UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Avaliação da permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio de modelo *ex vivo* com emprego de segmentos da mucosa bucal de suínos

Mônica Maria Coquemala da Silva

Orientadora:

Profª. Drª. Cristina Helena dos Reis Serra

SÃO PAULO

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Avaliação da permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio de modelo *ex vivo* com emprego de segmentos da mucosa bucal de suínos

Mônica Maria Coquemala da Silva

Versão corrigida da dissertação conforme resolução CoPgr 6018

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP

Dissertação para Obtenção do Grau de Mestre

Orientadora:

Profª. Drª. Cristina Helena dos Reis Serra

SÃO PAULO

2015

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

Silva, Mônica Maria Coquemala da
S487a Avaliação da permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio de modelo *ex vivo* com emprego de segmentos de mucosa bucal de suínos / Mônica Maria Coquemala da Silva. -- São Paulo, 2016.
107p.

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

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

615.4b CDD

Mônica Maria Coquemala Da Silva

Comissão Julgadora

Da

Dissertação para Obtenção do Grau de Mestre

Profª Dra. Cristina Helena dos Reis Serra

Orientadora/ Presidente

1º examinador

2º examinador

São Paulo, ____de_____de_____

Só é digno da liberdade, como da vida, aquele que se empenha em conquistá-la."

Johann Goethe

Dedico este trabalho à minha Mãe Ana,

à Minha Madrinha Valéria

e ao meu querido avô Walter Coquemala

Agradeço a Deus, obrigada meu Deus por tudo o que me proporcionou ao longo da minha vida e ainda irá me proporcionar. Agradeço por todas as pessoas que o senhor colocou em meu caminho e me deram forças e me encorajaram, mesmo quando eu achava que não era capaz. Obrigada por permitir em alcançar mais essa etapa da minha vida.

Agradeço às minhas mães Ana e minha “mãendrinha” Valéria, assim que a chamo por ser mais do que madrinha e sim uma mãe para mim. Minhas duas mães, quero agradecê-las por sempre estar ao meu lado me apoiando, me encorajando e puxando minha orelha quando é necessário. Obrigada por tudo!!! Amo vocês.

Agradeço aos meus amigos André e Thaisa, por sempre me apoiar e me ajudar.

Agradeço a Profa. Gislaine Ricci Leonardi por me emprestar o Dermátomo e com isso poder concretizar esse projeto.

Agradeço o Silas Aranhas por me ajudar no processo de dematomização da mucosa bucal e carregar as caixas de isopor com as cabeças dos suínos.

Agradeço à Professora Cristina Helena, por esta alegria. Professora, você foi um anjo que Deus colocou em minha vida!! Não tenho palavras para expressar todo meu agradecimento por tudo o que a senhora fez por mim, mas saiba que a senhora tem uma grande amiga e sempre pode contar comigo.

Agradeço aos meus amigos que fiz durante minha vida acadêmica e que vão comigo por toda minha vida. Agradeço pelas forças que vocês deram para mim nos meus momentos mais difíceis. Obrigada galera por tudo.

Agradeço a CNPQ e A CAPES por dar incentivo a realização desse Projeto.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 18
2. OBJETIVOS 20
2.1 Objetivo geral 20
2.2 Objetivos específicos 20
3. REVISÃO DA LITERATURA 21
3.1 Estrutura da mucosa bucal 23
3.2 Mecanismos envolvidos na permeabilidade de fármacos na mucosa oral 27
3.3 Fatores que influenciam a absorção de fármacos através da mucosa bucal 29
3.4 Métodos que permitem a avaliação da permeabilidade de fármacos através da mucosa bucal 31
3.4.1 Método ex vivo 33
3.5 Fármacos antirretrovirais selecionados para o estudo de permeabilidade pela via da mucosa bucal 38
4. MATERIAIS E MÉTODOS 42
4.1 Materiais, solventes e reagentes 42
4.2 Equipamentos e dispositivos diversos 42
4.3 Métodos 43
4.3.1 Obtenção e preparação do segmento da mucosa bucal de suíno 43
4.3.2 Estudo da viabilidade da mucosa bucal 46
4.3.3 Estudo de Permeabilidade 47
4.3.4 Análise Estatística dos Resultados 51
4.3.5 Quantificação dos fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e dos marcadores fluoresceína e metoprolol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) 52
4.3.5.1 Preparo das amostras 52
4.3.5.2 Condições Cromatográficas 53
4.3.5.3 Validação dos métodos analíticos 55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 59

5.1 Ensaio de Permeabilidade através de segmento bucal de suínos ... 59
5.1.1 Avaliação da viabilidade dos segmentos de mucosa bucal de suínos 59
5.1.2 Avaliação da permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio de modelo ex vivo com emprego de segmentos da mucosa bucal de suínos 62
5.2 Desenvolvimento e validação do método cromatográfico para a quantificação dos fármacos nos estudos de permeabilidade por meio do modelo ex vivo (células de Franz) 73
5.2.1 Precisão e Exatidão 77
5.2.2 Estabilidade 79
5.2.3 Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento 81
6. CONCLUSÕES 84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 85
8. ANEXOS 93

