UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Avaliação da solubilidade e da permeabilidade intestinal de
fármacos antirretrovirais. Aplicações na Classificação
Biofarmacêutica**

Thaís Marinho Pereira

Dissertação para obtenção
do Grau de **MESTRE**

Orientadora:

Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra

São Paulo

2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Avaliação da solubilidade e da permeabilidade intestinal de
fármacos antirretrovirais. Aplicações na Classificação
Biofarmacêutica**

Thaís Marinho Pereira

Dissertação para obtenção
do Grau de **MESTRE**

Orientadora:

Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra

São Paulo

2011

Ficha Catalográfica

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

Pereira, Thaisa Marinho

P436a Avaliação da solubilidade e da permeabilidade intestinal
de fármacos antirretrovirais. Aplicações na classificação
biofarmacêutica / Thaisa Marinho Pereira. -- São Paulo, 2011.
151p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador : Serra, Cristina Helena dos Reis

1. Biofarmácia 2. Biofarmacotécnica I. T. II. Serra, Cristina
Helena dos Reis, orientador.

615.4b CDD

Thaís Marinho Pereira

**Avaliação da solubilidade e da permeabilidade intestinal de fármacos
antirretrovirais. Aplicações na Classificação Biofarmacêutica**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra
Orientadora/Presidente

Profa. Dra. Kênnia Rocha Rezende
1º examinador

Profa. Dra. Jacqueline de Souza
2º examinador

São Paulo, 8 de março de 2012.

"Lembre-se de que somente os que têm convicção aceitam o desafio de vencer e que o tempo que perdem para aprender será sempre menor que o tempo que irão ganhar ao tomar posse do conhecimento. "

Autor desconhecido

Dedico este trabalho aos meus pais Charles e Etienne

Aos meus irmãos Júnior, Isis e Blenda

E ao meu querido noivo André

*"Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me mansamente a
águas tranqüilas. "*

Salmos 23:2

Agradecimentos

A Deus pelo dom da vida e por ser a base da minha existência.

Aos meus queridos pais Charles e Etiene pela constante compreensão, incentivo e apoio para a realização deste trabalho.

Aos meus queridos irmãos Júnior, Isis e Blenda pelo apoio e por me proporcionarem momentos de alegria.

Ao meu querido noivo André pela compreensão, companheirismo, incentivo e por sempre oferecer-me sua ajuda durante as diversas etapas deste trabalho.

Às minhas tias Dulce, Geni, Riso e à minha avó Ester pelo incentivo e apoio.

À Paula M., Paula L. e Joyce pelo companheirismo e compreensão.

À Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra pela confiança em mim depositada, pela paciência, incentivo e apoio para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Valentina Porta e ao Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz pelo apoio e contribuições.

À Claudinéia e ao Edgar pela atenção dispensada e pela amizade.

Aos colegas Francinalva, José Eduardo, Marina, Rafael M., Rafael P., Marize, Juliana, Michelle, Arthur, João e Mônica pelo companheirismo e contribuições.

À Marisa Rizzi (supervisora de P&D) da Cristália pela atenção dispensada e pela doação de matérias-primas e padrões de referência.

Aos secretários Bete, David, Alexandre, Jorge e Elaine pela atenção, paciência e dedicação.

Aos funcionários da biblioteca do Conjunto das Químicas pela revisão das referências, elaboração da ficha catalográfica e pela atenção dispensada.

Aos funcionários do biotério do Conjunto das Químicas pela atenção e por mostrarem-se sempre prestativos.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo suporte financeiro que viabilizou o desenvolvimento deste trabalho.

A todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram de forma significativa para este trabalho.

Sumário

RESUMO.....	i
ABSTRACT	iii
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 administrados por via oral	8
3.2. Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) e métodos empregados na determinação da solubilidade e da permeabilidade dos fármacos	16
3.2.1. Fundamentos do SCB	16
3.2.2. Métodos empregados na determinação da solubilidade de fármacos	19
3.2.3. Métodos empregados na determinação da permeabilidade de fármacos	22
3.2.3.1. Métodos físico-químicos	25
3.2.3.2. Métodos <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i>	26
a) Membrana artificial paralela (PAMPA).....	26
b) Células Caco-2	27
c) Células MDCK (<i>Madin-Darby canine kidney cells</i>)	28
d) Métodos que empregam tecidos animais	29

I.	Técnica do saco invertido.....	29
II.	Transporte <i>ex vivo</i> utilizando segmentos intestinais em câmaras de difusão	30
3.2.3.3.	Métodos <i>in vivo</i>	31
3.2.3.4.	Método de perfusão <i>in situ</i>	32
a)	Modelo animal em estudos de perfusão <i>in situ</i>	36
b)	Condições gerais dos estudos de perfusão <i>in situ</i>	37
c)	Efeito da CAE e fluxo dinâmico de água no lúmen intestinal	40
d)	Cálculo da permeabilidade efetiva (P_{ef}).....	43
e)	Cálculo da P_{ef} em seres humanos a partir dos resultados de P_{ef} em ratos	44
3.3.	Fármacos antirretrovirais	45
3.3.1.	Estavudina (d4T)	46
3.3.2.	Lamivudina (3TC)	47
3.3.3.	Zidovudina (AZT)	50
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1.	Materiais	54
4.1.1.	Materiais, solventes e reagentes	54
4.1.2.	Equipamentos e dispositivos diversos	54
4.2.	Métodos	55
4.2.1.	Determinação da solubilidade da d4T	55
4.2.1.1.	Preparo dos meios de solubilização para a determinação da solubilidade e da dissolução intrínseca	55

4.2.1.2. Determinação da solubilidade da d4T pelo método do equilíbrio (<i>shake-flask</i>).....	57
4.2.1.3. Determinação da dissolução intrínseca da d4T	58
4.2.2. Determinação da permeabilidade da d4t, 3TC e AZT utilizando o modelo de perfusão <i>in situ</i> em ratos	59
4.2.2.1. Preparo da solução de perfusão	59
4.2.2.2. Etapa cirúrgica e perfusão	60
4.2.2.3. Correção do fluxo de água	63
4.2.3. Quantificação dos fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT e dos marcadores fluoresceína e metoprolol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	65
4.2.3.1. Preparação das amostras	65
4.2.3.2. Condições cromatográficas.....	66
4.2.4. Análise estatística dos resultados.....	67
4.2.5. Validação dos métodos analíticos	68
4.2.5.1. Validação do método espectrofotométrico para a quantificação da d4T na determinação da solubilidade e da dissolução intrínseca.....	68
a) Linearidade.....	68
b) Especificidade/Seletividade	69
c) Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	69
d) Precisão	70
e) Exatidão	71

4.2.5.2. Validação do método cromatográfico para a quantificação dos fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT e dos marcadores fluoresceína e metoprolol	71
a) Condições cromatográficas	72
b) Linearidade.....	73
c) Especificidade/Seletividade	73
d) Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	74
e) Precisão	74
f) Exatidão	74
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	76
5.1. Determinação da solubilidade da d4T	77
5.2. Permeabilidade efetiva (P_{ef}) da d4T, 3TC e AZT	85
5.3. Validação do método espectrofotométrico para a quantificação da d4T na determinação da solubilidade e da dissolução intrínseca	100
5.4. Validação do método cromatográfico para a quantificação dos fármacos d4T, 3TC e AZT e dos marcadores fluoresceína e metoprolol	109
6. CONCLUSÕES	118
7. ASPECTOS LEGAIS DE BIOÉTICA	120
8. REFERÊNCIAS.....	122
9. ANEXOS	138

LISTA DE ABREVIATURAS

3TC: lamivudina

AZT: zidovudina

CAE: camada de água estacionária

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

d4T: estavudina

FDA: Food and Drug Administration

HIV: *human immunodeficiency vírus* (vírus da imunodeficiência humana)

ITRAN: inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo

P_{ap} : permeabilidade aparente

P_{ef} : permeabilidade efetiva

SCB: sistema de classificação biofarmacêutica

TDI: taxa de dissolução intrínseca

TFA: taxa de fluxo de água

TGI: trato gastrintestinal

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Representação da monocamada de enterócitos indicando o lado apical, lado basolateral e junções intercelulares	10
Figura 3.2: Mecanismos de transporte de fármacos através da membrana intestinal: (A) transporte por difusão passiva transcelular, (B) transporte por difusão passiva paracelular, (C1) transporte ativo mediado por carreadores de influxo, (C2) transporte ativo mediado por carreadores de efluxo, (D) transporte por endocitose (DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008).	14
Figura 3.3: Estrutura química da d4T (BALIMANE; SINKO, 1999; LI; CHAN, 1999) ..	46
Figura 3.4: Estrutura química da 3TC (BALIMANE; SINKO, 1999; LI; CHAN, 1999; WHO, 2006; STRAUCH et al., 2011)	48
Figura 3.5: Estrutura química da AZT (BALIMANE; SINKO, 1999; LI; CHAN, 1999)	50
Figura 5.1: Representação gráfica dos valores médios de solubilidade da d4T, indicados na parte superior das barras, nos diferentes meios empregados no estudo. Os resultados representam a média de três determinações obtidas pelo método do equilíbrio por 72 horas.....	78
Figura 5.2: Perfis de dissolução intrínseca da d4T em diferentes meios de solubilização (água purificada, meio pH 1,2, meio pH 4,5, meio pH 6,8 e meio pH 7,5) sob agitação de 50 rotações por minuto a $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	83
Figura 5.3: Representação gráfica dos resultados de P_{ef} para os fármacos d4T, 3TC e AZT e marcadores fluoresceína e metoprolol, obtidos por meio do modelo de perfusão <i>in situ</i> . Os resultados representam a média de seis determinações para a fluoresceína e de sete determinações para o metoprolol, d4T, 3TC e AZT. As barras de erros representam os desvios padrão para cada substância. Os asteriscos representam os índices de significância: * $p < 0,000$ em relação à fluoresceína, ** $p < 0,001$ em relação ao metoprolol.....	92

Figura 5.4: Curvas analíticas obtidas a partir da análise da d4T dissolvida em água, em meio pH 1,2, em meio pH 4,5, em meio pH 6,8 e em meio pH 7,5, através do método espectrofotométrico na região do UV, com comprimento de onda de 266 nm	101
Figura 5.5: Espectros de absorção na região do UV dos meios utilizados: água purificada (vermelho), meio pH 1,2 (azul), meio pH 4,5 (verde), meio pH 6,8 (roxo) e meio pH 7,5 (preto)	102
Figura 5.6: Espectros de absorção na região do UV da d4T dissolvida ($14 \mu\text{g.mL}^{-1}$) nos diferentes meios: água purificada (vermelho), meio pH 1,2 (azul), meio pH 4,5 (verde), meio pH 6,8 (roxo) e meio pH 7,5 (preto).....	103
Figura 5.7: Curvas analíticas da fluoresceína (a), metoprolol (b), d4T (c), 3TC (d), AZT (e) obtidas por CLAE	110
Figura 5.8: Cromatogramas obtidos com (a) fase móvel em detecção por UV, (b) fase móvel em detecção por fluorescência, (c) solução de perfusão em detecção por UV, (d) solução de perfusão em detecção por fluorescência, (e) metoprolol em detecção por UV, (f) fluoresceína em detecção por fluorescência, (g) d4T em detecção por UV, (h) 3TC em detecção por UV, (i) AZT em detecção por UV e (j) didanosina em detecção por UV	113

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1: Valores de pH nas porções do TGI em indivíduos normais nos estados de jejum e após a ingestão de alimentos.....	10
Quadro 3.2: Classificação dos fármacos de acordo com o SCB.....	16
Quadro 3.3: Limites de P_{ap} e P_{ef} propostos para a classificação de fármacos quanto à permeabilidade utilizando células Caco-2 e o método de perfusão <i>in situ</i> em ratos, respectivamente	24
Quadro 3.4: Principais variáveis referentes ao modelo de perfusão <i>in situ</i> e condições adotadas nos estudos relatados na literatura para a obtenção dos resultados de permeabilidade	36
Quadro 3.5: Principais componentes utilizados no preparo de soluções de perfusão	39
Quadro 4.1: Procedimentos de preparo das soluções tampão utilizadas nos estudos de solubilidade e de dissolução intrínseca da d4T	56
Quadro 4.2: Concentração dos fármacos na solução de perfusão para o estudo de permeabilidade utilizando o modelo de perfusão <i>in situ</i>	60
Quadro 4.3: Condições cromatográficas empregadas para a análise e quantificação de fluoresceína, metoprolol, d4T, 3TC e AZT	67
Quadro 4.4: Concentrações das curvas analíticas para cada solução padrão e suas respectivas soluções de padrão interno.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1: Valores médios da solubilidade em mg.mL^{-1} , desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) da d4T nos diferentes meios empregados no estudo de solubilidade pelo método do equilíbrio	77
Tabela 5.2: Valores médios da razão D:S (em mL)	80
Tabela 5.3: Valores da quantidade média dissolvida acumulada (D) em mg/cm^2 da d4T em função do tempo de coleta em cada um dos meios de solubilização empregados no estudo.....	82
Tabela 5.4: Parâmetros relativos aos perfis de dissolução intrínseca da d4T	84
Tabela 5.5: TDI da d4T obtidas nos diferentes meios	85
Tabela 5.6: Valores médios de TFA em $\mu\text{L/h/cm}$ obtidos por meio do método gravimétrico para cada animal em cada experimento de permeabilidade.....	86
Tabela 5.7: Resultado de P_{ef} da fluoresceína (média de seis determinações) e respectivo desvio padrão obtidos a partir do presente estudo por meio do modelo de perfusão <i>in situ</i> em ratos e resultados de P_{ap} da fluoresceína obtidos da literatura (limite de quantificação = $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	88
Tabela 5.8: Resultados de P_{ef} do metoprolol ($n = 7$) e respectivo desvio padrão obtido a partir do presente estudo por meio do modelo de perfusão <i>in situ</i> em ratos e resultados de P_{ap} do metoprolol obtidos da literatura	90
Tabela 5.9: Resultados de P_{ef} em cm.s^{-1} obtidos a partir dos ensaios de permeabilidade com os fármacos d4T, 3TC e AZT e com os marcadores fluoresceína e metoprolol	92
Tabela 5.10: Valores de F e p resultantes da comparação estatística dos resultados de P_{ef} para os fármacos d4T, 3TC e AZT e para os marcadores fluoresceína e metoprolol	93
Tabela 5.11: Resultados de P_{ef} obtidos por meio do modelo de perfusão <i>in situ</i> e os dados descritos na literatura para os fármacos do presente trabalho	95

Tabela 5.12: Resultados preditivos da P_{ef} em seres humanos obtidos a partir dos resultados de P_{ef} em ratos com o emprego do modelo de perfusão <i>in situ</i>	100
Tabela 5.13: Parâmetros relativos às curvas analíticas obtidas por análise espectrofotométrica de soluções de d4T em diferentes meios.....	101
Tabela 5.14: Valores do intercepto com o eixo Y, DP_a , média das inclinações das três retas e LD. Onde DP_a corresponde ao desvio padrão do intercepto com o eixo Y das três curvas analíticas	104
Tabela 5.15: Valores do intercepto com o eixo Y, DP_a , média das inclinações das três retas e LQ.....	105
Tabela 5.16: Valores de concentração teórica (CT), concentração média experimental (CME), desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR), referentes à determinação da precisão intraensaio do método.....	106
Tabela 5.17: Valores de concentração teórica (CT), concentração média experimental (CME), desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR), referentes à determinação da precisão intermediária do método para a quantificação da d4T em diferentes meios de solubilização	107
Tabela 5.18: Valores de concentração teórica (CT), concentração média experimental (CME), desvio padrão (DP) e exatidão, referentes à determinação da exatidão do método para a quantificação da d4T.....	108
Tabela 5.19: Parâmetros relacionados à regressão linear das curvas analíticas definidas para a quantificação da d4T, 3TC, AZT, fluoresceína e metoprolol	111
Tabela 5.20: Valores de LD e LQ. Precisão e exatidão do método na concentração de $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para fluoresceína, $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para metoprolol, $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para d4T, $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para 3TC e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para AZT	114
Tabela 5.21: Resultados referentes à precisão (intraensaio e interensaio) do método analítico para a quantificação da d4T, 3TC, AZT, fluoresceína e metoprolol.....	115

Tabela 5.22: Resultados referentes à exatidão do método analítico para a quantificação da d4T, 3TC, AZT, fluoresceína e metoprolol	117
---	-----

PEREIRA, T.M. **Avaliação da solubilidade e da permeabilidade intestinal de fármacos antirretrovirais. Aplicações na Classificação Biofarmacêutica.** São Paulo, 2011. 151p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

RESUMO

A biodisponibilidade de um fármaco é o fator determinante da eficácia clínica e depende principalmente das seguintes etapas: liberação da substância ativa a partir da forma farmacêutica e absorção. Assim, o controle da extensão e da velocidade de absorção de um fármaco administrado por via oral depende basicamente de dois aspectos: solubilidade nos líquidos fisiológicos e permeabilidade através das membranas biológicas. Fundamentado nestas características, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto como ferramenta que permite a classificação dos fármacos e tem como finalidade auxiliar nas bioensaios e na predição da biodisponibilidade *in vivo*. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a solubilidade da estavudina e a permeabilidade intestinal de fármacos antirretrovirais por meio do modelo de perfusão *in situ*. Os meios empregados nos estudos de solubilidade e dissolução intrínseca foram: água purificada, tampão pH 1,2, tampão pH 4,5, tampão pH 6,8 e tampão pH 7,5. Para a determinação da solubilidade pelo método do equilíbrio (técnica *shake-flask*), quantidades conhecidas do fármaco foram adicionadas em cada meio até atingir a saturação e esta mistura foi submetida à agitação de 150 rpm por 72 horas a 37°C. Para os ensaios de dissolução intrínseca, quantidade conhecida de estavudina foi compactada na matriz do aparato de Wood e submetida à dissolução em cada meio, sob agitação de 50 rpm a 37°C. A determinação da permeabilidade dos antirretrovirais foi realizada empregando o modelo de perfusão *in situ* em ratos machos Wistar. Uma porção do jejuno foi isolada e a solução de perfusão (pH 6,5) contendo o fármaco foi perfundida a um fluxo de 0,2 mL.min⁻¹ a 37°C por 120 minutos. Os resultados obtidos referentes à solubilidade da estavudina pelo método do equilíbrio foram (em mg.mL⁻¹): 146,49 (água), 149,22 (pH 4,5), 139,43 (pH 6,8) e 130,15 (pH 7,5). A determinação da razão dose:solubilidade (D:S) em cada meio permitiu a obtenção dos seguintes resultados (em mL): 0,27 (água), 0,27 (pH 4,5), 0,29 (pH 6,8) e 0,31 (pH 7,5). Tais dados indicaram que este fármaco apresenta alta solubilidade nos meios utilizados no estudo, exceto em meio pH 1,2, onde a estavudina apresentou instabilidade demonstrada pela presença de coloração e odor alterados, inviabilizando a determinação da solubilidade nestas condições. Os ensaios de dissolução intrínseca da estavudina permitiram a determinação das taxas de dissolução intrínseca (TDI), as quais foram (em mg/min/cm²): 2,3570 (água), 2,7389 (pH 1,2), 2,7590 (pH 4,5) e 2,5947 (pH 6,8), demonstrando que este fármaco apresenta alta velocidade de dissolução nos meios utilizados. Com relação ao estudo de permeabilidade por meio do modelo de perfusão *in situ*, nas condições experimentais empregadas, os resultados obtidos foram (em cm.s⁻¹): 3,96 x 10⁻⁵ (estavudina), 3,08 x 10⁻⁵ (lamivudina) e 4,17 x 10⁻⁵ (zidovudina) sugerindo que os fármacos estavudina e zidovudina apresentam alta permeabilidade. Para a lamivudina não é descartada a possibilidade de ser considerada como fármaco de alta permeabilidade, mesmo apresentando resultado ligeiramente abaixo em relação aos outros dois antirretrovirais utilizados no estudo.

Palavras-chave: Permeabilidade, Solubilidade, Antirretrovirais, Estavudina; Lamivudina, Zidovudina, Perfusão *in situ*.

ABSTRACT

PERERA, T.M. **Evaluation of solubility and intestinal permeability of antiretroviral drugs. Biopharmaceutical Classification.** São Paulo, 2011. 151p. [Master's Degree Dissertation] - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo.

ABSTRACT

Drug's bioavailability is a determinant factor of clinical efficacy and it depends on the following steps: release of active ingredient from the dosage form and absorption. Thus, control of extent and rate of absorption of a drug orally administered depends on two aspects: the drug solubility in physiological fluids and permeability across biological membranes. Based on these characteristics, the Biopharmaceutical Classification System (BCS) was proposed as a tool that allows the drug's classification and it assists in biowaiver and *in vivo* bioavailability prediction. The aim of this study was to evaluate stavudine solubility and intestinal permeability of antiretroviral drugs through the *in situ* perfusion model. The means employed in the solubility studies and intrinsic dissolution were: purified water, buffer pH 1.2, buffer pH 4.5, buffer pH 6.8 and buffer pH 7.5. For solubility study by equilibrium method (shake-flask technique), known amounts of the drug were added in each media to reach saturation and the mixture was subjected to agitation of 150 rpm for 72 hours at 37°C. For intrinsic dissolution test, known amount of stavudine has been compressed in the matrix of Wood's apparatus and subjected to dissolution in each media with agitation of 50 rpm at 37°C. Permeability evaluation of antiretroviral drugs was performed using the *in situ* perfusion model in male Wistar rats. A portion of jejunum was isolated and perfusion solution (pH 6.5) with the drug was perfused at 0.2 mL/min at 37°C for 120 minutes. Results of stavudine solubility by equilibrium method were (in mg/mL): 146.49 (water), 149.22 (pH 4.5), 139.43 (pH 6.8) and 130.15 (pH 7.5). Dose:solubility (D:S) ratio determinations allowed to obtain the following results (in mL): 0.27 (water), 0.27 (pH 4.5), 0.29 (pH 6.8) and 0.31 (pH 7.5). These results indicate that stavudine has high solubility in the means employed in this study, except in buffer pH 1.2, where stavudine showed instability demonstrated by presence of stain and odor changed, which prevented the determination of solubility in these conditions. The intrinsic dissolution study allowed the determination of intrinsic dissolution rates (IDR), which were (in mg/min/cm²): 2.3570 (water), 2.7389 (pH 1.2), 2.7590 (pH 4.5) and 2.5947 (pH 6.8), demonstrating that this drug has a high dissolution rate in each media used. In permeability study through the *in situ* perfusion model, under experimental conditions adopted, the results obtained were (in cm/s): 3.96×10^{-5} (stavudine), 3.08×10^{-5} (lamivudine) and 4.17×10^{-5} (zidovudine), suggesting that stavudine and zidovudine have high permeability. It's possible that lamivudine might be considered high permeability drug, although its effective permeability result was slightly lower compared to effective permeability of stavudine and zidovudine.

Keywords: Permeability, Solubility, Antiretrovirals, Stavudine, Lamivudine, Zidovudine, *in situ* Perfusion.

1. INTRODUÇÃO

A biodisponibilidade corresponde a uma propriedade biológica e é definida como a velocidade e a extensão pelas quais um fármaco é absorvido a partir de uma forma farmacêutica e se torna disponível no sítio de ação (UNITED STATES, 2003). Para um medicamento administrado por via oral, esta propriedade depende principalmente da liberação/dissolução do fármaco a partir da forma farmacêutica nos líquidos do trato gastrointestinal (TGI) e da absorção do mesmo através da parede do TGI, parâmetros estes relacionados às propriedades de solubilidade e permeabilidade. Além destes fatores, são também determinantes da adequada biodisponibilidade oral de um fármaco os seguintes aspectos: estabilidade química da substância nos líquidos do TGI, resistência à degradação enzimática e ao metabolismo pré-sistêmico, características farmacocinéticas que determinam a distribuição, metabolização e eliminação. De forma resumida, pode-se afirmar que a biodisponibilidade oral depende de três parâmetros fundamentais: fração da dose absorvida, fração do fármaco que resiste ao metabolismo na parede intestinal e fração do fármaco que resiste ao metabolismo hepático (SMITH, 1996; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; CAO et al., 2006; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008; DAHAN; AMIDON, 2009).

Considerando que a permeação ocorre somente após a solubilização do fármaco, os processos de desintegração da forma farmacêutica sólida, liberação e dissolução são fundamentais e determinantes da etapa seguinte: a absorção. A solubilidade das partículas da substância pode ser influenciada pelos seguintes aspectos: i) em relação ao fármaco: características moleculares, constantes de ionização, lipossolubilidade, tamanho e forma das partículas, ii) em relação às propriedades farmacêuticas: excipientes, forma farmacêutica e tecnologia de fabricação, iii) em relação aos fatores fisiológicos do TGI: pH do meio de dissolução, presença de enzimas, presença de sais biliares, motilidade do TGI, tempo de esvaziamento gástrico, presença de alimentos e, sobretudo, superfície de absorção e mecanismos de transporte envolvidos nos processos de permeabilidade dos fármacos (GRASS, 1997).

Os principais mecanismos descritos na literatura envolvidos nos processos de permeabilidade de fármacos são: transporte passivo transcelular (ocorre através das membranas dos enterócitos), transporte passivo paracelular (entre os enterócitos, pelos espaços intercelulares), transporte ativo (pela atuação de proteínas transportadoras de influxo ou efluxo) e transporte por endocitose (ocorre

pela formação de vesículas formadas a partir da membrana plasmática, envolvendo partículas). Geralmente, o transporte intestinal do fármaco envolve mais de um mecanismo de permeação e depende das características de solubilidade e permeabilidade do mesmo (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; COOK; SHENOY, 2003; DEL AMO; HEIKKINEN; MÖNKKÖNEN, 2009).

Destacando as propriedades de solubilidade e permeabilidade intestinal dos fármacos, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto como ferramenta para auxiliar na predição da biodisponibilidade *in vivo* e permitir, desta forma, o adequado desenvolvimento de novos compostos, de formulações e de novos sistemas de liberação de fármacos (AMIDON et al., 1995). O SCB também vem sendo aplicado nas bioisenções, ou seja, nas isenções de estudos de bioequivalência para alguns medicamentos genéricos, facilitando, desta forma, o registro destes produtos (UNITED STATES, 2000; EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2001; BRASIL, 2011a).

Com a criação do SCB, tornou-se imperativo a investigação por métodos ou modelos mais apropriados para a determinação da solubilidade e da permeabilidade dos fármacos que permitam resultados mais próximos daqueles obtidos em condições fisiológicas ou, mais especificamente, *in vivo*. Para a determinação da solubilidade de um fármaco, os métodos preconizados pela FDA são: método do equilíbrio (técnica *shake-flask*) e métodos potenciométricos. Procedimentos como titulação podem ser usados mediante justificativa que suporte que tais métodos possam prever a solubilidade em equilíbrio da substância teste (UNITED STATES, 2000).

A utilização do método de dissolução intrínseca também pode auxiliar na caracterização da solubilidade de um fármaco. A taxa de dissolução e a solubilidade são de grande importância nos casos de pré-formulação de formas farmacêuticas (YU et al., 2002; YU et al., 2004; ZAKERI-MILANI et al., 2009).

Para o estudo de permeabilidade intestinal, diversos modelos têm sido atualmente empregados com o objetivo de caracterizar a permeabilidade de uma substância ativa, dentre eles: modelos *in vitro* e *ex vivo* que empregam membranas artificiais paralelas, culturas celulares e segmentos intestinais de animais, modelos *in vivo* que contemplem os estudos farmacocinéticos em animais ou em seres humanos, modelos *in silico* que empregam programas computacionais para a previsão da permeabilidade de fármacos e, finalmente,

modelos *in situ* que consistem na perfusão do fármaco em determinados trechos do intestino. Este último descrito na literatura como técnica de perfusão *in situ* tem se destacado como um procedimento cada vez mais utilizado para prever a absorção de fármacos de administração oral em seres humanos por apresentar inúmeras vantagens em relação aos demais métodos (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009).

Neste contexto, o presente trabalho teve como proposta avaliar a solubilidade da estavudina e a permeabilidade intestinal dos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina por meio do modelo de perfusão *in situ*. Estes fármacos apresentam semelhanças estruturais e são amplamente empregados na farmacoterapia de pacientes infectados pelo vírus HIV, além de fazerem parte do programa nacional de combate à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids) do ministério da saúde. Porém, a escassez e/ou a divergência de dados relacionados às características de solubilidade e permeabilidade destes fármacos levaram ao desenvolvimento do presente trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo a determinação da solubilidade da estavudina e da permeabilidade intestinal de fármacos antirretrovirais (estavudina, lamivudina e zidovudina) por meio do modelo de perfusão *in situ*.

2.2. Objetivos específicos

- i. Determinação da solubilidade da estavudina, conforme o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), utilizando o método do equilíbrio (técnica *shake-flask*).
- ii. Determinação da dissolução intrínseca da estavudina.
- iii. Padronização da técnica para a determinação da permeabilidade em segmentos intestinais de ratos da linhagem Wistar, por meio do modelo de perfusão *in situ*.
- iv. Determinação da permeabilidade efetiva dos fármacos estavudina, lamivudina e zidovudina empregando o modelo de perfusão *in situ*.
- v. Desenvolvimento do método analítico espectrofotométrico para a quantificação da estavudina nos estudos de solubilidade e dissolução intrínseca.
- vi. Desenvolvimento do método analítico cromatográfico para a quantificação dos fármacos estavudina, lamivudina e zidovudina nos estudos de permeabilidade.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Absorção de fármacos administrados por via oral

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 (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; LENNERNAS; ABRAHAMSSON, 2005; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008).

A eficácia e segurança de um fármaco administrado por via oral estão relacionadas à biodisponibilidade, que é uma propriedade biológica referente à extensão e à taxa de absorção. A absorção oral está relacionada ao processo de liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica (dissolução/solubilidade) nos líquidos corpóreos e à permeabilidade da substância ativa através das membranas biológicas. Portanto, as etapas de solubilidade e permeabilidade são fundamentais para o processo de absorção (CUSTODIO; WU; BENET, 2008).

Dados provenientes de estudos de biodisponibilidade podem fornecer uma estimativa da fração absorvida do fármaco, da sua distribuição e eliminação (UNITED STATES, 2003). Estes estudos são realizados tanto para a aprovação de um novo princípio ativo (registro de um novo produto) como para a aprovação e registro de uma nova formulação, ou, ainda, para o registro dos medicamentos genéricos e similares. Os ensaios de biodisponibilidade relativa ou bioequivalência, empregados na análise comparativa dos produtos candidatos a genéricos e similares com os respectivos produtos de referência, permitem avaliar, em condições pré-estabelecidas, a concentração plasmática do fármaco em função do tempo para um medicamento teste e um medicamento referência (KANO et al., 2005; BRASIL, 2006; ARMANDO, 2008; SERRA et al., 2008).

A maioria dos fármacos destinados à administração por via oral é absorvida no intestino delgado, principalmente no duodeno e na porção proximal do jejuno. O intestino delgado representa 60% do trato gastrointestinal (TGI) e é dividido em três importantes porções: duodeno, jejuno e íleo. Cerca de 90% dos processos de absorção acontecem no intestino delgado, uma vez que sua superfície apresenta projeções conhecidas como vilosidades, as quais são dotadas de microvilosidades responsáveis por aumentar a área de superfície absorptiva, tornando a absorção mais eficiente (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DESESSO; JACOBSON, 2001).

