UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Avaliação *in vitro* da solubilidade e da permeabilidade da
lamivudina e da zidovudina. Aplicações na Classificação
Biofarmacêutica**

André Bersani Dezani

Dissertação para obtenção

do Grau de **MESTRE**

Orientadora:

Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra

**São Paulo
2010**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Avaliação *in vitro* da solubilidade e da permeabilidade da
lamivudina e da zidovudina. Aplicações na Classificação
Biofarmacêutica**

André Bersani Dezani

Dissertação para obtenção

do Grau de **MESTRE**

Orientadora:

Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra

**São Paulo
2010**

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

Dezani, André Bersani
D532a Avaliação *in vitro* da solubilidade e da permeabilidade da
lamivudina e da zidovudina. Aplicações na classificação
biofarmacêutica / André Bersani Dezani. -- São Paulo, 2010.
140p.

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

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

615.4b CDD

André Bersani Dezani

Avaliação *in vitro* da solubilidade e da permeabilidade da lamivudina e da zidovudina. Aplicações na Classificação Biofarmacêutica

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Prof^a. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra

Orientadora/Presidente

1º examinador

2º examinador

São Paulo, ____ de _____ de ____

Nenhuma montanha é tão alta para que você escale

Tudo que você tem que ter é um pouco de confiança

Nenhum rio é a tão imenso para que você o atravesse

Tudo que tem que fazer é acreditar na sua fé

Robert Sylvester Kelly

Dedico este trabalho aos meus pais Edison e Sueli

A minha irmã Carla

e a minha querida noiva Thaisa

*Bem-aventurado o homem que acha sabedoria, e o
homem que adquire conhecimento*

Provérbios 3:13

Agradecimentos

Aos meus queridos pais Edison e Sueli por sua paciência, apoio e constante incentivo na realização deste trabalho.

À minha irmã Carla pela compreensão e apoio nos momentos difíceis.

À minha querida noiva Thaisa pelo esforço em ajudar-me, pelo incentivo e principalmente pelo companheirismo em todos os momentos durante a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra pela confiança depositada em mim, pelas palavras de incentivo e apoio e pela paciência e compreensão em todos os momentos difíceis durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Valentina Porta pelo apoio e contribuições.

Ao Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz por contribuir para o desenvolvimento deste trabalho.

À Claudinéia pelo incentivo e por oferecer sua amizade.

Ao amigo Marco Aurélio Lamolha, pelo incentivo e amizade.

Aos colegas Francinalva, José Eduardo, Marina, Juliana, Rafael L., Rafael Melo, Arthur, Marize e Michele pelas contribuições e pela compreensão.

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

Ao Jorge pela atenção dispensada na revisão ortográfica deste trabalho.

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

Aos funcionários da biblioteca do conjunto das químicas pela revisão das referências bibliográficas, elaboração da ficha catalográfica e pela atenção dispensada.

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq e à FAPESP pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
2.1. Objetivo geral.....	6
2.2. Objetivos específicos	6
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	7
3.1 Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB).....	8
3.2 Solubilidade de fármacos.....	12
3.2.1. Solubilidade segundo o SCB	14
3.3 Permeabilidade dos fármacos.....	16
3.3.1. Permeabilidade segundo o SCB.....	21
3.3.2. Métodos <i>in vitro</i> que empregam cultura celular	22
3.3.2.1. Células Caco-2	22
3.3.2.1 Células MDCK	23
3.3.3 Métodos <i>in vitro</i> que empregam membranas artificiais – Pampa	24
3.3.4 Perfusão <i>in situ</i>	25
3.3.5 Métodos <i>in vitro</i> que empregam tecidos animais.....	25
3.3.5.1 Ensaio <i>in vitro</i> com tecido invertido.....	26
3.3.5.2 Ensaio <i>in vitro</i> com tecido não invertido.....	26
3.4 Fármacos antirretrovirais	29
3.4.1 Lamivudina	31
3.4.2 Zidovudina	33
3.4.3. Solubilidade e permeabilidade da lamivudina e da zidovudina.....	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Materiais	38
4.1.1 Materiais, solventes e reagentes	38

4.1.2.	Equipamentos e dispositivos diversos	38
4.2	Métodos	39
4.2.1	Desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico para a quantificação de lamivudina e zidovudina.....	39
4.2.1.1	Linearidade	41
4.2.1.2	Especificidade/Seletividade	41
4.2.1.3	Limite de detecção e limite de quantificação	42
4.2.1.4	Precisão.....	43
4.2.1.5	Exatidão.....	45
4.2.2	Desenvolvimento e validação do método cromatográfico líquido de alta eficiência (CLAE) para a quantificação de lamivudina, zidovudina, metoprolol e fluoresceína.....	46
4.2.2.1.	Condições cromatográficas para a quantificação de lamivudina, zidovudina, metoprolol e fluoresceína.....	46
4.2.2.2	Linearidade	47
4.2.2.3	Especificidade/Seletividade	48
4.2.2.4	Limite de detecção e limite de quantificação	48
4.2.2.5	Precisão.....	48
4.2.2.6	Exatidão.....	48
4.2.2.7	Estabilidade	49
4.2.3	Avaliação da solubilidade	49
4.2.4	Estudos de dissolução intrínseca	50
4.2.5	Estudos de permeabilidade	51
4.2.5.1.	Obtenção e preparação dos segmentos de tecido de intestino de rato.....	51
4.2.5.2.	Avaliação da viabilidade das membranas utilizadas no estudo.....	51
4.2.5.3.	Estudos de permeação e/ou liberação	52

4.2.5.4.	Quantificação dos fármacos nos ensaios de permeabilidade .	53
4.2.5.5.	Análise dos resultados.....	53
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	Validação do método espectrofotométrico para quantificação dos fármacos em estudo.....	56
5.1.1	Validação do método analítico por espectrofotometria UV para a determinação do teor de lamivudina e zidovudina.....	56
5.1.1.1	Especificidade e seletividade do método espectrofotométrico UV para a determinação de lamivudina e zidovudina	56
5.1.1.2	Linearidade do método espectrofotométrico UV para a determinação de lamivudina e zidovudina	58
5.1.1.3	Precisão do método espectrofotométrico UV para a determinação de lamivudina e zidovudina	61
5.1.1.4	Limite de detecção e limite de quantificação do método espectrofotométrico UV para a determinação de lamivudina e zidovudina.....	64
5.1.1.5	Exatidão do método espectrofotométrico UV para a determinação de lamivudina e zidovudina	65
5.1.1.6	Estabilidade do método espectrofotométrico UV para a determinação de lamivudina e zidovudina	69
5.2	Desenvolvimento e validação dos métodos cromatográficos para a quantificação de lamivudina, zidovudina, metoprolol e fluoresceína.....	71
5.2.1	Validação do método cromatográfico líquido de alta eficiência (CLAE) UV para a determinação de lamivudina, zidovudina, metoprolol e fluoresceína....	71
5.2.1.1	Especificidade e seletividade	71
5.2.1.2	Limite de quantificação	73
5.2.1.3	Linearidade	73
5.2.1.4	Precisão e exatidão	75
5.2.1.5	Estabilidade	76

5.2.1.5.1. Estabilidade em ciclo de congelamento e descongelamento	76
5.3. Ensaio de solubilidade	77
5.4. Ensaio de dissolução intrínseca.....	82
5.5. Ensaio de permeabilidade	87
5.5.1. Estudo de permeabilidade através de segmentos intestinais obtidos de ratos Wistar.....	87
6. CONCLUSÃO	97
7. ASPECTOS LEGAIS DE BIOÉTICA.....	99
8. REFERÊNCIAS	101
9. ANEXOS	118
ANEXO A	119
Informações para os membros da banca julgadora de mestrado/doutorado.....	119
ANEXO B	122
Aprovação do protocolo de estudo pela Comissão de Ética em Experimentação Animal	122
ANEXO C	124
Ficha do aluno.....	124
ANEXO D	127
Currículo Lattes	127
ANEXO E	130
Artigo submetido a revista AOAC International	130

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1 - Classificação de fármacos de acordo com o SCB e principais características de cada classe.	10
Quadro 3.2 - Permeabilidade aparente e percentagem absorvida proposta para a classificação biofarmacêutica utilizando células Caco-2	23
Quadro 3.3 - Nome comercial, dose, forma farmacêutica/via de administração e laboratório referente à lamivudina.	32
Quadro 3.4 - Nome comercial, dose, forma farmacêutica/via de administração e laboratório referente à zidovudina.	34
Quadro 4.1 - Descrição do modo de preparo dos meios empregados nos estudos para volume final de dois litros (2,0L).....	39
Quadro 4.2 - Descrição da forma de preparo das concentrações das curvas analíticas (SP - solução padrão com concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).	42
Quadro 4.3 - Condições cromatográficas para a quantificação de lamivudina, zidovudina, metoprolol e fluoresceína	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Resultados obtidos da análise de regressão linear a partir das curvas analíticas para a quantificação de lamivudina por espectrofotometria em água e nas soluções de pH 1,2, pH 4,5, pH 6,8 e pH 7,5	59
Tabela 5.2 - Resultados obtidos da análise de regressão linear a partir das curvas analíticas para a quantificação de zidovudina por espectrofotometria em água e nas soluções de pH 1,2, pH 4,5, pH 6,8 e pH 7,5	61
Tabela 5.3 - Valores de concentração teórica (CT), concentração média experimental (CME) e desvio padrão relativo (DPR) referentes as seis determinações da precisão intraensaio do método para a quantificação da lamivudina em diferentes meios de solubilização.....	62
Tabela 5.4 - Valores de concentração teórica (CT), concentração média experimental (CME) e desvio padrão relativo (DPR) referentes as seis determinações da precisão intraensaio do método para a quantificação da zidovudina em diferentes meios de solubilização.....	62
Tabela 5.5 - Valores de concentração teórica (CT), concentração média experimental (CME) e desvio padrão relativo (DPR), em triplicatas, referentes à determinação da precisão intermediária do método para a quantificação da lamivudina em diferentes meios de solubilização.....	63
Tabela 5.6 - Valores de concentração teórica (CT), concentração média experimental (CME) e desvio padrão relativo (DPR), em triplicatas, referentes à determinação da precisão intermediária do método para a quantificação da zidovudina em diferentes meios de solubilização.....	64
Tabela 5.7 - Valores médios de limite de detecção e de limite de detecção da lamivudina e da zidovudina em diferentes meios, referentes a três determinações.....	65

Tabela 5.8 - Valores de concentração teórica (CT), concentração média experimental (CME), desvio padrão (DP) e exatidão, expressa em %, referentes à determinação da exatidão do método para a quantificação da lamivudina em diferentes meios de solubilização, utilizando três concentrações do intervalo 66

Tabela 5.9 - Valores de concentração teórica (CT), concentração média experimental (CME) e exatidão, por adição do padrão para a quantificação da lamivudina em diferentes meios 67

Tabela 5.10 - Valores de concentração teórica (CT), concentração média experimental (CME), desvio padrão (DP) e exatidão, expressa em %, referentes à determinação da exatidão do método para a quantificação da zidovudina em diferentes meios de solubilização, utilizando três concentrações do intervalo 68

Tabela 5.11 - Valores de concentração teórica (CT), concentração média experimental (CME) e exatidão, por adição do padrão para a quantificação da zidovudina em meio diferentes meios 69

Tabela 5.12 - Valores experimentais obtidos na avaliação da estabilidade nos diversos meios utilizados. Os resultados expressam a média de amostras analisadas em triplicatas 70

Tabela 5.13 - Valores de limite de quantificação. Precisão e exatidão do método na concentração de 10 ng.mL^{-1} 73

Tabela 5.14 - Resultados obtidos por meio da regressão linear a partir da curva analítica definida para a quantificação da lamivudina, zidovudina, metoprolol e fluoresceína em Ringer-Krebs modificado..... 74

Tabela 5.15 - Resultados referentes à precisão e à exatidão, intraensaio e interensaio, do método analítico para a quantificação de lamivudina, zidovudina, metoprolol e fluoresceína por CLAE 75

Tabela 5.16 - Valores experimentais de exatidão obtidos a partir da avaliação da estabilidade de amostras de lamivudina, zidovudina, metoprolol e fluoresceína analisadas por CLAE..... 76

Tabela 5.17: Avaliação da precisão e exatidão de amostras de controle de qualidade submetidas a um ciclo de congelamento e descongelamento. Os resultados expressam a média de amostras analisadas em triplicatas..... 77

Tabela 5.18 - Valores médios de solubilidade (M), expressos em mg.mL^{-1} , desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) da lamivudina nos diferentes meios empregados. Ensaio realizado em triplicata..... 79

Tabela 5.19 - Valores médios de solubilidade (M), expressos em mg.mL^{-1} , desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) da zidovudina nos diferentes meios empregados. Ensaio realizado em triplicata..... 80

Tabela 5.20 - Valores da razão dose: solubilidade média (valores expressos em mL) 81

Tabela 5.21 - Valores de quantidade média dissolvida (D) expressa em mg/cm^2 de lamivudina em função do tempo de coleta (TC) em cada um dos meios. Todos os ensaios foram realizados em triplicata 83

Tabela 5.22 - Valores de quantidade média dissolvida (D) expressa em mg/cm^2 de zidovudina em função do tempo de coleta (TC) em cada um dos meios. Todos os ensaios foram realizados em triplicata 84

Tabela 5.23 - Parâmetros referentes aos perfis de dissolução intrínseca da lamivudina obtidos a partir da regressão linear 86

Tabela 5.24 - Parâmetros referentes aos perfis de dissolução intrínseca da zidovudina obtidos a partir da regressão linear 86

Tabela 5.25 - TDI (taxa de dissolução intrínseca) dos fármacos lamivudina e zidovudina	87
Tabela 5.26 - Valores de TEER referentes aos ensaios de permeabilidade	88
Tabela 5.27 - Valores médios da quantidade permeada (P) de fluoresceína e metoprolol, expressa em ng.mL^{-1} em função do tempo de coleta (TC). Os valores refletem a média de seis determinações	89
Tabela 5.28 - Valores médios da quantidade permeada (P) de lamivudina e zidovudina, expressa em ng.mL^{-1} em função do tempo de coleta (TC). Os valores refletem a média de seis determinações	90
Tabela 5.29 - Parâmetros relativos à regressão linear das curvas obtidas pela relação da quantidade permeada (ng) dos fármacos lamivudina e zidovudina e dos marcadores metoprolol e fluoresceína <i>versus</i> tempo (minutos).	91
Tabela 5.30 - Valores médios de permeabilidade aparente (Papp) obtidos a partir dos resultados dos ensaios de permeabilidade com os fármacos zidovudina e lamivudina e com os marcadores fluoresceína e metoprolol. Os valores representam a média de seis determinações	92
Tabela 5.31 - Resultados de permeabilidade aparente obtidos no presente trabalho e os dados descritos na literatura para os fármacos e marcadores utilizados	95
Tabela 5.32 - Valores de F e p resultantes da comparação estatística dos resultados da Papp para os fármacos (lamivudina e zidovudina) e marcadores (fluoresceína e metoprolol) do estudo	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Principais vias de transporte de fármacos através da mucosa intestinal: 1) Transporte transcelular; 2) Transporte paracelular; 3) Endocitose; 4) Transporte mediado por carreadores e 5) Transporte de efluxo (DEFERME et al., 2008)	19
Figura 3.2 - Estruturas químicas dos análogos de nucleosídeos inibidores da transcriptase reversa: 3TC (lamivudina) e AZT (zidovudina) (BALINT, 2001; CAMILO et al., 2008).....	31
Figura 4.1 - Representação esquemática da célula de difusão vertical e seus acessórios (HANSON RESEARCH, 2006)	52
Figura 5.1 - Espectro de absorção obtido na região do ultravioleta da lamivudina ($12 \mu\text{g.mL}^{-1}$) nos meios: água (vermelho), pH 1,2 (verde), pH 4,5 (preto), pH 6,8 (azul) e pH 7,5 (roxo).....	57
Figura 5.2 - Espectro de absorção obtido na região do ultravioleta da zidovudina ($12 \mu\text{g.mL}^{-1}$) nos meios: água (vermelho), pH 1,2 (verde), pH 4,5 (preto), pH 6,8 (azul) e pH 7,5 (roxo).....	57
Figura 5.3 - Espectro de absorção no UV obtido com meio água (vermelho), pH 1,2 (verde), pH 4,5 (preto), pH 6,8 (azul) e pH 7,5 (roxo)	58
Figura 5.4 - Curvas analíticas obtidas a partir da análise da lamivudina em água e nas soluções de pH 1,2, pH 4,5, pH 6,8 e pH 7,5, por meio do método espectrofotométrico UV nos comprimentos de onda de: 272, 281, 275, 271 e 273 nm, respectivamente. Cada ponto representa a média de três repetições.....	59
Figura 5.5 - Curvas analíticas obtidas a partir da análise da zidovudina em água e nas soluções de pH 1,2, pH 4,5, pH 6,8 e pH 7,5, por meio do método espectrofotométrico UV nos comprimentos de onda de 272, 281, 275, 271 e 273 nm, respectivamente. Cada ponto representa a média de três repetições.....	60

Figura 5.6 - Cromatogramas do padrão de fluoresceína(1), metoprolol(2), Ringer-Krebs modificado em detecção por fluorescência(3), fase móvel em fluorescência(4), lamivudina com detecção por UV (5), estavudina com detecção por UV (6), zidovudina com detecção por UV (7) e Ringer-Krebs modificado com detecção por UV (8), nos respectivos comprimentos de ondas	73
Figura 5.7 - Curva analítica da lamivudina(1), zidovudina(2), metoprolol(3) e fluoresceína(4) em Ringer-Krebs modificado obtida por CLAE, conforme condições descritas em 4.2.2.1	74
Figura 5.8 - Valores médios de solubilidade da lamivudina em água e nas soluções com diferentes pH. Os valores representam a média de três determinações.....	79
Figura 5.9 - Valores médios de solubilidade da zidovudina em água e nas soluções com diferentes pH. Os valores representam a média de determinações.....	80
Figura 5.10 - Perfis de dissolução intrínseca da lamivudina em diferentes meios, mantidos em temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e rotação de 50 rpm.....	85
Figura 5.11 - Perfis de dissolução intrínseca da zidovudina em diferentes meios, mantidos em temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e rotação de 50 rpm.....	85
Figura 5.12 - Curvas obtidas a partir da quantidade permeada de fluoresceína(1), metoprolol(2), lamivudina(3) e zidovudina(4) em função do tempo (minutos).	91
Figura 5.13 - Perfis de permeabilidade aparente e desvio padrão	93

RESUMO

DEZANI, A.B. **Avaliação *in vitro* da solubilidade e da permeabilidade da lamivudina e da zidovudina. Aplicações na Classificação Biofarmacêutica.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A biodisponibilidade é o fator determinante da eficácia clínica de um fármaco e depende diretamente das propriedades de solubilidade e permeabilidade da substância ativa. O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), baseado nestas características, consolidou-se nos últimos anos como ferramenta de auxílio na predição da biodisponibilidade de fármacos. O SCB tem sido empregado no desenvolvimento de formas farmacêuticas, contendo novos fármacos ou não, e no registro de medicamentos genéricos, por conta das limitações técnicas, econômicas e éticas para a realização dos ensaios diretos de biodisponibilidade. Assim, a avaliação das propriedades de solubilidade e permeabilidade dos fármacos, embora indiretamente, oferece objetivas indicações sobre a eficácia dos medicamentos, com vantagem de consolidar modelos *in vitro*, mais facilmente reproduzíveis, sem trazer riscos a voluntários sadios. Dentre os estudos de solubilidade destaca-se o método do equilíbrio que emprega a técnica de *shake-flask*. Para a determinação da permeabilidade *in vitro*, diferentes técnicas têm sido empregadas, dentre as quais destacam-se modelos que empregam tecido intestinal de animais. O presente trabalho teve como objetivos a avaliação da solubilidade e da permeabilidade de fármacos antirretrovirais (lamivudina e zidovudina) e o desenvolvimento de protocolo para determinação da permeabilidade em segmentos de intestino de ratos, por meio de modelo *in vitro* em ensaios com células de Franz. A solubilidade dos fármacos propostos foi caracterizada pela técnica *shake-flask* e por meio da dissolução intrínseca, sendo que os resultados permitiram concluir que, segundo o SCB, os fármacos zidovudina e lamivudina apresentam alta solubilidade. Os ensaios de permeabilidade demonstram que o método proposto é viável e os valores de permeabilidade da lamivudina e da zidovudina sugerem que ambos os fármacos podem ser classificados como de alta permeabilidade.

Palavras-chave: Biofarmacotécnica; Bioisenção; Permeabilidade; Solubilidade; Antirretrovirais.

ABSTRACT

DEZANI, A.B. **Solubility and permeability evaluation of lamivudine and zidovudine. Biopharmaceutical Classification.** Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2010.

Bioavailability is the determinant of the clinical efficacy of a drug and is directly dependent on the properties of solubility and permeability of the active substance. The Biopharmaceutical Classification System (BCS), based on these characteristics, has become in recent years as a tool to aid in predicting the bioavailability of drugs. The BCS has been used in the development of dosage forms, containing new drugs or not, and the registration of generic drugs, since there are technical limitations, economic and ethical guidelines for the testing of direct bioavailability. Thus, the evaluation of the solubility and permeability of the drugs, although indirectly, provides objective indications on the effectiveness of medicines, with the advantages of consolidating *in vitro* models more easily reproducible without bringing risk to healthy volunteers. Among the solubility studies highlight the *shake-flask* method, recommended by regulatory agencies. To determine the *in vitro* permeability, different techniques have been employed, among which stand out models based on intestinal tissue obtained from different animals. This study aims to evaluate the solubility and permeability of antiretroviral drugs (lamivudine and zidovudine), and the development of protocol for the determination of permeability in intestine segments of rats using *in vitro* model in experimental Franz cells. So far, the solubility of proposed drugs was characterized by *shake-flask* method and through the intrinsic dissolution. About the solubility, results showed that, according to BCS, the drugs zidovudine and lamivudine has high solubility. About the intrinsic dissolution, results showed agreement with the results of the solubility. Permeability tests showed that the proposed method is feasible and the permeability values of lamivudine and zidovudine suggest that both drugs can be classified as high permeability.

Keyword: Biopharmaceutical; Biowaive; Permeability; Solubility; Antiretrovirals.

1.INTRODUÇÃO

A eficácia clínica e a segurança de um medicamento dependem diretamente da velocidade e da extensão dos processos de dissolução e absorção do fármaco, os quais são determinantes de sua biodisponibilidade (LIPKA; AMIDON, 1999). Tal parâmetro é principalmente avaliado pelos ensaios de biodisponibilidade/bioequivalência, que são realizados tanto para aprovação de um novo princípio ativo (registro de um novo produto) como para aprovação e registro de uma nova formulação. Estes estudos avaliam, em condições pré-estabelecidas, a concentração plasmática do fármaco em função do tempo para um medicamento teste e para um medicamento de referência (PORTA et al., 2005; KANO et al., 2005; ANDRADE et al., 2006; BRASIL, 2006; SERRA et al., 2008; ARMANDO, 2008).

Contudo, os referidos estudos estão sujeitos a grande número de fontes de variação como, por exemplo, as variabilidades individuais (intraindivíduos e interindivíduos), que apresentam alto custo, além de envolverem indivíduos saudáveis, o que tem promovido uma discussão abrangente sobre as questões éticas destes ensaios (JACKSON, 1994; HELLRIEGEL et al., 1996). O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), proposto por Amidon e colaboradores (1995), representa uma das ferramentas mais importantes para o desenvolvimento de novos fármacos e formulações farmacêuticas. Este sistema é fundamentado no princípio de que o controle da extensão e da velocidade de absorção de um fármaco, administrado por via oral, depende basicamente de dois aspectos: a solubilidade do próprio fármaco e sua permeabilidade através das membranas biológicas. Fundamentado nessas propriedades, o SCB divide os fármacos em quatro classes, conforme demonstrado no Quadro 3.1.

Além disso, o SCB fornece um subsídio regulatório cujo objetivo é a substituição dos estudos *in vivo*, tais como biodisponibilidade/bioequivalência, por ensaios *in vitro*, que permitam conclusões sobre a solubilidade e a permeabilidade dos fármacos. A avaliação da permeabilidade e solubilidade dos fármacos, embora indiretamente, oferece objetivas indicações sobre a eficácia dos medicamentos. Contudo, há carência de protocolos padronizados para os estudos de solubilidade e muitos dos dados disponíveis na literatura sobre essas importantes propriedades não são confiáveis ou conclusivos.

A boa disponibilidade oral ocorre quando o fármaco tem máxima solubilidade e máxima permeabilidade no sítio de absorção, portanto, a

quantidade absorvida do fármaco pode ser predita com base nas características de permeabilidade e solubilidade *in vitro*. Assim, os dados referentes à solubilidade e à permeabilidade intestinal representam uma etapa essencial na predição da biodisponibilidade oral de substâncias candidatas a novos fármacos ou de novas formulações. Tal etapa tem sido fundamental para a avaliação dos efeitos dos vários excipientes como co-solventes ou promotores da absorção na permeabilidade intestinal (TRAPANI et al., 2004).

A solubilidade de um fármaco deve ser determinada pelo método *shake-flask*, preconizado pela FDA e EMEA (FDA, 2000; EMEA, 2008). Em relação aos métodos empregados para determinação da permeabilidade, segundo o guia da FDA e EMEA (FDA, 2000; EMEA 2008) e com objetivo de isenção para os estudos de biodisponibilidade/bioequivalência, são considerados aceitáveis estudos farmacocinéticos em humanos e métodos de permeabilidade intestinal (por exemplo: perfusão intestinal *in vivo* em humanos, perfusão intestinal *in vivo* ou *in situ* em animais, estudos *in vitro* em porções intestinais de animais, invertidos ou não invertidos, e estudos em cultura de células epiteliais em monocamadas (TUKKER, 2000; POLLI et al., 2004).

