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

Determinação da solubilidade e permeabilidade de
fármacos conforme o Sistema de Classificação
Biofarmacêutica (SCB)

Rafael Leal Monteiro Paraiso

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Valentina Porta

São Paulo
2012

Ficha Catalográfica

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

Paraíso, Rafael Leal Monteiro
P222d Determinação da solubilidade e permeabilidade de fármacos
conforme o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) /
Rafael Leal Monteiro Paraíso. -- São Paulo, 2012.
138p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador : Porta, Valentina

1. Biofarmacotécnica 2. Biodisponibilidade : Farmacocinética
I. T. II. Porta, Valentina, orientador.

615.4b CDD

Rafael Leal Monteiro Paraiso

Determinação da solubilidade e permeabilidade de fármacos
conforme o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB)

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Valentina Porta
orientadora/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Dedico este trabalho

À Deus, especialmente a minha mãe e meus tios que considero como pais, Waldecy e Antônio Vieira.

Aos familiares pelo apoio, educação, força e amor que sempre me deram em todas as fases da vida.

E aos amigos que de muitas formas me incentivaram e ajudaram para que fosse possível a concretização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus por tudo que nos proporciona diariamente. Aos meus pais (mãe e tios) e minha família o meu muito obrigado pelas lições que ainda me dão, pelo carinho, força e amor que necessito para continuar em frente.

Aos amigos Erich, Francinalva, Marina, Eduardo, Guilherme, Marc, Michelle, Rafael Melo, Mariane e Eremita pela amizade, companheirismo e incentivo.

A Andressa, minha estagiária de iniciação científica, pelo apoio e auxílio na realização dos experimentos.

A professora Valentina Porta pela oportunidade e pela confiança depositada em mim.

Thalita Monteiro pela amizade e pelo auxílio nos experimentos de permeabilidade.

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

Ao CNPq e a FAPESP pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que direta ou indiretamente, tornaram possível a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

	Pág.
SUMÁRIO	I
LISTA DE TABELAS	VI
LISTA DE QUADROS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIX
RESUMO	XXII
2. OBJETIVOS	5
2.1 Objetivo geral.....	6
2.2 Objetivos específicos.....	6
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	7
3.1 Medicamentos genéricos	8
3.2 Estudos de Bioequivalência.....	9
3.3 Sistema de Classificação Biofarmacêutica.....	10
3.4 Solubilidade	12
3.4.1 Dissolução e solubilidade.....	12
3.4.2 Estudos de solubilidade	13
3.5 Absorção dos fármacos	14
3.5.1 Principais vias de absorção de fármacos.....	14
3.5.1.1 Transporte passivo paracelular.....	15
3.5.1.2 Transporte passivo transcelular	15
3.5.1.3 Transporte mediado por carreadores.....	16
3.5.1.4 Transporte vesicular.....	18
3.6 Permeabilidade.....	18
3.6.1 Estudos de permeabilidade <i>in vitro</i> com tecidos animais	19
3.6.2 Principais métodos para avaliar a permeabilidade de fármacos.....	20
3.6.2.1 Métodos <i>in situ</i>	20
3.6.2.2 Métodos <i>in silico</i>	21
3.6.2.3 Métodos <i>in vitro</i>	22
3.6.2.3.1 Ensaio de permeabilidade com membranas paralelas artificiais (PAMPA)	22
3.6.2.3.3 Método <i>in vitro</i> com tecidos animais	25
3.6.2.3.3.1 Câmaras de Ussing.....	25
3.7 Bioislação.....	27
3.8 Fármacos utilizados nos estudos	29

3.8.1 Besilato de anlodipino	30
3.8.2 Cloridrato de fluoxetina	32
3.8.3 Fluconazol	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Materiais	36
4.2 Solventes e reagentes	37
4.3 Equipamentos e dispositivos diversos	37
4.4 Estudos de solubilidade	38
4.4.1 Desenvolvimento de método analítico para a quantificação do besilato de anlodipino, fluoxetina, fluconazol, fluoresceína e metoprolol nos estudos de solubilidade.....	38
4.4.1.1 Espectro UV-visível	38
4.4.1.2 Preparo de solução-padrão e soluções de trabalho de benzilato de anlodipino	39
4.4.1.3 Preparo da solução-padrão e soluções de trabalho de fluconazol	39
4.4.1.4 Preparo da solução-padrão e soluções de trabalho da fluoxetina .	39
4.4.2 Validação dos métodos analíticos para a quantificação dos fármacos nos meios empregados no estudo de solubilidade	39
4.4.2.1 Especificidade	39
4.4.2.2 Linearidade	40
4.4.2.3 Precisão	42
4.4.2.3.1 Precisão intra e inter-ensaio	42
4.4.2.4 Exatidão (intra-dia)	42
4.5 Desenvolvimento de método bioanalítico para a quantificação do besilato de anlodipino, fluoxetina, fluconazol, fluoresceína e metoprolol no meio empregado no estudo de permeabilidade.	43
4.5.1 Preparo das soluções padrões para a construção da curva analítica	43
4.5.2 Preparo das amostras de padrão de controle de qualidade	44
4.5.3 Condições cromatográficas	44
4.5.3.1 Método bioanalítico para quantificação de besilato de anlodipino .	44
4.5.3.2 Método bioanalítico para quantificação do cloridrato de fluoxetina	45
4.5.3.3 Método bioanalítico para quantificação do fluconazol	45
4.5.3.4 Método bioanalítico para quantificação da fluoresceína	46

4.5.3.5 Método bioanalítico para quantificação do metoprolol.....	46
4.6 Parâmetros de validação dos métodos bioanalíticos para quantificação do besilato de anlodipino, cloridrato de fluoxetina, fluconazol, fluoresceína e metoprolol	46
4.6.1 Especificidade	47
4.6.2 Limite de quantificação inferior e limite de detecção	47
4.6.3 Linearidade	48
4.6.4 Precisão	48
4.6.5 Exatidão	48
4.6.6 Estabilidade.....	49
4.6.6.1 Estabilidade de curta duração.....	49
4.6.6.2 Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento.....	49
4.7 Estudo de solubilidade.....	50
4.8 Estudos de permeabilidade	51
4.8.1 Membranas	51
4.8.1.1 Obtenção e preparação das membranas.....	51
4.8.2 Avaliação da viabilidade das membranas utilizadas no estudo	52
4.8.3 Estudos de permeação dos fármacos.....	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 Validação dos métodos analíticos para a quantificação dos fármacos no estudo de solubilidade	55
5.1.1 Especificidade	55
5.1.2 Linearidade	57
5.1.3 Precisão e exatidão.....	72
5.2 Validação dos métodos bioanalíticos para a quantificação dos fármacos no estudo de permeabilidade	78
5.2.1 Especificidade	79
5.2.2 Linearidade	84
5.2.3 Limite de quantificação inferior (LQ) e limite de detecção (LD)	87
5.2.4 Precisão e exatidão.....	87
5.2.5 Estabilidade.....	89
5.2.5.1 Estabilidade curta duração.....	89
5.2.5.2 Estabilidade em um ciclo de congelamento e descongelamento ..	92
5.3 Teste de solubilidade	95

5.3.1 Besilato de anlodipino	95
5.3.2 Fluconazol	97
5.3.3 Cloridrato de Fluoxetina	98
5.4 Relação dose:solubilidade e Classificação Biofarmacêutica	99
5.5 Estudo de permeabilidade	100
5.5.1 Avaliação da integridade das membranas utilizadas nos experimentos.....	100
5.5.2 Avaliação da permeabilidade dos fármacos	101
6 – CONCLUSÕES	109
8 ANEXOS	128
ANEXO A.....	129
ANEXO B.....	131
ANEXO C.....	133
ANEXO D.....	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de absorvância obtidas na curva analítica do método para quantificação do besilato de anlodipino em água.	57
Tabela 2 - Valores de absorvância obtidas na curva analítica do método para quantificação do besilato de anlodipino em tampão HCl pH 1,2.....	58
Tabela 3 - Valores de absorvância obtidas na curva analítica do método para quantificação do besilato de anlodipino em meio tampão acetato pH 4,5.	59
Tabela 4 - Valores de absorvância obtidas na curva analítica do método para quantificação do besilato de anlodipino em meio tampão fosfato pH 6,8.	60
Tabela 5 - Valores de absorvância obtidas na curva analítica do método para quantificação do besilato de anlodipino em meio tampão fosfato pH 7,5.	61
Tabela 6 - Valores de absorvância obtidas na curva analítica do método para quantificação do fluconazol em água.	62
Tabela 7 - Valores de absorvância obtidas na curva analítica do método para quantificação do fluconazol em tampão HCl pH 1,2	63
Tabela 8 - Valores de absorvância obtidas na curva analítica do método para quantificação do fluconazol em meio tampão acetato pH 4,5.....	64
Tabela 9 - Valores de absorvância obtidas na curva analítica do método para quantificação do fluconazol em meio tampão fosfato pH 6,8.....	65
Tabela 10 - Valores de absorvância obtidas na curva analítica do método para quantificação do fluconazol em meio tampão fosfato pH 7,5.....	66
Tabela 11 - Valores de absorvância obtidas na curva analítica do método para quantificação do cloridrato de fluoxetina em água.	67
Tabela 12 - Valores de absorvância obtidas na curva analítica do método para quantificação do cloridrato de fluoxetina em tampão HCl pH 1,2	68
Tabela 13 - Valores de absorvância obtidas na curva analítica do método para quantificação do cloridrato de fluoxetina em meio tampão acetato pH 4,5.....	69
Tabela 14 - Valores de absorvância obtidas na curva analítica do método para quantificação do cloridrato de fluoxetina em meio tampão fosfato pH 6,8.....	70
Tabela 15 - Valores de absorvância obtidas na curva analítica do método para quantificação do cloridrato de fluoxetina em meio tampão fosfato pH 7,5.....	71
Tabela 16 - Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e exatidão intra-ensaio do método analítico para a determinação de besilato de anlodipino em água.	73

Tabela 17 - Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e exatidão intra-ensaio do método analítico para a determinação de besilato de anlodipino em tampão HCl pH 1,2.....	73
Tabela 18 - Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e exatidão intra-ensaio do método analítico para a determinação de besilato de anlodipino em tampão acetato pH 4,5.....	74
Tabela 19 - Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e exatidão intra-ensaio do método analítico para a determinação de besilato de anlodipino em tampão fosfato pH 6,8.....	74
Tabela 20 - Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e exatidão intra-ensaio do método analítico para a determinação de besilato de anlodipino em tampão fosfato pH 7,5.....	74
Tabela 21 - Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e exatidão intra-ensaio do método analítico para a determinação de fluconazol em água.....	75
Tabela 22 - Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e exatidão intra-ensaio do método analítico para a determinação de fluconazol em tampão HCl 0,1 N pH 1,2	75
Tabela 23 - Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e exatidão intra-ensaio do método analítico para a determinação de fluconazol em tampão acetato pH 4,5	75
Tabela 24 - Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e exatidão intra-ensaio do método analítico para a determinação de fluconazol em tampão fosfato pH 6,8	76
Tabela 25 - Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e exatidão intra-ensaio do método analítico para a determinação de fluconazol em tampão fosfato pH 7,5	76
Tabela 26 - Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e exatidão intra-ensaio do método analítico para a determinação de cloridrato de fluoxetina em água.....	76
Tabela 27 - Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e exatidão intra-ensaio do método analítico para a determinação de cloridrato de fluoxetina em tampão HCl pH 1,2.....	77
Tabela 28 - Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e exatidão intra-ensaio do método analítico para a determinação de cloridrato de fluoxetina em tampão acetato pH 4,5.....	77

Tabela 29 - Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e exatidão intra-ensaio do método analítico para a determinação de cloridrato de fluoxetina em tampão fosfato pH 6,8	77
Tabela 30 - Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e exatidão intra-ensaio do método analítico para a determinação de cloridrato de fluoxetina em tampão fosfato pH 7,5	78
Tabela 31 - limites de detecção e de quantificação inferior dos métodos para a quantificação do besilato de anlodipino, fluoxetina, fluconazol, fluoresceína e metoprolol empregando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	87
Tabela 32 - Precisão e exatidão calculados a partir de 3 concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para o besilato de anlodipino utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV)	88
Tabela 33 - Precisão e exatidão calculados a partir de 3 concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para o cloridrato de fluoxetina utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV)	88
Tabela 34 - Precisão e exatidão calculados a partir de 3 concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para o fluconazol utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV)	88
Tabela 35 - Precisão e exatidão calculados a partir de 3 concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para o metoprolol utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV)	89
Tabela 36 - Precisão e exatidão calculados a partir de 3 concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para a fluoresceína utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-Fluorescência).....	89
Tabela 37 - Estabilidade besilato de anlodipino em tampão Ringer após 6 horas e em temperatura ambiente. Resultados representam a média de três determinações.....	90

Tabela 38 - Estabilidade do cloridrato de fluoxetina em tampão Ringer após 6 horas e em temperatura ambiente. Resultados representam a média de três determinações.....	90
Tabela 39 - Estabilidade do fluconazol em tampão Ringer após 6 horas e em temperatura ambiente. Resultados representam a média de três determinações	91
Tabela 40 - Estabilidade metoprolol em tampão Ringer após 6 horas e em temperatura ambiente. Resultados representam a média de três determinações	91
Tabela 41 - Estabilidade da fluoresceína em tampão Ringer após 6 horas e em temperatura ambiente. Resultados representam a média de três determinações.....	91
Tabela 42 - Estabilidade do besilato de anlodipino em tampão Ringer após 48 h em temperatura -20°C e descongeladas. Resultados representam a média de três determinações.....	92
Tabela 43 - Estabilidade fluoxetina em tampão Ringer após 48 h em temperatura -20°C e descongeladas. Resultados representam a média de três determinações.....	93
Tabela 44 - Estabilidade fluconazol em tampão Ringer após 48 h em temperatura -20°C e descongeladas. Resultados representam a média de três determinações.....	93
Tabela 45 - Estabilidade metoprolol em tampão Ringer após 48 h em temperatura -20°C e descongeladas. Resultados representam a média de três determinações.....	94
Tabela 46 - Estabilidade da fluoresceína em tampão Ringer após 48 h em temperatura -20°C e descongeladas. Resultados representam a média de três determinações.....	94
Tabela 47 - Solubilidade do besilato de anlodipino em diferentes meios a 37,0°C.	96
Tabela 48 - Solubilidade do fluconazol em diferentes meios a 37,0 °C	97
Tabela 49 - Solubilidade do cloridrato de fluoxetina em diferentes meios a 37°C	99
Tabela 50 - Valores de RET do segmento intestinal empregados nos ensaios de permeabilidade.....	101

Tabela 51 - Valores médios de permeabilidade aparente (Papp) obtidas a partir dos resultados dos ensaios de permeabilidade com os fármacos besilato de anlodipino, fluconazol, cloridrato de fluoxetina, metoprolol e fluoresceína e valores de Log P e Fração absorvida disponíveis na literatura..... 105

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais famílias de transportadores encontradas no epitélio intestinal	17
Quadro 2 - Fármacos candidatos a isenção dos estudos de BE	28
Quadro 3 - Principais características do besilato de anlodipino.....	31
Quadro 4 - Principais características do cloridrato de fluoxetina	33
Quadro 5 - Principais características do fluconazol	34
Quadro 6 - Concentração das amostras de besilato de anlodipino obtidas a partir de uma solução padrão do fármaco a 200 µg/mL e empregadas para determinação da linearidade do método de quantificação.....	40
Quadro 7 - Concentração das amostras do fluconazol obtidas a partir de uma solução padrão do fármaco a 200 µg/mL e empregadas para determinação da linearidade do método de quantificação.....	41
Quadro 8 - Concentração das amostras do cloridrato de fluoxetina obtidas a partir de uma solução padrão do fármaco a 1 mg/mL e empregadas para determinação da linearidade do método de quantificação.....	41
Quadro 9 - Concentrações em ng/mL das soluções padrão utilizadas na construção da curva analítica e linearidade para quantificação de benzilato de anlodipino, cloridrato de fluoxetina, fluconazol, fluoresceína e metoprolol em tampão Ringer.....	43
Quadro 10 - Concentrações e ng/mL das amostras de controle de qualidade utilizadas na quantificação de benzilato de anlodipino, cloridrato de fluoxetina, fluconazol, fluoresceína e metoprolol em tampão Ringer	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classes de fármacos de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (Adaptado de AMIDON et al 1995).....	11
Figura 2 – Representação da variação do pH e do tempo de residência dos fármacos e alimentos no TGI	12
Figura 3- Mecanismos de transporte através da membrana intestinal: a) permeabilidade passiva transcelular; b) transporte mediado por carreadores de membrana; c) permeabilidade passiva paracelular; d) transporte vesicular. Nas letras (e) e (f) estão representados dois mecanismos que impedem a absorção intestinal, sendo e) transporte mediado por carreadores de excreção e em f) enzimas metabolizadoras (adaptado GONÇALVES et. al., 2009)	14
Figura 4 - Esquema do suporte de cultivo de células Caco-2 empregado nos estudos de permeabilidade (GONÇALVES et. al., 2009).....	24
Figura 5 - Esquemática de Ussing Chamber.	27
Figura 6 - Célula de Franz.....	27
Figura 7 - Estrutura química do anlodipino.	30
Figura 8 - Estrutura química da fluoxetina.	32
Figura 9 - Estrutura química do fluconazol.....	34
Figura 10 - Representação esquemática da célula de difusão vertical e seus acessórios (HANSON RESEARCH, 2006).	52
Figura 11 - Espectro da varredura da água para avaliar a especificidade do método analítico do besilato de anlodipino, fluconazol e cloridrato de fluoxetina	55
Figura 12 - Espectro da varredura do tampão HCl pH 1,2 para avaliar a especificidade do método analítico do besilato de anlodipino, fluconazol e cloridrato de fluoxetina.	55
Figura 13 - Espectro da varredura do tampão acetato pH 4,5 para avaliar a especificidade do método analítico do besilato de anlodipino, fluconazol e cloridrato de fluoxetina.	56
Figura 14 - Espectro de varredura do tampão fosfato pH 6,8 para avaliar a especificidade do método analítico do besilato de anlodipino, fluconazol e cloridrato de fluoxetina.	56
Figura 15 - Espectro de varredura do tampão fosfato pH 7,5 para avaliar a especificidade do método analítico do besilato de anlodipino, fluconazol e cloridrato de fluoxetina.	56

Figura 16 - Curva analítica do besilato de anlodipino obtida por espectrofotometria a 240 nm a partir de diluições volumétricas da solução-padrão em água.	58
Figura 17 - Curva analítica do besilato de anlodipino obtida por espectrofotometria a 240 nm a partir de diluições volumétricas da solução-padrão em tampão HCl pH 1,2.....	59
Figura 18 - Curva analítica do besilato de anlodipino obtida por espectrofotometria a 240 nm a partir de diluições volumétricas da solução-padrão em tampão acetato pH 4,5.....	60
Figura 19 - Curva analítica do besilato de anlodipino obtida por espectrofotometria a 240 nm a partir de diluições volumétricas da solução-padrão em tampão fosfato pH 6,8.....	61
Figura 20 - Curva analítica do besilato de anlodipino obtida por espectrofotometria a 240 nm a partir de diluições volumétricas da solução-padrão em tampão fosfato pH 7,5.....	62
Figura 21 - Curva analítica de fluconazol obtida por espectrofotometria a 260 nm a partir de diluições volumétricas da solução-padrão em água.	63
Figura 22 - Curva de analítica do fluconazol obtida por espectrofotometria a 260 nm a partir de diluições volumétricas da solução-padrão em solução de tampão HCl pH 1,2.....	64
Figura 23 - Curva analítica do fluconazol obtida por espectrofotometria a 260 nm a partir de diluições volumétricas da solução-padrão em meio tampão acetato pH 4,5.	65
Figura 24 - Curva de analítica do fluconazol obtida por espectrofotometria a 260 nm a partir de diluições volumétricas da solução-padrão em meio tampão fosfato pH 6,8.	66
Figura 25 - Curva de analítica do fluconazol obtida por espectrofotometria a 260 nm a partir de diluições volumétricas da solução-padrão em meio tampão fosfato pH 7,5.	67
Figura 26 - Curva analítica do cloridrato de fluoxetina obtida por espectrofotometria a 230 nm a partir de diluições volumétricas da solução padrão em água.	68

Figura 27 - Curva analítica do cloridrato de fluoxetina obtida por espectrofotometria a 230 nm a partir de diluições volumétricas da solução-padrão em tampão HCl pH 1,2.....	69
Figura 28 - Curva analítica do cloridrato de fluoxetina obtida por espectrofotometria a 230 nm a partir de diluições volumétricas da solução-padrão em tampão acetato pH 4,5.....	70
Figura 29 - Curva analítica do cloridrato de fluoxetina obtida por espectrofotometria a 230 nm a partir de diluições volumétricas da solução-padrão em tampão fosfato pH 6,8.....	71
Figura 30 - Curva analítica do cloridrato de fluoxetina obtida por espectrofotometria a 230 nm a partir de diluições volumétricas da solução-padrão em tampão fosfato pH 7,5.....	72
Figura 31 - Cromatogramas de injeções de solução tampão Ringer (branco), Ringer em contato com a membrana (branco membrana) e de solução de besilato de anlodipino 400 ng/mL em solução tampão Ringer pH 7,4.	79
Figura 32 - Cromatogramas de injeções de solução tampão Ringer (branco), Ringer em contato com a membrana (branco membrana) e de solução de fluconazol 500 ng/mL em solução tampão Ringer pH 7,4.....	80
Figura 33 - Cromatogramas de injeções de solução tampão Ringer (branco), Ringer em contato com a membrana (branco membrana) e de solução de cloridrato de fluoxetina 400 ng/mL em solução tampão Ringer pH 7,4.....	81
Figura 34 - Cromatogramas de injeções de solução tampão Ringer (branco), Ringer em contato com a membrana (branco membrana) e de solução de metoprolol 400 ng/mL em solução tampão Ringer pH 7,4.	82
Figura 35 - Cromatogramas de injeções de solução tampão Ringer (branco), Ringer em contato com a membrana (branco membrana) e de solução de fluoresceína 150 ng/mL em solução tampão Ringer pH 7,4.	83
Figura 36 - Curva analítica referente ao método analítico desenvolvido para quantificação do besilato de anlodipino em tampão Ringer empregando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV). Cada ponto representa a média de três determinações.	84
Figura 37 - Curva analítica referente ao método analítico desenvolvido para quantificação do cloridrato de fluoxetina em tampão Ringer empregando-se	

cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV). Cada ponto representa a média de três determinações.....	85
Figura 38 - Curva analítica referente ao método analítico desenvolvido para quantificação do fluconazol em tampão Ringer empregando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV). Cada ponto representa a média de três determinações.....	85
Figura 39 - Curva analítica referente ao método analítico desenvolvido para quantificação do metoprolol em tampão Ringer empregando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV). Cada ponto representa a média de três determinações.....	86
Figura 40 - Curva analítica referente ao método analítico desenvolvido para quantificação da fluoresceína em tampão Ringer empregando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-Fluorescência). Cada ponto representa a média de três determinações.....	86
Figura 41 - Solubilidade do besilato de anlodipino em diferentes pHs.	96
Figura 42 - Solubilidade do fluconazol em diferentes pHs.....	98
Figura 43 - Solubilidade do cloridrato de fluoxetina em diferentes pHs.....	99
Figura 44 - Quantidade permeada de metoprolol em ng através do segmento intestinal em função do tempo. Média de 6 determinações.....	103
Figura 45 - Quantidade permeada de fluoresceína em ng através do segmento intestinal em função do tempo. Média de 6 determinações.....	103
Figura 46 - Quantidade permeada de besilato de anlodipino em ng através do segmento intestinal em função do tempo. Média de 6 determinações.....	103
Figura 47 - Quantidade permeada de fluconazol em ng através do segmento intestinal em função do tempo. Média de 6 determinações.....	104
Figura 48 - Quantidade permeada cloridrato de fluoxetina em ng através do segmento intestinal em função do tempo. Média de 6 determinações.....	104
Figura 49 - Perfis de permeabilidade aparente.....	105

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária
OMS = Organização Mundial de Saúde
FDA = Food and Drug Administration
EMA = European Medicines Agency
FIP = International Pharmaceutical Federation
SCB = Sistema de Classificação Biofarmacêutica
EF = Equivalência Farmacêutica
BE = Bioequivalência
RENAME = Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
DCB = Denominação Comum Brasileira
DCI = Denominação Comum Internacional
BP-AS = Baixa permeabilidade e alta solubilidade
BP-BS = Baixa permeabilidade e baixa solubilidade
BP-AS = Baixa permeabilidade e alta solubilidade
BP-BS = Baixa permeabilidade e baixa solubilidade
TGI = trato gastrointestinal
nm = nanometro
MDR = Multidrug resistance
Pgp = Glicoproteína-P
log P = Coeficientes de partição
log D = Coeficiente de distribuição
QSAR = relações quantitativa entre a estrutura e atividade
PAMPA = Membranas paralelas artificiais
RET = Resistência Elétrica Transepitelial
UV = Ultravioleta
HCl = Ácido clorídrico
µg/mL = Microgramas por mililitro
mg = Miligrama
mL = Mililitro
mg/mL = Miligramas por mililitro
µL = Microlitro
rep. = Replicata

CV = Coeficiente de variação
DP = Desvio-padrão
AMD = Absorbância Média Determinada.
ng/mL = Nanogramas por mililitro
CQB = Controle de Qualidade Baixo
CQM = Controle de Qualidade Médio
CQA = Controle de Qualidade Alto
 μm = Micrômetro
mM = Milimolar
mL/min = Mililitros por minuto
 $^{\circ}\text{C}$ = Graus celsius,
LD = limite de detecção
LIQ = limite de quantificação
Papp = Permeabilidade aparente
Abs. = Absorbância
CLAE = Cromatografia Líquida de alta eficiência
Fa = Fração absorvida
A-B = Apical-basolateral
B-A = Basolateral-apical

RESUMO

PARAISO, R. L. M. **Determinação da solubilidade e permeabilidade de fármacos conforme o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB).** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A avaliação da classe biofarmacêutica dos fármacos assume importância na política de medicamentos genéricos, já que as características de solubilidade e permeabilidade de um fármaco, conforme definidas pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), constituem critério essencial para bioisenção na obtenção de registro de genéricos. O propósito do trabalho foi o de determinar a classe biofarmacêutica dos fármacos benidolato de anlodipino, fluconazol e cloridrato de fluoxetina, por meio da determinação de seus parâmetros de solubilidade e permeabilidade. Para o teste de solubilidade, foram desenvolvidos e validados métodos para a quantificação do benidolato de anlodipino, fluconazol e cloridrato de fluoxetina em água e nos tampões farmacopéicos pH 1,2; pH 4,5; pH 6,8 e 7,5. O estudo de solubilidade foi realizado pelo método *shake flask* num período de 72 horas de agitação a 37°C. A maior dose comercializada no mercado é de 10 mg, 200 mg e 20 mg respectivamente para o benidolato de anlodipino, fluconazol e cloridrato de fluoxetina. Os valores de solubilidade para o benidolato de anlodipino nos meios avaliados foram de 0,88 a 2,35 mg/mL enquanto intervalo da razão dose: solubilidade (D: S) foi de 4,24 mL a 11,36 mL. Para o fluconazol os valores de solubilidade foram: 8,22 a 14,4 mg/mL, e o intervalo da razão D: S foram de 13,38 mL a 24,33 mL. Já para o cloridrato de fluoxetina a solubilidade foi de 5,12 a 44,36 mg/mL, e o intervalo razão D: S foram de 0,45 a 3,91 mL. De acordo com o SCB, para classificar um fármaco como de alta solubilidade a dose mais alta comercializada do fármaco deve ser solúvel em 250 mL de meio aquoso na faixa de pH de 1 a 7,5 a 37° C e um fármaco é considerado como de alta permeabilidade quando a sua fração absorvida seja $\geq 90\%$. De acordo com esse critério, ambos os fármacos apresentam alta solubilidade. A avaliação da permeabilidade dos fármacos foi realizada por meio da determinação do fluxo de fármaco através de segmentos intestinais de ratos, isolados e contidos em câmaras de difusão vertical da plataforma manual para testes de permeabilidade. Os valores de permeabilidade aparente (Papp) obtidos nos experimentos indicam que o benidolato de anlodipino e o fluconazol são fármacos de baixa permeabilidade, portanto, classe III e o cloridrato de fluoxetina alta permeabilidade, classe I.