LISTA DE QUADROS

Quadro1 - Diferenças anatômicas entre as mucosas bucal e sublingual, que influenciam na permeabilidade de fármacos (adaptado de LAM et al., 2013)..... 23

Quadro2 - Comparação de mucosas bucais de diferentes modelos de animais (Adaptado KUROSAKI et al., 1991; ROBINSON & HARRIS, 1992; SQUIER & WERTZ, 1996; OBRADOVIC, HIDALGO, 2008)..... 35

Quadro3 - Comparação da composição lipídica da mucosa bucal de suíno e de seres humanos (Adaptado PATEL; LIU, BROWN, 2012)..... 36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições cromatográficas empregadas para quantificação de fluoresceína, metoprolol, d4T e 3TC..... 54

Tabela 2 - Concentrações das soluções contendo os padrões dos marcadores e dos fármacos antirretrovirais utilizadas para a obtenção das curvas analíticas e os respectivos padrões internos..... 56

Tabela 3 - Concentrações das soluções padrões dos marcadores e dos fármacos antirretrovirais utilizadas para determinar a precisão..... 57

Tabela 4 - Valores médios de TEER (desvio ou erro padrão) referentes aos ensaios de permeabilidade para os marcadores de transporte transcelular (metoprolol), paracelular (fluoresceína) e para os fármacos antirretrovirais (lamivudina e estavudina) 61

Tabela 5 - Valores médios da quantidade permeada (P) do metoprolol e da fluoresceína, expressa em µg. mL-1 em função do tempo de coleta (T). Esses valores refletem a média de seis determinações..... 63

Tabela 6 - Valores médios da quantidade permeada (P) de Estavudina e Lamivudina, expressa em µg. mL-1 em função do tempo de coleta (T). Esses valores refletem a média de seis determinações..... 64

Tabela 7 - Parâmetros relativos à regressão linear das curvas obtidas a partir da relação da quantidade permeada (µg) dos fármacos antirretrovirais, lamivudina e estavudina, e dos marcadores, metoprolol e fluoresceína, em função do tempo (minutos) 64

Tabela 8 - Valores médios de permeabilidade (Papp) obtidos a partir dos resultados dos ensaios de permeabilidade com os fármacos antirretrovirais, lamivudina e estavudina, e com os marcadores de transporte transcelular (metoprolol) e paracelular (fluoresceína). Os valores representam a média de seis determinações 67

Tabela 9 - Valores de p e F obtidos pela comparação estatísticas dos resultados..... 68

Tabela 10 - Resultados de Papp obtidos por meio do modelo ex-vivo e os dados descritos na literatura paras as substâncias do presente trabalho..... 71

Tabela 11 - Valores experimentais obtidos na avaliação do limite de quantificação em meio de Ringer-Krebs-HEPES modificado. Os resultados expressam a média das amostras analisadas em seis réplicas 75

Tabela 12 - Resultados obtidos por meio da regressão linear a partir da curva analítica obtida pela análise das soluções contendo fluoresceína e metoprolol em meio Ringer-Krebs-HEPES modificado. Os resultados expressam a média de amostras analisadas em seis réplicas 76

Tabela 13 - Resultados referentes à precisão e à exatidão (intraensaio e interensaio) do método analítico para a quantificação da Fluoresceína por cromatografia líquida de alta eficiência 77

Tabela 14 - Resultados referentes à precisão e à exatidão (intraensaio e interensaio) do método analítico para a quantificação do metoprolol por cromatografia líquida de alta eficiência

..... 78

Tabela 15 - Resultados referentes à precisão e à exatidão (intraensaio e interensaio) do método analítico para a quantificação do lamivudina por cromatografia líquida de alta eficiência 78

Tabela 16 - Resultados referentes à precisão e à exatidão (intraensaio e interensaio) do método analítico para a quantificação da Estavudina por cromatografia líquida de alta eficiência

..... 79

Tabela 17 - Valores experimentais de exatidão obtidos a partir da avaliação da estabilidade de amostras de fluoresceína analisada por cromatografia líquida..... 80

Tabela 18 - Valores experimentais de exatidão obtidos a partir da avaliação da estabilidade de amostras de metoprolol analisada por cromatografia líquida 80

Tabela 19 - Valores experimentais de exatidão obtidos a partir da avaliação da estabilidade de amostras da Lamivudina analisada por cromatografia líquida 81

Tabela 20 - Valores experimentais de exatidão obtidos a partir da avaliação da estabilidade de amostras da Estavudina analisada por cromatografia líquida 81

Tabela 21 - Exatidão e precisão das análises das amostras contendo Fluoresceína após ciclos de congelamento e descongelamento. Os resultados expressam a média das amostras analisadas em triplicatas 82

Tabela 22 - Exatidão e precisão das análises das amostras contendo Metoprolol após ciclos de congelamento e descongelamento. Os resultados expressam a média das amostras analisadas em triplicatas 82

Tabela 23 - Exatidão e precisão das análises das amostras contendo Laivudina após ciclos de congelamento e descongelamento. Os resultados expressam a média das amostras analisadas em triplicatas 83

Tabela 24 - Exatidão e precisão das análises das amostras contendo Estavudina após ciclos de congelamento e descongelamento. Os resultados expressam a média das amostras analisadas em triplicatas 83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo da histologia da mucosa bucal 24