A grande vantagem dos métodos *in vitro* para a determinação da permeabilidade de fármacos é que estes permitem a avaliação mais direta da interação do fármaco com a respectiva membrana. Os estudos *in vitro* podem ser realizados por meio de diferentes técnicas, entre elas, destacam-se: métodos que empregam tecido intestinal obtido de diferentes animais; membranas artificiais e monocamadas de células obtidas por cultura celular. Além desses métodos, a permeabilidade pode ser determinada por modelos que utilizam membranas sintéticas, métodos cromatográficos com membranas artificiais imobilizadas e modelos computacionais (TUKKER, 2000; FDA, 2000; YU et al., 2002; ESCUDER-GILABERT et al., 2003; KATAOKA et al., 2003; LEGEN;KRISTL, 2003; RINAKI et al., 2003; LEGEN et al., 2005; FLATEN et al., 2006; ZAKELJ et al., 2006).

Os dispositivos mais empregados nos ensaios de permeabilidade com membrana intestinal animal incluem cubas de difusão horizontais, separadas pela membrana em estudo (ZAKELJ et al., 2006) e saco intestinal invertido (TUKKER, 2000) ou não (TRAPANI et al., 2004). Todavia, modelos que empregam as câmaras de difusão vertical, como as células de Franz, são principalmente usados

em estudos de permeação cutânea (LOPEZ et al., 2000; ROPKE et al., 2002; HERAI et al., 2007) e em membranas de cultura celular Caco-2 (GRABOVAC; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2006; SANDRI et al., 2007).

Não há dúvidas de que a previsão da solubilidade e da permeabilidade intestinal dos fármacos pode fornecer dados relevantes sobre a classificação biofarmacêutica e a biodisponibilidade, além de contribuir para o desenvolvimento farmacotécnico, com o objetivo de melhorar a eficácia dos medicamentos.

Com relação aos antirretrovirais, pesquisadores têm destacado que para o fármaco lamivudina, classe I ou III, não existem trabalhos conclusivos que garantam as devidas classificações biofarmacêuticas, uma vez que seus estudos de solubilidade e/ou permeabilidade ainda não foram confirmados (LINDENBERG et al., 2004). Diante do exposto, fica evidente a necessidade do desenvolvimento de pesquisa científica visando não apenas avaliar as características de solubilidade e permeabilidade de alguns fármacos fundamentais na terapia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), mas também desenvolver protocolos que permitam a avaliação destes parâmetros de forma simples e segura.

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo a avaliação da solubilidade e da permeabilidade *in vitro* de fármacos antirretrovirais (lamivudina e zidovudina).

2.2. Objetivos específicos

- i. Desenvolvimento do método analítico para a quantificação dos fármacos nos estudos de solubilidade e dissolução intrínseca.
- ii. Avaliação da solubilidade dos fármacos do estudo, conforme o SCB.
- iii. Avaliação da dissolução intrínseca dos fármacos do estudo.
- iv. Desenvolvimento do método analítico para a quantificação dos fármacos nos estudos de permeabilidade.
- v. Desenvolvimento de protocolo para determinação da permeabilidade em segmentos de intestino de ratos, por meio de modelo *in vitro* em ensaios com células de Franz.
- vi. Avaliação da permeabilidade dos fármacos do estudo.

3.REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB)

A magnitude da resposta farmacológica de um fármaco depende de seus atributos farmacodinâmicos e de sua biodisponibilidade, propriedade esta relacionada à quantidade e à velocidade com que o fármaco atinge o sítio de ação. A biodisponibilidade é um parâmetro relacionado ao processo de absorção e pode ser definida como uma propriedade biológica que se refere à quantidade de fármaco absorvido a partir da forma farmacêutica administrada e à velocidade do processo de absorção (ABDOU, 1989; ARANCÍBIA, 1991).

O processo de absorção *in vivo* é resultante de variados eventos e depende de inúmeros parâmetros relacionados às características dos fármacos, bem como aos aspectos fisiológicos do trato gastrointestinal (TGI). Dentre os fatores que influenciam a velocidade e a extensão da absorção intestinal, destacam-se os *fatores físico-químicos*: solubilidade aquosa, lipofilicidade, peso e tamanho molecular, pKa, carga, complexação, estabilidade do fármaco nos líquidos corporais; os *fatores fisiológicos*: tempo de esvaziamento gástrico, motilidade intestinal, pH intestinal, mecanismos envolvidos no transporte dos fármacos através das membranas dos enterócitos, metabolização pré-sistêmica, fluxo de sangue no intestino, conteúdo luminal, composição dos líquidos intestinais (como sais biliares) e estado de enfermidade do paciente; e os *fatores relacionados às características farmacêuticas*: forma farmacêutica, excipientes e adjuvantes farmacotécnicos, tecnologia envolvida na obtenção do produto farmacêutico (SHARGEL et al., 2005; DEFERME et al., 2008).

A participação desses fatores nas características de biodisponibilidade do fármaco a partir de uma forma farmacêutica faz necessárias etapas como a desintegração e a dissolução do fármaco, determinantes da liberação, para a posterior absorção.

A via de administração oral de fármacos é a rota mais frequentemente utilizada e é preferível devido sua conveniência, segurança, grande acessibilidade, maior adesão dos pacientes ao tratamento e baixo custo. Após a liberação da forma farmacêutica e a absorção, o fármaco chega aos vasos sanguíneos pré-hepáticos e posteriormente à veia porta antes da passagem pelo fígado e, finalmente, ocorre sua transferência para a circulação sistêmica (GRIFFIN; O'DRISCOLL, 2008; PRETORIUS; BOUIC, 2009).

Considerando que o processo de absorção de fármacos é resultado da interação entre as diferentes propriedades, como físico-químicas, fisiológicas e bioquímicas, atualmente não existe um único modelo *in vitro* capaz de simular fielmente a complexidade do processo de absorção *in vivo* (DEFERME et al., 2008).

A absorção pode ser estimada quantitativamente por meio da determinação da biodisponibilidade, através de estudos farmacocinéticos que permitem a obtenção das curvas de decaimento plasmático do fármaco. Estes estudos são realizados tanto para aprovação de um novo princípio ativo (registro de um novo produto) como para aprovação e registro de uma nova formulação ou, ainda, dos medicamentos genéricos e similares. Estes estudos avaliam, em condições pré-estabelecidas, a concentração plasmática do fármaco em função do tempo para um medicamento teste e um medicamento de referência (KANO et al., 2005; BRASIL, 2006; SERRA et al., 2008; ARMANDO, 2008).

Contudo, os referidos estudos estão sujeitos a grande número de fontes de variação, como, por exemplo, as variabilidades individuais (intraindivíduos e interindivíduos) que apresentam alto custo, além das questões éticas, constantemente discutidas, uma vez que empregam indivíduos sadios (JACKSON, 1994; HELLRIEGEL et al., 1996).

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto por Amidon e colaboradores em 1995 e tornou-se uma ferramenta atualmente empregada em diferentes segmentos da área farmacêutica que envolvem medicamentos, dentre eles: desenvolvimento químico-farmacêutico de novas moléculas bioativas; desenvolvimento farmacotécnico de novas formulações e estudos para bioisentar os medicamentos genéricos dos ensaios de bioequivalência realizados *in vivo*. Este sistema é fundamentado no princípio de que o controle da extensão e da velocidade de absorção de um fármaco, administrado por via oral, depende basicamente de dois aspectos: da solubilidade do próprio fármaco e de sua permeabilidade através das membranas biológicas. Fundamentado nessas propriedades, o SCB divide os fármacos em quatro classes, de acordo com suas características de solubilidade e permeabilidade, conforme demonstrado no Quadro 3.1 (MARTINEZ; AMIDON, 2002; LENNERNÄS, 2007; SOUZA et al., 2007; BONAMICI, 2009).

Quadro 3.1 - Classificação de fármacos de acordo com o SCB e principais características de cada classe.

Classe	Solubilidade	Permeabilidade	Características
I	Alta	Alta	Absorção rápida e completa, extensão de absorção maior que 90% (FDA) e 85% (EMA).
II	Baixa	Alta	Variabilidades devido a diferenças na formulação e variáveis fisiológicas.
III	Alta	Baixa	Variabilidades devido a diferenças no trânsito gastrointestinal, conteúdo luminal e permeabilidade da membrana.
IV	Baixa	Baixa	Possuem alta variabilidade na velocidade e extensão de absorção.

Fonte: AMIDON, G.L. et al., 1995; PADE; STAVCHANSKY et al., 1998; RAMA et al., 2006

Para fármacos pertencentes à classe I, com dissolução de 85% em até 30 minutos, é assegurada a bioequivalência entre o produto e seu respectivo medicamento de referência, que se apresenta na forma farmacêutica sólida de liberação imediata. Assim, a relação entre a permeabilidade/solubilidade do fármaco e a absorção através do TGI sugere que fármacos de classe I são altamente absorvidos (AMIDON et al., 1995; PADE; STAVCHANSKY et al., 1998; RAMA et al., 2006; BONAMICI et al., 2009).

A biodisponibilidade oral de fármacos da classe III geralmente está entre 40 e 80%, enquanto que fármacos da classe IV demonstram absorção incompleta ou ruim (PADE; STAVCHANSKY et al., 1998). Conforme relatos na literatura,

fármacos pertencentes às classes II e IV do SCB apresentam problemas de biodisponibilidade (KFURI, 2008).

Para fármacos altamente solúveis e altamente permeáveis (classe I), o SCB fornece uma ferramenta regulatória para substituição dos estudos de bioequivalência por ensaios de dissolução *in vitro*, reduzindo, desta forma, a exposição de voluntários sadios aos fármacos candidatos e também os custos e o tempo necessários para o desenvolvimento dos produtos farmacêuticos (LÖBENBERG; AMIDON, 2000; LENNERNÄS; ABRAHAMSSON, 2005; LENNERNÄS, 2007; COOK et al., 2008; BONAMICI, 2009).

O SCB possibilita prever o comportamento *in vivo* de um fármaco a partir dos dados de solubilidade/permeabilidade do mesmo e do comportamento de dissolução *in vitro* do produto farmacêutico. Desta forma, o SCB permite avaliar a influência de variáveis na absorção oral do fármaco e na sua biodisponibilidade, tais como: presença de alimentos, posologia, processo produtivo do medicamento, formulação ou concentração do fármaco (MARTINEZ; AMIDON, 2002; SOUZA et al., 2007; BONAMICI, 2009).

Em países em desenvolvimento, onde muitas vezes não há recursos suficientes para a realização dos ensaios de bioequivalência, o emprego do SCB torna-se uma ferramenta importante para assegurar a comparação entre os produtos candidato a genérico e o de referência (BENET et al., 2008; BONAMICI, 2009).

Em agosto de 2000, a FDA publicou um guia para isenção dos estudos de biodisponibilidade/bioequivalência com base no SCB, que trata tanto de medicamentos novos quanto de medicamentos genéricos ou alterações pós-registro (FDA, 2000). O objetivo deste guia é a de redução dos trabalhos requeridos para validar mudanças na formulação ou nos processos de produção após a aprovação de um medicamento, através da concessão de bioisenção de ensaios clínicos, com a finalidade de reduzir custos e diminuir exposição de voluntários sadios (MASUNGI et al., 2008).

Nesse sentido, inúmeros estudos de solubilidade e permeabilidade têm sido desenvolvidos para responder às questões que surgiram com o SCB e permitir o desenvolvimento racional de fármacos e formulações farmacêuticas que atendam aos critérios de eficácia e segurança (GINSKI; POLLI, 1999; EGAN;

LAURI, 2002; YU et al., 2002; KATAOKA et al., 2003; RINAKI et al., 2003; CORTI et al., 2006).

3.2 Solubilidade de fármacos

Segundo Martin e Sinko, a dissolução refere-se ao processo pelo qual as moléculas do fármaco são liberadas da fase sólida e entram na fase de solução, sendo este processo dependente de tempo que representa o passo final para a liberação da substância ativa. O fármaco em solução estará disponível para ser absorvido e distribuído pelo organismo, para exercer sua ação farmacológica, ser metabolizado e excretado (MARTIN; SINKO, 2008).

Por outro lado, a liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica depende das características de solubilidade do mesmo. Considerando a constituição aquosa dos líquidos corporais, a solubilidade de um fármaco dependerá de suas propriedades moleculares e de sua capacidade em formar pontes de hidrogênio com as moléculas de água (PANCHAGNULA; THOMAS, 2000; MARTINEZ; AMIDON, 2002; BONAMICI, 2009).

Além das propriedades moleculares que conferem às moléculas dos fármacos hidrossolubilidade e/ou lipofilicidade, outros fatores que afetam a dissolução dos fármacos no trato gastrointestinal (TGI) podem ser resumidos em: pKa do fármaco, polimorfismo, granulometria, forma farmacêutica, excipientes e adjuvantes farmacotécnicos, processo de fabricação do medicamento, pH do meio, volume e composição dos líquidos do TGI, motilidade e trânsito intestinal.

Estes fatores afetam a solubilidade e, portanto, a biodisponibilidade dos fármacos. A influência destes na biodisponibilidade é, sobretudo, maior quando a forma farmacêutica é sólida, pois neste caso a liberação do fármaco depende das etapas de desagregação, desintegração e dissolução (PRISTA et al., 1995; ASHFORD, 2005; BONAMICI, 2009).

Considerando que aproximadamente 95% dos fármacos disponíveis atualmente são ácidos ou bases fracas, os parâmetros pH do meio e pKa da molécula do fármaco serão determinantes dos processos de dissolução e, portanto, de absorção. Alterações no pH durante a dissolução ou no pH do meio no qual está o fármaco dissolvido podem afetar significativamente a

biodisponibilidade (MARTINEZ; AMIDON, 2002; AMIDON; BERMEJO, 2003; BONAMICI, 2009).

Fármacos fracamente ácidos, expostos a um meio de dissolução que possui pH maior que o pKa do fármaco, tendem a apresentar aumento da solubilidade. O mesmo ocorre para fármacos fracamente básicos, quando o pH está abaixo do valor de pKa. Portanto, a biodisponibilidade é afetada por alterações no pH durante a dissolução do fármaco, e até mesmo por alterações ocorridas nas formulações de formas farmacêuticas (MARTINEZ; AMIDON, 2002; AMIDON; BERMEJO, 2003).

De acordo com o princípio de partilha de pH, moléculas polares e ionizadas são mais solúveis em água, porém, mais lentamente absorvidas do que as não ionizadas. Segundo esta hipótese, é provável que um fármaco fracamente ácido seja mais bem absorvido no estômago, no qual se encontra na forma não ionizada, enquanto que um fármaco fracamente básico seja absorvido no intestino, no qual prepondera a forma não ionizada (ASHFORD, 2005; FLORENCE; ATTWOOD, 2006).

O polimorfismo, que corresponde à capacidade de uma substância existir em duas ou mais formas cristalinas com diferentes conformações moleculares, é um fator que influencia na solubilidade. Os fármacos também podem estar na forma de solvatos, hidratos ou amorfos (arranjos moleculares desordenados) (RAW et al., 2004; BONAMICI, 2009). Geralmente sob a forma de sólidos amorfos, alguns fármacos são melhores absorvidos, pois as moléculas estão arranjadas ao acaso, requerendo menor energia para separá-las e tornando a dissolução mais rápida (STULZER et al., 2007).

A granulometria de um pó, ou seja, o tamanho das partículas, também é outro fator que influencia a solubilidade de um fármaco. Partículas menores tendem a se solubilizar mais rapidamente que partículas maiores devido ao aumento da área superficial exposta ao solvente e, assim, a velocidade de dissolução do fármaco é maior (HINTZ; JOHNSON, 1989; PRISTA et al., 1995; ASHFORD, 2005; BONAMICI, 2009).

A solubilidade do fármaco nos líquidos do TGI também está relacionada ao volume necessário para dissolver determinada dose de fármaco e à composição destes líquidos (como por exemplo presença de enzimas, sais biliares, alimentos, entre outros). O volume de líquidos no TGI, disponível para a dissolução dos

fármacos, depende da quantidade de líquido co-administrado com o medicamento e das secreções e do fluxo de água através da superfície do intestino (MASAOKA et al., 2006).

Os sais biliares, por sua vez, podem auxiliar na dissolução de fármacos de características hidrofóbicas e, portanto, aumentar sua biodisponibilidade. Porém, as concentrações destes sais no intestino delgado proximal geralmente variam de 3 a 5 mM no estado de jejum, atingindo valores próximos de 15 mM após as refeições (CHARMAN et al., 1997; DRESSMAN et al., 1998).

Adicionalmente, devem ser considerados o tempo de esvaziamento gástrico e a velocidade do trânsito intestinal. A velocidade de dissolução deve ser suficiente para garantir a adequada solubilização e liberação do fármaco no local correspondente para a sua absorção.

A literatura tem destacado que fármacos considerados de baixa solubilidade apresentam biodisponibilidade incompleta, em função da velocidade de dissolução ser mais lenta que o trânsito intestinal (HÖRTER; DRESSMAN, 2001; BONAMICI, 2009).

3.2.1. Solubilidade segundo o SCB

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

O guia publicado pela FDA em 2000 estabelece que, para a isenção dos estudos de biodisponibilidade e bioequivalência *in vivo* para formas farmacêuticas de liberação imediata, os estudos de solubilidade devem ser conduzidos sob pH fisiológicos compreendidos entre 1,0 e 7,5; enquanto que para a EMEA, a faixa de pH deve ser entre 1,0 e 6,8, com temperatura do ensaio de 37,0 °C ± 1°C (FDA, 2000; EMEA, 2008).

Os valores de pH para a determinação da solubilidade são baseados nas características do fármaco. Assim, como exemplo, um fármaco que apresenta valor de pKa na faixa de 3 a 5 deverá ter a sua solubilidade determinada em: (1)

uma solução com pH de valor igual ao pKa do fármaco; (2) uma solução com pH de valor igual ao pKa + 1; (3) uma solução com pH de valor igual ao pKa -1; (4) uma solução com pH de valor igual a 1; e (5) uma solução com pH de valor igual a 7,5. É recomendada a realização de no mínimo três repetições para cada valor de pH (FDA, 2000; EMEA, 2008).

Para a realização dos estudos de solubilidade, os métodos mais recomendados são: método do equilíbrio (*shake-flask*) e métodos potenciométricos (seu emprego deve ser devidamente justificado). No método do equilíbrio, a avaliação da solubilidade é realizada com a adição de uma quantidade de fármaco em um meio solvente pré-definido, até que se atinja a saturação do meio, seguida de agitação desta mistura por tempo prolongado até a obtenção do equilíbrio (FDA, 2000; EMEA 2008).

Os ensaios de dissolução intrínseca de fármacos também são utilizados na avaliação da solubilidade. Com a finalidade de verificar a viabilidade deste método, em 2004, Yu e colaboradores utilizaram este ensaio para avaliação da solubilidade de fármacos, no qual foi considerado simples e conveniente para a classificação de fármacos quanto à solubilidade, pois foi constatado que variáveis estudadas, tais como: pressões de compressão, volume do meio de dissolução e posição do disco na cuba de dissolução, não interferem significativamente na dissolução intrínseca, refletindo a robustez do método (YU et al., 2004).

A taxa de dissolução intrínseca tem sido muito utilizada para caracterizar substâncias sólidas (YU; AMIDON, 1999; YU et al., 2004). Algumas das aplicações da taxa de dissolução intrínseca compreendem a determinação de parâmetros termodinâmicos associados às transições de fase cristalina, à investigação de fenômenos de transferência de massa durante o processo de dissolução, à determinação de perfis de dissolução, ao estudo da influência de tensoativos na dissolução e aos efeitos do pH na solubilização de fármacos pouco solúveis (WADKE; REIER, 1972; CHAN; GRANT, 1989; JINNO et al., 2000; YU et al., 2004).

A taxa de dissolução intrínseca, assim como o método que utiliza a técnica do *shake-flask*, também é um fenômeno de equilíbrio, portanto, espera-se uma correlação mais estreita deste parâmetro com a dissolução do fármaco *in vivo* do que com a solubilidade propriamente. Segundo Yu e colaboradores (2004), a taxa da dissolução intrínseca (TDI) pode ser utilizada para a determinação da

solubilidade e da classificação de fármacos. Assim, fármacos que possuem TDI maior que 0,1 mg/min/cm², na faixa de pH 1,0 a 7,5, podem ser classificados como pertencentes à classe I do SCB (YU et al., 2004). A relação estabelecida por estes autores é de grande importância, uma vez que a classificação utilizando a TDI não contempla a dose do medicamento. Considerando que há grande variabilidade das doses disponíveis em função dos padrões adotados por cada país, este aspecto permite calcular a solubilidade de um fármaco e classificá-lo conforme o SCB de uma forma mais padronizada (AMIDON et al., 1995; YU et al., 2002; YU et al., 2004).

Pode-se citar o exemplo do estudo referente à dissolução intrínseca do metoprolol (pKa = 9,7), no qual 500 mg do fármaco foram comprimidos na matriz com pressão de 2000 psi e o estudo de dissolução foi realizado com 900 mL de meio sob temperatura de 37,4°C. Os resultados indicaram que este fármaco mostrou-se altamente solúvel, pois apresentou taxa de dissolução intrínseca superior a 0,1 mg/min/cm² na faixa de pH 1,0 a 7,5 (23,7±2,0 mg/min/cm² em pH 1,2; 22,4±0,81 mg/min/cm² em pH 4,5 e 21,4±1,1 mg/min/cm² em pH 6,8) (YU et al., 2004).

3.3 Permeabilidade dos fármacos

A via oral de administração de medicamentos utiliza o trato gastrointestinal (TGI), que compreende desde a cavidade oral até o canal anal, formando um longo e contínuo tubo. A maior parte da absorção de substâncias ocorre no intestino delgado, que é dividido em três porções: duodeno, jejuno e íleo. Os fármacos são principalmente absorvidos no duodeno e na porção proximal do jejuno. A mucosa intestinal apresenta pregas, depressões e microvilosidades, tornando a absorção mais eficiente devido ao aumento da área de superfície (DESESSO; JACOBSON, 2001; SOUZA et al., 2007).

A parede do intestino delgado consiste de quatro camadas: a mucosa intestinal, a submucosa, a camada muscular e a camada serosa (DEFERME et al., 2008). A mucosa e a submucosa são as principais camadas que controlam a captação de nutrientes e também de fármacos após a dissolução no conteúdo luminal. A camada mucosa pode ser dividida em quatro subcamadas: a monocamada de enterócitos, a membrana basal, a lâmina própria (tecido

conectivo, nervos, linfócitos, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, macrófagos e mastócitos) e células musculares lisas (DEFERME et al., 2008).

Os enterócitos formam uma monocamada de células (epitélio colunar) presentes na superfície mais interna da camada mucosa, na qual também estão presentes células produtoras de muco. Entre os enterócitos existem junções que são responsáveis pela união e aderência entre as células (conhecidas com *tight junctions*). O espaço intercelular no jejuno humano mede 0,8 nm, enquanto que o espaço intercelular no cólon humano mede 0,3 nm. Assim, apenas pequenas moléculas hidrofílicas e polares são capazes de atravessar a monocamada de células através do espaço paracelular (entre as células) (DEFERME et al., 2008).

A membrana celular dos enterócitos é composta, essencialmente, por uma bicamada fosfolipídica, proteínas e, ligados a estas, glicolipídeos, glicoproteínas e oligossacarídeos. A membrana não é constante, apresentando canais (poros) que permitem a passagem de determinados compostos hidrossolúveis. A bicamada fosfolipídica representa uma barreira às moléculas de características hidrofílicas e que apresentam cargas. Desta forma, a partição de uma molécula de um fármaco entre a fase polar, representada pelos líquidos do TGI, e a fase apolar, correspondente à membrana celular do enterócito, depende da lipofilicidade da molécula, o que será determinante do processo de absorção (DEFERME et al., 2008).

A absorção é um processo dinâmico e complexo que envolve a permeação do fármaco através das membranas biológicas. Os mecanismos de transporte envolvem a difusão passiva, por meio dos enterócitos (transcelular), através das junções entre os enterócitos (paracelular) e os mecanismos ativos (transportadores) (BALIMANE et al., 2000). A Figura 3.1 ilustra os diferentes mecanismos de transporte de fármacos através da membrana biológica.

Para que absorção do fármaco ocorra, é necessário que ele esteja adequadamente solubilizado no meio de dissolução e, além disso, que seja capaz de transpor a membrana intestinal (enterócitos). Fármacos absorvidos por difusão passiva atravessam a membrana intestinal por via paracelular ou transcelular, de acordo com a gradiente de concentração e as características do fármaco (BALIMANE et al., 2000; BONAMICI, 2009).

O maior fator limitante para a permeação de substâncias por via paracelular é a região das junções intercelulares (*tight junctions*) que unem as

células e que podem influenciar a permeabilidade de certos fármacos, dependendo do peso molecular que possuem e de suas características físico-químicas (KIM, 2008).

Fármacos que utilizam a via paracelular de transporte geralmente apresentam baixa absorção oral devido à limitada área de superfície. A área de superfície disponível para o transporte paracelular é de aproximadamente 0,01% do total de área disponível para absorção no intestino delgado (LENNERNÄS, 2007).

Moléculas de fármacos que são mais lipofílicas distribuem-se na membrana das células e atravessam a monocamada epitelial pela via transcelular passiva, ou seja, atravessam permeando-a intracelularmente. A via de transporte através do epitélio depende do gradiente de concentração e das características de permeação do fármaco através da camada de água estacionária existente na fronteira da superfície luminal do epitélio e através das membranas apical e basolateral. Alguns fármacos podem ser transportados através das membranas dos enterócitos por endocitose (formação de vesículas). Exemplos de substâncias que utilizam esta via são: proteínas e pequenos nucleotídeos (DEFERME et al., 2008).

Existem diversos transportadores de efluxo, dentre eles, a glicoproteína-P (P-gp) é a mais estudada e atua como barreira biológica para substâncias que são substratos para este transportador, como um mecanismo de defesa fisiológico. Sua função está relacionada ao mecanismo de efluxo de substâncias, inclusive fármacos, sendo que alguns têm afinidade por esta proteína e a interação entre os dois resulta no retorno do fármaco das células epiteliais para o lúmen intestinal, o que retarda a absorção e pode influenciar a biodisponibilidade. Diversos componentes de alimentos ou da formulação de formas farmacêuticas podem interferir com os sistemas de transporte secretório, principal interação fármaco-alimento (DEFERME et al., 2008).