Palavras chave: Bioisenção; Classificação Biofarmacêutica (SCB); Benidolato de anlodipino; Cloridrato de fluoxetina; Fluconazol

ABSTRACT

PARAISO, R. L. M. **Determinação da solubilidade e permeabilidade de fármacos conforme o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB).** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The Biopharmaceutical Classification System (BCS) concept was established by Amidon and co-workers (1995) and BCS allows expectations regarding correlation between *in vitro* dissolution data and *in vivo* bioavailability data. According to the BCS, three major factors govern drug bioavailability: the drug aqueous solubility, the ability of the drug molecules to permeate biologic membranes and drug dissolution from the dosage form. Solubility criteria defined by the FDA to classify a drug as highly soluble requires the highest dose strength to be soluble in 250 mL of aqueous media over the pH range of 1-7.5 at 37°C and a drug is considered with high permeability when its fraction absorbed is $\geq 90\%$. The purpose of this study was to evaluate the solubility and permeability of amlodipine besylate, fluconazole and fluoxetine hydrochloride in order to determine them BCS class. The solubility study was performed using the drug over a 72 hours period of agitation as the *shake flask* method at 37 °C. The results from solubility values are given in mg/mL and dose: solubility ratio is given in mL. The highest dose marketed is 10 mg, 200 mg and 20 mg, respectively for the amlodipine besylate, fluconazole and fluoxetine hydrochloride. The solubility values for the amlodipine besylate in the tested aqueous media range from 0.88 to 2.35 mg/mL, while dose solubility ratio (D: S) values range from 4.24 to 11.36 mL. The values for fluconazole solubility were 8.22 to 14.4 mg/mL, and the D: S was 13.38 to 24.33 mL. The fluoxetine hydrochloride solubility is range from 5.12 to 44.36 mg/mL, and the ratio D: S from 0.45 to 3.91 mL. According to BCS all the drugs have high solubility. The evaluation of the drugs permeability was performed by determining the drug flow through the rat intestinal segments, isolated and contained in vertical diffusion chambers platform for manual testing permeability. The apparent permeability values (Papp) obtained in the experiments indicate that the amlodipine besylate and fluconazole are low permeability drugs and fluoxetine hydrochloride high permeability. Considering Solubility and permeability assay, amlodipine besylate and fluconazole are Class III and fluoxetine hydrochloride is Class I.

Key words: Bioisecção; Classificação Biofarmacêutica (SCB); Besilato de anlodipino; Cloridrato de fluoxetina; Fluconazol

1.INTRODUÇÃO

A política de medicamentos genéricos foi implantada no Brasil em 1999, pela lei nº 9.787, com o objetivo principal de melhorar o acesso da população a medicamentos de baixo custo com qualidade comprovada (BRASIL, 1999).

Os genéricos estão ganhando mercado e têm contribuído para a redução dos custos dos tratamentos farmacológicos. A política de genéricos, em função de seus objetivos precípuos de aumentar a concorrência no mercado farmacêutico, possibilitou também a redução dos preços dos medicamentos de marca e inovadores (ANVISA, 2009).

A confiabilidade dos medicamentos genéricos é assegurada pela definição de rígidos critérios de qualidade adotados para análise e concessão de registros desses medicamentos, previstos na legislação (BRASIL, 2006). Estes critérios incluem a comprovação de sua eficácia terapêutica, segurança e intercambiabilidade em relação ao medicamento de referência, garantidas por meio da realização dos ensaios de equivalência farmacêutica (EF) e bioequivalência (BE) (BRASIL, 2006).

Os testes de BE são realizados em centros habilitados e fiscalizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que, além de analisar os resultados dos testes, verifica se os estudos estão sendo conduzidos de acordo com os requisitos estabelecidos pela legislação (BRASIL, 2006).

Os estudos de BE são, em geral, onerosos e demorados, além de exporem os voluntários sadios a riscos advindos da utilização do medicamento e da retirada de amostras de sangue. Visando reduzir a necessidade deste tipo de estudo, diversas pesquisas vêm sendo realizadas com a finalidade de definir testes *in vitro* capazes de prever o comportamento *in vivo* dos medicamentos.

O conceito da classificação biofarmacêutica estabelecido por AMIDON e colaboradores (1995) permite a classificação dos fármacos, com base na sua solubilidade e permeabilidade, em quatro classes. Os fármacos da Classe I possuem uma alta solubilidade e alta permeabilidade; os de Classe II, baixa solubilidade e alta permeabilidade; os de Classe III alta solubilidade e baixa permeabilidade e os de Classe IV apresentam baixa solubilidade e baixa permeabilidade.

O fármaco é considerado altamente solúvel quando a quantidade da maior dosagem disponível comercialmente é solúvel em 250 mL ou menos de

meio aquoso em uma faixa específica de pH (FDA, 2000; WOLRD HEALTH ORGANIZATION, 2000).

A permeabilidade refere-se à capacidade de passagem do fármaco através da parede do trato gastrointestinal humano, e inclui a resistência aparente ao transporte de massa através da membrana intestinal. Fármacos de alta permeabilidade são, geralmente, aqueles estáveis nas condições do trato gastrointestinal e que apresentam biodisponibilidade absoluta maior que 90 %, ou aqueles para os quais a permeabilidade foi determinada experimentalmente (FDA, 2000; BRASIL, 2003).

As principais agências regulatórias mundiais como Food and Drug Administration (FDA) e European Medicines Agency (EMA), além da Organização Mundial da Saúde (OMS), têm avaliado a possibilidade de isentar de ensaios de BE aqueles medicamentos que se apresentam em formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata, contendo fármaco Classe I do SCB, com rápida dissolução *in vitro*. Nestes casos, testes *in vitro* seriam suficientes para garantir a intercambiabilidade com o medicamento de referência (FDA, 2000). A OMS além de prever a bioisenção para medicamentos contendo fármacos de Classe I e III considera esta possibilidade também para medicamentos contendo fármacos Classe II, desde que sejam ácidos fracos com altas solubilidades e velocidade de dissolução rápida (85% em 30 minutos) ou muito rápida (85% em 15 minutos) em pH 6,8 (DRESSMAN *et. al.*, 2006). Em agosto de 2011 a ANVISA publicou a Resolução – RDC N° 37 que dispõe sobre o Guia para isenção e substituição de estudos de BD relativa/ BE também possibilitando a isenção de estudos de biodisponibilidade relativa para alguns fármacos selecionados, presentes na Instrução Normativa N° 4, de 3 de Agosto de 2011. (BRASIL, 2011)

Desta forma, o SCB vem sendo usado atualmente para justificar a isenção dos ensaios de bioequivalência (bioisenção) para um determinado medicamento, em função dos resultados dos testes de dissolução *in vitro* e da classe biofarmacêutica do fármaco.

Atestando a importância que o tema assumiu atualmente, a Federation International Pharmaceutical (FIP) criou um programa para elaboração de

monografias de bioisenção para fármacos da lista de medicamentos essenciais da OMS (PHARMACEUTICAL INTERNATIONAL FEDERATION, 2012).

Os fármacos avaliados no presente estudo foram o besilato de anlodipino, o cloridrato de fluoxetina e o fluconazol, selecionados em função de sua ampla utilização para tratamento de importantes problemas de saúde da população. Estes fármacos estão incluídos na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) (BRASIL, 2008), na lista de medicamentos essenciais da OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009) e na lista de fármacos considerados pela FIP como de interesse para elaboração de monografia de bioisenção (PHARMACEUTICAL INTERNATIONAL FEDERATION, 2012).

O propósito do trabalho é determinar a classe biofarmacêutica dos fármacos besilato de anlodipino, fluconazol e cloridrato de fluoxetina, por meio da determinação de seus parâmetros de solubilidade e permeabilidade, de acordo com os critérios estabelecidos pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo, determinar a classe biofarmacêutica dos fármacos besilato de anlodipino, fluconazol e cloridrato de fluoxetina, por meio de testes de solubilidade e permeabilidade, de acordo com os critérios estabelecidos pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB).

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar os métodos para quantificação dos fármacos nos diferentes meios empregados no estudo de solubilidade;
- Realizar estudo de solubilidade dos fármacos, com determinação de sua solubilidade em diferentes meios;
- Desenvolver e validar métodos para a quantificação dos fármacos no meio empregado no estudo de permeabilidade;
- Determinar a permeabilidade dos fármacos em segmento intestinal de rato.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Medicamentos genéricos

A introdução de medicamentos genéricos no mercado farmacêutico é considerada uma política importante em países em desenvolvimento, por propiciar redução da dependência externa e dos preços e custos dos medicamentos. Trata-se de uma forma de regulação do mercado, em função da concorrência que se estabelece entre os genéricos e os medicamentos de marca ou inovadores (KING, 2002).

No Brasil, a política de medicamentos genéricos foi instituída em 1999, pela Lei nº 9.787, com o objetivo principal de melhorar o acesso da população a medicamentos de qualidade comprovada. De acordo com esta lei, o medicamento genérico é um “medicamento similar” a um produto de referência ou inovador, que pretende ser com este intercambiável, geralmente produzido após a expiração ou renúncia da proteção patentária ou de outros direitos de exclusividade, comprovada a sua eficácia, segurança e qualidade, e designado pela Denominação Comum Brasileira (DCB) ou, na sua ausência, pela Denominação Comum Internacional (DCI)” (BRASIL, 1999).

No Brasil, em 13 anos (1999-2012), os genéricos passaram a responder por 25,6% das vendas em unidades no conjunto do mercado farmacêutico. Em outros países como Espanha, França, Alemanha e Reino Unido, o mercado para os genéricos está mais consolidado e a porcentagem de participação desses medicamentos é de 31%, 42%, 66% e 60%, respectivamente. Nos Estados Unidos da América, país no qual o medicamento é comercializado por mais de 20 anos, o índice é de 60% de participação em volume de vendas no mercado farmacêutico. Os medicamentos genéricos são, oficialmente, no mínimo 35% mais baratos que os medicamentos de referência. Na prática, na venda ao consumidor são em média 50% mais baratos (PRÓ-GENÉRICOS, 2012).

Os genéricos estão ganhando mercado e têm contribuído para a redução dos custos dos tratamentos farmacológicos no Brasil. A política de genéricos além de disponibilizar medicamentos de qualidade e baixo custo, um dos seus objetivos também foi o de aumentar a concorrência no mercado farmacêutico do país, com isso possibilitou a redução dos preços dos medicamentos de marca e inovadores (ANVISA, 2009).

3.2 Estudos de Bioequivalência

A confiabilidade dos medicamentos genéricos é garantida por rígidos critérios de qualidade que são avaliados para que o medicamento seja disponibilizado no mercado. Estes critérios incluem a comprovação de sua eficácia terapêutica, segurança e intercambiabilidade em relação ao medicamento de referência, garantidas por meio da realização dos ensaios de equivalência farmacêutica (EF) e bioequivalência (BE) (BRASIL, 2006).

O ensaio de EF tem por objetivo comprovar que o medicamento genérico possui o mesmo fármaco que o medicamento de referência, nas mesmas dosagem e forma farmacêutica, além de cumprir com as mesmas especificações físicas e físico-químicas relativas ao controle de qualidade. Nos casos de produtos que são dispensados da comprovação da BE, como soluções injetáveis ou soluções orais é a EF que garante a intercambiabilidade entre o medicamento genérico e seu respectivo medicamento de referência (BRASIL, 2006).

O ensaio de BE é preconizado para medicamentos que não tem sua intercambiabilidade garantida apenas pelo ensaio de EF, como, por exemplo, os medicamentos administrados por via oral em suspensão ou em formas farmacêuticas sólidas. Segundo a resolução RDC nº 16, de 02 de março de 2007, que apresenta o regulamento técnico para registro de medicamentos genéricos, os estudos de BE são testes que visam comparar as biodisponibilidades de dois ou mais medicamentos administrados pela mesma via extravascular. Assim, produtos bioequivalentes são equivalentes farmacêuticos que, ao serem administrados na mesma dose molar e nas mesmas condições experimentais, não demonstram diferenças significativas na quantidade de fármaco absorvido e na velocidade do processo de absorção. Desta forma, a bioequivalência garante a eficácia terapêutica, a segurança e a intercambiabilidade entre medicamentos (BRASIL, 2007).

Os estudos de BE são geralmente realizados em voluntários sadios e consistem de três etapas:

Clínica: administração dos medicamentos candidatos a genérico e o de referência aos sujeitos do estudo, em períodos distintos, com a coleta de amostras de sangue ou outros líquidos biológicos em tempos determinados.

Analítica: quantificação do fármaco nas amostras por meio de método específico.

Estatística: cálculo dos parâmetros farmacocinéticos e análise estatística para determinar a bioequivalência ou a bioinequivalência entre os medicamentos avaliados.

Os testes de BE são realizados em centros habilitados e fiscalizados pela ANVISA, que, além de analisar os resultados dos testes, verifica se os estudos estão sendo conduzidos de acordo com os requisitos estabelecidos pela legislação (BRASIL, 2006).

Os estudos de BE são, em geral, onerosos e demorados, além de exporem os voluntários sadios a riscos advindos da utilização do medicamento e da retirada de amostras de sangue. Visando reduzir a necessidade deste tipo de estudo, diversas pesquisas vêm sendo realizadas com a finalidade de definir testes *in vitro* capazes de prever o comportamento *in vivo* dos medicamentos.

3.3 Sistema de Classificação Biofarmacêutica

O conceito da classificação biofarmacêutica estabelecida por AMIDON e colaboradores (1995) permitiu a correlação entre dados de dissolução *in vitro* e a biodisponibilidade *in vivo* de formulações farmacêuticas de liberação imediata, baseando-se em critérios de solubilidade e permeabilidade do fármaco. De acordo com este conceito, os parâmetros solubilidade e permeabilidade são os principais fatores que controlam a extensão e a velocidade de absorção de fármacos (AMIDON, *et al.*, 1995).

O FDA lançou, no ano 2000, o guia “Guidance for Industry: Waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on biopharmaceutics classification system”, para bioisenção, baseado no SCB (FDA, 2000).

Segundo o SCB, os fármacos podem ser divididos em quatro classes (Figura1), de acordo com suas características de solubilidade e permeabilidade (AMIDON *et al.*, 1995):

Classe I: fármacos de alta permeabilidade e alta solubilidade (AP-AS): estes fármacos são rápida e completamente absorvidos, com extensão de absorção maior que 90 %. Contudo, a biodisponibilidade sistêmica destes pode ser

limitada devido à biotransformação pré-sistêmica. O passo limitante para a absorção de fármacos desta classe é a velocidade de dissolução ou, caso esta seja muito alta, a velocidade de esvaziamento gástrico.

Classe II: fármacos de alta permeabilidade e baixa solubilidade (AP-BS): para os fármacos desta classe, a dissolução no trato gastrointestinal é a etapa limitante para o processo de absorção. A variabilidade na absorção destes fármacos pode ser consequência de diferenças entre formulações ou de variáveis fisiológicas, como variação de pH no TGI, que podem influenciar o processo de cedência dos mesmos a partir da forma farmacêutica.

Classe III: fármacos de baixa permeabilidade e alta solubilidade (BP-AS): a permeação do fármaco através da membrana intestinal é a etapa limitante no processo de absorção de fármacos pertencentes a esta classe. A velocidade e extensão de absorção deste grupo de fármacos podem ser altamente variáveis devido à influência de trânsito gastrointestinal, conteúdo luminal e permeabilidade da membrana, e não apenas em função de diferenças de formulação.

Classe IV: fármacos de baixa permeabilidade e baixa solubilidade (BP-BS): são fármacos que possuem alta variabilidade na velocidade e extensão de absorção. Desse modo, possuem absorção ruim, sendo problemáticos para utilização oral.

Figura 1 – Classes de fármacos de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (Adaptado de AMIDON *et al*, 1995).

3.4 Solubilidade

3.4.1 Dissolução e solubilidade

Os fármacos sólidos precisam ser dissolvidos para que possam ser absorvidos.

No caso de fármacos que sejam eletrólitos fracos, a solubilidade em meio aquoso é dependente do pH. Por esse motivo, para formas farmacêuticas sólidas administradas oralmente e que contém eletrólitos fracos, a velocidade de dissolução do fármaco será determinada pela sua solubilidade e pelo pH do local do trato gastrointestinal. Assim, podem-se esperar velocidades de dissolução diferenciadas em função da variação de pH ao longo do trato gastrointestinal (TGI) conforme ilustrado na Figura 2. A solubilidade de fármacos fracamente ácidos cresce com o aumento do pH, pois em um alto pH o fármaco estará na sua forma ionizada, de modo que, conforme o fármaco percorre o trato gastrointestinal, do estômago para o intestino a sua solubilidade aumentará. De modo contrário, a solubilidade de bases fracas diminui à medida que aumenta o pH. Portanto, para o caso de bases fracas, pouco solúveis, é importante que dissolvam rapidamente no estômago, considerando que a sua velocidade de dissolução no intestino será muito mais lenta (KANFER, 2002).

Figura 2 – Representação da variação do pH e do tempo de residência dos fármacos e alimentos no TGI (adaptado de VILLANOVA *et al.*, 2010).

3.4.2 Estudos de solubilidade

A solubilidade de qualquer substância pode ser definida como a quantidade desta que foi dissolvida quando for atingido o equilíbrio entre a solução e o excesso (substância não dissolvida) a uma dada temperatura e pressão (GOTHOSKAR, 2010).

Segundo o SCB, um fármaco é considerado altamente solúvel quando a quantidade da maior dosagem disponível no mercado é solúvel em 250 mL ou menos de meio aquoso em uma faixa de pH específico (FDA, 2000; WOLRD HEALTH ORGANIZATION, 2000). O volume de 250 mL foi estabelecido baseando-se no volume mínimo esperado no estômago de um voluntário, em jejum, submetido a um estudo de BE, cujo protocolo recomenda a administração da forma farmacêutica com um copo de água (FDA, 2000).

De acordo com o FDA, o perfil de solubilidade do fármaco deve ser determinado a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ em meios aquosos com pH na faixa de 1-7,5; já para a ANVISA, a OMS e a agência reguladora européia, a European Medicines Agency (EMA), a faixa de pH no qual o experimento deve ser realizado é de 1,2-6,8 (FDA, 2000; WOLRD HEALTH ORGANIZATION, 2000; EMA, 2007; BRASIL, 2011).

Um número suficiente de condições de pH devem ser avaliadas para definir com precisão o perfil de solubilidade em uma faixa de pH. O estudo deve ser realizado em triplicata em cada condição de pH para prever a solubilidade exata do fármaco em análise. As soluções tampão descritas em farmacopéias são consideradas apropriadas para uso em estudos de solubilidade. Outros métodos além do método de *shake flask* também podem ser usados, desde que adequadamente justificados. Se a degradação do fármaco é observada em função da composição do tampão e / ou do pH, esse fato deve ser levado em consideração. A concentração do fármaco nos tampões selecionados e nas diversas condições de pH deve ser determinada por meio de método analítico bem desenvolvido e validado (FDA, 2000).

3.5 Absorção dos fármacos

3.5.1 Principais vias de absorção de fármacos

O transporte de fármacos através do epitélio intestinal pode ocorrer por um ou mais dos seguintes mecanismos (Figura 3) (GONÇALVES *et al.*, 2009):

- Transporte passivo paracelular;
- Transporte passivo transcelular;
- Transporte mediado por carreadores no sentido absorptivo ou secretório;
- Transporte por vesículas.

Figura 3- Mecanismos de transporte através da membrana intestinal: a) permeabilidade passiva transcelular; b) transporte mediado por carreadores de membrana; c) permeabilidade passiva paracelular; d) transporte vesicular. Nas letras (e) e (f) estão representados dois mecanismos que impedem a absorção intestinal, sendo e) transporte mediado por carreadores de excreção e em f) enzimas metabolizadoras (adaptado GONÇALVES *et al.*, 2009).

3.5.1.1 Transporte passivo paracelular

O transporte paracelular ocorre pela passagem do fármaco através dos espaços intercelulares. Ocorre para fármacos com caráter hidrofílico e de baixo peso molecular e tamanho pequeno a moderado da molécula (KARLSON *et al.*, 1999; ARTURSSON *et al.*, 1993).

Devido à presença de junções intercelulares (*tight junctions*) e essas junções serem reduzidas 0,8 nm (jejuno humano) e 0,3 nm (cólon humano), apenas moléculas pequenas, de baixo peso molecular, hidrofílicas, e polares são capazes de atravessar a camada epitelial através dessas junções (transporte paracelular). Os poros intercelulares representam apenas 0,01 a 0,1 % da área absorptiva total do intestino. Assim, devido à superfície limitada, a via paracelular geralmente resulta em baixa absorção oral, e fármacos que utilizam exclusivamente esta via, apresentam absorção incompleta (ARTURSSON *et al.*, 1993; PADE, V. ; STAVCHANSKY, S., 1997).

3.5.1.2 Transporte passivo transcelular

Essa via é caracterizada pela passagem do fármaco através da membrana celular sem gasto energético. Este transporte é determinado pelas características biofísicas da membrana como a fluidez, caráter hidrofílico ou lipofílico da membrana. A membrana celular é composta de lipídios e proteínas em proporções variadas dependendo de cada espécie e tipo celular (NELSON, COX, 2006).

Como a membrana celular tem um caráter predominante lipofílico, fármacos lipofílicos tem essa via como a sua principal forma de absorção. A taxa de transporte através do epitélio depende do gradiente de concentração e das características de permeação da substância (ARTURSSON, 2001).

Muitos estudos sugerem que a maioria dos fármacos que apresentam absorção completa são absorvidos pela via transcelular (STENBERG, *et al.*, 2000).

3.5.1.3 Transporte mediado por carreadores

A maioria dos fármacos são absorvidos pelas vias passivas de difusão (transcelular e paracelular). Apesar disso, estudos recentes sugerem que fármacos que são transportados ativamente mediante carreadores possui grande impacto na sua absorção. Atualmente, um crescente número de transportadores tem sido identificado.

O transporte mediado por carreadores é saturável podendo, portanto, resultar em farmacocinética não linear para fármacos permeados exclusivamente por um único tipo de transportador. Para prevenir a entrada de compostos indesejáveis ao organismo, os transportadores apresentam especificidade ao substrato. Entretanto, esta pode não ser absoluta e estar disponível para um limitado número de fármacos e nutrientes com estruturas semelhantes (GANAPATHY *et al.*, 1998). Existem vários tipos de transportadores que promovem a entrada de fármaco no organismo, representados no Quadro 1 com seus respectivos substratos.

Assim como existem transportadores que proporcionam a entrada de fármacos no organismo, há aqueles que podem dificultar a sua absorção por um tipo de transporte especializado e responsável pela secreção ativa, onde ocorre o transporte da substância da mucosa para o lúmen intestinal. Tal mecanismo é denominado de múltipla resistência aos fármacos, do inglês, *multidrug resistance* (MDR) (BENET, *et. al.*, 2004). O mecanismo de sistema secretório melhor estudado é o da glicoproteína-P (Pgp) que é uma bomba de efluxo que consome ATP, super-expressa no trato gastrointestinal, e que atua sobre múltiplos fármacos (DI PIETRO *et al.*, 1999).

Quadro 1 - Principais famílias de transportadores encontradas no epitélio intestinal

Família de transportador	Gene decodificador	Substratos
Transportador ABC Família MDR (MDR1) Família MRP (MRP2, MRP3)	ABCB ABCC	Compostos hidrofóbicos, fármacos antineoplásicos, digoxina, imunossupressores conjugados aniônicos, agentes antineoplásicos, estatina, valaciclovir.
Transportador de ácidos monocarboxílico Família MCT (MCT1)	SCL 16	Ácido láctico, ácido salicílico.
Transportador de ânions orgânicos Família dos OATP (OATP-C, etc.).	SCL 21	Ácido taurocólico, estradiol 17 β -glucoronídeo, tiroxina, pravastatina.
Transportador de íons orgânicos Família OAT (OAT1, OAT3) Família OCT 1, ACT2 Família OCTN (OCTN1, OCTN2)	SCL 22	Ácido p-aminohipúrico, antibióticos β lactâmicos, metotrexato, cimetidina, tetrametilamônio, colina, dopamina, 1-metil-4-fenilpiridina, cimetidina, L-carnitina, tetrametilamônio, valproato, verapamil.
Transportador de nucleosídeos Família dos CNT (CNT1, CNT2). Família dos ENT (ENT1, ENT2).	SCL 28 SCLE 29	Purina, nucleosídeos piridínicos e derivados nucleosídeos.

Fonte: TSUJI e TAMAI, 1996, modificado.

3.5.1.4 Transporte vesicular

Transporte vesicular ou endocitose é o processo pelo qual as células absorvem ativamente materiais através das membranas celulares por meio de formação de vesículas (MANDARA & TRIER, 1994).

É uma forma de transporte na qual o nutriente ou fármaco é transportado através do enterócito por vesículas pequenas. Proteínas pequenas e os nucleotídeos são absorvidos principalmente por essa via (TUKKER, 2000).

Existem três formas principais de endocitose:

- Fagocitose: ocorre através de expansões citoplasmáticas chamadas pseudópodos que englobam as partículas ou células;
- Pinocitose: são formadas pequenas vesículas que irão promover a ingestão de fluidos e moléculas;
- Endocitose mediada por um receptor: ocorre a ligação de uma molécula extracelular a um receptor na membrana celular. Quando um receptor se liga à molécula, forma-se uma depressão que aumenta até se formar um vacúolo, que entra na célula. Esse mecanismo é geralmente relevante para a permeação de macromoléculas pela mucosa (MANDARA & TRIER, 1994).

3.6 Permeabilidade

A permeabilidade refere-se à capacidade de passagem do fármaco através da parede do TGI humano. Fármacos de alta permeabilidade são, geralmente, aqueles estáveis nas condições do trato gastrointestinal e que apresentam biodisponibilidade absoluta maior que 90 % (BRASIL, 2003).

A determinação da permeabilidade dos fármacos através de membranas do TGI contribui para a previsão de sua biodisponibilidade.

Os principais métodos rotineiramente utilizados na determinação da permeabilidade são (FDA, 2000):

- Estudos farmacocinéticos em seres humanos, incluindo estudos de balanço de massas e biodisponibilidade absoluta, métodos de permeabilidade intestinal;
- Perfusão intestinal *in vivo* (LOC-I-Gut) ou *in situ* em um modelo animal adequado;
- Métodos de permeabilidade *in vitro* usando segmentos intestinais de animais;
- Estudos com monocamadas de células epiteliais como Caco-2.
- Métodos *in silico*

Existem vários modelos *in vitro* que possibilitam determinar a permeabilidade aparente (Papp), que é a que avalia a absorção de fármacos no intestino (MAKHEY *et al.*, 1998; LUO *et al.*, 2002; MARIAPPAN *et al.*, 2004). Os primeiros experimentos neste sentido utilizaram tecidos e segmentos de intestino de diferentes espécies animais (BALIMANE *et al.*, 2000; PUTNAM *et al.*, 2002).