Figura 2 - Figura que demonstra as diversas áreas da cavidade bucal de acordo com sua composição 24

Figura 3 - Esquema representativo da mucosa bucal apresentando a via intracelular e extracelular 28

Figura 4 - Estrutura química da d4T 39

Figura 5 - Estrutura química da 3TC 41

Figura 6 - Região que contém a mucosa conforme indicado na figura 44

Figura 7 - A figura indica o segmento de interesse para o estudo 45

Figura 8 - A figura indica o segmento de interesse para o estudo 45

Figura 9 - Segmento da mucosa bucal após a dermatomização 46

Figura 10 - Representação Esquemática da célula de difusão vertical 47

Figura 11 - Resumo das etapas do estudo de permeabilidade dos marcadores transcelular (metoprolol) e paracelular (fluoresceína) em segmento da mucosa bucal 49

Figura 12 - Resumo das etapas do estudo de permeabilidade dos antirretrovirais em segmento da mucosa bucal 50

Figura 13- Curvas obtidas a partir dos valores médios das quantidades permeadas de metoprolol (1), fluoresceína (2), estavudina (3) e lamivudina (4) em função do tempo (minutos)..... 65

Figura 14 - Representação gráfica dos resultados de Papp para os fármacos, lamivudina, estavudina e para os marcadores, metoprolol e fluoresceína, obtidos por meio de modelo ex-vivo em segmento bucal de suínos. Os resultados apresentam a média de seis determinações para essas mesmas substâncias. As barras de erros representam os desvios padrão para cada uma das substâncias. O asterisco representa os índices de significâncias; * p< 0,05 em relação ao metorpolol e ** p < 0,05 em relação à fluoresceína..... 67

Figura 15 - (a) Cromatogramas obtidos das amostras: (a) solução de Ringer-Krebs-HEPES modificado presente no estudo depermeabilidade com a presença de interferentes da membrana, (b) fase móvel, (c) solução padrão de fluoresceína 300 ng/ mL, d) solução padrão de metoprolol 750 ng/ mL, e) solução padrão de 6000 ng/ mL de estavudina e (f) solução padrão de 6000 ng/ mL de Lamivudina. Esses cromatogramas obtidos por detecção UV..... 74

Figura 16 - Curva analítica da fluoresceína (a), do Metoprolol (b), da Estavudina (c) e da Lamivudina (d) em meio Ringer-Krebs-HEPES modificado. Em cromatografia líquida conforme condição descrita no item 76

RESUMO

COQUEMALA, Mônica Maria da Silva, Avaliação da permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio de modelo *ex vivo* com emprego de segmentos da mucosa bucal de suínos. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêutica- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A via de administração oral é a forma favorita de administração de fármacos em função das vantagens que apresenta, dentre elas destacam-se: a adesão do paciente, conveniência e praticidade. Em função disto, a maioria dos medicamentos comercializados encontra-se disponível na forma farmacêutica de administração oral, entretanto, o sucesso de um tratamento medicamentoso por esta via requer que a absorção gastrointestinal do fármaco seja suficiente para assegurar a sua disponibilidade no local de ação (VOLPE, 2010). No entanto, a absorção do fármaco no trato gastrointestinal é complexa e pode ser influenciada por vários fatores, os quais têm impacto sobre a dissolução, solubilidade e permeabilidade do fármaco.

Com o intuito de aumentar a biodisponibilidade de fármacos, que possuem absorção dificultada pela via oral, a via de administração pela mucosa bucal vem sendo uma alternativa na atualidade farmacêutica. Esta mucosa é um tecido não queratinizado, altamente vascularizado e apresenta poucas enzimas metabolizadoras. Tais características possibilitam boa absorção de fármacos sem que ocorra a metabolização pré-sistêmica, ou efeito de primeira passagem, somando-se ao fato desta apresentar fácil acessibilidade para a administração de fármacos (VRIES, M. E *et al*., 1991; NIELSEN, H. M &RASSING, M. R, 1999).

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a permeabilidade dos fármacos antirretrovirais (lamivudina e estavudina) por meio de modelo *ex vivo* em segmentos da mucosa bucal de suínos, com emprego de câmaras de difusão do tipo células de *Franz*. Para avaliação da permeabilidade bucal dos fármacos antirretrovirais, lamivudina e estavudina, e dos marcadores para transporte transcelular (metoprolol) e paracelular (fluoresceína sódica), empregou-se método *ex-vivo*, em células de *Franz*, com segmento de mucosa bucal de suíno (a 37ºC, meio Ringer- Krebs- HEPES, pH 7,4), e *Franz* posterior análise das concentrações das substâncias permeadas (fármacos e marcadores) por cromatografia líquida de alta eficiência.

Os resultados obtidos, por meio do protocolo desenvolvido, demonstram que o transporte através da via paracelular (marcador fluoresceína) foi mais expressivo que o transporte transcelular (marcador metoprolol), o que provavelmente se deve ao fato dos espaços intercelulares da mucosa bucal serem mais frouxos do que aqueles observados na mucosa intestinal (junções íntimas). Quanto à lamivudina e estavudina, os resultados de permeabilidade indicaram que estes fármacos permearam por mecanismo semelhante ao do metoprolol, isto é, por via transcelular.