A glicoproteína-P (P-gp), localizada na região apical dos enterócitos, está distribuída ao longo do trato gastrointestinal e é dependente de energia (ATP). Esta proteína transportadora também está presente em outros tecidos, como no fígado, no cérebro, nas glândulas adrenais, na placenta, na barreira hematoencefálica e nos rins (KATSURA; INUI, 2003; YAO; CHIOU, 2006; SOUZA et al., 2007). As

diferenças na expressão de P-gp ao longo do trato gastrointestinal dependem do trecho do intestino utilizado (AUNGST, 1999; STORCH et al., 2007).

O transporte secretório é passível de saturação. Assim, a biodisponibilidade de alguns fármacos substratos de transportadores de efluxo aumenta de acordo com o aumento da dose administrada, pois ocorre a saturação dos transportadores. Outro motivo que pode causar aumento na biodisponibilidade é a co-administração de fármacos, o que é comum na terapêutica contra a aids, sendo que um deles pode inibir o transportador de efluxo, favorecendo a absorção da outra substância ativa, além da existência de excipientes que interagem com a P-gp, causando alterações na biodisponibilidade (AUNGST, 1999).

Figura 3.1 - Principais vias de transporte de fármacos através da mucosa intestinal: 1) Transporte transcelular; 2) Transporte paracelular; 3) Endocitose; 4) Transporte mediado por carreadores e 5) Transporte de efluxo (DEFERME et al., 2008)

Existem fatores que retardam ou diminuem a permeação de fármacos, tais como: solubilidade, dissolução do fármaco, forma farmacêutica, co-administração de alimentos, retenção do fármaco na sua forma farmacêutica, sua decomposição pelos líquidos corporais ou formação de complexos não absorvíveis, presença de excipientes, alteração do pH no local de absorção, área superficial de contato,

estado de ionização ou tamanho das partículas do fármaco (AUNGST, 1999; METSUGI et al., 2008; SOUZA et al., 2007; CUSTODIO et al., 2008; TRAN et al., 2009). Os fatores fisiológicos que afetam a absorção de fármacos são: estado biológico do TGI do paciente, tempo de esvaziamento gástrico, trânsito intestinal, falhas no transporte do fármaco através das membranas biológicas, atividade enzimática e flora intestinal (AUNGST, 1999; METSUGI et al., 2008; SOUZA et al., 2007).

O metabolismo intestinal ocorre com alguns fármacos e pode ser em consequência da existência da microflora no lúmen do intestino, bem como por enzimas presentes nos fluidos intestinais e na mucosa intestinal. A microflora pode representar importante papel na ocorrência do metabolismo pré-sistêmico de fármacos, que são pouco ou incompletamente absorvidos pela mucosa intestinal, especialmente nas porções distais do intestino (DEFERME et al., 2008).

A lipossolubilidade do fármaco também é um fator que influencia na via pela qual o fármaco atravessa a membrana intestinal. Fármacos muito lipossolúveis são capazes de atravessar a bicamada lipídica das células intestinais, chegando à circulação sanguínea (via transcelular). Já fármacos pouco lipossolúveis, dependendo de seu peso molecular, são capazes de atravessar a membrana intestinal por via paracelular (entre as células) ou canais iônicos (BALIMANE et al., 2000).

Somente a forma molecular do fármaco é capaz de atravessar a bicamada lipídica dos enterócitos. A forma iônica é hidrossolúvel e, portanto, depende do peso molecular para atravessar a membrana intestinal. A proporção entre forma molecular e forma ionizada de um fármaco é dependente do pH do meio de dissolução (ASHFORD, 2005; BONAMICI, 2009).

A camada de água estacionária é um fenômeno que ocorre adjacente à mucosa intestinal e é um importante fator limitante para a permeabilidade de substâncias altamente permeáveis, porém esta camada pode ser reduzida caso haja agitação. A presença da camada de água estacionária é um fator que contribui para a divergência de valores de permeabilidade entre os diferentes métodos (LENNERNÄS, 2007).

3.3.1. Permeabilidade segundo o SCB

Segundo o SCB, considera-se um fármaco altamente permeável aquele cuja extensão da absorção em humanos for igual ou superior a 90%, de acordo com a FDA, e de 85%, segundo a EMEA (FDA, 2000; YU et al., 2002; EMEA, 2008; BONAMICI, 2009).

Para a determinação e a caracterização da permeabilidade de fármacos, diversos modelos têm sido empregados. Os métodos mais difundidos são: 1) métodos *in vitro* baseados em sistemas celulares, tais como segmentos de tecidos de animais, cultura de células de adenocarcinoma humano (Caco-2) ou de rim canino (MDCK); 2) métodos *in situ*, que consistem na perfusão do fármaco em determinados trechos do epitélio intestinal; 3) métodos *in vitro* baseados em sistemas artificiais compostos por lipídios, exemplificados pelas membranas artificiais imobilizadas (IAM) ou pelo ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA); 4) métodos *in vivo* que contemplem os estudos farmacocinéticos em animais ou seres humanos; e 5) métodos *in silico* que empregam programas computacionais para a previsão da permeabilidade dos fármacos. Assim, a utilização de um destes métodos, ou mesmo a combinação deles, têm sido o objeto da publicação de recentes pesquisas na área da biofarmácia (FDA, 2000; YU et al., 2002; ESCUDER-GILABERT et al., 2003; KATAOKA et al., 2003; LEGEN; KRISTL, 2003; RINAKI et al., 2003; LEGEN et al., 2005; FLATEN et al., 2006; ZAKELJ et al., 2006 ; SOUZA et al., 2007; DAHAN et al., 2009).

Tais estudos têm tido grande aplicação nas bioisenções, ou isenção dos ensaios de bioequivalência para alguns tipos de fármacos, evitando, assim, a exposição de voluntários sadios a estes estudos (BALIMANE et al., 2000). Dentre as diversas maneiras de avaliar a permeabilidade, os métodos *in vitro* têm se destacado como técnicas cada vez mais empregadas para prever a absorção de fármacos de administração oral no ser humano. Além disso, são menos trabalhosos e possuem baixo custo laboratorial, comparado com os estudos *in vivo* em animais ou em seres humanos (BALIMANE et al., 2000; DAHAN et al., 2009).

3.3.2. Métodos *in vitro* que empregam cultura celular

3.3.2.1. Células Caco-2

As células Caco-2 são amplamente utilizadas na avaliação da permeabilidade de fármacos através da mucosa intestinal (AVDEEF et al., 2005; SOUZA, 2005; MAUBON et al., 2007; MOTZ et al., 2007). Estas células são extraídas de adenocarcinoma de cólon humano e, quando em cultura sobre filtros permeáveis e porosos, se diferenciam espontaneamente em enterócitos aproximadamente 21 dias após o cultivo. Elas proporcionam semelhanças morfológicas, funcionais e bioquímicas com as células humanas, apresentando-se polarizadas, ou seja, uma superfície apical e outra basolateral. Existe também boa formação das junções intercelulares (*tight junctions*) e é possível encontrar a expressão de algumas enzimas metabolizadoras e transportadoras, como a glicoproteína-P (FLACH; DALLA COSTA, 1999; BALIMANE et al., 2000; MARINO et al., 2005; BRUESEWITZ et al., 2006; MAUBON et al., 2007; SOUZA et al., 2007).

A verificação da integridade celular é feita pela medida do TEER (resistência elétrica transepitelial). A utilização de substâncias com permeabilidade conhecida é comum para complementar a avaliação da integridade da membrana (LEGEN et al., 2005; BALIMANE; CHONG, 2008; FOSSATI et al., 2008; MATILAINEN et al., 2008; WANG et al., 2008).

A monocamada de células apresenta diferenças quanto à expressão da glicoproteína-P, de acordo com as condições de cultivo (AUNGST, 1999).

Os maiores inconvenientes do uso de células Caco-2 são: grande variabilidade entre os resultados obtidos em diferentes laboratórios, baixa expressão de transportadores, presença de grossa camada de água estacionária comparada ao intestino humano, células mais justapostas, aderência do fármaco ao filtro de policarbonato; elevado tempo de crescimento das células Caco-2 (aproximadamente 21 dias) e método dispendioso, o que não permite adequada aplicação para altas quantidades de testes de permeabilidade (BALIMANE et al., 2000; CUMMINS et al., 2004; SOUZA, 2005). Além disso, o excesso no uso de co-solventes orgânicos (metanol, propilenoglicol, etanol e polietilenoglicol) nos estudos de permeabilidade usando células Caco-2 pode levar ao

comprometimento da integridade das junções entre as células (BALIMANE et al., 2000).

Yee estudou a permeabilidade de fármacos em células Caco-2 e propôs uma divisão de acordo com a permeabilidade aparente e a percentagem absorvida, levando em consideração o SCB. O Quadro 3.2 apresenta a permeabilidade aparente, a percentagem absorvida e a classificação do fármaco segundo estudos realizados em células Caco-2 (YEE, 1997).

Quadro 3.2 - Permeabilidade aparente e percentagem absorvida proposta para a classificação biofarmacêutica utilizando células Caco-2

	Papp	% absorvida
Pouco absorvido	$< 1,0 \times 10^{-6}$	0-20%
Moderamente absorvido	$1,0 - 10 \times 10^{-6}$	20-70%
Bem absorvido	$> 10,0 \times 10^{-6}$	70-100%

Fonte: YEE, 1997

3.3.2.1 Células MDCK

As células MDCK, derivadas de rim canino (Madin-Darby), diferenciam-se em células epiteliais colunares quando cultivadas em membranas semipermeáveis. Estas células apresentam junções semelhantes às células Caco-2. Existem diferenças entre os transportadores que são expressos em tecidos intestinais (Caco-2) e renais (MDCK), causando diferença na avaliação da absorção de fármacos (IRVINE et al., 1999; BALIMANE et al., 2000; SOUZA et al., 2007).

Uma das desvantagens desse método é a pouca quantidade de transportadores em relação às células Caco-2. As células MDCK têm sido utilizadas para o estudo de transporte de fármacos por difusão passiva (TAUB et al., 2002).

3.3.3 Métodos *in vitro* que empregam membranas artificiais – Pampa

O ensaio designado PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeation Assay – membrana artificial paralela) é principalmente empregado para a avaliação de substâncias candidatas a fármacos (BALIMANE et al., 2000). Entretanto, vários pesquisadores têm utilizado este modelo para estudos de classificação biofarmacêutica (MASUNGI et al., 2008). Consiste em um método altamente produtivo e passível de automação. Também utilizado em conjunto com monocamadas de células Caco-2 como ferramenta para prever a permeabilidade passiva, ativa e transcelular de fármacos (MASUNGI et al., 2008).

Este modelo foi inicialmente utilizado por Kansy e colaboradores como um método rápido para estudos de permeação transcelular. Para a composição da membrana lipídica, fosfolípides e outros constituintes de membrana são adicionados ao suporte de filtro como uma solução num solvente orgânico (KANSY et al., 1998; DEFERME et al., 2008).

A impregnação da membrana é feita em filtros de material hidrofóbico com uma mistura de lecitina e solvente orgânico inerte, formando a membrana artificial lipídica. O grau de permeabilidade das membranas é medido e comparado com a extensão conhecida de absorção do fármaco em seres humanos (BALIMANE et al., 2000; DEFERME et al., 2007).

As principais desvantagens deste modelo são: este método subestima a absorção de fármacos que são ativamente transportados ou compostos hidrofílicos com baixo peso molecular (BALIMANE et al., 2000); envolve o uso de membranas artificiais não biológicas e, deste modo, dedica-se apenas à previsão da absorção passiva transcelular (MASUNGI et al., 2008), pode ocorrer retenção de compostos lipofílicos nas membranas; é um modelo dependente da composição lipídica e do pH (DEFERME et al., 2008).

3.3.4 Perfusão *in situ*

A perfusão *in situ* em segmentos intestinais tem sua aplicação para o estudo da permeabilidade e da cinética de absorção de fármacos (BALIMANE et al., 2000; COOK; SHENOY, 2003; JAIN et al., 2007a).

Os animais usados em experimentos de perfusão normalmente são ratos Wistar anestesiados, nos quais uma cânula é inserida nas duas extremidades da porção intestinal, na qual a região proximal recebe a solução de perfusão com o fármaco estudado e na porção distal são realizadas as coletas das amostras para posterior análise, normalmente por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (BALIMANE et al., 2000; JAIN et al., 2007 a; DAHAN et al., 2009).

O uso do método de perfusão *in situ* é limitado, pois é baseado apenas no desaparecimento do fármaco do lado do lúmen intestinal como indicativo da absorção. Porém, tal desaparecimento nem sempre representa efetivamente a permeação do fármaco para a circulação sistêmica, especialmente quando ocorre metabolização na luz intestinal. Outra desvantagem é o seu elevado custo, pois este método requer grande número de animais para se obter os dados significativos de absorção. Grande quantidade de fármaco é requerida para a realização deste ensaio, o que não é viável na descoberta precoce de fármacos. Ainda a manipulação no intestino do rato, juntamente com o uso de anestesia, pode causar mudanças no fluxo sanguíneo para o intestino, o que compromete a absorção (BALIMANE et al., 2000).

3.3.5 Métodos *in vitro* que empregam tecidos animais

Os modelos que utilizam tecido animal apresentam vantagens sobre outros modelos, dentre eles destacam-se as semelhanças estruturais com o intestino humano, o que depende da espécie animal selecionada para o estudo. Estes modelos permitem avaliar e caracterizar os mecanismos envolvidos na permeação de fármacos por transporte passivo, transporte ativo, cinética de transporte, na ausência ou presença de inibidores ou substratos de glicoproteínas-P. Estes tecidos podem ser obtidos de vários animais, como porco,

rato, coelho, cachorro e rã (BALIMANE et al., 2000; YAO; CHIOU, 2006; SOUZA et al., 2007).

Apesar das questões éticas em relação aos animais, os ratos são cada vez mais utilizados como modelos em pesquisas, por se demonstrarem adequados para prever a extensão da absorção de fármacos de uso oral. Além disso, a literatura tem indicado boa correlação entre a absorção de fármacos em intestino de rato e intestino de humanos, em função de similaridades estruturais e fisiológicas (LANE et al., 2006; RUAN et al., 2006; JAIN et al., 2007a).

3.3.5.1 Ensaio *in vitro* com tecido invertido

Inicialmente este modelo foi utilizado para o estudo dos transportes de açúcares e aminoácidos. As modificações, como constante de oxigenação durante a incubação e a agitação suave, têm aumentado a viabilidade dos tecidos. Este modelo tem sido empregado para a avaliação dos mecanismos de absorção de fármacos por transporte ativo ou passivo. Utiliza-se porções intestinais de origem animal para estes estudos (BALIMANE et al., 2000; BONAMICI, 2009).

Este método consiste de remover uma porção do intestino e invertê-lo com o auxílio de uma vareta (bastão) de vidro. Posterior a isto, as extremidades são amarradas, resultando em um “saco”, que é mergulhado em recipiente com quantidades de fármaco de concentração conhecida e, após tempo predefinido, realiza-se a análise do conteúdo de fármaco no interior do “saco”, o que caracteriza a quantidade do fármaco que permeou-se através da membrana. Entretanto, ele apresenta grande desvantagem, sendo que para obter a inversão do tecido é necessária extensa manipulação, favorecendo a alteração morfológica do mesmo, o que diminui o tempo de viabilidade do tecido (BALIMANE et al., 2000; AVADI et al., 2004; DEFERME et al., 2008).

3.3.5.2 Ensaio *in vitro* com tecido não invertido

O tecido animal pode ser utilizado em estudos *in vitro* por meio de câmaras de difusão vertical ou horizontal, contendo dois compartimentos: o doador e o

receptor. Os segmentos do intestino são removidos e adequadamente dispostos entre as duas câmaras. Os segmentos intestinais de rato são atualmente os mais utilizados para estabelecer correlação dos dados de permeabilidade do fármaco com os observados em humanos (RUAN et al., 2006; SOUZA et al., 2007). Quando mantido a 37°C e em meios líquidos adequados, podem permanecer morfológica e metabolicamente ativos por aproximadamente duas horas (SOUZA et al., 2007).

Este método apresenta grandes vantagens em relação aos outros modelos *in vitro*, das quais destacam-se: a menor manipulação do tecido; a possibilidade de coletas sucessivas de amostras com frequência que permitem melhores parâmetros de análise; o emprego de menores quantidades de fármaco por experimento; similaridades entre os tecidos intestinais de animal e humano; e a presença de transportadores que podem influenciar na permeabilidade do fármaco estudado.

A utilização de animais é cada vez mais crescente na avaliação da permeabilidade intestinal. Cao e colaboradores (2008) avaliaram a permeabilidade de fármacos utilizando o jejuno de rato e observaram que os dados relativos à permeabilidade apresentaram boa correlação, uma vez que o coeficiente de determinação foi de $r^2 = 0,7$. Neste mesmo estudo, a exclusão do verapamil (um fármaco substrato da glicoproteína-P) resultou no aumento da correlação de permeabilidade entre humano e rato, com $r^2 = 0,8$ (CAO et al., 2008).

Em um outro estudo, empregando o mesmo modelo, Zhao e colaboradores avaliaram a porcentagem de absorção de 98 fármacos em ratos e humanos e obtiveram coeficiente de determinação de $r^2 = 0,88$ (ZHAO et al., 2003). Assim, em função da boa correlação entre os resultados obtidos a partir de segmentos intestinais de ratos e aqueles obtidos a partir de estudos em humanos, a utilização de animais em estudos de permeabilidade permite prever a absorção de fármacos em seres humanos (CAO et al., 2008).

A técnica que utiliza a câmara de Ussing foi originalmente desenvolvida por Ussing e Zerahn (1951) em estudos de transporte de íons através de pele isolada de sapo. Esta técnica é muito empregada em diferentes estudos dos mecanismos fisiológicos e de farmacologia e, conforme a necessidade, a câmara de Ussing

pode ser modificada e adaptada para diferentes tecidos (intestinal, nasal, bucal, etc).

A membrana submetida ao estudo é montada entre dois compartimentos (células de difusão horizontal). Tanto o lado da camada serosa como o lado da camada mucosa são normalmente preenchidos com solução tampão Ringer-Krebs, que pode ser suplementada ou não. Durante a realização do experimento, uma mistura de gás, contendo 95% O₂ e 5% CO₂, é borbulhada na solução de Ringer-Krebs a fim de manter a viabilidade do tecido. Assim, o movimento criado na solução de Ringer-Krebs durante o experimento diminui a camada de água estacionária. O estudo de transporte de substâncias pode ser realizado tanto no sentido mucosa-serosa, como no sentido inverso (DEFERME et al., 2008; NICOLAZZO; FINNIN, 2008; TRAN et al., 2009).

Para a verificação da integridade da membrana intestinal, empregam-se avaliação da resistência transepitelial (TEER) e marcadores de alta (por exemplo, metoprolol) e baixa permeabilidades (por exemplo, fluoresceína). A integridade da membrana intestinal depende de cuidados que compreendem desde o tratamento do animal até a montagem dos segmentos intestinais nas câmaras (DEFERME et al., 2008). Estas estimativas são frequentemente utilizadas em estudos de permeabilidade *in vitro*, para garantir que resultados obtidos na avaliação de substâncias não sejam duvidosos devido ao comprometimento da membrana (NICOLAZZO; FINNIN, 2008).

O uso das câmaras de Ussing permite determinar o transporte transepitelial de fármacos em combinação com o metabolismo intestinal, avaliar a absorção em diversas regiões do intestino, estudar diferenças existentes entre as espécies em relação à absorção intestinal, investigar a influência de excipientes na integridade dos tecidos e na permeabilidade de fármacos. Estudos que envolvem transportadores de efluxo também empregam o uso das câmaras de Ussing (DEFERME et al., 2008).

Por outro lado, as câmaras de difusão vertical (células de Franz) são mais comumente empregadas para estudos de permeação cutânea, a literatura deste modelo de câmara para avaliação da permeabilidade de fármacos administrados por via oral é escassa. O princípio de funcionamento das células de Franz é semelhante ao funcionamento das câmaras de Ussing, contendo um compartimento doador e outro receptor. A agitação da solução receptora pode ser

controlada de acordo com a necessidade do estudo. Também é possível adaptar um sistema para fornecer 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico na câmara doadora (ROPKE et al., 2002; HAMID et al., 2009; ONG; HEARD, 2009; PRETORIUS; BOUIC, 2009).

3.4 Fármacos antirretrovirais

Os fármacos antirretrovirais atuam inibindo a replicação viral em diferentes fases do processo. Existem atualmente quatro classes de fármacos: inibidores da protease, inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos, inibidores da transcriptase reversa não nucleosídeos e inibidores da fusão (BALINT, 2001; VERWEIJ-VAN WISSEN et al., 2005; SOUZA, 2005).

Os inibidores da protease surgiram em 1994 após o esclarecimento do mecanismo de replicação do HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana). Estudos revelaram potente efeito antiviral desses fármacos, proporcionando melhoras significantes dos sintomas da aids (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), quando administrados isoladamente ou em associação com fármacos antirretrovirais inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos. O uso de fármacos inibidores da protease contribuiu para a diminuição da mortalidade, melhora dos indicadores imunológicos e recuperação das infecções oportunistas. Os principais fármacos pertencentes a esta classe são: amprenavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir e saquinavir (AYMARD et al., 2000; SOUZA, 2005).

Os fármacos inibidores da transcriptase reversa não nucleosídeos inibem seletivamente a enzima transcriptase reversa do HIV tipo 1 por competição direta pela ligação aos sítios de ação da enzima viral. Como exemplos de fármacos desta classe podem ser citados: nevirapina, delavirdina e efavirenz (AYMARD et al., 2000; SOUZA, 2005).

Os inibidores da fusão, fármacos que atuam impedindo a entrada do HIV nas células hospedeiras, por não permitir sua fusão com a membrana celular, constituem uma nova classe de agentes antirretrovirais. Um exemplo de fármaco desta classe é enfuvirtide (POVEDA et al., 2005; SOUZA, 2005).

A primeira classe de fármacos que surgiu para o tratamento de pacientes com aids foi a dos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos, que apresentam atividade antirretroviral em função de sua potência contra o HIV

dos tipos 1 e 2. Pertencem a esta classe fármacos como abacavir, didanosina, dideoxicidina, lamivudina, estavudina e zidovudina (AYMARD et al., 2000; BALINT, 2001; CHECA et al., 2005; FERNANDES et al., 2006).

Os inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos atuam inibindo a enzima transcriptase reversa. Os fármacos desta classe são amplamente utilizados para o tratamento de pacientes com HIV. O primeiro fármaco aprovado para o tratamento da aids foi a zidovudina (ROBBINS et al., 2007). Os inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos são geralmente utilizados na terapêutica combinada, evitando o aparecimento de resistência viral durante o tratamento dos pacientes. Para exercerem sua ação terapêutica, os análogos de nucleosídeos necessitam sofrer fosforilação intracelular, de modo a ficarem ativos (SOUZA, 2005; SILVA et al., 2006; SERRA et al., 2008).

A estratégia terapêutica consiste na combinação de diferentes medicamentos antirretrovirais. O desenvolvimento de novos fármacos permite maior número de combinações entre eles (coquetéis de tratamento) e envolve estudos e sínteses dos mesmos, diversas caracterizações físicas e químicas das moléculas, sobretudo as informações relacionadas à farmacocinética e à farmacodinâmica, que são de extrema importância para a obtenção da eficácia e da segurança desses medicamentos (AYMARD et al., 2000; CHECA et al., 2005; FERNANDES et al., 2006).

A Figura 3.1 mostra as estruturas químicas dos principais fármacos utilizados no tratamento de pacientes com aids.

Figura 3.2 - Estruturas químicas dos análogos de nucleosídeos inibidores da transcriptase reversa: 3TC (lamivudina) e AZT (zidovudina) (BALINT, 2001; CAMILO et al., 2008).

3.4.1 Lamivudina

A lamivudina (tiacina ou 3TC) é um fármaco sintético derivado da citidina inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo. Apresenta menor atividade que a zidovudina e também menor toxicidade celular (BALINT, 2001; FERNANDES et al., 2006; JAIN et al., 2007b; MISTRI et al., 2007).

A atividade terapêutica da 3TC contra o HIV depende de sua fosforilação no interior dos linfócitos (SOUZA, 2005; FERNANDES et al., 2006; JAIN et al., 2007b). É amplamente utilizada no tratamento da aids e é reconhecida pelo programa do governo brasileiro de tratamento de pacientes com HIV (FERNANDES et al., 2006).

A administração da 3TC é feita por via oral sob a forma de comprimidos ou soluções e sua absorção no intestino ocorre de forma rápida, sendo que o transporte é por difusão passiva. Este fármaco apresenta biodisponibilidade oral de aproximadamente 80%, podendo ocorrer variabilidade entre os pacientes (BALINT, 2001; SOUZA, 2005; MISTRI et al., 2007).

O Quadro 3.3 apresenta o nome comercial, dose, forma farmacêutica/via de administração e laboratório responsável pela produção dos medicamentos contendo a substância ativa lamivudina.

Quadro 3.3 - Nome comercial, dose, forma farmacêutica/via de administração e laboratório referente à lamivudina.

Nome comercial	Dose	Forma farmacêutica/ via de administração	Laboratório
Epivir	150 mg	Comprimidos/oral	VIIV Helthcare
Epivir	300 mg	Comprimidos/oral	VIIV Helthcare
Epivir	10 mg.mL ⁻¹	Solução/Oral	VIIV Helthcare
Epivir -HBV	5 mg.mL ⁻¹	Solução/Oral	Glaxosmithkline
Epivir -HBV	100 mg	Comprimidos/oral	Glaxosmithkline
Lamivudina	150 mg	Comprimidos/oral	Ranbaxy
Lamivudina	150 mg	Comprimidos/oral	Aurobindo
Lamivudina	300 mg	Comprimidos/oral	Aurobindo
Lamivudina	10 mg.mL ⁻¹	Solução/Oral	Aurobindo
Lamivudina	10 mg.mL ⁻¹	Solução/Oral	Cipla Limited
Lamivudina	150 mg	Comprimidos/oral	Matrix Labs
Lamivudina	150 mg	Comprimidos/oral	Invagen Pharms
Lamivudina	300 mg	Comprimidos/oral	Invagen Pharms
Lamivudina	150 mg	Comprimidos/oral	Macleods Pharma
Lamivudina	300 mg	Comprimidos/oral	Macleods Pharma
Lamivudina	150 mg	Comprimidos/oral	Alkem Labs Ltd
Lamivudina	150 mg	Comprimidos/oral	Strides Arcolab Ltd
Lamivudina	300 mg	Comprimidos/oral	Strides Arcolab Ltd

Fonte: FDA, 2010

A 3TC apresenta-se como pó branco a branco amarelado, pKa de 4,3 (JOZWIAKOWSKI et al., 1996; FERNANDES et al., 2006) e logP de 0,06 (KASIM et al., 2004; KAPOOR et al., 2006), quando dissolvido em água purificada encontra-se sob a forma não ionizada. Este fármaco possui boa estabilidade à

luz e à temperatura, tanto sob a forma sólida quando em solução aquosa (JOZWIAKOWSKI et al., 1996; CHECA et al., 2005; FERNANDES et al., 2006).