Ao longo do TGI é observado um gradiente de pH em diferentes regiões em função dos aspectos fisiológicos envolvidos nos processos de digestão. No estado de jejum, o estômago apresenta uma faixa de pH de 1,0 a 2,0 e no duodeno o pH aumenta para uma faixa de 4,0 a 5,4 em função da presença de íons bicarbonato secretados através do ducto pancreático. Entre o jejuno proximal e o íleo distal, o pH se eleva de forma gradual para uma faixa de 4,4 a 8,0. Assim, a hipótese de partição pelo pH prevê que a absorção de fármacos ionizáveis podem ser local-específica (AVDEEF, 2003; ASHFORD, 2005a). O Quadro 3.1 apresenta os valores de pH nas porções do TGI em indivíduos normais nos estados de jejum e após a ingestão de alimentos.

A parede intestinal é composta por quatro camadas: camada serosa, camada muscular externa, submucosa e mucosa intestinal. Esta última, por sua vez, é composta por uma monocamada celular superficial, membrana basal, lâmina própria e lâmina muscular da mucosa. A porção superficial é formada por diversos tipos celulares, mas principalmente por células colunares conhecidas como enterócitos (ou células absorptivas) (DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008).

Os enterócitos são as células responsáveis pela absorção de substâncias no TGI e apresentam grande capacidade absorptiva em função da presença de microvilosidades em sua superfície. Estas células são polarizadas, ou seja, estão organizadas de modo a apresentarem uma porção apical (voltada para o lúmen intestinal) e outra basolateral (voltada para os vasos sanguíneos), conforme demonstrado na Figura 3.1. Os enterócitos formam uma monocamada celular e são unidos por junções intercelulares (BALIMANE, CHONG, MORRISON, 2000; AVDEEF, 2003).

As junções intercelulares (também conhecidas como junções íntimas) apresentam poros que permitem a difusão de moléculas pequenas, hidrofílicas e polares através do espaço paracelular (entre as células), o qual apresenta variações ao longo do intestino. Assim, as junções intercelulares, juntamente com as características lipídicas das membranas e a camada de água estacionária, formam as principais barreiras físicas à passagem de moléculas (ARTURSSON; UNGELL; LÖFROTH, 1993; AVDEEF, 2003; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008).

Quadro 3.1: Valores de pH nas porções do TGI em indivíduos normais nos estados de jejum e após a ingestão de alimentos

local do TGI	pH	
	jejum	após a ingestão de alimentos
estômago	1,0-2,0	2,0-5,0
duodeno	4,0-5,4	4,9-5,9
jejuno	4,4-6,5	5,2-6,0
íleo	6,8-8,0	6,8-7,8
cólon	5,5-7,0	6,5-8,0

Fonte: AVDEEF, 2003; ASHFORD, 2005a.

Figura 3.1: Representação da monocamada de enterócitos indicando o lado apical, lado basolateral e junções intercelulares

Os processos de absorção de fármacos dependem de inúmeros fatores que interferem na velocidade e na extensão de absorção, tais como: físico-químicos, fatores inerentes à forma farmacêutica e formulação, além de fatores

fisiológicos (GRASS, 1997; MARTINEZ; AMIDON, 2002; DEFERME; ANNEART; AUGUSTINJS, 2008; GRIFFIN; O'DRISCOLL, 2008; KARALIS et al., 2008; VOLPE, 2010).

Os fatores físico-químicos estão relacionados às características intrínsecas do fármaco, tais como: solubilidade, Log-P, pKa, taxa de dissolução, formação de pontes de hidrogênio, peso e tamanho moleculares e área de superfície polar (GRASS, 1997; DRESSMAN et al., 1998; MARTINEZ; AMIDON, 2002; DEFERME; ANNAERT; AGUSTIJNS, 2008; GRIFFIN; O'DRISCOLL, 2008).

Fatores relacionados à forma farmacêutica e formulação também podem afetar a absorção de um fármaco e incluem: tipo de forma farmacêutica, presença de promotores de absorção nas formulações, taxas de desintegração e dissolução da forma farmacêutica, mecanismos de liberação de fármacos no processo de dissolução e influência dos excipientes presentes na formulação (DRESSMAN et al., 1998; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008; GRIFFIN; O'DRISCOLL, 2008; KARALIS et al., 2008).

A solubilidade do fármaco em meios fisiológicos é de suma importância para que a absorção ocorra, uma vez que este parâmetro depende da substância adequadamente solubilizada nos fluidos intestinais. Existem fatores que interferem diretamente na solubilidade do fármaco no TGI, tais como: pH do meio de dissolução, pKa do fármaco, polimorfismo, tamanho das partículas, taxa de dissolução e forma farmacêutica. No TGI, os sais biliares podem favorecer a dissolução de fármacos de natureza hidrofóbica, tais como colesterol e fármacos altamente lipofílicos, aumentando a biodisponibilidade dos mesmos (CHARMAN et al., 1997). Uma vez solubilizado, o fármaco estará livre para permear a membrana intestinal e, desta forma, ser absorvido dependendo apenas dos fatores que interferem na permeação (HINTZ; JOHNSON, 1989; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1995; GRASS, 1997; MARTINEZ; AMIDON, 2002; RAW et al., 2004; ASHFORD, 2005b).

Os fatores fisiológicos relacionam-se com as características *in vivo* e são altamente variáveis, podendo haver diferenças inter e intraindividuais. São eles: esvaziamento gástrico, motilidade intestinal, área de superfície da membrana intestinal, mecanismos de transporte envolvidos, presença de sais biliares, secreções intestinais e enzimas, alterações do pH do meio (podendo comprometer a solubilização ou promover a degradação), metabolismo pré-

hepático no enterócito, expressão de transportadores de influxo e efluxo, suprimento sanguíneo intestinal e vasos linfáticos no TGI, conteúdo e composição luminal (GRAS, 1997; MARTINEZ; AMIDON, 2002; CUSTODIO; WU; BENET, 2008; DEFERME; ANNAERT; AGUSTIJNS, 2008; GRIFFIN; O'DRISCOLL, 2008; KARALIS et al., 2008).

Além dos fatores acima citados que interferem na absorção, o fármaco deverá superar as barreiras bioquímicas e físicas.

Na superfície da parede intestinal, a presença de enzimas metabolizadoras constitui uma importante barreira bioquímica à absorção de fármacos e podem estar relacionadas à microflora presente ao longo do TGI ou a enzimas presentes nos fluidos luminiais. Fármacos que são pouco ou incompletamente absorvidos pela mucosa intestinal estão mais expostos às enzimas, favorecendo o metabolismo pré-sistêmico e, com isso, poderá haver alterações na biodisponibilidade destas substâncias. As principais enzimas presentes na superfície da mucosa pertencem à subfamília CYP3A, pois estas são expressas em altos níveis nas microvilosidades dos enterócitos (KIVISTÖ et al., 1996; WACHER; SALPHATI; BENET, 2001; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008).

Além da barreira bioquímica, a camada de água estacionária (CAE) constitui uma importante barreira física à absorção intestinal de substâncias. Esta camada limita a difusão passiva de fármacos juntamente com a presença de muco e células na parede intestinal (LARHED et al., 1997; MUDRA; BORCHARDT, 2010).

As microvilosidades dos enterócitos apresentam glicoproteínas (glicocálice) que se projetam em direção ao fluido luminal. Células caliciformes presentes na monocamada intestinal são responsáveis por produzir a camada de muco que reveste o glicocálice (AVDEEF, 2003).

O glicocálice e a camada de muco promovem a estagnação de água nas adjacências da parede intestinal formando uma região conhecida como CAE. A espessura desta camada é variável e *in vivo* é estimada como sendo entre 30 a 100 µm. Por outro lado, em tecidos isolados e na ausência de agitação, esta camada poderá apresentar um intervalo de espessura que varia de 300 a 700 µm. A CAE representa uma região diferenciada das condições luminiais, ou seja, o pH na camada pode ser regulado de forma independente do pH luminal

(LENNERNAS, 1998; AVDEEF, 2003; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008; REIS; SINKO; SERRA, 2010; SUGANO, 2010).

Sendo a CAE uma barreira física, o fármaco a ser absorvido deverá primeiramente superar este obstáculo antes de atravessar a membrana biológica. A absorção de compostos altamente lipofílicos é limitada pela CAE em virtude da composição aquosa desta camada. Por outro lado, a permeação através da monocamada epitelial é rápida devido à constituição lipídica da membrana biológica. Assim, a transposição da CAE representa uma barreira limitante à absorção de substâncias hidrofóbicas (SUGANO, 2010).

Em alguns casos, a CAE pode atuar como um reservatório de substâncias. Quando a concentração do fármaco aumenta no lúmen intestinal ou o tamanho da partícula é diminuído, as moléculas solubilizadas se difundem em direção à membrana epitelial em razão do aumento no número de partículas na camada (SUGANO, 2010).

Um importante fenômeno que ocorre no TGI é a movimentação de água através do epitélio intestinal (absorção e secreção). Este processo ocorre de forma constante e ao longo de todo o TGI, tanto pela via paracelular como pela via transcelular, porém a sua magnitude ainda não é compreendida. Tal movimentação pode estar relacionada ao transporte de íons ou é influenciada por um gradiente osmótico, interferindo na concentração da substância a ser absorvida presente no lúmen (LANE; LEVIS; CORRIGAN, 2006).

A absorção de fármacos é um processo dinâmico e complexo e pode ocorrer por um ou mais mecanismos de transporte através da membrana biológica, são eles: transporte passivo transcelular (ocorre através das membranas dos enterócitos), transporte passivo paracelular (ocorre entre os enterócitos, pelos espaços intercelulares), transporte ativo (pela atuação de proteínas transportadoras de influxo ou efluxo) e transporte por endocitose (ocorre pela formação de vesículas formadas a partir da membrana plasmática, envolvendo partículas). Para que uma substância atravessasse a monocamada de enterócitos, muitas vezes mais de um tipo de mecanismo está envolvido. A Figura 3.2 ilustra os principais mecanismos de transporte de substâncias (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; COOK; SHENOY, 2003; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008; DEL AMO; HEIKKINEN; MÖNKKÖNEN, 2009).

Figura 3.2: Mecanismos de transporte de fármacos através da membrana intestinal: (A) transporte por difusão passiva transcelular, (B) transporte por difusão passiva paracelular, (C1) transporte ativo mediado por carreadores de influxo, (C2) transporte ativo mediado por carreadores de efluxo, (D) transporte por endocitose (DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008).

O transporte pela monocamada epitelial depende do gradiente de concentração e das características de permeação do fármaco através da CAE e através das membranas apical e basolateral. A composição da membrana plasmática é predominantemente lipídica e fármacos que apresentam características lipofílicas conseguem se difundir pelo epitélio, atravessando-o por via transcelular passiva (DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008).

A via paracelular, conforme mencionado anteriormente, localiza-se entre os enterócitos, nos espaços intercelulares e constitui a principal rota de transporte intestinal de substâncias. Apenas moléculas pequenas, hidrofílicas e com carga conseguem transpor a membrana intestinal por esta via, que normalmente resulta em baixa absorção oral devido à limitada área de superfície. Além disso, a via paracelular é mais expressiva nas porções superiores do intestino delgado (ARTURSSON; UGELL; LÖFROTH, 1993; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008).

Os carreadores de influxo e de efluxo na superfície epitelial constituem outro tipo de via de transporte de substâncias. Tais mecanismos ativos (influxo e

efluxo) estão condicionados a um gradiente de concentração eletroquímico e são processos passíveis de saturação. As proteínas transportadoras de influxo são responsáveis por interagir com o fármaco (uma vez que este tenha afinidade pela proteína) e por transportá-los ativamente (com gasto de energia) no sentido apical-basolateral através do enterócito, ou seja, de forma transcelular (COOK; SHENOY, 2003; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008). Proteínas transportadoras de efluxo, por sua vez, atuam fazendo a secreção de fármacos, ou seja, realizam o transporte de substâncias do enterócito para o lúmen intestinal de forma ativa. Da mesma maneira que acontece com o transporte ativo transcelular, esse mecanismo apenas ocorre quando o fármaco é substrato deste tipo de carreador. Portanto, a ocorrência de efluxo de uma determinada substância ativa pode causar alterações na biodisponibilidade oral, além de expor o fármaco às enzimas metabolizadoras presentes na parede intestinal (BERGGREN et al., 2004; JAIN et al., 2007; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008; DEL AMO; HEIKKINEN; MÖNKKÖNEN, 2009; MUDRA; BORCHARDT, 2010).

Existem diferentes transportadores de efluxo presentes na membrana intestinal, porém o mais estudado é a glicoproteína-P (P-gp). Este carreador localiza-se na porção apical dos enterócitos e atua como uma barreira à absorção por transportar ativamente substâncias do espaço intracelular de volta para o lúmen intestinal. A P-gp foi primeiramente isolada de células tumorais, onde foi observada a expulsão de agentes quimioterápicos do interior celular, conferindo múltipla resistência a fármacos. Além do TGI (onde sua expressão é variada de acordo com a região intestinal), esta glicoproteína é encontrada em diversos tecidos saudáveis, tais como: barreira hematoencefálica, placenta, fígado e rins (KATSURA; INUI, 2003; DAHAN; AMIDON, 2009; DEL AMO; HEIKKINEN; MÖNKKÖNEN, 2009; MUDRA; BORCHARDT, 2010).

Por fim, endocitose é um mecanismo de transporte onde uma substância é absorvida a partir da formação de vesícula procedente da membrana plasmática da célula e é importante para o transporte de macromoléculas como nucleotídeos, peptídeos e pequenas proteínas. Existem três tipos de endocitose: pinocitose (envolvimento de partículas líquidas), fagocitose (envolvimento de partículas sólidas) e endocitose mediado por receptores (GONÇALVES; SOUZA; STORPIRTIS, 2009).

3.2. Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) e métodos empregados na determinação da solubilidade e da permeabilidade dos fármacos

3.2.1. Fundamentos do SCB

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto em 1995 por Amidon e colaboradores e representa uma importante ferramenta para o desenvolvimento de novos fármacos e formulações farmacêuticas. Este sistema é fundamentado no princípio de que o controle da extensão e velocidade de absorção de um fármaco administrado por via oral depende basicamente de dois fatores: a solubilidade do próprio fármaco e sua permeabilidade através das membranas biológicas. Assim, o SCB divide os fármacos em quatro classes, conforme demonstrado no Quadro 3.2. Com o auxílio do SCB é possível prever variáveis na absorção oral do fármaco, tais como: formulação, presença de alimentos, posologia, entre outras (AMIDON et al., 1995; MARTINEZ; AMIDON, 2002; LENNERNÄS, 2007; MASUNGI et al., 2008; CHEN; YU, 2009).

Quadro 3.2: Classificação dos fármacos de acordo com o SCB

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

Fonte: AMIDON et al., 1995; PADE; STAVCHANSKY, 1998.

Este sistema de classificação divide os fármacos em quatro classes distintas de acordo com as seguintes características:

Classe I (alta solubilidade – alta permeabilidade): são fármacos rápida e completamente absorvidos, com extensão de absorção maior que 90%. Para alguns fármacos, no entanto, a biodisponibilidade pode ser limitada devido ao metabolismo pré-sistêmico. Os fatores limitantes para a absorção de um fármaco classe I é a dissolução e/ou o esvaziamento gástrico (AMIDON et al., 1995; PADE; STAVCHANSKY, 1998; UNITED STATES, 2000; BONAMICI, 2009).

Classe II (baixa solubilidade – alta permeabilidade): o fator limitante do processo de absorção é a solubilidade do fármaco no TGI. As variabilidades na absorção de fármacos classe II podem ser devidas às diferenças de formulação e variáveis fisiológicas. Como o conteúdo intestinal e a membrana luminal mudam ao longo do intestino, o perfil de dissolução determinará a concentração do fármaco por um período maior e a absorção levará mais tempo para ocorrer, quando comparado com fármaco classe I (AMIDON et al., 1995; PADE; STAVCHANSKY, 1998; UNITED STATES, 2000; BONAMICI, 2009).

Classe III (alta solubilidade – baixa permeabilidade): a etapa limitante no processo de absorção para fármacos desta classe é a permeabilidade através da membrana intestinal. A velocidade e a extensão da absorção destas substâncias podem ser altamente variáveis devido às diferenças no trânsito gastrointestinal, conteúdo luminal e permeabilidade da membrana. O perfil de dissolução é bem definido e a passagem do fármaco para o intestino é controlada pela taxa de esvaziamento gástrico (AMIDON et al., 1995; PADE; STAVCHANSKY, 1998; UNITED STATES, 2000; BONAMICI, 2009).

Classe IV (baixa solubilidade – baixa permeabilidade): são fármacos que possuem alta variabilidade na velocidade e extensão de absorção. Possuem absorção muito baixa, apresentando problemas quando administrados por via oral e não é esperada uma correlação *in vitro* - *in vivo* (AMIDON et al., 1995; PADE; STAVCHANSKY, 1998; UNITED STATES, 2000; BONAMICI, 2009).

Para fármacos pertencentes à classe I, o SCB fornece uma ferramenta regulatória cujo objetivo é a substituição dos ensaios *in vivo* por ensaios *in vitro* que permitam conclusões sobre a solubilidade e a permeabilidade. Assim, os produtos farmacêuticos podem ser bioisentos, isto é, a aprovação de um produto baseada em testes de dissolução *in vitro* poderá ser aceita no lugar de um estudo de bioequivalência em seres humanos. A expectativa destas medidas é a redução da exposição de voluntários sadios aos fármacos, bem como dos custos e do

tempo necessários para os processos de desenvolvimento de produtos farmacêuticos (LÖBENBERG; AMIDON, 2000; UNITED STATES, 2000; LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004; LENNERNÄS; ABRAHAMSSON, 2005; KIM et al., 2006; COOK; ADDICKS; WU, 2008; CHEN; YU, 2009; BRASIL, 2011a).

No Brasil foi publicada recentemente a Resolução RDC nº 37, de 3 de agosto de 2011 (Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência). Tal resolução estabelece que os estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência são desnecessários para medicamentos de liberação imediata e medicamentos de liberação retardada ou prolongada com o mesmo mecanismo de liberação, desde que apresentem a mesma forma farmacêutica e contenham fármacos que pertençam à classe I do SCB (BRASIL, 2011a). A Instrução Normativa IN nº 4, de 3 de agosto de 2011 apresenta a lista de fármacos candidatos à bioisenção baseada no SCB (BRASIL, 2011b).

Embora o SCB tenha sido destinado primeiramente a aplicações regulatórias, ele pode auxiliar nos processos de desenvolvimento de fármacos prevendo o comportamento *in vivo* dos mesmos a partir das características de solubilidade e permeabilidade. O uso destes dados obtidos *in vitro* pode promover uma estimativa da absorção intestinal humana em estágios iniciais da descoberta de compostos e, desta forma, contribuir para a adequada seleção daquelas moléculas candidatas a fármacos. Nos estágios avançados do desenvolvimento do produto farmacêutico, o SCB é uma importante ferramenta para o desenvolvimento de formulações que permitam a adequada biodisponibilidade oral (LENNERNAS; ABRAHAMSSON, 2005; VOLPE, 2008).

Em 2000, a FDA (*Food and Drug Administration*) publicou um guia para isenção de estudos de biodisponibilidade e de bioequivalência *in vivo* para formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata com base no SCB, sendo que estas formas farmacêuticas devem liberar mais que 85% do fármaco em até trinta minutos numa faixa de pH de 1,0 a 7,5, estabelecendo padrões para os ensaios de dissolução e enfatizando a possibilidade de um teste *in vitro* substituir o ensaio *in vivo*. Além disso, fármacos candidatos à bioisenção deverão apresentar alta permeabilidade (fração absorvida superior a 90%) (UNITED STATES, 2000; LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004; VOLPE, 2008).

De acordo com o guia da FDA, a classificação de um fármaco quanto à permeabilidade pode ser determinada diretamente pela medida da taxa de transferência de massa através da membrana intestinal humana, ou indiretamente por estimativa da extensão de absorção do fármaco em estudos farmacocinéticos em seres humanos, que permitam a comparação com uma dose referência administrada intravenosamente. Alternativamente, sistemas capazes de prever a extensão de absorção de fármacos em seres humanos podem ser usados para classificar um fármaco, como estudos de perfusão intestinal em ratos (UNITED STATES, 2000; CHEN; YU, 2009; THIEL-DEMBY et al., 2009; DAHAN et al., 2010).

O guia da FDA promove especificações de testes e critérios de aceitação para conduzir estudos de solubilidade, de permeabilidade e de dissolução para o propósito de classificação biofarmacêutica. O guia apresenta condições para a bioisenção de fármacos, os quais devem apresentar: alta solubilidade, alta permeabilidade, dissolução rápida e similar comparado ao medicamento de referência, amplo índice terapêutico e estabilidade no TGI. Além disso, devem ser empregados na formulação apenas excipientes previamente usados na aprovação de forma farmacêutica de liberação imediata pela FDA (UNITED STATES, 2000; VOLPE, 2008).

Portanto, o SCB permite a estimativa dos três maiores fatores para a absorção oral do fármaco a partir de formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata administradas por via oral: dissolução, solubilidade e permeabilidade intestinal (AVDEEF, 2003; BREDA et al., 2009).

Nos países em desenvolvimento, onde muitas vezes não há recursos suficientes para a realização dos ensaios de bioequivalência, o emprego do SCB torna-se uma ferramenta importante para assegurar a qualidade entre os produtos farmacêuticos (LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004; BENET et al., 2008).

3.2.2. Métodos empregados na determinação da solubilidade de fármacos

A solubilidade de um fármaco constitui um dos requisitos à absorção para medicamentos administrados por via oral e depende da dissolução da forma

farmacêutica. A dissolução refere-se ao processo pelo qual as moléculas do composto são liberadas da fase sólida e entram na fase de solução, sendo este processo relacionado ao tempo. Assim, a substância ativa em solução estará disponível para ser absorvida e distribuída pelo organismo, a fim de exercer sua ação farmacológica, ser metabolizada e excretada (RAMA et al., 2006; MARTIN; SINKO, 2008).

Segundo o SCB e de acordo com o guia de bioisenção da FDA, um fármaco possui alta solubilidade quando a maior dose disponível do produto farmacêutico comercializado no país é solúvel em até 250 mL de meio aquoso numa faixa de pH de 1,0 a 7,5 (pH fisiológico), sob temperatura de 37°C. O volume de 250 mL é originado de protocolos de estudos de bioequivalência, que recomendam a administração de medicamentos com um copo de água de 250 mL (UNITED STATES, 2000; YU et al., 2002; LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004; VOLPE, 2008; CHEN; YU, 2009).

Os estudos de solubilidade preconizados pela FDA devem ser conduzidos nas seguintes condições: temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ em meio aquoso numa faixa de pH que varia de 1,0 a 7,5. O número de condições de pH para a determinação da solubilidade é baseado nas características do fármaco. Assim, como exemplo, um fármaco que apresenta um valor de pKa na faixa de 3 a 5, a solubilidade deverá ser determinada em: (1) uma solução com pH de valor igual ao pKa do fármaco, (2) uma solução com pH de valor igual a $\text{pKa} + 1$, (3) uma solução com pH de valor igual a $\text{pKa} - 1$, (4) uma solução com pH de valor igual a 1,0 e (5) uma solução com pH de valor igual a 7,5. É recomendado a realização de, no mínimo, três repetições para cada valor de pH (UNITED STATES, 2000).

De acordo com o guia da FDA, os métodos indicados para os estudos de solubilidade são: método do equilíbrio ou de saturação (técnica do *shake-flask*) e métodos potenciométricos (UNITED STATES, 2000).

No método do equilíbrio empregando a técnica do *shake-flask*, a avaliação da solubilidade é realizada com a adição de quantidade conhecida do fármaco em uma solução tampão padronizada até atingir a saturação do meio, indicada pelo excesso da substância não dissolvida precipitada no fundo do frasco utilizado para o ensaio. A mistura é submetida à temperatura controlada ($37 \pm 1^\circ\text{C}$) e agitação constante por longos períodos (de 12 horas a 7 dias) até a obtenção do equilíbrio entre as duas fases. Após esta etapa, a mistura é filtrada ou

centrifugada e, em seguida, é diluída adequadamente com o meio correspondente. A quantificação do fármaco na solução é determinada por metodologia específica (UNITED STATES, 2000; AVDEEF, 2003).

O ensaio de solubilidade pelo método do equilíbrio permite a obtenção da razão dose:solubilidade (D:S), que corresponde à razão entre a maior dose disponível comercializada no país e a solubilidade da substância ativa. Assim, de acordo com o guia de bioisenção, fármacos altamente solúveis apresentam razão D:S menor que 250 mL numa faixa de pH de 1,0 a 7,5 a 37°C (UNITED STATES, 2000; LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004).

Outro tipo de estudo que vem sendo proposto para avaliar a solubilidade dos fármacos é o ensaio de dissolução intrínseca, que permite auxiliar na caracterização de uma substância quanto à solubilidade (YU et al., 2002; YU et al., 2004; ZAKERI-MILANI et al., 2009).

A dissolução intrínseca tem sido utilizada para caracterizar fármacos na forma sólida, esclarecer a relação entre a taxa de dissolução e a forma cristalina de uma substância e avaliar os efeitos de surfactantes e pH na solubilização de compostos pouco solúveis. Além disso, este tipo de ensaio permite a obtenção da taxa de dissolução intrínseca (TDI - expressa em mg/min/cm²), que é definida como a taxa de dissolução de um fármaco puro (transferência de massa da superfície do sólido para a fase líquida) sob condições de área de superfície, tipo e velocidade de agitação, pH e força iônica do meio de dissolução (YU et al., 2004; ZAKERI-MILANI et al., 2009). A TDI é determinada por meio do valor da inclinação das equações (*slope*) obtidas a partir da regressão linear das curvas de dissolução intrínseca para cada meio empregado no estudo (MARCOLONGO, 2003; YU et al., 2004; ZAKERI-MILANI et al., 2009).

Para a realização do ensaio de dissolução intrínseca, utiliza-se o aparato de Wood preconizado pela *United States Pharmacopeia* (2010). Este estudo permite o cálculo da taxa de dissolução por centímetro quadrado, sugerindo que a utilização da TDI pode ser viável para a classificação de fármacos quanto às características de solubilidade. Além disso, este ensaio tem melhor correlação com a dissolução do fármaco *in vivo* que a solubilidade, já que esta depende da dose para a classificação do fármaco enquanto que a dissolução intrínseca não considera o efeito da dose (YU et al., 2004; ZAKERI-MILANI et al., 2009).

Em relação aos resultados de dissolução intrínseca de fármacos, Yu e colaboradores sugeriram um limite de 0,1 mg/min/cm² para classificar as substâncias como altamente solúveis ou não. Ou seja, o resultado de dissolução intrínseca maior que 0,1 mg/min/cm² sugere que o fármaco estudado apresenta alta solubilidade (YU et al., 2004).

3.2.3. Métodos empregados na determinação da permeabilidade 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; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005; CHEN; YU, 2009).

O desenvolvimento do SCB e a sua adoção pelas agências regulatórias em questões relacionadas à bioisenção têm despertado o interesse por métodos que permitem uma estimativa da absorção de um fármaco (GRIFFIN; O'DRISCOLL, 2008).

Para a determinação e caracterização da permeabilidade de fármacos, diversos modelos têm sido empregados. Os métodos mais difundidos são: (1) métodos *in silico* que empregam programas computacionais para a previsão da permeabilidade dos fármacos, (2) métodos *in vitro* baseados em sistemas artificiais compostos por lipídios, tais como membranas artificiais paralelas (PAMPA), (3) métodos *in vitro* baseados em sistemas celulares, tais como cultura de células de adenocarcinoma humano (Caco-2) ou de rim canino (MDCK), (4) métodos *ex vivo* que empregam segmentos de tecidos isolados de animais, (5) métodos *in vivo* que contemplem os estudos farmacocinéticos em animais ou em seres humanos e (6) métodos *in situ*, que consistem na perfusão do fármaco em determinados trechos do intestino. Assim, a utilização de um destes métodos, ou mesmo a combinação deles, têm sido o objeto da publicação de recentes

pesquisas na área da biofarmácia (TUKKER, 2000; UNITED STATES, 2000; YU et al., 2002; LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004; RUAN et al., 2006; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009).

A seleção de um método adequado para o estudo de permeabilidade e classificação do fármaco conforme o SCB deverá ser feita de maneira criteriosa, pois algumas divergências nos resultados obtidos poderão ocorrer em função das variabilidades existentes em cada técnica, prejudicando ou alterando a classificação das substâncias avaliadas. Assim, a utilização de marcadores pode determinar os limites entre alta e baixa permeabilidade e a padronização da técnica a ser empregada é de suma importância para minimizar as variações nos resultados, melhorando o potencial preditivo do ensaio (VOLPE, 2010).

Nos estudos de permeabilidade, numerosos fatores influenciam na obtenção de dados independente do modelo, tais como: escolha da espécie animal, origem do tecido, linhagem celular, forma de condução do estudo e forma de análise dos resultados. Além disso, é importante considerar a estabilidade e a solubilidade do fármaco em relação às condições do estudo, tais como: intervalo de tempo do estudo, soluções tampão empregadas, pH do meio e temperatura do ensaio (VOLPE, 2010).

Outro importante aspecto é que dificilmente são encontrados limites de classificação de fármacos quanto à permeabilidade relatados na literatura. Yee (1997) estudou a permeabilidade de fármacos em células Caco-2 e propôs uma classificação em relação aos valores de permeabilidade aparente (P_{ap}) levando em consideração o SCB. Assim, segundo esta proposta, fármacos que apresentam permeabilidade menor que $0,1 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ são considerados como sendo de baixa permeabilidade, com permeabilidade entre $0,1$ a $1,0 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ são considerados como sendo moderadamente absorvidos e aqueles com valores de permeabilidade maiores que $1,0 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ são considerados como sendo altamente permeáveis (YEE, 1997). Em outro estudo de permeabilidade realizado por Zakeri-Milani e colaboradores (2005), por meio de modelo de perfusão *in situ* em ratos, foi proposto um limite de classificação de fármacos em relação aos valores de permeabilidade efetiva (P_{ef}). Fármacos que apresentam valores de permeabilidade superior a $3,0 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ são considerados altamente permeáveis, enquanto que valores menores que $2,0 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ indicam que as

substâncias apresentam baixa permeabilidade (ZAKERI-MILANI et al., 2005), conforme demonstrado no Quadro 3.3.

Em métodos *in vitro* e *ex vivo*, a permeabilidade é normalmente expressa na forma de velocidade de permeação em cm.s^{-1} conhecida como permeabilidade aparente (P_{ap}). Nestes casos, as amostras são coletadas a partir do compartimento receptor e não é considerada a retenção do fármaco na membrana. Em ensaios que empregam o modelo de perfusão *in situ*, a permeabilidade também é expressa na forma de velocidade de permeação em cm.s^{-1} , conhecida como permeabilidade efetiva (P_{ef}). Neste caso, todavia, considera-se a retenção do fármaco na membrana e também são observados outros fatores como proteínas séricas e outras barreiras de membrana, além da interação membrana-água que ocorre. A P_{ef} é derivada da lei de Fick que define a relação entre o fluxo de água através da parede da membrana e a queda na concentração do fármaco através da superfície da membrana (AVDEEF, 2003; GRIFFIN; O'DRISCOLL, 2008).