Palavras Chaves: Permeabilidade, antirretrovirais, via transmucoasal bucal

ABSTRACT

COQUEMALA, Monica Maria da Silva, permeability Assessment of antiretroviral drugs through *ex vivo* model with employment segments of the oral mucosa of pigs. Faculty of Science pharmaceutically University of São Paulo, São Paulo, 2015.

The oral route of administration is the preferred mode of administration of drugs according to the advantages which features, among which stand out: patient compliance, convenience and practicality. Because of this, most of the marketed drug is available in pharmaceutical form for oral administration, however, the success of a drug therapy in this way requires that the drug intestinal absorption is sufficient to ensure their availability at the site of action (VOLPE, 2010). However, the drug absorption in the gastrointestinal tract is complex and may be influenced by various factors which have an impact on the dissolution, solubility and permeability of the drug.

In order to increase the bioavailability of drugs, which have impeded absorption by oral route of administration from oral mucosa has been an alternative the pharmaceutical today. This mucosa is not keratinized tissue, highly vascular and shows metabolizing enzymes. These characteristics allow good absorption of drugs occurs without presystemic metabolism or first-pass effect, adding to the fact that this display easy accessibility for the administration of drugs (Vries, M. E et al, 1991;. NIELSEN, H. M & RASSING, M. R, 1999).

In this sense, this study aimed to evaluate the permeability of antiretroviral drugs (lamivudine and stavudine) through ex vivo model segments of the oral mucosa of pigs with use of diffusion chambers type Franz cells. To evaluate the oral permeability of antiretroviral drugs, lamivudine and stavudine, and markers for transcellular transport (metoprolol) and paracellular (sodium fluorescein), used ex-vivo method, Franz cells, with buccal mucosa segment of swine (at 37, through Krebs-Ringer- HEPES, pH 7.4) and Franz subsequent analysis of concentrations of the permeated substances (drugs and markers) by high-performance liquid chromatography.

The results obtained using the protocol developed demonstrate that transport through the paracellular pathway (marker fluorescein) was higher than that transcellular transport (marker metoprolol), which probably is due to the intercellular spaces of the oral mucosa are looser than those observed in the intestinal mucosa (tight junctions). The lamivudine and stavudine, the permeability results indicate that these drugs permeated by a mechanism similar to that of metoprolol, by transcellular pathway.

Key words: permeability, antiretroviral drugs, transmucoasa, buccal

A via de administração oral é a forma favorita de administração de fármacos em função das vantagens que apresenta tais como, adesão do paciente, conveniência e praticidade. A maioria dos medicamentos comercializados encontra-se disponível na forma farmacêutica de administração oral. O sucesso de um tratamento medicamentoso requer que a absorção gastrointestinal do fármaco seja suficiente para assegurar a sua disponibilidade no local de ação (VOLPE, 2010). No entanto, a absorção do fármaco no trato gastrointestinal (TGI) é complexa e pode ser influenciada por vários fatores, os quais têm impacto sobre a dissolução, solubilidade e permeabilidade do fármaco. Desta forma, a mucosa bucal vem ganhando destaque para administração de fármacos, sobretudo nos casos em que a biodisponibilidade pode ser extensivamente comprometida quando a administração do fármaco se dá por via oral. Entretanto, há poucos relatos na literatura sobre os processos envolvidos na absorção de fármacos na mucosa bucal.

A absorção de fármacos por meio da mucosa bucal pode ocorrer por diversos mecanismos, como: transporte passivo transcelular (através das membranas das células); transporte passivo paracelular (através dos espaços intercelulares, ou junções íntimas); transporte ativo (intermediado por carreadores de influxo ou efluxo). Geralmente, o transporte de fármaco pode envolve mais de um mecanismo de permeação e depende também das características físico-químicas do mesmo (NICOLAZZO, FINNIN, 2005; DEZANI, 2010; PEREIRA, 2011)

Para o estudo da permeabilidade de fármacos através da mucosa bucal, vários métodos têm sido empregados, os quais compreendem métodos *in vitro*, *in situ*, *in vivo,* ou *ex vivo*. Os métodos *in vitro* são fundamentados em sistemas celulares com emprego de células TR 146. Já os métodos *in situ* avaliam a perfusão do fármaco em determinados trechos da mucosa e *o in vivo* avalia a permeabilidade de fármaco em seres humanos e em toda a cavidade bucal. Os modelos *ex vivo* por sua vez, utilizam segmentos da mucosa bucal obtidos de animais após a eutanásia (RATHBONE, 1990; HOOGSTRAATE &

BODDÉ, 1993).

Estudos de permeabilidade de fármacos em mucosa bucal, por meio do modelo *ex vivo,* empregam especialmente a mucosa de suínos, em função das semelhanças com a mucosa oral humana (NICOLAZZO, FINNIN, 2005). Estudos têm demonstrado boa correlação entre os dados de permeabilidade obtidos por meio deste modelo com a mucosa bucal humana (NICOLAZZO, FINNIN, 2010). Além disso, o processo de aquisição desta mucosa apresenta baixo custo. Essas características colaboram para que esse tipo de estudo seja uma alternativa para correlacionar e mimetizar condições *in vivo.*

Nesse sentido, o presente projeto teve como objetivo avaliar a permeabilidade de fármacos antirretrovirais (estavudina e lamivudina) através da mucosa bucal, uma vez que existem poucos dados na literatura sobre o processo de absorção de fármacos antirretrovirais.