3.4.2 Zidovudina

A zidovudina (3'-azido-3'-deoxythymidine ou azidotimidina ou AZT) foi sintetizada pela primeira vez por Horwitz e colaboradores em 1964; dez anos depois sua atividade antirretroviral foi descoberta por Ostertag e colaboradores (BALINT, 2001).

A AZT foi o primeiro fármaco antirretroviral aprovado para o tratamento da aids e até hoje é fármaco de escolha, normalmente empregado em associação com outros fármacos para combater a infecção pelo HIV (KIYOMOTO et al., 2008; PENDELA et al., 2009).

A AZT é um inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo que apresenta atividade contra o HIV tipo 1. Seu uso está relacionado ao aumento da expectativa de vida dos pacientes portadores do HIV e diminuição das infecções oportunistas (DIVI et al., 2008; KIYOMOTO et al., 2008; DESAI et al., 2009; PENDELA et al., 2009). Intracelularmente, a AZT sofre fosforilação por enzimas quinases e transforma-se em metabólito ativo trifosfatado, que possui afinidade pela enzima transcriptase reversa do HIV, causando sua inibição e consequente diminuição na replicação viral (BALINT, 2001).

A administração da AZT é feita por via oral sob a forma de comprimidos, a absorção do fármaco é quase completa e ocorre por difusão passiva pela parede intestinal, aproximadamente de 30 a 90 minutos. A taxa de absorção sofre influência das refeições, podendo levar ao prolongamento do T_{max} (tempo em que ocorre a máxima absorção do fármaco) (BALINT, 2001).

A biodisponibilidade oral da AZT é de aproximadamente 60 a 70%, podendo ocorrer grande variabilidade individual (BALINT, 2001; SOUZA, 2005; SERRA, et al., 2008). A baixa biodisponibilidade está relacionada ao metabolismo pré-sistêmico e seu tempo de meia via é aproximadamente de 1 hora (MANDAL & TENJARLA, 1996; AUNGST, 1999; CARVALHO et al., 2010; SINGH et al., 2010).

O Quadro 3.4 apresenta nome comercial, dose, forma farmacêutica/via de administração e laboratório responsável pela produção dos medicamentos contendo a substância ativa zidovudina.

Quadro 3.4 - Nome comercial, dose, forma farmacêutica/via de administração e laboratório referente à zidovudina.

Nome comercial	Dose	Forma farmacêutica/ via de administração	Laboratório
Retrovir	100 mg	Cápsula/Oral	VIIV Helthcare
Retrovir	50 mg/5 mL	Xarope/Oral	VIIV Helthcare
Retrovir	10 mg.mL ⁻¹	Injetável	VIIV Helthcare
Retrovir	200 mg	Comprimidos/oral	VIIV Helthcare
Retrovir	300 mg	Comprimidos/oral	VIIV Helthcare
Zidovudina	100 mg	Cápsula/Oral	Barr
Zidovudina	300 mg	Comprimidos/oral	Roxane
Zidovudina	300 mg	Comprimidos/oral	Aurobindo
Zidovudina	50 mg/5 mL	Xarope/Oral	Aurobindo
Zidovudina	300 mg	Comprimidos/oral	Ranbaxy
Zidovudina	50 mg/5 mL	Xarope/Oral	Cipla Limited
Zidovudina	100 mg	Cápsula/Oral	Aurobindo
Zidovudina	100 mg	Cápsula/Oral	Cipla Limited
Zidovudina	300 mg	Comprimidos/oral	Matrix Labs
Zidovudina	300 mg	Comprimidos/oral	Hetero drugs Ltd

Fonte: FDA, 2010

A AZT possui boa estabilidade à luz e à temperatura quando está na forma sólida ou em solução aquosa. Seu valor de pKa é 9,8 (CHECA et al, 2005; FERNANDES et al., 2006) e apresenta logP de 0,05 (GERTZ et al., 2008; SINGH et al., 2010).

3.4.3. Solubilidade e permeabilidade da lamivudina e da zidovudina

A literatura é escassa em relação aos dados de solubilidade e permeabilidade, determinados segundo o SCB, para vários fármacos, incluindo a lamivudina e a zidovudina.

Segundo Lindenberg e colaboradores, a lamivudina apresenta alta solubilidade e dados inconclusivos sobre permeabilidade. Assim, a classificação deste fármaco é incerta (LINDENBERG et al., 2004). Por outro lado, este fármaco tem sido considerado como pertencente à Classe I do SCB (alta solubilidade e alta permeabilidade) (FERNANDES et al., 2006).

Singh e colaboradores determinaram a solubilidade em equilíbrio da zidovudina em água e tampão fosfato pH 6,8, com emprego da técnica do shake-flask, sob agitação por 48 horas nas temperaturas de 37°C e 25°C. Os resultados indicaram que a zidovudina apresentou solubilidade de $30,6 \pm 0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ a 37°C e $19,5 \pm 0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ a 25°C, em água destilada. Em tampão fosfato pH 6,8 a sua solubilidade foi de $24,4 \pm 0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$ a 37°C e $20,3 \pm 0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ a 25°C (SINGH et al., 2010).

Pouquíssimos são os trabalhos encontrados na literatura que descrevem a avaliação e a determinação da permeabilidade dos fármacos lamivudina e zidovudina. Mariappan e Singh (2007) avaliaram a permeabilidade destes fármacos por meio do modelo de perfusão *in situ* em ratos Sprague-Dawley. Estes autores descreveram que maior permeabilidade da zidovudina e da lamivudina foi observada na porção do duodeno. Entretanto, os dados referentes à esta observação não foram apresentados (MARIAPPAN; SINGH, 2007).

Por meio de estudos com emprego de células Caco-2, Souza e colaboradores encontraram taxa de transporte igual a $1,05 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ (Papp), para a lamivudina, enquanto que a taxa de transporte da zidovudina foi igual a $61,40 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ (Papp) (SOUZA et al., 2009). Por outro lado, Aungst descreveu que a permeabilidade aparente (Papp) da zidovudina em Caco-2 foi de $21,6 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ (AUNGST, 1999).

Até o presente momento, nenhuma publicação referente ao estudo de permeabilidade por meio do modelo *in vitro* com emprego do segmento intestinal de rato em câmaras de difusão vertical foi encontrada. Apenas estudos referentes

a outros fármacos. Watanabe e colaboradores estudaram a permeabilidade do metoprolol, na qual a absorção é realizada através do mecanismo transcelular passivo (KOLJONEN et al., 2006), e apresentou valores de permeabilidade em câmaras de Ussing de $23,99 \pm 1,98 \times 10^{-6}$ cm/s (WATANABE et al., 2004), enquanto que a fluoresceína apresenta permeação por mecanismos paracelular (KOLJONEN et al., 2006).

4.MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Materiais, solventes e reagentes

- zidovudina e lamivudina: matérias-primas de grau farmacêutico de pureza, fornecidas gentilmente por Farmanguinhos, Cristália e FURP.
- zidovudina e lamivudina: substâncias químicas de referência com grau de pureza > 99 %, gentilmente fornecidas por FURP e Farmanguinhos (padrões secundários).
- solução de Ringer-Krebs, preparada de acordo com a seguinte composição: NaCl: 7,0g; KCl: 0,35 g; CaCl₂: 0,28 g; MgSO₄: 0,28 g; NaHCO₃: 2,1 g; KH₂PO₄: 0,16 g; D-Glicose: 5,05 (SHARMA et al., 2002).
- di-hidrogenofosfato de potássio, ácido clorídrico e hidróxido de sódio.
- acetonitrila, metanol e di-hidrogenofosfato de potássio (todos de pureza cromatográfica), Merck.
- água purificada Milli-Q (Millipore, USA).

4.1.2 Equipamentos e dispositivos diversos

- Equipamento para verificação da integridade de membrana Millicell®-ERS (Millipore, Bedford, MA).
- Micropipeta monocal de 20 a 100 µL (*Pipetman* P100) – Gilson.
- Micropipeta monocal de 100 a 1.000 µL (mod.4500) – Labsystems.
- Micropipeta monocal de 500 a 5.000 µL (Série 2.100) – Eppendorf.
- Seringa de precisão para amostragem manual de volume igual a 1,0 mL.
- Incubadora com plataforma de agitação orbital tipo *shaker* - Tecnal TE 420.
- Espectrofotômetro UV-Visível Varian.
- Filtros Millex LCR (com membrana PTFE) 0,45 µm e 13 mm para filtração de solventes orgânicos e aquosos (Millipore).
- Dissolutor Vankel®, modelo VK 7010, provido de oito cubas.
- Prensa hidráulica de bancada Carver.
- Cromatógrafo Shimadzu Scientific Instrumentation (Japan), constituído de bomba LC-10ADvp, detector Diode Array SPD-M10ADvp.

- Plataforma manual para testes de tópicos e transdérmicos *Start Up 6 Cells* – Variomag/Hanson Research.
- Células de difusão vertical (58-001-455) adaptadas, orifício de 5,0 mm, volume de 7,0 mL e área de exposição de 0,20 cm² – Hanson Research.

4.2 Métodos

4.2.1 Desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico para a quantificação de lamivudina e zidovudina

Nos ensaios de solubilidade e dissolução foram empregadas soluções tampão (meios) com os diversos valores de pH (1,2; 4,5; 6,8; 7,5) e água purificada (Milli-Q). Com exceção da água, as demais soluções foram preparadas de acordo com os procedimentos descritos no Quadro 4.1. As correções de pH foram realizadas com soluções de HCl 0,1M e NaOH 0,2M.

Quadro 4.1 - Descrição do modo de preparo dos meios empregados nos estudos para volume final de dois litros (2,0L).

Tipo de solução	Modo de preparo
pH 1,2	Foram dissolvidos 4,0g de NaCl em água purificada Milli-Q em um balão volumétrico de 2L. Adicionaram-se 10mL de HCl e completou-se o volume com água purificada Milli-Q (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2010).

(Continua)

(continuação)

pH 6,8	Foram adicionados 500mL da solução de fosfato de potássio monobásico* em um balão volumétrico de 2L. Posterior adição de 224mL de solução de NaOH 0,2N**, completou-se o volume do balão com água purificada Milli-Q (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).
pH 7,5	Foram adicionados 500mL da solução de fosfato de potássio monobásico (0,2N). Acrescentaram-se 395mL de solução de NaOH 0,2N e completou-se o volume do balão volumétrico de 2L com água purificada Milli-Q (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).
pH 4,5	Foram dissolvidos 13,6g de fosfato de potássio monobásico (0,2N) em balão volumétrico de 2L e completou-se o volume com água purificada Milli-Q (FARMACOPÉIA PORTUGUESA VIII, 2005).
* solução de fosfato de potássio monobásico 0,2N (1L)	Foram dissolvidos 27,22g de fosfato de potássio monobásico num balão volumétrico de 1L e completou-se o volume com água purificada (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).
** solução de NaOH (0,2N) (1L)	Foram dissolvidos 8g de NaOH em um balão volumétrico de 1L e completou-se o volume com água purificada Milli-Q (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).

Os meios foram armazenados em refrigerador (temperatura de 4°C) em frascos de vidro âmbar, devidamente limpos.

Soluções padrão dos fármacos em estudo foram preparadas na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a partir de padrões secundários com grau de pureza superior a 99% (lamivudina – 99,7%; zidovudina – 99,9%). Desta forma, pesou-se a massa corrigida do fármaco e procedeu-se a dissolução da mesma em 500mL dos meios, descritos no Quadro 4.1.

O método foi validado pela determinação dos seguintes parâmetros: linearidade, especificidade/seletividade, precisão, exatidão, estabilidade. Estes parâmetros estão descritos na RE 899/2003 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para testes que pretendem quantificar princípios ativos em produtos farmacêuticos ou matérias-primas (ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).

4.2.1.1 Linearidade

A linearidade indica a faixa de concentração do fármaco em que as respostas obtidas pela metodologia são diretamente proporcionais à quantidade de fármaco presente na amostra (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).

A curva analítica foi obtida conhecendo-se previamente o intervalo de absorbância de aproximadamente 0,2 - 1,4 UA (UA como unidades de absorbância), com o intervalo de 6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 24 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A equação da reta foi obtida por regressão linear, através do método dos mínimos quadrados (BRASIL, 2003).

4.2.1.2 Especificidade/Seletividade

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

As curvas analíticas foram obtidas para cada meio utilizado (Quadro 4.1) e para ambos os fármacos. Para lamivudina e zidovudina, o intervalo de concentrações utilizadas para a construção da curva analítica foi de 6,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a

24,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, segundo demonstrado no quadro 4.2. A determinação da concentração foi feita em espectrofotômetro UV- VIS nos comprimentos de onda que variaram de 271 nm a 281 nm, para a lamivudina, e de 267 nm a 269 nm, para a zidovudina, em função do meio utilizado. As determinações foram realizadas em triplicata.

O Quadro 4.2 apresenta os volumes de solução padrão e concentrações empregadas para a construção da curva analítica.

Quadro 4.2 - Descrição da forma de preparo das concentrações das curvas analíticas (SP - solução padrão com concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Balões volumétricos de 25mL	Volume de SP adicionado (mL)	Volume de meio adicionado (mL)	Concentração final obtida em $\mu\text{g.mL}^{-1}$
1	3	22	6
2	4	21	8
3	5	20	10
4	6	19	12
5	7	18	14
6	8	17	16
7	9	16	18
8	10	15	20
9	11	14	22
10	12	13	24

4.2.1.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Limite de detecção corresponde à menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003).

Limite de quantificação corresponde à menor quantidade do analito em uma amostra, que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003).

Os limites de quantificação e de detecção foram determinados por meio das seguintes equações:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

LD: limite de detecção

DPa: desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas analíticas

IC: inclinação da curva analítica

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

LQ: limite de quantificação

DPa: desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas analíticas

IC: inclinação da curva analítica

A partir dos valores obtidos na construção das três curvas analíticas, foram determinados os parâmetros DP_a e IC, com os quais foram calculados o limite de detecção e o limite de quantificação.

4.2.1.4 Precisão

A precisão de um método indica o grau de concordância entre resultados individuais obtidos em uma série de medidas de uma mesma amostra (ICH, 2005;

UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010). Avaliou-se este parâmetro em um mesmo dia (precisão intraensaio).

A precisão intraensaio para a lamivudina e para a zidovudina foi determinada procedendo-se da seguinte forma: em balões volumétricos de 25mL (n = 6) foram adicionados 6mL de uma solução (lamivudina ou zidovudina), cuja concentração foi de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O volume do balão foi então completado com o meio de interesse (Quadro 4.1), resultando na concentração final igual a 12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As leituras em espectrofotômetro UV-VIS foram realizadas no comprimento de onda de máxima absorção para cada meio utilizado (BRASIL, 2003; ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).

Avaliou-se também a precisão em dias diferentes (precisão intermediária) em três concentrações diferentes, em triplicata (ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).

A precisão intermediária para lamivudina e zidovudina foi determinada procedendo-se da seguinte forma: em balões volumétricos de 25mL (n = 3) foram adicionados 6mL, 8mL e 10mL de uma solução do fármaco (lamivudina ou zidovudina), cuja concentração foi de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O volume de cada balão foi completado com o meio de interesse (Quadro 4.1), resultando na concentração final igual a 12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. As leituras em espectrofotômetro UV-VIS foram realizadas no comprimento de onda de máxima absorção para cada meio utilizado (BRASIL, 2003; ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).

Os resultados foram expressos pelo coeficiente de variação dos resultados destas análises, conforme a equação abaixo:

$$\text{CV(\%)} = \frac{\text{DP}}{\text{Cmédia}} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

CV(%): coeficiente de variação em porcentagem

DP: desvio padrão

Cmédia: concentração média determinada

4.2.1.5 Exatidão

A exatidão é definida como a proximidade entre os resultados obtidos no método proposto e o valor real, podendo ser expressa em termos de porcentagem de recuperação (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).

A determinação deste parâmetro foi realizada da seguinte forma: foram adicionadas quantidades conhecidas de padrão de lamivudina a soluções amostra (amostras constituídas apenas da matéria-prima lamivudina). Em 4 balões volumétricos de 25mL foram acrescentados os volumes de 10; 9; 8 e 6mL da solução amostra de lamivudina de grau farmacêutico de pureza, cuja concentração foi de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Respectivamente, aos volumes supracitados foram acrescentados 0; 1; 2 e 4mL da solução padrão (SP) de concentração $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Completou-se o volume dos balões com o mesmo meio das soluções adicionadas. As leituras em espectrofotômetro UV-VIS foram realizadas no comprimento de onda de máxima absorção para cada meio utilizado.

As soluções amostra foram preparadas a partir da pesagem de 25,0 mg da matéria-prima de cada fármaco (lamivudina e zidovudina), estas quantidades foram dissolvidas em balões volumétricos de 500 mL e completou-se os volumes dos balões com os meios de interesse (Quadro 4.1).

A porcentagem recuperada foi determinada através da seguinte equação:

$$\%R = (C_a / C_p) \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

%R = porcentagem recuperada

C_a = quantidade de lamivudina/zidovudina determinada na solução amostra

C_p = quantidade nominal de padrão de lamivudina/zidovudina adicionada à solução amostra

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo. Além do método de recuperação, a exatidão pode ser verificada a partir de, no mínimo, 9 determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 concentrações (baixa, média e alta) com 3 réplicas cada. A exatidão é expressa

pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (BRASIL, 2003).

As soluções de concentrações $12,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $16,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $20,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, empregadas na determinação da precisão, foram utilizadas para o cálculo da exatidão do método.

4.2.2 Desenvolvimento e validação do método cromatográfico líquido de alta eficiência (CLAE) para a quantificação de lamivudina, zidovudina, metoprolol e fluoresceína

A validação da metodologia analítica, foi realizada de acordo com o item 4.2.1. Os parâmetros de validação analisados estão de acordo com a RE 899, de 2003 (BRASIL, 2003; ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010). Os resultados, obtidos, de acordo com o método proposto, foram expressos através da média, do desvio padrão e do desvio padrão relativo.

4.2.2.1. Condições cromatográficas para a quantificação de lamivudina, zidovudina, metoprolol e fluoresceína

A fase móvel foi constituída por mistura de tampão fosfato de sódio monobásico, acetonitrila, metanol e, para o ajuste de pH, foi utilizado ácido fosfórico P.A., quando necessário, conforme descrito no Quadro 4.3. Filtrou-se a solução em membrana filtrante de acetato de celulose regenerada com 47 mm de diâmetro e poro de $0,22 \mu\text{m}$. Para degaseificar, levou-se a solução ao banho ultrassônico por 30 minutos.

Quadro 4.3 - Condições cromatográficas para a quantificação de lamivudina, zidovudina, metoprolol e fluoresceína

Condições cromatográficas	Fluoresceína	Metoprolol	Lamivudina	Zidovudina
Detector	Fluorescência	Fluorescência	UV	UV
Comprimento de onda	Ex: 485 Em: 515	Ex: 225 Em: 310	270 nm	270 nm
Fase móvel	tampão fosfato 20 mM e acetonitrila (60:40) pH 4,5	tampão fosfato 20 mM e acetonitrila (80:20) pH 4,5	tampão fosfato 20 mM, acetonitrila e metanol (90:7:3) pH 4,5	tampão fosfato 20 mM, acetonitrila e metanol (90:7:3) pH 4,5
Fase estacionária	fenomenex c18 de 25 cm	fenomenex c18 de 25 cm	fenomenex c18 de 15 cm	fenomenex c18 de 15 cm
Fluxo	1,0 ml/min	1,0 ml/min	0,7 ml/min	0,7 ml/min

4.2.2.2 Linearidade

Esse parâmetro foi determinado por meio da construção da curva de calibração com soluções padrão de lamivudina, zidovudina, metoprolol e fluoresceína de diversas concentrações. Nas concentrações analisadas para validação da metodologia cromatográfica o intervalo foi de 10 ng.mL^{-1} a 1.000 µg.mL^{-1} (BRASIL, 2003).

4.2.2.3 Especificidade/Seletividade

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

4.2.2.4 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção determinado corresponde ao valor imediatamente menor ao limite de quantificação, na qual não necessariamente deve ser determinável com precisão e exatidão.

O limite de quantificação foi determinado utilizando as concentrações decrescentes e conhecidas do fármaco, em seis repetições, até o menor nível determinável com precisão e exatidão dos limites estabelecidos.

4.2.2.5 Precisão

Este parâmetro foi determinado analisando-se três concentrações diferentes em cinco réplicas no mesmo dia (precisão intraensaio) e em dias consecutivos (precisão interensaios) e foi calculado segundo a seguinte equação:

$$\text{DPR (\%)} = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{concentração média}} \times 100 \text{ (equação 5)}$$

4.2.2.6 Exatidão

A exatidão de métodos analíticos é uma medida de erro sistemático e é definida como concordância entre o valor determinado pelo método proposto e o valor real (BRASIL, 2003; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).

A exatidão intradia (análises realizadas no mesmo dia em réplicas de seis) e interdias (análises realizadas em três dias diferentes em réplicas de nove, no

total) em três concentrações diferentes e foram calculadas segundo a equação (BRASIL, 2003; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010):

$$\text{Exatidão (\%)} = (\text{Ca} / \text{Cp}) \times 100 \quad (\text{equação 6})$$

Onde:

Ca = quantidade de lamivudina/zidovudina determinada na solução amostra

Cp = quantidade nominal de padrão de lamivudina, zidovudina, metoprolol e fluoresceína

4.2.2.7 Estabilidade

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

Determinou-se a estabilidade de lamivudina, zidovudina, metoprolol e fluoresceína em: soluções padrão mantidas a -20°C, utilizadas para a preparação diária da curva de calibração; amostras descongeladas e mantidas à temperatura ambiente durante 4 horas (estabilidade de curta duração) e amostras processadas e mantidas por 24 e 48 horas à temperatura ambiente (BRASIL, 2003; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).

4.2.3 Avaliação da solubilidade

Os testes de solubilidade de lamivudina e zidovudina foram realizados por meio do método do equilíbrio, empregando a técnica do *shake-flask*, no equipamento *shaker* (incubadora com plataforma de agitação orbital). Assim, os fármacos foram adicionados separadamente em frascos plásticos com tampa e de capacidade de 50 mL, contendo, cada um, 10 mL do meio de interesse (Quadro 4.1) e 700 mg de zidovudina ou 2.500 mg de lamivudina. As quantidades dos respectivos fármacos foram suficientes para saturar os meios de dissolução. Os frascos foram então adaptados ao equipamento, que foi devidamente adequado

para manter temperatura em 37°C e agitação de 150 rpm por 72 horas (FDA, 2000; MARIN et al., 2002; WON et al., 2005).

Após o tempo indicado, as amostras foram retiradas e imediatamente filtradas com auxílio do filtro Millipore 0,45 µm. Do volume filtrado, retirou-se a alíquota de 25 µL, que foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL e, em seguida, completou-se o volume do balão com os meios de interesse (Quadro 4.1). As leituras em espectrofotômetro UV-VIS foram realizadas no comprimento de onda de máxima absorção para cada meio utilizado, pelo método validado, conforme descrito no item 4.2.1.

4.2.4 Estudos de dissolução intrínseca

Os estudos de dissolução intrínseca foram realizados com o emprego do aparato Wood e Dissolutor Vankel®, modelo VK 7010. Para a obtenção das pastilhas (discos) foi utilizada uma prensa hidráulica de bancada, utilizando pressão de 3.000 psi durante 3 minutos para o fármaco lamivudina e pressão de 2.000 psi durante 1 minuto para o fármaco zidovudina.

Padronizou-se o volume de 900 mL dos meios descritos no quadro 4.1 para a cuba de dissolução, à temperatura de 37,0°C ± 0,5°C e rotação de 50 rpm. Os intervalos de coleta foram: para a lamivudina 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 min; para a zidovudina 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70 e 80 min, com imediata reposição do meio. As determinações das quantidades dissolvidas de cada fármaco foram feitas por método espectrofotométrico, validado conforme descrito no item 4.2.1 (LEUNER; DRESSMAN, 2000; YU et al., 2004; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).

A exposição da área superficial de uma determinada substância a um meio de dissolução apropriado, mantido à temperatura constante, velocidade de rotação do aparato e pH, viabiliza a determinação da TDI (taxa de dissolução intrínseca) da mesma, que é expressa em mg/min/cm². A TDI foi determinada por meio do valor da inclinação das equações (*slope*) das curvas de dissolução intrínseca obtidas por regressão linear a partir dos resultados de dissolução dos fármacos em estudo para cada meio empregado (KUU, 1989; MARCOLONGO, 2003).

4.2.5 Estudos de permeabilidade

4.2.5.1. Obtenção e preparação dos segmentos de tecido de intestino de rato

Os segmentos de jejuno foram obtidos de ratos machos adultos, da linhagem Wistar, com peso entre 250 g e 300g, após jejum por um período de 18 horas antes do experimento. O período de jejum foi estabelecido conforme relatos da literatura relacionados aos estudos de permeabilidade de fármacos (LANGGUTH et al., 1997; SUTTON et al., 2001; KIM et al., 2006; JAIN et al., 2007a; DAHAN et al., 2009). De acordo com as normas de conduta da Comissão de Ética de Experimentação Animal e do Biotério da FCF/USP, os ratos foram sacrificados por decapitação, uma vez que a utilização de anestésicos tem influência direta sobre a fisiologia da membrana intestinal alvo.