Quadro 3.3: Limites de P_{ap} e P_{ef} propostos para a classificação de fármacos quanto à permeabilidade utilizando células Caco-2 e o método de perfusão *in situ* em ratos, respectivamente

Classificação	$P_{\text{ap}} (\times 10^{-5}) \text{ cm.s}^{-1}$ (Caco-2)	$P_{\text{ef}} (\times 10^{-5}) \text{ cm.s}^{-1}$ (perfusão <i>in situ</i>)
baixa permeabilidade	< 0,1	< 2,0
moderada permeabilidade	entre 0,1 e 1,0	entre 2,0 e 3,0
alta permeabilidade	>1,0	> 3,0

Fonte: YEE, 1997; ZAKERI-MILANI et al., 2005.

3.2.3.1. Métodos físico-químicos

Os métodos físico-químicos representam o modelo de menor investimento (tanto material quanto humano). Sua utilização é simples, eficiente, rápida e de boa reprodutibilidade, permitindo a obtenção de informações sobre a permeabilidade de compostos (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

As propriedades físico-químicas de um fármaco administrado por via oral influenciam de maneira significativa na permeabilidade. Dentre as propriedades conhecidas, pode-se citar: peso e tamanho molecular, polaridade, capacidade de formação de pontes de hidrogênio, pKa, lipofilicidade, carga/ionização e solubilidade (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Devido à natureza lipídica das membranas biológicas, a lipofilicidade de um fármaco é um fator importante para a previsão da permeação de um fármaco através da membrana gastrintestinal. O coeficiente de partição octanol/água (Log P) ou coeficiente de partição octanol/tampão (Log-D) são indicadores da lipofilicidade de uma substância (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; GRIFFIN; O'DRISCOLL, 2008).

Embora as propriedades físico-químicas de um fármaco apresentem algumas vantagens e permitem prever as características de permeabilidade, muitas vezes são informações limitadas, com baixo valor preditivo devido à impossibilidade de prever o comportamento das moléculas em relação às interações com as membranas biológicas, mecanismos de transporte e outros fatores fisiológicos (GRASS, 1997; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DEFERME, ANNAERT, AUGUSTIJNS, 2008).

A relação estrutura-atividade é frequentemente recomendada para prever a absorção intestinal em seres humanos sem que haja necessidade de síntese da substância ativa. Os métodos *in silico* que utilizam programas computacionais podem ser empregados como um potencial método virtual para selecionar moléculas durante o processo inicial de desenvolvimento de novos fármacos (GRASS, 1997; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Apesar do grande número de pesquisas realizadas, os métodos físico-químicos não são aceitos pela FDA para a determinação da permeabilidade de um fármaco, em razão da carência e inconsistência de dados (UNITED STATES, 2000; LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004).

3.2.3.2. Métodos *in vitro* e *ex vivo*

As técnicas *in vitro* e *ex vivo* utilizadas para prever a absorção intestinal são menos trabalhosas e apresentam menores custos quando comparadas aos estudos realizados *in vivo* (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Nos métodos *in vitro* e *ex vivo* não há fatores fisiológicos que influenciam nos processos de permeabilidade intestinal, tais como: esvaziamento gástrico, trânsito gastrintestinal, pH gastrintestinal, entre outros. O sucesso dos resultados dependerá de quanto o modelo mimetiza as características do epitélio intestinal *in vivo* (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Vários modelos *in vitro* e *ex vivo* podem identificar e caracterizar um tipo de transporte ou sítios específicos de absorção. Membranas artificiais, culturas celulares e tecidos intestinais provenientes de animais de experimentação são utilizados para os ensaios de permeabilidade (GRASS, 1997; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; VOLPE, 2008).

a) Membrana artificial paralela (PAMPA)

O modelo *in vitro* de PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*) é muito utilizado nos processos iniciais de descoberta de novas moléculas com potencial farmacológico para prever as características de permeabilidade intestinal. Por ser um método de simples execução, este modelo torna-se atrativo para selecionar um grande número de compostos de interesse num período de tempo relativamente curto (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; KOLJONEN et al., 2008; LI et al., 2008; MASUNGI et al., 2008; REIS; SINKO; SERRA, 2010).

Para a formação das membranas lipídicas, fosfolipídios, lecitina e solventes orgânicos inertes são utilizados nas mais variadas proporções, permitindo a constituição de membranas com composições diferenciadas (KANSY; SENNER; GUBERNATOR, 1998; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008; LI et al., 2008; VOLPE, 2010).

As membranas lipídicas são constituídas sobre filtros em placas específicas e situam-se entre os compartimentos doador e receptor, permitindo, desta forma, o estudo do transporte de substâncias (KANSY; SENNER; GUBERNATOR, 1998; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008; KOLJONEN et al., 2008; VOLPE, 2010).

Embora seja um bom modelo para prever a permeabilidade por mecanismo passivo (transporte passivo transcelular), as membranas lipídicas apresentam limitações, tais como ausência de espaços paracelulares e ausência de proteínas transportadoras, o que pode subestimar a permeação de uma substância com características específicas (baixo peso molecular, hidrofílica ou substância transportada por mecanismo ativo) (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008; LI et al., 2008).

Em estudos com fármacos lipofílicos, a ocorrência de retenção da substância na membrana lipídica pode ocorrer. Além disso, a existência da CAE adjacente à membrana atua como uma barreira à absorção. Uma vez que o ensaio em PAMPA normalmente não utiliza nenhum tipo de agitação, valores muito superiores da espessura da CAE têm sido relatados (NIELSEN; AVDEEF, 2004; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008).

b) Células Caco-2

As células Caco-2 constituem outro modelo *in vitro* para o estudo de permeabilidade de substâncias. São originalmente derivadas de células de adenocarcinoma de cólon humano e quando cultivadas adequadamente se diferenciam em enterócitos (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; BALIMANE; HAN; CHONG, 2006; MASUNGI et al., 2008).

Para a preparação da monocamada, as células são semeadas em placas para crescimento e diferenciação, que são mantidas à temperatura de 37°C com 5% CO₂ pelo período requerido para a diferenciação celular (21 dias) para que haja a formação das junções intercelulares, a polaridade celular e a adequada expressão de mecanismos de efluxo (KOLJONEN et al., 2008; LI et al., 2008; MASUNGI et al., 2008).

Para avaliar a viabilidade celular, a resistência elétrica transepitelial (TEER) é mensurada para cada monocamada. O emprego de marcadores também é importante para complementar a avaliação de possíveis danos à membrana de células. Normalmente são utilizados marcadores cuja permeabilidade é bem definida (por exemplo, fluoresceína, manitol e atenolol), os quais são utilizados para monitorar a integridade celular (DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008; LI et al., 2008; MASUNGI et al., 2008).

Na execução dos experimentos de permeabilidade, o fármaco a ser avaliado é solubilizado em solução tampão e adicionado no compartimento doador, caso o objetivo do estudo seja avaliar o transporte no sentido apical-basolateral. Em seguida, as placas são incubadas por um período de tempo a 37°C sob agitação constante. As coletas são realizadas a partir do compartimento receptor em intervalos de tempo pré-determinados, com reposição de meio novo (KOLJONEN et al., 2008).

Algumas limitações da aplicação deste método consistem em: variação na expressão de transportadores, risco de contaminação por micro-organismos, longo período para crescimento das células (21 dias), formação de CAE mais espessa que na situação *in vivo*, origem celular, composição e pH dos meios de cultivo e idade das células. Estas causas podem gerar diferenças significativas intra e interlaboratoriais (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008; LI et al., 2008; MASUNGI et al., 2008).

c) Células MDCK (*Madin-Darby canine kidney cells*)

As células MDCK (*Madin-Darby canine kidney cells*) são provenientes de rim canino e se diferenciam em células epiteliais colunares, formando junções intercelulares quando cultivadas sobre membranas semipermeáveis (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

A origem não humana (canino) e não intestinal (rim) das células MDCK constitui uma desvantagem para os estudos de permeabilidade, pois este tipo celular apresenta baixos níveis de expressão e especificidade de proteínas transportadoras, além da baixa atividade metabólica. O uso de MDCK transfectadas com gene MDR1 para expressão de P-gp são frequentemente

utilizadas como alternativa ao uso de células Caco-2 para o estudo de transporte bidirecional de compostos, permitindo também avaliar a influência da P-gp no transporte de fármacos (DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008).

d) Métodos que empregam tecidos animais

Devido à grande dificuldade em obter tecidos viáveis de origem humana para estudos de permeabilidade, muitos animais são empregados como modelos por apresentarem semelhanças em relação às células endoteliais humanas. Somando-se a isto, os métodos *ex vivo* que utilizam tecidos animais isolados têm permitido resultados satisfatórios e boa correlação com os dados de absorção *in vivo* em seres humanos (GRASS, 1997; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Desde a década de 50, tecidos isolados de animais são empregados em estudos visando à compreensão dos mecanismos envolvidos na absorção intestinal de nutrientes. Um grande inconveniente do uso de tecidos isolados é a viabilidade que é de difícil manutenção, pois as membranas necessitam de suprimento sanguíneo e oxigenação constante (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

I. Técnica do saco invertido

Os primeiros estudos envolvendo o uso da técnica do saco invertido foram realizados na década de 50 com o objetivo de investigar o transporte de açúcares e de aminoácidos. O avanço destes estudos permitiu modificações e um aprimoramento na técnica em relação às condições do ensaio como: meios líquidos empregados, oxigenação constante e agitação. Tais alterações possibilitaram maior viabilidade dos tecidos (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; RUAN et al., 2006).

A utilização deste modelo *ex vivo* permite avaliar os mecanismos de absorção tanto por transporte passivo, como por transporte ativo. Também é possível explorar os mecanismos de efluxo na absorção intestinal, comparando a

cinética de transporte de fármacos na ausência e na presença de substâncias inibidoras de proteínas carreadoras (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Para a avaliação da permeabilidade de fármacos por meio deste modelo, normalmente procede-se a retirada de uma porção específica do intestino de um animal de experimentação. Este segmento é lavado com solução Krebs-Ringer para remoção de resíduos intestinais e, posteriormente, é invertido com o auxílio de um bastão de vidro. As extremidades são amarradas formando um saco, o qual é preenchido com Krebs-Ringer. Este sistema é colocado em outro recipiente contendo o fármaco em solução mantida a 37°C, sob borbulhamento de uma mistura de gases O₂ (95%) e CO₂ (5%). É importante que o lado da mucosa intestinal fique em contato com o meio e com os gases que estão sendo borbulhados. Em determinados períodos, um volume conhecido de amostra é coletado a partir do interior do saco e o fármaco é quantificado através de método adequado validado previamente (GRASS, 1997; AVADI et al., 2005).

Além de permitir a coleta de um pequeno volume de amostra, a preparação do tecido para o ensaio causa danos morfológicos às células devido à manipulação intensa para a inversão. Além disso, as ausências de suprimento sanguíneo e inervação contribuem para a rápida perda da viabilidade do tecido, comprometendo os resultados. Alguns relatos na literatura descrevem que o tempo de viabilidade do tecido é de aproximadamente 30 minutos (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008).

II. Transporte *ex vivo* utilizando segmentos intestinais em câmaras de difusão

A utilização de câmaras de difusão em estudos de permeabilidade consiste em adaptar o tecido intestinal isolado em equipamento adequado, onde a permeabilidade é baseada no aparecimento do fármaco no lado seroso a partir do desaparecimento no lado mucoso, quando a pretensão é estudar o transporte apical-basolateral (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008).

Dois tipos de câmaras são usados para avaliar o transporte de fármacos: câmaras de Ussing (câmaras de difusão horizontal) e células de Franz (câmaras

de difusão vertical) (USSING; ZERAHN, 1951; BARTHE; WOODLEY; HOUIN, 1999; NICOLAZZO; FINNIN, 2008; DEZANI, 2010). Em ambos os modelos, o segmento intestinal de interesse é posicionada entre as câmaras doadora e receptora. Cada compartimento é preenchido com solução de Ringer mantida a 37°C e a oxigenação do líquido é mantida constante com uma mistura gasosa (95% O₂ e 5% CO₂). A solução contendo o fármaco solubilizado é colocada na câmara doadora do sistema e as coletas das amostras são realizadas a partir do compartimento receptor em intervalos de tempo pré-determinados, com reposição de meio novo. As amostras coletadas podem ser congeladas para posterior análise por meio de método analítico validado, normalmente por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (GRASS, 1997; BERGGREN et al., 2004; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008; NICOLAZZO; FINNIN, 2008; DEZANI, 2010; VOLPE, 2010).

Por utilizar tecidos isolados, a ausência de suprimento sanguíneo e inervação contribuem para a rápida perda da viabilidade da membrana durante o experimento. Além disso, a preparação do tecido para o ensaio requer manipulação intensa, o que pode ocasionar mudanças morfológicas e funcionais de proteínas transportadoras. Pode ocorrer também a retenção do fármaco em estudo na membrana, levando à subestimação da quantidade permeada, sobretudo se o composto é lipofílico (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008).

Embora o tempo empregado para a realização dos experimentos de transporte de fármacos em câmaras de difusão seja em torno de 150 a 180 minutos, têm sido relatadas ocorrências de edema intestinal e rompimento de vilosidades após 20 minutos de incubação (PLUMB et al., 1987).

3.2.3.3. Métodos *in vivo*

Esse tipo de ensaio é muito utilizado para a avaliação de substâncias ativas, principalmente durante a etapa do desenvolvimento molecular destas e tem a finalidade de avaliar o potencial de absorção oral das mesmas. Classicamente, esses estudos são realizados em animais e os resultados dependem da espécie selecionada para a avaliação (GRASS, 1997).

Características fisiológicas como pH, motilidade gastrointestinal, tempo de trânsito intestinal e distribuição diferenciada de enzimas e transportadores podem afetar a absorção de substâncias devido às diferenças encontradas entre as espécies utilizadas como modelos experimentais (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Os estudos *in vivo* que empregam modelos animais são comumente utilizados para prever a extensão de absorção de fármacos em seres humanos através de estudos que permitem a comparação da área sob a curva (concentração *versus* tempo) após a administração intravenosa ou oral (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

3.2.3.4. Método de perfusão *in situ*

Embora existam diversos modelos disponíveis para o estudo de permeabilidade de substâncias, o método de perfusão *in situ*, originalmente proposto por Schanker e colaboradores (1958), é muito utilizado atualmente por apresentar facilidades na técnica cirúrgica, ser relativamente simples e de baixo custo em relação ao modelo *in vivo*. Esse método permite avaliar a permeabilidade, a cinética de absorção e a absorção intestinal de fármacos (SCHANKER et al., 1958; RATHORE et al., 2008; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; ZAKERI-MILANI et al., 2009).

Alguns pesquisadores têm se dedicado ao estudo da absorção intestinal de substâncias por meio de modificações na técnica original de perfusão *in situ* como recirculação de perfusato, oscilação de perfusato, método de circuito fechado, perfusão de passagem simples e perfusão de passagem tripla (SCHURGERS et al., 1986; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009).

A técnica de recirculação de perfusato é realizada a partir da perfusão da solução no segmento selecionado do intestino de forma unidirecional, sendo que tal solução retorna ao reservatório inicial antes de ser perfundida novamente (VAN REES; DE WOLFF; NOACH, 1974; TSUJI et al., 1978; SCHURGERS et al., 1986). Por sua vez, o método que utiliza a oscilação de perfusato permite que a solução contendo o fármaco solubilizado percorra o trecho intestinal selecionado

nos dois sentidos, bidirecionalmente (SCHURGERS; DE BLAEY, 1984; SCHURGERS et al., 1986).

O método do circuito fechado consiste em isolar totalmente o segmento intestinal, perfundir a solução com o fármaco e realizar coletas sucessivas em determinados intervalos de tempo, sem que haja a circulação ou reposição do conteúdo luminal (DOLUISIO et al., 1969; SCHURGERS et al., 1986).

A perfusão de passagem simples consiste em perfundir uma solução contendo o fármaco na porção proximal de um segmento do intestino selecionado para o estudo por meio de uma cânula a um fluxo constante. As coletas são realizadas a partir da porção distal em intervalos determinados (KOMIYA et al., 1980; AMIDON et al., 1981). A perfusão de passagem tripla assemelha-se à técnica de perfusão simples, o que diferencia é a quantidade de trechos intestinais que podem ser selecionados no mesmo animal (SCHURGERS et al., 1986; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009).

A perfusão *in situ* simples (*Single Pass Intestinal Perfusion*), também conhecida como modelo de tubo paralelo, fundamenta-se no princípio de que a concentração do fármaco no líquido perfundido diminui, ou seja, a concentração decresce exponencialmente à medida que percorre o comprimento do intestino (GRIFFIN; O'DRISCOLL, 2008).

A técnica de perfusão *in situ* simples consiste na perfusão da solução do fármaco solubilizado em uma porção determinada do intestino, devidamente canulada a fim de preservar o suprimento sanguíneo local e a inervação, evitando o comprometimento da absorção. O desaparecimento do fármaco, ou seja, a diminuição da concentração da substância ativa na solução de perfusão é atribuída à absorção e este resultado permite a determinação da taxa ou extensão de absorção através do tecido intestinal (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001; COOK; SHENOY, 2003; JAIN et al., 2007; GRIFFIN; O'DRISCOLL, 2008; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; VOLPE, 2010). Em ensaios mais sofisticados, tanto o desaparecimento do fármaco da solução de perfusão, quanto o aparecimento da substância na corrente sanguínea são monitorados através da coleta de sangue a partir de um vaso sanguíneo, como a veia mesentérica (GRASS, 1997).

Os estudos de perfusão intestinal normalmente são realizados em animais de pequeno porte como camundongos, ratos e coelhos. Por esta razão, é

importante considerar variáveis como: sexo, peso, idade e espécie do modelo animal, estado e duração do jejum, esquema anestésico adotado, tempo para atingir o equilíbrio do fármaco com a membrana intestinal, região intestinal selecionada para o estudo, composição, pH e osmolaridade da solução de perfusão e fluxo de perfusão, conforme demonstrado no Quadro 3.4 (GRASS, 1997; VOLPE, 2010).

A aplicação do modelo de perfusão *in situ* em estudos de permeabilidade é simples e depende unicamente do controle experimental como a concentração da solução que contém o fármaco, pH, osmolaridade, o fluxo da solução de perfusão e a escolha da região intestinal para o estudo (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; COOK; SHENOY, 2003; RATHORE et al., 2008; ZAKERI-MILANI et al., 2009).

O guia de bioisenção da FDA (2000) recomenda a utilização do modelo de perfusão *in situ* como uma ferramenta para a classificação de um fármaco quanto à sua característica de permeabilidade conforme o SCB (UNITED STATES, 2000; KIM et al., 2006; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009).

Brouwers e colaboradores (2010) estudaram a perfusão *in situ* com coleta de sangue para avaliar a permeabilidade intestinal de marcadores (atenolol, talinolol e propranolol) na ausência e presença de um inibidor de efluxo (inibidor de P-gp). Por um período de duas horas de teste de perfusão, constatou-se que os transportes mediados pelos mecanismos ativos, difusão passiva pela via paracelular e transcelular não sofreram nenhum tipo de alteração ou comprometimento (BROUWERS et al., 2010).

Em estudos de permeabilidade de substâncias que permeiam a membrana intestinal por transporte passivo, a comparação de resultados obtidos em jejuno de seres humanos e jejuno de ratos apresenta alta correlação e ambos os modelos podem ser utilizados para prever a absorção oral em seres humanos. Diferenças constatadas na P_{ef} de fármacos absorvidos passivamente em seres humanos e em ratos mostraram que os valores obtidos em seres humanos foram maiores que os valores obtidos em ratos. As possíveis razões para isso são as diferenças existentes entre as áreas de absorção efetiva do segmento perfundido nos dois modelos, além da existência de diferenças entre as espécies que afetam o transporte de substâncias ativamente transportadas (AMIDON; SINKO; FLEISHER, 1988; SALPHATI et al., 2001).

Cao e colaboradores (2006) encontraram um alto grau de correlação (superior a 0,8) entre valores de P_{ef} em ratos e em seres humanos para dezesseis compostos avaliados (tanto substâncias transportadas passivamente como substâncias transportadas por carreadores). Um bom resultado obtido utilizando o rato para prever as características de absorção é a correlação existente entre as características de permeabilidade em tecido intestinal de rato e em tecido de origem humana (CAO et al., 2006).

Assim, a boa correlação constatada entre dados obtidos pela técnica de perfusão *in situ* e dados obtidos em seres humanos permite classificar os fármacos adequadamente, segundo o SCB (FAGERHOLM; JOHANSSON; LENNERNÄS, 1996).

A ampla utilização do modelo de perfusão *in situ* para o estudo de permeabilidade de substâncias está relacionada às suas vantagens em relação aos demais modelos: existência de inervação e suprimento sanguíneo no intestino, adequada permeabilidade por via paracelular, presença da camada de muco, expressão biorrelevante de transportadores protéicos e de enzimas metabolizadoras. Portanto, este modelo permite compreender os mecanismos de transporte envolvendo carreadores de influxo e efluxo, bem como avaliar o impacto das enzimas metabolizadoras presentes na superfície dos enterócitos (ANNAERT et al., 2000; BROUWERS et al., 2010).

Baseando-se nestas vantagens, o modelo de perfusão *in situ* permite uma simulação da administração oral de fármacos. Também é possível determinar a absorção de uma substância ativa num segmento intestinal específico, principalmente em estudos com compostos que são transportados por proteínas carreadoras, uma vez que a expressão de transportadores varia de acordo com a região do intestino (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; COOK; SHENOY, 2003; JAIN et al., 2007; RATHORE et al., 2008; ZAKERI-MILANI et al., 2009; BROUWERS et al., 2010).

Embora haja a utilização de anestésicos em animais, as funcionalidades neural, endócrina, linfática e de suprimento sanguíneo permanecem preservados durante todo o período do experimento e, portanto, os mecanismos de transporte presentes em um animal vivo estão ativos permitindo que os resultados de permeabilidade obtidos a partir deste modelo sejam mais próximos das condições *in vivo*. Assim, este modelo integra os aspectos de transporte e metabolismo em

que todos os fatores fisiológicos que influenciam a absorção do fármaco estão presentes (JAIN et al., 2007; RATHORE et al., 2008; VOLPE, 2008; ZAKERI-MILANI et al., 2009).

Quadro 3.4: Principais variáveis referentes ao modelo de perfusão *in situ* e condições adotadas nos estudos relatados na literatura para a obtenção dos resultados de permeabilidade

Variáveis	Condição adotada
espécie, sexo e linhagem do animal	Rato Wistar macho ^(1,2,3,4)
peso do animal (gramas)	250-300 ⁽¹⁾ ; 200-250 ⁽²⁾ ; 250-280 ^(3,4)
duração do jejum (horas)	12-18 h ^(1,3,4,5)
anestésicos	pentobarbital ⁽²⁾ ; cetamina-xilazina ^(3,4)
região intestinal selecionado para o estudo	Jejuno ^(2,3,4) ; íleo ⁽²⁾ ; cólon ⁽²⁾
tempo para atingir o equilíbrio no procedimento de perfusão (minutos)	30 ⁽²⁾ ; 60 ^(3,4)
composição e pH da solução de perfusão	tampão fosfato (pH 6,5) ⁽²⁾ ; tampão MES, NaCl, KCl, vermelho de fenol (pH 6,5) ^(3,4)
fluxo utilizado na perfusão (mL.min ⁻¹)	0,2 ^(1,3,4,5) ; 0,5 ⁽²⁾
método adotado para a correção do TFA	marcador não absorvível ^(2,3,4,)

(1) ZAKERI-MILANI et al., 2009; (2) MASAOKA et al., 2006; (3) DAHAN; AMIDON, 2009; (4) DAHAN; WEST; AMIDON, 2009

a) Modelo animal em estudos de perfusão *in situ*

Apesar das questões éticas, os roedores (principalmente ratos) são cada vez mais utilizados como modelos animais em pesquisas por se demonstrarem

adequados para prever a extensão da absorção de fármacos de uso oral. Além disso, a literatura tem apresentado a existência de boa correlação entre a absorção de substâncias em intestino de rato e intestino de seres humanos em função de similaridades estruturais e fisiológicas (CAO; YU; SUN, 2008). Portanto, dados relacionados à permeabilidade obtidos em ratos poderão servir de base para prever quantitativamente a absorção de fármacos *in vivo* (FAGERHOLM; JOHANSSON; LENNERNÄS, 1996; RUAN et al., 2006; JAIN et al., 2007; CAO; YU; SUN, 2008).

Dependendo da espécie animal selecionada para o estudo, poderá haver diferenças na correlação de dados para fármacos que são transportados por mecanismos mais complexos, pois a expressão de proteínas varia de uma espécie para a outra (CAO et al., 2006; KIM et al., 2006; CAO; YU; SUN, 2008).

b) Condições gerais dos estudos de perfusão *in situ*

Os animais normalmente utilizados em experimentos de perfusão são ratos machos da linhagem Wistar ou Sprague-Dawley, com peso entre 200 e 400g. Usualmente estes animais são mantidos em jejum por um período que varia de 12 a 24 horas com acesso livre à água. Dependendo do propósito do estudo, a anestesia poderá ser administrada por meio de injeções intramuscular ou intraperitonal, ou ainda por inalação de anestésicos (SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001; COOK; SHENOY, 2003; BERGGREN et al., 2004; KIM et al., 2006; LANE; LEVIS; CORRIGAN, 2006; JAIN et al., 2007; RATHORE et al., 2008; DAHAN; AMIDON, 2009; LI et al., 2011).

Os anestésicos empregados em procedimentos cirúrgicos em ratos não devem exercer qualquer atividade no TGI para não comprometer os estudos de permeabilidade. Os anestésicos mais utilizados são: associação de cetamina-xilazina (60 a 87 mg.kg⁻¹ e 7 a 8 mg.kg⁻¹, respectivamente), pentobarbital sódico (50 a 60 mg.kg⁻¹), uretano (30 mg.kg⁻¹), isoflurano (2%) e tiopental sódico (50 mg.kg⁻¹) (SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001; COOK; SHENOY, 2003; KIM et al., 2006; LANE; LEVIS; CORRIGAN, 2006; RATHORE et al., 2008; DAHAN; AMIDON, 2009; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; LI et al., 2011).

Para a realização do experimento, os ratos anestesiados são inicialmente acomodados em superfícies lisas aquecidas a 37°C e, em seguida, o abdômen é aberto por meio de uma incisão para acessar o intestino. O segmento intestinal de 10 a 15 cm de comprimento é selecionado para a inserção das cânulas. Esta técnica permite avaliar a permeabilidade dos fármacos em diferentes regiões do intestino, tais como: duodeno, jejuno ou íleo (SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001; COOK; SHENOY, 2003; CUMMINS et al., 2003; BERGGREN et al., 2004; KIM et al., 2006; JAIN et al., 2007; RATHORE et al., 2008; DAHAN; AMIDON, 2009; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; ERIKSSON et al., 2010; LI et al., 2011).

Usualmente, as cânulas são inseridas nas duas extremidades da porção intestinal: na região proximal (a qual recebe a solução de perfusão com o fármaco a ser avaliado) e na região distal (onde as coletas das amostras são realizadas). Na preparação do segmento intestinal para o estudo é importante que haja cuidados adequados para não causar danos ao sistema circulatório local e à inervação. Para evitar o ressecamento dos órgãos e ajudar a manter a temperatura do animal durante o experimento, a cavidade abdominal exposta é banhada com solução fisiológica a 37°C ou protegida por filme plástico (SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001; JAIN et al., 2007; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; LI et al., 2011).

A literatura tem indicado que a solução de perfusão utilizada nos ensaios pode ser preparada utilizando os componentes descritos no Quadro 3.5, solubilizando-os em água purificada. As quantidades de cada componente estão descritas nas referências indicadas no quadro (BERGGREN et al., 2004; KIM et al., 2006; JAIN et al., 2007; RATHORE et al., 2008; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; ERIKSSON et al., 2010).

O ajuste de pH da solução de perfusão pode ser feito com solução de ácido clorídrico 2 M ou solução de hidróxido de potássio 0,1 M até pH 6,5 (RATHORE et al., 2008; ERIKSSON et al., 2010).

Quadro 3.5: Principais componentes utilizados no preparo de soluções de perfusão

Componentes	Referências
Tampão MES (2-N-morfolino-etanossulfonato), cloreto de sódio, cloreto de potássio, vermelho de fenol ou PEG 4000 (pH 6,5 e osmolaridade 290 mosm.L ⁻¹)	KIM et al., 2006 DAHAN; WEST; AMIDON, 2009
Cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio bibásico, manitol, polietilenoglicol, D-glicose (pH 6,5 e osmolaridade 290 mosm.L ⁻¹)	JAIN et al., 2007 ERIKSSON et al., 2010
Cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio bibásico, D-glicose (pH 7,4 e osmolaridade 200-250 mosm.L ⁻¹)	RATHORE et al., 2008
Tampão fosfato, cloreto de potássio, cloreto de sódio, manitol, D-glicose, PEG 4000 (pH 6,5 e osmolaridade 290 mosm.L ⁻¹)	BERGGREN et al., 2004

Conforme descrito na literatura, para a definição da concentração do fármaco na solução de perfusão deve-se considerar a maior dose comercializada no país dividida pelo volume de 250 mL de meio aquoso (KIM et al., 2006; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009). O volume de 250 mL é justificado em função do volume de água empregado para a administração dos medicamentos por via oral nos estudos de biodisponibilidade e bioequivalência (UNITED STATES, 2000).

A perfusão da solução através do segmento intestinal selecionado deve ser realizada com fluxo constante e uniforme, o que é permitido com o emprego de uma bomba peristáltica (BERLIOZ et al., 1999; JAIN et al., 2007; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; BROUWERS et al., 2010). Com o objetivo de deslocar resíduos presentes no segmento intestinal, os quais podem comprometer o estudo de permeabilidade, solução de perfusão isenta de fármaco é perfundida por um

determinado período a um fluxo previamente padronizado (de 0,5 mL.min⁻¹ por 30 minutos, de 5,0 mL.min⁻¹ por 8 minutos ou de 1,0 a 3,0 mL.min⁻¹) (ANNAERT et al., 2000; KIM et al., 2006; JAIN et al., 2007; MORISHITA et al., 2007; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009).

Por outro lado, a perfusão da solução contendo o fármaco normalmente é realizada com fluxo de 0,2 mL.min⁻¹, podendo variar de 0,1 a 0,3 mL.min⁻¹. A manutenção deste fluxo é importante para que as condições fisiológicas sejam preservadas, evitando-se alterações na CAE. Estudos têm indicado que as coletas de amostras da solução perfundida são realizadas em intervalos de tempo que variam de 5 a 15 minutos e o período total do experimento corresponde a um intervalo de 60 a 120 minutos (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001; COOK; SHENOY, 2003; BERGGREN et al., 2004; KIM et al., 2006; LANE; LEVIS; CORRIGAN, 2006; JAIN et al., 2007; GRIFFIN; O'DRISCOLL, 2008; RATHORE et al., 2008; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; ZAKERI-MILANI et al., 2009; ERIKSSON et al., 2010; LI et al., 2011).