3.6.1 Estudos de permeabilidade *in vitro* com tecidos animais

O método de avaliação da permeabilidade de fármacos em segmentos intestinais consiste na determinação do fluxo do fármaco através de segmento intestinal animal de tamanho apropriado, isolado e contido em equipamento adequado para o teste. A permeabilidade é baseada no aparecimento do fármaco no lado seroso (apical) e desaparecimento do lado mucoso (basolateral) do epitélio intestinal. Para avaliar a integridade da membrana é medida a resistência elétrica transepitelial antes e durante e ao fim do experimento (GRASS, SWEETANA, 1989; MENON, BARR, 2003).

Os modelos utilizando tecido animal para avaliar a permeabilidade intestinal são empregados desde 1950 e, em geral, apresentam constituição semelhante à do epitélio intestinal humano, embora algumas diferenças possam ser observadas de acordo com a espécie em estudo (BALIMANE *et al.*, 2000; ATISOOK *et al.*, 1990; KARASOV *et al.*, 1991; LABOISSE *et al.*, 1994).

Dentre os tecidos animais, o de porco é o que possui maiores similaridade anatômicas e fisiológicas com o humano, porém, não é muito

utilizado devido à dificuldade de aquisição. (HOSSAIN *et al.*, 1990; PIETZONKA *et al.*, 2002). Outra restrição para a utilização deste modelo é a dificuldade em obter tecidos viáveis, ou que se mantenham adequados durante os experimentos, uma vez que necessitam de sangue e oxigenação constantes (PIETZONKA *et al.*, 2002).

3.6.2 Principais métodos para avaliar a permeabilidade de fármacos

3.6.2.1 Métodos *in situ*

Os métodos de perfusão intestinal têm sido utilizados ao longo dos anos. De certa forma os métodos *in situ* oferecem vantagens sobre os métodos *in vitro* pelo fato de, durante o experimento, manterem o animal (rato) vivo. Dessa forma as funções vitais do animal como suprimentos de sangue, sistema endócrino e mesentérico estão intactas simulando as condições reais que ocorrem no processo de absorção dos fármacos (PARVIN *et al.*, 2007).

O uso da técnica *in situ* tem sido bastante útil na pesquisa para a investigação de mecanismos de transporte intestinal e de metabolismo dos fármacos. O método de avaliação da permeabilidade *in situ*, vem sendo bastante utilizado devido ao seu baixo custo, e relativa simplicidade das técnicas cirúrgicas para a sua realização. Na técnica cirúrgica, a cavidade abdominal do animal anestesiado é exposta por laparotomia. O segmento intestinal em que o fármaco é introduzido pode ser 'fechado' ou 'aberto' (KIM *et al.*, 2006).

O principal modo que é o “aberto” (open loop), originalmente proposto por Higuchi e colaboradores (1977), a solução do fármaco em estudo é colocada em um fluxo contínuo com o auxílio de uma bomba peristáltica em uma região específica do intestino, geralmente o jejuno, que foi previamente seccionada e canulada e a solução perfundida é coletada de tempo em tempo, desta forma, a permeabilidade intestinal é estimada pelo balanço de massas através da diferença de concentração entre a solução que foi colocada inicialmente e a solução que foi coletada após a perfusão (HIGUCHI *et al.*, 1977; PARVIN *et al.*, 2007).

O uso do método *in situ* é limitado, pois é baseado apenas no desaparecimento do fármaco do lúmen intestinal como indicativo da absorção, sem levar em conta que o fármaco pode ter ficado retido no segmento intestinal (BALIMANE *et al.*, 2000).

A principal vantagem do método é que ele é o que mais se assemelha as condições *in vivo* e que durante os experimentos de avaliação da absorção intestinal não ocorre influência do metabolismo hepático (KEYKO *et al.*, 2003)

3.6.2.2 Métodos *in silico*

Como a maioria dos fármacos são absorvidos por difusão passiva, informações relevantes a respeito da permeabilidade através do epitélio do TGI podem ser obtidas a partir de experimentos realizados sem emprego de materiais vivo. Estes métodos baseiam-se em nos parâmetros físico-químicos de um fármaco como sua solubilidade, peso molecular, carga e polaridade de superfície e flexibilidade conformacional, assim como coeficientes de partição ($\log P$) ou coeficiente de distribuição ($\log D$), que se referem à partição da substância a partir de uma fase aquosa para uma fase lipídica (BURTON, *et al.*, 1996; WILS, *et al.*, 1994; PALM, *et al.*, 1997; CAMENISCH, *et al.*, 1998; AVDEEF, 2001).

Propriedade farmacocinética, como a absorção, pode ser estudada através de métodos como os de estudos das relações quantitativa entre a estrutura e atividade (QSAR). O QSAR é uma tecnologia que gera descritores baseados em estruturas moleculares, como as citadas anteriormente, e usa algoritmos computacionais para relacionar os descritores principais com o valor da propriedade em interesse (AVDEEF, 2001).

O modelo é eficiente para prever a permeabilidade de um fármaco que passe através da membrana por difusão passiva, caso o fármaco seja absorvido por algum tipo de transportador ou sofra um transporte de efluxo o método deixa de ser eficiente, pois os marcadores moleculares não conseguem prever esses tipos de eventos (BERESFORD *et al.*, 2002)

Os modelos *in silico* possuem uma grande vantagem em comparação com os ensaios experimentais tradicionais, porque possuem uma aplicabilidade

maior para atender a demanda gerada pela triagem de novas moléculas em larga escala. Além disso, os ensaios *in vivo* e *in vitro* são complexos e dispendiosos em termo de materiais, infraestrutura e pessoal qualificado (EKINS *et al.*, 2005; ROSE, STEVENS, 2003).

3.6.2.3 Métodos *in vitro*

3.6.2.3.1 Ensaio de permeabilidade com membranas paralelas artificiais (PAMPA)

Método que foi inicialmente introduzido por KANSY e colaboradores (1998). É um método que emprega membranas sintéticas constituídas de fosfolipídios, principalmente fosfaditilcolina e fosfaditiletonolamina (DUDEJA, *et al.*, 1991; TAILLARDAT-BERTSCHINGER, *et al.*, 2002).

A formação da bicamada lipídica ocorre pelo emprego de uma solução de dodecano impregnada entre duas membranas semipermeáveis com espessura e dimensão de poros bem estabelecidos, formando, dessa forma, dois compartimentos: o doador, onde é adicionado em solução do fármaco em teste e o receptor, onde se quantifica a fração do fármaco que foi capaz de atravessar a bicamada lipídica formada. Por esta técnica é possível determinar a interação do fármaco com a camada bilipídica por meio de sua transição de um meio aquoso para um lipídico, o que simula as características de uma membrana celular. Este método é muito utilizado para avaliar a permeabilidade transcelular passiva, principalmente nos estágios iniciais de desenvolvimento de um fármaco (OLLILA, *et al.*, 2002; YEN, *et al.*, 2001; LIU, *et al.*, 2002).

3.6.2.3.2 Células Caco-2

As células Caco-2 são oriundas de um adenocarcinoma de colón humano e foram primeiramente isoladas e cultivadas *in vitro* em 1977 por FOGH e colaboradores (FOGH, *et al.*, 1977).

Existem vários modelos celulares de monocamada que são frequentemente utilizados para a avaliação da permeabilidade de fármacos. As células Caco-2 a partir da década de 1980, tornaram-se uma promissora

ferramenta nos estudos de avaliação das funções das células intestinais por apresentarem peculiaridades interessantes, como uma maior semelhança com os enterócitos, em relação aos outros tipos celulares até então disponíveis. É atualmente o modelo celular mais empregado para investigar os processos de absorção intestinal *in vitro* (BALIMANE & CHONG, 2005).

As células Caco-2 apresentam uma capacidade de diferenciação espontânea quando em cultivo *in vitro* expressando muitas características morfológicas e bioquímicas presentes no intestino delgado humano (ARTURSSON, 1997).

Mantidas as condições adequadas de cultivo, as células Caco-2 crescem formando uma monocamada de células cilíndricas e polarizadas, com microvilosidades na borda apical, apresentando, ainda, as junções oclusivas entre as células adjacentes comuns no intestino delgado (PINTO, *et al.*, 1983). Para se manter as condições mais próximas possíveis das encontradas no intestino *in vivo* as células Caco-2 são cultivadas em suporte de filtros permeáveis que mantém o livre acesso de íons e nutrientes presentes nos meios de cultivo, em ambos os lados da membrana que está em processo de formação (ARTURSSON, 1997).

O ensaio de permeabilidade com células Caco-2 é geralmente realizado com placas Transwell (Figura 4). O dispositivo Transwell contém dois compartimentos: um doador e um receptor. O compartimento doador apical contém uma membrana porosa que suporta o crescimento da monocamada Caco-2. As células Caco-2 são semeadas sobre a membrana porosa e após um período e condições específicas ocorre a formação de um “tapete” de células. Durante o experimento para avaliação da permeabilidade o composto em teste é adicionado ao compartimento doador e de tempos em tempos até um período de 2 horas são realizadas as coletas das frações permeadas no compartimento receptor para posterior quantificação do composto em estudo (GINSK & POLLI, 1999).

A figura 4 representa o cultivo das células Caco-2 em suporte permeável para a realização dos experimentos de permeabilidade.

Figura 4 - Esquema do suporte de cultivo de células Caco-2 empregado nos estudos de permeabilidade (GONÇALVES *et al.*, 2009).

Com o modelo de absorção com células Caco-2 nos testes de permeabilidade pode-se: obter informação rápida sobre a permeação de fármacos em desenvolvimento, direcionando as alterações das características físico-químicas responsáveis pela absorção; estudar as funções das células epiteliais do intestino; investigar estratégias de formulações com o intuito de melhorar a permeabilidade do fármaco através da membrana; investigar o potencial efeito tóxico de determinados compostos ao epitélio intestinal e caracterizar possíveis interações entre fármacos envolvendo o processo de absorção (SOUZA *et al.*, 2007; GERSHANIK *et al.*, 2000; GINSK & POLLI, 1999).

Assim como os outros métodos, o emprego das células Caco-2 para avaliar a permeabilidade possui algumas limitações que são descritas a seguir:

- 1) O reduzido número de transportadores como peptídeos e da glicoproteína P (PgP) (CHONG, *et al.*, 1996).
- 2) A baixa permeabilidade dos compostos hidrofílicos com baixo peso molecular pelo fato de as suas junções intercelulares serem mais coesas em relação aos outros métodos *in vitro*, que acaba dificultando o transporte paracelular, via preferencial para a absorção de compostos hidrofílicos de baixo peso molecular (BALIMANE, *et al.*, 2000).
- 3) A presença de co-solventes como metanol, propilenoglicol e polietilenoglicol pode danificar a membrana.
- 4) A aderência física do fármaco no filtro de polycarbonato, apresentando reduzida permeação, principalmente para aqueles que possuem alta lipofilicidade.
- 5) Elevado tempo de crescimento e

diferenciação das células Caco-2, que é em torno de 21 dias (BALIMANE, *et al*, 2000).

As células Caco-2 são empregadas mais eficientemente na caracterização da permeabilidade de compostos absorvidos passivamente pela via transcelular, uma vez que apresentam variações bastante discutidas quanto à expressão de carreadores do transporte de membranas (BALIMANE, 2005).

3.6.2.3.3 Método *in vitro* com tecidos animais

3.6.2.3.3.1 Câmaras de Ussing

A técnica da Câmara de Ussing foi desenvolvida por Ussing e Zerahn (1951) e desde então tem sido usado com frequência em estudos farmacológicos e da fisiologia do transporte de água e íons (USSING, ZERAHN, 1951).

Nos últimos anos o sistema *in vitro* das Câmaras de Ussing usando segmento intestinal de animais, principalmente de ratos, montados em células de difusão vem ganhando popularidade para avaliar as características de absorção de novos fármacos.

O método utiliza segmentos intestinais excisados, que são montados entre dois compartimentos, um doador e outro receptor, da célula de difusão (UNGELL, A. L, 1997). Para manter a viabilidade da membrana, no lado mucoso e no seroso, normalmente é fornecido Tampão Krebs-Ringer bicarbonato, que pode ser suplementado com adição de outros elementos, incluindo glicose, glutamato, fumarato, e piruvato (DEFERME, *et al.*, 2002). Durante o experimento, no lado mucoso, a solução tampão é continuamente borbulhada com uma mistura de oxigênio e gás carbônico (95:5, O₂: CO₂) para fornecer a tensão de oxigênio suficiente para manter a viabilidade do tecido (GINSK, M. J. & POLLI, J. E, 1999).

Para realização do experimento, a solução do fármaco em teste é adicionada no compartimento doador da câmara e de tempos em tempos é realizada a coleta no compartimento receptor, com reposição do meio utilizado no estudo de permeabilidade. A solução coletada posteriormente é quantificada para avaliar a permeabilidade do composto (UNGELL, *et al.*, 1997). A

viabilidade e a integridade da membrana (tecido intestinal) podem ser monitoradas tanto pela medida da resistência elétrica transepitelial (RET) quanto empregando padrões de baixa permeabilidade como manitol, inulina, fluoresceína sódica, e PEG-400 (POLENTARUTTI, *et al.*, 1999). Estudos demonstram que a membrana intestinal permanece viável num período de 120 minutos. A avaliação da RET do segmento intestinal em estudo antes do início dos experimentos de transporte é uma estratégia comum para garantir a qualidade suficiente do tecido e para reduzir a variabilidade (LENNERNAS, *et al.*, 1997; UNGELL, *et al.*, 1998; DEFERME, *et al.*, 2002; TSUTSUMI, *et al.*, 2003).

A principal vantagem da técnica das Câmaras de Ussing é que ela pode ser utilizada para fins múltiplos, como mostrado por vários exemplos na literatura: 1) A técnica permite determinar o transporte do fármaco transepitelial em combinação com o metabolismo intestinal; 2) para estudar as diferenças regionais do trato gastrointestinal em relação à absorção intestinal; 3) Para estudar diferenças entre espécies na absorção intestinal; 4) têm sido utilizados para avaliar o papel dos transportadores de fármacos na absorção intestinal e verificar a funcionalidade de vários transportadores de efluxo incluindo P-gp e transportadores de cátions orgânicos (NARUHASHI *et al.*, 2001; DEFERME *et al.*, 2002; SHEN, *et al.*, 2006).

A principal desvantagem do sistema é a subestimação possível do transporte do fármaco através do tecido animal devido à retenção do composto na membrana, o que ocorre geralmente com compostos lipofílicos (YAMASHITA, S., 1997).

O modelo utilizado no presente trabalho é uma adaptação do método de Ussing Chamber, porém utilizando uma plataforma de Células de Franz. No modelo de Ussing Chamber o transporte do fármaco ocorre na horizontal já na plataforma de Células de Franz o transporte através da membrana ocorre no sentido vertical como demonstrado nas figuras 5 e 6.

Câmara de Ussing

Figura 5 – Esquema das Câmaras de Ussing (WPI, 2012).

Figura 6 - Célula de Franz (PERMEGEAR, 2012).

3.7 Bioisenção

As principais agências regulatórias mundiais como FDA e EMA, além da OMS, têm avaliado a possibilidade de isentar de ensaios de BE aqueles medicamentos que se apresentam em formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata, contendo fármaco Classe I do SCB, com rápida dissolução *in vitro*. Nestes casos, testes *in vitro* seriam suficientes para garantir a intercambiabilidade com o medicamento de referência (FDA, 2000)

A FDA prevê a bioisenção somente para fármacos de Classe I. Para a EMA além dos fármacos classe I a bioisenção é possível para os de classe III, desde que a dissolução *in vitro* seja muito rápida (85% em 15 minutos em pH 6,8). A OMS além de prever a bioisenção para medicamentos contendo fármacos de Classe I e III considera esta possibilidade também para medicamentos contendo fármacos Classe II, desde que sejam ácidos fracos

com alta solubilidade e alta taxa de dissolução em pH 6,8 (DRESSMAN *et al.*, 2006).

A ANVISA após colocar em consulta pública o Guia para isenção e substituição de estudos de BE, publicou em agosto de 2011 a Resolução – RDC N° 37 que dispõe sobre o Guia para isenção e substituição de estudos de BD relativa/ BE. Diferentemente das outras agências regulatórias descritas anteriormente, a agência brasileira publicou uma lista de fármacos passíveis de bioisenção. Os fármacos foram escolhidos com base em alguns critérios como: alta permeabilidade intestinal; ampla faixa terapêutica; ausência de evidências documentadas de bioinequivalência, e classificados como fármacos de classe I, baseados no SCB. Para a requisição de bioisenção de medicamentos contendo os fármacos do Quadro 2, a indústrias devem apresentar estudos de solubilidade para comprovar a alta solubilidade dos fármacos. O assim como a EMA e a WHO para a ANVISA o fármaco será considerado de alta solubilidade quando sua maior dosagem solubiliza-se completamente em até 250 mL de cada uma das soluções tampão utilizadas dentro da faixa de pH fisiológico (1,2 a 6,8), a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Para avaliar a forma farmacêutica deve ser realizado também o estudo de dissolução com os seguintes meios de dissolução: pH 1,2 (0,1 M HCl ou líquido gástrico simulado sem enzimas), pH 4,5 e pH 6,8 (ou líquido intestinal simulado sem enzimas) (ANVISA, 2011).

Quadro 2 - Fármacos candidatos à isenção dos estudos de BE

I – ácido acetilsalicílico; II – cloridrato de propranolol; III – cloridrato de doxiciclina; IV – dipirona; V – estavudina; I – fluconazol; VII – isoniazida; VIII – levofloxacino; IX – metoprolol; X – metronidazol; XI – paracetamol; XII – sotalol.
--

Fonte: ANVISA, 2011

Atestando a importância que o tema assumiu atualmente, a Federation International Pharmaceutical (FIP) criou um programa para elaboração de monografias de bioisenção para fármacos da lista de medicamentos essenciais da OMS, as quais vêm sendo publicadas no Journal of Pharmaceutical Sciences. As monografias mencionadas são revisões da literatura que reúnem e organizam dados sobre a solubilidade, farmacocinética, permeabilidade, dissolução das formulações disponíveis, usos terapêuticos e janela terapêutica do fármaco, efeitos da formulação (excipientes) e problemas relacionados à biodisponibilidade e bioequivalência e classificando-os de acordo com o SCB. Como os dados não são publicados por um órgão oficial, as monografias não possuem um aspecto regulatório, porém reúnem as melhores opiniões científicas da área. As mesmas estão disponíveis no site da FIP. Dentre os 124 fármacos considerados de interesse pela FIP, 36 já tem sua monografia publicada, com a descrição das características de permeabilidade e solubilidade e discussão sobre a possibilidade ou não de bioisenção (FIP, 2012).

3.8 Fármacos utilizados nos estudos

Os fármacos avaliados no presente estudo foram besilato de anlodipino, cloridrato de fluoxetina e fluconazol, selecionados em função de sua ampla utilização para tratamento de importantes problemas de saúde da população. Estes fármacos estão incluídos na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME), na lista de medicamentos essenciais da OMS e na lista de fármacos considerados pela FIP como de interesse para elaboração de monografia de bioisenção (BRASIL, 2008; FEDERATION INTERNATIONAL PHARMACEUTICAL, 2010; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

3.8.1 Besilato de anlodipino

O besilato de anlodipino (Figura 7, Quadro 3) é um fármaco de primeira linha no tratamento da hipertensão, podendo ser utilizado na maioria dos pacientes como agente único de controle da pressão sanguínea. Pacientes que não são adequadamente controlados com um único agente anti-hipertensivo podem ser beneficiados com a adição de anlodipino, que tem sido utilizado em combinação com diuréticos tiazídicos alfa-bloqueadores, agentes β -bloqueadores adrenérgicos ou inibidores da enzima conversora da angiotensina. O anlodipino é um inibidor do influxo de cálcio e inibe o influxo transmembrana do íon cálcio no interior dos músculos cardíacos e liso. O mecanismo de ação se dá através do efeito relaxante direto na musculatura vascular lisa, que ocasiona dilatamento das arteríolas periféricas, redução da resistência periférica total contra o trabalho cardíaco e diminuição da pressão arterial (RIENZO, 2009).

Figura 7 - Estrutura química do anlodipino (FMRP, 2012).

Quadro 3 - Principais características do besilato de anlodipino

Nome químico	(4R,S)-3-etil-metil-2-(2-amino-etóxi-metil)-4-(2-clorofenil)1,4-diidro-6-metil piridino 3,5 dicarboxilato monobenzeno sulfonato (1)
Registro no Chemical Abstracts Service (CAS)	111479-99-6 (1)
Fórmula molecular	C ₂₆ H ₃₁ ClN ₂ O ₈ S (1)
Peso molecular	567,1g/mol (1)
Ponto de fusão	203°C (1)
Apresentação e solubilidade	Pó branco, pouco solúvel em água e 2-propanol, solúvel em metanol e em etanol (3)
Solubilidade em água	0,75 mg/mL (1)
pKa	8,9 (2)
Log P	1,9 (1)
Biodisponibilidade	64-94% (1)

Fonte. (1) DRUGBANK, 2012b (2) MERCK & COMPANY INCORPORATED, 2010; (3) USP, 2010.

3.8.2 Cloridrato de fluoxetina

A fluoxetina (Figura 8, Quadro 4) é um fármaco antidepressivo da classe dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina. Atua corrigindo as concentrações inadequadas de serotonina no cérebro, responsáveis pelos sintomas na situação de doença. É biotransformada por desmetilação, originando a norfluoxetina, composto também ativo. Não exibe efeitos anticolinérgicos e hipotensores como os antidepressivos tricíclicos, pois não bloqueia os receptores muscarínicos, serotoninérgicos, dopaminérgicos, histaminérgicos e adrenérgicos. Devido à sua importância farmacológica e terapêutica, além de relativa ausência de reações adversas graves e baixo potencial de abuso, a fluoxetina tornou-se um dos antidepressivos mais utilizados no tratamento de alguns transtornos neurológicos. Suas principais indicações são para uso em depressão moderada a grave, transtorno obsessivo compulsivo (TOC) e bulimia nervosa. É utilizado na forma de cloridrato de fluoxetina, como cápsulas ou em solução oral (SUAREZ,2009).

Figura 8 - Estrutura química da fluoxetina (NETDRUGS, 2012).

Quadro 4 - Principais características do cloridrato de fluoxetina

Nome químico	Cloridrato de (±)- <i>N</i> -metil-[4-(trifluorometil) fenoxi] benzeno propanamina (1)
Registro no Chemical Abstracts Service (CAS)	54910-89-3 (1)
Fórmula molecular	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO.HCl (1)
Peso molecular	345,79 g/mol (1)
Ponto de fusão	158,4 – 158,9°C (1)
Apresentação e solubilidade	Ligeiramente solúvel em água, facilmente solúvel em etanol, praticamente insolúvel em éter etílico (3)
Solubilidade em água	30 mg/mL (2)
pKa	8,7 (4)
Log P	1,98 (5)
Biodisponibilidade	60-80% (1)

Fonte: (1) DRUGBANK, 2012a (2) KASSIN, *et. al.*, 2003; (3) USP, 2010; (5) KRISTENSEN, *et. al.* 1999.

3.8.3 Fluconazol

O fluconazol (Figura 9, Quadro 5) é muito utilizado em pacientes imunocomprometidos ou imunodeprimidos para tratamento de infecções fúngicas oportunistas. Pertence a um grupo de agentes fungistáticos sintéticos com amplo espectro de atividade, os azóis, sendo descrito como um bistriazol fluorado e hidrossolúvel. De modo geral, o mecanismo de ação deste grupo de medicamentos se dá por inibição das enzimas P450 fúngicas responsáveis pela síntese do ergosterol, o principal esterol encontrado na membrana das células fúngicas. A conseqüente depleção de ergosterol altera a fluidez da membrana, interferindo na ação das enzimas associadas a ela. O efeito global consiste em inibição da replicação do microorganismo. O fluconazol pode ser administrado por via oral ou por via intravenosa e em ambos os casos as

concentrações plasmáticas do fármaco apresentam-se essencialmente idênticas (RANG *et al.*, 2001).

Figura 9 - Estrutura química do fluconazol (PFIZER, 2012).

Quadro 5 - Principais características do fluconazol

Nome químico	2-(2,4-difluorophenyl)-1,3- <i>bis</i> (1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ol (1)
Registro no Chemical Abstracts Service (CAS)	86386-73-4 (1)
Fórmula molecular	C ₁₃ H ₁₂ F ₂ N ₆ O (1)
Peso molecular	306.27 g/mol (1)
Ponto de fusão	138 a 140° C (1)
Apresentação e solubilidade	É um cristal branco, solúvel em água (2)
Solubilidade em água	8,0 mg/mL (4)
pKa	2,0 (2)
Log P	0,99 (3)
Biodisponibilidade	90% (1)

Fonte: (1)DRUGBANK, 2012c; (2) MERCK & COMPANY INCORPORATED, 2010; (3) TSRLINC, 2012; (4) PFIZER, 2012)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

Padrões analíticos secundários

- Besilato de anlodipino

Fornecedor: Aché

Lote: 1002000693

Teor: 99,8%

Val: 04/2012

- Fluoxetina

Fornecedor: Pharma Nostra

Lote: 10010342d

Teor: 99,9%

Val: 09/2012

- Fluconazol

Fornecedor: Sigma

Lote: 0808001130

Teor: 100%

Val: 10/2012

- Metoprolol

Fornecedor: Sigma

Lote: UB7450100

Teor: 99,5

Val: 08/2012

- Fluoresceína

Fornecedor: Sigma-Aldrich

Lote: BCBB2088V

Val: 10/201

Matérias primas:

- Besilato de anlodipino

Fornecedor: Henrifarma

Lote: 003072009AB

Teor: 99,5%

Val: 06/2014

- Fluoxetina

Fornecedor: Pharma Nostra

Lote: 10010342d

Teor: 99,9%

Val: 09/2012

- Fluconazol

Fornecedor: Henrifarma

Lote: FCZ0901005

Teor: 99,8

Val: 12/2013

4.2 Solventes e reagentes

- ⇒ Solução de Ringer composta por NaCl: 7,0 g; KCl: 0,35 g; CaCl₂: 0,28 g; NaHCO₃: 2,1 g; KH₂PO₄: 0,16 g e D- Glicose: 5,05 (SHARMA, *et. al*, 2002);
- ⇒ Acetonitrila, metanol e dihidrogenofosfato de potássio de grau cromatográfico;
- ⇒ Água ultrapura obtida em equipamento Milli-Q (Millipore, USA).

4.3 Equipamentos e dispositivos diversos

- ⇒ Condutivímetro para verificação da integridade de membrana Millicell®-ERS (Millipore, Bedford, MA);
- ⇒ Micropipeta monocal 20 a 100 µL – Gilson;
- ⇒ Micropipeta monocal 100 a 1.000 µL – Labsystems;
- ⇒ Micropipeta monocal 500 a 5.000 µL – Eppendorf;
- ⇒ Plataforma de agitação com incubadora *Shaker* - Tecnal
- ⇒ Plataforma manual para testes de permeabilidade *Start Up 6 Cells* – Variomag/Hanson Research;
- ⇒ Seringa de precisão para amostragem manual de volume igual a 1,0 e 10 mL;

- ⇒ Células de difusão vertical, orifício de 15,0 mm, volume de 7,0 mL e área de exposição de 0,22 cm² – Hanson Research, representadas na Figura 10;
- ⇒ Cromatógrafo líquido (CLAE) Shimadzu Scientific Instrumentation com detector ultravioleta e Cromatógrafo líquido (CLAE) MERCK com detecção de fluorescência;
- ⇒ Espectrofotômetro UV-visível Varian.