Os segmentos de intestino foram imediatamente isolados, retirados, colocados em uma solução fria de Ringer-Krebs, modificada com adição de D-glicose (10 mM) tamponada em pH 6,8, e mantidos nestas condições por 20 minutos. Estes segmentos foram então abertos inseridos de forma adequada nas seis câmaras de difusão vertical e então mantida sob temperatura constante de $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ com oxigenação constante em um fluxo de 1 mL/minuto (HIDALGO et al., 1993; HILLGREN et al., 1995; LEGEN; KRISTL, 2003; LEGEN et al., 2005; ZAKELJ et al., 2006).

4.2.5.2. Avaliação da viabilidade das membranas utilizadas no estudo

A viabilidade das membranas foi avaliada durante todo o experimento através da resistência elétrica transepitelial, com o auxílio do equipamento Millicell®-ERS e com a adição de padrões de baixa permeação (fluoresceína) e alta permeação (metoprolol).

Com o objetivo de avaliar a integridade da membrana intestinal utilizada nos experimentos, a medida da resistência elétrica transepitelial (TEER) foi feita em cada sistema, com a utilização do aparelho Millicell ERS (Millipore

Corporation) equipado com o eletrodo. Os valores de TEER foram padronizados entre 70 e 110 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ no início do ensaio. Os segmentos que não apresentavam estes valores foram reprovados e descartados.

A avaliação do TEER também foi realizada com cada segmento utilizado no estudo ao final do experimento. Valores menores que 30 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ foram determinantes para a exclusão dos resultados de permeabilidade referentes ao segmento intestinal avaliado (LENNERNÄS et al., 1997; LI et al., 2006).

4.2.5.3. Estudos de permeação e/ou liberação

Para o início do experimento foi necessário realizar a estabilização do compartimento receptor, que foi preenchido com 7 mL solução de Ringer-Krebs modificado pH 6,8 e mantido a $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$, sob constante agitação a 200 rpm por 20 minutos. Após este período, as membranas foram inseridas adequadamente nas câmaras de difusão com um compartimento receptor e outro doador, conforme demonstrado na Figura 4.1.

Figura 4.1 - Representação esquemática da célula de difusão vertical e seus acessórios (HANSON RESEARCH CORPORATION, 2004)

Os segmentos foram dispostos nas câmaras da seguinte forma: o lado apical (A) foi colocado voltado para a câmara doadora, de forma a estar disponível para receber os fármacos e as substâncias marcadoras, e o lado basolateral (B) foi disposto voltado para a câmara receptora, o que permitiu um fluxo de permeação do lado A (apical) $\rightarrow$ B (basolateral).

Após estabilização das membranas por 20 minutos, todos os fármacos foram adicionados no compartimento doador, de forma individualizada, dissolvidos no volume de 5 mL de solução de Ringer-Krebs modificado, de forma a obter solução de concentração conhecida ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para fluoresceína, $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para metoprolol, $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para lamivudina e zidovudina). A oxigenação do tecido foi obtida por borbulhamento de uma mistura de gás contendo 95% O_2 e 5% CO_2 , garantindo fluxo de oxigenação de 1,0 mL/minuto na câmara doadora e agitação na câmara receptora permaneceu constante em 200 rpm durante todo o ensaio.

As amostragens de 1,0 mL foram realizadas a partir do compartimento receptor e em intervalos pré-estabelecidos (30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 minutos), com reposição imediata de solução de Ringer-Krebs modificado pH 6,8. O tempo total do experimento compreendido entre a retirada do tecido animal e a finalização do mesmo foi de 2 horas e quarenta minutos.

4.2.5.4. Quantificação dos fármacos nos ensaios de permeabilidade

A quantificação dos fármacos nas soluções receptoras foi realizada por meio do método cromatográfico, cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção em UV (lamivudina e zidovudina) e em fluorescência (metoprolol e fluoresceína), previamente desenvolvido e validado conforme descrito no item 4.2.2.

4.2.5.5. Análise dos resultados

A partir dos resultados obtidos no item 4.2.5.3.1 foram calculados os principais parâmetros de permeação, abaixo destacados, e obtidos os perfis de permeação em função dos intervalos de amostragem (BARRY, 1983; SHAH, 1993, TRAPANI et al., 2004):

a) Porcentagem cumulativa de fármaco permeado através das membranas no período de 2 horas (Q_t).

b) Constantes de absorção aparente de primeira ordem, expressas pelos coeficientes angulares das curvas (k_a), calculados a partir dos perfis de fármaco permeado *versus* tempo plotados em curvas semi-log.

c) Permeabilidade aparente (P), calculada pela seguinte equação:

$$P_{app} = \frac{\Delta Q}{\Delta t} \cdot \frac{1}{A} \cdot \frac{1}{C_0} \quad (\text{equação 7})$$

Onde: $\frac{\Delta Q}{\Delta t}$ é o fluxo em $\mu\text{mol}/\text{min}$ ou a quantidade de fármaco permeado pela membrana no tempo t. A corresponde à área de exposição da membrana (de $0,20 \text{ cm}^2$) e C_0 corresponde à concentração inicial do fármaco na solução colocada em contato com a membrana.

Os parâmetros de permeação foram comparados estatisticamente empregando-se a análise de variância (ANOVA), seguida de testes de Tukey. Foram considerados estatisticamente significantes resultados $p < 0,05$.

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Validação do método espectrofotométrico para quantificação dos fármacos em estudo

O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Sendo assim, o método deve atender aos seguintes parâmetros: especificidade, seletividade, linearidade, precisão, exatidão e sensibilidade (limites de quantificação e detecção) (BRASIL, 2003; ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).

O método analítico para determinação da concentração dissolvida dos fármacos nos ensaios de solubilidade foi validado a partir dos procedimentos preconizados na RE nº899, de 29 de maio de 2003, da ANVISA, também relatado no ICH (2005) e na United States Pharmacopeia (2010).

5.1.1 Validação do método analítico por espectrofotometria UV para a determinação do teor de lamivudina e zidovudina

5.1.1.1 Especificidade e seletividade do método espectrofotométrico UV para a determinação de lamivudina e zidovudina

Especificidade e seletividade de um método consistem na capacidade em medir exatamente um composto na presença de outros componentes, tais como: impurezas, produtos de degradação e componentes da formulação (BRASIL, 2003; ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010). Estes parâmetros foram avaliados em diferentes meios (água, pH 1,2; 4,5; 6,8 e 7,5).

A Figura 5.1 apresenta os espectros de absorção da lamivudina dissolvida em água e nas soluções de pH 1,2, 4,5; 6,8 e 7,5. Os resultados obtidos indicaram que este fármaco tem seu máximo de absorbância nos comprimentos de onda de 272, 281, 275, 271 e 273nm, respectivamente.

A Figura 5.2 apresenta os espectros de absorção da zidovudina dissolvida em água e nas soluções com pH 1,2, 4,5; 6,8 e 7,5. Os resultados obtidos

indicaram que este fármaco tem seu máximo de absorbância em 267, 268, 269, 267 e 267nm, respectivamente.

Estes espectros de absorção demonstraram que não houve nenhum tipo de alteração significativa no comprimento de onda utilizado para a detecção da lamivudina e zidovudina. Sendo assim, comprova-se que este método é específico e seletivo para a determinação destes fármacos nos respectivos meios de solubilização, conforme apresentado na Figura 5.3.

Figura 5.1 - Espectro de absorção obtido na região do ultravioleta da lamivudina ($12 \mu\text{g.mL}^{-1}$) nos meios: água (vermelho), pH 1,2 (verde), pH 4,5 (preto), pH 6,8 (azul) e pH 7,5 (roxo)

Figura 5.2 - Espectro de absorção obtido na região do ultravioleta da zidovudina ($12 \mu\text{g.mL}^{-1}$) nos meios: água (vermelho), pH 1,2 (verde), pH 4,5 (preto), pH 6,8 (azul) e pH 7,5 (roxo)

Figura 5.3 - Espectro de absorção no UV obtido com meio água (vermelho), pH 1,2 (verde), pH 4,5 (preto), pH 6,8 (azul) e pH 7,5 (roxo)

5.1.1.2 Linearidade do método espectrofotométrico UV para a determinação de lamivudina e zidovudina

A linearidade consiste na capacidade de um método analítico em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais às concentrações do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003; ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).

Na Figura 5.4 estão representadas as curvas analíticas das soluções de lamivudina obtidas por sua dissolução em água e nos meios de pH 1,2; 4,5; 6,8 e 7,5, respectivamente.

Figura 5.4 - Curvas analíticas obtidas a partir da análise da lamivudina em água e nas soluções de pH 1,2, pH 4,5, pH 6,8 e pH 7,5, por meio do método espectrofotométrico UV nos comprimentos de onda de: 272, 281, 275, 271 e 273 nm, respectivamente. Cada ponto representa a média de três repetições

O método espectrofotométrico, em todas as condições adotadas no estudo, mostrou-se linear, uma vez que os coeficientes de correlação (r) foram superiores a 0,999, conforme apresentado na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Resultados obtidos da análise de regressão linear a partir das curvas analíticas para a quantificação de lamivudina por espectrofotometria em água e nas soluções de pH 1,2, pH 4,5, pH 6,8 e pH 7,5

Meios	Coeficiente angular	Coeficiente linear	Coeficiente de correlação (r)
água	0,0422±0,0002	0,0066±0,0063	0,9997
pH 1,2	0,0572±0,0004	0,0116±0,0020	0,9999
pH 4,5	0,0439±0,0004	0,0002±0,0049	0,9999
pH 6,8	0,0414±0,0003	0,0008±0,0005	0,9999
pH 7,5	0,0407±0,0001	0,0053±0,0008	0,9998

Na Figura 5.5 estão representadas as curvas analíticas das soluções de zidovudina obtidas por sua dissolução em água e nos meios de pH 1,2; 4,5; 6,8 e 7,5, respectivamente.

Figura 5.5 - Curvas analíticas obtidas a partir da análise da zidovudina em água e nas soluções de pH1,2, pH4,5, pH6,8 e pH7,5, por meio do método espectrofotométrico UV nos comprimentos de onda de 272, 281, 275, 271 e 273 nm, respectivamente. Cada ponto representa a média de três repetições

O método espectrofotométrico, em todas as condições adotadas no estudo, mostrou-se linear, uma vez que os coeficientes de correlação (r) foram superiores a 0,999, conforme apresentado na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Resultados obtidos da análise de regressão linear a partir das curvas analíticas para a quantificação de zidovudina por espectrofotometria em água e nas soluções de pH 1,2, pH 4,5, pH 6,8 e pH 7,5

Meios	Coeficiente angular	Coeficiente linear	Coeficiente de correlação (r)
água	0,0397±0,0004	0,0042±0,0022	0,9999
pH 1,2	0,0381±0,0021	0,0030±0,0092	0,9998
pH 4,5	0,0400±0,0002	0,0076±0,0026	0,9999
pH 6,8	0,0378±0,0003	0,0068±0,0014	0,9999
pH 7,5	0,0382±0,0002	0,0029±0,0032	0,9999

5.1.1.3 Precisão do método espectrofotométrico UV para a determinação de lamivudina e zidovudina

A precisão do método analítico foi expressa como desvio padrão e desvio padrão relativo. Os resultados referentes à repetibilidade (precisão intraensaio), tanto para a lamivudina quanto para a zidovudina, em todos os meios, indicaram concordância com o limite de 5 % preconizado na RE 899/03, o que permite afirmar que o método, nas condições adotadas, é preciso (BRASIL, 2003; ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).

Os resultados referentes à repetibilidade (precisão intraensaio) estão apresentados na Tabela 5.3, para a lamivudina, e Tabela 5.4, para a zidovudina. Os resultados representam a média de seis determinações.

Tabela 5.3 - Valores de concentração teórica (CT), concentração média experimental (CME) e desvio padrão relativo (DPR) referentes as seis determinações da precisão intraensaio do método para a quantificação da lamivudina em diferentes meios de solubilização

Meios	C T ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	C M E ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	DPR(%)
água	12,00	12,30	1,29
pH 1,2	12,00	12,31	0,46
pH 4,5	12,00	12,62	0,67
pH 6,8	12,00	12,19	0,68
pH 7,5	12,00	12,75	0,42

Tabela 5.4 - Valores de concentração teórica (CT), concentração média experimental (CME) e desvio padrão relativo (DPR) referentes as seis determinações da precisão intraensaio do método para a quantificação da zidovudina em diferentes meios de solubilização

Meios	C T ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	C M E ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	DPR(%)
água	12,00	11,83	0,48
pH 1,2	12,00	11,86	0,30
pH 4,5	12,00	10,66	0,97
pH 6,8	12,00	11,79	0,33
pH 7,5	12,00	12,05	0,49

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

Os resultados referentes à precisão intermediária estão apresentados na Tabela 5.5, para a lamivudina, e Tabela 5.6, para a zidovudina. Os resultados representam a média de três determinações. Os resultados obtidos indicaram concordância com o limite de 5% preconizado na RE nº899, o que permite afirmar

que o método, nas condições adotadas, é preciso (BRASIL, 2003; ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010)

Tabela 5.5 - Valores de concentração teórica (CT), concentração média experimental (CME) e desvio padrão relativo (DPR), em triplicatas, referentes à determinação da precisão intermediária do método para a quantificação da lamivudina em diferentes meios de solubilização

Meios	C T ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	C M E ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	DPR (%)
água	12,00	12,14	1,76
	16,00	15,99	1,19
	20,00	19,95	0,55
pH 1,2	12,00	11,99	1,22
	16,00	16,03	0,80
	20,00	20,01	0,59
pH 4,5	12,00	12,03	0,54
	16,00	15,96	0,82
	20,00	20,06	1,19
pH 6,8	12,00	11,99	0,97
	16,00	15,97	0,97
	20,00	19,97	1,01
pH 7,5	12,00	11,93	0,54
	16,00	15,98	0,67
	20,00	19,80	0,44

Tabela 5.6 - Valores de concentração teórica (CT), concentração média experimental (CME) e desvio padrão relativo (DPR), em triplicatas, referentes à determinação da precisão intermediária do método para a quantificação da zidovudina em diferentes meios de solubilização

Meios	C T ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	C M E ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	DPR (%)
água	12,00	11,99	1,27
	16,00	16,03	0,67
	20,00	19,99	0,81
pH 1,2	12,00	11,91	0,70
	16,00	16,12	1,18
	20,00	19,95	0,76
pH 4,5	12,00	12,12	1,58
	16,00	15,97	0,77
	20,00	20,04	1,90
pH 6,8	12,00	11,98	1,23
	16,00	15,99	0,82
	20,00	19,99	0,96
pH 7,5	12,00	12,13	0,95
	16,00	16,18	1,64
	20,00	20,16	0,41

5.1.1.4 Limite de detecção e limite de quantificação do método espectrofotométrico UV para a determinação de lamivudina e zidovudina

Os resultados referentes ao limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para a lamivudina e zidovudina estão apresentados na Tabela 5.7. Os resultados representam a média de determinações a partir de três curvas analíticas.

Os resultados obtidos, tanto para a lamivudina quanto para a zidovudina, em todos os meios, permitiram concluir que o método espectrofotométrico

demonstrou limite de quantificação e detecção satisfatório, uma vez que os valores foram inferiores à menor concentração utilizada na construção da curva de linearidade ($5,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$), como apresentados na Tabela 5.7.

Tabela 5.7 - Valores médios de limite de detecção e de limite de detecção da lamivudina e da zidovudina em diferentes meios, referentes a três determinações

Meios	Lamivudina LD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Zidovudina LD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Lamivudina LQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Zidovudina LQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
água	0,45	0,16	1,49	0,56
pH 1,2	0,10	0,60	0,34	2,02
pH 4,5	0,33	0,19	1,11	0,64
pH 6,8	0,09	0,11	1,11	0,37
pH 7,5	0,06	0,25	0,20	0,84

5.1.1.5 Exatidão do método espectrofotométrico UV para a determinação de lamivudina e zidovudina

A exatidão do método para análise da lamivudina e da zidovudina na água e nas soluções de diferentes pH ficou entre 98 % e 102 %. Os resultados referentes à exatidão estão apresentados nas Tabelas 5.9 e 5.10, para a lamivudina, e Tabelas 5.11 e 5.12, para a zidovudina. Os resultados representam a média de três determinações.

Tabela 5.8 - Valores de concentração teórica (CT), concentração média experimental (CME), desvio padrão (DP) e exatidão, expressa em %, referentes à determinação da exatidão do método para a quantificação da lamivudina em diferentes meios de solubilização, utilizando três concentrações do intervalo

Meios	C T ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	C M E ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	DP	Exatidão
água	12,00	12,14	0,21	101,13
	16,00	15,99	0,19	99,91
	20,00	19,96	0,11	99,79
pH 1,2	12,00	11,99	0,15	99,91
	16,00	16,03	0,13	100,20
	20,00	20,01	0,12	100,06
pH 4,5	12,00	12,03	0,07	100,22
	16,00	15,96	0,13	99,72
	20,00	20,06	0,24	100,32
pH 6,8	12,00	11,99	0,12	99,89
	16,00	15,97	0,15	99,83
	20,00	19,97	0,20	99,86
pH 7,5	12,00	11,93	0,06	99,40
	16,00	15,98	0,11	99,86
	20,00	19,80	0,09	99,01

Tabela 5.9 - Valores de concentração teórica (CT), concentração média experimental (CME) e exatidão, por adição do padrão para a quantificação da lamivudina em diferentes meios

Meios	C T ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CME ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Exatidão
água	18,39		
	18,55	18,15	97,84
	18,71	18,28	97,67
	19,03	18,96	99,61
pH 1,2	20,61		
	20,55	20,28	98,70
	20,49	20,18	98,53
	20,36	20,31	99,76
pH 4,5	20,55		
	20,50	20,58	100,41
	20,44	20,58	100,67
	20,33	20,65	101,58
pH 6,8	19,84		
	19,86	19,69	99,18
	19,87	19,38	97,55
	19,90	19,70	98,98
pH 7,5	19,74		
	19,77	19,87	100,52
	19,79	19,94	100,74
	19,84	20,08	101,21

Tabela 5.10 - Valores de concentração teórica (CT), concentração média experimental (CME), desvio padrão (DP) e exatidão, expressa em %, referentes à determinação da exatidão do método para a quantificação da zidovudina em diferentes meios de solubilização, utilizando três concentrações do intervalo

Meios	C T ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	C M E ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	DP	Exatidão (%)
água	12,00	11,99	0,15	99,95
	16,00	16,03	0,11	100,17
	20,00	19,99	0,16	99,96
pH 1,2	12,00	11,91	0,08	99,25
	16,00	16,12	0,19	100,75
	20,00	19,95	0,15	99,74
pH 4,5	12,00	12,12	0,19	101,01
	16,00	15,97	0,12	99,82
	20,00	20,04	0,38	100,20
pH 6,8	12,00	11,98	0,15	99,82
	16,00	15,99	0,13	99,91
	20,00	20,00	0,19	100,00
pH 7,5	12,00	12,13	0,12	101,07
	16,00	16,18	0,26	101,13
	20,00	20,16	0,08	100,82

Tabela 5.11 - Valores de concentração teórica (CT), concentração média experimental (CME) e exatidão, por adição do padrão para a quantificação da zidovudina em meio diferentes meios

Meios	C T ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CME ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Exatidão (%)
água	17,95		
	18,16	18,02	99,25
	18,36	18,43	100,39
	18,77	18,76	99,92
pH 1,2	18,69		
	18,80	18,85	100,23
	18,93	18,76	99,07
	19,20	19,28	100,39
pH 4,5	17,99		
	18,20	17,96	98,71
	18,40	17,67	96,05
	18,80	17,88	95,10
pH 6,8	21,47		
	21,33	21,23	99,54
	21,18	20,95	98,90
	20,88	20,94	100,29
pH 7,5	18,27		
	18,44	18,62	100,97
	18,61	18,81	101,08
	18,96	19,27	101,66

5.1.1.6 Estabilidade do método espectrofotométrico UV para a determinação de lamivudina e zidovudina

As amostras constituídas de solução padrão em três concentrações dissolvidas em diferentes meios mostraram-se estáveis por no mínimo 72 horas à

temperatura de 37°C, conforme demonstrado na Tabela 5.12 através dos dados de exatidão expressos em porcentagem.

Tabela 5.12 - Valores experimentais obtidos na avaliação da estabilidade nos diversos meios utilizados. Os resultados expressam a média de amostras analisadas em triplicatas

Meios	Tempo (horas)	Exatidão (%)					
		Lamivudina			Zidovudina		
		12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
água	24	99,28	100,90	100,15	100,92	99,95	99,17
	48	99,00	101,15	100,02	99,76	98,80	99,42
	72	99,04	101,13	100,06	101,43	97,71	99,43
pH 1,2	24	99,48	99,68	99,85	98,00	99,58	101,97
	48	100,19	99,77	100,53	98,03	99,24	100,95
	72	100,73	100,09	100,78	98,92	99,12	101,57
pH 4,5	24	101,38	100,20	100,38	99,83	100,90	99,70
	48	100,77	100,03	100,50	99,53	100,59	99,75
	72	100,11	99,92	100,66	99,31	100,96	100,13
pH 6,8	24	99,24	100,34	98,23	99,79	99,27	99,17
	48	98,75	99,33	98,19	99,82	99,37	99,45
	72	98,14	99,17	98,19	97,88	98,35	98,77
pH 7,5	24	100,94	101,58	99,86	99,77	101,37	99,87
	48	99,41	100,21	99,54	98,88	101,25	100,05
	72	100,64	100,59	100,50	100,71	100,48	99,25

5.2 Desenvolvimento e validação dos métodos cromatográficos para a quantificação de lamivudina, zidovudina, metoprolol e fluoresceína

Os métodos desenvolvidos demonstraram-se adequados à quantificação de lamivudina, zidovudina, metoprolol e fluoresceína em amostras provenientes de ensaios de permeabilidade. Sendo assim, as validações dos métodos seguiram os parâmetros descritos anteriormente, no item 4.2.2.1, atendendo as especificações, conforme apresentado a seguir.

5.2.1 Validação do método cromatográfico líquido de alta eficiência (CLAE) UV para a determinação de lamivudina, zidovudina, metoprolol e fluoresceína

5.2.1.1 Especificidade e seletividade

Os métodos desenvolvidos, utilizando as condições cromatográficas descritas no item 4.2.2.1, demonstraram-se específicos para a lamivudina, zidovudina, metoprolol e fluoresceína.

Todas as substâncias do estudo apresentaram boa separação dos componentes da matriz, com tempo de retenção de 4,9 minutos para a lamivudina, 7,0 minutos para a estavudina (padrão interno), 22,2 minutos para a zidovudina, 10,2 minutos para o metoprolol e 10,3 minutos para a fluoresceína. Os cromatogramas obtidos em relação ao branco (amostra isenta das substâncias do estudo) e após a adição de lamivudina, zidovudina e estavudina (padrão interno), metoprolol e fluoresceína não revelaram nenhum sinal relevante nos tempos de retenção de interesse (conforme demonstrado na Figura 5.6).

(1)

(2)

(3)

(4)

(5)

(6)

(7)

(8)

Figura 5.6 - Cromatogramas do padrão de fluoresceína(1), metoprolol(2), Ringer-Krebs modificado em detecção por fluorescência(3), fase móvel em fluorescência(4), lamivudina com detecção por UV (5), estavudina com detecção por UV (6), zidovudina com detecção por UV (7) e Ringer-Krebs modificado com detecção por UV (8), nos respectivos comprimentos de ondas

5.2.1.2 Limite de quantificação

Os limites de quantificação para a lamivudina, zidovudina, metoprolol e fluoresceína estão apresentados na Tabela 5.13. Os resultados indicam que o limite de quantificação do método está de acordo para o propósito indicado.

Tabela 5.13 - Valores de limite de quantificação. Precisão e exatidão do método na concentração de 10 ng.mL⁻¹.

Substâncias	Limite de quantificação	Precisão (%)	Exatidão (%)
Lamivudina	10 ng.mL ⁻¹	2,44	145,39
Zidovudina	10 ng.mL ⁻¹	1,77	104,17
Metoprolol	10 ng.mL ⁻¹	4,81	102,90
Fluoresceína	10 ng.mL ⁻¹	4,83	95,79

5.2.1.3 Linearidade

Os métodos mostraram-se linear na faixa de 10 ng a 1.000 ng para a quantificação de lamivudina, zidovudina, metoprolol e fluoresceína.

A Figura 5.7 apresenta as curvas analíticas para lamivudina, zidovudina, metoprolol e fluoresceína, respectivamente. Os parâmetros obtidos por regressão linear a partir destas curvas estão apresentados na Tabela 5.14.

Figura 5.7 - Curva analítica da lamivudina(1), zidovudina(2), metoprolol(3) e fluoresceína(4) em Ringer-Krebs modificado obtida por CLAE, conforme condições descritas em 4.2.2.1

Tabela 5.14 - Resultados obtidos por meio da regressão linear a partir da curva analítica definida para a quantificação da lamivudina, zidovudina, metoprolol e fluoresceína em Ringer-Krebs modificado

Parâmetro	Lamivudina	Zidovudina	Metoprolol	Fluoresceína
Coeficiente angular (a)	0,0115	0,0102	0,0019	0,0020
Coeficiente linear (b)	-0,0256	-0,0665	0,0019	-0,0155
Coeficiente de correlação (r^2)	0,9996	0,9999	0,9993	0,9996

5.2.1.4 Precisão e exatidão

Os valores que indicam precisão e exatidão, intra e interensaio, dos métodos referentes à quantificação de lamivudina, zidovudina, metoprolol e fluoresceína estão apresentadas na Tabela 5.15. Os resultados referentes à precisão indicaram resultados satisfatórios, uma vez que a apresentaram variação menor que 15%. Portanto, o método apresentou-se preciso e exato para as determinações das substâncias do estudo de permeabilidade.

Tabela 5.15 - Resultados referentes à precisão e à exatidão, intraensaio e interensaio, do método analítico para a quantificação de lamivudina, zidovudina, metoprolol e fluoresceína por CLAE

Concentração ng.mL ⁻¹	Precisão (%)		Exatidão (%)	
	Intraensaio	Interensaio	Intraensaio	Interensaio
Lamivudina				
20	3,67	4,55	102,33	102,78
500	0,92	3,89	95,70	99,36
750	1,89	2,22	100,03	101,77
Zidovudina				
20	5,83	6,87	97,70	98,05
500	0,89	3,31	100,15	101,75
750	1,07	1,17	100,63	100,16
Metoprolol				
20	3,18	4,85	99,35	101,45
500	1,49	2,29	98,06	99,90
750	2,88	1,59	92,91	99,93
Fluoresceína				
20	1,89	2,66	103,21	104,82
500	1,07	1,32	96,69	96,46
750	0,96	1,68	98,73	97,70

5.2.1.5 Estabilidade

As amostras contendo os padrões das substâncias (lamivudina, zidovudina, metoprolol e fluoresceína) em solução de Ringer-Krebs modificado mantiveram-se estáveis por, no mínimo, 48 horas, à temperatura ambiente, conforme apresentado na Tabela 5.16.