Ao final do experimento, normalmente os animais são sacrificados com injeção intracardíaca de solução saturada de cloreto de potássio e, em seguida, os intestinos são removidos para as medições do comprimento e raio (SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001; JAIN et al., 2007; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009).

c) Efeito da CAE e fluxo dinâmico de água no lúmen intestinal

A CAE, conforme descrito no item 3.1, é uma camada estagnada de água adjacente à superfície apical da membrana e que é formada pela mistura incompleta de conteúdo luminal próxima à superfície do intestino, podendo atuar como uma barreira física à absorção de substâncias. Dependendo da espessura desta camada, a permeabilidade de uma substância ativa através da membrana intestinal pode ser variada (THOMSON et al., 1983).

Estudos têm indicado que esta camada apresenta-se mais espessa quando empregam-se métodos *in vitro* e *ex vivo*, o que pode ser uma razão para resultados diferenciados devido ao efeito de barreira à absorção (LENNERNAS,

1998; AVDEEF, 2003; DEFERME, ANNAERT, AUGUSTIJNS, 2008; SUGANO, 2010).

Nos estudos de permeabilidade por meio do modelo de perfusão *in situ* é fundamental considerar o efeito dos processos de absorção (ou influxo) e secreção (ou efluxo) de água que ocorrem constantemente no intestino durante o ensaio sobre os resultados de permeabilidade, pois estas transferências de água podem introduzir erros na concentração luminal do fármaco (SUTTON; RINALDI; VUKOVISNKY, 2001; LANE; LEVIS; CORRIGAN, 2006).

Com a finalidade de corrigir as prováveis alterações que ocorrem na concentração da substância em função do efluxo e influxo de água, têm sido relatados dois principais métodos: o da co-perfusão de uma substância marcadora não absorvível, tais como vermelho de fenol (corante), inulina ou ^{14}C -PEG 4000 (isótopo radioativo) e o método gravimétrico.

Para o método com co-perfusão de um marcador, a correção da concentração de um fármaco avaliado no estudo de permeabilidade utilizando marcadores não absorvíveis é calculada pela Equação 3.1 (SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001; KIM et al., 2006; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009).

Equação 3.1:

$$C_{out\ corrigida} = \frac{C_{out} \cdot [Marcador_{in}]}{[Marcador_{out}]}$$

onde: $C_{out\ corrigida}$ = concentração corrigida do fármaco na saída do segmento intestinal;

C_{out} = concentração do fármaco na saída do segmento intestinal;

$[Marcador_{in}]$ = concentração da substância marcadora na entrada do segmento intestinal;

$[Marcador_{out}]$ = concentração da substância marcadora na saída do segmento intestinal.

Já por meio do método gravimétrico, a correção da concentração do fármaco pode ser calculada através do emprego da Equação 3.2. Tal método consiste em pesar o líquido coletado (diferença entre o peso do recipiente cheio e o peso do mesmo recipiente vazio) e através do valor da densidade (obtido a partir da solução de perfusão com o fármaco) é possível obter o volume correspondente ao fluxo utilizado por unidade de tempo (SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001; JAIN et al., 2007; MAHER et al., 2009).

O método gravimétrico consiste em corrigir a concentração do fármaco na solução de perfusão coletada em cada intervalo de tempo do ensaio em relação à ocorrência do efeito do fluxo de água no intestino. C_{out} é determinada a partir da quantificação da substância por método analítico adequado e o valor de Q_{out} pode ser facilmente obtido a partir do cálculo da densidade da solução de perfusão contendo o fármaco nas condições de temperatura do ensaio.

Equação 3.2:

$$C_{out\ corrigida} = C_{out} \cdot \frac{Q_{out}}{Q_{in}}$$

onde: $C_{out\ corrigida}$ = concentração corrigida do fármaco na saída do segmento intestinal;

C_{out} = concentração do fármaco na saída do segmento intestinal;

Q_{in} = fluxo da solução de perfusão na entrada do segmento intestinal;

Q_{out} = fluxo da solução de perfusão na saída do segmento intestinal.

Sutton, Rinaldi e Vukovsky (2001) avaliaram comparativamente o emprego de dois métodos para a correção da concentração do fármaco na saída do segmento intestinal ($C_{out\ corrigida}$). Neste estudo foram avaliados os métodos que utilizam marcadores não absorvíveis e o método gravimétrico. Os autores constataram que ambos os procedimentos apresentaram precisão satisfatória, entretanto o método gravimétrico mostrou-se superior, uma vez que, por não empregar nenhum tipo de substância como marcador, não oferece o risco de

interferência no ensaio de permeabilidade propriamente dito e nas análises posteriores do fármaco em estudo (SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001).

É possível, por meio de outra equação, obter os valores de fluxo de água no intestino para cada coleta de amostra durante o ensaio. A taxa de fluxo de água no intestino (TFA) é calculada pela Equação 3.3, onde resultados positivos indicam a ocorrência de absorção de água a partir do lúmen intestinal e resultados negativos indicam o oposto (JAIN et al., 2007).

Equação 3.3:

$$TFA = \left[1 - \left(\frac{Q_{out}}{Q_{in}} \right) \right] \frac{Q_{in}}{l}$$

onde: TFA = taxa do fluxo de água;

Q_{in} = fluxo de entrada da solução de perfusão;

Q_{out} = fluxo de saída da solução de perfusão em um intervalo específico;

l = comprimento do segmento intestinal selecionado.

d) Cálculo da permeabilidade efetiva (P_{ef})

O estudo de permeabilidade de uma substância ativa por meio do modelo de perfusão *in situ* se inicia após o estabelecimento do estado de equilíbrio (também conhecido como estado estacionário). Para atingir esta condição, normalmente leva-se de 30 a 60 minutos e é fundamental para que o fármaco solubilizado na solução de perfusão possa entrar em equilíbrio com a membrana intestinal, ou seja, sua concentração na saída do intestino permanece estável ao longo do tempo, permitindo, desta forma, o cálculo da P_{ef} a partir das amostras coletadas (COOK; SHENOY, 2003; KIM et al., 2006; JAIN et al., 2007; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; ERIKSSON et al., 2010).

A Equação 3.4 apresenta a fórmula matemática para o cálculo da permeabilidade efetiva (JAIN et al., 2007; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009).

Equação 3.4:

$$P_{ef} = -\frac{Q_{in}}{A} \cdot \ln\left(\frac{C_{out}}{C_{in}}\right)$$

onde: P_{ef} = permeabilidade efetiva do fármaco;

Q_{in} = fluxo de entrada da solução de perfusão;

A = área ($2\pi RL$) disponível para absorção intestinal, considerando o comprimento (L) e o raio do intestino (R);

C_{out} = concentração corrigida do fármaco na saída do segmento intestinal;

C_{in} = concentração de entrada do fármaco.

e) Cálculo da P_{ef} em seres humanos a partir dos resultados de P_{ef} em ratos

Alguns autores têm proposto um modelo matemático que permite determinar ou prever a P_{ef} em seres humanos a partir dos valores de P_{ef} obtidos em ratos pelo método de perfusão *in situ*. A relação matemática proposta por estes pesquisadores está descrita na Equação 3.5 (FAGERHOLM; JOHANSSON; LENNERNÄS, 1996; SVENSSON et al., 1999).

Equação 3.5:

$$P_{ef,humanos} = 3,6 P_{ef,ratos} + 0,03 \times 10^{-4}$$

onde: $P_{ef, humanos}$ = permeabilidade efetiva prevista para seres humanos;

$P_{ef, ratos}$ = permeabilidade efetiva obtida a partir de ensaios com ratos empregando o modelo de perfusão *in situ*.

3.3. Fármacos antirretrovirais

Os fármacos antirretrovirais atuam inibindo a replicação viral em diferentes fases do processo. Existem atualmente cinco classes de fármacos antirretrovirais: inibidores da protease, inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos, inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos, inibidores da fusão e inibidores da integrase (OFOTOKUN; CHUCK; HITTI, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

A primeira classe de fármacos que surgiu para o tratamento de pacientes com Aids (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) foi a dos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRAN), que apresentam atividade antirretroviral em função de sua potência contra o HIV tipo 1 e tipo 2. Pertencem a esta classe fármacos como abacavir, didanosina, lamivudina, estavudina e zidovudina (AYMARD et al., 2000; BALINT, 2001; CHECA et al., 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Os ITRAN são amplamente utilizados e atuam inibindo a enzima transcriptase reversa do vírus HIV. Os fármacos estavudina (d4T), lamivudina (3TC) e zidovudina (AZT) são aprovados pela FDA para o tratamento terapêutico de pessoas infectadas com o vírus HIV, além de fazerem parte do programa brasileiro do governo de combate à Aids (BALIMANE; SINKO, 1999; FERNANDES et al., 2006; ROBBINS et al., 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Dados referentes às características de solubilidade e permeabilidade em relação à d4T, 3TC e AZT são escassos na literatura, bem como dados relacionados aos estudos de permeabilidade destes fármacos por meio do modelo de perfusão *in situ*. Os poucos relatos existentes apresentam divergências que podem ser justificadas em razão das variáveis do estudo: técnica ou tipo de ensaio empregado, temperatura, composição e pH do meio utilizado, entre outras.

3.3.1. Estavudina (d4T)

A estavudina (d4T, $C_{10}H_{12}N_2O_4$) é um fármaco sintético inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo (ITRAN). No interior das células, este fármaco sofre fosforilação por enzimas quinases gerando um metabólito ativo conhecido como trifosfato de estavudina (d4T-3P) que atua impedindo a replicação viral, pois há competição com o substrato natural da enzima resultando na formação prematura do DNA viral (BALIMANE; SINKO, 1999; LI; CHAN, 1999). A Figura 3.3 mostra a estrutura química da d4T.

Figura 3.3: Estrutura química da d4T (BALIMANE; SINKO, 1999; LI; CHAN, 1999)

A d4T apresenta-se como pó branco ou levemente amarelado com peso molecular igual a $224,2 \text{ g.mol}^{-1}$ e pKa igual a 9,8. A solubilidade da d4T em água na temperatura de 23°C é de aproximadamente 83 mg.mL^{-1} (UNITED STATES, 2009). É um fármaco que apresenta boa absorção após a administração oral com biodisponibilidade em torno de 86% (1 hora após a administração oral). Tem sido classificada como pertencente à classe I do SCB (BALIMANE; SINKO, 1999; LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004; MISTRI et al., 2007; STRYDOM et al., 2009; SILVA et al., 2011).

Apesar da existência das informações relativas à solubilidade em água ou biodisponibilidade, há poucos relatos na literatura que avaliam ou descrevem estes parâmetros em relação à d4T, sobretudo conforme o SCB.

Prakash e colaboradores (2008) avaliaram a solubilidade de antirretrovirais, inclusive da d4T. Em diferentes meios, tais como água, solução de HCl a 0,01M, tampão acetato pH 4,5 e tampão fosfato pH 6,8, utilizando o método de saturação do meio sob temperatura de $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Os resultados apresentados foram: $75,36 \text{ mg.mL}^{-1}$ no meio água, $78,19 \text{ mg.mL}^{-1}$ no meio HCl 0,01M, $101,23 \text{ mg.mL}^{-1}$ no meio pH 4,5 e $76,13 \text{ mg.mL}^{-1}$ no meio pH 6,8 (PRAKASH et al., 2008).

Com relação à permeabilidade, Waclawski e Sinko (1996) empregaram o modelo de perfusão *in situ* e constataram que a d4T apresenta permeabilidade concentração-dependente em concentrações variadas, ou seja, quando a concentração do fármaco aumenta, a permeabilidade também aumenta. Em estudo realizado com membranas de intestino de ratos (*brush-border membrane vesicles*), Waclawsky e Sinko observaram que os mecanismos de permeação da d4T estão relacionados à participação de carreadores e aos processos passivos (WACLAWSKI; SINKO, 1996). Os resultados deste trabalho reforçam a participação de um transportador na membrana intestinal. Neste estudo foi verificado também que a ocorrência de metabolismo intracelular e na borda em escova é mínima em ratos (por incubação da substância com homogenato intestinal). Em seres humanos, a não ocorrência de absorção saturável da d4T provavelmente se deve à alta permeabilidade passiva (WACLAWSKI; SINKO, 1996).

Siccardi e colaboradores têm relatado que a permeabilidade da d4T, resultado obtido por meio de estudos em células Caco-2, foi de $0,45 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ (SICCARDI et al., 2003).

3.3.2. Lamivudina (3TC)

A lamivudina (3TC; $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$) é um fármaco antirretroviral sintético análogo de nucleosídeo (ITRAN) e atua inibindo a enzima transcriptase reversa do HIV. Normalmente este fármaco é utilizado em associação com outros antirretrovirais como d4T, AZT e didanosina (LI; CHAN, 1999; BALINT, 2001; FERNANDES et al., 2006; WHO, 2006; JAIN; JADON; RADHAPYARI, 2007; MISTRI et al., 2007; STRAUCH et al., 2011). A Figura 3.4 representa a estrutura química da 3TC.

Figura 3.4: Estrutura química da 3TC (BALIMANE; SINKO, 1999; LI; CHAN, 1999; WHO, 2006; STRAUCH et al., 2011)

A atividade terapêutica da 3TC contra o vírus HIV depende de sua fosforilação por enzimas quinases no interior dos linfócitos, transformando-se em metabólito ativo trifosfatado (3TC-3P) capaz de inibir a enzima transcriptase reversa do HIV tipo 1 e HIV tipo 2 por se ligar ao DNA do vírus (BALIMANE; SINKO, 1999; JAIN; JADON; RADHAPYARI, 2007; STRAUCH et al., 2011).

Após a administração oral, a absorção da 3TC ocorre de forma rápida por mecanismo de difusão passiva e apresenta biodisponibilidade em torno de 80% (YUEN et al., 1995; BALIMANE; SINKO, 1999; BALINT, 2001; MISTRI et al., 2007).

A 3TC apresenta-se como pó branco a branco amarelado, peso molecular igual a $229,3 \text{ g.mol}^{-1}$, pKa de 4,3 e quando dissolvido em água purificada encontra-se sob a forma não ionizada (FERNANDES et al., 2006; STRAUCH et al., 2011). Este fármaco possui boa estabilidade à luz e à temperatura tanto sob a forma sólida quando em solução aquosa. Com relação à solubilidade, o fármaco 3TC apresenta-se solúvel em metanol e praticamente insolúvel em acetona (WHO, 2006). Segundo o Merck Index (2001), o valor de solubilidade da 3TC é de aproximadamente $70,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ a 20°C , porém esta referência não relata quaisquer detalhes para a obtenção deste resultado (MERCK INDEX, 2001).

Quanto à sua classificação biofarmacêutica, há divergências. Estudos têm indicado que ela pode pertencer à classe I ou à classe III (LINDERBERG; KOOP; DRESSMAN, 2004; FERNANDES et al., 2006). Segundo Lindenber, Koop e Dressman (2004), a 3TC apresenta alta solubilidade, porém dados referentes à permeabilidade deste fármaco são contraditórios, levando à dificuldade de classificá-lo segundo critérios do SCB. Por outro lado, alguns pesquisadores têm considerado esta substância como pertencente à classe I do SCB, ou seja, apresenta características de alta solubilidade e alta permeabilidade (LINDENBERG; KOOP; DRESSMAN, 2004; FERNANDES et al., 2006).

De acordo com os estudos de solubilidade, segundo o SCB, realizados por Prakash e colaboradores (2008), a 3TC apresentou os seguintes resultados: 140,01 mg.mL⁻¹ em meio água, 276,08 mg.mL⁻¹ em solução de HCl 0,01M, 230,50 mg.mL⁻¹ em tampão pH 4,5 e 92,76 mg.mL⁻¹ em tampão pH 6,8. Os estudos foram conduzidos sob temperatura de 37 ± 0,5°C, porém algumas condições diferem do preconizado pela FDA (PRAKASH et al., 2008).

Igualmente, fundamentados no SCB, a avaliação da solubilidade da 3TC pelo método do equilíbrio foi realizada em estudo conduzido por Dezani (2010). Cinco meios de solubilização foram utilizados e os resultados obtidos foram: 177,53 mg.mL⁻¹ em meio água purificada, 212,63 mg.mL⁻¹ em meio pH 1,2, 155,95 mg.mL⁻¹ em meio pH 4,5, 179,03 mg.mL⁻¹ em meio pH 6,8 e 190,70 mg.mL⁻¹ em meio pH 7,5. A partir destes resultados, a razão D:S da 3TC foi obtida para cada meio de solubilização considerando a maior dose recomendada (300 mg). Os resultados referentes à razão D:S foram: 1,69 mL em água purificada, 1,41 mL em meio pH 1,2, 1,92 mL em meio pH 4,5, 1,68 mL em meio pH 6,8, e 1,57 mL em meio pH 7,5 (DEZANI, 2010).

A dissolução intrínseca da 3TC em diferentes meios permitiu a obtenção das taxas de dissolução intrínseca do fármaco (TDI), as quais foram: 6,94 mg/min/cm² em água purificada, 9,83 mg/min/cm² em meio pH 1,2, 6,38 mg/min/cm² em meio pH 4,5, 5,13 mg/min/cm² em meio pH 6,8 e 4,86 mg/min/cm² em meio pH 7,5 (DEZANI, 2010).

Os resultados de solubilidade e de dissolução intrínseca da 3TC obtidos por Dezani (2010) são condizentes, uma vez que o fármaco é solúvel em até 250 mL de meio aquoso. Além disso, a 3TC apresentou elevada velocidade de dissolução, correspondendo com a característica de alta solubilidade do fármaco.

Dados referentes à permeabilidade da 3TC são escassos na literatura. Souza e colaboradores estudaram a permeabilidade da 3TC em células Caco-2 e MDCK-MDR1. A P_{ap} em Caco-2 foi de $0,10 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$, enquanto que em células MDCK-MDR1 o resultado obtido foi de $0,01 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ (SOUZA et al., 2009).

Em ensaios de permeabilidade utilizando o modelo *ex vivo* com o emprego de tecido intestinal isolado em câmaras de difusão vertical (Franz Cells), a 3TC apresentou P_{ap} igual a $48,00 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ (DEZANI, 2010).

3.3.3. Zidovudina (AZT)

A zidovudina (AZT, $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$) é um fármaco antirretroviral sintético análogo de nucleosídeo inibidor da enzima transcriptase reversa (ITRAN). A Figura 3.5 representa a estrutura química da AZT.

Figura 3.5: Estrutura química da AZT (BALIMANE; SINKO, 1999; LI; CHAN, 1999)

A AZT foi o primeiro fármaco antirretroviral aprovado para o tratamento da Aids e até hoje ele é escolhido para ser usado em associação com outras substâncias ativas para combater a infecção pelo vírus HIV (BALIMANE; SINKO, 1999; KIYOMOTO; TENGAN; GODINHO, 2008; PENDELA et al., 2009).

Intracelularmente, a AZT sofre fosforilação por enzimas quinases e transforma-se em metabólito ativo trifosfatado. A zidovudina-trifosfato (AZT-3P) possui afinidade pela enzima transcriptase reversa do vírus HIV causando sua inibição por mecanismo competitivo e conseqüente diminuição na replicação viral, pois impede a formação da cadeia de DNA viral (BALIMANE; SINKO, 1999; LI; CHAN, 1999; BALINT, 2001).

A AZT possui boa estabilidade à luz e à temperatura quando está na forma sólida ou em solução aquosa. Seu valor de pKa é de 9,78 (LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004).

A AZT apresenta boa absorção após a administração oral, ocorrendo por difusão passiva através da membrana intestinal, podendo interagir com proteínas carreadoras. A biodisponibilidade deste fármaco é de 60 a 70%, podendo ocorrer grande variabilidade oral em razão do metabolismo pré-sistêmico e a uma série de fatores, incluindo o estado de saúde do paciente e interações com alimentos e com outros fármacos (BLUM et al., 1988; WACLAVISKI; SINKO, 1996; LI; CHAN, 1999).

Pertence à classe I do SCB (LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004) e existem alguns estudos de solubilidade e permeabilidade da AZT realizados por diferentes métodos relatados na literatura.

Em relação à solubilidade, a AZT apresenta resultado como 25 mg.mL⁻¹ a 25°C, porém as condições do ensaio para a obtenção de tal dado não são descritas (MERCK INDEX, 2001).

Singh e colaboradores (2010) conduziram um estudo de solubilidade da AZT pelo método do equilíbrio em água destilada, resultando em 19,50 mg.mL⁻¹ a 25°C, enquanto que a 37°C a solubilidade foi de 30,60 mg.mL⁻¹. Em tampão pH 6,8, a solubilidade da AZT foi de 20,3 mg.mL⁻¹ a 25°C e 24,4 mg.mL⁻¹ a 37°C (SINGH et al., 2010).

Em outro estudo de solubilidade pelo método do equilíbrio a 37°C, a AZT foi avaliada em cinco meios com diferentes valores de pH. Os resultados obtidos foram: 25,39 mg.mL⁻¹ em água purificada, 18,65 mg.mL⁻¹ em meio pH 1,2, 23,25 mg.mL⁻¹ em meio pH 4,5, 24,43 mg.mL⁻¹ em meio pH 6,8, e 20,10 mg.mL⁻¹ em meio pH 7,5. Os valores relacionados à razão D:S foram obtidos a partir dos dados de solubilidade, considerando a maior dose recomendada (300 mg) do fármaco. As razões D:S foram obtidas para cada meio empregado no estudo e os

resultados foram: 11,92 mL em água purificada, 16,08 mL em meio pH 1,2, 12,90 mL em meio pH 4,5, 12,28 mL em meio pH 6,8, e 14,93 mL em meio pH 7,5 (DEZANI, 2010).

Com relação ao estudo de dissolução intrínseca da AZT, os resultados obtidos por Dezani (2010) foram: 0,95 mg/min/cm² em água purificada, 0,74 mg/min/cm² em meio pH 1,2, 0,90 mg/min/cm² em meio pH 4,5, 0,72 mg/min/cm² em meio pH 6,8 e 0,66 mg/min/cm² em meio pH 7,5. Tais dados indicaram alta velocidade de dissolução da AZT. Sendo assim, este fármaco apresenta alta solubilidade, bem como alta velocidade de dissolução (DEZANI, 2010).

Em estudo de permeabilidade utilizando tecidos intestinais isolados em câmaras de difusão (Franz Cells), a AZT apresentou permeabilidade aparente no sentido absorptivo igual a $56,00 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ (DEZANI, 2010).

Em culturas celulares de Caco-2 e MDCK-MDR1, a AZT apresentou permeabilidade aparente igual a $6,14 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ e $0,17 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$, respectivamente (SOUZA et al., 2009). Yu e Synko (1997) também estudaram a P_{ap} da AZT em células Caco-2, obtendo resultado igual a $2,16 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ (YU; SINKO, 1997).

Em sacos invertidos, o valor de permeabilidade aparente da AZT obtido foi de $0,55 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ (QUEVEDO; BRIÑON, 2009).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Materiais, solventes e reagentes

- Lamivudina e zidovudina: matérias-primas de grau farmacêutico de pureza, fornecidas gentilmente pela Fundação para o Remédio Popular (FURP, São Paulo, Brasil);
- Estavudina: matéria-prima de grau farmacêutico de pureza, fornecida gentilmente pela Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos (São Paulo, Brasil);
- Estavudina, lamivudina e zidovudina: substâncias químicas de referência com grau de pureza superior a 99%;
- Marcadores fluoresceína e metoprolol;
- Solução de perfusão preparada com os seguintes componentes: NaCl, KCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, manitol, PEG 4000 e D-glicose (JAIN et al., 2007);
- Materiais descartáveis para uso nos procedimentos cirúrgicos (seringas, algodão, gazes e esparadrapo);
- ácido clorídrico (HCl), cloreto de sódio (NaCl), fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) e hidróxido de sódio (NaOH);
- Acetonitrila e Metanol de pureza cromatográfica Merck;
- Trietilamina P.A.;
- Fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) Merck;
- Ácido o-fosfórico (H₃PO₄), ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH);
- Água purificada Milli-Q (Millipore Corporation, EUA).

4.1.2. Equipamentos e dispositivos diversos

- Micropipeta monocal de 20 a 100 µL (Pipetman P100) – Gilson®;
- Micropipeta monocal de 100 a 1000 µL (mod. 4500) – Labsystems®;
- Micropipeta monocal de 500 a 5000 µL (série 2100) – Eppendorf®;
- Incubadora com plataforma de agitação orbital tipo *Shaker* – Tecna® mod. TE-420;
- Espectrofotômetro UV-VIS – Varian®;
- Dissolutor Vankel®, modelo VK-7010, provido de oito cubas;
- Prensa hidráulica de bancada – Carver®;

- Aparato de Wood;
- Cromatógrafo Merck Hitachi LaChrom® com detector UV (L-7400), detector de fluorescência (L-7485) e bomba (L-7100);
- Bomba peristáltica Minipuls-3 marca Gilson® com 8 canais;
- Colchonete térmico com controle de temperatura;
- pHmetro Hanna®;
- Balança analítica Shimadzu® modelo AX 200;
- Ultrassom Unique®.

4.2. Métodos

4.2.1. Determinação da solubilidade da d4T

4.2.1.1. Preparo dos meios de solubilização para a determinação da solubilidade e da dissolução intrínseca

Para a realização dos ensaios de solubilidade e de dissolução intrínseca foram empregados cinco meios de dissolução, sendo que quatro deles foram soluções tampão (meios aquosos) com diferentes valores de pH (1,2; 4,5; 6,8 e 7,5) e um deles foi a água purificada Milli-Q. O Quadro 4.1 mostra os procedimentos de preparo das quatro soluções tampão utilizadas nos ensaios de solubilidade e de dissolução intrínseca da d4T. Conforme a necessidade, o pH foi corrigido com o uso de soluções diluídas de HCl (0,1 M) ou NaOH (0,2 M).

Quadro 4.1: Procedimentos de preparo das soluções tampão utilizadas nos estudos de solubilidade e de dissolução intrínseca da d4T

Solução Tampão	Modo de preparo
pH 1,2	Foram dissolvidos 4,0 g de NaCl em água purificada Milli-Q em um balão volumétrico de 2 L. Adicionaram-se 10 mL de HCl e completou-se o volume com água purificada Milli-Q (BRITISH PHARMACOPŌEIA, 2010).
pH 4,5	Foram dissolvidos 13,6 g de fosfato de potássio monobásico em balão volumétrico de 2 L e completou-se o volume com água purificada Milli-Q (FARMACOPÉIA PORTUGUESA VIII, 2005).
pH 6,8	Foram adicionados 500 mL da solução de fosfato de potássio monobásico (0,2 M*) em um balão volumétrico de 2 L. Posteriormente, foi feita a adição de 224 mL de solução de NaOH 0,2 M**, e completou-se o volume do balão com água purificada Milli-Q (UNITED STATES PHARMACOPŌEIA, 2010).
pH 7,5	Foram adicionados 500 mL da solução de fosfato de potássio monobásico (0,2 M*). Acrescentaram-se 395 mL de solução NaOH 0,2 M** e completou-se o volume do balão de 2 L com água purificada Milli-Q (UNITED STATES PHARMACOPŌEIA, 2010).
* solução de fosfato de potássio monobásico 0,2 M (1 L)	Foram dissolvidos 27,22 g de fosfato de potássio monobásico em balão volumétrico de 1 L e completou-se o volume com água purificada Milli-Q (UNITED STATES PHARMACOPŌEIA, 2010).
** solução de NaOH (0,2 M) (1 L)	Foram dissolvidos 8 g de NaOH em balão volumétrico de 1 L e completou-se o volume com água purificada Milli-Q (UNITED STATES PHARMACOPŌEIA, 2010).

As soluções tampão preparadas foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar e mantidas sob refrigeração à temperatura de 4°C até sua utilização nos estudos de solubilidade e de dissolução intrínseca.

4.2.1.2. Determinação da solubilidade da d4T pelo método do equilíbrio (*shake-flask*)

Soluções tampão descritas na Farmacopéia dos Estados Unidos (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010) são consideradas apropriadas para o uso em determinações da solubilidade. Outros métodos que não o de saturação em *shake-flask* (método do equilíbrio) a 37°C, como os de titulação ácido/base, podem ser usados mediante justificativa que suporte que tais métodos possam prever a solubilidade de equilíbrio da substância teste (UNITED STATES, 2000).

O número de diferentes faixas de pH a serem testados depende das características de ionização do fármaco e de seu pKa. Por exemplo, se o pKa do fármaco variar na faixa de 3 a 5, a solubilidade deverá ser determinada em: pH = pKa, pH = pKa - 1, pH = pKa + 1 e nos pH = 1,0 a 7,5, devendo ser realizado com três replicatas, sendo o pH verificado após a adição do fármaco na solução tampão (UNITED STATES, 2000).

Os testes de solubilidade da d4T foram realizados utilizando o método do equilíbrio empregando a técnica *shake-flask* (agitação de frascos) no equipamento *shaker* (incubadora com plataforma de agitação orbital com controle de temperatura), conforme preconizado pelo guia da FDA (UNITED STATES, 2000). Os ensaios foram realizados em frascos plásticos com tampa e com capacidade de 50 mL. Em cada frasco, foram adicionados 10 mL do meio de interesse (descritos no Quadro 4.1) e a quantia de 2 g de d4T. Esta quantidade foi suficiente para saturar cada meio, o que foi caracterizado pelo depósito da fração não solubilizada no fundo do recipiente. Os frascos foram adaptados ao equipamento devidamente programado para manter a temperatura em $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e agitação de 150 rpm pelo período de 72 horas (UNITED STATES, 2000; MARÍN; MARGARIT; SALCEDO, 2002; WON et al., 2005; OKUMU; DIMASO; LÖBENBERG, 2009).

Após o tempo indicado, as amostras foram retiradas do equipamento e imediatamente filtradas com auxílio do filtro de seringa com porosidade de 0,45 μm . Do volume filtrado, retirou-se a alíquota de 250 μL que foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL e, em seguida, completou-se o volume do balão com os correspondentes meios de interesse (descritos no Quadro 4.1). As leituras em espectrofotômetro foram realizadas na região do UV com o comprimento de onda de 266 nm utilizando método previamente validado, conforme o item 4.2.5.1.

A partir dos resultados de solubilidade, é possível calcular a razão D:S do fármaco, que é obtida dividindo a maior dose comercial disponível do fármaco (em miligramas) pela solubilidade (em miligramas por mililitros) obtida no estudo, fornecendo unidades volumétricas (mL). Os valores da razão D:S são, então, comparados com os critérios estabelecidos pelo FDA para estabelecer se o fármaco é altamente solúvel ou não (UNITED STATES, 2000; LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004; UNITED STATES, 2011).