4.4 Estudos de solubilidade

4.4.1 Desenvolvimento de método analítico para a quantificação do besilato de anlodipino, fluoxetina, fluconazol, fluoresceína e metoprolol nos estudos de solubilidade.

A espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) é um método útil na identificação de fármacos e oferece precisão adequada para medidas quantitativas de fármacos tanto como matéria-prima quanto para formulações farmacêuticas. Além disso, é um método simples, baixo custo e de fácil execução (WATSON, D. G., 1999).

A validação foi conduzida de acordo com a Resolução ANVISA 899/2003 (BRASIL, 2003). Os parâmetros de validação utilizados foram: especificidade, linearidade, precisão (intra-ensaio e inter-ensaio) e exatidão.

4.4.1.1 Espectro UV-visível (UV-VIS)

Os espectros de absorção de besilato de anlodipino, fluconazol e cloridrato de fluoxetina foram obtidos em espectrofotometria UV-VIS na região de 200-400 nm. As soluções dos fármacos foram preparadas em água, nos tampões farmacopéicos HCl pH 1,2; acetato pH 4,5; fosfato pH 6,8 e pH 7,5. Foi utilizada cubeta de quartzo com 1 mm de comprimento e os tampões acima descritos como branco. Com a varredura os valores máximos de absorbâncias para o besilato de anlodipino, fluconazol e cloridrato de fluoxetina foram encontrados nos comprimentos de onda de 240, 260 e 230 nm respectivamente.

4.4.1.2 Preparo de solução-padrão e soluções de trabalho de besilato de anlodipino

Para o preparo de solução-padrão de 200 µg/mL de benzilato de anlodipino pesaram-se, 20 mg de besilato de anlodipino (padrão secundário 99,8%) transferindo-se para balão volumétrico de 100 mL, adicionando-se metanol P.A e agitando-se até completa dissolução do fármaco. Diluições desta solução foram utilizadas para a validação do método de doseamento do fármaco.

4.4.1.3 Preparo da solução-padrão e soluções de trabalho de fluconazol

Para o preparo de solução-padrão de 5,0 mg/mL pesaram-se, 500 mg de fluconazol (padrão secundário 99,9%) transferindo-se para balão volumétrico de 100 mL, adicionando-se metanol PA e agitando-se até completa dissolução do fármaco. Diluições desta solução foram utilizadas para a validação do método analítico de doseamento do fármaco.

4.4.1.4 Preparo da solução-padrão e soluções de trabalho do cloridrato de fluoxetina

Para o preparo de solução-padrão de 1,0 mg/mL pesaram-se, analiticamente, 25 mg de fluconazol (padrão secundário 99,9%) transferindo-se para balão volumétrico de 25 mL, adicionando-se água ultrapura e agitando-se até completa dissolução do fármaco. Diluições desta solução foram utilizadas para a validação do método analítico de doseamento do fármaco.

4.4.2 Validação dos métodos analíticos para a quantificação dos fármacos nos meios empregados no estudo de solubilidade

4.4.2.1 Especificidade

Foi avaliada a partir da realização de varredura entre 200 e 400 nm dos solventes descritos no item 4.4.1.1, com a finalidade de garantir que o método

analítico não sofre interferências dos componentes que estarão presentes nos meios avaliados.

4.4.2.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade de um método analítico demonstrar que os valores obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra dentro de um intervalo especificado.

A partir das soluções padrão de besilato de anlodipino, fluconazol e cloridrato de fluoxetina descritas no item 4.4.1.2, 4.4.1.3 e 4.4.1.4, foram transferidas alíquotas com auxílio de pipeta para balões volumétricos e os volumes foram completados com os solventes em análise conforme o Quadro 6, 7 e 8 obtendo-se soluções com concentrações definidas para os fármacos. O esquema de diluições utilizado para o preparo de cada solução, bem como as concentrações obtidas estão nos Quadros 6 e 7 e 8. As curvas analíticas foram preparadas em triplicata em sete níveis de concentrações diferentes, exceto para cloridrato de fluoxetina para o qual foram usados cinco níveis. Plotaram-se as absorbâncias médias, correspondentes a três determinações para cada diluição da solução padrão, no eixo das ordenadas e as concentrações ($\mu\text{g/mL}$) no eixo das abscissas.

Quadro 6 - Concentração das amostras de besilato de anlodipino obtidas a partir de uma solução padrão do fármaco a 200 $\mu\text{g/mL}$ e empregadas para determinação da linearidade do método de quantificação.

Amostra	Alíquota da solução padrão (μL)	Volume final (mL)	Concentração final ($\mu\text{g/mL}$)
1	250	10	5
2	500	10	10
3	600	10	12
4	750	10	15
5	900	10	18
6	1000	10	20
7	1250	10	25

Quadro 7 - Concentração das amostras do fluconazol obtidas a partir de uma solução padrão do fármaco a 5 mg/mL e empregadas para determinação da linearidade do método de quantificação.

Amostra	Alíquota da solução padrão (µL)	Volume final (mL)	Concentração final (µg/mL)
1	250	25	50
2	200	10	100
3	400	10	200
4	500	10	250
5	1500	25	300
6	700	10	350
7	800	10	400

Quadro 8 - Concentração das amostras do cloridrato de fluoxetina obtidas a partir de uma solução padrão do fármaco a 1 mg/mL e empregadas para determinação da linearidade do método de quantificação

Amostra	Alíquota da solução padrão (µL)	Volume final (mL)	Concentração final (µg/mL)
1	250	50	5
2	250	25	10
3	375	25	15
4	500	25	20
5	625	25	25

4.4.2.3 Precisão

4.4.2.3.1 Precisão intra e inter-ensaio

Determinou-se a precisão dos métodos de modo a averiguar a proximidade dos resultados obtidos em uma série de quantificações de uma amostragem (BRASIL, 2003).

Para determinar a precisão, soluções padrões de trabalho foram preparadas em triplicata nas seguintes concentrações: para o besilato de anlodipino 10, 15 e 20 µg/mL; para o fluconazol 100, 250 e 350 µg/mL e para o cloridrato de fluoxetina 10, 15 e 20 µg/mL. As réplicas foram avaliadas em um mesmo dia (precisão intra-ensaio) e em dias diferentes (precisão inter-ensaio). Os resultados foram expressos por meio da imprecisão dada pelo coeficiente de variação das absorbâncias, calculada pela seguinte expressão:

$$CV\% = DP/AMD \times 100$$

Na qual:

- CV% = coeficiente de variação
- DP = desvio-padrão
- AMD = absorbância média determinada.

Adotou-se como critério mínimo de aceitação CV% menor ou igual a 5%. (BRASIL, 2003).

4.4.2.4 Exatidão (intra-ensaio)

A resolução 899/ 2003 da ANVISA estabelece que um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes valores de concentração devem ser determinados. Todas essas concentrações devem estar dentro do intervalo do método, sendo que para determinação da exatidão é preciso primeiramente determinar a especificidade, a linearidade e o intervalo do método (BRASIL, 2003).

O referido parâmetro foi determinado pela análise dos mesmos três valores de concentração avaliados na precisão descrita no item 4.4.2.3.1 determinando a concentração esperada pelo método (100%) e o resultado obtido na prática.

4.5 Desenvolvimento de método bioanalítico para a quantificação do besilato de anlodipino, fluoxetina, fluconazol, fluoresceína e metoprolol no meio empregado no estudo de permeabilidade.

4.5.1 Preparo das soluções padrões para a construção da curva analítica

As soluções padrão da curva analítica foram preparadas a cada dia de análise, a partir de uma solução estoque na concentração de 1 mg/mL recentemente preparada em água. A partir das soluções estoque foram preparadas as soluções de trabalho. As soluções de trabalho foram diluídas em solução tampão Ringer, que foi o meio utilizado nos experimentos de permeabilidade, para obtenção das soluções padrão da curva analítica. As concentrações empregadas em ng/mL das soluções estão descritas no quadro 9 a seguir.

Quadro 9 - Concentrações em ng/mL das soluções padrão utilizadas na construção da curva analítica e linearidade para quantificação de benzilato de anlodipino, cloridrato de fluoxetina, fluconazol, fluoresceína e metoprolol em tampão Ringer

Fármaco	1	2	3	4	5	6	7
Besilato de anlodipino	50	100	200	400	600	800	1000
Cloridrato de fluoxetina	40	100	200	400	600	800	1000
Fluconazol	20	50	150	250	500	800	1000
Fluoresceína	2	5	25	50	150	300	400
Metroprolol	50	100	200	400	600	800	1000

4.5.2 Preparo das amostras de padrão de controle de qualidade

As amostras controle de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA) foram preparadas a partir de soluções estoque de padrão de besilato de anlodipino, cloridrato de fluoxetina, fluconazol, fluoresceína e metoprolol.

Quadro 10 - Concentrações e ng/mL das amostras de controle de qualidade utilizadas na quantificação de benilato de anlodipino, cloridrato de fluoxetina, fluconazol, fluoresceína e metoprolol em tampão Ringer

Controle de qualidade	Besilato de anlodipino ng/mL	Cloridrato de Fluoxetina ng/mL	Fluconazol ng/mL	Fluoresceína ng/mL	Metoprolol ng/mL
CQB	100	100	50	5	100
CQM	400	400	500	150	400
CQA	800	800	800	300	800

4.5.3 Condições cromatográficas

4.5.3.1 Método bioanalítico para quantificação de besilato de anlodipino

Empregou-se para separação coluna de marca Phenomenex, modelo Luna C18, de 15 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, contendo partículas do tamanho de 5 µm.

A fase móvel foi constituída por mistura de tampão fosfato de potássio monobásico 20 mM pH 3,0 e acetonitrila grau cromatográfico na proporção de 50:50 (v/v), filtrada em membrana de acetato de celulose, com 47 mm de diâmetro e poro de 0,22 µm. Para degaseificar, a fase móvel foi colocada em banho ultrasônico por 15 minutos.

O fluxo de fase móvel e a temperatura da coluna utilizados na separação cromatográfica foram de 1,0 mL/min e 30° C, respectivamente. Para quantificação do fármaco foram injetados 50 µL e o comprimento de onda empregado no detector UV foi de 237 nm.

4.5.3.2 Método bioanalítico para quantificação do cloridrato de fluoxetina

Empregou-se para separação coluna de marca Phenomenex, modelo Luna C18, de 15 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, contendo partículas do tamanho de 5 µm.

A fase móvel foi constituída por mistura de tampão fosfato de potássio monobásico 20 mM pH 3,0 e acetonitrila grau cromatográfico na proporção de 50:50 (v/v), foi filtrada em membrana de acetato de celulose, com 47 mm de diâmetro e poro de 0,22 µm. Para degaseificar, a fase móvel foi colocada em banho ultrasônico por 15 minutos.

O fluxo de fase móvel e a temperatura da coluna utilizados na separação cromatográfica foram de 1,0 mL/min e 30° C, respectivamente. Para quantificação do fármaco foram injetados 50 µL e o comprimento de onda empregado no detector UV foi de 226 nm.

4.5.3.3 Método bioanalítico para quantificação do fluconazol

Empregou-se para separação coluna de marca Phenomenex, modelo Luna C18, de 15 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, contendo partículas do tamanho de 5 µm.

A fase móvel foi constituída por mistura água ultra-purificada e acetonitrila grau cromatográfico na proporção de 36:63 (v/v), foi filtrada em membrana de acetato de celulose, com 47 mm de diâmetro e poro de 0,22 µm. Para degaseificar, a fase móvel foi colocada em banho ultrasônico por 15 minutos.

O fluxo da fase móvel e a temperatura da coluna utilizados foram de 1,0 mL/min e 30° C, respectivamente. Para análise foram injetados 50 µL e o comprimento de onda empregado no detector UV foi de 210 nm.

4.5.3.4 Método bioanalítico para quantificação da fluoresceína

Empregou-se para separação coluna de marca Phenomenex, modelo Luna C18, de 15 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, contendo partículas do tamanho de 5 µm.

A fase móvel foi constituída por mistura de metanol e tampão fosfato de potássio monobásico 20 mM pH 4,5 na proporção de 55:45 (v/v), foi filtrada em membrana de acetato de celulose, com 47 mm de diâmetro e poro de 0,22 µm. Para degaseificar, a fase móvel foi colocada em banho ultrasônico por 15 minutos.

O fluxo da fase móvel a temperatura da coluna utilizados foram de 1,0 mL/min e 35° C, respectivamente. Para análise foram injetados 50 µL de meio receptor? e o comprimento de onda empregado no detector de fluorescência foram 485 de excitação e 515 de emissão.

4.5.3.5 Método bioanalítico para quantificação do metoprolol

Empregou-se para separação coluna de marca Phenomenex, modelo Luna C18, de 15 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, contendo partículas do tamanho de 5 µm.

A fase móvel foi constituída por mistura de tampão fosfato de potássio monobásico 20 mM pH 3,0 e metanol grau cromatográfico na proporção de 65:35 (v/v), foi filtrada em membrana de acetato de celulose, com 47 mm de diâmetro e poro de 0,22 µm. Para degaseificar a fase móvel foi colocada em banho ultrasônico por 15 minutos.

O fluxo da fase móvel e a temperatura da coluna utilizados foram de 1,0 mL/min e 30° C, respectivamente. Para análise foram injetados 50 µL de meio receptor? e o comprimento de onda empregado no detector UV foi de 226 nm.

4.6 Parâmetros de validação dos métodos bioanalíticos para quantificação do besilato de anlodipino, cloridrato de fluoxetina, fluconazol, fluoresceína e metoprolol

A validação dos métodos foi realizada por meio da determinação dos parâmetros de especificidade, linearidade, limite de quantificação, precisão, exatidão e estabilidade conforme a Resolução 899 (BRASIL, 2003).

4.6.1 Especificidade

A especificidade é definida como a capacidade de o método distinguir a substância analisada de todas outras presentes na amostra. Na análise de amostras provenientes dos estudos de permeabilidade, interferentes potenciais incluem componentes endógenos, metabólitos provenientes da membrana intestinal em estudo ou produtos de degradação (CAUSON, 1997).

Tal parâmetro foi analisado pela análise de três amostras de solução tampão Ringer. Estas soluções foram preparadas para avaliação das possíveis interferências dos adjuvantes empregados nos ensaios de permeabilidade. Também foi avaliada se a presença de metabólitos no estudo de permeabilidade poderia interferir no método por meio da injeção de três amostras coletadas no compartimento receptor antes da adição do fármaco no compartimento doador, no período de estabilização da membrana (branco).

O critério de aceitação da especificidade do método é a ausência de picos no mesmo tempo de retenção dos analitos.

4.6.2 Limite de quantificação inferior e limite de detecção

O limite de quantificação inferior deve representar a menor concentração que pode ser determinada com exatidão e precisão aceitáveis (BRASIL, 2003). A exatidão deve estar entre $\pm 20\%$ do valor nominal da concentração, com coeficiente de variação de, no máximo, 20% (BRESSOLE *et al.*, 1996).

Na determinação do limite de detecção (LD) do método, foram feitas injeções em ordem decrescente de concentração até que o sinal cromatográfico atingisse uma área referente a três vezes o ruído da linha de base, no tempo de retenção do pico de interesse. Para a determinação do limite de quantificação (LIQ), as injeções foram feitas até a área do pico fosse dez vezes superior ao ruído da linha de base no tempo de retenção do pico de interesse.

4.6.3 Linearidade

A linearidade indica a relação entre a concentração do analito e a resposta do método (BRESSOLE *et al.*, 1996), representada, nesse estudo, pela área do sinal cromatográfico.

De acordo com a RDC 899/2003, o coeficiente de correlação linear não deve ser inferior a 0,98 (BRASIL, 2003)

Na construção da curva analítica utilizaram-se soluções dos fármacos dissolvidos na solução Tampão Ringer nas concentrações descritas no QUADRO 9 (curva) em triplicatas.

4.6.4 Precisão

A precisão de um método analítico representa o grau de concordância dos resultados obtidos quando um procedimento analítico é aplicado repetidamente, sendo expressa em coeficiente de variação (CV%). A precisão intra-ensaio refere-se ao CV obtido por repetição do método com o mesmo analista, utilizando o mesmo instrumento e os mesmos reagentes, em curto intervalo de tempo (mesmo dia). A precisão inter-ensaios é obtida por meio de alteração de condições, como mudança de analista ou reagentes e utilização do método durante várias semanas ou meses (CAUSON, 1997). Esse parâmetro foi determinado analisando-se amostras de controle de qualidade em três concentrações diferentes para cada fármaco em seis réplicas no mesmo dia (precisão intra-ensaio) e em dois dias consecutivos (precisão inter-ensaio), e foi calculado segundo a equação no item 4.4.2.3.1.

4.6.5 Exatidão

O referido parâmetro foi determinado pela análise de amostra de controle em três diferentes concentrações e em seis réplicas em um mesmo dia (exatidão intra-ensaio) e em dois dias diferentes (exatidão inter-ensaio). Lembrando que o desvio não deve exceder 15%, exceto para o limite de quantificação para o qual se acitam desvios de até 20% (BRASIL, 2003).

O referido parâmetro foi determinado pela análise dos mesmos três valores de concentração avaliados na precisão descritos no quadro 10 determinando a concentração esperada pelo método (100%) e o resultado obtido na prática.

4.6.6 Estabilidade

A determinação da estabilidade de um fármaco no meio em estudo depende de vários fatores, tais como propriedades químicas do fármaco, condições de armazenamento da amostra, tipo de matriz biológica e material de acondicionamento (USP, 2010).

A determinação da estabilidade de uma amostra é fundamental para garantir que a concentração da substância a ser analisada não sofreu alteração entre a sua coleta e o momento da análise (CAUSON, 1997).

Assim, é importante que se determine a estabilidade das amostras em temperatura ambiente e em ciclos de congelamento e descongelamento.

Conforme recomendado pela Resolução 899 (BRASIL, 2003) foram determinadas as estabilidade descritas a seguir.

4.6.6.1 Estabilidade de curta duração

Foram utilizadas três amostras da solução padrão de controle de qualidade em três concentrações (baixa, média e alta), submetidas a descongelamento natural e mantidas a temperatura ambiente durante 6 horas. Os resultados foram comparados com amostras recém preparadas imediatamente analisadas.

4.6.6.2 Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento

Foram utilizadas três amostras da solução padrão de controle de qualidade em três concentrações (baixa, média e alta), submetidas às seguintes condições: congelamento a -20°C por, no mínimo, 48 horas, seguida

de descongelamento. A concentração do fármaco nas amostras padrão de controle de qualidade foi determinada após seu descongelamento e comparada aos resultados de amostras recém preparadas.

4.7 Estudo de solubilidade

Os experimentos para determinação da solubilidade de fármacos segundo o SCB devem ser conduzidos utilizando-se excesso do fármaco e meios aquosos com diversos valores de pH, por meio da utilização de diferentes tampões. O fármaco é colocado em um frasco contendo o tampão no qual o mesmo será testado. Após um período prolongado de agitação para que o equilíbrio possa ser atingido, geralmente de 72 horas, alíquotas da solução são retiradas e filtradas, antes da quantificação com método adequado (STAVCHANSKY ,PADE, 1998). Através desta técnica pode-se determinar a quantidade máxima do fármaco que pode ser dissolvida no volume especificado de 250 mL de acordo com os critérios do SCB para os testes de solubilidade.

Os ensaios foram conduzidos de acordo com o método *shake flask*, em plataforma de agitação orbital com incubadora e temperatura controlada a 37°C. O estudo foi realizado em frascos de vidro de 250 mL, amostras dos fármacos em estudo foram dispersas em volume de 20 ml de água destilada e de cada um dos quatro tampões farmacopéicos na faixa de pH 1 a 7,5, a 37 ± 1 °C (pHs 1,2; 4,5; 6,8; 7,5) agitadas por um período de 72 horas. Para avaliar se o meio estava saturado, de tempo em tempo as amostras eram verificadas e no caso em que o fármaco havia dissolvido, era adicionado mais ao meio de estudo. Após esse período as amostras foram submetidas à filtração através de membrana com poro de 0,45 µm.

Ao fim do experimento foi avaliado o pH da solução para verificar se houve variação do pH do meio em teste pois a alteração do pH pode ser um indício de degradação do fármaco.

A determinação da concentração dos fármacos em solução foi feita nos filtrados por métodos espectrofotométricos, previamente validados, nos comprimentos de onda UV de máxima absorbância de cada fármaco. Com os resultados obtidos nos testes de solubilidade foi calculada a relação

dose:solubilidade, levando em conta que a forma farmacêutica com maior dosagem disponível no mercado para o besilato de anlodipino é 10 mg, para o fluconazol 200 mg e para o cloridrato de fluoxetina, 20 mg.

4.8 Estudos de permeabilidade

O método de avaliação da permeabilidade em segmentos intestinais consiste na determinação do fluxo de fármaco através de segmento intestinal animal de tamanho apropriado, isolado e contido em equipamento adequado. A permeabilidade é baseada no aparecimento do fármaco no lado seroso e desaparecimento do lado mucoso. Para avaliar a integridade da membrana é medida a resistência elétrica transepitelial antes e durante o experimento (GRASS, SWEETANA, 1989; MENON, BARR, 2003).

4.8.1 Membranas

⇒ Segmentos de intestinos (jejuno) de aproximadamente 25 cm de comprimento, obtidos de ratos machos adultos da raça Wistar, com peso entre 250 a 300 g, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

4.8.1.1 Obtenção e preparação das membranas

Segmentos de jejuno foram obtidos de ratos machos e adultos da linhagem Wistar com peso entre 250 g e 300g após jejum por um período de 18 horas antes do experimento, conforme técnica descrita por diversos autores para este tipo de estudo (PARVIN *et al.*, 2009; DAHAN *et al.*, 2009; LEVIS *et al.*, 2003). De acordo com as normas de conduta do Comitê de Ética em Experimentação Animal e do biotério da FCF/USP, os ratos foram sacrificados por anestesia seguida de decapitação com guilhotina. Os segmentos de intestino foram imediatamente isolados, retirados e colocados em uma solução fria de Ringer modificada com adição de *D*-glicose (10 mM) tamponada em pH 7,4 e mantidos nessas condições durante 20 minutos . Estes segmentos foram então abertos e inseridos de forma adequada nas seis câmaras de difusão

vertical da plataforma manual para testes de permeabilidade (Figura 10) (HIDALGO *et al.*, 1993; HILLGREN, *et al.*, 1995; LEGEN, KRISTL, 2002; LEGEN *et al.*, 2005; ZAKELJ *et al.*, 2006).

Figura 10 - Representação esquemática da célula de difusão vertical e seus acessórios (HANSON RESEARCH, 2006).

4.8.2 Avaliação da viabilidade das membranas utilizadas no estudo

A viabilidade das membranas foi avaliada através da medida da resistência elétrica transepitelial (RET) utilizando-se o equipamento Millicell®-ERS (SODERHOLM *et al.*, 2004) antes e após a realização do experimento.

4.8.3 Estudos de permeação dos fármacos

As membranas foram inseridas adequadamente nas câmaras de difusão entre um compartimento receptor e outro doador (Figura 10). O compartimento receptor foi preenchido com solução de Ringer tamponada e foi mantido a $37 \pm 0.5^\circ \text{C}$, sob constante agitação de 200 rpm por 20 minutos até estabilização. Cada fármaco foi colocado no compartimento doador em solução de concentração conhecida 100 $\mu\text{g/mL}$ para o besilato de anlodipino, 300 $\mu\text{g/mL}$ para o fluconazol, 100 $\mu\text{g/mL}$ para o cloridrato de fluoxetina. Também foram avaliados os padrões de baixa permeação (fluoresceína 60 $\mu\text{g/mL}$) e alta permeação (metoprolol 100 $\mu\text{g/mL}$). Em intervalos pré-estabelecidos, no tempo de 30, 60, 90 e 120 minutos foi coletado 1 mL da fração permeada com a reposição do meio utilizado no estudo. Para efeito de cálculos, foi realizada a correção entre a quantidade retirada e colocada. Todos os experimentos foram

realizados em sextuplicata. As concentrações do fármaco e dos padrões de permeabilidade na solução receptora foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e foram obtidos os perfis de permeação em função dos intervalos de amostragem. A partir desses dados, foi calculado a permeabilidade aparente Papp (BARRY, 1983; SHAH, 1993; TRAPANI *et al.*, 2004):

⇒ Permeabilidade aparente (Papp), calculada pela seguinte equação:

$$P_{app} = \frac{\Delta Q}{\Delta t} \cdot \frac{1}{A} \cdot \frac{1}{C_0}$$

Onde: $\frac{\Delta Q}{\Delta t}$ é o fluxo em ng/s ou a quantidade de fármaco permeado pela membrana no tempo t;

A é a área de exposição da membrana (de 0,22 cm²);

C₀ (ng/cm³) corresponde a concentração inicial do fármaco na solução colocada em contato com a membrana (compartimento doador).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Validação dos métodos analíticos para a quantificação dos fármacos no estudo de solubilidade

5.1.1 Especificidade

Na avaliação da especificidade, a absorção desprezível dos meios utilizados para o desenvolvimento do método nos comprimentos de onda de 240 nm para o besilato de anlodipino e 260 nm para o fluconazol e 230 nm para o cloridrato de fluoxetina comprova a especificidade dos métodos em meio tampão HCl pH 1,2, tampão acetato pH 4,5, tampão fosfato pH 6,8 e 7,5, respectivamente (Figuras 11, 12, 13, 14 e 15).

Figura 11 - Espectro da varredura da água para avaliar a especificidade do método analítico do besilato de anlodipino, fluconazol e cloridrato de fluoxetina

Figura 12 - Espectro da varredura do tampão HCl pH 1,2 para avaliar a especificidade do método analítico do besilato de anlodipino, fluconazol e cloridrato de fluoxetina.

Figura 13 - Espectro da varredura do tampão acetato pH 4,5 para avaliar a especificidade do método analítico do besilato de anlodipino, fluconazol e cloridrato de fluoxetina.

Figura 14 - Espectro de varredura do tampão fosfato pH 6,8 para avaliar a especificidade do método analítico do besilato de anlodipino, fluconazol e cloridrato de fluoxetina.

Figura 15 - Espectro de varredura do tampão fosfato pH 7,5 para avaliar a especificidade do método analítico do besilato de anlodipino, fluconazol e cloridrato de fluoxetina.

5.1.2 Linearidade

Com o propósito de avaliar a linearidade do método, construíram-se os gráficos de concentração ($\mu\text{g/mL}$) *versus* absorbância referente a cada meio utilizado no estudo obtendo-se a curva analítica e a sua respectiva equação da reta pela regressão linear usando o método dos mínimos quadrados, bem como o seu correspondente coeficiente de correlação linear (r^2) (figuras 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30). Foram determinados o desvio padrão e o coeficiente de variação dos pontos das absorbâncias em cada nível de concentração da curva de linearidade e considerado aceitáveis todos abaixo do valor de 5% (tabelas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15) como preconizado pela norma vigente RE899/2003 (BRASIL, 2003).

Os métodos de quantificação para o besilato de anlodipino e fluconazol e cloridrato de fluoxetina por espectrofotometria no UV demonstraram linearidade na faixa de 5 - 25 $\mu\text{g/mL}$ para o benzilato de anlodipino de 50 – 400 $\mu\text{g/mL}$ para o fluconazol e de 5 - 25 $\mu\text{g/mL}$ para o cloridrato de fluoxetina quando utilizados água, tampão HCl pH 1,2, tampão acetato pH 4,5, tampão fosfato pH 6,8 e 7,5 como diluentes, atendendo ao critério mínimo estabelecido ($r^2 > 0,99$) (BRASIL, 2003).