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a permeabilidade dos fármacos antirretrovirais (lamivudina e estavudina), em segmentos de mucosa bucal de suínos, por meio de modelo *ex vivo,* com emprego de câmaras de difusão do tipo células de *Franz*.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar o método analítico cromatográfico para a quantificação da lamivudina e estavudina nas amostras oriundas dos ensaios de permeabilidade;

- Desenvolver protocolo para determinação da permeabilidade em segmentos de mucosa bucal de suínos por meio de modelo *ex vivo* em ensaios com células de *Franz*;

- Avaliar a permeabilidade da lamivudina e estavudina por meio do protocolo desenvolvido.

A mucosa bucal vem sendo uma alternativa interessante para a administração de fármacos que apresentam biodisponibilidade diminuída quando administrados pela via oral, ou que encontram uma série de barreiras no trato gastrintestinal (TGI), as quais dificultam a sua dissolução e/ou absorção. Dentre as barreiras podem ser destacadas: a baixa solubilidade nos líquidos do TGI; a alta variação do pH dos líquidos do TGI, que pode levar à degradação de alguns fármacos; a baixa permeabilidade através da mucosa intestinal; metabolização pré-sistêmica e metabolização hepática ocasionada pelo efeito de primeira passagem, dentre outros (SMITH, 1996; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; CAO *et al.,* 2006; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008; DAHAN; AMIDON, 2009).

Desse modo, a administração de fármacos através da mucosa bucal apresenta-se como uma alternativa importante, pois, algumas limitações encontradas no TGI, não são observadas na cavidade bucal, como por exemplo: 1) não há degradação do fármaco em função da variação de pH; 2) não há metabolismo de primeira passagem, uma vez que as ramificações dos vasos sanguíneos que irrigam esta região estão vinculadas à veia jugular interna, e com isto escapam da circulação porta-hepática e efeito de primeira passagem; 3) observa-se baixa degradação enzimática do fármaco nesta mucosa. Em função do exposto, esta via tem se mostrado apropriada para a administração de fármacos que apresentam alta taxa de metabolização, especialmente na forma de sistemas de liberação modificada, tais como géis muco adesivos (PREGO *et al.,* 2005; GILHOTRA *et al*., 2014).

Apesar do TGI apresentar uma área absortiva (350.000 cm^2) muito superior ao da mucosa bucal (200 cm^2), esta diferença pode não ter impacto importante na biodisponibilidade de alguns fármacos principalmente para aqueles que são afetados pelos fatores supracitados (VRIES *et al*., 1991; SHOJAEI,1998; NIELSEN, RASSING, 1999; MADHAV *et al*.,2009).

Por outro lado, essa via de administração é limitada para fármacos que são instáveis no pH de aproximadamente 7,4, que provocam irritação na mucosa ou que apresentam propriedades organolépticas desagradáveis.

Normalmente está via é mais adequada para a administração de pequenas doses de fármacos (HAO& HENG, 2003).

A administração pela mucosa bucal pode ser classificada em três categorias, de acordo com a região e com o efeito terapêutico pretendido. São elas: administração pela via sublingual, que visa efeito sistêmico de fármacos através da mucosa que reveste o sulco da boca e a parte inferior da língua; administração bucal ou também denominada via transmucosal, que contempla a administração de fármacos através das membranas que revestem a face da cavidade bucal e visam também a circulação sistêmica, e a administração tópica de fármacos que visa ação local (SHOJAEI, 1998; MADHAV *et al*., 2009).

Embora a via sublingual seja mais vascularizada, e possua menos camadas de tecidos epiteliais que a via bucal, ela apresenta desvantagens para administração de fármacos. Por exemplo, uma formulação administrada no sulco bucal é exposta a níveis relativamente altos de saliva, o que acarreta na diminuição da dose absorvida, já que parte do fármaco que se solubiliza nessa quantidade de saliva pode ser deglutida e, com isto não é absorvida diretamente pela circulação sistêmica sublingual. Isto pode ocorrer quando há o acúmulo de saliva, que normalmente gera um mecanismo de deglutição involuntária. Por outro lado, o sulco bucal (cavidade que se localiza abaixo da língua e que contempla a região sublingual) é relativamente imóvel e evita o contato da forma farmacêutica com a língua (SUDAHAKAR *et al*., 2006).

A permeabilidade de fármacos pela mucosa bucal é menor quando comparada àquela observada pela mucosa sublingual, isto se deve às características fisiológicas distintas, principalmente relacionadas ao número de camadas, que na sublingual é menor que na mucosa bucal. As diferenças destas regiões estão relacionadas no **Quadro 1** (SUDAHAKAR *et al*., 2006; MADHAV *et al*.,2009; LAM *et al*., 2013). Por outro lado, a forma farmacêutica poderá ter maior tempo de contato com a mucosa bucal do que com a sublingual, e essa característica pode contribuir para uma melhor biodisponibilidade do fármaco pela via transmucosal.

Quadro1- Comparação entre a estrutura anatômicas da mucosa bucal e sublingual, que influenciam na permeabilidade de fármacos (adaptado de LAM *et al*., 2013).