4.2.1.3. Determinação da dissolução intrínseca da d4T

Os estudos de dissolução intrínseca foram realizados com o emprego do aparato de Wood (vide Anexo A) e dissolutor Vankel®, modelo VK7010. Para a obtenção das pastilhas (discos com área de 0,5 cm^2) de d4T, foi utilizada uma prensa hidráulica de bancada para comprimir uma quantidade do fármaco (média de 350 mg) utilizando pressão de 2000 psi durante 2 minutos (MARASANAPALLE et al., 2009).

Padronizou-se o volume de 900 mL de meio para cada cuba de dissolução, à temperatura de $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e rotação de 50 rpm. Os intervalos de coleta foram 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80 e 90 minutos. As leituras em espectrofotômetro foram realizadas na região do UV com o comprimento de onda de 266 nm, conforme descrito no item 4.2.5.1 (YU et al., 2004; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).

Para a determinação da TDI, é necessário plotar a quantidade acumulada da amostra por unidade de área do disco contra o tempo correspondente a até 10% do fármaco dissolvido. A quantidade acumulada dissolvida por unidade de área é dada pela quantidade acumulada dissolvida em cada tempo dividido pela

área de superfície exposta. A regressão linear deve ser realizada com pontos que representem 10% do fármaco dissolvido (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).

4.2.2. Determinação da permeabilidade da d4t, 3TC e AZT utilizando o modelo de perfusão *in situ* em ratos

4.2.2.1. Preparo da solução de perfusão

A solução de perfusão utilizada nos ensaios de permeabilidade intestinal *in situ* foi preparada com a seguinte composição: cloreto de sódio (NaCl) 48 mM, cloreto de potássio (KCl) 5,4 mM, fosfato de sódio bibásico (Na_2HPO_4) 28 mM, fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) 43 mM, manitol 35 mM, polietilenoglicol 4000 (PEG 4000) 1 g.L^{-1} , D-glicose anidra 10 mM (JAIN et al., 2007).

Os componentes foram adicionados em água purificada Milli-Q até a completa solubilização e em seguida foi verificado o pH. Conforme a necessidade, realizou-se o ajuste de pH para o valor de 6,5 com solução de ácido clorídrico 2 M ou hidróxido de potássio 0,1 M (RATHORE et al., 2008; ERIKSSON et al., 2010). A solução pronta foi degaseificada em banho de ultrassom antes da sua utilização nos experimentos.

As soluções de perfusão contendo o fármaco de interesse ou o marcador foram preparadas a partir da dissolução destas substâncias na solução de perfusão descrita anteriormente. As soluções dos fármacos apresentaram as seguintes concentrações: $0,16 \text{ mg.mL}^{-1}$ (d4T), $1,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ (3TC), $1,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ (AZT). As soluções dos marcadores apresentaram as seguintes concentrações: $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ para fluoresceína e $0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$ para metoprolol.

Para definir a concentração do fármaco na solução de perfusão, considera-se a maior dose recomendada do produto farmacêutico dividida pelo volume de 250 mL. Assim, assegura-se a maior concentração possível do fármaco no intestino (KIM et al., 2006; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009). Desta maneira, a d4T apresenta-se sob a forma de cápsulas na maior dose disponível de 40 mg (WHO, 2005; UNITED STATES, 2011). Assim, de acordo com o exposto anteriormente, a solução de perfusão contendo este fármaco foi preparada na

concentração de $0,16 \text{ mg.mL}^{-1}$. A 3TC e a AZT apresentam-se sob a forma de comprimidos na maior dose disponível de 300 mg (UNITED STATES, 2011) para ambos, permitindo o preparo da solução de perfusão na concentração de $1,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ para cada um dos dois fármacos, conforme demonstrado no Quadro 4.2.

Quadro 4.2: Concentração dos fármacos na solução de perfusão para o estudo de permeabilidade utilizando o modelo de perfusão *in situ*

Fármaco	Maior dose recomendada (mg)*	Concentração da substância na solução de perfusão (mg.mL^{-1})
estavudina	40	0,16
lamivudina	300	1,2
zidovudina	300	1,2

Fonte: UNITED STATES, 2011

4.2.2.2. Etapa cirúrgica e perfusão

Para este estudo foram empregados ratos machos da linhagem Wistar Hannover, pesando de 250 a 300 g, fornecidos pelo Biotério do Conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo. Ressalta-se que este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, recebendo resposta favorável para a realização do presente trabalho sob o número de Protocolo nº 235, conforme apresentado em Anexo C.

Para a avaliação da permeabilidade de cada fármaco do estudo e dos marcadores foi empregado um número de 6 animais para a fluoresceína ($n = 6$) e 7 animais para as demais substâncias ($n = 7$).

Os ratos fornecidos permaneceram dentro das condições padrão de temperatura, umidade, iluminação e ciclo circadiano no biotério até sua utilização nos experimentos. Previamente à execução dos ensaios, os animais foram submetidos a um período de jejum de 12 horas com acesso livre à água,

conforme procedimentos relatados na literatura relacionados aos estudos de permeabilidade de fármacos (SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001; BERGGREN et al., 2004; KIM et al., 2006; JAIN et al., 2007; RATHORE et al., 2008; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; ZAKERI-MILANI et al., 2009).

Após o período de jejum, os animais foram contidos adequadamente e anestesiados com associação de cetamina-xilazina na dose de $0,1 \text{ g.kg}^{-1}$ e $0,02 \text{ g.kg}^{-1}$ respectivamente, com administração por via intramuscular na porção posterior da pata traseira. A manutenção anestésica foi realizada com 25% a 50% da dose inicial administrada (via intramuscular) à medida que os animais apresentavam sinais de recuperação, tais como: aumento das frequências respiratória e cardíaca, contrações/espasmos musculares, retorno do reflexo interdigital ou caudal e respiração irregular.

Após a constatação do estado profundo de anestesia, caracterizado por ausência de reflexos protetores e reflexos caudal e interdigital, além do relaxamento muscular, os animais foram acomodados em superfície aquecida a $37,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ para melhor comando da duração da anestesia e conforto e foram monitorados durante todo o período de experimento.

Uma incisão abdominal foi feita para expor o intestino. Cerca de dez centímetros de segmento intestinal do jejuno foi isolado utilizando fio cirúrgico. Uma cânula plástica foi inserida na porção proximal do intestino e, então, conectada à bomba peristáltica para a perfusão da solução de perfusão. Outra cânula plástica foi inserida na porção distal do segmento isolado, a fim de permitir a coleta das amostras em tempos pré-estabelecidos.

A solução de perfusão isenta de fármaco, preparada conforme descrito no item 4.2.2.1, mantida à temperatura de $37,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$, foi perfundida no trecho intestinal selecionado para o estudo por um período aproximado de 30 minutos a um fluxo de $0,5 \text{ mL.min}^{-1}$ até a completa remoção do conteúdo intestinal, resíduos alimentares e secreções.

Em seguida, a solução de perfusão contendo os fármacos de interesse ou os marcadores, preparadas conforme descrito no item 4.2.2.1, foi perfundida a um fluxo de $0,2 \text{ mL.min}^{-1}$, sob temperatura de $37,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$. Os primeiros 60 minutos de perfusão correspondem ao período para atingir o estado de equilíbrio, ou seja, é o período para que o fármaco ou os marcadores em solução possam alcançar o

estado de equilíbrio com a membrana intestinal (DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; DAHAN et al., 2010).

Após essa etapa, as amostras foram coletadas em intervalos de 15 minutos por um tempo total de coleta de 120 minutos (coleta aos 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 minutos), em recipientes plásticos apropriados do tipo tubo cônico plástico com capacidade para 2 mL. Imediatamente após a coleta, os recipientes foram pesados para o cálculo da TFA (ver item 4.2.2.3) e, em seguida, as amostras foram congeladas a -20 °C para a posterior análise por meio de método cromatográfico devidamente validado, conforme descrito no item 4.2.3.

Com a finalização das coletas das amostras e, portanto, término do experimento, foi realizado o aprofundamento da anestesia com a administração intramuscular de uma dose completa (0,1 g.kg⁻¹ de cetamina e 0,02 g.kg⁻¹ de xilazina) de cetamina-xilazina, para posterior eutanásia com solução saturada de cloreto de potássio (KCl) administrada por via intracardíaca, conforme protocolos de eutanásia para animais em experimentação (SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001; AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, 2007; JAIN et al., 2007; LI et al., 2011).

Após a constatação da morte, o segmento intestinal submetido ao estudo foi retirado para fazer as medições de comprimento para cada animal, pois este parâmetro interfere nos cálculos de P_{ef} , conforme a Equação 4.1 (JAIN et al., 2007; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009).

Equação 4.1:

$$P_{ef} = -\frac{Q_{in}}{A} \cdot \ln\left(\frac{C_{out}}{C_{in}}\right)$$

onde: P_{ef} = permeabilidade efetiva do fármaco;

Q_{in} = fluxo de entrada da solução de perfusão;

A = área ($2\pi RL$) disponível para absorção intestinal, considerando o comprimento (L) e o raio do intestino (R);

C_{out} = concentração corrigida do fármaco na saída do segmento intestinal;

C_{in} = concentração de entrada do fármaco.

A partir dos valores de P_{ef} obtidos em ratos por meio do método de perfusão *in situ*, calcularam-se os valores preditivos da perfusão *in situ* em seres humanos por meio da equação descrita por Fagerholm, Johansson e Lennernäs (1996) (FAGERHOLM; JOHANSSON; LENNERNÄS, 1996; SVENSSON et al., 1999), conforme demonstrado na Equação 4.2.

Equação 4.2:

$$P_{ef, humanos} = 3,6 P_{ef, ratos} + 0,03 \times 10^{-4}$$

onde: $P_{ef, humanos}$ = permeabilidade efetiva predita para seres humanos;

$P_{ef, ratos}$ = permeabilidade efetiva obtida a partir de ensaios com ratos empregando o modelo de perfusão *in situ*.

4.2.2.3. Correção do fluxo de água

As concentrações dos fármacos e dos marcadores foram corrigidas pelo método gravimétrico, conforme descrito no item 3.2.3.4 (subitem c).

Para realizar a correção, os recipientes plásticos empregados nas coletas foram previamente pesados vazios e em seguida foram pesados com o líquido coletado em cada intervalo de tempo de amostragem. Por diferença, obteve-se a massa em gramas do líquido coletado (volume de 1mL), ou seja, a massa de líquido correspondente ao volume de 1 mL. O volume coletado corresponde a cinco minutos de coleta a um fluxo de $0,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Sabendo-se previamente a densidade do líquido que contém o fármaco solubilizado, é possível corrigir o fluxo de saída e, conseqüentemente, a concentração do fármaco contido na amostra, sem que a absorção ou secreção de água interfira na quantificação, permitindo, desta forma, verificar se houve absorção ou secreção de água no segmento intestinal selecionado para o estudo.

Conforme relatado no item 4.2.2.2, a solução de perfusão contendo o fármaco foi perfundida no trecho intestinal a um fluxo de $0,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ de forma que aproximadamente 1 mL da solução de perfusão foi coletada em cada intervalo de tempo do experimento (15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 minutos). O cálculo da densidade de cada substância na solução de perfusão foi realizado considerando o volume de 1 mL e conhecendo-se a massa do líquido correspondente a este volume nas condições do estudo. Desta forma, o valor de densidade calculado (d) para cada composto foi utilizado no cálculo de correção do fluxo de saída (Q_{out} em $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$), conforme demonstrado na Equação 4.3.

Equação 4.3:

$$d = \frac{m}{V}$$

onde: d = densidade em $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (valor obtido pelo cálculo da massa da solução de perfusão contendo o fármaco no volume de 1 mL);

m = massa do líquido coletado a partir da porção distal do intestino (diferença entre a massa do recipiente com líquido e a massa do recipiente vazio);

V = volume em mL pelo período de cinco minutos.

O valor de V calculado pela Equação 4.3 refere-se ao volume obtido em cinco minutos. Ao dividir este valor por cinco, obtém-se o volume por minuto, que corresponde ao fluxo de saída da solução de perfusão (Q_{out}) em $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

Para constatar a ocorrência de absorção ou secreção de água no intestino (taxa de fluxo de água) durante o período do experimento, foi utilizada a Equação 4.4.

Equação 4.4:

$$TFA = \left[1 - \left(\frac{Q_{out}}{Q_{in}} \right) \right] \frac{Q_{in}}{l}$$

onde: Q_{in} = fluxo de entrada da solução de perfusão;

Q_{out} = fluxo de saída da solução de perfusão em um intervalo específico, calculado a partir da densidade da solução de perfusão através do método gravimétrico;

l = comprimento do segmento intestinal selecionado.

4.2.3. Quantificação dos fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT e dos marcadores fluoresceína e metoprolol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

4.2.3.1. Preparação das amostras

Após o descongelamento sob temperatura ambiente, as amostras foram preparadas da seguinte maneira: (1) para a determinação da d4T: 150 µL de cada amostra foram transferidos para tubo de ensaio com 150µL de padrão interno (didanosina 10,0 µg.mL⁻¹) e 1200 µL de fase móvel; (2) para a determinação da 3TC e da AZT: 150 µL de cada amostra foram transferidos para tubo de ensaio com 150 µL de padrão interno (didanosina 125,0 µg.mL⁻¹) e 1200 µL de fase móvel; (3) para a determinação da fluoresceína: 75 µL de cada amostra foram transferidos para tubo de ensaio com 1425 µL de fase móvel; (4) para a determinação do metoprolol: 500 µL de cada amostra foram transferidos para tubo de ensaio com 150 µL de padrão interno zidovudina (5 µg.mL⁻¹) e 350 µL de fase móvel.

Todas as amostras preparadas foram agitadas em agitador tipo *vórtex* e transferidas para recipientes adequados (*vials*) para posterior análise por meio de CLAE, conforme descrição no item 4.2.3.2.

4.2.3.2. Condições cromatográficas

A análise e quantificação das substâncias presentes nas amostras provenientes dos ensaios de perfusão *in situ* foram realizadas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O Quadro 4.3 apresenta as condições cromatográficas empregadas para a quantificação dos marcadores (fluoresceína e metoprolol) e dos fármacos (d4T, 3TC e AZT) em estudo.

A fase móvel utilizada foi composta basicamente por mistura de tampão fosfato de potássio monobásico 20 mM, acetonitrila e metanol, com proporções diferenciadas de acordo com a substância analisada. Conforme a necessidade, o pH foi ajustado com ácido o-fosfórico diluído até a obtenção do valor de pH desejado. A solução foi filtrada sob vácuo com a utilização de membrana filtrante de acetato de celulose, em seguida, a preparação foi levada ao banho de ultrassom para degaseificação.

Quadro 4.3: Condições cromatográficas empregadas para a análise e quantificação de fluoresceína, metoprolol, d4T, 3TC e AZT

Condições	Fluoresceína	Metoprolol	d4T	3TC	AZT
Detector	Fluorescência	UV			
Comprimento de onda (λ)	Ex*: 485 nm Em**: 515 nm	254 nm	270 nm		
Fase móvel	tampão fosfato 20 mM, metanol e acetonitrila (40:30:30) pH 4,5	tampão fosfato 20 mM, metanol, acetonitrila e trietilamina (69:15:15:1) pH 4,5	tampão fosfato 20 mM, metanol e acetonitrila (90:7:3) pH 4,5		
Fase estacionária	C18 de 25 cm Phenomenex®			C18 de 15 cm Phenomenex®	
Temperatura do forno	35°C	30°C	35°C		
Fluxo	1,0 mL.min ⁻¹				

* comprimento de onda de excitação da substância

** comprimento de onda de emissão da substância

4.2.4. Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos nos ensaios de permeabilidade foram analisados estatisticamente utilizando a análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey. Os resultados com índice de significância menor que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos (JAIN et al., 2007).

4.2.5. Validação dos métodos analíticos

4.2.5.1. Validação do método espectrofotométrico para a quantificação da d4T na determinação da solubilidade e da dissolução intrínseca

A validação do método analítico para a determinação da concentração da d4T dissolvida nos ensaios de solubilidade e de dissolução intrínseca foi realizada a partir dos procedimentos preconizados na RE nº 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA (Guia para a Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos), para ensaios destinados a quantificar fármacos em produtos farmacêuticos ou matérias-primas (BRASIL, 2003; ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).

Para a validação do método espectrofotométrico, foram preparadas soluções padrão contendo o fármaco d4T na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, nos diferentes meios de dissolução empregados e descritos no Quadro 4.1. Utilizou-se o padrão secundário de teor 101% fornecido pela Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos (São Paulo, Brasil). A partir destas soluções padrão, procederam-se as diluições utilizando o meio de solubilização correspondente (descrito no Quadro 4.1), obtendo-se, desta forma, as soluções diluídas para as curvas analíticas da validação.

Os meios utilizados para a validação do método espectrofotométrico foram preparados de acordo com o item 4.2.1.1.

a) Linearidade

As curvas analíticas para cada meio de solubilização empregado foram obtidas a partir das leituras em espectrofotômetro das soluções diluídas em cada meio (intervalo de $4,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $24,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$), conhecendo-se previamente o intervalo de absorvância (aproximadamente de 0,2 a 1,4 UA – unidades de absorvância). As equações das retas foram obtidas por regressão linear, através do método dos mínimos quadrados (BRASIL, 2003).

b) Especificidade/Seletividade

Simultaneamente à obtenção dos dados de especificidade e seletividade foram realizados ensaios de linearidade, os quais permitiram a construção das curvas analíticas.

As concentrações, em $\mu\text{g.mL}^{-1}$, utilizadas para a construção das curvas analíticas de cada meio foram: 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0; 14,0; 16,0; 18,0; 20,0; 22,0 e 24,0. As leituras das absorvâncias foram feitas em espectrofotômetro na região do UV utilizando o comprimento de onda de 266 nm. As determinações foram realizadas em triplicata.

c) Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados por meio das Equações 4.5 e 4.6 (BRASIL, 2003):

Equação 4.5:

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC}$$

onde: LD = limite de detecção;

DP_a = desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, três curvas analíticas;

IC = inclinação da curva analítica.

Equação 4.6:

$$LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC}$$

onde: LQ = limite de quantificação;

DP_a = desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, três curvas analíticas;

IC = inclinação da curva analítica.

A partir dos valores obtidos na construção das três curvas analíticas, foram determinados os parâmetros DP_a e IC, com os quais foram calculados os LD e LQ.

d) Precisão

Avaliou-se este parâmetro em um mesmo dia (precisão intraensaio) e em dias diferentes (precisão interensaio ou intermediária).

A precisão intraensaio para a d4T foi determinada utilizando a concentração média da solução do fármaco (14 µg.mL⁻¹) preparada em cada um dos meios de solubilização empregados no estudo e descritos no Quadro 4.1. As análises foram determinadas em seis replicatas (n = 6). Já a precisão intermediária foi determinada utilizando três concentrações diferentes (8 µg.mL⁻¹, 14 µg.mL⁻¹ e 22 µg.mL⁻¹), sendo que cada análise foi realizada com três repetições (n = 3 para cada concentração) e este procedimento repetido para cada dia de análise. As leituras das absorvâncias foram feitas em espectrofotômetro na região do UV com o comprimento de onda de 266 nm e os resultados foram expressos pelos desvios padrão relativos (DPR) dos resultados destas análises, conforme a Equação 4.7.

Equação 4.7:

$$DPR (\%) = \frac{DP \times 100}{C_{média}}$$

onde: DPR (%) = desvio padrão relativo em porcentagem;

DP = desvio padrão;

C_{média} = concentração média determinada.

e) Exatidão

A exatidão foi verificada a partir de três concentrações (baixa, média e alta), com três réplicas cada. Os resultados deste parâmetro foram obtidos através de cálculos que relaciona a concentração média experimental e a concentração teórica, segundo a Equação 4.8.

Equação 4.8:

$$Exatidão (\%) = \frac{CME \times 100}{CT}$$

onde: CME = concentração média experimental;

CT = concentração teórica.

4.2.5.2. Validação do método cromatográfico para a quantificação dos fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT e dos marcadores fluoresceína e metoprolol

A validação do método analítico cromatográfico empregado na determinação da concentração dos fármacos em estudo e dos marcadores nas amostras dos estudos de permeabilidade foi realizada conforme preconizado na

RE nº 899 e no ICH (BRASIL, 2003; ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010). Os resultados obtidos, de acordo com o método proposto, foram expressos por meio da média, do desvio padrão (DP) e do desvio padrão relativo (DPR).

a) Condições cromatográficas

O preparo de cada fase móvel foi realizado de acordo com o item 4.2.3.2, bem como as condições cromatográficas, que estão apresentadas no Quadro 4.3.

Para o preparo de cada solução padrão, uma quantidade da respectiva substância, devidamente corrigida de acordo com o teor declarado, foi pesada analiticamente e transferida para balão volumétrico de 100 mL, solubilizando-a com solução formada pela mistura de água purificada Milli-Q e metanol (80%:20%, v/v). As quantidades pesadas foram equivalentes a: 250 mg de d4T (teor = 101,0%), 625 mg de 3TC (teor = 99,7%), 625 mg de AZT (teor = 99,8%), 2500 mg de fluoresceína (teor = 93,5%) e 1000 mg de metoprolol (teor = 100,2%). Todas as soluções preparadas foram levadas ao banho ultrassônico para degaseificação.

As soluções diluídas empregadas para obtenção das curvas analíticas foram preparadas por meio de diluições sucessivas das soluções padrão de cada substância empregada no estudo utilizando solução água-metanol (80%:20%, v/v). As concentrações das curvas para cada solução padrão diluída, bem como a solução de padrão interno de didanosina, estão descritas no Quadro 4.4.

Quadro 4.4: Concentrações das curvas analíticas para cada solução padrão e suas respectivas soluções de padrão interno

Solução Padrão	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Padrão interno
d4T	0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 50,0	Didanosina 10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
3TC	10,0; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0; 125,0; 150,0; 200,0	Didanosina 125,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
AZT	10,0; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0; 125,0; 150,0; 200,0	
Fluoresceína	0,25; 0,50; 2,5; 5,0; 12,5; 15,0; 25,0	-----
Metoprolol	25,0; 50,0; 100,0; 250,0; 500,0; 800,0; 1000,0	Zidovudina 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

b) Linearidade

A linearidade foi determinada por meio da construção das curvas analíticas com soluções padrão de d4T, 3TC, AZT, fluoresceína e metoprolol nas diversas condições descritas no item 4.2.5.2 (subitem a). As equações das retas foram obtidas por regressão linear, através do método dos mínimos quadrados (BRASIL, 2003).

c) Especificidade/Seletividade

A especificidade do método foi verificada por meio da comparação dos cromatogramas do padrão e das amostras contendo d4T, 3TC, AZT, metoprolol e fluoresceína (BRASIL, 2003; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).

d) Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O LD foi determinado utilizando a concentração inferior ao limite de quantificação, não sendo determinado necessariamente com precisão e exatidão (BRASIL, 2003).

O LQ foi determinado utilizando concentrações decrescentes e conhecidas do fármaco, em seis repetições, até o menor nível determinável com precisão e exatidão dos limites estabelecidos (BRASIL, 2003).

e) Precisão

A precisão foi determinada analisando-se três concentrações diferentes em cinco réplicas no mesmo dia (precisão intraensaio) e em dias consecutivos (precisão interensaios) e foi calculado segundo a Equação 4.9:

Equação 4.9:

$$DPR (\%) = \frac{DP \times 100}{C_{média}}$$

onde: DPR (%) = desvio padrão relativo em porcentagem;

DP = desvio padrão;

C_{média} = concentração média determinada.

f) Exatidão

A exatidão intradia (análises realizadas no mesmo dia em réplicas de seis) e interdias (análises realizadas em três dias diferentes em réplicas de nove, no total) em três concentrações diferentes foi calculada de acordo com a Equação 4.10 (BRASIL, 2003; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010):

Equação 4.10:

$$Exatidão (\%) = \frac{Ca \times 100}{Cp}$$

onde: Ca = quantidade de d4T/3TC/AZT determinada na solução amostra

Cp = quantidade nominal de padrão de d4T, 3TC, AZT, fluoresceína e metoprolol

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Determinação da solubilidade da d4T

Os resultados de solubilidade foram obtidos a partir de método espectrofotométrico previamente validado, conforme apresentado no item 5.3.

A Tabela 5.1 e na Figura 5.1 indicam a quantidade máxima de d4T em miligramas solúvel em cada mililitro de meio a 37°C. Conforme estes dados, a d4T mostrou-se completamente solúvel em até 250 mL em todas as condições avaliadas, considerando que a maior dose administrada oralmente (40 mg) é completamente dissolvida nesta quantidade de líquido (UNITED STATES, 2000; UNITED STATES, 2011).

Entretanto, durante a execução do estudo de solubilidade da d4T em solução tampão pH 1,2, observou-se ao final do teste o surgimento de coloração alterada e odor atípico, sugerindo uma possível reação de degradação perante as condições do ensaio (150 rpm a 37°C por 72 horas), inviabilizando assim a obtenção dos resultados de solubilidade da d4T neste meio.

Estudos de Silva e colaboradores (2008) têm descrito que o principal produto da degradação da d4T é a timina. Este produto de decomposição é principalmente formado após a fusão ou degradação hidrolítica e oxidativa da d4T (SILVA et al., 2008).

Tabela 5.1: Valores médios da solubilidade em mg.mL^{-1} , desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) da d4T nos diferentes meios empregados no estudo de solubilidade pelo método do equilíbrio

	Meios de solubilização			
	água	pH 4,5	pH 6,8	pH 7,5
Solubilidade* (mg.mL^{-1})	146,49	149,22	139,43	130,15
DP	3,40	3,99	3,88	10,57
DPR (%)	2,32	2,68	2,78	8,12

*Os resultados representam a média de três determinações obtidas por método espectrofotométrico

Figura 5.1: Representação gráfica dos valores médios de solubilidade da d4T, indicados na parte superior das barras, nos diferentes meios empregados no estudo. Os resultados representam a média de três determinações obtidas pelo método do equilíbrio por 72 horas

Há escassas publicações que tratam da solubilidade da d4T, principalmente no que se refere às condições estabelecidas pelo SCB. Segundo relatório do medicamento Zerit® apresentado à FDA (UNITED STATES, 2009), a solubilidade da d4T em água na temperatura de 23°C é de aproximadamente 83 mg.mL⁻¹. No entanto, nenhuma condição do ensaio é relatada para que seja possível chegar a este resultado. Prakash e colaboradores (2008) avaliaram a solubilidade de diferentes antirretrovirais, inclusive da d4T, em diferentes meios (água purificada, solução HCl 0,01M, tampão acetato pH 4,5 e tampão fosfato pH 6,8) por meio do método de saturação do meio de solubilização. Os autores descrevem os seguintes resultados de solubilidade para a d4T: 75,36 mg.mL⁻¹ no meio água, 78,19 mg.mL⁻¹ no meio HCl 0,01M, 101,23 mg.mL⁻¹ no meio pH 4,5 e 76,13 mg.mL⁻¹ no meio pH 6,8 (PRAKASH et al., 2008).

Conforme pode ser observado na Tabela 5.1, os resultados descritos no presente trabalho são maiores do que àqueles indicados e publicados por Prakash e colaboradores (2008). Tais diferenças podem ser atribuídas às condições empregadas nos ensaios para a determinação da solubilidade, dentre

elas: temperatura, intensidade e forma de agitação, tempo de ensaio, composição dos meios de dissolução, entre outros. A determinação da solubilidade da d4T no presente estudo foi realizada conforme os critérios preconizados pela FDA (UNITED STATES, 2000) em uma incubadora com plataforma de agitação orbital tipo *Shaker*. Este equipamento permite o aquecimento dos frascos de maneira uniforme e constante e o adequado controle da temperatura que foi mantida a $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Além disso, a plataforma empregada promove agitação orbital com controle de velocidade (150 rotações por minuto). Assim, as condições adotadas neste estudo mantiveram-se constantes e padronizadas. O tempo de agitação empregado no presente trabalho foi de 72 horas, sendo este período importante para que haja a saturação do meio.

Por outro lado, nos estudos conduzidos por Prakash e colaboradores (2008), o aquecimento do meio foi localizado, não garantindo a adequada distribuição e uniformidade da temperatura no meio e a agitação foi promovida por agitador magnético, dificultando, desta forma, o controle ou a determinação da velocidade de agitação. Ressalta-se também que o tempo de ensaio total para o citado estudo foi de 5 horas (PRAKASH et al., 2008). Outro fator que pode justificar tais diferenças encontradas é a constituição dos meios de solubilização. No presente trabalho, os meios de solubilização empregados na avaliação da solubilidade da d4T foram a água purificada e tampão fosfato com valores de pH 4,5, 6,8 e 7,5, enquanto que as soluções utilizadas nos estudos de Prakash e colaboradores (2008) foram água purificada, solução de HCl 0,01 M, tampão acetato pH 4,5 e tampão fosfato pH 6,8.

Conforme descrito no item 4.2.1.2, a partir dos dados de solubilidade calculou-se a razão D:S do fármaco. Para que uma substância seja considerada altamente solúvel, conforme os critérios estabelecidos pela FDA, ela deve apresentar a razão D:S menor que 250 mL (UNITED STATES, 2000; LINDENBERG; KOOP; DRESSMAN, 2004) numa faixa de pH de 1,0 a 7,5 (UNITED STATES, 2000) ou pH 1,2 a 6,8 (EMA, 2008; WHO, 2005) a 37°C (STRAUCH et al., 2011).

Entretanto, existem divergências em relação às dosagens do fármaco, dependendo do país e dos protocolos adotados, o que pode determinar diferenças na classificação biofarmacêutica de um determinado composto. Por exemplo, em função da maior dose disponível no mercado para um determinado

produto, a mesma substância ativa poderá ser considerada como altamente solúvel em um determinado país, e de baixa solubilidade em outro país. Para a determinação da relação D:S para a d4T no presente estudo, considerou-se como maior dose aquela recomendada pela FDA para este fármaco, que é de 40mg para a d4T (LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004; WHO, 2005; UNITED STATES, 2011).

A Tabela 5.2 apresenta os valores da razão D:S (expressos em mL) para a d4T. Este parâmetro corresponde ao volume de meio necessário para solubilizar totalmente a maior dose administrada do fármaco. Conforme os resultados, a d4T mostrou alta capacidade de solubilização em todos os meios empregados, o que indica que, no caso deste fármaco, a solubilidade em valores de pH fisiológicos não é fator limitante para a biodisponibilidade do mesmo.

Tabela 5.2: Valores médios da razão D:S (em mL)

meio	Razão D:S (mL)			
	água	pH 4,5	pH 6,8	pH 7,5
Estavudina*	0,27	0,27	0,29	0,31

* maior dose administrada oralmente = 40 mg (UNITED STATES, 2011)

A dissolução intrínseca, por sua vez, tem como objetivo a avaliação da transferência do fármaco na forma sólida (quando este não está contido numa forma farmacêutica) para um meio similar aos líquidos corpóreos (SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007).

Os estudos de dissolução intrínseca podem ser influenciados pelas seguintes condições: vibração do equipamento, alinhamento e velocidade do sistema de agitação, geometria da cuba, adsorção, presença de gás dissolvido no meio de dissolução, centralização dos aparatos, local de amostragem, volume e características do meio de dissolução (YU et al., 2004; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007; ZAKERI-MILANI et al., 2009).