Tabela 1 - Valores de absorbância obtidas na curva analítica do método para quantificação do besilato de anlodipino em água.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbância			Média	DP	CV%
	1° rep.	2° rep.	3° rep.			
5	0,1673	0,1651	0,1667	0,1663	0,0333	0,6835
10	0,3403	0,3353	0,335	0,3368	0,0873	0,8837
12	0,3971	0,3976	0,4021	0,3989	0,0807	0,6902
15	0,5021	0,5006	0,5033	0,5020	0,0396	0,2694
18	0,6100	0,6159	0,6110	0,6123	0,0925	0,5156
20	0,6664	0,6759	0,6692	0,6705	0,1431	0,7280
25	0,8533	0,8527	0,8446	0,8502	0,1424	0,5715

DP= Desvio-padrão da média (n=3), CV%=Coeficiente de Variação (n=3)

Figura 16 - Curva analítica do besilato de anlodipino obtida por espectrofotometria a 240 nm a partir de diluições volumétricas da solução-padrão em água.

Tabela 2 - Valores de absorbância obtidas na curva analítica do método para quantificação do besilato de anlodipino em tampão HCl pH 1,2

Concentração (µg/ml)	Absorbância			Média	DP	CV%
	1º rep.	2º rep.	3º rep.			
5	0,1736	0,1730	0,1714	0,1726	0,033	0,6586
10	0,3257	0,3296	0,3260	0,3271	0,063	0,6635
12	0,3939	0,3922	0,3914	0,3925	0,037	0,3253
15	0,4931	0,4857	0,4887	0,4891	0,108	0,7609
18	0,5945	0,6044	0,6015	0,6001	0,148	0,8481
20	0,6648	0,6594	0,6690	0,6644	0,140	0,7243
25	0,8388	0,8387	0,8311	0,8362	0,128	0,5282

DP= Desvio-padrão da média (n=3), CV%=Coeficiente de Variação (n=3)

Figura 17 - Curva analítica do besilato de anlodipino obtida por espectrofotometria a 240 nm a partir de diluições volumétricas da solução-padrão em tampão HCl pH 1,2.

Tabela 3 - Valores de absorbância obtidas na curva analítica do método para quantificação do besilato de anlodipino em meio tampão acetato pH 4,5.

Concentração (µg/ml)	Absorbância			Média	DP	CV%
	1º rep.	2ºrep.	3ºrep.			
5	0,1755	0,1745	0,1723	0,1741	0,0487	0,9403
10	0,3415	0,3397	0,338	0,3397	0,1325	1,3175
12	0,4030	0,4052	0,4005	0,4029	0,1660	1,3913
15	0,5061	0,5022	0,5053	0,5045	0,1222	0,8178
18	0,6047	0,6068	0,6030	0,6048	0,2016	1,1255
20	0,6692	0,6637	0,6680	0,6669	0,1636	0,8282
25	0,8507	0,8442	0,8549	0,8499	0,1303	0,5178

DP= Desvio-padrão da média (n=3), CV%=Coeficiente de Variação (n=3)

Figura 18 - Curva analítica do besilato de anlodipino obtida por espectrofotometria a 240 nm a partir de diluições volumétricas da solução-padrão em tampão acetato pH 4,5.

Tabela 4 - Valores de absorbância obtidas na curva analítica do método para quantificação do besilato de anlodipino em meio tampão fosfato pH 6,8.

Concentração (µg/ml)	Absorbância			Média	DP	CV%
	1º rep.	2ºrep.	3ºrep.			
5	0,1758	0,1737	0,1767	0,1754	0,0455	0,8776
10	0,3336	0,3402	0,3385	0,3374	0,1013	1,0155
12	0,3996	0,4025	0,4016	0,4012	0,0439	0,3699
15	0,5043	0,5086	0,5035	0,5054	0,0811	0,5426
18	0,6091	0,6131	0,6101	0,6107	0,0615	0,3408
20	0,6751	0,6802	0,6723	0,6758	0,1185	0,5926
25	0,8488	0,8491	0,8465	0,8481	0,0420	0,1677

DP= Desvio-padrão da média (n=3), CV%=Coeficiente de Variação (n=3)

Figura 19 - Curva analítica do besilato de anlodipino obtida por espectrofotometria a 240 nm a partir de diluições volumétricas da solução-padrão em tampão fosfato pH 6,8.

Tabela 5 - Valores de absorbância obtidas na curva analítica do método para quantificação do besilato de anlodipino em meio tampão fosfato pH 7,5.

Concentração (µg/ml)	Absorbância			Média	DP	CV%
	1º rep	2ºrep.	3ºrep.			
5	0,1764	0,1771	0,1719	0,1751	0,0828	1,6113
10	0,3394	0,3430	0,3372	0,3398	0,0859	0,8615
12	0,4115	0,4018	0,4023	0,4052	0,1602	1,3479
15	0,5093	0,5048	0,5027	0,5056	0,0989	0,6669
18	0,6002	0,6049	0,6000	0,6017	0,0813	0,4609
20	0,6845	0,6740	0,6804	0,6796	0,1552	0,7786
25	0,8604	0,8625	0,8544	0,8591	0,1233	0,4893

DP= Desvio-padrão da média (n=3), CV%=Coeficiente de Variação (n=3)

Figura 20 - Curva analítica do besilato de anlodipino obtida por espectrofotometria a 240 nm a partir de diluições volumétricas da solução-padrão em tampão fosfato pH 7,5.

Tabela 6 - Valores de absorbância obtidas na curva analítica do método para quantificação do fluconazol em água.

Concentração (µg/ml)	Absorbância			Média	DP	CV%
	1° rep.	2°rep.	3°rep.			
50	0,1070	0,1062	0,1059	0,1063	0,2707	0,5345
100	0,2140	0,2115	0,2116	0,2123	0,6740	0,6664
200	0,4264	0,4276	0,4254	0,4264	0,5245	0,2582
250	0,5280	0,5273	0,5244	0,5265	0,9089	0,3624
300	0,6412	0,6401	0,6445	0,6419	1,0904	0,3567
350	0,7410	0,7399	0,7456	0,7421	1,4399	0,4074
400	0,8414	0,8442	0,8461	0,8439	1,1258	0,2801

DP= Desvio-padrão da média (n=3), CV%=Coeficiente de Variação (n=3)

Figura 21 - Curva analítica de fluconazol obtida por espectrofotometria a 260 nm a partir de diluições volumétricas da solução-padrão em água.

Tabela 7 - Valores de absorbância obtidas na curva analítica do método para quantificação do fluconazol em tampão HCl pH 1,2

Concentração (µg/ml)	Absorbância			Média	DP	CV%
	1º rep.	2ºrep.	3ºrep.			
50	0,1039	0,1041	0,1036	0,1038	0,1198	0,2422
100	0,2104	0,2112	0,2120	0,2112	0,3809	0,3787
200	0,4148	0,4195	0,4137	0,4160	1,4669	0,7405
250	0,5198	0,5194	0,5177	0,5189	0,5309	0,2148
300	0,6174	0,6177	0,6233	0,6194	1,5824	0,5364
350	0,7285	0,7217	0,7230	0,7244	1,7189	0,4983
400	0,8216	0,8243	0,8296	0,8251	1,9380	0,4932

DP= Desvio-padrão da média (n=3), CV%=Coeficiente de Variação (n=3)

Figura 22 - Curva de analítica do fluconazol obtida por espectrofotometria a 260 nm a partir de diluições volumétricas da solução-padrão em solução de tampão HCl pH 1,2.

Tabela 8 - Valores de absorbância obtidas na curva analítica do método para quantificação do fluconazol em meio tampão acetato pH 4,5.

Concentração (µg/ml)	Absorbância			Média	DP	CV%
	1º rep.	2º rep.	3º rep.			
50	0,1035	0,1029	0,1063	0,1042	0,8641	1,7410
100	0,2075	0,2101	0,2128	0,2101	1,2619	1,2612
200	0,4163	0,4166	0,4161	0,4163	0,1198	0,0604
250	0,5083	0,5172	0,5170	0,5141	2,4198	0,9883
300	0,6120	0,6250	0,6193	0,6187	3,1030	1,0531
350	0,7197	0,7232	0,7305	0,7244	2,6239	0,7606
400	0,8276	0,8327	0,8295	0,8299	1,2273	0,3106

DP= Desvio-padrão da média (n=3), CV%=Coeficiente de Variação (n=3)

Figura 23 - Curva analítica do fluconazol obtida por espectrofotometria a 260 nm a partir de diluições volumétricas da solução-padrão em meio tampão acetato pH 4,5.

Tabela 9 - Valores de absorbância obtidas na curva analítica do método para quantificação do fluconazol em meio tampão fosfato pH 6,8.

Concentração (µg/ml)	Absorbância			Média	DP	CV%
	1° rep.	2°rep.	3°rep.			
50	0,1051	0,1032	0,1064	0,1049	0,7663	1,5347
100	0,2135	0,2104	0,2124	0,2121	0,7483	0,7409
200	0,4201	0,4228	0,4262	0,4230	1,4555	0,7225
250	0,5247	0,5288	0,5289	0,5274	1,1412	0,4543
300	0,6311	0,6298	0,6334	0,6314	0,8681	0,2887
350	0,7342	0,7334	0,7347	0,7341	0,3122	0,0893
400	0,8320	0,8331	0,8334	0,8328	0,3510	0,0885

DP= Desvio-padrão da média (n=3), CV%=Coeficiente de Variação (n=3)

Figura 24 - Curva de analítica do fluconazol obtida por espectrofotometria a 260 nm a partir de diluições volumétricas da solução-padrão em meio tampão fosfato pH 6,8.

Tabela 10 - Valores de absorbância obtidas na curva analítica do método para quantificação do fluconazol em meio tampão fosfato pH 7,5.

Concentração	Absorbância			Média	DP	CV%
(µg/ml)	1° rep.	2°rep.	3°rep.			
50	0,1051	0,1055	0,1057	0,1054	0,1454	0,2897
100	0,2093	0,2075	0,2096	0,2088	0,5408	0,5439
200	0,4178	0,4202	0,4228	0,4202	1,1907	0,5950
250	0,5271	0,5226	0,5223	0,5240	1,2804	0,5131
300	0,6242	0,6276	0,6252	0,6256	0,8320	0,2792
350	0,7311	0,7316	0,7357	0,7328	1,2018	0,3444
400	0,8359	0,8384	0,8357	0,8366	0,7163	0,1798

DP= Desvio-padrão da média (n=3), CV%=Coeficiente de Variação (n=3)

Figura 25 - Curva de analítica do fluconazol obtida por espectrofotometria a 260 nm a partir de diluições volumétricas da solução-padrão em meio tampão fosfato pH 7,5.

Tabela 11 - Valores de absorbância obtidas na curva analítica do método para quantificação do cloridrato de fluoxetina em água.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbância			Média	DP	CV%
	1° rep.	2°rep.	3°rep.			
5	0,2096	0,2140	0,2196	0,2144	0,0041	1,9087
10	0,3745	0,3713	0,3779	0,3746	0,0027	0,7195
15	0,5231	0,5303	0,5160	0,5231	0,0058	1,1160
20	0,6625	0,6699	0,6623	0,6649	0,0035	0,5319
25	0,8238	0,8249	0,8255	0,8247	0,0007	0,0854

DP= Desvio-padrão da média (n=3), CV%=Coeficiente de Variação (n=3)

Figura 26 - Curva analítica do cloridrato de fluoxetina obtida por espectrofotometria a 230 nm a partir de diluições volumétricas da solução padrão em água.

Tabela 12 - Valores de absorbância obtidas na curva analítica do método para quantificação do cloridrato de fluoxetina em tampão HCl pH 1,2

Concentração	Absorbância			Média	DP	CV%
(µg/ml)	1° rep.	2°rep.	3°rep.			
5	0,2607	0,2502	0,2639	0,2583	0,0059	2,2658
10	0,4191	0,4225	0,4157	0,4191	0,0028	0,6624
15	0,5529	0,5559	0,5747	0,5612	0,0096	1,7192
20	0,6987	0,6948	0,7312	0,7082	0,0163	2,3040
25	0,8440	0,8427	0,8429	0,8432	0,0006	0,0678

DP= Desvio-padrão da média (n=3), CV%=Coeficiente de Variação (n=3)

Figura 27 - Curva analítica do cloridrato de fluoxetina obtida por espectrofotometria a 230 nm a partir de diluições volumétricas da solução-padrão em tampão HCl pH 1,2.

Tabela 13 - Valores de absorbância obtidas na curva analítica do método para quantificação do cloridrato de fluoxetina em meio tampão acetato pH 4,5.

Concentração (µg/ml)	Absorbância			Média	DP	CV%
	1° rep.	2°rep.	3°rep.			
5	0,2361	0,2609	0,2465	0,2478	0,0102	4,1029
10	0,3970	0,3894	0,3862	0,3909	0,0045	1,1588
15	0,5397	0,5386	0,5500	0,5428	0,0051	0,9460
20	0,6947	0,6996	0,6902	0,6948	0,0038	0,5525
25	0,8476	0,8582	0,8402	0,8487	0,0074	0,8704

DP= Desvio-padrão da média (n=3), CV%=Coeficiente de Variação (n=3)

Figura 28 - Curva analítica do cloridrato de fluoxetina obtida por espectrofotometria a 230 nm a partir de diluições volumétricas da solução-padrão em tampão acetato pH 4,5.

Tabela 14 - Valores de absorbância obtidas na curva analítica do método para quantificação do cloridrato de fluoxetina em meio tampão fosfato pH 6,8.

Concentração (µg/ml)	Absorbância			Média	DP	CV%
	1° rep.	2°rep.	3°rep.			
5	0,2531	0,2551	0,2474	0,2519	0,0033	1,2952
10	0,3834	0,3944	0,3805	0,3878	0,0060	1,5507
15	0,5498	0,5570	0,5587	0,5552	0,0039	0,6949
20	0,6910	0,6938	0,6919	0,6922	0,0012	0,1686
25	0,8416	0,8428	0,8626	0,8500	0,0096	1,1342

DP= Desvio-padrão da média (n=3), CV%=Coeficiente de Variação (n=3)

Figura 29 - Curva analítica do cloridrato de fluoxetina obtida por espectrofotometria a 230 nm a partir de diluições volumétricas da solução-padrão em tampão fosfato pH 6,8.

Tabela 15 - Valores de absorbância obtidas na curva analítica do método para quantificação do cloridrato de fluoxetina em meio tampão fosfato pH 7,5.

Concentração (µg/ml)	Absorbância			Média	DP	CV%
	1° rep.	2°rep.	3°rep.			
5	0,2577	0,2522	0,2524	0,2641	0,0025	1,0023
10	0,4052	0,4126	0,4051	0,4076	0,0035	0,8616
15	0,5428	0,5375	0,5431	0,5428	0,0026	0,4753
20	0,6734	0,6725	0,6785	0,6785	0,0026	0,3915
25	0,8236	0,8238	0,8226	0,8233	0,0005	0,0638

DP= Desvio-padrão da média (n=3), CV%=Coeficiente de Variação (n=3)

Figura 30 - Curva analítica do cloridrato de fluoxetina obtida por espectrofotometria a 230 nm a partir de diluições volumétricas da solução-padrão em tampão fosfato pH 7,5.

5.1.3 Precisão e exatidão

Os resultados da precisão intra-ensaio e inter-ensaio, expressos em coeficiente de variação (CV%) e o valor da exatidão em % em relação à concentração nominal, estão descritos nas Tabelas 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30. A precisão inter-dias foi realizada em dois dias e por dois analistas diferentes. Para a avaliação da precisão do método os coeficientes de variação (CV%) obtidos foram inferiores ao critério mínimo estabelecido 5% pela RE 899/2003, comprovando-se a precisão intra e inter-ensaio do método espectrofotométrico para quantificação do besilato de anlodipino, do fluconazol e do cloridrato de fluoxetina (BRASIL, 2003). O maior valor de coeficiente de variação para o método analítico para determinação do besilato de anlodipino foi de 2,1% em água para precisão intra-ensaio (Tabela 16) e 2,6% em solução de tampão fosfato pH 7,5 para precisão inter-ensaio (Tabela 20). Já para o fluconazol o maior valor para o teste intra-ensaio foi de 1,3% em solução de tampão acetato pH 4,5 (Tabela 23) e para inter-ensaio foi de 2,7% em tampão fosfato pH 6,8 (Tabela 24) para o cloridrato de fluoxetina na precisão intra-ensaio foi de 2,87 (Tabela 29) em solução tampão fosfato pH 6,8 e de 3,95 em tampão HCl pH 1,2 (Tabela 27) na precisão inter-ensaio.

Portanto os valores obtidos para os métodos são bem inferiores ao valor de 5% estabelecido pela legislação.

A avaliação da exatidão foi realizada pela verificação dos mesmos três níveis de concentração da avaliação da precisão do método sendo uma baixa, média e alta de acordo com o item 4.4.2.3.1. Na avaliação de todos os meios, observou-se que a exatidão variou no intervalo de 98,5 – 101,58% para o besilato de anlodipino (tabelas 16, 17, 18, 19 e 20) e de 99,25 – 101,17% para o fluconazol (tabelas 21, 22, 23, 24 e 25) e para o cloridrato de fluoxetina 97,51 e 102,51% (tabelas 26, 27, 28, 29, 30) mostrando, portanto uma boa exatidão em relação ao valor esperado que é de 100%.

Tabela 16 - Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e exatidão intra-ensaio do método analítico para a determinação de besilato de anlodipino em água.

Conc. (µg/ml)	Precisão (CV%)		Exatidão (%)
	Intra-ensaio	Inter-ensaio	
10	1,0	0,1	98,5
15	0,8	0,6	99,8
20	2,1	1,3	99,5

Cada valor representa a média de três determinações

Tabela 17 - Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e exatidão intra-ensaio do método analítico para a determinação de besilato de anlodipino em tampão HCl pH 1,2.

Conc. (µg/ml)	Precisão (CV%)		Exatidão (%)
	Intra-ensaio	Inter-ensaio	
10	0,7	1,5	99,29
15	0,8	2,3	99,56
20	0,7	2,2	101,58

Cada valor representa a média de três determinações.

Tabela 18 - Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e exatidão intra-ensaio do método analítico para a determinação de besilato de anlodipino em tampão acetato pH 4,5.

Conc. (µg/ml)	Precisão (CV%)		Exatidão (%)
	Intra-ensaio	Inter-ensaio	
10	0,5	1,0	100,13
15	0,4	0,1	99,81
20	0,4	1,7	100,37

Cada valor representa a média de três determinações

Tabela 19 - Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e exatidão intra-ensaio do método analítico para a determinação de besilato de anlodipino em tampão fosfato pH 6,8.

Conc. (µg/ml)	Precisão (CV%)		Exatidão (%)
	Intra-ensaio	Inter-ensaio	
10	1,0	2,1	98,64
15	0,5	0,3	99,78
20	0,6	2,0	99,16

Cada valor representa a média de três determinações

Tabela 20 - Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e exatidão intra-ensaio do método analítico para a determinação de besilato de anlodipino em tampão fosfato pH 7,5.

Conc. (µg/ml)	Precisão (CV%)		Exatidão (%)
	Intra-ensaio	Inter-ensaio	
10	0,9	0,5	100,35
15	0,7	2,6	101,00
20	0,8	1,3	100,85

Cada valor representa a média de três determinações.

Tabela 21 - Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e exatidão intra-ensaio do método analítico para a determinação de fluconazol em água.

Conc. (µg/ml)	Precisão (CV%)		Exatidão (%)
	Intra-ensaio	Inter-ensaio	
100	0,7	2,5	99,38
250	0,4	0,2	100,18
350	0,4	0,7	100,45

Cada valor representa a média de três determinações.

Tabela 22 - Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e exatidão intra-ensaio do método analítico para a determinação de fluconazol em tampão HCl 0,1 N pH 1,2

Conc. (µg/ml)	Precisão (CV%)		Exatidão (%)
	Intra-ensaio	Inter-ensaio	
100	0,4	0,8	100,56
250	0,2	1,0	99,60
350	0,5	1,7	99,79

Cada valor representa a média de três determinações.

Tabela 23 - Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e exatidão intra-ensaio do método analítico para a determinação de fluconazol em tampão acetato pH 4,5

Conc. (µg/ml)	Precisão (CV%)		Exatidão (%)
	Intra-ensaio	Inter-ensaio	
100	1,3	0,1	101,17
250	1,0	0,2	100,43
350	0,8	1,0	100,29

Cada valor representa a média de três determinações.

Tabela 24 - Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e exatidão intra-ensaio do método analítico para a determinação de fluconazol em tampão fosfato pH 6,8

Conc. (µg/ml)	Precisão (CV%)		Exatidão (%)
	Intra-ensaio	Inter-ensaio	
100	0,7	2,7	99,20
250	0,5	1,5	99,25
350	0,1	0,8	100,40

Cada valor representa a média de três determinações.

Tabela 25 - Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e exatidão intra-ensaio do método analítico para a determinação de fluconazol em tampão fosfato pH 7,5

Conc. (µg/ml)	Precisão (CV%)		Exatidão (%)
	Intra-ensaio	Inter-ensaio	
100	0,5	0,7	100,62
250	0,5	0,3	100,05
350	0,3	1,1	100,18

Cada valor representa a média de três determinações.

Tabela 26 - Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e exatidão intra-ensaio do método analítico para a determinação de cloridrato de fluoxetina em água

Conc. (µg/ml)	Precisão (CV%)		Exatidão (%)
	Intra-ensaio	Inter-ensaio	
10	0,94	1,52	98,00
15	1,34	1,22	99,25
20	0,61	1,04	98,72

Cada valor representa a média de três determinações.

Tabela 27 - Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e exatidão intra-ensaio do método analítico para a determinação de cloridrato de fluoxetina em tampão HCl pH 1,2

Conc. (µg/ml)	Precisão (CV%)		Exatidão (%)
	Intra-ensaio	Inter-ensaio	
10	0,93	3,95	102,73
15	2,19	2,29	100,65
20	2,78	2,81	100,67

Cada valor representa a média de três determinações.

Tabela 28 - Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e exatidão intra-ensaio do método analítico para a determinação de cloridrato de fluoxetina em tampão acetato pH 4,5

Conc. (µg/ml)	Precisão (CV%)		Exatidão (%)
	Intra-ensaio	Inter-ensaio	
10	1,52	1,44	98,86
15	1,14	1,48	99,55
20	0,64	0,65	99,92

Cada valor representa a média de três determinações.

Tabela 29 - Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e exatidão intra-ensaio do método analítico para a determinação de cloridrato de fluoxetina em tampão fosfato pH 6,8

Conc. (µg/ml)	Precisão (CV%)		Exatidão (%)
	Intra-ensaio	Inter-ensaio	
10	2,54	2,60	98,86
15	2,87	2,79	102,51
20	1,69	1,64	97,51

Cada valor representa a média de três determinações.

Tabela 30 - Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e exatidão intra-ensaio do método analítico para a determinação de cloridrato de fluoxetina em tampão fosfato pH 7,5

Conc. (µg/ml)	Precisão (CV%)		Exatidão (%)
	Intra-ensaio	Inter-ensaio	
10	2,00	1,73	101,06
15	1,07	1,19	98,63
20	0,50	0,75	98,69

Cada valor representa a média de três determinações.

Desta forma, a partir do conjunto de resultados obtidos na avaliação dos parâmetros analíticos, pode-se afirmar que o método por espectrofotometria no UV foi validado para a quantificação do besilato de anlodipino, fluconazol e para o cloridrato de fluoxetina nos meios propostos, água, tampão HCl pH 1,2, tampão acetato pH 4,5, tampão fosfato pH 6,8 e 7,5.

5.2 Validação dos métodos bioanalíticos para a quantificação dos fármacos no estudo de permeabilidade

As etapas de desenvolvimento e validação dos métodos para a quantificação dos fármacos nas amostras provenientes dos estudos de permeabilidade são consideradas grandes desafios para o emprego de técnicas que avaliam a permeabilidade de fármacos. Nos estudos de permeabilidade as concentrações dos fármacos avaliados são reduzidas e em consequência disso, as frações permeadas obtidas nos experimentos são muito baixas (ng), por isso, o método analítico deve apresentar grande sensibilidade, sendo capaz de detectar e quantificar estes baixos níveis, com precisão e exatidão adequados. Outro parâmetro bastante importante a ser considerado é a especificidade do método, que deve ser suficientemente específico para evitar a interferência dos diversos constituintes dos meios empregados nos estudos e compostos oriundos do metabolismo celular que também podem interferir na análise.

5.2.1 Especificidade

Os métodos desenvolvidos demonstraram ser específicos para os analitos em estudo, não ocorrendo interferências perceptíveis em relação aos picos de besilato de anlodipino, fluconazol, cloridrato de fluoxetina, metoprolol e fluoresceína nos tempos de retenção 2,85; 3,2; 3,0; 3,0 e 4,1 respectivamente.

As figuras 31, 32, 33, 34 e 35 representam os cromatogramas de injeções de solução tampão Ringer, da amostra padrão e de tampão Ringer obtida no compartimento receptor de besilato de anlodipino, fluconazol, cloridrato de fluoxetina, metoprolol e fluoresceína respectivamente.

Figura 31 – Cromatogramas (CLAE-UV) de injeções de solução tampão Ringer (branco), Ringer em contato com a membrana (branco membrana) e de solução de besilato de anlodipino 400 ng/mL em solução tampão Ringer pH 7,4.

Figura 32 - Cromatogramas (CLAE-UV) de injeções de solução tampão Ringer (branco), Ringer em contato com a membrana (branco membrana) e de solução de fluconazol 500 ng/mL em solução tampão Ringer pH 7,4.

Figura 33 - Cromatogramas (CLAE-UV) de injeções de solução tampão Ringer (branco), Ringer em contato com a membrana (branco membrana) e de solução de cloridrato de fluoxetina 400 ng/mL em solução tampão Ringer pH 7,4.

Figura 34 – Cromatogramas (CLAE-UV) de injeções de solução tampão Ringer (branco), Ringer em contato com a membrana (branco membrana) e de solução de metoprolol 400 ng/mL em solução tampão Ringer pH 7,4.

Figura 35 – Cromatogramas (CLAE-Fluorescência) de injeções de solução tampão Ringer (branco), Ringer em contato com a membrana (branco membrana) e de solução de fluoresceína 150 ng/mL em solução tampão Ringer pH 7,4.

5.2.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada pela injeção em triplicata de padrão de besilato de anlodipino, cloridrato de fluoxetina, fluconazol, fluoresceína e metoprolol em solução de tampão Ringer nas concentrações descritas no quadro 9.

As curvas analíticas que representam a linearidade para os métodos validados e as equações correspondentes estão representadas nas figuras 36, 37, 38,39 e 40 correspondendo aos fármacos besilato de anlodipino, cloridrato de fluoxetina, fluconazol, metoprolol e fluoresceína respectivamente.

Os métodos de quantificação para o besilato de anlodipino, cloridrato de fluoxetina, fluconazol, metoprolol por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por UV e para a fluoresceína por detecção com fluorescência utilizando o tampão Ringer como diluente, demonstraram linearidade atendendo ao critério mínimo estabelecido ($r^2 > 0,98$) (BRASIL,2003).

Figura 36 - Curva analítica referente ao método analítico desenvolvido para quantificação do besilato de anlodipino em tampão Ringer empregando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) na faixa de 50-1000 ng. Cada ponto representa a média de três determinações.

Figura 37 - Curva analítica referente ao método analítico desenvolvido para quantificação do cloridrato de fluoxetina em tampão Ringer empregando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) na faixa de 40-1000 ng. Cada ponto representa a média de três determinações.

Figura 38 - Curva analítica referente ao método analítico desenvolvido para quantificação do fluconazol em tampão Ringer empregando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) na faixa de 20-1000 ng. Cada ponto representa a média de três determinações.