	Mucosa Bucal	Mucosa Sublingual
Tipo	Não queratinizado	Não queratinizado
Espessura	500 a 800 µm	100 a 200 µm
Número de camadas	40 a 50	8 a 12
Vascularização	Boa vascularização	Alta vascularização
Tipo de administração	Local e sistêmica	Sistêmica

Em função do exposto, destaca-se que a via de administração bucal é uma ótima opção para administração de fármacos que apresentem absorção reduzida pelo trato gastrointestinal, e em função das características fisiológicas desta região a via de administração transmucosal vem ganhando o interesse para o desenvolvimento de forma farmacêutica com intuito de melhorar a farmacoterapia e a biodisponibilidade de fármacos (SUDAHAKAR *et al*., 2006; MADHAV *et al*.,2009; LAM *et al*., 2013).

3.1 Estrutura da Mucosa Bucal

A mucosa bucal é composta por 4 estruturas, que são: 1) epitélio, 2) membrana basal,3) lâmina própria e 4) submucosa (NICOLAZZO, FINNIN, 2008). A **Figura 1** ilustra estas camadas. A mucosa bucal pode ser dividida em queratinizada e não queratinizada. As mucosas queratinizadas encontram-se no palato duro, palato mole e gengiva, que são regiões recobertas com um epitélio queratinizado que se assemelham ao da pele em seu período de maturação, e representam 25% de toda área da cavidade bucal (LAM *et al*., 2013). Também existem as regiões, como o assoalho da cavidade bucal, que são constituídas por áreas queratinizadas e por áreas não queratinizadas,

também denominadas de especializadas, e que representam 15% da cavidade bucal. Além dessas regiões, há também na cavidade bucal a mucosa de revestimento, que recobre os lábios e as bochechas, constituídos de tecidos não queratinizados e que representa cerca de 60 % da área da cavidade bucal, ou seja, corresponde à maior parte da mucosa bucal (GANEN-QUINTANAR; FALSON-REIG, BURI, 1997; SHOJAEI, 1998; LAM *et al*., 2013). Essas regiões da cavidade bucal estão representadas na **Figura 2**.

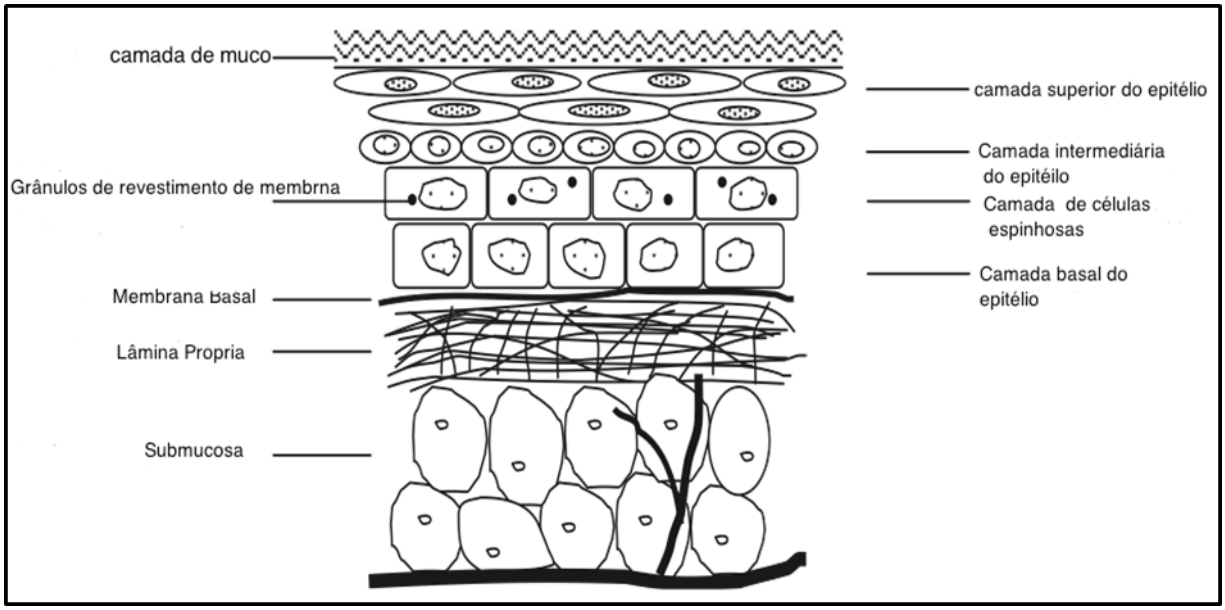


Figura 1- Esquema representativo da histologia da mucosa bucal - adaptado de HAO, HENG, 2003.