No presente trabalho, as condições supracitadas foram padronizadas para minimizar as interferências nos resultados. Os ensaios de dissolução intrínseca

foram realizados com o emprego do dissolutor Vankel juntamente com o aparato de Wood para a determinação da dissolução do fármaco em sua forma original (matéria-prima), sem adjuvantes farmacotécnicos e com forças de compressão padronizadas (YU et al., 2004; ZAKERI-MILANI et al., 2009). Conforme descrito no item 4.2.1.3, os ensaios de dissolução intrínseca foram realizados em meios de dissolução com diferentes valores de pH (Quadro 4.1), mantidos sob temperatura de $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, agitação de 50 rpm e cada coleta realizada nos intervalos pré-definidos com a reposição de meio.

Dez pontos de coleta foram utilizados para a construção dos perfis de dissolução intrínseca da d4T. Em função da rápida dissolução, padronizaram-se as coletas em curtos intervalos de tempo visando tornar possível a obtenção dos perfis. Os valores obtidos correspondem à média de três determinações. Todos os ensaios foram realizados em réplicas de três. A Tabela 5.3 apresenta os resultados (valores médios) da quantidade de d4T dissolvida em cada um dos meios de solubilização no estudo de dissolução intrínseca. A Figura 5.2 apresenta os perfis de dissolução intrínseca da d4T nos diferentes meios empregados no estudo. Conforme resultados apresentados na Tabela 5.3, foram necessários quatorze minutos para a dissolução de 10% da quantidade total do fármaco (em média 350 mg) contido nas pastilhas.

Tabela 5.3: Valores da quantidade média dissolvida acumulada (D) em mg/cm² da d4T em função do tempo de coleta em cada um dos meios de solubilização empregados no estudo

Tempo de coleta (min.)	D (mg/cm ²)				
	Água	pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8	pH 7,5
2	5,80	5,81	6,79	4,63	6,54
4	9,67	12,00	12,42	10,52	11,55
6	14,15	15,91	18,10	16,03	16,57
8	19,45	19,89	23,86	21,22	21,74
10	23,56	25,86	28,96	26,18	26,25
12	28,92	31,34	34,39	32,98	30,96
14	33,15	37,85	39,33	36,30	35,42
16	36,60	43,12	45,21	41,38	40,65
18	43,43	49,45	50,63	46,62	44,74
20	47,95	55,86	56,05	51,60	49,56

Figura 5.2: Perfis de dissolução intrínseca da d4T em diferentes meios de solubilização (água purificada, meio pH 1,2, meio pH 4,5, meio pH 6,8 e meio pH 7,5) sob agitação de 50 rotações por minuto a $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$

A partir dos perfis de dissolução, foram obtidas as taxas de dissolução intrínseca (TDI), conforme descrito no item 4.2.1.3. A velocidade ou TDI da amostra é determinada a partir da inclinação da reta (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010). Os parâmetros relativos ao coeficiente angular, coeficiente linear e coeficiente de determinação obtidos nos meios de dissolução estão representados na Tabela 5.4. A Tabela 5.5 apresenta as TDI da d4T nos meios empregados. Destaca-se que não existem relatos na literatura quanto às características de dissolução intrínseca da d4T.

Segundo Yu e colaboradores (2004), fármacos que apresentam TDI maior que $0,1 \text{ mg/min/cm}^2$ podem ser classificados como altamente solúveis. Considerando esta informação e de acordo com os resultados apresentados na Tabela 5.5, pode-se concluir que a d4T comportou-se como um fármaco altamente solúvel, pois em todos os meios empregados os valores de TDI foram superiores a $0,1 \text{ mg/min/cm}^2$ (YU et al., 2004).

Segundo Zakeri-Milani e colaboradores (2009), a TDI pode ser utilizada para determinar a solubilidade de um fármaco quando este parâmetro não pode ser obtido com precisão pelo método tradicional. Ressalta-se que, diferentemente da solubilidade, a dissolução intrínseca é um fenômeno que envolve velocidade

de dissolução e, portanto, é dependente da molhabilidade e capacidade de difusão do composto, além de ser independente da dose (ZAKERI-MILANI et al., 2009).

O uso da dissolução intrínseca como metodologia para a classificação biofarmacêutica apresenta-se como método eficaz, visto que os dados obtidos são independentes da dose administrada do medicamento, o que traduz de forma mais confiável o verdadeiro comportamento do fármaco quanto à solubilidade (YU et al., 2004; ZAKERI-MILANI et al., 2009). Entretanto, segundo os referidos autores, são necessárias mais pesquisas para que se estabeleça uma correlação entre tais parâmetros (TDI e solubilidade).

Resumindo, pode-se afirmar que os resultados obtidos no presente estudo referentes à solubilidade (exceto pH 1,2) e à TDI apresentaram concordância e permitiram conclusões semelhantes a respeito das características de solubilidade da d4T nos meios de solubilização empregados neste estudo. Em virtude do impedimento na obtenção de dados de solubilidade pelo método do equilíbrio no pH 1,2, não é possível afirmar que este fármaco apresenta alta solubilidade segundo os critério estabelecidos pela FDA (FDA, 2000).

Tabela 5.4: Parâmetros relativos aos perfis de dissolução intrínseca da d4T

Parâmetro	Valor				
	Água	pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8	pH 7,5
Coefficiente angular (a)	2,3570	2,7389	2,7590	2,5947	2,4310
Coefficiente linear (b)	0,3105	-0,3805	1,1141	0,1855	1,5064
Coefficiente de determinação (r²)	0,9984	0,9968	0,9993	0,9987	0,9984

Tabela 5.5: TDI da d4T obtidas nos diferentes meios

pH (meios)	TDI (mg/min/cm ²)				
	água	pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8	pH 7,5
Estavudina	2,3570	2,7389	2,7590	2,5947	2,4310

5.2. Permeabilidade efetiva (P_{ef}) da d4T, 3TC e AZT

A Tabela 5.6 exibe os valores médios de fluxo de água para cada animal em cada experimento de permeabilidade ($n = 6$ para fluoresceína e $n = 7$ para as demais substâncias avaliadas) utilizando o método gravimétrico. Valores negativos representam a ocorrência de secreção de água para o lúmen intestinal, enquanto que valores positivos representam a absorção de água a partir do lúmen intestinal.

Por se tratar de uma ocorrência fisiologicamente dinâmica, estes valores podem variar constantemente durante o experimento, dependendo de vários fatores, tais como: tipo de fármaco avaliado, conteúdo luminal, composição, pH e osmolaridade da solução de perfusão. Em estudo de perfusão *in situ* na porção proximal do jejuno de ratos realizado por Zakeri-Milani e colaboradores (2007), os valores de TFA descritos variaram de acordo com o fármaco estudado. Esta variação é ampla, pois é um fenômeno fisiológico constante, sendo que a faixa relatada foi de -318,40 a 90,0 $\mu\text{L/h/cm}$ (ZAKERI-MILANI et al., 2007).

Tabela 5.6: Valores médios de TFA em $\mu\text{L/h/cm}$ obtidos por meio do método gravimétrico para cada animal em cada experimento de permeabilidade

Animal	TFA ($\mu\text{L/h/cm}$)				
	Fluoresceína	Metoprolol	d4T	3TC	AZT
Rato 1	0,12	0,76	0,87	-0,50	-1,24
Rato 2	-0,25	0,37	1,62	-0,13	-1,63
Rato 3	-0,50	-0,25	0,25	0,25	2,87
Rato 4	0,25	1,00	-1,88	-0,16	-0,38
Rato 5	0,25	1,00	1,62	0,25	0,29
Rato 6	-0,63	0,50	0,25	0,75	0,87
Rato 7	-----	1,34	-2,27	0,63	-0,38

Para garantir a viabilidade da membrana do segmento intestinal perfundido para o estudo, a preparação do mesmo foi realizada de maneira cuidadosa, conforme descrito no item 4.2.2.2. As precauções adotadas nos procedimentos de canulação do trecho intestinal tiveram como prioridade a preservação do suprimento sanguíneo e inervação. Padronizou-se o fluxo de perfusão de $0,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, a fim de preservar as condições fisiológicas, evitando, desta forma, danos à membrana intestinal.

Adicionalmente, a integridade do intestino foi avaliada utilizando a fluoresceína (marcador de baixa permeabilidade), amplamente utilizada em diferentes modelos para estudos de permeabilidade como marcador de integridade da membrana (FLATEN et al., 2006; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008; LI et al., 2008; BERGINC et al., 2007; MUENDOERFER et al., 2010). Assim, espera-se que os resultados relacionados à fluoresceína sejam baixos, caso contrário poderá ser um indicativo da perda da viabilidade da membrana, principalmente em estudos que utilizam culturas celulares ou trechos intestinais isolados, comprometendo a confiança dos dados.

É importante ressaltar que os resultados de P_{ef} dos fármacos antirretrovirais e dos marcadores foram obtidos a partir de métodos cromatográficos previamente validados, conforme apresentado no item 5.4.

A Tabela 5.7 apresenta o resultado médio de P_{ef} da fluoresceína obtido no presente trabalho ($P_{ef} = 0,005 \pm 0,001 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$, DPR = 21,59%) e também dados relacionados a este marcador descritos na literatura e obtidos por diferentes modelos de estudo de permeabilidade.

A partir da comparação dos resultados de permeabilidade da fluoresceína (Tabela 5.7), é possível observar que o dado obtido no presente estudo pelo método de perfusão *in situ* apresentou o menor valor de permeabilidade ($0,005 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$) em relação aos demais métodos, o que condiz com as características de baixa ou nenhuma permeabilidade desta substância indicando que os cuidados e as condições adotadas neste trabalho foram eficientes para a manutenção da viabilidade do tecido. É importante ressaltar que a membrana, durante o experimento de perfusão, permanece em condições mais próximas do modelo *in vivo*, ou seja, apresenta suprimento sanguíneo, inervação, além de outros fatores fisiológicos como peristaltismo, atividade de proteínas carreadoras e de metabolismo em razão da permanência do animal vivo durante todo o experimento, garantindo, desta forma, a integridade do segmento intestinal.

Conforme demonstrado na Tabela 5.7, observa-se ampla diferença entre os valores de permeabilidade relativos às variáveis de outras técnicas, dentre elas: difícil manutenção da viabilidade do tecido utilizado (ausência de suprimento sanguíneo, inervação e fatores fisiológicos), condições dos estudos (diferenças entre os modelos empregados), composição e pH da solução tampão utilizada, espessura da CAE (é mais espessa, sobretudo em modelos que não empregam agitação adequada), intensidade de manipulação do tecido intestinal que pode causar danos morfológicos significantes (tecidos isolados).

A permeabilidade da fluoresceína através da membrana intestinal, apesar de inexpressiva, ocorre por via paracelular, embora estudos relatados na literatura tenham demonstrado outros mecanismos envolvidos na permeação deste marcador (KONISHI; HAGIWARA; SHIMIZU, 2002; KUWAYAMA et al., 2002; ITAGAKI et al., 2005; BERGINC et al., 2007; ZAMBITO et al., 2008; MUENDOERFER et al., 2010).

Tabela 5.7: Resultado de P_{ef} da fluoresceína (média de seis determinações) e respectivo desvio padrão obtidos a partir do presente estudo por meio do modelo de perfusão *in situ* em ratos e resultados de P_{ap} da fluoresceína obtidos da literatura (limite de quantificação = $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$)

	Modelo	Método	Permeabilidade ($P_{ef} \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$)
Resultado obtido no presente trabalho	<i>in situ</i>	perfusão intestinal em ratos	$0,005 \pm 0,001$
			0,02 ⁽²⁾
	<i>in vitro</i>	células Caco-2	0,53 ⁽³⁾
			0,04 ⁽⁶⁾
Resultados obtidos a partir da literatura			4,30 ⁽¹⁾
	<i>ex vivo</i>	jejuno de rato em câmaras de difusão	0,86 ⁽³⁾
			0,95 ⁽⁴⁾
			1,57 ⁽⁵⁾

(1) DEZANI, 2010; (2) FLATEN et al., 2006; (3) BERGINC et al., 2007; (4) ZVONAR et al., 2010; (5) ZAMBITO et al., 2008; (6) MUENDOERFER et al., 2010

P_{ef} = permeabilidade efetiva; P_{ap} = permeabilidade aparente

Outra substância utilizada como marcador no método de perfusão *in situ* desenvolvido no presente estudo foi o metoprolol (marcador de alta permeabilidade). Diferentes resultados de permeabilidade relacionados a este marcador são encontrados na literatura, conforme referências citadas na Tabela 5.8.

A Tabela 5.8 apresenta o resultado médio de P_{ef} do metoprolol obtido no presente trabalho ($P_{ef} = 5,32 \pm 0,54 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$, DPR = 10,21%) e os dados relacionados a este marcador descritos na literatura e obtidos por diferentes

modelos de estudo de permeabilidade. Conforme pode ser observado, há grandes divergências entre os valores publicados (Tabela 5.8). Entretanto, o resultado de P_{ef} do metoprolol obtido no presente estudo ($5,32 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$) foi muito próximo daquele descrito por Salphati e colaboradores (2001) ($5,90 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$) com o emprego do método de perfusão *in situ* em ratos (SALPHATI et al., 2001). Outros estudos de permeabilidade do metoprolol têm apresentado valores relativamente próximos aos obtidos neste estudo: $3,30 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ (ZAKERI-MILANI et al., 2009), $3,40 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ (UCHIDA et al., 2009), $4,10 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ (THIEL-DEMBY et al., 2009) e $3,50 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ (LENNERNÄS; NYLANDER; UNGELL, 1997).

Tais resultados confirmam a alta capacidade de permeação do metoprolol. Esta característica pode ser atribuída ao seu mecanismo de transporte, via transcelular passiva (KONISHI; HAGIWARA; SHIMIZU, 2002; KUWAYAMA et al., 2002). Assim, como não há participação de carreadores, a permeação do marcador através da membrana intestinal ocorre de maneira constante, sem que haja a saturação de transportadores presentes na membrana.

Tabela 5.8: Resultados de P_{ef} do metoprolol ($n = 7$) e respectivo desvio padrão obtido a partir do presente estudo por meio do modelo de perfusão *in situ* em ratos e resultados de P_{ap} do metoprolol obtidos da literatura

	Modelo	Método	Permeabilidade ($P_{ef} \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$)
Resultado obtido no presente trabalho	<i>in situ</i>	perfusão intestinal em ratos	5,32 ± 0,54
Resultados obtidos a partir da literatura	<i>in situ</i>	perfusão intestinal em ratos	1,70 ⁽¹⁰⁾
			3,30 ⁽⁸⁾
			1,47 ⁽⁹⁾
			15,21 ⁽³⁾
			5,90 ⁽¹¹⁾
	<i>in situ</i>	perfusão intestinal em seres humanos	13,40 ⁽⁴⁾
			15,00 ⁽⁵⁾
	<i>in vitro</i>	células Caco-2	3,40 ⁽¹⁾
	<i>in vitro</i>	células MDCK	4,10 ⁽²⁾
	<i>ex vivo</i>	jejuno de rato em câmaras de difusão	75,40 ⁽⁶⁾
			3,50 ⁽⁵⁾
			2,40 ⁽⁷⁾

(1) UCHIDA et al., 2009; (2) THIEL-DEMBY et al., 2009; (3) MASAOKA et al., 2006; (4) LENNERNÄS, 2007; (5) LENNERNAS; NYLANDER; UNGELL, 1997; (6) DEZANI, 2010; (7) WATANABE; TAKAHASHI; HAYASHY, 2004; (8) ZAKERI-MILANI et al., 2009; (9) DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; (10) DAHAN; AMIDON, 2009; (11) SALPHATI et al., 2006

P_{ap} = permeabilidade aparente; P_{ef} = permeabilidade efetiva

Os resultados de P_{ef} obtidos para os marcadores de baixa e de alta permeabilidade indicam que o modelo de perfusão *in situ* desenvolvido neste estudo foi capaz de diferenciar a característica de permeabilidade dos dois marcadores empregados nas condições padronizadas. Uma vez definidas as condições do ensaio em função dos resultados observados para os marcadores de baixa e de alta permeabilidade, procedeu-se o estudo com os fármacos antirretrovirais. Para a avaliação da permeabilidade destes fármacos, conforme descrito no item 4.2.2.1, realizou-se a solubilização de cada um deles de forma individual na solução de perfusão, visando obter a concentração adequada considerando a maior dose disponível comercialmente e o volume de 250 mL (KIM et al., 2006; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009).

A Tabela 5.9 apresenta os resultados obtidos no presente estudo referentes aos valores médios de P_{ef} e seus respectivos desvios padrão para os fármacos d4T, 3TC e AZT. Também são novamente apresentados nesta tabela os valores médios de P_{ef} para os marcadores, fluoresceína e metoprolol. Os valores representam a média de seis determinações para fluoresceína e de sete determinações para as demais substâncias. A Figura 5.3 representa graficamente os resultados de P_{ef} mostrados na Tabela 5.9.

Em uma análise comparativa dos resultados de P_{ef} dos fármacos em estudo e dos marcadores, observa-se que, conforme apresentado na Tabela 5.10, os fármacos d4T e AZT apresentaram valores de P_{ef} , apesar de menores, próximos daqueles observados para o metoprolol e muito distintos em relação àqueles obtidos para a fluoresceína (Tabela 5.9 e Figura 5.3). A 3TC apresenta valor mais baixo de permeabilidade em relação aos observados para a d4T e AZT, mas também é bastante distinto do valor de permeabilidade da fluoresceína.

Tabela 5.9: Resultados de P_{ef} em cm.s^{-1} obtidos a partir dos ensaios de permeabilidade com os fármacos d4T, 3TC e AZT e com os marcadores fluoresceína e metoprolol

	$P_{ef} \times 10^{-5} (\text{cm.s}^{-1})$	$DP \times 10^{-5} (\text{cm.s}^{-1})$	DPR(%)
d4T	3,96	0,47	11,85
3TC	3,08	0,26	8,41
AZT	4,17	0,43	10,32
Fluoresceína	0,005	0,001	21,59
Metoprolol	5,32	0,54	10,21

DP = desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo. Os valores representam a média de seis determinações para a fluoresceína e de sete determinações para o metoprolol, d4T, 3TC e AZT

Figura 5.3: Representação gráfica dos resultados de P_{ef} para os fármacos d4T, 3TC e AZT e marcadores fluoresceína e metoprolol, obtidos por meio do modelo de perfusão *in situ*. Os resultados representam a média de seis determinações para a fluoresceína e de sete determinações para o metoprolol, d4T, 3TC e AZT. As barras de erros representam os desvios padrão para cada substância. Os asteriscos representam os índices de significância: * $p < 0,000$ em relação à fluoresceína, ** $p < 0,001$ em relação ao metoprolol

Os resultados de P_{ef} apresentados na Tabela 5.9 indicaram que o metoprolol, d4T, 3TC e AZT apresentaram valores significativamente superiores aos da fluoresceína. Por apresentar baixa permeabilidade, pequenas diferenças na quantificação deste marcador detectadas pelo método CLAE é responsável pelo aumento do DPR (KOLJONEN et al., 2006; MOTZ et al., 2007; MASUNGI et al., 2008; BREDA et al., 2009).

A análise estatística dos resultados permitiu identificar grandes diferenças entre as médias de P_{ef} da fluoresceína e do metoprolol. Esta análise também indicou que as P_{ef} da d4T, 3TC e AZT são significativamente diferentes dos valores de P_{ef} das substâncias empregadas como marcadores.

A Tabela 5.10 demonstra os valores de p e F obtidos pela comparação e análise estatística dos resultados.

Tabela 5.10: Valores de F e p resultantes da comparação estatística dos resultados de P_{ef} para os fármacos d4T, 3TC e AZT e para os marcadores fluoresceína e metoprolol

Substância	Fluoresceína		Metoprolol		d4T		3TC		AZT	
	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F
Fluoresceína	----	----	0,000	1270,19	0,000	697,71	0,000	1465,86	0,000	1550,62
Metoprolol	0,000	1270,19	----	----	0,000	61,01	0,000	178,68	0,000	35,77
d4T	0,000	697,71	0,000	61,01	----	----	0,002	16,66	0,017	8,10
3TC	0,000	1465,86	0,000	178,68	0,002	16,66	----	----	0,000	75,81
AZT	0,000	1550,62	0,000	35,77	0,017	8,10	0,000	75,81	----	----

Com relação aos fármacos antirretrovirais avaliados neste trabalho, destaca-se que a literatura é bastante escassa. Alguns trabalhos têm descrito

estudos de permeabilidade com estas substâncias, porém dados obtidos em modelos de perfusão *in situ* são raros.

A Tabela 5.11 tem por objetivo apresentar de forma comparativa os valores de P_{ef} obtidos no presente trabalho para os fármacos d4T, 3TC e AZT, conforme condições experimentais descritas no item 4.2.2, e os dados relatados na literatura para as mesmas substâncias. Entretanto, destaca-se que estes últimos foram determinados com o emprego de diferentes modelos para o estudo de permeabilidade.

Os resultados referentes à P_{ef} obtida para a d4T, 3TC e AZT, conforme condições experimentais adotadas no presente estudo, diferem dos resultados descritos na literatura. Tais diferenças podem ser atribuídas às particularidades das técnicas empregadas.

Tabela 5.11: Resultados de P_{ef} obtidos por meio do modelo de perfusão *in situ* e os dados descritos na literatura para os fármacos do presente trabalho

		Resultados obtidos no presente estudo (perfusão <i>in situ</i> em ratos)		
		$P_{ef} (x 10^{-5}) \text{ cm.s}^{-1}$		
	Métodos	d4T	3TC	AZT
Perfusão <i>in situ</i>	Intestino de ratos	3,96	3,08	4,17
		Resultados obtidos a partir da literatura		
		$P_{ef} (x 10^{-5}) \text{ cm.s}^{-1}$		
Perfusão <i>in situ</i>	Intestino de ratos	-----	-----	-----
	Intestino de seres humanos	-----	-----	-----
Métodos <i>in vitro</i> *	Células Caco-2	0,45 ⁽¹⁾	0,10 ⁽²⁾	6,14 ⁽²⁾ 2,16 ⁽⁴⁾
	Células MDCK-MDR1	-----	0,01 ⁽²⁾	0,17 ⁽²⁾
Métodos <i>ex vivo</i> **	Câmaras de Ussing	-----	-----	-----
	Células de Franz	-----	48,00 ⁽³⁾	56,00 ⁽³⁾

* métodos *in vitro* com emprego de culturas celulares

** métodos *ex vivo* com emprego de segmentos intestinais isolados

(1) SICCARDI et al., 2003; (2) SOUZA et al., 2009; (3) DEZANI, 2010; (4) YU; SINKO, 1997

Conforme descrito anteriormente, muitas diferenças existentes entre as técnicas utilizadas para o estudo de permeabilidade interferem nos resultados, justificando as diferenças encontradas entre os dados relatados na literatura e os dados obtidos no presente trabalho.

De acordo com a Tabela 5.11, a P_{ef} da d4T obtida no presente estudo foi de $3,96 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$. Este valor difere daquele obtido por Siccardi e colaboradores (2003) que empregaram o modelo *in vitro* com células Caco-2 ($0,45 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$) (SICCARDI et al., 2003). Com relação à 3TC, a P_{ef} foi igual a $3,08 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ no presente estudo (Tabela 5.11), sendo este dado também diferente em relação àqueles descritos na literatura e obtidos por meio de modelos como células Caco-2 ($0,10 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$) (SOUZA et al., 2009), células MDCK-MDR1 ($0,01 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$) (SOUZA et al., 2009) e método *ex vivo* com tecido intestinal isolado ($48,00 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$) (DEZANI, 2010). O fármaco AZT, por sua vez, apresentou resultados de P_{ef} igual a $4,17 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ (Tabela 5.11). Este valor aproxima-se do resultado obtido por Souza e colaboradores (2009) utilizando células Caco-2, porém é importante ressaltar que tal método *in vitro* difere consideravelmente do método de perfusão *in situ* do presente trabalho, conforme apresentado no capítulo da revisão da literatura.

Assim, os dados estatísticos obtidos não permitem concluir sobre a classificação biofarmacêutica dos fármacos em relação à permeabilidade, uma vez que existem diferentes mecanismos responsáveis pelo transporte de fármacos através das membranas, como o metoprolol que tem transporte por mecanismo passivo transcelular, a fluoresceína por mecanismo paracelular, a d4T, 3TC e AZT por mecanismo transcelular passivo com possibilidade de participação de proteínas carreadoras. Deste modo, diferentes resultados de permeabilidade podem indicar diferenças nos mecanismos envolvidos no transporte de fármacos e dos marcadores. Portanto, não é descartada a possibilidade dos fármacos antirretrovirais serem considerados como altamente permeáveis.

Destaca-se que para os resultados de permeabilidade obtidos por meio do modelo de perfusão *in situ* não existe uma proposta de faixa de valores que permita a classificação das substâncias quanto às características de permeabilidade, como acontece para os estudos de permeabilidade que envolvem

o uso de células Caco-2 (YEE, 1997). Entretanto, Zakeri-Milani e colaboradores (2005) propuseram um limite de valores para a classificação de um fármaco quanto à permeabilidade usando ratos no modelo de perfusão *in situ*. Os limites são: maior que $3,0 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ para substâncias de alta permeabilidade e menor que $2,0 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ para substâncias de baixa permeabilidade, conforme demonstrado no Quadro 3.3, no item 3.2.3 (ZAKERI-MILANI et al., 2005).

Utilizando a proposta de Zakeri-Milani e colaboradores (2005), os fármacos antirretrovirais d4T e AZT estudados no presente trabalho podem ser considerados como substâncias de alta permeabilidade. Já a 3TC apresenta valor de permeabilidade muito próximo ao limite proposto por Zakeri-Milani e colaboradores (2005), não sendo descartada a possibilidade deste fármaco ser considerado como altamente permeável. Desta forma, é difícil afirmar a real classificação desta substância ao ser considerado o desvio padrão do resultado obtido, visto que alguns outros mecanismos de transporte podem estar envolvidos nos processos de absorção, conforme discutido anteriormente. Sendo assim, estudos mais profundos em relação à permeabilidade da 3TC são necessários.

As diferenças de valores de P_{ef} entre os resultados do presente trabalho e aqueles descritos na literatura, devem-se principalmente às distintas técnicas ou modelos empregados para a obtenção destes dados. Conforme descrito no capítulo que trata da revisão da literatura do presente trabalho (item 3.2.3), para a determinação e caracterização da permeabilidade de fármacos, diversos modelos têm sido empregados, sendo os mais difundidos: métodos *in vitro* baseados em sistemas celulares (Caco-2 ou MDCK), métodos *in situ*, modelos *in vitro* baseados em membranas artificiais paralelas (PAMPA), métodos *ex vivo* com o emprego de tecidos isolados, métodos *in vivo* e métodos *in silico*. Tal observação reforça a carência de protocolos padronizados para a determinação deste fundamental parâmetro visando à classificação biofarmacêutica dos fármacos. Além disso, é fundamental ressaltar a carência de estudos de permeabilidade, de um modo, geral, para os fármacos antirretrovirais.

É importante destacar que métodos *in vitro* que utilizam culturas celulares apresentam limitações que influenciam na obtenção dos resultados de permeabilidade, tais como: origem do tecido (adenocarcinoma – Caco-2 ou rim canino – MDCK), diferença na expressão de transportadores de efluxo e influxo, ausência de fatores fisiológicos (suprimento sanguíneo e inervação), ausência de

muco, manutenção da viabilidade celular, condições dos ensaios (composição do tampão utilizado e pH).

O emprego de métodos *ex vivo* com utilização de segmentos intestinais isolados também apresentam limitações, tais como: diferenças entre as regiões intestinais, diferença na expressão de carreadores (influxo ou efluxo), condições dos ensaios (composição e pH do tampão), espécie e linhagem dos modelos animais, ausência de fatores fisiológicos (suprimento sanguíneo e inervação), manutenção da viabilidade e manipulação dos tecidos.

Um importante fator a ser considerado é a existência da CAE, a qual corresponde a uma camada de água, muco e glicocálice mais ou menos estática adjacente à parede da membrana e é formada pela mistura incompleta do conteúdo luminal situado próximo à superfície da mucosa intestinal e que atua como importante barreira à absorção (THOMSON et al., 1983; FAGERHOLM; LENNERNÄS, 1995). Os métodos *in vitro* e *ex vivo* apresentam a CAE mais espessa em comparação à condição *in vivo*, podendo ser alterada de acordo com o tipo e velocidade de agitação utilizada. No modelo de perfusão *in situ*, a CAE (bem como a integridade da membrana) é preservada respeitando os limites do fluxo da solução de perfusão no intestino (0,1 a 0,3 mL.min⁻¹), conforme abordado no item 3.2.3.4 (subitem b) (SUGANO et al., 2001).

Além dos aspectos supracitados, as diferenças nos resultados de permeabilidade também podem estar relacionadas aos distintos mecanismos de transporte envolvidos para cada um dos fármacos. A d4T, 3TC e AZT apresentam como mecanismos de transporte a via transcelular passiva, não sendo descartada outras vias, tais como a participação de proteínas carreadoras de influxo e efluxo (PRETORIUS; BOUIC, 2009; QUEVEDO; BRIÑON, 2009).

O modelo de perfusão *in situ* oferece grandes vantagens sobre os demais modelos, conforme relatado na revisão da literatura deste trabalho. A existência das condições fisiológicas, incluindo o suprimento sanguíneo e inervação, presença de enzimas metabolizadoras, além da expressão biorrelevante de proteínas carreadoras (efluxo e influxo), faz deste modelo o mais próximo das condições *in vivo*. Tais condições permitem que esta técnica possa ser empregada nos estudos de mecanismos de transporte de diferentes fármacos, segundo as condições padronizadas neste estudo.

Em razão da utilização de modelo animal para o estudo de perfusão *in situ*, é importante considerar a uniformização das condições adotadas. Conforme apresentado no Quadro 3.4 (item 3.2.3.4) na revisão da literatura, há diferenças a serem consideradas.

Assim, a padronização das condições nos diferentes modelos para o estudo de permeabilidade é necessária para minimizar as possíveis interferências.

Diante do apresentado, pode-se concluir que, nas condições experimentais adotadas no presente trabalho, tanto a d4T como a AZT apresentam valores de P_{ef} mais próximos dos valores observados para o marcador de alta permeabilidade (metoprolol). A 3TC apresenta-se ligeiramente mais distante do valor do metoprolol, porém todos os antirretrovirais apresentam-se demasiadamente distantes dos valores do marcador de baixa permeabilidade (fluoresceína). Assim, estudo com outros marcadores poderiam ser realizados para permitir conclusões mais objetivas sobre a classificação biofarmacêutica destes fármacos.

Conforme descrito no item 3.2.3.4 (subitem e) e indicado pelos pesquisadores Fagerholm, Johansson e Lennernäs (1996), a partir dos resultados de P_{ef} obtidos por meio do modelo de perfusão *in situ* em ratos no presente estudo, é possível determinar valores preditivos da P_{ef} em seres humanos (FAGERHOLM; JOHANSSON; LENNERNÄS, 1996), conforme demonstrado na Tabela 5.12.