Figura 39 - Curva analítica referente ao método analítico desenvolvido para quantificação do metoprolol em tampão Ringer empregando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) na faixa de 50-1000 ng. Cada ponto representa a média de três determinações.

Figura 40 - Curva analítica referente ao método analítico desenvolvido para quantificação da fluoresceína em tampão Ringer empregando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-Fluorescência) na faixa de 2-400 ng. Cada ponto representa a média de três determinações.

5.2.3 Limite de quantificação inferior (LQ) e limite de detecção (LD)

Tabela 31 - limites de detecção e de quantificação inferior dos métodos para a quantificação do besilato de anlodipino, fluoxetina, fluconazol, fluoresceína e metoprolol empregando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Fármaco	LD	LQ	Precisão de LQ CV%	Exatidão de LQ (%)
Besilato de anlodipino	10 ng/mL	50 ng/mL	3,08	97,73
Fluoxetina	8 ng/mL	40 ng/mL	1,50	104,80
fluconazol	5 ng/mL	20 ng/mL	2,01	103,65
fluoresceína	2 ng/mL	5 ng/mL	1,16	101,76
metoprolol	10 ng/mL	50 ng/mL	2,33	97,02

5.2.4 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão foram avaliadas em dois níveis: intra-dia e inter-dias em dois dias seguidos.

Os resultados para precisão e exatidão intra-ensaio e inter-ensaio, expressos em coeficiente de variação (CV%) e o valor da exatidão em porcentagem em relação à concentração nominal, para os métodos desenvolvidos para quantificação do besilato de anlodipino, cloridrato de fluoxetina, fluconazol, metoprolol e fluoreseceína em tampão Ringer, estão apresentados nas tabelas 32, 33, 34, 35 e 36 respectivamente.

A avaliação da exatidão foi realizada pela verificação dos mesmos três níveis de concentração da avaliação da precisão do método sendo uma baixa, média e alta (CQB, CQM e CQA) de acordo com o quadro 10.

Os resultados de precisão e exatidão atendem os limites estabelecidos pela legislação vigente no Brasil sobre o tema, pois todos os valores obtidos apresentam desvio menor que 15% na precisão e, na exatidão, as relações entre os valores nominais e obtidos encontram-se na faixa de 85 a 115% (BRASIL, 2003).

Tabela 32 - Precisão e exatidão calculados a partir de 3 níveis de concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para o besilato de anlodipino utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV)

Concentração ng/mL	Precisão		Exatidão	
	Intra-dia n=6	Inter-dias n=12	Intra-dia n=6	Inter-dias n=12
100	2,56	2,40	100,48	100,53
400	0,88	0,96	100,48	100,45
800	0,16	0,32	99,74	100,14

Tabela 33 - Precisão e exatidão calculados a partir de 3 níveis de concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para o cloridrato de fluoxetina utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV)

Concentração ng/mL	Precisão		Exatidão	
	Intra-dia n=6	Inter-dias n=12	Intra-dia n=6	Inter-dias n=12
100	0,19	0,35	96,06	97,15
400	1,15	1,60	97,61	102,42
800	2,26	2,34	98,29	102,18

Tabela 34 - Precisão e exatidão calculados a partir de 3 níveis de concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para o fluconazol utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV)

Concentração ng/mL	Precisão		Exatidão	
	Intra-dia n=6	Inter-dias n=12	Intra-dia n=6	Inter-dias n=12
50	1,91	1,26	99,60	97,70
400	0,82	0,75	100,21	98,33
800	0,81	0,69	102,06	99,37

Tabela 35 - Precisão e exatidão calculados a partir de 3 níveis de concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para o metoprolol utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV)

Concentração ng/mL	Precisão		Exatidão	
	Intra-dia n=6	Inter-dias n=12	Intra-dia n=6	Inter-dias n=12
100	0,30	0,52	96,24	101,88
400	0,42	0,97	104,92	104,56
800	0,29	0,28	101,43	99,74

Tabela 36 - Precisão e exatidão calculados a partir de 3 níveis de concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para a fluoresceína utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-Fluorescência)

Concentração ng/mL	Precisão		Exatidão	
	Intra-dia n=6	Inter-dias n=12	Intra-dia n=6	Inter-dias n=12
5	0,35	0,39	98,94	98,77
150	1,11	0,88	100,14	100,04
300	0,32	0,32	99,91	99,90

5.2.5 Estabilidade

5.2.5.1 Estabilidade curta duração

Os resultados da avaliação da estabilidade de curta duração das amostras padrão de plasma de controle de qualidade (CQB, CQM e CQA) de besilato de anlodipino, cloridrato de fluoxetina, fluconazol, metoprolol e fluoresceína em solução de Ringer mantida a temperatura ambiente por 6 horas estão apresentadas nas tabelas 37, 38, 39, 40 e 41 respectivamente.

Tabela 37 - Estabilidade besilato de anlodipino em tampão Ringer após 6 horas e em temperatura ambiente. Resultados representam a média de três determinações

Conc. (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras em temp. ambiente por 6 horas			
	Conc deter.	Precisão CV%	Exatidão %	Conc deter.	Precisão CV%	Exatidão %	Desvio (%)
100	100,48	2,56	100,48	98,66	0,93	98,66	1,82
400	401,93	0,88	100,48	398,,95	0,11	99,74	0,82
800	797,90	0,16	99,74	797,54	0,04	99,69	0,05

Desvio = desvio em relação à amostra recém-preparada

Tabela 38 - Estabilidade do cloridrato de fluoxetina em tampão Ringer após 6 horas e em temperatura ambiente. Resultados representam a média de três determinações

Conc. (ng/mL)	Amostras recém preparadas			Amostras em temp. ambiente por 6 horas			
	Conc deter.	Precisão CV%	Exatidão %	Conc. deter.	Precisão CV%	Exatidão %	Desvio (%)
100	96,06	0,19	96,06	96,17	0,05	96,17	-0,11
400	97,61	1,15	97,61	391,90	1,39	97,97	-0,36
800	786,28	2,26	98,29	788,62	0,22	98,58	-0,29

Desvio = desvio em relação à amostra recém preparada.

Tabela 39 - Estabilidade do fluconazol em tampão Ringer após 6 horas e em temperatura ambiente. Resultados representam a média de três determinações

Conc. (ng/mL)	Amostras recém preparadas			Amostras em temp. ambiente por 6 horas			
	Conc. deter.	Precisão CV%	Exatidão %	Conc. deter.	Precisão CV%	Exatidão %	Desvio (%)
50	49,80	1,91	99,60	49,87	0,9	99,74	0,07
400	501,05	0,82	100,21	498,81	0,27	99,76	0,45
800	816,48	0,81	102,06	799,14	0,20	99,89	2,17

Desvio = desvio em relação à amostra recém preparada.

Tabela 40 - Estabilidade metoprolol em tampão Ringer após 6 horas e em temperatura ambiente. Resultados representam a média de três determinações

Conc. (ng/mL)	Amostras recém preparadas			Amostras em temp. ambiente por 6 horas			
	Conc. deter.	Precisão CV%	Exatidão %	Conc. deter.	Precisão CV%	Exatidão %	Desvio (%)
100	96,24	0,30	96,24	97,00	0,24	97,00	-0,76
400	419,68	0,42	104,92	410,69	0,08	102,67	2,25
800	811,40	0,29	101,43	807,35	0,06	100,92	0,51

Desvio = desvio em relação à amostra recém preparada.

Tabela 41 - Estabilidade da fluoresceína em tampão Ringer após 6 horas e em temperatura ambiente. Resultados representam a média de três determinações.

Conc. (ng/mL)	Amostras recém preparadas			Amostras em temp. ambiente por 6 horas			
	Conc. deter.	Precisão CV%	Exatidão %	Conc. deter.	Precisão CV%	Exatidão %	Desvio (%)
5	4,95	0,35	98,94	4,89	1,85	97,71	0,69
150	149,70	1,11	100,14	149,77	0,52	99,85	0,29
300	298,20	0,32	99,91	298,26	0,24	99,42	0,49

Desvio = desvio em relação à amostra recém preparada

5.2.5.2 Estabilidade em um ciclo de congelamento e descongelamento

Os resultados de estabilidade dos fármacos em solução de Ringer das amostras analisadas após um ciclo de congelamento e descongelamento indicam que não houve degradação dos mesmos, apresentando precisão e exatidão dentro dos limites estabelecidos.

Os resultados sobre a avaliação da estabilidade das amostras controle de qualidade após um ciclo de congelamento e descongelamento foram obtidos pela comparação dos resultados das soluções congeladas a - 20°C por 48 horas estão apresentados nas tabelas 42, 43, 44, 45 e 46.

Tabela 42 - Estabilidade do besilato de anlodipino em tampão Ringer após 48 h a temperatura de -20°C e descongeladas. Resultados representam a média de três determinações.

Conc. (ng/mL)	Amostras recém preparadas			Amostras congeladas por 48 horas a -20 °C			
	Conc. deter.	Precisão CV%	Exatidão %	Conc. deter.	Precisão CV%	Exatidão %	Desvio (%)
100	100,48	2,56	100,48	98,17	0,55	98,17	2,31
400	401,93	0,88	100,48	398,72	0,32	99,68	0,80
800	797,90	0,16	99,74	798,24	0,21	99,78	-0,04

Desvio = desvio em relação à amostra recém preparada.

Tabela 43 - Estabilidade fluoxetina em tampão Ringer após 48 h a temperatura de -20°C e descongeladas. Resultados representam a média de três determinações.

Conc. (ng/mL)	Amostras recém preparadas			Amostras congeladas por 48 horas a -20 °C			
	Conc.	Precisão	Exatidão	Conc.	Precisão	Exatidão	Desvio
	deter.	CV%	%	deter.	CV%	%	(%)
100	96,06	0,19	96,06	96,83	0,32	96,83	-0,77
400	97,61	1,15	97,61	388,54	0,64	97,14	0,47
800	786,28	2,26	98,29	794,89	0,23	99,36	-1,08

Desvio = desvio em relação à amostra recém preparada.

Tabela 44 - Estabilidade fluconazol em tampão Ringer após 48 h a temperatura de -20°C e descongeladas. Resultados representam a média de três determinações.

Conc. (ng/mL)	Amostras recém preparadas			Amostras congeladas por 48 horas a -20°C			
	Conc.	Precisão	Exatidão	Conc.	Precisão	Exatidão	Desvio
	deter.	CV%	%	deter.	CV%	%	(%)
50	49,80	1,91	99,60	48,65	1,06	97,30	2,30
400	501,05	0,82	100,21	493,29	0,03	98,66	1,55
800	816,48	0,81	102,06	800,52	0,25	100,06	2,00

Desvio = desvio em relação à amostra recém preparada.

Tabela 45 - Estabilidade metoprolol em tampão Ringer após 48 h a temperatura de -20°C e descongeladas. Resultados representam a média de três determinações.

Conc. (ng/mL)	Amostras recém preparadas			Amostras congeladas por 48 horas a -20 °C			
	Conc.	Precisão	Exatidão	Conc.	Precisão	Exatidão	Desvio
	deter.	CV%	%	deter.	CV%	%	(%)
100	96,24	0,30	96,24	97,86	0,70	97,86	-1,62
400	419,68	0,42	104,92	407,86	0,11	101,97	2,95
800	811,40	0,29	101,43	794,5	0,07	99,31	2,12

Desvio = desvio em relação à amostra recém preparada.

Tabela 46 - Estabilidade da fluoresceína em tampão Ringer após 48 h a temperatura de -20°C e descongeladas. Resultados representam a média de três determinações

Conc. (ng/mL)	Amostras recém preparadas			Amostras em temp. ambiente por 6 horas			
	Conc.	Precisão	Exatidão	Conc.	Precisão	Exatidão	Desvio
	deter.	CV%	%	deter.	CV%	%	(%)
5		0,35	98,94	4,87	1,64	97,43	1,51
150		1,11	100,14	149,09	0,23	99,39	0,75
300		0,32	99,91	297,58	0,31	99,19	0,72

Desvio = desvio em relação à amostra recém preparada.

5.3 Teste de solubilidade

5.3.1 Besilato de anlodipino

O fármaco besilato de anlodipino é uma base fraca com pK_a de 8,9, descrito como ligeiramente solúvel em água em diferentes farmacopeias (MERCK & COMPANY INCORPORATED, 2010 PH. EUR, 2007; USP, 2010).

Muitos dados relativos à solubilidade de fármacos encontrados na literatura são calculados a temperatura ambiente (25°C), e, nesta condição, a solubilidade encontrada para o besilato de anlodipino é de 0,75 mg/mL (DRUG-BANK, 2010). Sabe-se que a temperatura pode influenciar na solubilidade dos fármacos. O valor de solubilidade do fármaco obtido no experimento em água a 37°C, apresentado na Tabela 47, é consideravelmente maior do que a encontrada na literatura, provavelmente em decorrência da diferença de temperatura.

Para o teste de solubilidade, as condições estão descritas no item 4.7 e os valores obtidos estão representados na Tabela 47 e na Figura 41. Maiores valores de solubilidade foram encontrados em meios ácidos (pH 1,2; 4,5 e água pH 5,5), o que é esperado para uma base fraca. Como o pK_a da molécula do besilato de anlodipino é de 8,6, quanto menor o pH do meio, mais a molécula estará na sua forma ionizada e portanto maior será a sua solubilidade. Esse comportamento pode ser observado nos experimentos, pois com o aumento do pH da solução aquosa houve a diminuição da solubilidade. Por esta razão o menor valor encontrado foi no tampão fosfato pH 7,5 (Tabela 47 e Figura 41), por ser este o valor mais próximo do seu pK_a e quanto maior essa proximidade, menor o grau de ionização.

SHAIKH e colaboradores (2010) realizaram um estudo de solubilidade com o besilato de anlodipino utilizando pH na faixa fisiológica (valores de pH 1,2; 4,0; 6,8; 7,4), por 60 minutos. Apesar dos valores de solubilidade não serem reportados no trabalho, o meio em que o fármaco apresentou maior solubilidade foi o tampão pH 1,2.

SHOHIN e colaboradores (2010) realizaram estudo da cinética de dissolução de comprimidos de besilato de anlodipino, nas condições propostas para obtenção de bioequivalência (pHs 1,2; 4,5 e 6,8). O meio em que houve maior

porcentagem de fármaco dissolvido em um menor tempo foi o de tampão HCl pH 1,2 .

Tabela 47 - Solubilidade do besilato de anlodipino em diferentes meios a 37,0°C.

pH	Solubilidade (mg/mL)	Dose:solubilidade (mL)	pH ao final do experimento
pH 1,2	6,94	1,44	1,16
pH 4,5	2,35	4,24	4,45
Água pH 5,5	2,28	4,38	5,46
pH 6,8	1,10	9,09	6,77
pH 7,5	0,88	11,36	7,50

Figura 41 - Solubilidade do besilato de anlodipino em diferentes pHs.

5.3.2 Fluconazol

Para o fluconazol as condições do teste foram as descritas no item 4.7. O fluconazol é uma base fraca com pKa de 2,0 (MERCK & COMPANY INCORPORATED, 2010).

A solubilidade do fluconazol em água a 37° C encontrada na literatura foi de 8 mg/mL, valor bem próximo do encontrado no experimento realizado que foi de 8,8 mg/mL (PFIZER, 2012).

Como o único pH menor que o pKa do fármaco foi o de tampão HCl pH 1,2, este meio foi o que apresentou maior solubilidade (14,4 mg/mL). Os valores de solubilidade nos outros pHs estão apresentados na Tabela 48 e na Figura 42. Como em meio com pH acima do seu pKa as moléculas estão menos ionizadas em relação a um de menor pH, os valores de solubilidade nos outros meios foram mais próximos um em relação ao outro e bem menores quando comparados com o resultado obtido no tampão HCl pH 1,2.

Tabela 48 - Solubilidade do fluconazol em diferentes meios a 37,0 °C

Meios avaliados	Solubilidade (mg/mL)	Dose:solubilidade (mL)	pH ao final do experimento
pH 1,2	14,40	13,88	1,69
pH 4,5	9,16	21,83	4,59
Água pH 5,5	8,80	22,72	6,05
pH 6,8	8,34	23,98	6,82
pH 7,5	8,22	24,33	7,49

Figura 42 - Solubilidade do fluconazol em diferentes pHs.

5.3.3 Cloridrato de Fluoxetina

Assim como para os outros fármacos descritos anteriormente as condições do estudo de solubilidade estão descritas no item 4.7.

O cloridrato de fluoxetina é uma base fraca descrita como ligeiramente solúvel em água, com o pKa de 8,7 (MERCK & COMPANY INCORPORATED, 2010). O valor de solubilidade em água reportado na literatura é de 30 mg/mL esse valor foi obtido à temperatura ambiente (KASSIN, *et al.*, 2003). Esse valor reportado é inferior ao resultado obtido no experimento conduzido a 37°C (Tabela 49 e figura 43), demonstrando que a temperatura realmente influencia nos valores de solubilidade.

Para o cloridrato de fluoxetina assim como para o besilato de anlodipino quanto para o fluconazol, à relação solubilidade-pka foi estabelecida, pois, os valores de maior solubilidade foram obtidos nas soluções com o pH menores que o pKa da molécula e à medida que o valor do pH se aproximava do valor do pKa, a solubilidade era reduzida.

Tabela 49 - Solubilidade do cloridrato de fluoxetina em diferentes meios a 37°C

Meios avaliados	Solubilidade (mg/mL)	Dose:solubilidade (mL)	pH ao final do experimento
pH 1,2	12,93	1,55	1,30
pH 4,5	44,11	0,45	4,55
Água pH 5,5	44,36	0,45	6,00
pH 6,8	7,16	2,79	6,83
pH 7,5	5,12	3,91	7,48

Figura 43 - Solubilidade do cloridrato de fluoxetina em diferentes pHs.

5.4 Relação dose:solubilidade e Classificação Biofarmacêutica

O critério de solubilidade definido pelo SCB para classificar um fármaco como altamente solúvel requer que a dose mais alta comercializada do fármaco seja solúvel a 37°C $\pm$ 1°C em 250 mL ou menos de solução aquosa na faixa de pH 1,0 – 7,5 de acordo como o guia da FDA (FDA, 2000).

Como a forma farmacêutica com a maior dosagem para o besilato de anlodipino comercializado no mercado farmacêutico é de 10 mg, do fluconazol é de 200 mg e da fluoxetina é 20 mg, as relações dose:solubilidade para os três fármacos avaliados foram calculadas com base nestes valores (Tabelas 47, 48 e 49). Portanto a quantidade de meio necessária para solubilizar os

fármacos é muito menor do que o volume de 250 mL preconizado pela FDA (2000), sendo assim, de acordo com essa agência regulatória o besilato de anlodipino o fluconazol e o cloridrato de fluoxetina podem ser considerados como de alta solubilidade, podendo ser dispostos tanto na Classe I como III, necessitando dos resultados de permeabilidade para enquadrá-los adequadamente em uma dessas classes.

5.5 Estudo de permeabilidade

5.5.1 Avaliação da integridade das membranas utilizadas nos experimentos

A viabilidade das membranas utilizadas nos experimentos de permeabilidade é um pré-requisito indispensável para a confiabilidade dos resultados obtidos. O emprego da resistência transepitelial (RET) como indicativo da integridade da membrana intestinal tem sido bastante difundido nas técnicas em que empregam segmentos intestinais de rato. Adequadas correlações entre valores de RET e a permeabilidade de compostos que são absorvidos pela via paracelular foram obtidos.

Outra maneira de se determinar a integridade e viabilidade das membranas intestinais utilizadas nos estudos de permeabilidade é através da determinação da permeabilidade de compostos que apresentam dados de permeabilidade já conhecidos. Muitos fármacos são utilizados para essa finalidade. Dentre esses podem ser destacados o manitol, a digoxina, o metoprolol, a cimetidina e a fluoresceína (AUGUSTINJS, MOLS, 2004; KOLJONEN *et al.*, 2006).

A integridade do segmento intestinal utilizado nos estudos de permeabilidade foi avaliada pela aferição da RET com o Millicell®-ERS.

A RET foi verificada em dois momentos: antes e após o experimento de permeabilidade. O segmento que apresentasse um valor de RET inferior a 20 Ω . cm seria considerado de baixa viabilidade sendo imediatamente excluído do estudo. O tecido foi considerado viável quando o valor diminuiu em até 15% do valor inicial, caso houvesse uma variação maior, a célula em que a membrana

estava montada seria descartado (POLENTARUTTI *et. al.*, 1999; HASLAM *et. al.*, 2011)

Como demonstrado na tabela 50, a resistência foi praticamente estável para todos os segmentos do intestino durante o experimento.

Tabela 50 - Valores de resistência transepitelial (RET) do segmento intestinal empregados nos ensaios de permeabilidade

Fármaco	RET ($\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$)	
	Antes	Depois
Besilato de anlodipino	33,33 $\pm$ 1,10	31,67 $\pm$ 0,80
Fluconazol	31,33 $\pm$ 2,20	29,50 $\pm$ 1,70
Cloridrato de fluoxetina	30,83 $\pm$ 1,80	29,00 $\pm$ 1,30
Metoprolol	33,83 $\pm$ 1,50	31,33 $\pm$ 1,90
Fluoresceína	30,50 $\pm$ 1,90	28,33 $\pm$ 1,60

Valores representam média de 6 determinações $\pm$ DP

5.5.2 Avaliação da permeabilidade dos fármacos

Atualmente, com o advento da bioensação vários modelos para a avaliação da permeabilidade de fármacos são propostos, dentre eles destacam-se os métodos *in vitro*, *in situ* e *in silico*. No entanto, os dados obtidos a partir de diferentes modelos, ou até de um mesmo modelo, para um mesmo fármaco pode variar significativamente entre laboratórios, embora tenham sido estabelecidas correlações semelhantes com a fração absorvida em seres humanos. Diferenças podem ocorrer devido ao uso de materiais ou equipamentos diferentes, sexo do animal ou linhagem celular entre outros fatores, por isso, é de grande importância uma padronização intralaboratorial e interlaboratorial dos modelos de absorção de fármacos (HASLAM *et al.*, 2011; ARTURSSON *et al.*, 2001). Esses fatores devem ser levados em conta para a adequação dos modelos de permeabilidade principalmente para efeitos de SCB onde, para que seja solicitado a bioensação para lançamento de genéricos no mercado, deve haver uma comparação do fármaco investigado com um padrão interno de alta e de baixa permeabilidade (HASLAM *et al.*, 2011).

O metoprolol geralmente é utilizado como padrão de alta permeabilidade nos estudos de permeabilidade de fármacos por apresentar uma fração absorvida de 95% em humanos e devido a grande quantidade de estudos publicados na literatura com dados sobre as suas propriedades de absorção e permeabilidade (SEILE *et al.*, 1980; REGARTH *et al.*, 1983; KIM *et al.*, 2006; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2007). Além disso, o fármaco é proposto como padrão interno de alta permeabilidade pelo FDA (FDA, 2000).

Alguns fármacos têm sido utilizados como marcadores de baixa permeabilidade. Destacam-se, entre estes compostos, o manitol e a fluoresceína, que são utilizados como padrão de baixa permeabilidade e também como marcadores para avaliar a integridade da membrana por apresentarem sua permeabilidade apenas pela via paracelular (HIDALGO *et al.*, 1993). O grande problema do manitol é que o método para sua quantificação é bastante limitado, pois o fármaco deve ser radiomarcado. Tal artifício permite uma rápida e sensível quantificação. Entretanto, por requerer uma certa estrutura infra-estrutura para utilizar compostos radiomarcados, tornava inviável o seu emprego.

A fluoresceína foi empregada no presente trabalho por ser um composto de fácil quantificação, não sendo necessária, a utilização de compostos radiomarcados. Sua estabilidade no meio em que o estudo foi realizado, sua fácil quantificação por método sensível (CLAE-fluorescência) e características de permeabilidade bem estabelecidas, a tornam um dos compostos empregados na padronização da técnica de avaliação da permeabilidade de compostos por métodos *in vitro* (KOLJONEN *et al.*, 2006; BERGINC *et al.*, 2007).

Figura 44 - Quantidade permeada de metoprolol em ng através do segmento intestinal de rato em função do tempo. Média de 6 determinações. Barras indicam desvio padrão.

Figura 45 - Quantidade permeada de fluoresceína em ng através do segmento intestinal de rato em função do tempo. Média de 6 determinações. Barras indicam desvio padrão.

Figura 46 - Quantidade permeada de besilato de anlodipino em ng através do segmento intestinal de rato em função do tempo. Média de 6 determinações. Barras indicam desvio padrão.

Figura 47 - Quantidade permeada de fluconazol em ng através do segmento intestinal de rato em função do tempo. Média de 6 determinações. Barras indicam desvio padrão.

Figura 48 - Quantidade permeada cloridrato de fluoxetina em ng através do segmento intestinal de rato em função do tempo. Média de 6 determinações. Barras indicam desvio padrão.

As figuras 44, 45, 46, 47 e 48 demonstram um aumento da quantidade dos fármacos em relação ao tempo do experimento, demonstrando que o método apresentou uma boa linearidade e não houve indício de saturação, no decorrer dos experimentos.

Tabela 51 - Valores médios de permeabilidade aparente (Papp) obtidas a partir dos resultados dos ensaios de permeabilidade com os fármacos besilato de anlodipino, fluconazol, cloridrato de fluoxetina, metoprolol e fluoresceína e valores de Log P e Fração absorvida disponíveis na literatura.

Fármacos	Papp ($\times 10^{-5}$ cm/s) *	Log P	Fração absorvida (Fa) %
Metoprolol	4,39	1,72 (1)	95(8)
Fluoresceína	0,17	-0,67 (2)	N.E
Besilato de anlodipino	0,90	1,90 (3)	90 (3)
Fluconazol	1,71	0,90 (4)	90 (5)
Cloridrato de fluoxetina	3,29	1,98 (6)	80 (7)

*Os valores representam a média de seis determinações. NE= não encontrado.

Fonte: (1) KASSIN, *et al.*, 2003 (2); (3) DRUGBANK, 2012b (4) TSRLINC, 2012; (5) DRUGBANK, 2012c; (6) KRISTENSEN, *et al.* 1999; (7) DRUGBANK, 2012b; (8) MERCK & COMPANY INCORPORATED, 2012).

Figura 49 - Perfis de permeabilidade aparente para os fármacos metoprolol, fluoresceína, besilato de anlodipino, fluconazol, cloridrato de fluoxetina.

Kassin e colaboradores (2003) publicaram um artigo em que propõem uma Classificação Biofarmacêutica provisória da lista de medicamentos essenciais da WHO levando em conta as propriedades moleculares dos fármacos. Nesse estudo, os fármacos que possuíam uma alta solubilidade e

um logP maior que o do metoprolol (1,72) foram considerados como fármacos de alta permeabilidade, sendo assim, o besilato de anlodipino (log P 1,90) e o cloridrato de fluoxetina (log P 1,98) seriam classificados como classe I (alta solubilidade e alta permeabilidade) e o fluconazol (log P 0,99) como classe III (alta solubilidade e baixa permeabilidade).

Apesar de o cloridrato de fluoxetina ser um fármaco de alta permeabilidade, a sua Fa é de 80%, isso ocorre porque ele é extensivamente metabolizado no fígado pelos hepatócitos dando origem a vários metabólitos sendo que o principal é a norfluoxetina que em modelos animais demonstrou ação equivalente à fluoxetina (RYH-NAN *et al.*, 2002). Alguns métodos *in vitro* que utilizam tecido animal ou cultivo celular podem até prever uma fração do metabolismo pré-sistêmico, mas, somente aquela que ocorre nos enterócitos, não considera, por sua vez, o metabolismo de primeira passagem que ocorre no fígado (XIANHUA *et. al.*, 2006).