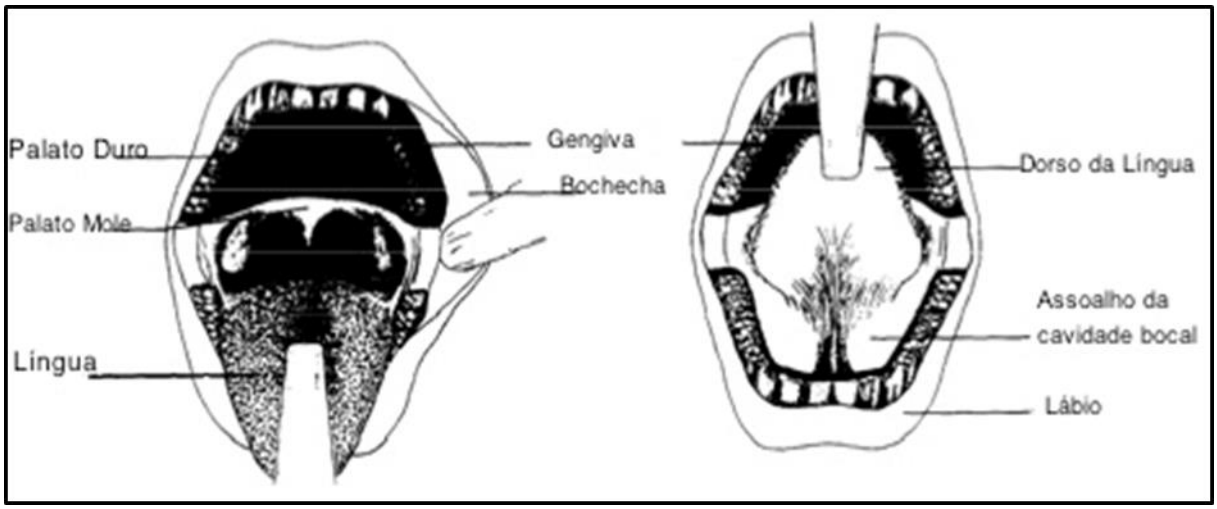


Figura 2- Figura que demonstra as diversas áreas da cavidade bucal de acordo com sua composição. As partes sombreadas demonstram as regiões queratinizadas; as partes abertas representam as regiões não queratinizadas e as partes pontilhadas demonstram as regiões especializadas (Adaptada de GANEN-QUINTANAR; FALSON-REIG, BURI, 1997).

O epitélio da mucosa bucal é do tipo estratificado-escamoso, composto por 40 a 50 camadas de células, o que resulta em uma espessura de aproximadamente 500 µm a 800 µm (SUDAHAKAR *et al*., 2006). A camada superficial desta região apresenta pequenos grânulos citoplasmáticos, denominados grânulos de revestimento da membrana (MCG), provenientes do complexo de Golgi, da camada intermediária desse epitélio. Tais grânulos migram para a superfície do nível médio do epitélio e se fundem com a membrana das células superiores. Essa fusão faz com que o conteúdo dos grânulos seja extruído para os espaços intercelulares (GANEN-QUINTANAR; FALSON-REIG, BURI, 1997; OBRADOVIC, HIDALGO, 2008). Esses grânulos são responsáveis pela coesão entre as células da mucosa e funcionam como uma das principais barreiras para a permeabilidade de fármacos através dessa mucosa (HAO, HENG, 2003).

Os grânulos de revestimento de membrana (MCG) estão presentes em toda a cavidade bucal, ou seja, tanto na mucosa queratinizada quanto na não queratinizado, localizados a uma distância de 200µm de espessura da camada superior do epitélio não queratinizado da mucosa. Os MCG apresentam uma morfologia esférica de 20 µm de diâmetro, e sua composição varia de acordo com a região da cavidade bucal (SHOJAEI, 1998; SUDAHAKAR *et al*., 2006).

Os MCG (s) das regiões queratinizadas da cavidade bucal são caracterizados por terem em sua composição esfingomielina, glicosilceramidas, ceramidas, acilceramidas entre outros constituintes (estruturas lipídicas). Já os MCG da mucosa não queratinizada são constituídos basicamente por éster de colesterol, colesterol, glicoesfingolipídeos e sulfato de colesterol (HAO, HENG, 2003; MADHAV *et al*., 2009). Tais diferenças contribuem para que na mucosa queratinizada, por apresentarem composição mais apolar, haja a formação de uma barreira à permeabilidade de alguns fármacos. Em contrapartida os grânulos da mucosa não queratinizada, por apresentarem uma maior quantidade de compostos bioquímicos polares, proporcionam maior permeabilidade em relação à mucosa queratinizada (SUDAHAKAR *et al*., 2006; MADHAV *et al*., 2009).

Além dos lipídeos oriundos do MCG e presentes nos espaços intercelulares das células da mucosa bucal, há também outras barreiras que afetam a permeabilidade de fármacos, tais como a película salivar, camada de

muco, membrana basal da mucosa e atividade metabólica proveniente das enzimas presentes na saliva e no muco.

A saliva é constituída basicamente de um líquido aquoso que contém 1% de materiais orgânicos e inorgânicos, além de conter enzimas, tais como α-amilase, lipase e protease, que respectivamente quebram ligações glicosídeas 1-4, gorduras e proteínas. Encontram-se na saliva ainda, as lisozimas que rompem a parede celular de algumas bactérias. A saliva apresenta também em sua composição vários anticorpos, tais como imunoglobulinas, IgA, IgG e IgM (HAO, HENG, 2003; MADHAV *et al*., 2009; LAM *et al*., 2013). Esses constituintes da saliva podem funcionar como uma barreira para a ação e absorção de alguns fármacos (MILLER *et al*., 2005; SCHOLZ *et al*., 2008).