Tabela 5.16 - Valores experimentais de exatidão obtidos a partir da avaliação da estabilidade de amostras de lamivudina, zidovudina, metoprolol e fluoresceína analisadas por CLAE

Tempo (horas)	Exatidão (%)		
	20 ng.mL ⁻¹	500 ng.mL ⁻¹	750 ng.mL ⁻¹
Lamivudina			
24	97,38	103,23	104,04
48	97,95	97,96	101,11
Zidovudina			
24	104,54	100,46	100,22
48	99,05	101,83	100,96
Metoprolol			
24	105,17	99,31	94,75
48	99,13	99,92	96,99
Fluoresceína			
24	104,70	92,36	92,45
48	102,24	89,16	89,84

5.2.1.5.1. Estabilidade em ciclo de congelamento e descongelamento

A avaliação dos resultados da estabilidade das amostras de controle de qualidade avaliadas por um ciclo de congelamento e descongelamento mostra que estas mantiveram-se estáveis, apresentando precisão e exatidão aceitáveis, conforme apresentado na Tabela 5.17.

Tabela 5.17: Avaliação da precisão e exatidão de amostras de controle de qualidade submetidas a um ciclo de congelamento e descongelamento. Os resultados expressam a média de amostras analisadas em triplicatas

Concentração (ng.mL ⁻¹)	Exatidão (%)	Precisão (%)
Lamivudina		
20	94,39	3,37
500	104,31	1,16
750	103,36	5,66
Zidovudina		
20	101,52	5,79
500	102,16	4,57
750	99,82	3,15
Metoprolol		
20	90,85	4,59
500	96,73	5,57
750	92,53	0,72
Fluoresceína		
20	109,88	7,21
500	105,56	3,69
750	90,85	4,57

5.3. Ensaio de solubilidade

Por definição, solubilidade é a extensão pela qual uma molécula de um sólido é removida a partir de sua superfície por um solvente (MARTINEZ; AMIDON, 2002). A determinação da solubilidade de um composto é de extrema importância para a caracterização do fármaco. Este parâmetro tem sido aplicado para o adequado desenvolvimento biofarmacotécnico de formulações e para a classificação dos fármacos conforme o SCB.

De acordo com o guia de isenção de bioequivalência da FDA, a solubilidade de um fármaco é determinada pela dissolução da dosagem mais alta de uma forma farmacêutica de liberação imediata no volume de 250 mL, ou menos, de uma solução tampão que apresente pH dentro de uma faixa de 1,0 a 7,5, sob temperatura de 37°C (FDA, 2000).

O volume de 250 mL é estimado com base no desenho de um estudo de biodisponibilidade oral, no qual o medicamento é administrado com 250 mL de água. O número de diferentes faixas dos pH a serem analisados depende das características de ionização do fármaco e de seu pKa. Por exemplo, se o pKa variar na faixa de 3 a 5, a solubilidade deverá ser determinada em: $\text{pH} = \text{pKa}$, $\text{pH} = \text{pKa} - 1$, $\text{pH} = \text{pKa} + 1$ e nos $\text{pH} = 1 - 7,5$, devendo ser realizado com três replicatas, sendo o pH verificado após a adição do fármaco na solução tampão (FDA, 2000; BONAMICI, 2009).

O ensaio para determinação da solubilidade do fármaco, conforme as preconizações da FDA (2000), deve ser realizado por meio dos seguintes métodos: método do equilíbrio, potenciométrico e dissolução intrínseca proposto por YU e colaboradores em 2004, sendo o método do equilíbrio, que emprega a técnica do *shake-flask*, o mais utilizado. Para sua realização, devem ser verificadas as seguintes condições: concentrações de saturação do fármaco; velocidade e o tempo de agitação que a solução saturada do fármaco será submetida. Normalmente, estes ensaios empregam a incubação sob agitação em torno de 150 rpm durante um intervalo de tempo que varia de 24 horas a 72 horas, sendo que a temperatura é mantida a 37°C (FDA, 2000; EMEA, 2008; SINGH et al., 2010).

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

As Tabelas 5.18 e 5.19 apresentam os resultados obtidos por meio dos ensaios de solubilidade da lamivudina e da zidovudina, respectivamente, nos meios propostos para o estudo (Quadro 4.1). Os desvios padrão das análises e os

coeficientes de variação também estão descritos nas tabelas. As representações gráficas destes valores para lamivudina e zidovudina estão apresentadas nas Figuras 5.8 e 5.9, respectivamente.

Tabela 5.18 - Valores médios de solubilidade (M), expressos em mg.mL^{-1} , desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) da lamivudina nos diferentes meios empregados. Ensaio realizado em triplicata

	pH (meios)				
	água	1,2	4,5	6,8	7,5
Média (M)	177,53	212,63	155,95	179,03	190,70
DP	2,97	9,95	4,04	12,27	17,21
DPR%	1,67	4,68	2,59	6,85	9,02

Figura 5.8 - Valores médios de solubilidade da lamivudina em água e nas soluções com diferentes pH. Os valores representam a média de três determinações.

Tabela 5.19 - Valores médios de solubilidade (M), expressos em mg.mL^{-1} , desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) da zidovudina nos diferentes meios empregados. Ensaio realizado em triplicata

	pH (meios)				
	água	1,2	4,5	6,8	7,5
Média (M)	25,39	18,65	23,25	24,43	20,10
DP	2,74	0,16	2,12	1,06	0,23
DPR%	10,79	0,86	9,10	4,33	1,14

Figura 5.9 - Valores médios de solubilidade da zidovudina em água e nas soluções com diferentes pH. Os valores representam a média de determinações.

A Tabela 5.20 demonstra os valores da razão dose: solubilidade, expressos em mL (quantidade em volume necessária do meio para solubilizar totalmente a maior dose administrada).

Tabela 5.20 - Valores da razão dose: solubilidade média (valores expressos em mL)

pH	Razão Dose: solubilidade (mL)				
	água	1,2	4,5	6,8	7,5
Lamivudina*	1,69	1,41	1,92	1,68	1,57
Zidovudina*	11,82	16,08	12,90	12,28	14,93

*maior dose administrada oralmente = 300mg

Ambos os fármacos mostraram alta capacidade de solubilização nos meios indicados. Estes resultados indicam que a solubilidade da lamivudina e da zidovudina, em valores de pH fisiológicos, não será fator limitante para a biodisponibilidade dos mesmos. Segundo o SCB, fármacos da classe I devem apresentar alta solubilidade em diferentes condições de pH. Ou seja, a maior dose do fármaco, veiculada nos produtos farmacêuticos disponíveis, deve se solubilizar em 250 mL das soluções de pH variados (FDA, 2000).

A maior dose de lamivudina encontrada nos produtos disponíveis é de 300 mg. Para que um fármaco seja classificado como de alta solubilidade, segundo o SCB, ele deve apresentar a maior dose disponível no mercado completamente solúvel em 250 mL em todas as condições avaliadas, conforme apresentado na Tabela 5.20 (FDA, 2000).

Segundo o INDEX MERCK (2001), os valores de solubilidade para a lamivudina e zidovudina, de $\sim 70,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ à 20°C e de $25,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ à 25°C , respectivamente. Os resultados encontrados no presente trabalho diferem dos valores descritos no INDEX MERCK (2001). Entretanto, ressalta-se que existem diferenças em relação ao método e à temperatura do ensaio. O método para avaliação da solubilidade, empregado neste estudo, segue as orientações preconizadas pela FDA. A diferença de temperatura entre os dois métodos é fator importante, visto que, quanto maior a temperatura maior será a solubilidade do fármaco.

Os valores de zidovudina encontrados no presente trabalho estão de acordo com os resultados encontrados por Singh e colaboradores (2010), que por meio do método do equilíbrio, a 37°C, obtiveram os seguintes valores de solubilidade: 30,6 mg.mL⁻¹ em água e 24,4 mg.mL⁻¹ em tampão fosfato pH 6,8 (SINGH et al., 2010).

Segundo Lindenberg e colaboradores, a lamivudina apresenta alta solubilidade e dados inconclusivos sobre permeabilidade. Assim, a classificação deste fármaco é incerta (LINDENBERG et al., 2004). Por outro lado, este fármaco tem sido considerado como pertencente à Classe I do SCB (alta solubilidade e alta permeabilidade) (FERNANDES et al., 2006).

5.4. Ensaio de dissolução intrínseca

A determinação da dissolução intrínseca foi empregada com o dissolutor Vankel, juntamente com o aparato de Wood. Este tipo de ensaio é feito sem emprego de adjuvantes farmacotécnicos e com forças de compressão padronizadas (ZAKERI-MILANI et al., 2009). A dissolução intrínseca tem como objetivo a avaliação da liberação do fármaco (quando este não está contido numa forma farmacêutica) para um meio similar aos líquidos corpóreos (SOUZA et al., 2007).

Todos os ensaios de dissolução intrínseca foram realizados com a utilização dos meios propostos: água purificada, suco gástrico artificial (HCl pH 1,2) e tampão fosfato pH 4,5; 6,8 e 7,5 (conforme apresentado no Quadro 4.1), com tempos de coleta padronizados para cada fármaco, conforme descrito no item 4.2.4.

Condições, como vibração do equipamento, alinhamento e velocidade do sistema de agitação, geometria da cuba, adsorção, presença de gás dissolvido no meio de dissolução, centralização dos aparatos, local de amostragem, volume e características do meio de dissolução, causam interferências durante a dissolução do fármaco (SOUZA et al., 2007). Portanto, todas estas condições foram padronizadas para minimizar interferências.

As Tabelas 5.21 e 5.22 apresentam os resultados (valores médios) da dissolução intrínseca para lamivudina e zidovudina.

Tabela 5.21 - Valores de quantidade média dissolvida (D) expressa em mg/cm² de lamivudina em função do tempo de coleta (TC) em cada um dos meios. Todos os ensaios foram realizados em triplicata

TC (min)	D (mg) água	D (mg) pH 1,2	D (mg) pH 4,5	D (mg) pH 6,8	D (mg) pH 7,5
2	9,53	14,01	12,06	8,95	8,54
4	20,81	32,23	20,70	17,20	18,60
6	33,12	51,29	34,23	27,08	27,99
8	44,55	70,02	40,76	36,96	36,68
10	57,14	91,12	55,13	48,19	46,23
12	71,09	111,08	67,85	58,90	52,01
14	87,72	130,49	79,94	68,56	67,16
16	102,66	153,34	99,03	78,64	77,04
18	123,14	172,63	116,07	90,91	87,73
20	138,32	192,97	126,94	102,51	96,62

Tabela 5.22 - Valores de quantidade média dissolvida (D) expressa em mg/cm² de zidovudina em função do tempo de coleta (TC) em cada um dos meios. Todos os ensaios foram realizados em triplicata

TC (min)	D (mg) água	D (mg) pH 1,2	D (mg) pH 4,5	D (mg) pH 6,8	D (mg) pH 7,5
6	5,29	5,73	5,83	5,85	5,29
8	7,07	7,40	7,42	7,73	6,93
10	8,89	8,98	9,03	9,47	8,50
12	10,68	10,58	11,28	11,32	10,13
14	13,11	12,07	12,93	12,90	11,65
16	15,05	13,38	14,75	14,57	12,97
18	16,82	14,78	16,51	16,13	14,24
20	18,65	16,23	18,44	17,69	15,64
25	23,44	19,54	22,58	20,92	18,85
30	28,22	22,92	27,02	24,74	22,17
35	33,26	25,83	31,37	27,81	25,19
40	37,89	29,64	35,53	31,68	28,21
45	42,63	32,92	41,28	34,49	31,26
50	47,30	36,70	45,83	37,98	34,78
55	51,95	43,10	49,26	41,63	38,00
60	56,41	47,25	54,41	44,50	41,08

A lamivudina apresentou maior velocidade de dissolução que a zidovudina. Portanto, este fármaco apresentou tempo maior para atingir 10% de dissolução, o que é demonstrado pelos valores destacados em negrito nas Tabelas 5.21 e 5.22. Em função da dissolução rápida das amostras de lamivudina, foi necessário o aumento da força e do tempo de compactação impostos a estas amostras.

Ao menos 10 pontos foram utilizados para a construção dos perfis de dissolução intrínseca dos dois fármacos. Para a lamivudina foram impostos curtos intervalos de tempo para que se alcançassem pontos de coletas suficientes para se obter resultados significativos, devido à grande velocidade de dissolução. Para

a zidovudina, seguiram-se inicialmente os tempos de coleta da lamivudina, aumentando-se gradualmente os intervalos entre os pontos de coleta.

As Figuras 5.10 e 5.11 apresentam os perfis de dissolução intrínseca da lamivudina e da zidovudina. Os parâmetros relativos aos coeficientes angular, linear e de correlação dos meios avaliados estão representados nas Tabelas 5.23 e 5.24.

Figura 5.10 - Perfis de dissolução intrínseca da lamivudina em diferentes meios, mantidos em temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e rotação de 50 rpm

Figura 5.11 - Perfis de dissolução intrínseca da zidovudina em diferentes meios, mantidos em temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e rotação de 50 rpm

Tabela 5.23 - Parâmetros referentes aos perfis de dissolução intrínseca da lamivudina obtidos a partir da regressão linear

Parâmetro	Valor				
	Água	pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8	pH 7,5
Coeficiente angular (a)	6,9423	9,8279	6,3829	5,1345	4,8588
Coeficiente linear (b)	-6,8700	-5,6255	-4,4926	-2,4453	-1,4412
Coeficiente de correlação (r)	0,9904	0,9985	0,9902	0,9982	0,9969

Tabela 5.24 - Parâmetros referentes aos perfis de dissolução intrínseca da zidovudina obtidos a partir da regressão linear

Parâmetro	Valor				
	Água	pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8	pH 7,5
Coeficiente angular (a)	0,9525	0,7460	0,9061	0,7135	0,6897
Coeficiente linear (b)	-0,3895	0,9411	0,0980	2,2252	1,1475
Coeficiente de correlação (r)	0,9999	0,9976	0,9997	0,9966	0,9973

As velocidades de dissolução intrínseca (TDI) dos dois fármacos foram também determinadas. Segundo Zakeri-Milani e colaboradores (2009), a dissolução intrínseca pode ser utilizada quando não é possível mensurar precisamente a solubilidade, embora, segundo os autores, há a necessidade de mais pesquisas nesta área (ZAKERI-MILANI et al., 2009).

A Tabela 5.25 apresenta as TDI da lamivudina e da zidovudina nos meios estudados. Os resultados obtidos referentes à TDI apresentaram concordância em relação aos resultados de solubilidade e permitiram conclusões semelhantes a respeito da solubilidade destes fármacos. Quanto aos valores de pH nos quais os fármacos lamivudina e zidovudina apresentaram maior solubilidade também mostraram valor de TDI superior.

O uso da dissolução intrínseca como metodologia para classificação biofarmacêutica apresenta-se como um método eficaz, visto que os dados obtidos

são independentes da dose administrada do medicamento, o que traduz de forma mais confiável o verdadeiro comportamento do fármaco.

Os dados obtidos por meio do ensaio de dissolução intrínseca confirmam os resultados obtidos em relação à solubilidade. Tanto a lamivudina como a zidovudina podem ser classificadas como fármacos de alta solubilidade, conforme a proposta de Yu e colaboradores (2004), que classifica fármacos com TDI maior que 0,1 mg/min/ cm² como altamente solúveis.

Tabela 5.25 - TDI (taxa de dissolução intrínseca) dos fármacos lamivudina e zidovudina

pH (meios)	TDI (mg/min/cm ²)				
	água	1,2	4,5	6,8	7,5
Lamivudina	6,9423	9,8279	6,3829	5,1345	4,8588
Zidovudina	0,9515	0,7389	0,9002	0,7218	0,6628

5.5. Ensaio de permeabilidade

5.5.1. Estudo de permeabilidade através de segmentos intestinais obtidos de ratos Wistar

A avaliação da permeabilidade no sentido A (lado apical) → B (lado basolateral) foi realizada adicionando-se 5,0 ml de Ringer-Krebs modificado contendo os fármacos no lado A (câmara doadora) e 7,0 mL da solução de Ringer-Krebs modificada no lado B (câmara receptora). As condições do teste, como concentrações dos fármacos, foram padronizadas segundo descrito no item 4.2.5.

Os valores de TEER dos sistemas de permeação mantiveram-se entre o intervalo de 70 Ω.cm² e 110 Ω.cm², valores estes estipulados para garantir a integridade da membrana, conforme descritos no item 4.2.5.2. Verificou-se que os relatos da literatura referentes aos valores de TEER apresentam grande divergência, inclusive alguns trabalhos não apresentam uma padronização, e

apenas indicam os valores obtidos e os erros padrão envolvidos. Visando a padronização no método desenvolvido no presente trabalho, a faixa de 70 a 110 $\Omega\cdot\text{cm}^2$ foi estabelecida. Este procedimento foi adotado em função de dados de TEER descritos em trabalhos que empregaram câmaras de difusão para estudos de permeabilidade. Menon & Barr (2003) determinaram valores de TEER entre $74,0\pm 18 \Omega\cdot\text{cm}^2$ e $82,0\pm 12 \Omega\cdot\text{cm}^2$, enquanto que Mineo e colaboradores (2002) e Thomas e colaboradores (2006) estabeleceram valores de TEER de $123,9\pm 3,5 \Omega\cdot\text{cm}^2$ e de $125,0\pm 27,7 \Omega\cdot\text{cm}^2$, respectivamente. Considerando que não há padronização para os valores de TEER, a faixa proposta no presente estudo está de acordo com trabalhos descritos anteriormente e tem o objetivo de uniformizar as condições do ensaio, visto que a integridade da membrana é fator relevante para a obtenção de dados.

A Tabela 5.26 demonstra os valores de TEER obtidos para os ensaios de permeabilidade.

Tabela 5.26 - Valores de TEER referentes aos ensaios de permeabilidade

	Fluoresceína $\Omega\cdot\text{cm}^2$		Metoprolol $\Omega\cdot\text{cm}^2$		Lamivudina $\Omega\cdot\text{cm}^2$		Zidovudina $\Omega\cdot\text{cm}^2$	
Experimento	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
1	90	39	101	40	82	56	82	44
2	81	59	82	53	82	40	96	59
3	78	59	83	49	80	59	86	56
4	83	59	94	51	98	49	82	59
5	85	56	91	58	93	55	79	48
6	75	55	90	67	81	48	82	42

Durante o experimento foram retiradas alíquotas de 1,0 mL do compartimento receptor após 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 minutos do início do experimento.

As Tabelas 5.27 e 5.28 apresentam os valores de quantidade média permeada dos fármacos e dos marcadores utilizados no estudo. A Figura 5.12 representa graficamente os dados de permeabilidade. A Tabela 5.29 apresenta os parâmetros relativos à regressão linear das curvas obtidas pela relação da

quantidade permeada dos fármacos e marcadores empregados no estudo (ng) *versus* tempo (minutos) (coeficiente angular, coeficiente linear e coeficiente de correlação), conforme descrição no item 4.2.5.3.2.

Os resultados descritos nas Tabelas 5.27, 5.28 e 5.29 indicaram que a fluoresceína, por ser uma substância marcadora de baixa permeabilidade, apresentou valores de permeabilidade extremamente baixos em relação aos fármacos metoprolol, lamivudina e zidovudina. Sua determinação no primeiro tempo de coleta, 30 minutos, ficou inviabilizada. Possivelmente, tal resultado se deve à sua baixa permeabilidade (KOLJONEN et al., 2006; MOTZ et al., 2007; MASUNGI et al., 2008; BREDA et al., 2009).

Os valores obtidos e descritos nas Tabelas 5.27 e 5.28 e representados na Figura 5.12 indicam a crescente permeação dos fármacos e dos marcadores. Este fato sugere que não houve saturação da membrana envolvida no decorrer do estudo e nem a saturação do meio da câmara receptora.

Tabela 5.27 - Valores médios da quantidade permeada (P) de fluoresceína e metoprolol, expressa em ng.mL⁻¹ em função do tempo de coleta (TC). Os valores refletem a média de seis determinações

TC (min)	P			P		
	Fluoresceína ng.mL ⁻¹	DP	DPR%	Metoprolol ng.mL ⁻¹	DP	DPR%
30	n.d	n.d	n.d	19879,22	2478,54	12,25
45	151,75	25,86	5,48	36858,72	1931,89	6,24
60	422,67	59,01	8,43	61270,73	5622,86	11,81
75	724,31	46,57	5,02	77718,32	5760,72	9,58
90	1062,97	30,56	2,78	96355,79	3527,94	4,53
105	1377,73	20,51	1,55	112800,10	2540,02	2,77
120	1707,80	63,32	4,12	130704,66	5775,71	5,47

nd = não detectável

Tabela 5.28 - Valores médios da quantidade permeada (P) de lamivudina e zidovudina, expressa em ng.mL^{-1} em função do tempo de coleta (TC). Os valores refletem a média de seis determinações

TC (min)	P			P		
	Lamivudina ng.mL^{-1}	DP	DPR%	Zidovudina ng.mL^{-1}	DP	DPR%
30	57881,35	7906,00	22,00	85537,57	9658,29	20,03
45	105701,90	12677,82	20,26	134792,81	15558,53	20,28
60	158985,17	15908,79	17,96	196253,17	24242,71	21,89
75	221194,11	22501,35	18,48	249076,88	23585,64	16,82
90	275878,64	32385,09	21,32	300320,61	27737,26	16,29
105	318126,81	35882,76	20,72	360179,20	34308,33	16,79
120	372006,99	37080,03	18,39	426604,33	39728,22	16,35

Figura 5.12 - Curvas obtidas a partir da quantidade permeada de fluoresceína(1), metoprolol(2), lamivudina(3) e zidovudina(4) em função do tempo (minutos).

Tabela 5.29 - Parâmetros relativos à regressão linear das curvas obtidas pela relação da quantidade permeada (ng) dos fármacos lamivudina e zidovudina e dos marcadores metoprolol e fluoresceína *versus* tempo (minutos).

Parâmetro	Valor			
	Fluoresceína	Metoprolol	Lamivudina	Zidovudina
Coeficiente angular (a)	12,921	905,91	1742,2	2030,9
Coeficiente linear (b)	-49,973	-5263,6	-9912,9	-9124,3
Coeficiente de correlação (r^2)	0,9950	0,9926	0,9929	0,9953

Os estudos de permeabilidade utilizando membranas de ratos Wistar, assim como outros métodos, conforme citado no item 3.3, possibilitaram a obtenção de coeficientes de permeabilidade aparente (Papp). Os coeficientes de permeabilidade aparente, calculados conforme descrito no item 4.2.5.3.2, representam a velocidade de difusão do fármaco através da membrana, em função da área da superfície da mesma e da concentração do fármaco na solução doadora (ZAKELJ ET AL., 2006; DAHAN; HOFFMAN, 2007; LENNERNÄS, 2007; UCHIDA et al., 2009; DAHAN; AMIDON 2009). A Tabela 5.30 e a Figura 5.13 demonstram os valores de Papp obtidos na direção absorptiva (A → B).

Tabela 5.30 - Valores médios de permeabilidade aparente (Papp) obtidos a partir dos resultados dos ensaios de permeabilidade com os fármacos zidovudina e lamivudina e com os marcadores fluoresceína e metoprolol. Os valores representam a média de seis determinações

Fármacos	Papp (x 10 ⁻⁴ cm/s)	Desvio padrão (x 10 ⁻⁴)	Desvio padrão relativo (%)
Fluoresceína	0,11	0,05	4,13
Metoprolol	1,51	0,10	7,11
Lamivudina	1,05	0,20	18,59
Zidovudina	1,07	0,11	10,36

* $p < 0,000$ em relação à fluoresceína

** $p < 0,001$ em relação ao metoprolol

Figura 5.13 - Perfis de permeabilidade aparente e desvio padrão

Os resultados de permeabilidade aparente (P_{app}) refletiram a baixa permeabilidade da fluoresceína, marcador de baixa permeabilidade, em relação ao metoprolol, marcador de alta permeabilidade. Estes resultados são indicativos da aplicabilidade do método desenvolvido com a utilização das células de Franz como câmaras de difusão. Os dados também sugerem que os segmentos intestinais de ratos, nas condições padronizadas no presente trabalho, são eficientes e viáveis para a determinação da permeabilidade dos fármacos.

Resultados de permeabilidade aparente (P_{app}) referentes ao metoprolol foram obtidos por Lennernäs e colaboradores (1997) e Watanabe e colaboradores (2004). Estes pesquisadores realizaram os estudos de permeabilidade em câmaras de difusão horizontal (*Ussing Chamber*) com segmentos intestinais de rato (jejuno). Apesar das condições adotadas no presente estudo se assemelharem àquelas descritas pelos autores acima citados, os resultados referentes à P_{app} do metoprolol obtidos no presente trabalho ($1,51 \times 10^{-4}$ cm/s) diferiram dos observados pelos referidos autores, $0,35 \times 10^{-4}$ cm/s (LENNERNÄS et al., 1997) e $0,24 \times 10^{-4}$ cm/s (WATANABE et al., 2004).

Porém, relatam-se algumas diferenças que podem justificar estes resultados. No presente trabalho foram utilizadas câmaras verticais (células de

Franz), nas quais forneceu-se a oxigenação por meio de borbulhamento dos gases O₂ e Co₂ (95%:5%), o que possibilitou agitação no lado apical (câmara doadora) e também promoveu-se agitação magnética de 200 rpm no lado basolateral. Agitação esta que diminui o efeito da camada de água estacionária, que corresponde a uma camada de água, muco e glicocálix, mais ou menos estática adjacente à parede da membrana, sendo formada pela mistura incompleta do conteúdo luminal situado próximo à superfície da mucosa intestinal e que atua como uma barreira à absorção (THOMSON; DIETCHY, 1984; FAGERHOLM; LENNERNÄS, 1995). Estudos demonstraram que a agitação no compartimento receptor, assim como o aumento da temperatura durante o ensaio de permeabilidade, reduzem a espessura da camada de água estacionária (SUGANO et al., 2001; ZHU et al., 2002).