Para o metoprolol, alguns estudos têm relatado os valores de P_{ef} obtidos a partir dos ensaios de perfusão *in situ* em humanos e os valores descritos são: $15,21 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ (LENNERNÄS et al., 1997) e $13,40 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ (LENNERNÄS, 2007). Conforme apresentado na Tabela 5.12, o valor preditivo de P_{ef} em seres humanos para o metoprolol a partir do resultado obtido no presente estudo foi de $19,45 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$, sendo um valor próximo ao relatado na literatura. Por se tratar de uma predição calculada da P_{ef} em seres humanos através da P_{ef} obtida em ratos, é possível a ocorrência de algumas diferenças nos resultados em razão das condições adotadas nos estudos em ratos e em seres humanos, além das diferenças referentes à espécie.

Entretanto, não há dados publicados referentes à P_{ef} em seres humanos para os fármacos antirretrovirais avaliados no presente estudo, ou mesmo para a fluoresceína.

Tabela 5.12: Resultados preditivos da P_{ef} em seres humanos obtidos a partir dos resultados de P_{ef} em ratos com o emprego do modelo de perfusão *in situ*

Substância	P_{ef} humanos ($\times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$)
d4T	14,56
3TC	11,39
AZT	15,31
Fluoresceína	0,32
Metoprolol	19,45

5.3. Validação do método espectrofotométrico para a quantificação da d4T na determinação da solubilidade e da dissolução intrínseca

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 (BRASIL, 2003; ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).

O método analítico para determinação da concentração da d4T dissolvida nos ensaios de solubilidade foi validado a partir dos procedimentos preconizados na RE 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA, também relatado no ICH (2005) e na farmacopéia americana USP (2010).

Com relação à linearidade, na Figura 5.4 estão representadas as curvas analíticas obtidas pela análise espectrofotométrica, na região do UV, das soluções de d4T dissolvida em diferentes meios (água e nas soluções com valores de pH 1,2; 4,5; 6,8 e 7,5), sendo que cada ponto representa a média de três determinações. Os coeficientes angular e linear estão apresentados na Tabela 5.13, bem como os coeficientes de determinação (r^2) para cada meio utilizado.

Figura 5.4: Curvas analíticas obtidas a partir da análise da d4T dissolvida em água, em meio pH 1,2, em meio pH 4,5, em meio pH 6,8 e em meio pH 7,5, através do método espectrofotométrico na região do UV, com comprimento de onda de 266 nm

Tabela 5.13: Parâmetros relativos às curvas analíticas obtidas por análise espectrofotométrica de soluções de d4T em diferentes meios

Parâmetro	Valor				
	Água	pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8	pH 7,5
Coefficiente angular (a)	0,0442	0,0449	0,0428	0,0447	0,0435
Coefficiente linear (b)	-0,0197	0,0023	-0,0066	-0,0034	0,0007
Coefficiente de determinação (r^2)	0,9999	0,9999	0,9999	0,9998	0,9998

A especificidade e a seletividade foram avaliadas em função dos espectros de absorção da d4T em diferentes meios de solubilização (água, tampão pH 1,2 e tampão fosfato com valores de pH 4,5, pH 6,8 e pH 7,5).

A Figura 5.5 apresenta os espectros de absorção dos diferentes meios utilizados: água, meio pH 1,2, meio pH 4,5, meio pH 6,8, meio pH 7,5. A Figura 5.6 apresenta os espectros de absorção da d4T dissolvida nos meios água, meio pH 1,2, meio pH 4,5, meio pH 6,8, meio pH 7,5.

Os resultados obtidos indicaram que este fármaco tem seu máximo de absorvância no comprimento de onda (λ) de 266 nm. As figuras demonstram que não houve nenhum tipo de alteração significativa no comprimento de onda utilizado para a detecção da d4T. Sendo assim, comprova-se que este método é específico e seletivo para a determinação da d4T nos respectivos meios de solubilização, conforme demonstrado na Figura 5.6.

Figura 5.5: Espectros de absorção na região do UV dos meios utilizados: água purificada (vermelho), meio pH 1,2 (azul), meio pH 4,5 (verde), meio pH 6,8 (roxo) e meio pH 7,5 (preto)

Figura 5.6: Espectros de absorção na região do UV da d4T dissolvida ($14 \mu\text{g.mL}^{-1}$) nos diferentes meios: água purificada (vermelho), meio pH 1,2 (azul), meio pH 4,5 (verde), meio pH 6,8 (roxo) e meio pH 7,5 (preto)

Para a adequada validação também foram determinados os LD e LQ. Os resultados referentes ao LD estão apresentados na Tabela 5.14. Os resultados apresentam a média de determinações a partir de três curvas analíticas.

Os resultados obtidos permitem concluir que o método espectrofotométrico mostrou-se satisfatoriamente sensível, uma vez que os valores detectados para a estavudina ($0,04$ a $0,17 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foram muito inferiores à menor concentração utilizada na construção da curva analítica ($4,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Tabela 5.14: Valores do intercepto com o eixo Y, DP_a , média das inclinações das três retas e LD. Onde DP_a corresponde ao desvio padrão do intercepto com o eixo Y das três curvas analíticas

Meios	Intecepto com eixo Y	DP_a	Média das inclinações	LD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
água	-0,0212	0,0014	0,0442	0,09
	-0,0192			
	-0,0186			
pH 1,2	0,0047	0,0021	0,0450	0,14
	0,0023			
	0,0006			
pH 4,5	-0,0091	0,0021	0,0428	0,15
	-0,0052			
	-0,0056			
pH 6,8	-0,0015	0,0026	0,0447	0,17
	-0,0063			
	-0,0023			
pH 7,5	0,0005	0,0005	0,0435	0,04
	0,0003			
	0,0013			

Os resultados referentes ao LQ estão apresentados na Tabela 5.15. Os resultados representam a média das determinações a partir de três curvas analíticas. DP_a corresponde ao desvio padrão do intercepto com o eixo Y das três curvas analíticas da d4T em diferentes meios.

Os resultados obtidos nesta análise em todos os meios permitem concluir que o método espectrofotométrico mostrou-se adequado para a quantificação da

d4T uma vez que os menores valores obtidos ($0,12$ a $0,57 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foram inferiores à menor concentração utilizada na construção da curva analítica ($4,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Tabela 5.15: Valores do intercepto com o eixo Y, DP_a , média das inclinações das três retas e LQ

Meios	Intecepto com eixo Y	DP_a	Média das inclinações	LQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
água	-0,0212	0,0014	0,0442	0,31
	-0,0192			
	-0,0186			
pH 1,2	0,0047	0,0021	0,0450	0,46
	0,0023			
	0,0006			
pH 4,5	-0,0091	0,0021	0,0428	0,50
	-0,0052			
	-0,0056			
pH 6,8	-0,0015	0,0026	0,0447	0,57
	-0,0063			
	-0,0023			
pH 7,5	0,0005	0,0005	0,0435	0,12
	0,0003			
	0,0013			

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.

Os resultados obtidos nesta análise em todos os meios indicaram concordância com o limite de 5,0% preconizado na RE 899/2003 (BRASIL, 2003), o que permite afirmar que o método, nas condições experimentais adotadas, é preciso (BRASIL, 2003; ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).

Os resultados referentes à repetibilidade (precisão intraensaio) do método para a quantificação da d4T em diferentes meios de solubilização (descritos no Quadro 4.1) estão apresentados na Tabela 5.16. Os resultados representam a média de seis determinações.

Tabela 5.16: Valores de concentração teórica (CT), concentração média experimental (CME), desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR), referentes à determinação da precisão intraensaio do método

Meios	C T ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	C M E ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	DP	DPR (%)
água	14,00	14,11	0,04	0,28
pH 1,2	14,00	14,02	0,05	0,33
pH 4,5	14,00	13,73	0,07	0,51
pH 6,8	14,00	13,74	0,05	0,38
pH 7,5	14,00	13,93	0,06	0,43

A precisão intermediária corresponde à concordância entre os resultados obtidos no mesmo laboratório, mas em dias diferentes com analistas diferentes. A determinação da precisão intermediária foi realizada em três dias diferentes com analistas diferentes.

Os resultados obtidos em todos os meios indicaram concordância com o limite de 5,0% preconizado na RE 899/03, o que permite afirmar que o método, nas condições adotadas, é preciso (BRASIL, 2003; ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).

A Tabela 5.17 apresenta os resultados referentes à precisão intermediária do método para a quantificação da d4T, que foi verificada em triplicata com três concentrações diferentes.

Tabela 5.17: Valores de concentração teórica (CT), concentração média experimental (CME), desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR), referentes à determinação da precisão intermediária do método para a quantificação da d4T em diferentes meios de solubilização

Meios	C T ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	C M E ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	DP	DPR (%)
água	8,00	8,00	0,21	1,60
	14,00	14,08	0,01	0,05
	22,00	22,01	0,11	0,48
pH 1,2	8,00	8,07	0,05	0,68
	14,00	14,05	0,03	0,20
	22,00	22,03	0,05	0,21
pH 4,5	8,00	8,01	0,01	0,20
	14,00	14,02	0,02	0,15
	22,00	22,01	0,01	0,07
pH 6,8	8,00	7,96	0,05	0,66
	14,00	13,92	0,10	0,71
	22,00	22,01	0,13	0,59
pH 7,5	8,00	7,99	0,06	0,76
	14,00	13,94	0,04	0,30
	22,00	21,94	0,18	0,83

A exatidão do método analítico corresponde à proximidade dos resultados obtidos em relação ao valor verdadeiro. É aceita a análise pelo método de adição do padrão, no qual se adiciona quantidades conhecidas do analito (padrão de referência) (BRASIL, 2003).

A exatidão do método esteve entre 98,00 e 102,00%. Os resultados referentes à exatidão estão apresentados na Tabela 5.18. Os resultados

representam a média de três determinações para cada meio utilizado (descritos no Quadro 4.1).

Tabela 5.18: Valores de concentração teórica (CT), concentração média experimental (CME), desvio padrão (DP) e exatidão, referentes à determinação da exatidão do método para a quantificação da d4T

Meios	C T ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	C M E ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	DP	Exatidão (%)
água	8,00	8,00	0,13	100,01
	14,00	14,08	0,01	100,54
	22,00	22,01	0,10	100,03
pH 1,2	8,00	8,07	0,05	100,91
	14,00	14,05	0,03	100,37
	22,00	22,03	0,05	100,13
pH 4,5	8,00	8,01	0,01	100,09
	14,00	14,02	0,02	100,16
	22,00	22,02	0,01	100,04
pH 6,8	8,00	7,96	0,05	99,54
	14,00	13,92	0,10	99,46
	22,00	22,01	0,13	100,06
pH 7,5	8,00	7,99	0,06	99,83
	14,00	13,94	0,04	99,60
	22,00	21,94	0,18	99,72

A exatidão do método para análise da d4T na água e nas soluções com diferentes valores de pH ficou entre 99 e 101%.

5.4. Validação do método cromatográfico para a quantificação dos fármacos d4T, 3TC e AZT e dos marcadores fluoresceína e metoprolol

Os métodos desenvolvidos demonstraram-se adequados para a quantificação dos fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT e dos marcadores fluoresceína e metoprolol em amostras provenientes dos ensaios de permeabilidade. Sendo assim, as validações dos métodos seguiram os parâmetros descritos no item 4.2.5.2.

Os métodos mostraram-se lineares na faixa de 0,25 µg a 25,0 µg para fluoresceína, de 25,0 µg a 1000,0 µg para metoprolol, de 0,5 a 50,0 µg para d4T, de 10,0 µg a 200,00 µg para 3TC e de 10,0 µg a 200,0 µg para AZT, conforme demonstrado na Figura 5.7.

Figura 5.7: Curvas analíticas da fluoresceína (a), metoprolol (b), d4T (c), 3TC (d), AZT (e) obtidas por CLAE

Os parâmetros obtidos por regressão linear a partir das curvas estão apresentados na Tabela 5.19.

Tabela 5.19: Parâmetros relacionados à regressão linear das curvas analíticas definidas para a quantificação da d4T, 3TC, AZT, fluoresceína e metoprolol

Parâmetro	Fluoresceína	Metoprolol	d4T	3TC	AZT
Coeficiente angular (a)	560024	0,0148	0,2255	0,0186	0,016
Coeficiente linear (b)	481,71	0,1789	-0,0307	0,0118	0,0174
Coeficiente de determinação (r^2)	0,9998	0,9993	0,9998	0,9997	0,9998

Os métodos desenvolvidos utilizando as condições cromatográficas descritas no item 4.2.5.2 demonstraram-se específicos para a d4T, 3TC, AZT, fluoresceína e metoprolol.

Os cromatogramas obtidos com o branco (amostra isenta das substâncias em estudo) e após a adição de d4T, 3TC, AZT, didanosina (padrão interno) fluoresceína e metoprolol não revelaram nenhum sinal relevante nos tempos de retenção de interesse, conforme demonstrado na Figura 5.8.

Todas as substâncias do estudo apresentaram boa separação dos componentes da matriz, com tempo de retenção de 7,8 minutos para d4T, 4,8 minutos para 3TC, 28,6 minutos para AZT, 6,6 minutos para didanosina (padrão interno), 8,1 minutos para fluoresceína e 8,1 minutos para metoprolol.

Figura 5.8: Cromatogramas obtidos com (a) fase móvel em detecção por UV, (b) fase móvel em detecção por fluorescência, (c) solução de perfusão em detecção por UV, (d) solução de perfusão em detecção por fluorescência, (e) metoprolol em detecção por UV, (f) fluoresceína em detecção por fluorescência, (g) d4T em detecção por UV, (h) 3TC em detecção por UV, (i) AZT em detecção por UV e (j) didanosina em detecção por UV

Os LD e LQ para d4T, 3TC, AZT, fluoresceína e metoprolol estão apresentados na Tabela 5.20.

Os resultados indicam que o LD e o LQ do método estão de acordo para o propósito indicado.

Tabela 5.20: Valores de LD e LQ. Precisão e exatidão do método na concentração de 0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para fluoresceína, 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para metoprolol, 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para d4T, 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para 3TC e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para AZT

Substância	LD e LQ	Precisão (%)	Exatidão (%)
Fluoresceína	0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,78	101,58
Metoprolol	25,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2,65	100,12
d4T	0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,43	101,12
3TC	10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,58	99,12
AZT	10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,67	96,61

Os valores que indicam precisão intraensaio e interensaio dos métodos referentes à quantificação da fluoresceína, metoprolol, d4T, 3TC e AZT estão indicados na Tabela 5.21. Os resultados referentes à precisão indicaram resultados satisfatórios, uma vez que apresentaram variação menor que 5%. Portanto, o método apresentou-se preciso para as determinações dos fármacos e dos marcadores no estudo de permeabilidade.

Tabela 5.21: Resultados referentes à precisão (intraensaio e interensaio) do método analítico para a quantificação da d4T, 3TC, AZT, fluoresceína e metoprolol

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Precisão (%)	
	intraensaio	interensaio
d4T		
1,0	0,44	1,89
20,0	1,33	1,41
30,0	1,39	1,38
3TC		
25,0	1,85	2,58
125,0	1,34	1,07
150,0	0,74	1,95
AZT		
25,0	0,96	2,15
125,0	1,30	1,06
150,0	0,96	1,29
Fluoresceína		
0,5	1,11	1,23
12,5	0,03	0,06
15,0	0,03	0,02
Metoprolol		
50,0	0,86	1,17
500,0	1,26	1,45
800,0	1,15	0,86

Os valores que indicam a exatidão dos métodos referentes à quantificação da fluoresceína, metoprolol, d4T, 3TC e AZT estão indicados na Tabela 5.22. Os resultados referentes à precisão indicaram resultados satisfatórios, uma vez que apresentaram variação menor que 5%. Portanto, o método apresentou-se preciso e exato para as determinações das substâncias marcadoras no estudo de permeabilidade.

Tabela 5.22: Resultados referentes à exatidão do método analítico para a quantificação da d4T, 3TC, AZT, fluoresceína e metoprolol

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Exatidão (%)	
	intraensaio	interensaio
d4T		
1,0	97,53	102,00
20,0	104,87	103,29
30,0	104,75	102,31
3TC		
25,0	101,10	99,90
125,0	100,39	100,89
150,0	101,47	100,76
AZT		
25,0	102,47	101,88
125,0	100,28	100,02
150,0	101,49	100,89
Fluoresceína		
0,5	102,99	103,13
12,5	100,06	100,21
15,0	100,05	100,05
Metoprolol		
50,0	99,46	99,61
500,0	100,50	100,41
800,0	100,00	99,96

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- I. A partir dos ensaios de solubilidade da estavudina pelo método do equilíbrio (*shake-flask*), este fármaco apresentou alta solubilidade nos meios empregados (água purificada, pH 4,5 pH 6,8 e pH 7,5), exceto em pH 1,2 onde a determinação da solubilidade foi impedida em razão das alterações observadas neste meio, impossibilitando, desta forma, a classificação do fármaco segundo o SCB.
- II. Os resultados obtidos a partir dos ensaios de dissolução intrínseca permitiram concluir que a estavudina comportou-se como um fármaco altamente solúvel, pois em todos os meios empregados os valores de TDI foram superiores a 0,1 mg/min/cm².
- III. Os resultados referentes à solubilidade determinada pelo método do equilíbrio (exceto em pH 1,2) e da dissolução intrínseca apresentaram concordância e permitiram conclusões semelhantes à respeito das características de solubilidade da estavudina nos meios de solubilização empregados neste estudo.
- IV. Os resultados de permeabilidade efetiva, nas condições experimentais adotadas no estudo, para os marcadores fluoresceína e metoprolol, indicam que o modelo de perfusão *in situ* desenvolvido neste trabalho foi capaz de diferenciar as características de baixa e alta permeabilidade, respectivamente.
- V. Os resultados de permeabilidade efetiva, nas condições experimentais adotadas no estudo, sugerem que os fármacos estavudina e zidovudina apresentam alta permeabilidade e para a lamivudina conclui-se que, mesmo este apresentando valor próximo ao limite proposto por Zakeri-Milani e colaboradores (2005), não se pode descartar a possibilidade do mesmo ser considerado como fármaco altamente permeável.
- VI. Os resultados de solubilidade, juntamente com os resultados de permeabilidade obtidos neste estudo sugerem que a estavudina e a zidovudina podem ser classificadas como pertencentes à classe I do SCB. Porém, mais ensaios são necessários para determinar com maior precisão a classificação destes fármacos, sobretudo com relação à lamivudina.
- VII. A validação dos métodos espectrofotométrico e cromatográfico mostrou-se adequado para a quantificação dos fármacos e dos marcadores nos estudos de solubilidade, dissolução intrínseca e permeabilidade por meio do modelo de perfusão *in situ*.

7. ASPECTOS LEGAIS DE BIOÉTICA

O presente trabalho foi submetido à avaliação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo em razão do uso de ratos Wistar para a avaliação da permeabilidade, obtendo resposta positiva para a realização do projeto, conforme Protocolo nº 235 demonstrado no Anexo C.

8. REFERÊNCIAS

AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. AVMA Guidelines on Euthanasia: formerly report of the AVMA Panel on Euthanasia. 2007. Disponível em: http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf. Acesso em: 10 fev. 2011.

AMIDON, G.L.; HO, N.F.; FRENCH, A.B.; HIGUCHI, W.I. Predicted absorption rates with simultaneous bulk fluid flow in the intestinal tract. *Journal of Theoretical Biology*, v.89, n.2, p.195-210, 1981.

AMIDON, G.L.; LENNERNAS, 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.; SINKO, P.J.; FLEISHER, D. Estimating human oral fraction dose absorbed: a correlation using rat intestinal membrane permeability for passive and carrier-mediated compounds. *Pharmaceutical Research*, v.5, n.10, p.651-654, 1988.

ANNAERT, P.; TUKKER, J.J.; VAN GELDER, J.; NAESENS, L.; CLERCQ, E.; VAN DER MOOTER, G.; KINGET, R.; AUGUSTIJNS, P. *In vitro*, *in vivo*, and *in situ* intestinal absorption characteristics of the antiviral ester prodrug adefovir dipivoxil. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.89, n.8, p.1054-1062, 2000.

ARMANDO, Y.P. *Avaliação da bioequivalência entre comprimido convencional e comprimido de desintegração oral contendo 8mg de ondansetrona*. São Paulo, 2008. 117p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

ARTURSSON, P.; UNGELL, A.-L.; LÖFROTH, J.-E. Selective paracellular permeability in two models of intestinal absorption: cultured monolayers of human intestinal epithelial cells and rat intestinal segments. *Pharmaceutical Research*, v.10, n.8, p.1123-1129, 1993.

ASHFORD, M. O trato gastrointestinal – fisiologia e absorção de fármacos. In: AULTON, M.E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005a. cap. 16, p.229-244.

ASHFORD, M. Biodisponibilidade: fatores físico-químicos relacionados à forma farmacêutica. In: AULTON, M.E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005b. cap.17, p.245-263.

AVADI, M.R.; JALALI, A.; SADEGHI, A.M.; SHAMIMI, K.; BAYATI, K.H.; NAHID, E.; DEHPUR, A.R.; RAFIEE-TEHRANI, M. Diethyl methyl chitosan as an intestinal paracellular enhancer: *ex vivo* and *in vivo* studies. *International Journal of Pharmaceutics*, v.293, n.1/2, p.83-89, 2005.

AVDEEF, A. *Absorption and drug development: solubility, permeability and charge state*. Hoboken: Wiley Interscience, 2003. 287p.

AYMARD, G.; LEGRAND, M.; TRICHEREAU, N.; DIQUET, B. Determination of twelve antiretroviral agents in human plasma sample using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications*, v.744, n.2, p.227-240, 2000.

BALIMANE, P.V.; CHONG, S.; MORRISON, R.A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v.44, p.301-312, 2000.

BALIMANE, P.V.; HAN, Y.-H.; CHONG, S. Current industrial practices of assessing permeability and P-glycoprotein interaction. *The AAPS Journal*, v.8, n.1, 2006.

BALIMANE, P.V.; SINKO, P.J. Involvement of multiple transporters in the oral absorption of nucleoside analogues. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.39, p.183-209, 1999.

BALINT, G.A. Antiretroviral therapeutic possibilities for human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome. *Pharmacology & Therapeutics*, v.89, p.17-27, 2001.

BARTHE, L.; WOODLEY, J.; HOUIN, G. Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v.13, n.2, p.154-168, 1999.

BENET, L.; AMIDON, G.L.; BARENDT, D.; LENNERNÄS, H.; POLLI, J.; SHAH, V.; STAVCHANSKY, S.; YU, L. The use of BDDCS in classifying the permeability of marketed drugs. *Pharmaceutical Research*, v.52, n.3, p.483-488, 2008.

BERGGREN, S.; HOOGSTRAATE, J.; FAGERHOLM, U.; LANNERNÄS, H. Characterization of jejunal absorption and apical efflux of ropivacaine, lidocaine and bupivacaine in the rat using *in situ* and *in vitro* absorption models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.21, p.553-560, 2004.

BERGINC, K.; ZAKELJ, S.; LEVISTK, L.; URSIC, D.; KRISTL, A. Fluorescein transport properties across artificial lipid membranes, Caco-2 cell monolayers and rat jejunum. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.66, p.281-285, 2007.

BERLIOZ, F.; JULIEN, S.; TSOCAS, A.; CHARIOT, J.; CARBON, C.; FARINOTTI, R.; ROZÉ, C. Neural modulation of cephalixin intestinal absorption through the Di- and tripeptide brush border transporter of rat jejunum *in vivo*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.288, n.3, p.1037-1044, 1999.

BLUM, M.R.; LIAO, S.H.; GOOD, S.S.; MIRANDA, P. Pharmacokinetics and bioavailability of zidovudine in humans. *The American Journal of Medicine*, v.85, p.189-194, 1988.

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

BRASIL. Resolução RE n.899, de 29 de maio de 2003. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2 jun. 2003. Seção 1, p.56-59.

BRASIL. Resolução 1170, de 19 de abril de 2006. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 24 abr. 2006. Seção 1, p.35-55.

BRASIL. Instrução Normativa IN n.4, de 3 de agosto de 2011. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova a lista de fármacos candidatos à bioisenção baseada no sistema de classificação biofarmacêutica (SCB). *Diário Oficial da União*, Brasília, 5 ago. 2011b. Seção 1, p. 119

BRASIL. Resolução RDC n.37, de 3 de agosto de 2011. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. *Diário Oficial da União*, Brasília, 5 ago. 2011a. Seção 1, p.117.

BREDA, S.A.; JIMENEZ-KAIRUZ, A.F.; MANZO, R.H.; OLIVEIRA, M.E. Solubility behavior and biopharmaceutical classification of novel high-solubility ciprofloxacin and norfloxacin pharmaceutical derivatives. *International Journal of Pharmaceutics*, v.371, p.106-113, 2009.

BRITISH Pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationary Office, 2010.

BROUWERS, J.; MOLS, R.; ANNAERT, P.; AUGUSTIJNS, P. Validation of a differential *in situ* perfusion method with mesenteric blood sampling in rats for intestinal drug interaction profiling. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, v.31, p.278-285, 2010.

CAO, X.; GIBBS, S.T.; FANG, L.; MILLER, H.A.; LANDOWSKI, C.P.; SHIN, H.-C.; LENNERNÄS, 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, n.8, p.1675-1686, 2006.

CAO, X.; YU, L.X.; SUN, D. Drug absorption principles. In: KRISHNA, R.; YU, L., eds. *Biopharmaceutics applications in drug development*. New York, London: Springer, 2008. p.75-100.

CHARMAN, W.N.; PORTER, C.J.H.; MITHANI, S.; DRESSMAN, J.B. Physicochemical and physiological mechanisms for the effects of food on drug absorption: the role of lipids and pH. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.86, n.3, p.269-282, 1997.

CHECA, A.; SOTO, V.G.; HERNÁNDEZ-CASSOU, S.; SAURINA, J. Fast determination of pKa values of reverse transcriptase inhibitor drugs for AIDS treatment by using pH-gradient flow-injection analysis and multivariate curve resolution. *Analytica Chimica Acta*, v.554, p.177-183, 2005.

CHEN, M.-L.; YU, L. The use of drug metabolism for prediction of intestinal permeability. *Molecular Pharmaceutics*, v.6, n.1, p.74-81, 2009.

COOK, J.; ADDICKS, W.; WU, Y.H. Application of the biopharmaceutical classification system in clinical drug development: an industrial view. *AAPS Journal*, v.10, n.2, p.306-310, 2008.

COOK, T.J.; SHENOY, S.S. Intestinal permeability of chlorpyrifos using the single pass intestinal perfusion method in the rat. *Toxicology*, v.184, p.125-133, 2003.

CUMMINS, C.L.; SALPHATI, L.; REID, M.J.; BENET, L.Z. *In vivo* modulation of intestinal CYP3A metabolism by P-glycoprotein: studies using the rat single-pass intestinal perfusion model. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.305, n.1, p.306-314, 2003.

CUSTODIO, J.M.; WU, C.-Y.; BENET, L.Z. Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.60, p.717-733, 2008.

DAHAN, A.; AMIDON, G.L. 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. *Molecular Pharmaceutics*, v.6, n.1, p.19-28, 2009.

DAHAN, A.; MILLER, J.M.; HILFINGER, J.M.; YAMASHITA, S.; YU, L.X.; LENNERNÄS, H.; AMIDON, G.L. High permeability criterion for BCS classification: segmental/pH dependent permeability considerations. *Molecular Pharmaceutics*, v.7, n.5, p.1827-1834, 2010.

DAHAN, A.; WEST, B.T.; AMIDON, G.L. Segmental-dependent membrane permeability along the intestine following oral drug administration: evaluation of a triple single-pass intestinal perfusion (TSPiP) approach in the rat. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.36, p.320-329, 2009.

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, 2008. p.182-215. (Biotechnology: Pharmaceutics Aspects, v.7).

DEL AMO, E.M.; HEIKKINEN, A.T.; MÖNKKÖNEN, J. *In vitro* – *in vivo* correlation in P-glycoprotein mediated transport in intestinal absorption. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.36, p.200-211, 2009.

DESESSO, J.M.; JACOBSON, C.F. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food and Chemical Toxicology*, v.39, p.209-228, 2001.

DEZANI, A.B. *Avaliação in vitro da solubilidade e da permeabilidade da lamivudina e da zidovudina: aplicações na classificação biofarmacêutica*. São Paulo, 2010. 140p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

DOLUISIO, J.T.; BILLUPS, N.F.; DITTERT, L.W.; SUGITA, E.T.; SWINTOSKY, J.V. Drug absorption I: a *in situ* rat gut technique yielding realistic absorption rates. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.58, p.1196-1200, 1969.

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

ERIKSSON, A.H.; VARMA, M.V.S.; PERKINS, E.J.; ZIMMERMAN, C.L. The intestinal absorption of a prodrug of the mGlu2/3 receptor agonist LY354740 is mediated by PEPT1: *In situ* rat intestinal perfusion studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.99, n.3, p.1574-1581, 2010.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Evaluation of Medicines for Human Use. Committee for Proprietary Medicinal Products. *Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence*. London, 2001. (CPMP/EWP/QWP/1401/98). Disponível em: http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003519.pdf. Acesso em: 20 ago 2010.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Pre-Authorization Evaluation of Medicines for Human Use. Committee for Medicinal Products for Human Use. *DRAFT: Guideline on the investigations of bioequivalence*. London, 2008. (CPMP/EWP/QWP/1401/98). Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/qwp/140198enrev1.pdf>. Acesso em: 16 mai 2010.

FAGERHOLM, U.; JOHANSSON, M.; LENNERNÄS, H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum. *Pharmaceutical Research*, v.13, p.1336-1342, 1996.

FAGERHOLM, U.; LENNERNÄS, 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.

FARMACOPÉIA Portuguesa VIII. Lisboa: Infarmed/Ministério da Saúde e Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento, 2005. v.1, p.449.

FERNANDES, C.; JUNQUEIRA, R.G.; CAMPOS, L.M.M.; PIANETTI, G.A. Dissolution test for lamivudine tablets: optimization and statistical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.42, p.601-606, 2006.

FLATEN, G.E.; DHANIKULA, A.B.; LUTHMAN, 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.

GONÇALVES, J.E.; SOUZA, J.; STORPIRTIS, S. Avaliação da permeabilidade de fármacos empregando culturas celulares. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N, Eds. *Biofarmacotécnica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p.204-211.

GRASS, G.M. Simulation models to predict oral drug absorption from *in vitro* data. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.23, p.199-219, 1997.

GRIFFIN, B.; O'DRISCOLL, C. Models of the small intestine. In: EHRHARDT, C.; KIM, K.-J., eds. *Drug absorption studies: in situ, in vitro and in silico models*. New York: Springer, 2008. p.34-76. (Biotechnology: Pharmaceutical Aspects, v.7).

HINTZ, R.J.; JOHNSON, K.C. The effect of particle size distribution on dissolution rate and oral absorption. *International Journal of Pharmaceutics*, v.51, p.9-17, 1989.

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. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf. Acesso em: 05 ago. 2011.

ITAGAKI, S.; OTSUKA, Y.; KUBO, S.; OKUMURA, H.; SAITO, Y.; KOBAYASHI, M.; HIRANO, T.; ISEKI, K. Intestinal uptake of nateglinide by an intestinal fluorescein transporter. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1668, n.2, p.190-194, 2005.