O fluconazol apesar de apresentar o log P inferior ao do metoprolol possui um alto valor de Fa (Tabela 51) que o caracteriza como fármaco de alta permeabilidade. No experimento realizado, o fluconazol obteve um valor intermediário de Papp.

Para o benzilato de anlodipino os valores do log P e a Fa (tabela 51) caracterizam este fármaco como sendo de alta permeabilidade, porém, o valor do Papp (tabela 51) obtido no experimento foi característico de fármaco de baixa permeabilidade.

De acordo com SCB, os resultados de Papp e solubilidade obtidos para o cloridrato de fluoxetina, indicam que este fármaco pode ser classificado como da classe I, já o fluconazol por ter apresentado uma Papp intermediária e o besilato de anlodipino baixa, os dois fármacos podem ser classificados como da classe III. Porém, tanto o besilato de anlodipino quanto fluconazol possuem uma Fa alta ($\geq 90\%$). A não correlação da Papp com a fração absorvida pode ser em decorrência da ausência de condições que representam impacto na absorção *in vivo* do método proposto para o estudo de permeabilidade.

Principais fatores *in vivo* que podem ter impacto na absorção de fármacos: expressão de transportadores, variação do pH no trato gastrointestinal, ligação dos fármacos às proteínas plasmáticas, presença de

muco entre outros fatores (XIANHUA *et al.*, 2006; YAMASHIDA, *et al.*, 2000; FOSSATI, 2008; NEUHOFF, *et al.*, 2005).

Apesar da maior parte dos fármacos serem absorvidos através da membrana intestinal por transporte passivo, o transporte mediado por carreadores também é um importante mecanismo para absorção de fármacos (XIANHUA *et al.*, 2006).

Dados obtidos a partir de modelos *in vitro* de absorção (Papp), tais como a permeabilidade de segmentos intestinais de rato em Câmaras Ussing, *in situ* e a permeabilidade em células Caco-2 se correlacionam bem com a os dados de permeabilidade intestinal *in vivo* usando a técnica Loc-I-Gut. Tal correlação ocorre principalmente para fármacos em que absorção pela difusão passiva é o principal mecanismo de absorção (LENNERNAS, 1997.; FAGERHOL, *et al.*, 1996). Desta forma, modelos que utilizam segmentos intestinais de rato têm sido recomendados como um bom modelo para a previsão da absorção em humanos, quando o mecanismo de absorção predominante for por difusão passiva (FAGERHOL *et al.* 1996; UNGELL *et al.* 1998; CAO *et al.*, 2006). Já para absorção mediada por transportadores, essa correlação já não é tão eficiente, uma vez que as técnicas *in vitro* podem apresentar significativas divergências quanto à expressão de transportadores ativos de fármacos o que em muitos casos, pode ser o responsável pela falta de correlação de dados obtidos por esta técnica com os resultados de um estudo *in vivo*. (FAGERHOL, 1996; CAO *et al.*, 2006).

Assim como para o fluconazol e o benzilato de alodipino, o baixo valor de Papp obtido pode ser em decorrência da reduzida expressão de transportadores no modelo empregado.

A utilização de muco simulado (mucina) no compartimento apical e de proteínas sanguíneas no basolateral, são artifícios empregados para otimizar a determinação da permeabilidade de fármacos, nas técnicas *in vitro*. Tais compostos adicionados ao experimento podem evitar potenciais interferências que são consideradas limitações à técnica (YAMASHITA *et al.*, 2000; FOSSATI, 2008).

Na maioria dos trabalhos publicados, o uso do soro fetal bovino no compartimento basolateral tem demonstrado ser um fator de melhoria dos valores de permeabilidade principalmente para os fármacos que possuem uma

alta ligação às proteínas plasmáticas, com características hidrofóbicas (KRISHNA *et al.*, 2001; AUNGST *et al.*, 2004). Segundo estes autores, a presença de soro no compartimento basolateral serve como um reservatório para o fármaco, impedindo que este retorne no sentido inverso de absorção e ou se acumule no interior da célula.

Na avaliação da permeabilidade de fármacos, é importante avaliar o transporte tanto no sentido absorptivo (A-B) quanto no secretório (B-A), os valores obtidos de Papp podem indicar se há envolvimento de mecanismo de transporte ativo de efluxo para os fármacos, possivelmente por ação da P-gp (MAKHEY *et al.*, 1998).

Um aspecto importante que deve ser levado em consideração nos métodos que avaliam a permeabilidade é gradiente de pH ao longo do trato gastrointestinal. O pH luminal é dependente do segmento intestinal envolvido (em seres humanos: duodeno: 5-7, jejuno: 6-7, íleo: 7, cólon: 5,5-7), enquanto que o pH do sangue varia entre 7,2 e 7,4, indicando que, sob condições fisiológicas o pH no lado basolateral é maior do que o pH no lado luminal (NEUHOFF *et al.*, 2005; KARARLI, 1995). De acordo com o pKa da molécula, o pH determina o carga dos fármacos (ácidos fracos e bases fracas), sendo que dependendo do valor de pH o fármaco pode estar na sua forma ionizada ou não ionizada. Quando a substância encontra-se na sua forma não ionizada o transporte passivo é favorecido.

O valor do pH apical pode ou não afetar a absorção de fármacos. Em um estudo em que foi avaliada a permeabilidade do tacrolimus, verificou-se que a permeabilidade deste fármaco não é afetada pelo pH. Já a permeabilidade da angiotensina II, aumenta drasticamente quando a redução do pH apical 7,4 para 6,0 (BOISSET *et al.* 2000).

Dessa forma, os resultados de Papp apresentados para os fármacos fluconazol e bensilato de anlodipino, no presente estudo, necessitam ser avaliados frente aos possíveis fatores que podem ter impacto significativo na permeabilidade e, conseqüentemente, na correlação desses dados *in vitro* com os dados de Fa apresentados por estes compostos.

6 – CONCLUSÕES

- Os métodos desenvolvidos e validados para a quantificação do besilato de anlodipino, fluconazol e cloridrato de fluoxetina por espectrofotometria na região do UV cumpriram com as especificações estabelecidas para a validação de métodos analíticos, como especificidade, linearidade, precisão e exatidão, nos meios propostos para o estudo de solubilidade: água, tampão HCl pH 1,2, tampão acetato pH 4,5, tampão fosfato pH 6,8 e 7,5.
- Os métodos bioanalíticos desenvolvidos e validados para a quantificação do besilato de anlodipino, fluconazol, cloridrato de fluoxetina, metoprolol e fluoresceína no meio em que foram realizados os estudos de permeabilidade, demonstraram adequada sensibilidade, reprodutibilidade, especificidade, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade.
- De acordo com o SCB, os fármacos besilato de anlodipino, fluconazol e o cloridrato de fluoxetina podem ser considerados como de alta solubilidade, já que a razão dose:solubilidade máxima em cada meio encontrada foi menor do que 250 mL, considerando todos os meios testados e a maior dose comercializada para cada fármaco.
- Os resultados de permeabilidade aparente obtidos, nas condições experimentais do estudo, sugerem que o besilato de anlodipino possui uma permeabilidade baixa, o fluconazol moderada e o cloridrato de fluoxetina alta.
- De acordo com os resultados obtidos nos experimentos e dados de fração absorvida em humanos dos fármacos o cloridrato de fluoxetina pode ser enquadrado na Classe I do SCB. Já o besilato de anlodipino e o fluconazol podem ser enquadrados na Classe III do SCB, porém devido a alta fração absorvida *in vivo* de ambos, faz-se necessária a avaliação de quais fatores poderiam ser otimizados na técnica utilizada no presente estudo (condições experimentais) para que levasse a uma correlação dos dados com a fração absorvida *in vivo*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AKEJ, S., STURM, K., KRISTL, A. Ciprofloxacin permeability and its active secretion through rat small intestine in vitro. *Int J. Pharm.*, v. 313, n. 1, p.175-180, 2006.
2. AMIDON, G.L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm. Res.*, v.12, n.3, p.413-420, 1995.
3. ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA: Redução no Custo de Tratamento. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/cidadao/redu%E7aodecusto.pdf> [acesso em 05 jul 2009].
4. ARTURSSON, P; UNGELL, A. L.; LOFROTH, J. E. Selective paracellular permeability in two models of intestinal absorption: Cultured monolayers of human intestinal epithelial cells and rat intestinal segments. *Pharm Res.* v. 10, p. 1123–1129, 1993.
5. ARTURSON, P.; BORCHARD, R. T. Intestinal drug and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond. *Pharm. Res.*, v. 14, n.12, p. 1655-1658, 1997.
6. ARTURSSON, P.; KATRIN, P.; KRISTINA, L. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced Drug Delivery Reviews.* v. 46, p. 27–43, 2001.
7. ATISOOK, K.; CARLSON, S.; MADARA, J.L. Effects of phlorizin and sodium on glucose-elicited alterations of cell junctions in intestinal epithelia. *Am. J. Physiol.*, v. 258, p. 77-85, 1990.
8. AUNGST, B. J.; MASAKO, O.; HIROSHI, S; KOBAYASHI, S. M.; Beta-Cyclodextrin as a suitable solubilizing agent for in situ absorption study of poorly water-soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics.* v. 280, p. 95-102, 2004.
9. AVDEEF, A. Physicochemical profiling solubility, permeability and charge state). *Curr. Topics Med. Chem.* V. 1, p. 277-351, 2001.
10. BALIMANE, P.V.; CHONG, S.; MORRISON, R.A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, v.44, p. 301-312, 2000.
11. BALIMANE, P.V.; CHONG, S. Cell culture-based models for intestinal permeability: A critique. *Drug. Discov. Today* v. 10, p. 335 – 343, 2005.

12. BARRY, BW: *Dermatological Formulations: Percutaneous Absorption*, New York, Marcel Dekker. v. 18, p 264–280, 1983
13. BARTHE, L.; WOODLEY, J.F.; KENWORTHY, S.; HOUIN, G. An improved everted gut sac as a simple and accurate technique measure paracellular transport across the small intestine. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, v. 23, p. 313-323, 1998.
14. BENET L. Z.; CUMMINS, C. L.; WU, C. U. Unmasking the dynamic interplay between efflux transporters and metabolic enzymes. *Int. J. Pharm.* v. 227, p. 3-9, 2004.
15. BERESFORD, A.P.; SEGALL, M.; TARBIT, M. H.: In silico prediction of ADME properties: are we making progress? *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.* v. 7. p. 36-42, 2004.
16. BERGINC, K.; ZAKELJ, S.; LEVSTIK, L.; URSIC, D.; KRISTL, A. Fluorescein transport properties across artificial membranes, Caco-2 cell monolayers and rat jejunum. *Eur. Jour. of Pharm. and Biopharm.* v. 66. p. 281-287, 2007.
17. BOISSET, M.; BOTHAM, R. P.; HAEGELE, K. D.; LENFANT, B.; PACHOT, J. I. Absorption of angiotensin II antagonists in Ussing chambers, Caco-2, perfused jejunum loop and in vivo: importance of drug ionisation in the in vitro prediction of in vivo absorption. *Eur. J. Pharm. Sci.* v.10, p. 215-24, 2000.
18. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RE nº 899, 29 de maio de 2003. Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, 02 de junho de 2003.
19. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC Nº 37, DE 3 DE AGOSTO DE 2011. Dispõe sobre o Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência e dá outras providências. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0037_03_08_2011.html. Acesso 20 junho. 2012
20. BRASIL. Portaria MS/GM n.º 2012, de 24 de setembro de 2008. Aprova a 6ª edição da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME).

Disponível em <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/prt2012_24_09_2008.html

21. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. VISALEGIS. RE nº 1170, de 19 de abril de 2006. Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=21746&word=>. Acesso em: 27 julho. 2009.
22. BRASIL. Lei nº. 9.787, de 10 de fevereiro de 1999. Altera a Lei 6.360, de 23 de Setembro de 1976, que dispõe sobre a Vigilância Sanitária, Estabelece o Medicamento Genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos. Diário Oficial da União, Brasília, p.1 coluna 1, 11 de Fevereiro de 1999.
23. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 901, de 29 de maio de 2003: Determina a publicação do "Guia para ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (FFSOLI)". Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php>. Acesso em 04 de março de 2010.
24. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a Resolução – RDC Nº 37, de 3 de Agosto, 2011 que dispõe sobre o Guia para isenção e substituição de estudos de BD relativa/ BE, Disponível em: <http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/anvisa/109151-37.html>. Acesso em 10 Junho de 2012.
25. BRESSOLE, F.; BROMET-PETIT, M.; M. AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods: applications to pharmacokinetics. *Journal of Chrom., B: Biomedical Sciences and Applications*, v. 686, n. 1, p. 3-10, 1996.
26. BURTON, P. S.; CONRADI, R. A.; GI, N. F. H.; HILGERS, A. R.; BOUCHARDT, R. T. How structural features influence the biomembrane permeability of peptides. *J. Pharm. Sci.* v. 85, p. 1336-1340, 1996.
27. CAMENISCH, G.; ALSENZ, J.; VAN DE WATERBEEMD, H.; FOLKERS, G. Estimation of permeability by diffusion through Caco-2 cell monolayers using the drugs lipophilicity and molecular weight. *Eur. J. Pharm. Sci.* v. .4, p. 313-319, 1998.

28. CAO, X.; GIBBS, S. T.; FANG, L.; MILLER, H. A.; LANDOWSKI, C. P.; SHIN, H.; LENNERNAS, H.; ZHONG, Y.; AMIDON, G. L.; YU, X. L.; SUN, D. Why is it Challenging to Predict Intestinal Drug Absorption and Oral Bioavailability in Human Using Rat Model. *Pharmaceutical Research*, v. 23 , p. 1675-1686, 2006.
29. CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: Viewpoint and discussion. *J. Chromatog. B.: Biomed. Sci appl.* v.689, p. 269-282, 1997.
30. CHEN, Y; PING, Q.; GUO, J.; WENLI, L.; GAO, J. The absorption behavior of cyclosporin A lecithin vesicles in rat intestinal tissue. *Int. J. Pharm.*, v. 261, p.21-26, 2003.
31. CHIOU, W.L., BARVE, A. Linear correlation of the fraction of oral dose absorbed of 64 drugs between humans and rats. *Pharm. Res.* v.15, p.1792-1795, 1998.
32. CHIOU, W. L.; MA, C.; CHUNG, S. M.; WU, T.C.; JEONG, H. Y. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* v. 38, p. 532-539, 2000.
33. CHONG, S.; DANDO, S. A.; SOUCEK, K. M.; MORRISON, R. A. *In vitro* permeability through Caco-2 cells is not quantitatively predictive of *in vivo* absorption peptide-like drugs absorbed via the peptide transporter system. *Pharm. Res.*, v. 13, p. 120-123, 1996.
34. 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.
35. DEFERME, S.; VAN GELDER, J.; AUGUSTIJNS, P. Inhibitory effects of fruit extracts on P-glycoprotein-related efflux carriers: An in-vitro screening. *J. Pharm. Pharmacol.* v. 54, p. 1–7, 2002.
36. DI PIETRO, A.; DAYAN, G.; CONSEIL, G.; STEINFELS, E. KRELL, T.; TROMPIER, D.; BAUBICHON-CORTAY, H.; JAULT, J. M. P-glycoprotein-mediated resistance to chemotherapy in cancer cells: using recombinant cytosolic domains to establish structure-function relationships. *Braz J Med Biol Res.*, vol.32, no.8, p.925-939, 1999.
37. DRESSMAN, J. B.; GUPTA, E.; BARENDs, D. M.; YAMASHITA, E.; LENTZ, K. A.; HARMZE, A. M.; SHAH, V.P.; LIPPER, R. A. Review of

- global regulations concerning biowaivers for immediate release solid oral dosage forms. *Eur J Pharm Sci.*, v. 29, n.34, p. 315-324, 2006.
38. DRUG BANK, base de dados. Drug card for fluoxetine 2012. Disponível em: [http:// www.drugbank.ca/drugs/DB00381](http://www.drugbank.ca/drugs/DB00381). Acesso em 20 de janeiro de 2012a.
 39. DRUG BANK, base de dados. Drug card for Amlodipine 2012. Disponível em: [http:// www.drugbank.ca/drugs/DB00381](http://www.drugbank.ca/drugs/DB00381). Acesso em 20 de janeiro de 2012b.
 40. DRUG BANK, base de dados. Drug card for fluconazole 2012. Disponível em: [http:// www.drugbank.ca/drugs/DB00381](http://www.drugbank.ca/drugs/DB00381). Acesso em 20 de janeiro de 2012c.
 41. DUDEJA, P. K.; HARIG, J. M.; WALI, R. K.; KNAUP, S. M.; RAMASWAMY, K.; BRASITUS, T. A. Differential modulation of human small intestinal brush-border membrane hemileaflet fluidity affects leucine aminopeptidase activity and transport of D-glucose and L-glutamine. *Arch. Biochem. Biophys.* V. 284, p. 338-345, 1991.
 42. EKINS, S.; BOULANGER, B.; SWAN, P. W.; HUPCEY, M. A. Z. Towards a new age of virtual ADME/Tox and multidimensional drug discovery. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* v. 16, p. 381-401, 2002
 43. EMA. Concept paper on BCS-based biowaiver. Londres: EMA, 2007. 3p.
 44. European Pharmacopoeia, 6th ed.; European Directorate for the Quality of Medicines, Council of Europe: Strasbourg, France, 2007.
 45. FAGERHOL, U.; JOHANSSON, M.; LENNERNAS, H.; Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum. *Pharm. Res.* v.13, p. 1336–1342, 1996.
 46. FDA. GUIDANCE FOR INDUSTRY: waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on biopharmaceutics classification system. Rockville: 2000. 13p.
 47. FOGH, J.; FOGH, J. M.; ORFEO, T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst.* v. 59, p. 221-226, 1977.
 48. FOSSATI, L.; DECHAUME, R.; HARDILLIER, E.; CHEVILLON, D.; PREVOST, C.; BOLZE, S.; MAUBON, N. Use of simulated intestinal fluid for

- Caco-2 permeability assay of lipophilic drugs. *Int. J. Pharm.* v. 360, p. 148–155, 2008.
49. GANAPATHY, V.; HUANG, W.; WANG, H.; LEIBACH, F. H. Valacyclovir: a substrate for the intestinal and renal peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 24, p 470-475, 1998.
 50. GERSHANIK, T.; HALTNER, E.; LEHR, C. M.; BENITA, S. Charge-dependent interaction of self-emulsifying oil formulations with Caco-2 cells monolayers: binding, effects on barrier function and cytotoxicity. *Int. J. Pharm.*, v. 211, p. 29-36, 2000.
 51. GINSK, J. M. POLLI, J. E. Prediction of dissolution –absorption relationships from a dissolution/Caco-2 system. *Int. J. Pharm.*, v. 177, p. 117-125, 1999.
 52. GONÇALVES, J. E.; SOUZA, J.; STORPIRTIS, S. Avaliação da permeabilidade de fármacos empregando culturas celulares. In STORPIRTIS et al, *Biofarmacotécnica – Séries Ciências Farmacêuticas*. Guanabara Koogan, 1ª Ed. Rio de Janeiro, 2009
 53. GOTHOSKAR, A. V. Biopharmaceutical classification system of drugs [online]. *Pharmaceut Rev.* Disponível em: URL: <http://www.pharmainfo.net/reviews/biopharmaceutical-classification-drugs>. Acesso em novembro de 2010.
 54. GRASS, G; SWEETANA, S. A correlation for permeabilities of passively transported compounds in monkey and rabbit jejunum. *Pharm. Res.*, v.6, p. 857-862, 1989.
 55. HANSON RESEARCH, 2006. Disponível em: [http:// www.hansonresearch.com/bg-equipment.pdf](http://www.hansonresearch.com/bg-equipment.pdf). Acesso em 30 de outubro de 2009.
 56. HASLAM, I. S.; O'REILLY, D.A.; SHERLOCK, D. J.; KAUSER, A.; WOMACK, C.; COLEMAN, T. Pancreatoduodenectomy as a source of human small intestine for Ussing chamber investigations and comparative studies with rat tissue. *Biopharm Drug Dispos* v. 32, p.210–221, 2011.
 57. HENDRIKSEN, BA, SANCHES F.M.V, BOLGER, M.B. The Composite Solubility Versus pH Profile and Its Role in Intestinal Absorption Prediction. *AAPS PharmSci.* v.5, p.1-4, 2003.

58. HIDALGO, I. J.; RYA, F.M, MARKS, G. J.; SMITH, P. L. pH dependent transcellular transport of cephalexin in rabbit intestinal mucosa. *Int. J. Pharm.*, v. 98, p. 83-92, 1993.
59. HIGUCHI, W.I.; HO, N. F. H.; PARK, J.Y.; MOROZOWICH, W. Physical model approach to the design of drugs with improved intestinal absorption. *Design of Biopharm. Properties Through Prodrugs and Analogs* ed Roche EB. p.136–227, 1977.
60. HILLGREN, K. M.; KATO, A.; BORCHARDT, R. T. In vitro systems for studying intestinal drug absorption. *Med Res Rev.* v. 15, n. 2, p. 83-109, 1995.
61. HOSSAIN, M.; ABRAMOWITZ, W.; WATROUS, B.J.; SZPUNAR, G.J.; AYREES, J.W. Gastrointestinal transit of nondisintegration, nonerodible oral dosage forms in pigs. *Pharm. Res.*, v. 7, p. 1163-1166, 1990.
62. KANFER, I. Report on the International Workshop on the Biopharmaceutics Classification
63. INTERNATIONAL PHARMACEUTICAL FEDERATION - FIP. Biowaivers monographs. Disponível em: < http://www.fip.org/www/index.php?page=ps_sig_bcs. 2012. Acesso em 02 março. 2012
64. System (BCS): scientific and regulatory aspects in practice. *J Pharm Pharm Sci.*, v. 5, p. 1-4, 2002;.
65. KANSY, M.; SENNER, F.; GUBERNATOR, K. Physicochemical high-throughput screening: Parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J. Med. Chem.* v. 41, p.1007 – 1010, 1998.
66. KARASOV, W.H.; DARKEN, B.W.; BOTTUM, M.C. Dietary regulation of intestinal ascorbate uptake in guinea pigs. *Am. J. Physiol.*, v. 260, p. 108-118, 1991.
67. KARARLI, T. T. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharm. Drug. Dispos.*, 16: 351-80, 1995.
68. KARLSON, J.; UNGELL, A.; GRASJO, J.; ARTURSSON, P. Paracellular drug transport across intestinal epithelia: influence of charge and induced water flux. *Eur. J. Pharm. Sci.* n.9, p.47-56, 1999.

69. KASSIN, N.A.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO, M.; LENNERNAS, H.; HUSSAIN, A.S.; JUNGINGER, H.E; STAVICHANSKY, S.A.; MIDHA, K.K.; SHAH, V.P.; AMIDON, G.L. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Mol. Pharm.*, v. 1, p. 85-96, 2003.
70. KEYKO, Y.; OSAM, S.; HISASHI U.; YASUKO, T. SHGERO, N.; YOSHIO, F. Long-term observation of in situ seismic velocity and attenuation. *Jour. of Geo. Reser.* v. 108, p. 2317-2332, 2003.
71. 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 I Biowaiver requests. *Mol. Pharm.* v. 3, p. 686-694, 2006.
72. KING, D.R.; KANAVOS, P. Encouraging the use of generic medicines: implications for transitions economies. *Croat Med J.* v. 43, n.4, p. 462-469, 2002.
73. KOLJONEN, M.; HAKALA, K. S.; AHTOLA-SATILLA, T.; LAITINEM, L. A.; KOSTIANEN, R.; KOTIAHO, T.; KAUKONEN, A. N.; HIRVONEN, J. Evaluation of cocktail approach to standardize Caco-2 permeability experiments. *Eur. Journal of Pharm. and Biopharm.* v. 64, p. 379-387, 2006.
74. KRISHNA, R.; WEBB, M. S.; ONGE, G. S.T.; LAWRENCE, M. D. Liposomal and Nonliposomal Drug Pharmacokinetics after Administration of Liposome-Encapsulated Vincristine and Their Contribution to Drug Tissue Distribution Properties. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* v. 298, p. 1206–1212, 2001.
75. KRISTENSEN, J. H.; ILETT, K. F.; HACKETT, L. P.; YAPP, P.; PAECH, M.; BEGG, E. J. Distribution and excretion of fluoxetine and norfluoxetine in human milk. *Br J Clin Pharmacol.*, v. 48, n. 4, p. 521–527, 1999.
76. LABOISSE, C.L.; JARRY, A.; BOU-HANNA, C.; MELIN, D.; VALLETTE, G. Intestinal cell culture models. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 2, p. 32-38, 1994.
77. LEGEN, I.; KRISTL, A. Ketoprofen-induced intestinal permeability changes studied in side-by-side diffusion cells. *J. Pharm. Pharmacol.* v.54, p.1419-1422, 2002.

- 78.LEGEN, I.; SALOBIR, M.; KERC, J. Comparison of different intestinal epithelia as models for absorption enhancement studies. *Int. J. Pharm.* v. 291, p. 183–188, 2005.
- 79.LENNERNÄS, H. Human jejunal effective permeability and its correlation with preclinical drug absorption models. *J. Pharm. Pharmacol.* v. 49, p. 627-638, 1997.
- 80.LENNERNAS, H.; NYLANDER, S.; UNGELL, A. L. Jejunal permeability: A comparison between the Ussing chamber technique and the single-pass perfusion in humans. *Pharm. Res.*, v. 14, p. 667–671, 1997.
- 81.LEVIS, K. A.; LANE, M. E.; CORRIGAN, O. I. [Effect of buffer media composition on the solubility and effective permeability coefficient of ibuprofen](#). *International journal of Pharmaceutics*. v. 253, p. 49-59, 2003.
- 82.LIU, X. Y.; NAKAMURA, C.; YANG, Q.; KAMO, N.; MIYAKE, J. Immobilized liposome chromatography to study drug-membrane interactions. Correlation with drug absorption in humans. *J. Chrom. A.*, v. 961, p. 113-118, 2002.
- 83.LUO, F.R.; PARANJPE, P.V.; GUO, A.; RUBIN, E.; SINKO, P. transport of irinotecan in Caco-2 cells and MDCK II cells over expressing efflux transporters Pgp, cMOAT, and MRP1. *Drug Metab. Dispos.* v. 30, p. 763-70, 2002.
- 84.MANDARA, J. L.; TRIER, J. S. The junctional morphology of the mucosa of the small intestine. In *Physiology of the gastrointestinal tract*. Ed R. Johnson (Raven Press, New York), 1577p, 1994.
- 85.MAKHEY, V. D., GUO, A., NORRIS, D. A., HU, P., YAN, J., SINKO, P. J. () Characterization of the regional intestinal kinetics of drug efflux in rat and human intestine and in Caco-2 cells. *Pharm. Res.* v. 15, p. 1160-7, 1998.
- 86.MAKHEY, V.D.; GUO, A.; NORRIS D.A.; H.U. P.; YAN, J., SINKO, P.J. Characterization of the regional intestinal kinetics of drug efflux in rat and human intestine and in Caco-2 cells. *Pharm Res.*, v. 15, p.1160-1167, 1998.
- 87.MARIAPPAN T.T.; SINGH S. Evidence of efflux-mediated and saturable absorption of rifampicin in rat intestine using the ligated loop and everted gut sac techniques. *Mol Pharm.*, v.1, p.363-7, 2004.