A agitação magnética de 200 rpm promovida no lado basolateral (câmara receptora) é o diferencial do método empregado neste trabalho, pois possibilita maior agitação quando comparado com o borbulhamento de gases. A agitação promovida pode reduzir a camada de água estacionária e desta forma permitir aumento na permeabilidade dos fármacos, uma vez que evita a saturação da camada de água que está em contato direto com a membrana (THOMSON; DIETCHY, 1984; FAGERHOLM; LENNERNÄS, 1995; ZHU et al., 2002). Em função desta característica, valores de permeabilidade maiores em relação a outros métodos *in vitro*, que não tenham a redução da camada estacionária de água, seriam esperados. Desta forma, a redução da camada de água estacionária em função das características do modelo desenvolvido no presente trabalho pode justificar os resultados de permeabilidade superiores obtidos na pesquisa.

A Tabela 5.31 resume os resultados de permeabilidade aparente (Papp) obtidos no presente trabalho e os dados descritos na literatura para os fármacos e marcadores utilizados no estudo. Está destacado na Tabela 5.31 o modelo de estudo de permeabilidade empregado.

Os resultados apresentados na Tabela 5.31 indicam semelhanças entre os resultados de Papp do metoprolol obtidos no trabalho, por meio de estudo *in vitro* com emprego de segmentos intestinais de rato, e aqueles obtidos por modelos de perfusão *in situ* e *in vivo*, uma vez que estes modelos se aproximam mais das condições *in vivo* (BALIMANE et al., 2000; GRIFFIN; O'DRISCOLL, 2008).

Entretanto, os valores de Papp descritos para o modelo que emprega Caco-2 diferem daqueles observados com o emprego dos modelos de perfusão *in situ* e perfusão *in vivo*.

Tabela 5.31 - Resultados de permeabilidade aparente obtidos no presente trabalho e os dados descritos na literatura para os fármacos e marcadores utilizados

Substâncias	Dados obtidos no presente trabalho	Dados obtidos da literatura			
	Papp ($\times 10^{-4}$) cm/s	Papp ($\times 10^{-4}$) cm/s			
	Franz Cells	Ussing Chamber	Caco-2	Perfusão <i>in situ</i>	Perfusão <i>in vivo</i>
Fluoresceína	0,11 $\pm$ 0,05	-----	0,0022(5)	-----	-----
Metoprolol	1,51 $\pm$ 0,10	0,24 (6) 0,35 (7)	0,3370(4)	1,52 (8)	1,34 (9) 1,50 (7)
Lamivudina	1,05 $\pm$ 0,20	-----	0,0105(1)	-----	-----
Zidovudina	1,07 $\pm$ 0,11	-----	0,6140(1) 0,2160(2) 0,2160(3)	-----	-----

(1) SOUZA et al., 2009; (2) AUNGST, 1999; (3) YU; SYNKO 1997; (4) UCHIDA et al., 2009; (5) FLATEM et al., 2006; (6) WATANABE et al., 2004; (7) LENNERNÄS et al., 1997; (8) MASAOKA et al., 2006; (9) LENNERNÄS, 2007

A análise estatística dos valores obtidos nos ensaios (item 4.2.5.3.2) permitiu identificar diferenças entre as médias de permeabilidade de fluoresceína e metoprolol. A análise estatística dos resultados também indicou que as Papp da zidovudina e da lamivudina são significativamente diferentes dos valores de Papp dos marcadores. Porém, este dado estatístico não permite concluir a respeito da classificação biofarmacêutica em relação à permeabilidade, uma vez que existem

diferentes mecanismos responsáveis pelo transporte dos fármacos através das membranas, como, por exemplo, o metoprolol por mecanismo transcelular passivo, a fluoresceína pelo mecanismo paracelular, a lamivudina e a zidovudina pelo mecanismo de absorção transcelular passivo, sendo estes fármacos antirretrovirais são fracos substratos da P-gp (SOUZA, 2005). Assim, diferenças em relação aos valores de Papp podem significar diferentes mecanismos envolvidos no transporte destes fármacos e marcadores. Portanto, não é descartada a possibilidade da lamivudina e da zidovudina serem consideradas como fármacos de alta permeabilidade. A Tabela 5.32 apresenta os resultados de p e F obtidos pela comparação e análise estatística dos resultados (item 4.2.5.3.2).

Diante do exposto, pode-se concluir que, nas condições experimentais adotadas no presente trabalho, tanto a zidovudina quanto a lamivudina apresentam valores de Papp mais próximos daqueles observados para o marcador de alta permeabilidade (metoprolol). Porém, estudos com outros marcadores poderiam permitir conclusões mais objetivas em relação à classificação destes fármacos.

Tabela 5.32 - Valores de F e p resultantes da comparação estatística dos resultados da Papp para os fármacos (lamivudina e zidovudina) e marcadores (fluoresceína e metoprolol) do estudo

Substâncias	Fluoresceína		Metoprolol		Lamivudina		Zidovudina	
	p	F	p	F	p	F	p	F
Fluoresceína	-----	-----	0,000	1012,48	0,000	138,54	0,000	445,58
Metoprolol	0,000	1012,48	-----	-----	0,001	23,73	0,001	50,41
Lamivudina	0,000	138,54	0,001	23,73	-----	-----	0,990	0,00
Zidovudina	0,000	445,58	0,001	50,41	0,990	0,00	-----	-----

6. CONCLUSÃO

As conclusões do presente trabalho foram:

- I. Os resultados de solubilidade dos fármacos lamivudina e zidovudina, determinada através do método de equilíbrio pela técnica de *shake-flask* sob diferentes condições de pH, permitem concluir que ambos podem ser classificados como fármacos de alta solubilidade.
- II. Os resultados da avaliação da dissolução intrínseca dos fármacos em questão mostraram concordância com aqueles obtidos a partir dos estudos de solubilidade. Tanto a lamivudina quanto a zidovudina apresentaram TDI superior a 0,1 mg/min/cm², identificando-as como altamente solúveis com elevada dissolução nos meios empregados.
- III. Os resultados de permeabilidade aparente, nas condições experimentais adotadas no estudo, sugerem que os fármacos zidovudina e lamivudina apresentam alta permeabilidade.
- IV. O método descrito no presente trabalho tem potencial para ser utilizado na avaliação e na classificação dos fármacos em relação à permeabilidade.
- V. Os resultados de solubilidade e de permeabilidade obtidos, nas condições experimentais adotadas no estudo, sugerem que a lamivudina e a zidovudina pertencem à Classe 1 do SCB.

7. ASPECTOS LEGAIS DE BIOÉTICA

O presente trabalho foi submetido à Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, em função do uso do intestino de ratos nos experimentos, obtendo resposta favorável ao desenvolvimento do estudo.

8. REFERÊNCIAS

ABDOU, H.M. *Dissolution, bioavailability & bioequivalence*. Easton: Mack Publishing, 1989. 554p.

AMIDON, G.L.; BERMEJO, M. *Modern biopharmaceutics*. Versão 6.03. Ann Arbor: TSRL, 2003. 1 CD-ROOM.

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

ANDRADE, S.S.; KANO, E.K.; BRIOSCHI, T.M.L.S.; KOONO, E.E.M.; SERRA, C.H.R.; PORTA, V. Bioavailability study of two oral formulations of didanosine in healthy volunteers. *Arzneimittel Forschung*, v.56, n.5, p.359-364, 2006.

ARANCÍBIA, A. Calidad Biofarmacéutica. Estudios *in vitro* e *in vivo*. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v.10, n.2, p.123-133, 1991.

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

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

AUNGST, B.J. P-glycoprotein, secretory transport, and other barriers to the oral delivery of anti-HIV drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.39, p.105-116, 1999.

AVADI, M.R.; ERFAN, M.; SADEGHI, A.M.M.; MOEZI, L.; DEHPOUR, A.R.; YOUNESSI, P.; RAFIEE-TEHRANI, M.; SHAFIEE, A. N,N-diethyl N-methyl chitosan as an enhancing agent for colon drug delivery. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v.19, p.421-433, 2004.

AVDEEF, A.; ARTURSSON, P.; NEUHOFF, S.; LAZOROVA, L.; GRASJÖ, J.; TAVELIN, S. Caco-2 permeability of weakly basic drugs predicted with the double-sink PAMPA pK_a^{flux} method. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.24, p.333-349, 2005.

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

BALIMANE, P.V.; CHONG, S. Evaluation of permeability and P-glycoprotein interactions: industry outlook. In: KRISHNA, R.; YU, L. eds. *Biopharmaceutics applications in drug development*. New York, London: Springer, 2008. cap.5, p.101-138.

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

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

BARRY, B.W. *Dermatological formulations: percutaneous absorption*. New York: Marcel Dekker, 1983. 480p. (Drugs and the Pharmaceutical Sciences, v.18).

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

BONAMICI, D. *Sistema de Classificação Biofarmacêutica e Bioisemções*. São Paulo, 2009. 159p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

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

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

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

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

BRUESEWITZ, C.; FUNKE, A.; KUHLAND, U.; WAGNER, T.; LIPP, R. Comparison of permeation enhancing strategies for an oral factor Xa inhibitor using the Caco-2 cell monolayer model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.64, p.229–237, 2006.

CAMILO, F.C.; RODRIGUES, P.O.; WAGNER, T.M. Validação de um método analítico para análise simultânea de estavudina (D4T), lamivudina (3TC) e zidovudina (AZT) em matéria-prima. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v.2, p.22-29, 2008.

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

CARVALHO, F.C.; SARMENTO, V.H.V.; CHIAVACCI, L.A.; BARBI, M.S.; GREMIÃO, M.P.D. Development and *in vitro* evaluation of surfactant systems for controlled released of zidovudine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.99, n.5, p.2367- 2374, 2010.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. *Journal of Chromatography, B: Biomedical Applications*, v. 689, p.175-180, 1997.

CHAN, H.-K.; GRANT, D.J.W. Influence of compaction on the intrinsic dissolution rate of modified acetaminophen and adipic acid crystals. *International Journal of Pharmaceutics*, v.57, p.117-124, 1989.

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

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

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

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

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

CUMMINS, C.L.; JACOBSEN, W.; CHRISTIANS, U.; BENET, L.Z. CYP3A4–transfected Caco-2 cells as a tool for understanding biochemical absorption barriers: studies with sirolimus and midazolam. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.308, n.1, p.143-155, 2004.

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

DAHAN, A.; AMIDON, G. L. Segmental dependent transport of low permeability compounds along the small intestine due to P-glycoprotein: the role of efflux transport in the oral absorption of BCS class III drugs. *Molecular Pharmaceutics*, v.6, n.1, p.19-28, 2009.

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

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

DEFERME, S.; ANNAERT, P.; AUGUSTIJNS, P. *In vitro* screening models to assess intestinal drug absorption and metabolism. In: EHRHARDT, C.; KIM, K.-J., eds. *Drug Absorptions studies: in situ, in vitro and in silico* models. New York: Springer, 2008. p.182-215. (Biotechnology: Pharmaceutical Aspects, v.7).

DESAI, V.G.; LEE, T.; MOLAND, C.L.; BRANHAM, W.S.; VON TUNGLIN, L.S.; BELAND, F.A.; FUSCOE, J.C. Effect of short-term exposure to zidovudine (AZT) on the expression of mitochondria-related genes in skeletal muscle of neonatal mice. *Mitochondrion*, v.9, p.9-16, 2009.

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

DIVI, R.L.; DOERGE, D.R.; TWADDLE, N.C.; SHOCKLEY, M.E.; ST. CLAIRE, M.C.; HARBAUGH, J.W.; HARBAUGH, S.W.; POIRIER, M.C. Metabolism and pharmacokinetics of the combination zidovudine plus lamivudine in the adult *Erythrocebus patas* monkey determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.226, p.206-211, 2008.

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

EGAN, W.J.; LAURI, G. Prediction of intestinal permeability. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.54, p.273-289, 2002.

ESCUDE-GILABERT, L.; MARTÍNEZ-PLA, J.J.; SAGRADO, S.; VILLANUEVA-CAMAÑAS, R.M.; MEDINA-HERNÁNDEZ, M.J. Biopartitioning micellar separation methods: modeling drug absorption. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 797, p.21-35, 2003.

EMA - EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Pre-Authorization Evaluation of Medicines for Human Use. Committee for Medicinal Products for Human Use. DRAFT. Guideline on the investigations of bioequivalence. London, 2008. (CPMP/EWP/QWP/1401/98). Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/qwp/140198enrev1.pdf>. Acesso em: 16 set. 2009.

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

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

FDA approved drug products. US Department of Health & Human Services Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/>. Acesso em: 14 jul. 2010.

FDA Guidance for industry: waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. Rockville: FDA, 2000. p.1-13. Disponível em : <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070246.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2009.

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

FLACH, A.O.P.; DALLA COSTA, T. Avaliação dos critérios de isenção de estudos de bioequivalência *in vivo* para medicamentos orais em forma farmacêutica sólida de liberação imediata. *Caderno de Farmácia*, v.15, n.2, p.49-58, 1999.

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

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. *Physicochemical principles of Pharmacy*. 4.ed. London: Pharmaceutical Press, 2006. 492p.

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. *International Journal of Pharmaceutics*, v.360, p.148-155, 2008.

GERTZ, M.; KILFORD, P.J.; HOUSTON, J.B.; GALETIN, A. Drug lipophilicity and microsomal protein concentration as determinants in the prediction of the fraction unbound in microsomal incubations. *Drug Metabolism and Disposition*, v.36, n.3, p.535-542, 2008.

GINSKI, M.J.; POLLI, J.E. Prediction of dissolution–absorption relationships from a dissolution/Caco-2 system. *International Journal of Pharmaceutics*, v.177, p.117–125, 1999.

GRABOVAC, V.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Improvement of the intestinal membrane permeability of low molecular weight heparin by complexation with stem bromelain. *International Journal of Pharmaceutics*, v.326, p.153–159, 2006.

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

HAMID, K.A.; KATSUMI, H.; SAKANE, T.; YAMAMOTO, A. The effects of common solubilizing agents on the intestinal membrane barrier functions and membrane toxicity in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, v.379, p.100-108, 2009.

HANSON RESEARCH CORPORATION. *Manual Diffusion cell: operation manual*. Chatsworth: Hanson Research, 2004. 36p.

HELLRIEGEL, E.T.; BJORNSSON, T.D.; HAUCK, W.W. Interpatient variability in bioavailability is related to the extent of absorption: implications for bioavailability and bioequivalence studies. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v.60, n.6, p.601-607, 1996.

HERAI, H.; GRATIERI, T.; THOMAZINE, J.A.; BENTLEY, M.V.L.B; LOPEZ, R.F.V. Doxorubicin skin penetration from monoolein-containing propylene glycol formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, v.329, p.88-93, 2007.

HIDALGO, I.J.; RYAN, F.M.; MARKS, G.J.; SMITH, P.L. pH-dependent transepithelial transport of cephalexin in rabbit intestinal mucosa. *International Journal of Pharmaceutics*, v.98, p.83-92, 1993.

HILLGREN, K.M.; KATO, A.; BORCHARDT, R.T. *In vitro* systems for studying intestinal drug absorption. *Medicinal Research Reviews*, v.15, n.2, p.83-109, 1995.

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

HÖRTER, D.; DRESSMAN, J.B. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.46, p.75-87, 2001.

ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). *International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use*. 2005 17p.

IRVINE, J.D.; TAKAHASHI, L.; LOCKHART, K.; CHEONG, J.; TOLAN, J.W.; SELICK, H.E.; GROVE, J.R. MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: a tool for membrane permeability screening. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.88, n.1, p.28-33, 1999.

JACKSON, A.J. ed. *Generics and bioequivalence*. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.49-100.

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

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

JINNO, J.; OH, D.-M.; CRISON, J.R.; AMIDON, G.L. Dissolution of ionizable water-insoluble drugs: the combined effect of pH and surfactant. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.89, n.2, p.268-274, 2000.

JOZWIAKOWSKI, M. J.; NGUYEN, N.-A.T.; SISCO, J.M.; SPANCAKE, C.W. Solubility behavior of lamivudine crystal forms in recrystallization solvents. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.85, n.2, p.193-199, 1996.

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

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

KAPOOR, N.; KHANDAVILLI, S.; PANCHAGNULA, R. Simultaneous determination of lamivudine, stavudine, and nevirapine in antiretroviral fixed dose combinations by high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, v.570, p.41-45, 2006.

KASIM, N.A.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO, M.; LENNERNÄS, H.; HUSSAIN, A.S.; JUNGINGER, H.E.; STAVCHANSKY, S.A.; MIDHA, K.K.; SHAH, V.P.; AMIDON, G.L. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Molecular Pharmaceutics*, v.1, n.1, p.85-96, 2004.

KATAOKA M.; MASAOKA Y.; YAMAZAKI Y.; SAKANE T.; SEZAKI H.; YAMASHITA S. *In vitro* system to evaluate oral absorption of poorly water-soluble drugs: simultaneous analysis on dissolution and permeation of drugs. *Pharmaceutical Research*, v.20, n.10, p.1674–1680, 2003.

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

KFURI, C.R. *Desenvolvimento de grânulos de carbamazepina por “hot melt granulation” em leito fluidizado*. Ribeirão Preto, 2008. 144p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

KIM, D.D. *In vitro* cellular models for nasal drug absorption studies. In: EHRHARDT, C.; KIM, K.-J., eds. *Drug absorption studies: in situ, in vitro and in silico* models. New York: Springer, 2008. p.216-234. (Biotechnology: Pharmaceutical Aspects, v.7).

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

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

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

KUU, W.Y.; PRISCO M.R.; WOOD R.W.; ROSEMAN T.J. Studies of dissolution behaviour of highly soluble drugs using rotating basket. *International Journal of Pharmaceutics*, v.55, p.77-89, 1989.

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

LANGGUTH, P.; KUBIS, A.; KRUMBIEGEL, G.; LANG, W.; MERKLE, H.P.; WÄCHTER, W.; SPAHN-LANGGUTH, H.; WEYHENMEYER, R. Intestinal absorption of the quaternary trospium chloride: permeability-lowering factors and bioavailabilities for oral dosage forms. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.43, p.265-272, 1997.

LEGEN, I.; KRISTL, A. pH and energy dependent transport of ketoprofen across rat jejunum *in vitro*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.56, p.87-94, 2003.

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

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

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

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

LEUNER, C.; DRESSMAN, J. Improving drug solubility for oral delivery using dispersions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.50, p.47-60, 2000.

LI, F.; HONG, L.; MAU, C.-I.; CHAN, R.; HENDRICKS, T.; DVORAK, C.; YEE, C.; HARRIS, J.; ALFREDSON, T. Transport of levovirin prodrugs in the human intestinal Caco-2 cell line. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.95, n.6, p.1318-1325, 2006.

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

LIPKA, E.; AMIDON, G.L. Setting bioequivalence requirements for drug development based on preclinical data: optimizing oral drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, v.62, p.41-49, 1999.

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

LOPEZ, R.F.V.; COLLETT, J.H.; BENTLEY, M.V.L.B. Influence of cyclodextrin complexation on the *in vitro* permeation and skin metabolism of dexamethasone. *International Journal of Pharmaceutics*, v.200, p.127-132, 2000.

MANDAL, T.K.; TENJARLA, S. Preparation of biodegradable microcapsules of zidovudine using solvent evaporation: effect of the modification of aqueous phase. *International Journal of Pharmaceutics*, v.137, p.187-197, 1996.

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

MARIAPPAN, T.T.; SINGH, S. Gastrointestinal permeability studies using combinations of rifampicin and nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, v.39, n.6, p.284-290, 2007.

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

MARINO, A.M.; YARDE, M.; PATEL, H.; CHONG, S.; BALIMANE, P.V. Validation of the 96 well Caco-2 cell culture model for high throughput permeability assessment of discovery compounds. *International Journal of Pharmaceutics*, v.297, p.235–241, 2005.

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

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

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

MASUNGI, C.; MENSCH, J.; VAN DIJCK, A.; BORREMANS, C.; WILLEMS, B.; MACKIE, C.; NOPPE, M.; BREWSTER, M.E. Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) combined with a 10-day multiscreen Caco-2 cell culture as a tool for assessing new drug candidates. *Pharmazie*, v.63, n.3, p.194–199, 2008.

MATILAINEN, L.; TOROPAINEN, T.; VIHOLA, H.; HIRVONEN, J.; JÄRVINEN, T.; JARHO, P.; JÄRVINEN, K. *In vitro* toxicity and permeation of cyclodextrins in Calu-3 cells. *Journal of Controlled Release*, v.126, p.10-16, 2008.

MAUBON, N.; LE VEE, M.; FOSSATI, L.; AUDRY, M.; LE FERREC, E.; BOLZE, S.; FARDEL, O. Analysis of drug transporter expression in human intestinal Caco-2 cells by real-time PCR. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v.21, p.659-663, 2007.

MENON, R.M.; BARR, W.H. Comparison of ceftibuten transport across Caco-2 cells and rat jejunum mounted on modified Ussing chambers. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, v.24, p.299-308, 2003.

MERCK index of chemicals and drugs: an encyclopedia of chemists, drugs and biologicals. 30.ed. Rathway: Merck, 2001. p.959,1802.

METSUGI, Y.; MIYAJI, Y.; OGAWARA, K.-I.; HIGAKI, K.; KIMURA, T. Appearance of double peaks in plasma concentration–time profile after oral administration depends on gastric emptying profile and weight function. *Pharmaceutical Research*, v.25, n.4, p.886-895, 2008.

MINEO, H.; HARA, H.; SHIGEMATSU, N.; OKUHARA, Y.; TOMITA, F. Melibiose, difructose anhydride III and difructose anhydride IV enhance net calcium

absorption in rat small and large intestinal epithelium by increasing the passage of tight junctions *in vitro*. *The Journal of Nutrition*, v.132, p.3394-3399, 2002.

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

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

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

ONG, C.M.Y.; HEARD, C.M. Permeation of quinine across sublingual mucosa, *in vitro*. *International Journal of Pharmaceutics*, v.366, p.58-64, 2009.

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

PANCHAGNULA, R.; THOMAS, N.S. Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. *International Journal of Pharmaceutics*, v.201, p.131-150, 2000.

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

POLLI, J.E.; YU, L.X.; COOK, J.A.; AMIDON, G.L.; BORCHARDT, R.T.; BURNSIDE, B.A.; BURTON, P.S.; CHEN, M.-L.; CONNER, D.P.; FAUSTINO, P.J.; HAWI, A.A.; HUSSAIN, A.S.; JOSHI, H.N.; KWEI, G.; LEE, V.H.L.; LESKO, L.J.; LIPPER, R.A.; LOPER, A.E.; NERURKAR, S.G.; POLLI, J.W.; SANVORDEKER, D.R.; TANEJA, R.; UPPOOR, R.S.; VATTIKONDA, C.S.; WILDING, I.; ZHANG, G. Summary workshop report: biopharmaceutics classification system – implementation challenges and extension opportunities. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.93, n.6, p.1375-1381, 2004.

PORTA, V.; FERRAZ, H.G.; SOUZA, T.M.L.; KANO, E.K.; SERRA, C.H.R. Método analítico para a determinação de meloxicam em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41, n.2, p.215-222, 2005.

POVEDA, E.; BRIZ, V.; SORIANO, V. Enfuvirtide, the first fusion inhibitor to treat HIV infection. *AIDS Reviews*, v.7, p.139-147, 2005.

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

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

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

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

RINAKI E., VALSAMI G., MACHERAS P. Quantitative biopharmaceutics classification system: the central role of dose/solubility ratio. *Pharmaceutical Research*, v.20, n.12, p.1917-1925, 2003.

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

RÖPKE, C.D.; KANEKO, T.M.; RODRIGUES, R.M.; SILVA, V.V.; BARROS, S.; SAWADA, T.C.H. ; KATO, M.J. ; BARROS, S.B.M. Evaluation of percutaneous absorption of 4-nerolidylcatechol from four topical formulation. *International Journal of Pharmaceutics*, v.249, n.1/2, p.109-116, 2002.

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

SANDRI, G.; BONFERONI, M.C.; ROSSI, S.; FERRARI, F.; GIBIN, S.; ZAMBITO, Y.; DI COLO, G.; CARAMELLA, C. Nanoparticles based on N-trimethylchitosan: evaluation of absorption properties using *in vitro* (Caco-2 cells) and *ex vivo* (excised rat jejunum) models. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.65, p.68-77, 2007.

SERRA, C.H.R. *Avaliação biofarmacotécnica de comprimidos contendo cefalexina: cinética de dissolução e bioequivalência*. São Paulo, 1998. 205p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

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

SHAH, J.C. Analysis of permeation data: evaluation of the lag time method. *International Journal of Pharmaceutics*, v.90, n.2, p.161-169, 1993.

SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A.B.C. *Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics*. 5.ed. New York: McGraw-Hill, 2005. 892p.

SHARMA, P; CHAWLA H.P.S; PANCHAGNULA R. LC determination of cephalosporins in *in vitro* rat intestinal sac absorption model. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.27, p.39–50, 2002.

SILVA, G.R.; LAGES, G.P.; PIANETTI, G.A.; NUNAN, E.A.; SOARES, C.D.V.; CAMPOS, L.M.M. Determinação de lamivudina, estavudina e nevirapina, em comprimidos, por cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova*, v.29, n.6, p.1159-1163, 2006.

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

SOUZA, J. *Avaliação das características físico-químicas, farmacocinéticas e de biodisponibilidade relativa de comprimidos contendo associação de lamivudina 150 mg e zidovudina 300 mg*. São Paulo, 2005. 290p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

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

SOUZA, J.; FREITAS Z.M.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, n.4, p.2007.

STORCH, C.H.; THEILE, D.; LINDENMAIER, H.; HAEFELI, W.E.; WEISS, J. Comparison of the inhibitory activity of anti-HIV drugs on P-glycoprotein. *Biochemical Pharmacology*, v.73, p.1573-1581, 2007.

STULZER, H.K.; TAGLIARI, M.P.; SILVA, M.A.S.; LARANJEIRA, M.C.M. Desenvolvimento, avaliação e caracterização físico química de micropartículas constituídas de aciclovir/quitosana desenvolvidas pela técnica de *Spray-drying*. *Latin American Journal of Pharmacy*, v.26, n.6, p.866-871, 2007.