JAIN, R.; DUVVURI, S.; KANSARA, V.; MANDAVA, N.K.; MITRA, A.K. Intestinal absorption of novel-dipeptide prodrugs of saquinavir in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, v.336, p.233-240, 2007.

JAIN, R.; JADON, N.; RADHAPYARI, K. Cathodic adsorptive stripping voltammetric studies on lamivudine: an antiretroviral drug. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.313, p.254-260, 2007.

KANO, E.K.; SERRA, C.H.R.; KOONO, E.E.M.; ANDRADE, S.S.; PORTA, V. Determination of lamivudine in human plasma by HPLC and its use in bioequivalence studies. *International Journal of Pharmaceutics*, v.297, p.73-79, 2005.

KANSY, M.; SENNER, F.; GUBERNATOR, K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption process. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.41, n.7, p.1007-1010, 1998.

KARALIS, V.; MACHERAS, P.; PEER, A.V.; SHAH, V.P. Bioavailability and bioequivalence: focus on physiological factors and variability. *Pharmaceutical Research*, v.25, n.8, p.1956-1962, 2008.

KATSURA, T.; INUI, K. Intestinal absorption of drugs mediated by drug transporters: mechanisms and regulation. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, v.18, n.1, p.1-15, 2003.

KIM, J.-S.; MITCHELL, S.; KIJEK, P.; TSUME, Y.; HILFINGER, J.; AMIDON, G.L. The suitability of an *in situ* perfusion model for permeability determinations: utility for BCS class I biowaiver requests. *Molecular Pharmaceutics*, v.3, n.6, p.686-694, 2006.

KIVISTÖ, K.T.; BOOKJANS, G.; FROMM, M.F.; GRIESE, E.-U.; MÜNZEL, P.; KROEMER, H.K. Expression of CYP3A4, CYP3A5 and CYP3A7 in human duodenal tissue. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v.42, p.387-389, 1996.

KIYOMOTO, B.H.; TENGAN, C.H.; GODINHO, R.O. Effects of short-term zidovudine exposure on mitochondrial DNA content and succinate dehydrogenase activity of rat skeletal muscle cells. *Journal of the Neurological Sciences*, v.268, p.33-39, 2008.

KOLJONEN, M.; HAKALA, K.S.; AHTOLA-SÄTILÄ, T.; LAITINEN, L.; KORSTIANEN, R.; KOTIAHO, T.; KAUKONEN, A.M.; HIRVONEN, J. Evaluation of cocktail approach to standardise Caco-2 permeability experiments. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.64, p.379-387, 2006.

KOLJONEN, M.; ROUSU, K.; CIERNY, J.; KAUKONEN, A.M.; HIRVONEN, J. Transport evaluation of salicylic acid and structurally related compounds across Caco-2 cell monolayers and artificial PAMPA membranes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.70, p.531-538, 2008.

KOMIYA, I.; PARK, J.Y.; KAMANI, A.; HO, N.F.H.; HIGUCHI, W.I. Quantitative mechanistic studies in simultaneous fluid flow and intestinal absorption using steroids as model solutes. *International Journal of Pharmaceutics*, v.4, n.3, p.249-262, 1980.

KONISHI, Y.; HAGIWARA, K.; SHIMIZU, M. Transepithelial transport of fluorescein in Caco-2 cell monolayers and use of such transport in *in vitro* evaluation of phenolic acid availability. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v.66, n.11, p.2449-2457, 2002.

KUWAYAMA, K.; MIYAUCHI, S.; TATEOKA, R.; ABE, H.; KAMO, N. Fluorescein uptake by monocarboxylic acid transporter in human intestinal Caco-2 cells. *Biochemical Pharmacology*, v.63, p.81-88, 2002.

LANE, M.E.; LEVIS, K.A.; CORRIGAN, O.I. Effect of intestinal fluid flux on ibuprofen absorption in the rat intestine. *International Journal of Pharmaceutics*, v.309, p.60-66, 2006.

LARHED, A.W.; ARTURSSON, P.; GRASJÖ, J.; BJÖRK, E. Diffusion of drugs in native and purified gastrointestinal mucus. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.86, n.6, p.660-665, 1997.

LENNERNÄS, 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.

LENNERNÄS, H. Human intestinal permeability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.87, n.4, p.403-410, 1998.

LENNERNÄS, H.; ABRAHAMSSON, B. The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.57, p.273-285, 2005.

LENNERNÄS, H.; NYLANDER, S.; UNGELL, A.-L. Jejunal permeability: a comparison between the ussing chamber technique and the single pass perfusion in humans. *Pharmaceutical Research*, v.14, n.5, p.667-671, 1997.

LI, X.; CHAN, W.K. Transport, metabolism and elimination mechanisms of anti-HIV agents. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.39, p.81-103, 1999.

LI, C.; NAIR, L.; LIU, T.; LI, F.; PICHARDO, J.; AGRAWAL, S.; CHASE, R.; TONG, X.; USS, A.S.; BOGEN, S.; NJOROGUE, 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.

LI, M.; SI, L.; PAN, H.; RABBA, A.K.; YAN, F.; QUI, J.; LI, G. Excipients enhance, intestinal absorption of ganciclovir by P-gp inhibition: assessed *in vitro* by everted gut sac and *in situ* by improved intestinal perfusion. *International Journal of Pharmaceutics*, v.403, p.37-45, 2011.

LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J.B. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of essential medicines according to the biopharmaceutics classification system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.58, p.265-278, 2004.

LOBENBERG, R.; AMIDON, G.L. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system: new scientific approaches to international regulatory standards. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.50, p.3-12, 2000.

MAHER, S.; WANG, X.; BZIK, V.; MCCLEAN, S.; BRAYDEN, D.J. Evaluation of intestinal absorption and mucosal toxicity using two promoters. II rat instillation and perfusion studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.38, p.301-311, 2009.

MARASANAPALLE, V.P.; CRISON, J.R.; MA, J.; LI, X.; JASTI, B.R. Investigation of some factors contributing to negative food effects. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, v.30, p.71-80, 2009.

MARCOLONGO, R. *Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica*. São Paulo, 2003. 117p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

MARÍN, M.T.; MARGARIT, M.V.; SALCEDO, G.E. Characterization and solubility study of solid dispersions of flunarizine and polyvinylpyrrolidone. *Farmaco*, v.57, p.723-727, 2002.

MARTIN, A.; SINKO, P.J. *Martin: físico-farmácia e ciências farmacêuticas*. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. p.351-368.

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

MASAOKA, 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, p.240-250, 2006.

MASUNGI, C.; MENSCH, J.; VAN DIJCK, A.; BORREMANS, B.; 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*, n.63, p.194-199, 2008.

MERCK index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 13.ed. Whitehouse Station: Merck, 2001. p.959-1802.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Departamento de DST, Aids e Hepatites virais. *Quais são os antirretrovirais?* Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pagina/quais-sao-os-antirretrovirais>. Acesso em: 10 nov. 2011.

MISTRI, H.N.; JANGID, A.G.; PUDAGE, A.; GOMES, N.; SANYAL, M.; SHRIVASTAV, P. High throughput LC-MS/MS method for simultaneous quantification of lamivudine, stavudine and nevirapine in human plasma. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.853, p.320-332, 2007.

MORISHITA, M.; KAMEI, N.; EHARA, J.; ISOWA, K.; TAKAYAMA, K. A novel approach using functional peptides for efficient intestinal absorption of insulin. *Journal of Controlled Release*, v.118, p.177-184, 2007.

MOTZ, S.A.; SCHAEFER, U.F.; BALBACH, S.; EICHINGER, T.; LEHR, C.-M. Permeability assessment for solid oral drug formulations based on Caco-2 monolayer in combination with a flow through dissolution cell. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.66, p.286-295, 2007.

MUDRA, D.R.; BORCHARDT, R.T. Absorption barriers in the rat intestinal mucosa. 1. Applications of an *in situ* perfusion model to simultaneously assess drug permeation and metabolism. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.99, n.2, p.982-998, 2010.

MUENDOERFER, M.; SCHAEFER, U.F.; KOENIG, P.; WALK, J.S.; LOOS, P.; BALBACH, S.; EICHINGER, T.; LEHR, C.-M. On line monitoring of transepithelial electrical resistance (TEER) in an apparatus for combined dissolution and permeation testing. *International Journal of Pharmaceutics*, v.392, p.134-140, 2010.

NICOLAZZO, J.A.; FINNIN, B.C. *In vivo* and *in vitro* models for assessing drug absorption across the bucal mucosa. In: EHRHARDT, C.; KIM, K.-J., eds. *Drug absorption studies: in situ, in vivo and in silico* models. New York: Springer, 2008. p.89-111. (Biotechnology: Pharmaceutical Aspects, v.7).

NIELSEN, P.E.; 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.

OFOTOKUN, I.; CHUCK, SK.; HITTI, J.E. Antiretroviral pharmacokinetic profile: a review of sex differences. *Gender Medicine*, v.4, n.2, p.106-119, 2007.

OKUMU, A.; DIMASO, M.; LÖBENBERG, R. Computer simulations using Gastroplus™ to justify a biowaiver for etoricoxib solid oral drug products. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.72, p.91-98, 2009.

PADE, V.; STAVCHANSKY, S. Link between drug absorption solubility and permeability measurements in Caco-2 cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.87, n.12, p.1604-1607, 1998.

PENDELA, M.; VAN GYSEGHEM, E.; VAN DEN MOOTER, G.; BAERT, L.; ROSIER, J.; HOOGMARTENS, J.; ADAMS, E. Development of a liquid chromatographic assay for an anti-HIV tablet containing lamivudine, zidovudine and TMC278.HCL. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.49, p.508-512, 2009.

PLUMB, J.A.; BURSTON, D.; BAKER, T.G.; GARDNER, M.L.G. A comparison of the structural integrity of several commonly used preparations of rat small intestine *in vitro*. *Clinical Science*, v.73, n.1, p.53-59, 1987.

PRAKASH, K.; RAJU, P.N.; KUMARI, K.S.; NARASU, M.L. Solubility and dissolution rate determination of different antiretroviral drugs in different pH media using UV visible spectrophotometer. *E-Journal of Chemistry*, v.5, p.1159-1164, 2008.

PRETORIUS, E.; BOUIC, P.J.D. Permeation of four oral drugs through human intestinal mucosa. *AAPS PharmSciTech*, v.10, n.1, p.270-275, 2009.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. *Tecnologia farmacêutica*. 5.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995. v.5, p.111-113.

QUEVEDO, M.A.; BRIÑON, M.C. *In vitro* and *in vivo* pharmacokinetics characterization of two novel prodrugs of zidovudine. *Antiviral Research*, v.83, p.103-111, 2009.

RAMA, A.C.R.; VEIGA, F.; FIGUEIREDO, I.V.; SOUSA, A.; CARAMONA, M. Complexos de inclusão de indometacina com hidroxipropil- β -ciclodextrina: estudos de dissolução e coeficiente de partição. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.42, n.1, p.59-68, 2006.

RATHORE, R.; JAIN, J.P.; SRIVASTAVA, A.; JACHAK, S.M.; KUMAR, N. Simultaneous determination of hydrazinocurcumin and phenol red in samples from rat intestinal permeability studies: HPLC method development and validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.46, p.374-380, 2008.

RAW, A.S.; FURNESS, M.S.; GILL, D.S.; ADAMS, R.C.; HOLCOMBE, F.O.; YU, L.X. Regulatory considerations of pharmaceutical solid polymorphism in abbreviated new drug applications (ANDAs). *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.56, p.397-414, 2004.

REIS, J.M.; SINKO, 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.

ROBBINS, B.L.; POSTON, P.A.; NEAL, E.F.; SLAUGHTER, C.; RODMAN, J.H. Simultaneous measurement of intracellular triphosphate metabolites of zidovudine, lamivudine and abacavir (carbovir) in human peripheral blood mononuclear cells by combined anion exchange solid phase extraction and LC–MS/MS. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.850, p.310-317, 2007.

RUAN, L.P.; CHEN, S.; YU, B.Y.; ZHU, D.N.; CORDELL, G.A.; QIU, S.X. Prediction of human absorption of natural compounds by the non-everted rat intestinal sac model. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.41, p.605-610, 2006.

SALPHATI, L.; CHILDERS, K.; PAN, L.; TSUSUI, K.; TAKAHASHI, L. Evaluation of a single-pass intestinal perfusion method in rat for the prediction of absorption in man. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.53, p.1007-1013, 2001.

SCHANKER, L.S.; TOCCO, D.J.; BRODIE, B.B.; HOGBEN, C.A.M. Absorption of drugs from the rat small intestine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.123, n.1, p.81-88, 1958.

SCHURGERS, N.; BIJDENDIJK, J.; TUKKER, J.J.; CROMMELIN, D.J.A. Comparison of four experimental techniques for studying drug absorption kinetics in the anesthetized rat *in situ*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.75, n.2, p.117-119, 1986.

SCHURGERS, N.; DE BLAEY, C.J. Effect of pH, buffer concentration and buffer composition on the absorption of theophylline from the small intestine of the rat. *International Journal of Pharmaceutics*, v.19, p.283-295, 1984.

SERRA, C.H.R.; KOONO, E.E.M.; KANO, E.K.; SCHRAMM, S.G.; ARMANDO, Y.P.; PORTA, V. Bioequivalence and pharmacokinetics of two zidovudine formulations in healthy Brazilian volunteers: an open-label, randomized, single dose, two-way crossover study. *Clinical Therapeutics*, v.30, n.5, p.902-908, 2008.

SICCARDI, D.; KANDALAFT, L.E.; GUMBLETON, M.; MCGUIGAN, C. Stereoselective and concentration-dependent polarized epithelial permeability of a series of phosphoramidate triester prodrugs of d4T: an *in vitro* study in Caco-2 and Madin-Darby canine kidney cell monolayers. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.307, n.3, p.1112-1119, 2003.

SILVA, G.R.; CONDESSA, F.A.; PIANETTI, G.A.; NUNAN, E.A.; CAMPOS, L.M.M. Desenvolvimento e validação de método por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação simultânea das impurezas timina e timidina na matéria prima estavudina. *Química Nova*, v.31, n.7, p.1686-1690, 2008.

SILVA, A.L.L.; CRISTOFOLETTI, R.; STORPIRTIS, S.; SOUSA, V.D.; JUNGINGER, H.E.; SHAH, V.P.; STAVCHANSKY, S.; DRESSMAN, J.B.; BARENDT, D.M. Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage

forms: stavudine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.101, n.1, article first published on line: 15 sep. 2011.

SINGH, S.; DOBHAL, A.K.; JAIN, A.; PANDIT, J.K. CHAKRABORTY, S. Formulation and evaluation of solid lipid nanoparticles of a water soluble drug: zidovudine. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.58, n.5, p.650-655, 2010.

SMITH, P.L. Methods for evaluating intestinal permeability and metabolism *in vitro*. In: BORCHARDT, R.T.; SMITH, P.L.; WILSON, G., eds. *Models for assessing drug absorption and metabolism*. New York: Plenum Press, 1996. cap.2, p.13-34. (Pharmaceutical Biotechnology, v.8).

SOUZA, J. BENET, L.Z.; HUANG, Y.; STORPIRTIS, S. Comparison of bidirectional lamivudine and zidovudine transport using MDCK, MDCK-MDR1, and Caco-2 cell monolayers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.98, n.11, p.4413-4419, 2009.

SOUZA, J.; FREITAS, Z.M.; STORPIRTIS, S. Modelos *in vitro* para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.43, n.4, p.515-527, 2007.

STRAUCH, S.; JANTRATID, E.; DRESSMAN, J.B.; JUNGINGER, H.E.; KOPP, S.; MIDHA, K.K.; SHAH, V.P.; STAVCHANSKY, S.; BARENDIS, D.M. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: lamivudine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.100, n.6, p.2054-2063, 2011.

STRYDOM, S.; LIEBENBERG, W.; YU, L.; VILLIERS, M. The effect of temperature and moisture on the amorphous-to-crystalline transformation of stavudine. *International Journal of Pharmaceutics*, v.379, p.72-81, 2009.

SUGANO, K. Possible reduction of effective thickness of intestinal unstirred water layer by particle drifting effect. *International Journal of Pharmaceutics*, v.387, p.103-109, 2010.

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.

SUTTON, S.C.; RINALDI, M.T.S.; VUKOVINSKY, K.E. Comparison of the gravimetric, phenol red, and ¹⁴C-PEG-3350 methods to determine water absorption in the rat single-pass intestinal perfusion model. *AAPS Journal*, v.3, n.3, p.1-5, 2001.

SVENSSON, U.S.H.; SANDSTRÖM, R.; CARLBORG, Ö.; LENNERNÄS, H.; ASHTON, M. High *in situ* rat intestinal permeability of artemisinin unaffected by multiple dosing and with no evidence of P-glycoprotein involvement. *Drug Metabolism and Disposition*, v.27, n.2, p.227-232, 1999.

THIEL-DEMBY, V.E.; HUMPHREYS, J.E.; JOHN WILLIAMS, L.A.ST.; ELLENS, H.M.; SHAH, N.; AYRTON, A.D.; POLLI, J.W. Biopharmaceutics Classification System: validation learnings of an *in vitro* permeability assay. *Molecular Pharmaceutics*, v.6, n.1, p.11-18, 2009.

THOMSON, A.; HOTKE, C.; O'BIREN, B.; WEINSTEIN, W. Intestinal uptake of fatty acids and cholesterol in four animal species and man: role of unstirred water layer and bile salt micelle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, v.75, n.2, p.221-232, 1983.

TSUJI, A.; MIYAMOTO, E.; HASHIMOTO, N.; YAMANA, T. GI absorption of beta-lactam antibiotics II: Deviation from pH-partition hypothesis in penicillin absorption through *in situ* and *in vitro* lipoidal barriers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, n.67, p.1705-1711, 1978.

TUKKER, J.J. *In vitro* methods for the assessment of permeability. In: DRESSMAN, J.B.; LENNERNÄS, H., eds. *Oral drug absorption: prediction and assessment*. New York: Marcel Dekker, 2000. p.51-72. (Drug and the pharmaceutical sciences, 106).

UCHIDA, M.; FUKAZAWA, T.; YAMAZAKI, Y.; HASHIMOTO, H.; MIYAMOTO, Y. A modified fast (4 days) 96-well plate Caco-2 permeability assay. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v.59, p.39-43, 2009.

UNITED STATES. Department of Health & Human Services. Food and Drug Administration. *Drugs @ FDA*: FDA approved drug products. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/>. Acesso em: 14 mar. 2011.

UNITED STATES. Department of Health & Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. *Guidance for industry: waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system*. Rockville: FDA, 2000. p.1-13. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070246.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2011.

UNITED STATES. Department of Health & Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. *Guidance for industry: bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products-general considerations*. Rockville: FDA, 2003. p.1-26. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070124.pdf>. Acesso em: 12 ago. 2011.

UNITED STATES. Department of Health & Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. *Zerit label*. Rockville: FDA, 2009. Disponível em: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/020412s029,020413s020lbl.pdf. Acesso em: 10 nov. 2011.

UNITED States Pharmacopeia 33: The National Formulary 28. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2010.

USSING, H.H.; ZERAHN, K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiologica Scandinavica*, v.23, n.2/3, p.110-127, 1951.

VAN REES, H.; WOLFF, F.A.; NOACH, E.L. The influence of diphenylhydantoin on intestinal glucose absorption in the rat. *European Journal of Pharmacology*, v.28, p.310-315, 1974.

VOLPE, D.A. Application of method suitability for drug permeability classification. *AAPS Journal*, v.12, n.4, p.670-678, 2010.

VOLPE, D.A. Drug permeability studies in regulatory biowaiver applications. In: EHRHARDT, C.; KIM, K.-J., eds. *Drug absorption studies: in situ, in vitro and in silico* models. New York: Springer, 2008. p.665-680. (Biotechnology: Pharmaceutics Aspects, v.7).

WACHER, V.J.; SALPHATI, L.; BENET, L.Z. Active secretion and enterocytic drug metabolism barriers to drug absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 46, p. 89-102, 2001.

WACLAWSKI, A.P.; SINKO, P.J. Oral absorption of anti-acquired immune deficiency syndrome nucleoside analogues. 2. Carrier-mediated intestinal transport of stavudine in rat and rabbit preparations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.85, n.5, p.478-485, 1996.

WATANABE, E.; TAKAHASHI, M.; HAYASHI, M. A possibility to predict the absorbability of poorly water-soluble drugs in humans based on rat intestinal permeability assessed by an *in vitro* chamber method. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.58, p.659-665, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Lamivudine*: final text for addition to The International Pharmacopeia. Geneva: WHO, 2006. Disponível em: http://www.who.int/medicines/publications/pharmacopoeia/QAS_124rev2_Lamivudine.monoFINAL.pdf. Acesso em: 3 ago. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Proposal to waive *in vivo* bioequivalence requirements for the WHO model list of essential medicines immediate release, solid oral dosage forms. Geneva: WHO, 2005. Disponível em: http://www.who.int/medicines/services/expertcommittees/pharmprep/QAS04_109Rev1_Waive_in_vivo_bioequiv.pdf. Acesso em: 10 jul. 2011.

WON, D.-H.; KIM, M.-S.; LEE, S.; PARK, J.-S.; HWANG, S.J. Improved physicochemical characteristics of felodipine solid dispersion particles by supercritical anti-solvent precipitation process. *International Journal of Pharmaceutics*, v.301, p.199-208, 2005.

YEE, S. *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man – fact or myth. *Pharmaceutical Research*, v.14, n.6, p.763-766, 1997.

YU, L.X.; AMIDON, G.L.; POLLI, J.E.; ZHAO, H.; MEHTA, M.U.; CONNER, D.P.; SHAH, V.P.; LESKO, L.J.; CHEN, M.-L.; LEE, V.H.L.; HUSSAIN, A.S. Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. *Pharmaceutical Research*, v.19, n.7, p.921-925, 2002.

YU, L.X.; CARLIN, A.S.; AMIDON, G.L.; HUSSAIN, A.S. Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v.270, p.221-227, 2004.

YU, H.; SINKO, P.J. Influence of the microporous substratum and hydrodynamics on resistances to drug transport in cell culture systems: calculation of intrinsic transport parameters. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.86, n.12, p.1448-1457, 1997.

YUEN, G.L.; MORRIS, D.M.; MYDLOW, P.K.; HAIDAR, S.; HALL, S.T.; HUSSEY, E.K. Pharmacokinetics, absolute bioavailability, and absorption characteristics of lamivudine. *The Journal of Clinical Pharmacology*, v.35, n.12, p.1174-1180, 1995.

ZAMBITO, Y.; ZAINO, C.; UCCELLO-BARRETTA, G.; BALZANO, F.; DI COLO, G. Improved synthesis of quaternary ammonium-chitosan conjugates (N^+ -Ch) for enhanced intestinal drug permeation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.33, p.343-350, 2008.

ZAKERI-MILANI, P.; BARZEGAR-JALALI, M.; AZIMI, M.; VALIZADEH, H. Biopharmaceutical classification of drugs using intrinsic dissolution rate (IDR) and rat intestinal permeability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.73, p.102-106, 2009.

ZAKERI-MILANI, P.; BARZEGAR-JALALI; TJERZADEH, H.; AZARMI, Y.; VALIZADEH, H. Simultaneous determination of naproxen, ketoprofen, and phenol red in samples from rat intestinal permeability studies: HPLC method development and validation. *Journal of Pharmaceutical and biomedical analysis*, v.39, p. 624-630, 2005.

ZAKERI-MILANI, P.; VALIZADEH, H.; TAJERZADEH, H.; AZARMI, Y.; ISLAMBOLECHILAR, Z.; BARZEGAR, S.; BARZEGAR-JALALI, M. Predicting human intestinal permeability using single-pass intestinal perfusion in rat. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v.10, n.3, p.368-379, 2007.

ZVONAR, A.; BERGINČ, K.; KRISTL, A.; GASPERLIN, M. Microencapsulation of self-microemulsifying system: improving solubility and permeability of furosemide. *International Journal of Pharmaceutics*, v.388, p.151-158, 2010.

9. ANEXOS

ANEXO A

**Figuras referentes ao aparato de Wood utilizado no
estudo de dissolução intrínseca**

Figura a: Base da matriz e matriz com punção fixada na base

Figura b: Matriz em vista inferior, superior e com a punção

Figura c: Fármaco sendo adicionado na matriz, prensa para compactação do pó e matriz com o fármaco compactado

Figura d: Haste do aparato de Wood sem a matriz e com a matriz

ANEXO B
Informações para os 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 C

**Aprovação do protocolo de estudo pela
Comissão de Ética em Experimentação Animal**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética em Experimentação Animal

Cert.CEEA/FCF/85/2009

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"Permeabilidade de fármacos antiretrovirais usando o método de perfusão 'in situ' em ratos"** (Protocolo nº 235), de responsabilidade da pesquisadora **Thaís Marinho Pereira** sob a orientação da Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal – CEEA, desta Faculdade, em 13 de julho de 2009.

São Paulo, 16 de setembro de 2009.

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal
CEEA/FCF/USP

ANEXO D
Ficha do Aluno

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 6962791/1 - Thaisa Marinho Pereira

Email: thaisamarinho@usp.br
Data de Nascimento: 25/12/1986
Cédula de Identidade: RG - 34.316.760-8 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico - Universidade São Judas Tadeu - São Paulo - Brasil - 2009

Curso: Mestrado
Programa: Fármaco e Medicamentos
Área: Produção e Controle Farmacêuticos
Data de Matrícula: 06/07/2009
Início da Contagem de Prazo: 06/07/2009
Data Limite: 06/01/2012
Orientador: Prof(a). Dr(a). Cristina Helena dos Reis Serra - 06/07/2009 até o presente. E.Mail: chserra@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 06/07/2009
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 24/08/2010

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 Mestrado em 06/07/2009
Mudança de Regulamento em 06/08/2009
Matrícula de Acompanhamento em 25/07/2011

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 25/07/2011

Impresso em: 17/12/11 12:15:33

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 6962791/1 - Thaisa Marinho Pereira

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
MAE5755-6/1	Métodos Estatísticos Aplicados às Ciências Biológicas (Instituto de Matemática e Estatística - Universidade de São Paulo)	17/08/2009	04/12/2009	120	0	0	-	N	Matrícula cancelada
QBQ5747-6/1	Animais de Laboratório (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	09/11/2009	17/11/2009	15	1	100	A	N	Concluída
FBF5777-2/2	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos	01/03/2010	13/06/2010	45	3	93.3	A	N	Concluída
EDM5791-5/4	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	17/03/2010	30/06/2010	120	8	100	A	N	Concluída
FBF5778-1/3	Biofarmacotécnica: Estudo de Permeabilidade de Fármacos	20/05/2010	30/06/2010	60	4	100	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBF0342 Manipulação Farmacêutica, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo	01/07/2010	30/11/2010	-	3	0	-	-	-

São Paulo (1)									
FBF5766-2/3	Biodisponibilidade e Bioequivalência de Medicamentos	05/08/2010	06/10/2010	90	6	100	A	N	Concluída

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

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 03/06/2011.

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 de Acompanhamento em 25/07/2011

Impresso em: 17/12/11 12:15:33

ANEXO E
Currículo Lattes

Thaisa Marinho Pereira

Mestranda no programa de Fármaco e Medicamentos pela Universidade de São Paulo (USP) na área de Produção e Controle Farmacêuticos. Atua em pesquisa relacionada à solubilidade e permeabilidade de fármacos. Bolsista CAPES.

(Texto informado pelo autor)

Última atualização em 17/12/2011

Endereço para acessar este CV:
<http://lattes.cnpq.br/8930681649026019>

Dados Pessoais

Nome Thaisa Marinho Pereira

Nascimento 25/12/1986 - São Paulo/SP - Brasil

CPF 36438129810

Formação Acadêmica/Titulação

2009 Mestrado em Fármacos e Medicamentos.
 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
 Título: Avaliação da solubilidade e da permeabilidade intestinal por meio do modelo de perfusão in situ da fármacos antirretrovirais. Aplicações na Classificação Biofarmacêutica
 Orientador: Cristina Helena dos Reis Serra
 Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2005 - 2008 Graduação em Farmácia.
 Universidade São Judas Tadeu, USJT, São Paulo, Brasil
 Título: Interações Medicamentosas com antidepressivos em pacientes internados
 Orientador: Tânia Carmen Peñaranda Govato

Formação complementar

2011 - 2011 Curso de curta duração em UHPLC and UHPLC/MS in Pharmaceutical Applications.
 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil

2006 - 2006 Curso de curta duração em Técnicas de aplicação de injetáveis.
 Universidade São Judas Tadeu, USJT, São Paulo, Brasil

2006 - 2006 Curso de curta duração em Técnicas de coleta de sangue.
 Universidade São Judas Tadeu, USJT, São Paulo, Brasil

2005 - 2005 Curso de curta duração em Aspectos Clínicos da Atenção Farmacêutica.
 Universidade São Judas Tadeu, USJT, São Paulo, Brasil

2005 - 2005 Curso de curta duração em Atenção Farmacêutica em Hipertensão Arterial.
 Universidade São Judas Tadeu, USJT, São Paulo, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2009 - Atual Vínculo: outro (especifique) , Enquadramento funcional: Pesquisadora , Carga horária: 40, Regime: Dedicção Exclusiva

Atividades

07/2009 - Atual Projetos de pesquisa, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Participação em projetos:

Avaliação da solubilidade e da permeabilidade intestinal por meio do modelo de perfusão in situ de fármacos antirretrovirais. Aplicações na Classificação Biofarmacêutica

2. Hospital e Maternidade Cruz Azul de São Paulo - CRAZ

Vínculo institucional

2008 - 2008 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Estágio em farmácia hospitalar , Carga horária: 40, Regime: Integral

3. Universidade São Judas Tadeu - USJT

Vínculo institucional

2007 - 2007 Vínculo: outro (especifique) , Enquadramento funcional: Estágio na área industrial , Carga horária: 20, Regime: Parcial

2007 - 2007 Vínculo: outro (especifique) , Enquadramento funcional: Estágio na área de alimentos , Carga horária: 20, Regime: Parcial

2006 - 2006 Vínculo: outro (especifique) , Enquadramento funcional: Estágio na área de Análises Clínicas , Carga horária: 20, Regime: Parcial

2006 - 2006 Vínculo: outro (especifique) , Enquadramento funcional: Estágio na área de Farmácia , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Projetos

2009 - 2012 Avaliação da solubilidade e da permeabilidade intestinal por meio do modelo de perfusão in situ de fármacos antirretrovirais. Aplicações na Classificação Biofarmacêutica

Descrição: O trabalho tem como objetivo avaliar a solubilidade empregando o método do equilíbrio (técnica shake-flask) e empregando também os ensaios de dissolução intrínseca. O estudo de permeabilidade intestinal foi realizado com o emprego do modelo de perfusão in situ realizado em ratos Wistar.

Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Mestrado acadêmico (1); Doutorado (1);

Integrantes: Thaisa Marinho Pereira (Responsável); ; Cristina Helena dos Reis Serra; André Bersani Dezani; João Batista da Silva Júnior

Financiador(es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

Número de produções C,T & A: 2/