88. MARIN, M. T.; MARGARIT, M. V.; SALCEDO, M. V. Characterization and solubility study of solid dispersions of flunarizine and polyvinylpyrrolidone. // *Farmaco* v.57, p 723-727, 2002.
89. MENON, R.M.; BARR, W.H. Comparison of ceftibuten transport across Caco-2 cells and rat jejunum mounted on modified Using chambers. *Biopharm. Drug Dispos.* v. 24, p. 299-308, 2003.
90. MERCK & COMPANY INCORPORATED. The Merck Index. 13. ed. New Jersey: Merck & Company Incorporated, 2010.
91. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Relação Nacional de Medicamentos (Rename), 2008. Editora do Ministério da Saúde, 2008.
92. NARUHASHI, K.; TAMAI, I.; INOUE, N., MURAOKA, H.; SAI, Y.; SUZUKI, N.; TSUJI, A. Active intestinal secretion of new quinolone antimicrobials and the partial contribution of P-glycoprotein. *J. Pharm. Pharmacol.* v. 53, p. 699 – 709, 2001.
93. NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehniger – *Principles of Biochemistry*, 4 ed, 2006.
94. NEUHOFF, S., UNGELL, A.L.; ZAMORA, I.; ARTURSSON, P. pH-Dependent passive and active transport of acidic drugs across Caco-2 cell monolayers. *Eur J Pharm Sci* v. 25, p. 211-220, 2005.
95. OLLILA, F.; HALLING, K.; VUORELA, P.; VUORELA, H.; SLOTTE, P. Characterization of flavonoide-biomembrane interactions. *Arch. Biochem. Biophys.* v. 339, p. 103-108, 2002.
96. PADE, V.; STAVCHANSKY, S. Estimation of the relative contribution of the transcellular and paracellular pathway to the transport of passively absorbed drugs in the Caco-2 cell culture model. *Pharm. Res.* v. 14, p. 1210 - 1215, 1997.
97. PALM, K. STENBERG, P.; LUTHMAN, K.; ARTURSSON, P. Pollar molecular surface properties predict the intestinal absorption of drugs in humans. *Pharm. Res.* v. 14, p. 568-571, 1997.
98. PARVIN, Z.; HADI, V.; HOSNEH, T.; YADOLLAH, A.; ZIBA I.; SAEED, B.; MOHAMMAD, B. Predicting human intestinal permeability using single-pass intestinal perfusion in rat. *Jour. of Pharm. and Pharmaceutical Sci.* v. 10 n.3, p. 368-79, 2007.

99. PARVIN, Z.; HADI V.; HOSNIEH T.; ZIBA I. The utility of rat jejunal permeability for biopharmaceutics classification system. *Drug Develop. and Ind. Pharm*, v. 35, n. 12, p. 1496-1502, 2009.
100. PERMEGEAR. Esquema da célula de Franz. Disponível em <http://www.permegear.com/franz.htm>. Acesso em 14 de julho de 2012.
101. PFIZER. Diflucan Prescribing Information, março 2012. Disponível em: http://www.pfizer.com/files/products/uspi_diflucan.pdf. Acessado, março 2012.
102. PIETZONKA, P.; WALTER, E.; DUDA-JOHNER, S.; LANGGUTH, P.; MERKLE, H.P. Compromised integrity of excised porcine intestinal epithelium obtained from the abattoir effects the outcome of in vitro particle uptake studies. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 15, p. 39-47, 2002.
103. PINTO, M. ; et al., Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell*, v. 47, p. 323-330, 1983.
104. POLENTARUTTI, B.I.; PETERSON, A.L.; SJOBERG, A. K.; ANDERBERG, E. K. I.; UTTER, L.M.; UNGEL, A. L. B. Evaluation of excised rat intestinal segments in the Ussing chamber: Investigation of morphology, electrical parameters and permeability characteristics. *Pharm. Res.* v. 16, p. 446–454, 1999.
105. PRÓ-GENÉRICOS: Mercado mundial de genéricos. Disponível em: <http://www.progenericos.org.br/mecado.shtml>. Acesso em 24 de janeiro de 2012.
106. PUTNAM, W.S.; PAN, L.; TSUTSUI, K.; TAKAHASHI, L.; BENET, L.Z. Comparison of bidirectional cephalixin transport across MDCK and Caco-2 cell monolayers: Interactions with peptide transporters. *Pharm. Res.*, v.19, p. 27-33, 2002.
107. RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Farmacologia. 4a ed..Guanabara Koogan, 2001.
108. REGARH, C. G.; LANDAHL, S.; LARSSON, M.; LUNDBORG, P.; STEEN, B.; HOFFMANN, K. J.; LANGERSTROM, P. O. Pharmacokinetics of metoprolol and its metabolite alpha-OH-metoprolol in healthy, non-smoking, elderly individuals. *Eur J Clin Pharmacol.*, v. 24, p. 221–226, 1983.

109. RIENZO, M.; SARAIVA, J. F. K.; NOGUEIRA, P.R.; GOMES, E. P. S. G.; MORETI, M. A.; FERREIRA, J.F.M. ARMAGNAJAN, D.; MANSUR, A. P.; RAMIRES, A. F.; CÉSAR, L. A. M. Combinação de anlodipino e enalapril em pacientes hipertensos com doença coronariana. *Arq. Bras. Cardiol. São Paulo*, v. 92, n. 3, p. 183-189, 2009.
110. ROSE, S.; STEVENS, A. Computacional design strategies for combinatorial libraries. *Curr. Opin. Chem. Biol.* v. 7, p. 331-339, 2003
111. ROWLAND, R.N.; WOODLEY, J.F. The uptake of distearoylphosphatidylcholine/cholesterol liposomes by rat intestinal sac in vitro. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 673, p. 217-223, 1981.
112. RYH-NAN P.; TING-HSIEN C.; CHRISTINE S. H.; CHENG-HUEI H. Pharmacokinetics and Bioequivalent Study of Generic Fluoxetine Capsules Preparation. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 10, N. 1, p 13-17, 2002.
113. SANTOS, C.A.; JACOB, J.S.; HETZOG, B.A.; FREEDMAN, B.D.; PRESS, D.L.; HARNPICHARNCHAI, P.; MATHIOWITZ, E. Correlation of two bioadhesion assays: The everted sac technique and the CAHN microbalance. *J. Control. Rel.*, v. 61, p. 113-122, 1999.
114. SEILE, K.U.; SCHUSTER, K.J.; MEYER, G. J.; NIEDERMAYER, W.; WASSERMAN, O. The pharmacokinetics of metoprolol and its metabolites in dialysis patients. *Clin. Pharmacokinet.*, v. 5, p. 192–198, 1980.
115. SHAH, J.C. Analysis of permeation data: evaluation of the lag time method. *Int. J. Pharm., Amsterdam*, v.90, n.2, p.161-169, 1993.
116. SHAIKH, S. A.; SHAIKH, S. S; SHAHI, S. R.; SHOOKUR, M. A.; Reddy, L. K.; Padalkar, A. N.; THUBE, M. Formulation and Evaluation of S-(-)-Amlodipine Besylate and Nebivolol Hydrochloride Tablets. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* v. 1, p. 199–206, 2010
117. SHARMA, P.; CHAWLA, H. P. S.; PANCHAGNULA, R. LC determination of cephalosporins *in vitro* rat intestinal sac absorption model. *Journ. of Pharm. and Biom. Analysis*, v. 27, p. 39-50, 2002.
118. SHEN, Q.; LIN, Y.; HANDA, T.; DOI, M.; SUGIE, M.; WAKAYAMA, K.; OKADA, N.; FUJITA, T.; YAMAMOTO, A. Modulation of intestinal P-glycoprotein function by polyethylene glycols and their derivatives by in vitro transport and in situ absorption studies. *Int. J. Pharm.* v. 313, p. 49–56, 2006.

119. SHOHIN, I. E.; RAMENKAYA, G. V.; VASILENKO, G. F.; MALASHENKO, E. A. Dissolution kinetics of amlodipine tablets marketed in Russia under biowaiver conditions. *Dissolution technologies*, v. 17, n. 3, p. 20-22, 2010.
120. SODERHOLM., J. D.; OMAN, H.; BLOMQUIST, L.; VEEN, J.; LINDMARK, T, OLAISON, G. Reversible Increase in Tight Junction Permeability to Macromolecules in Rat Ileal Mucosa *in vitro* by Sodium Caprate, a Constituent of Milk Fat. *Digestive Diseases and Sciences*, v. 43, n. 7, p. 1547-1552, 2004.
121. SOUZA, J.; FREITAS, Z. M. F.; STORPIRTIS, S. Modelos *in vitro* para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, p. 515-527, 2007.
122. STAVCHANSKY, S.; PADE, V. Link between Drug Absorption Solubility and Permeability Measurements in Caco-2 Cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 87, n. 12, p. 1604-1607, 1998.
123. STENBERG, P.; LUTHMAN, K.; ARTURSSON, P. Virtual screening of intestinal drug permeability. *J. Control Release*. v.65, p. 231-243, 2000.
124. STEVENS, B.R. Amino acid transport in intestine. In: KILBERG, M. S., HAUSSINGER, D. Mammalian Amino Acid Transport. *Plenum, New York*, p. 149–163, 1992.
125. STRENG, W. H.; HIS, S. K.; HELMS, P. E.; TAM, H. G. General treatment of pH-solubility profiles of weak acids and bases and the effects of different acids on the solubility of a weak base. *J Pharm Sci.*v.73, n. 12, p. 1679-1684, 1984.
126. SUAREZ, W. T.; SARTORI, E. R.; BATISTA, E. F.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação turbidimétrica em fluxo de cloridrato de fluoxetina em formulações farmacêuticas. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 32, n. 9, 2009.
127. TAILLARDAT-BERTSCHINGER, A. ; MARCA MARTINET, C. A. ; CARRUPT, P. A. ; REIST, M. ; CARON, G. ; FRUTTERO, R. ; TESTA, B. Molecular factors influencing retention on immobilized artificial membranes (IAM) compared to partitioning in liposomes and n-octanol. *Pharm. Res.* v. 19, p. 729-737, 2002.

128. TAMURA, S.; OHIKE, A.; IBUKI, R.; AMIDON, G. L, YAMASHITA, S. Tacrolimus is a class II lowsolubility high-permeability drug: the effect of P-glycoprotein efflux on regional permeability of tacrolimus in rats. *J. Pharm. Sci.* v. 91, p. 719-729, 2002.
129. TRAPANI, G.; FRANCO, M, TRAPANI, A.; LOPEDOTA, A.; GALLUCCI, E.; MICELLI, S.; LISO, G. Frog Intestinal Sac: A New In Vitro Method for the Assessment of Intestinal Permeability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 93, p. 2909–2919, 2004.
130. TSUJI, A.; TAMAI, I. Carrier – mediated intestinal transport of drugs. *Pharm. Res.* v. 13, p. 963-977, 1996.
131. TSUTSUMI, K.; LI, S. K.; GHANEM, A. H.; H0, N. F. H.; HIGUCHI, W. I. A systematic examination of the in vitro Ussing chamber and the in situ single-pass perfusion model systems in rat ileum permeation of model solutes. *J Pharm. Sci.* v. 92, p. 344–359, 2003.
132. TUKKER, J. J. In vitro methods for the assessment of permeability. In: DRESMANN, J. B.; LENNERNAS, H. (Eds) Oral Drug Absorption. Prediction and Assessment. *Marcel Dekker, New York*, p 51–72, 2000.
133. UGELL, A. L. In vitro absorption studies and their relevance to absorption from the GI tract. *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, v. 23, p. 879–892, 1997.
134. UGELL, A. L.; NYLANDER, S.; BERGSTRAND, S.; SJONER, A.; LENNERNAS, H. Membrane transport of drugs in different regions of the intestinal tract of the rat. *J. Pharm. Sci.* v.87, p. 360–366, 1998.
135. USSING, H. H.; ZERAHN, K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta. Physiol. Scand.* v. 23, p. 110–127, 1951.
136. USP. United States Pharmacopeia and National Formulary USP 29–NF 24; The United Pharmacopeial Convention, Inc.: Rockville, MD, 2010.
137. VILLANOVA, J. C. O.; OREFICE, R. L.; CUNHA, A. S.. Aplicações farmacêuticas de polímeros. *Polímeros*. 2010, vol. 20, n.1
138. WILS, P.; WARNEY, A. PHUNG, P. A.; LEGRIN, D.; SCHERMAN, J. High lipophilicity decreases drug transport across intestinal epithelial cells. *J. Pharm. Exp. Ther.* V. 269, p. 654-658, 1994.
139. WATSON, D. G. Pharmaceutical analysis A textbook for pharmacy

- students and pharmaceutical chemists. 1. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1999.
140. WPI. Esquema das Câmaras de Ussing. Disponível em: <http://www.wpi-europe.com/en/products/tissue/ussing.shtml>. Acesso em 14 de julho de 2012.
 141. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Multisource (generic) pharmaceutical products: Guidelines on registration requirements to establish interchangeability. In: WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations, Fortieth Report. Geneva, World Health Organization. WHO Technical Report Series, n. 937, Annex 7: p. 347-390, 2000.
 142. WON, D.; KIM, M. LEE, S.; PARK, J.; HWANG, S. Improved physicochemical characteristics of felodipine solid dispersion particles by supercritical anti-solvent precipitation process. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 301, p. 199–208, 2005.
 143. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Model list of essential medicines 16th list, march, 2009. Disponível em: http://www.who.int/medicines/publications/essential_medicines/en/index.html. Acesso 02, Mar. 2010.
 144. XIANHUA, C.; SETH, T. G.; LANYAN, F.; HEATHER, A. M.; CHRISTOPHER, P. L.; HO-CHUL, S.; LENNERNAS, H.; ZHONG, Y.; AMIDON, G. L.; YU, L. X.; SUN, D. Why is it challenging to predict intestinal drug absorption and oral bioavailability in human using rat model. *Pharm. res.* v. 23, p. 1675-86, 2006.
 145. YAMASHITA, S.; FURUBAYASHI, T.; KATAOKA, M.; SAKANE, T.; SEZAKI, H.; TOKUDA, H.;. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* v. 10, p.195-204, 2000.
 146. YAMASHITA, S.; TANAKA, Y.; ENDOH, Y.; TAKI, Y.; SAKANE, T.; NADAI, T.; SEZAKI, H. Analysis of drug permeation across Caco-2 monolayer: Implication for predicting in vivo drug absorption. *Pharm. Res.* v. 14, p. 486–491, 1997.

147. YEN, T. E.; AGATONOVIC-KUSTRIN, S.; EVANS, A. M.; NATION, R. L.; RYAND, J. X. Prediction of drug absorption based on immobilized artificial membranes (IAM) chromatography separation and calculated molecular descriptors. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v 38, p. 472-478, 2001.
148. ZAKERI-MILANI, P.; VALIZADEH, H.; TAJEZADEH, H.; AZAMI, Y.; ISLAMBOICHILAR, Z.; BARZEGA, S. Predicting human intestinal permeability using single pass intestinal perfusion in rat. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 10, p. 368–379, 2007.

8 ANEXOS

ANEXO A

Informação 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 B

Aprovação do protocolo de estudo pela Comtê de ética em Experiência Animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/23/2010

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto **"Determinação de solubilidade e permeabilidade de fármacos conforme o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS)."** (Protocolo nº 265), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Rafael Leal Monteiro Paraíso** sob a orientação do(a) Profa. Dra. Valentina Porta, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi **APROVADO** em reunião de 12 de abril de 2010.

São Paulo, 13 de abril de 2010.

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 660 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3677 / Fax: (11) 3853-6093 - e-mail: rnlgo@usp.br

ANEXO C
Ficha do aluno

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

139 - 7009162/1 - Rafael Leal Monteiro Paraíso

Email: rlmparaíso@hotmail.com

Data de Nascimento: 27/01/1985

Cédula de Identidade: RG - 12.700.439-0 - PR

Local de Nascimento: Estado de Minas Gerais

Nacionalidade: Brasileira

Graduação: Farmacêutico - Universidade Positivo - Paraná - Brasil - 2009

Curso: Mestrado

Programa: Fármaco e Medicamentos

Área: Produção e Controle Farmacêuticos

Data de Matrícula: 09/02/2010

Início da Contagem de Prazo: 09/02/2010

Data Limite: 09/08/2012

Orientador: Prof(a). Dr(a). Valentina Porta - 09/02/2010 até o presente. E.Mail: vporta@usp.br

Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 21/10/2010

Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 15/04/2011

Data do Depósito do Trabalho:

Título do Trabalho:

Data Máxima para Aprovação da Banca:

Data de Aprovação da Banca:

Data Máxima para Defesa:

Data da Defesa:

Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências:
Ingressou no Mestrado em 09/02/2010
Matrícula de Acompanhamento em 27/02/2012

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 27/02/2012

Acesso em: 16/07/12 23:28:18

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 7009162/1 - Rafael Leal Monteiro Paraíso

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Fre
FBF5777-2/2	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos	01/03/2010	13/06/2010	45	3	93,;
FBF5704-5/3	Análise Espectrométrica de Fármacos	02/03/2010	14/06/2010	150	10	100
FBF5778-1/3	Biofarmacotécnica: Estudo de Permeabilidade de Fármacos	20/05/2010	30/06/2010	60	4	100
FBC5803-1/2	Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíticos	03/08/2010	16/08/2010	30	2	75
FBF5766-2/3	Biodisponibilidade e Bioequivalência de Medicamentos	05/08/2010	06/10/2010	90	6	93,;
EDM5791-5/6	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	16/03/2011	30/06/2011	120	8	100

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	33
Estágios:			
Total:	0	25	33

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

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 27/02/2012

Impresso em: 16/07/12 23:28:18

ANEXO D

Currículo Lattes

Rafael Leal Monteiro Paraiso
Bolsista de Mestrado do CNPq

Graduado em farmácia pela Universidade Positivo de Curitiba. Experiência nas áreas de controle de qualidade de medicamentos, estudos de biodisponibilidade, pesquisa e desenvolvimento analítico. Matriculado no Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos da Universidade de São Paulo, nível mestrado, sendo orientado pela professora doutora Valentina Porta.

(Texto informado pelo autor)

Última atualização do currículo em 14/07/2012

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/3538846427133902>

**Certificado
pelo autor em
14/07/12**

Dados pessoais

Nome Rafael Leal Monteiro Paraiso

Nome em citações bibliográficas PARAÍSO, R. L. M.

Sexo Masculino

Endereço profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.
Av. Prof. Lineu Prestes, 580
Butantã - Cidade Universitária
05508-000 - Sao Paulo, SP - Brasil
Telefone: (011) 63650962

2010

Mestrado em andamento em Ciências Farmacêuticas (Conceito CAPES 6) .
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título: Determinação da solubilidade e permeabilidade de fármacos conforme o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB)., *Orientador:* Valentina Porta.

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico .

Palavras-chave: BCS; Permeabilidade; Solubilidade.

Grande área: Ciências da Saúde / *Área:* Farmácia.

Grande área: Ciências da Saúde / *Área:* Farmácia / *Subárea:* Farmacotecnica

/ *Especialidade:* Biofarmacotécnica.

Formação acadêmica/Titulação

2008 - 2011

Aperfeiçoamento em Planejamento e execução: Ensaio de Bioequivalência . (Carga Horária: 480h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título: Planejamento e execução de ensaios de bioequivalência: etapas clínica, analítica e estatística.
Ano de finalização: 2011.

Orientador: Valentina Porta.

2005 - 2008 Graduação em Farmácia .
Universidade Positivo, UP, Brasil.
Título: Estudo comparativo da biodisponibilidade in vitro de comprimidos de hidroclorotiazida.
Orientador: Silvio Miró Francchi.
Bolsista do(a): Programa Universidade para todos .

Formação complementar

2010 - 2010 Testes de Estatística Relacionados. (Carga horária: 16h).
United States Pharmacopeia.

2009 - 2009 Sistema de Classificação Biofarmacêutica. (Carga horária: 8h).
Invitare Pesquisa Clínica Auditoria e Consultoria.

2008 - 2008 Desenvolvimento de formas farmacêuticas. (Carga horária: 3h).
Universidade Federal do Paraná.

2008 - 2008 Pesquisa e desenvolvimento de cosméticos. (Carga horária: 3h).
Universidade Federal do Paraná.

2008 - 2008 Biotecnologia do etanol. (Carga horária: 3h).
Universidade Federal do Paraná.

2008 - 2008 Pesquisa e desenvolvimento de medicamentos. (Carga horária: 4h).
Universidade Federal do Paraná.

2007 - 2007 Extensão universitária em Contribuições do farmacêutico na promoção da saúde. (Carga horária: 20h).
Universidade Positivo, UP, Brasil.

Atuação profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2010 - 2012 Vínculo: Aluno, Enquadramento Funcional: Aluno, Regime: Dedicção exclusiva.

Outras informações Estou desenvolvendo o meu projeto de pesquisa do mestrado e auxiliando em outros projetos no Laboratório de Pesquisas em Biofarmacotécnica (LPB) situado no Bloco 15 de Ciências Farmacêuticas.

Atividades

2010 - 2012 Atividades de Participação em Projeto, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, .
Projetos de pesquisa
[Determinação da solubilidade e permeabilidade de fármacos conforme o Sistema de Classificação Biofarmacêutica \(BCS\)](#)

Centro de estudos em biofarmácia, CEB, Brasil.

Vínculo institucional

2008 - 2008 Vínculo: estagiário, Enquadramento Funcional: estagiário, Carga horária: 4, Regime: Dedicção exclusiva.

Outras informações Centro de estudos em bioequivalência; atividades desenvolvidas: preparo de amostras, análises espectrométricas (HPLC e UV), confecção de POPs entre outras atividades.

Centro de pesquisa e processamento de alimentos, CEPPA, Brasil.

Vínculo institucional

2007 - 2008 Vínculo: estagiário, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 4, Regime: Dedicção exclusiva.

Outras informações Laboratório de análises instrumentais onde eram realizadas análises de agrotóxicos em grãos (milho, arroz, algodão e cana de açúcar) e em outras matérias primas por cromatografia líquida (HPLC) e por cromatografia gasosa (GC). Função: Auxílio no preparo de amostras para a análise, realizando a análise e na organização laboratorial.

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUC/PR, Brasil.

Vínculo institucional

2007 - 2008 Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 4

Atividades

2007 - 2008 Atividades de Participação em Projeto, Centro Odontológico, .

Projetos de pesquisa

[Avaliação da sorção e solubilidade de cimentos ionoméricos e resinosos para cimentação](#)

Vínculo institucional

2006 - 2007 Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

Outras informações Atividades desenvolvidas: Análises microbiológicas de águas, medicamentos e alimentos, rotina laboratorial e preparo de meios de cultura. Controle de qualidade de águas, análise físico-química de matérias-primas e preparações para medicamentos, alimentos e cosméticos. Aplicação de técnicas analíticas: cromatografia líquida, espectrometria UV visível e infravermelho, análises por via clássica e organização laboratorial e preparo de relatórios.

Atividades

2006 - 2007 Atividades de Participação em Projeto, Laboratório de Farmacognosia, .

Projetos de pesquisa

[Estudo Morfo-anatômico de Verbena Minutiflora Briq. Moldenke, Verbenaceae](#)

Projetos de Pesquisa

- 2010 - 2012** Determinação da solubilidade e permeabilidade de fármacos conforme o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS)
- Descrição:* Será realizado o estudo de solubilidade e permeabilidade do Anlodipino, Fluoxetina e Fluconazol para determinar Classificação Biofarmacêutica desses fármacos..
Situação: Em andamento; *Natureza:* Pesquisa.
Integrantes: Valentina Porta - Integrante / Rafael Leal Monteiro Paraíso - Coordenador.
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Auxílio financeiro..
- 2007 - 2008** Avaliação da sorção e solubilidade de cimentos ionométricos e resinosos para cimentação
- Descrição:* Avaliar a capacidade de sorção e solubilidade quando expostas à água, de diferentes tipos de resinas disponíveis no mercado odontológico..
Situação: Concluído; *Natureza:* Pesquisa.
Integrantes: Luci Regina Panka Archegas - Coordenador / Rafael Leal Monteiro Paraíso - Integrante.
Financiador(es): Pontifícia Universidade Católica do Paraná - Bolsa..
- 2006 - 2007** Estudo Morfo-anatômico de Verbena Minutiflora Briq. Moldenke, Verbenaceae
- Descrição:* Estudo para caracterizar morfológicamente a planta medicinal Verbena Minutiflora que é usada pela medicina popular. Esse estudo teve como contribuição para diferenciar das outras espécies semelhantes..
Situação: Concluído; *Natureza:* Pesquisa.
Integrantes: José Roberto Cavazzani - Integrante / Leila Terezinha Maranhão - Integrante / Rafael Leal Monteiro Paraíso - Coordenador.
Financiador(es): Universidade Positivo - Bolsa..

Áreas de atuação

1. *Grande área:* Ciências da Saúde / *Área:* Farmácia / *Subárea:* Farmacotecnia.
2. *Grande área:* Ciências da Saúde / *Área:* Farmácia.
3. *Grande área:* Ciências da Saúde / *Área:* Farmácia / *Subárea:* Análise e Controle de Medicamentos.

Idiomas

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

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

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

Produção em C,T & A

Produção bibliográfica

Resumos publicados em anais de congressos

1. ★ PARAÍSO, R. L. M. ; SILVA, M. F. ; SILVA JR, J. B. ; PORTA, V. ; SERRA, C. H. R. . Biopharmaceutical Classification of Fluconazole: solubility determination. In: International Symposium on BA/BE of Oral Drug Products, 2011, 2011, Kobe. International Symposium on BA/BE of Oral Drug Products, 2011.

2. SILVA, M. F. ; PARAÍSO, R. L. M. ; SILVA JR, J. B. ; REIS, J. M. ; FERRAZ, H. G. ; SERRA, C. H. R. ; PORTA, V. . Solubility of furosemide and the complexity of furosemide hydroxy-β-cyclodextrin. In: International Symposium on BA/BE of Oral Drug Products, 2011, 2011, Kobe. International Symposium on BA/BE of Oral Drug Products, 2011.

Apresentações de Trabalho

1. ★ PARAÍSO, R. L. M. ; SILVA, M. F. ; PORTA, V. ; SERRA, C. H. R. ; SILVA JR, J. B. . Biopharmaceutical Classification of Fluconazole: solubility determination. 2011. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
2. SILVA, M. F. ; PARAÍSO, R. L. M. ; SILVA JR, J. B. ; FERRAZ, H. G. ; REIS, J. M. ; PORTA, V. ; SERRA, C. H. R. . Solubility of furosemide and the complexity of furosemide hydroxy-β-cyclodextrin. 2011. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
3. STRASSER, M. ; RICCI, M. C. S. ; FRANÇA, G.G. ; PAZ, K. D ; PARAÍSO, R. L. M. ; MEDEIROS, F. D ; FERNANDES, M. B. ; MELO, R. S. ; BRASSICA, S. C. . Concepção de ensino-aprendizagem em um modelo de preceptoria em Farmácia Clínica: experiência do Hospital Universitário da USP. 2011. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
4. ★ ARCHEGAS, L.R.P ; PARAÍSO, R. L. M. . Avaliação da sorção e solubilidade de cimentos ionoméricos e resinosos para cimentação. 2008. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Produção técnica

1. PARAÍSO, R. L. M. . Pesquisa Clínica - da teoria à aplicação. 2010. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).

Eventos

Participação em eventos

1. International Symposium on BA/BE of Oral Drug Products, 2011. Biopharmaceutical Classification of Fluconazole: solubility determination. 2011. (Simpósio).
2. Ressonância Nuclear Magnética aplicada ao controle de qualidade de fármacos. 2009. (Seminário).
3. 1 Encontro da pós graduação do Instituto de Química USP. 2009. (Encontro).
4. Estudos de Bioequivalência em oncologia. Formulação de questionamentos pertinentes ao assunto. 2009. (Encontro).
5. XLIV Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica. 2009. (Encontro).
6. 1º Simpósio Farmacêutico de Curitiba. 2006. (Simpósio).