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

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

TAUB, M.E.; KRISTENSEN, L.; FROKJAER, S. Optimized conditions for MDCK permeability and turbidimetric solubility studies using compounds representative of BCS classes I-IV. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.15, p.331-340, 2002.

THOMAS, K.E.; SAPONE, A.; FASANO, A.; VOGEL, S.N. Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are myD88-dependent: role of the innate immune response in celiac disease. *The Journal of Immunology*, v.176, p.2512-2521, 2006.

THOMSON, A.B.R.; DIETCHY, J.M. The role of the unstirred water layer in intestinal permeation. In: CSAKY, T.Z. ed. *Pharmacology of intestinal permeation II*. Berlin: Springer, 1984.

TRAN, H.T.T.; TRAN, P.H.L.; LEE, B.-J. New findings on melatonin absorption and alterations by pharmaceutical excipients using the Ussing chamber technique with mounted rat gastrointestinal segments. *International Journal of Pharmaceutics*, v.378, p.9-16, 2009.

TRAPANI, G.; FRANCO, M.; TRAPANI, A.; LOPEDOTA, A.; LATROFA, 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, n.12, p.2909-2919, 2004.

TUKKER J.J. *In vitro* methods for the assessment of permeability. In: Dressman J.B.; Lennernas, H. eds. *Oral drug absorption: prediction and assessment*. New York: Marcel Dekker, 2000. p.51-72.

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

UNITED States Pharmacopeia 33. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2010.

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

VERWEIJ-VAN WISSEN, C.P.W.G.M.; AARNOUTSE, R.E.; BURGER, D.M. Simultaneous determination of the HIV nucleoside analogue reverse transcriptase

inhibitors lamivudine, didanosine, stavudine, zidovudine and abacavir in human plasma by reversed phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.816, p.121-129, 2005.

WADKE, D.A.; REIER, G.E. Use of intrinsic dissolution rates to determine thermodynamic parameters associated with phase transitions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.61, p.868-871, 1972.

WANG, Q.; STRAB, R.; KARDOS, P.; FERGUSON, C.; LI, J.; OWEN, A.; HIDLAGO, I.J. Application and limitation of inhibitors in drug-transporter interactions studies. *International Journal of Pharmaceutics*, v.356, p.12-18, 2008.

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

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

YAO, H.-M.; CHIOU, W.L. The complexity of intestinal absorption and exorption of digoxin in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, v.322, p.79-86, 2006.

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

YU, L.X.; AMIDON, G.L. A compartmental absorption and transit model for estimating oral drug absorption. *International Journal of Pharmaceutics*, v.186, p.119-125, 1999.

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

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

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

ZAKELJ, S.; STURM, K.; KRISTL, A. Ciprofloxacin permeability and its active secretion through rat small intestine *in vitro*. *International Journal of Pharmaceutics*, v.313, p.175-180, 2006.

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

ZHAO, Y.H.; ABRAHAM, M.H.; LE, J.; HERSEY, A.; LUSCOMBE, C.N.; BECK, G.; SHERBORNE, B.; COOPER, I. Evaluation of rat intestinal absorption data and correlation with human intestinal absorption. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.38, p.233-243, 2003.

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

9. ANEXOS

ANEXO A

**Informações para os membros da banca julgadora de
mestrado/doutorado**

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

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

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

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

3. Não serão permitidas correções na dissertação/tese. Assim, havendo extrema necessidade, poderá ser incluída uma errata.

4. A sessão de defesa será aberta ao público.

5. 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.

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

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

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

São Paulo, 11 de dezembro de 2009.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco

Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO B

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**
Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

Ofício CEEA/FCF nº 38 /2008

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “Avaliação ‘in vitro’ da permeabilidade de fármacos em tecido intestinal de rato. Aplicações na classificação farmacêutica” (Protocolo CEEA nº180), de responsabilidade do pesquisador André Bersani Dezani sob a orientação da Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 12/5/2008.

São Paulo, 15 de julho de 2008.

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da CEEA

ANEXO C

Ficha do aluno

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9139 - 6336962/1 - Andre Bersani Dezani

Email: andredezani@usp.br
Data de Nascimento: 13/06/1980
Cédula de Identidade: RG - 32.259.178-8 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico - Universidade São Judas Tadeu - São Paulo - Brasil - 2003

Curso: Mestrado
Programa: Fármaco e Medicamentos
Área: Produção e Controle Farmacêuticos
Data de Matrícula: 12/02/2008
Início da Contagem de Prazo: 12/02/2008
Data Limite: 12/08/2010
Orientador: Prof(a). Dr(a). Cristina Helena dos Reis Serra - 12/02/2008 até o presente. E.Mail: chserra@usp.br

Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 10/12/2009

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 12/02/2008
Matrícula de Acompanhamento em 21/07/2010

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 21/07/2010

Impresso em: 02/08/10 21:04:28

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9139 - 6336962/1 - Andre Bersani Dezani

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5777-1/3	Seminários Gerais	25/02/2008	08/06/2008	45	3	92	A	N	Concluída
FBF5708-4/1	Relações entre Estrutura Química e Atividade Biológica	09/04/2008	01/07/2008	120	8	100	C	N	Concluída
FBF5766-2/2	Biodisponibilidade e Bioequivalência de Medicamentos	30/09/2008	01/12/2008	90	6	89	A	N	Concluída
EDM5791-5/2	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	18/03/2009	30/06/2009	120	8	91.6	A	N	Concluída

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

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 21/07/2010

Impresso em: 02/08/10 21:04:28

ANEXO D

Currículo Lattes

André Bersani Dezani

Graduação em Farmácia Industrial em 2002. Com experiência na área de controle de qualidade em indústria e laboratórios de farmacotécnica, controle de qualidade, tecnologia farmacêutica e cosmetologia como técnico em instituição de ensino.

(Texto informado pelo autor)

Última atualização em 05/08/2010

Endereço para acessar este CV:
<http://lattes.cnpq.br/7364684323244071>

Dados Pessoais

Nome	André Bersani Dezani
Nome em citações bibliográficas	DEZANI, A. B.
Sexo	masculino
Filiação	Edison Dezani e Sueli Bersani Dezani
Nascimento	13/06/1980 - São Paulo/SP - Brasil
Carteira de Identidade	322591788 SSP-SP - SP - 09/06/1994
CPF	22212482876
Endereço residencial	Pça Cataguarino Jd. IV Centenário - São Paulo 03933-060, SP - Brasil Telefone: 11 67222075
Endereço profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 13 Cidade Universitária - São Paulo 05508-900, SP - Brasil Telefone: 11 30913623
Endereço eletrônico	e-mail para contato : andredezani@ig.com.br e-mail alternativo : andredezani@usp.br

Formação Acadêmica/Titulação

1999 - 2002 Graduação em Farmácia Industrial.
 Universidade São Judas Tadeu, USJT, São Paulo, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2008 - 2010 Vínculo: Outro (especifique) , Enquadramento funcional: bolsista cnpq

Atividades

2008 - 2010 Projetos de pesquisa, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Participação em projetos:
Avaliação in vitro da permeabilidade de fármacos em tecido intestinal de rato. Aplicações na Classificação Farmacêutica

2. Universidade São Judas Tadeu - USJT

Vínculo institucional

2005 - 2008 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Técnico Farmacêutico , Carga horária: 44, Regime: Integral
 Outras informações:

Atuação direta com alunos do curso de farmácia, auxiliando em aulas praticas de farmacotécnica, cosmetologia, tecnologia farmacêutica e controle de qualidade.

Projetos

2008 - 2010 Avaliação in vitro da permeabilidade de fármacos em tecido intestinal de rato. Aplicações na Classificação Farmacêutica

Descrição: Avaliação da permeabilidade de fármacos antiretrovirais no TGI por meio de ensaios in vitro e correlações com ensaios in vivo
 Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa
 Integrantes: André Bersani Dezani (Responsável); ;
 Financiador(es):

Áreas de atuação

1. Farmacotecnia
2. Análise e Controle de Medicamentos

Idiomas

Inglês Compreende Bem , Fala Razoavelmente, Escreve Bem, Lê Bem
Espanhol Compreende Razoavelmente , Fala Pouco, Escreve Razoavelmente, Lê Razoavelmente

Produção em C, T & A

Eventos

Participação em eventos

1. Simpósio de atualização em farmacologia clínica, 2007. (Simpósio)
2. Semana Racine, 2006. (Seminário)
Critérios no desenvolvimento de formulações dermocosméticas para peles sensíveis.
3. IX Jornada Farmacêutica, 2006. (Congresso)
Perfumes.
4. IX Jornada Farmacêutica, 2006. (Seminário)
Teste de atividade antimicrobiana.
5. Pharma Congress, 2006. (Congresso)
6. II Jornada Farmacêutica, 1999. (Simpósio)

Totais de produção

Eventos

Participações em eventos (congresso)	2
Participações em eventos (seminário)	2
Participações em eventos (simpósio)	2

ANEXO E

Artigo submetido à revista AOAC International

SOLUBILITY AND INTRINSIC DISSOLUTION EVALUATION OF ZIDOVUDINE AND LAMIVUDINE. BIOPHARMACEUTICAL CLASSIFICATION SYSTEM APPLICATION

ANDRÉ B. DEZANI ; ARTHUR M. CAFFARO; THAISA M. PEREIRA; JULIANA M. REIS; CRISTINA HELENA R. SERRA

Department of Pharmacy, University of São Paulo, FCF/USP- Rua Profº Lineu Prestes, 580- CEP 05508-900 - Cidade Universitária – Butantan – São Paulo

Corresponding author:

Cristina Helena dos Reis Serra

University of São Paulo

Rua Profº Lineu Prestes, 580- CEP 05508-900 - Cidade Universitária

Butantan – São Paulo – Brasil

Phone: 55-11- 30913623

e-mail: chserra@usp.br

a b s t r a c t

The solubility and dissolution rate of drugs are of major importance in preformulation studies of pharmaceutical dosage forms. The solubility behaviour of zidovudine and lamivudine in individual solvents under the range of pH 1.2–7.5 solvents was studied by equilibrium method and the intrinsic dissolution rate (IDR) was determined for both drugs. Both drugs are clearly more soluble in the selected range of pH. The drugs fulfill the BCS criteria to be classified as class I compounds (high solubility/high permeability). The solubility improvement allows the drugs to be potential biowaiver candidates from the scientific point of view and may be a good way to develop more dose-efficient formulations. Furthermore, a very fast intrinsic dissolution was obtained. The IDR was determined by measuring the dissolution of a non-disintegrating disk of drug.

Keyword: Biopharmaceutical; Biopharmacy; Solubility; Antiretrovirals.

1. Introduction

Biopharmaceutics Classification System (BCS) is a scientific framework for classifying drugs based upon their aqueous solubilities related to dose at three relevant pHs and intestinal permeability (1). According to the BCS, drugs are classified as follows: class I (high solubility–high permeability), class II (low solubility-highly permeability) class III (highly solubility-low permeability) and class IV (low solubility-low permeability). In addition, immediate release oral dosage forms are categorized according to their rates of dissolution. Therefore, when combined with the dissolution of a drug, the BCS takes into account three major factors that govern the rate and extent of drug absorption from immediate release solid oral dosage forms: dissolution rate, solubility and permeability (5)(6)(7).

In the last years, the BCS has been applied not only to immediate release solid dosage forms, but also to extended release ones, and it is considered an useful tool in drug development (13) (17) (9).

According to SCB, a drug has high solubility when the highest dose available in the pharmaceutical product sold in the country is soluble in 250 mL of aqueous solution in a pH range of 1.0-7.5 at temperature of 37 ° C. The volume of 250 mL is derived of protocols for bioequivalence studies recommending the administration of medication with a glass containing 250 mL of water (7)(3)(4).

The guide published by the FDA in 2000 provides the waive for bioavailability and bioequivalence studies in vivo for immediate release dosage forms. The solubility studies must be conducted under physiological pH between 1.0 and 7.5, while for the EMEA, the pH range should be between 1.0 and 6.8, with test temperature of 37.0 ° C $\pm$ 1 ° C (7)(8).

To achieve the solubility studies, the methods most recommended are: equilibrium method (shake-flask) and potentiometric methods (their employment must be justified). In the equilibrium method, the evaluation of solubility is achieved with the addition of a quantity of drug in a solvent pre-defined, until it reaches the saturation of the medium, followed by stirring this mixture for a prolonged period until the attainment of equilibrium (7)(8).

Singh and colleagues determined the solubility equilibrium of zidovudine in water and in phosphate buffer pH 6.8, employing the technique of shake-flask under stirring for 48 hours at temperatures of 37 ° C and 25 ° C. The results indicated that zidovudine had a solubility of 30.6 ± 0.3 mg.mL⁻¹ at 37 ° C and 19.5 ± 0.2 mg.mL⁻¹ at 25 ° C in distilled

water. In phosphate buffer at pH 6.8, the solubility was $24.4 \pm 0.4 \text{ mg.mL}^{-1}$ at 37°C and $20.3 \pm 0.3 \text{ mg.mL}^{-1}$ at 25°C (20).

The intrinsic dissolution rate (IDR) has been used to characterize solid drugs for many years (2) (4). This property has been studied in order to elucidate the relationship between the dissolution rate and the crystalline form and also to study the effects of surfactants and pH on the solubilization of poorly soluble drugs (10) (15).

IDR is generally defined as the dissolution rate of a drug under constant surface area, stirring speed, pH and ionic strength of the dissolution medium. The effective intrinsic dissolution rate may be better described as the rate of mass transferred from the solid surface to the liquid phase. The apparatus for intrinsic dissolution testing was originally developed by John Wood which enables the calculation of the dissolution rate per square centimeter (11).

It has been suggested to use IDR instead of solubility in drug classification. Therefore, IDR may correlate better with *in vivo* dissolution rate than solubility, although, for drugs having either extremely high or low dose, discrepancies may exist between the solubility and the IDR methods (4). This can be explained by the fact that the intrinsic dissolution does not take into account the effect of administered dose. Drug solubility is one of the main factors which affect the passage of a drug from the site of administration into the bloodstream. It is widely known that insufficient drug solubility can lead to poor oral absorption (16). Aiming to improve the biopharmaceutical-related properties, the present work evaluated the solubility behavior and the BCS classification of zidovudine and lamivudine. Moreover, an ideal formulation to be considered in the subsequent *in vivo* studies is reported.

2. Materials and methods

2.1. Buffers

Buffer solutions were obtained from different mixture compositions of Hydrochloric acid (PA), potassium dihydrogen phosphate (PA) and 1N sodium hydroxide, as follows: pH 1.2 (HCl), pH 4.5(KH_2PO_4), pH 6.8 ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$), pH 7.5 ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$) and purified water (Milli-Q) according to USPXXX and Pharmacopeia Portuguesa 8.

2.2. Solubility studies

Drug solubilities were determined in triplicates by equilibrating excess amount of drugs in buffer solutions of pH 1.2, 4.5, 6.8, 7.5 and purified water. The samples were kept in thermostated water bath at 37° C and shaken at a rate of 150 rpm for 72 h. After filtration and dilution, samples were measured with an UV–Vis spectrophotometer (Vankel 50 uv-vis) at the maximum absorbance wavelength for each sample tested. The solubilities were calculated using calibration curves determined for each drug.

2.3. Procedure for Intrinsic Dissolution Rate (IDR) measurements

An amount of 200 mg of zidovudine was compressed at an average compression force of 2000 psi for 2 min to make non-disintegrating disk using die and punch with 6 mm of diameter. For lamivudine, an amount of 300 mg was compressed at an average compression force of 3000 psi for 3 min. The surface area of both tablets was 0.2826 cm². Dissolution studies were conducted using the apparatus of Wood using 900 mL of buffers previously described in item 2.1, at a temperature of 37° C ± 0.5°C as with rotation of 50 rpm. Samples were withdrawn and filtered at 2,4, 6, 8, 10, 12,14,16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70 and 80 min. For a few highly soluble drugs, it was necessary to withdraw a known aliquot of the medium and make a volumetric dilution before determining absorbances.

Absorbances were determined in triplicate using a UV–Vis spectrophotometer at the maximum absorbance wavelength for each sample tested (Table 1). The amount dissolved per surface unit of the disk was plotted against time for each dissolution vessel. The slope of the linear regression ($R^2 \geq 0,99$, $P < 0,005$) was considered to be the IDR, it is easily calculated by

$$j = \frac{V}{A} \frac{dc}{dt}$$

where j is the disk intrinsic dissolution rate, V is the volume of the dissolution medium, c is the concentration, A is the area of the drug disk, and t is the time. (4)

Results and discussion

3.1. Solubility and BCS classification

Solubility of zidovudine and lamivudine was determined considering the BCS framework outlined in current guideline recommendations. The FDA defines “highly soluble” over the pH range 1–7.5 (7), whereas the EMEA (8) and the WHO Guidelines (18) limit the requirements to the pH range 1.2–6.8. The current BCS (Biopharmaceutics Classification System) guidance defines an API as “highly soluble” when the highest dose recommended is soluble in 250 mL or less of aqueous media over the pH range of 1.2–7.5 (7). In order to set a reliable condition for BCS classification of compounds and since small intestine is the major site for drug absorption, this work has considered the range of pH from 1.2 to 7.4 for the solubility studies (Table 1).

The WHO recommended dose for lamivudine is 150mg and for zidovudine is 300mg. However, Lamivudine and Zidovudine are clearly classified as high solubility drugs at pH 1.2, 4.5, 6.8, 7.5 and water, since they do satisfy the criteria of dose:solubility ratio < 250 ml (18) (Table 1).

3.2. Dissolution studies

In the fig. 1 and fig.2 it can be found a typical plot of concentration versus time for lamivudine and zidovudine, respectively, at pH 1.2, 4.5, 6.8, 7.5 and water. The insignificant discrepancies between three runs using three disks in three dissolution vessels indicate an excellent reproducibility (RSD less than 10%). Linearity was also excellent, which can be demonstrated by a correlation coefficient higher than 0.99 for all buffer tested.

The determined intrinsic dissolution rates are shown in Table 2. The presence of a sink condition in the dissolution medium during the experiment is upheld by comparison of the final concentration of drugs and their solubility in dissolution medium. According to work by Parvin et al in 2009 states that, compounds with high solubility could be successfully demonstrated by an IDR greater than 3 mg/cm²/min, while compounds with low solubility showed an IDR less than 1 mg/cm²/min.(14) According to work by Amidon et al in 2004, suggests that drugs with IDR greater than 0.1 mg/cm²/min could be classified as high solubility (3).

Table 2 shows the IDR results obtained for the two compounds tested. It can be stated that there is a good qualitative correlation between the solubility classification and

IDR values. IDR along with permeability is a rate phenomenon instead of an equilibrium phenomenon. Moreover, it might be expected to correlate more closely with *in vivo* drug dissolution dynamics than solubility. It should be pointed out that dose is taken into consideration in solubility classification while intrinsic dissolution does not consider this effect. Thus, when the dose is either extremely high or extremely low (for example 1.0 g/ml and his dose is 0.25 mg or the other hand, 4.0 mg/ml and his dose is 1000 mg) a discrepancy between the current solubility classification and the IDR may occur. Further, when the dose is extremely high, the *in vivo* absorption may be solubility limited (19).

4. Conclusions

The BCS was developed based on two principal properties: intrinsic dissolution rate and rat/human intestinal permeability of passively absorbed drugs. In this study we could confirm the data on the solubility and intrinsic dissolution rate of lamivudine and zidovudine, included in the BCS as class I, according to the theory expounded by Amidon and colleagues in 2004. Both drugs demonstrated high solubility values, which could be successfully confirmed by the intrinsic dissolution rate results. Therefore, more scientific research and discussion is necessary to complement the biofarmaceutics classification of these drugs with intestinal permeability studies in rat or human, to support the regulatory purposes on biowaives.

5. Acknowledgments

We appreciate the financial support of FAPESP and CNPq.

6. References

- (1) Amidon, G.L., Lennernas, H., Shah, V.P., Crison, J.R., (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharm. Res.* 12, 413–420.
- (2) Amidon G.L., Higuchi W.I., Ho N.F., (1982) Theoretical and experimental studies of transport of micelle-solubilized solutes, *J. Pharm. Sci.* 7177–84.
- (3) Yu, L. X.; Amidon, G. L.; Polli, J. E.; Zhao, H.; Mehta, M. U.; Conner, D. P.; Shah, V. P.; Lesko, L. J.; Chen, M. L.; Lee, V. H. L.; Hussain, A. S. (2002) Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. *Pharmaceutical Research*, v. 19, n.7, p. 921-925,.

- (4) Yu L.X., Carlin A.S., Amidon G.L., Hussain A.S., (2004) Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs, *Int. J. Pharm.* 270 221–227.
- (5) CDER/FDA, 1995. Guidance for Industry, Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Scale-Up and Post-Approval Changes (November 1995).
- (6) CDER/FDA, 1997. Guidance for Industry, Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms (August 1997).
- (7) CDER/FDA, 2000. Guidance for Industry, Waiver of in vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms based on a Biopharmaceutics Classification System.
- (8) CPMP, 2008. Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence. <http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/qwp/140198enfin.pdf>, [accessed May 2010].
- (9) Grudzien', M., Krol, A., Paterek, G., Stepien', K., Plucin' ski, F., Mazurek, A., 2008. The structure-bioavailability approach in antifungal agents. *Eur. J. Med. Chem.*, doi:10.1016/j.ejmech.10.028.
- (10) Jinno J., Oh D., Crison J.R., Amidon G.L., (2000) Dissolution of ionizable water-insoluble drugs: the combined effect of pH and surfactant, *J. Pharm. Sci.* 89 268– 274.
- (11) Wood J., Syarto J., Letterman H., (1965) Improved holder for intrinsic dissolution rate studies, *J. Pharm. Sci.* 54 1068.
- (12) Ku,M., 2008. Use of the Biopharmaceutical Classification System in early drug development. *AAPS J.* 10, 208–212.
- (13) Lennernas,H. Abrahamsson, B. (2005) The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 57, p. 273-285,.
- (14) Zakeri-Milani P., Mohammad Barzegar-Jalali, Mandana Azimi, Hadi Valizadeh. (2009) Biopharmaceutical classification of drugs using intrinsic dissolution rate (IDR) and rat intestinal permeability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*
- (15) Dahlan R., McDonald C., Sunderland V.B., (1987) Solubilities and intrinsic dissolution rates of sulphamethoxazole and trimethoprim, *J. Pharm. Pharmacol.* 39 246–251.
- (16) Zhao, Y., Abraham,M., Lee, J., Hersey, A., Luscombe, C., Beck, G., Sherborne, B., Cooper, I., 2002. Rate-limited steps of human oral absorption and QSAR studies. *Pharm. Res.* 19, 1446–1457
- (17) Wei, H., Dalton, C., Di Maso, M., Kanfer, I., Lobenberg, R., 2008. Physicochemical characterization of five glyburide powders: a BCS based approach to predict oral absorption. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 1046–1056

- (18) WHO, 2010. Who expert committee on specifications for pharmaceutical preparations. http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_937_eng.pdf#page=403 [accessed May 2010]
- (19) Yu, L.X., Amidon, G.L., 1999. Analytical solutions to mass transfer. In: Amidon, G.L., Lee, P.I., Topp, E.M. (Eds.), Transport Processes in Pharmaceutical Systems. Marcel Dekker, Inc., pp. 23–54.
- (20) Singh, S.; Dobhal, A. K.; Jain, A.; Pandit, J. K.; Chakraborty, S. (2010) Formulation and evaluation of solid lipid nanoparticles of a water soluble drug: zidovudine. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, v. 58, n. 5, p. 650-655,

Table 1

Solubility at 37 °C and dose:solubility ratio of Lamivudine and Zidovudine.

Compound	pH	Wavelength (nm)	Solubility (mg/ml)	Dose (mg)	Dose:solubility ratio*
Lamivudine	1,2	281	212,6309	150	0,705448
	4,5	275	155,9524	150	0,961832
	6,8	271	179,0323	150	0,837838
	7,5	273	190,6973	150	0,844934
	water	272	177,5287	150	0,786587
Zidovudine	1,2	268	18,65109	300	16,08485
	4,5	269	23,25479	300	12,90056
	6,8	267	24,42843	300	12,28077
	7,5	267	20,10008	300	14,92531
	water	267	25,38801	300	11,8166

* Dose:solubility ratio ≤ 250 , indicates high solubility related to dose (7) (18) .

Fig.1. Concentration–time profile for the drug lamivudine at pH 1.2, 4.5, 6.8, 7.5 and water ($n = 3$).

Fig.2. Concentration–time profile for the drug zidovudine at pH 1.2, 4.5, 6.8, 7.5 and water ($n = 3$).

Table 2.- Experimental wavelength, intrinsic dissolution rate (IDR)

Compound	pH	Wavelength (nm)	IDR (mg/min/cm ²)
Lamivudine	1,2	281	9,8279
	4,5	275	6,3829
	6,8	271	5,1345
	7,5	273	4,8588
	water	272	6,9423
Zidovudine	1,2	268	0,7389
	4,5	269	0,9002
	6,8	267	0,7218
	7,5	267	0,6628
	water	267	0,9515

The Journal of
AOAC INTERNATIONAL

[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)

SCHOLARONE™
Manuscripts

[Main Menu](#) → [Corresponding Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as André Dezani

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Journal of AOAC INTERNATIONAL*.

Manuscript ID: 10-0296

Title: SOLUBILITY AND INTRINSIC DISSOLUTION EVALUATION OF ZIDOVUDINE AND LAMIVUDINE. BIOPHARMACEUTICAL CLASSIFICATION SYSTEM APPLICATION

Authors: Dezani, André
Serra, Cristina Helena
Pereira, Thaisa
Caffaro, Arthur
Reis, Juliana

Date Submitted: 03-Aug-2010

Print Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts™ v4.3.0(patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2010. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

Follow ScholarOne on Twitter

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

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

ERRATA

Página	Tabela	Onde se lê	Leia-se
73	5.13	145,39	104,39
92	5.30	0,11; 1,51; 1,05; 1,07	0,4; 7,5; 4,8; 5,6
95	5.31	0,11; 1,51; 1,05; 1,07	0,4; 7,5; 4,8; 5,6