A camada salivar, que envolve toda a superfície da mucosa bucal e forma uma barreira física entre a superfície bucal e o epitélio, protegendo contra agentes do ambiente externo, é produzida principalmente pelas glândulas submandibular e parótida, que produzem 80% do líquido salivar, enquanto que as glândulas sublinguais e glândulas menores são responsáveis por 20% da saliva. As glândulas menores, entre 600 a 1000 glândulas, distribuídas por toda área a mucosa bucal (bochecha, por exemplo), localizam-se abaixo da mucosa, e produzem uma película de saliva de 70 µm a 100 µm de espessura (SALAMART-MILER; CHITTCHANG, JOHNSTON, 2005; OBRADOVIC, HIDALGO, 2008; LAM *et al*., 2013).

Já a camada de muco também é produzida pelas glândulas sublinguais e glândulas menores que, apesar de cada uma delas contribuir com apenas 10% da produção de saliva, geram a maior parte do muco. Essa camada de muco pode variar de 40 µm a 300 µm de espessura, e se localiza ao redor das células da camada epitelial da mucosa bucal (SUDAHAKAR *et al*., 2006; MADHAV *et al*., 2009).

O muco é constituído por sais inorgânicos dissolvidos em água e pela mucina que se encontra dispersa neste líquido. As mucinas são glicoproteínas com peso molecular de 0,5 a 20 MDa, constituídas por 70 a 80% de hidratos de carbono, 12 a 25% de proteínas e 5% de ésteres de sulfatos, e representam de 1% a 5% da constituição da camada de muco. As glicoproteínas e os resíduos de sulfatos presentes em sua composição contribuem para que essa camada de muco apresente–se carregada negativamente, auxiliando assim a adesão

de formas farmacêuticas (SUDAHAKAR *et al*., 2006).

A lâmina basal também é uma barreira para a permeabilidade de fármacos através da mucosa bucal, a qual é influenciada pelo tamanho da substância e pela afinidade desta pela água e pela membrana (GANEN-QUINTANAR; FALSON-REIG, BURI, 1997; OBRADOVIC, HIDALGO, 2008).

A mucosa bucal também apresenta barreiras metabólicas que interferem na permeabilidade de fármacos, em razão da presença da enzima peptidase nos meios intracelular e/ou extracelular da membrana. Outras enzimas também estão presentes, como: esterases, oxidases, redutases, fosfatases e carboidrases (NIELSEN, RASSING, 2000; OBRADOVIC, HIDALGO, 2008).

Conforme apresentado na **Figura 1**, logo abaixo da camada basal do epitélio é possível encontrar a membrana basal, que consiste em um tecido conjuntivo de 1 a 2 µm de espessura. No entanto, subjacente a ela existe a lâmina própria que por ser altamente vascularizada, apresenta maior relevância para permeabilidade e absorção de fármacos (SALAMART-MILER; CHITTCHANG, JOHNSTON, 2005; NICOLAZZO, FINNIN, 2008).

3.2 Mecanismos envolvidos na permeabilidade de fármacos na mucosa oral

Os mecanismos envolvidos na permeabilidade de fármacos através da mucosa bucal, descritos na literatura, são: difusão passiva transcelular, difusão passiva paracelular e transporte ativo mediado por carreadores. A difusão passiva transcelular é o principal mecanismo de permeação responsável pelo transporte da maioria dos fármacos. Esse processo depende das características da molécula do fármaco como, por exemplo, Log P e pKa (NICOLAZZO, FINNIN, 2005). Neste sentido, se o fármaco apresentar maior afinidade por lipídeos, o mecanismo de transporte provável será por via transcelular passiva. Caso o fármaco apresenta-se na forma iônica, o mecanismo de transporte mais provável será a via paracelular, conforme demostrado na **Figura 3** (HEARNDEN *et al*., 2012). Porém, a absorção de um

fármaco na mucosa bucal pode ocorrer por vários mecanismos de permeabilidade concomitantemente, embora sempre haja a prevalência de um deles, e depende também das propriedades físico-químicas do fármaco (SUDAHAKAR *et al.,* 2006).

Conforme descrito anteriormente, os espaços intercelulares das células da mucosa bucal possuem lipídeos mais polares (mucosa não queratinizada) ou lipídeos apolares (mucosa queratinizada). Por outro lado, estes espaços intercelulares da mucosa bucal são mais frouxos em relação aos espaços existentes entre os enterócitos (células da mucosa intestinal), que são constituídos por várias proteínas, dentre as quais podem-se citar: as claudinas, as ocludinas, as proteínas da família Marvel (marvel D3 e tricelulina) e as proteínas citoplasmáticas (tais como ZO-1, ZO-2 e ZO-3) (FU *et al.,* 2015; STAAT *et al.,* 2015; MATTER; BALDA, 2014). Estas proteínas das junções oclusivas oferecem uma barreira importante para a absorção de fármacos no TGI, porém são pouco observadas na mucosa bucal. Assim, a via paracelular pode se destacar como um transporte importante para fármacos de baixo peso molecular na mucosa bucal (SOJAEI, 1998; NIELSEN *et al*.,1999; SUDHAKAR *et al*., 2006; ZAMBITO *et al*., 2006).

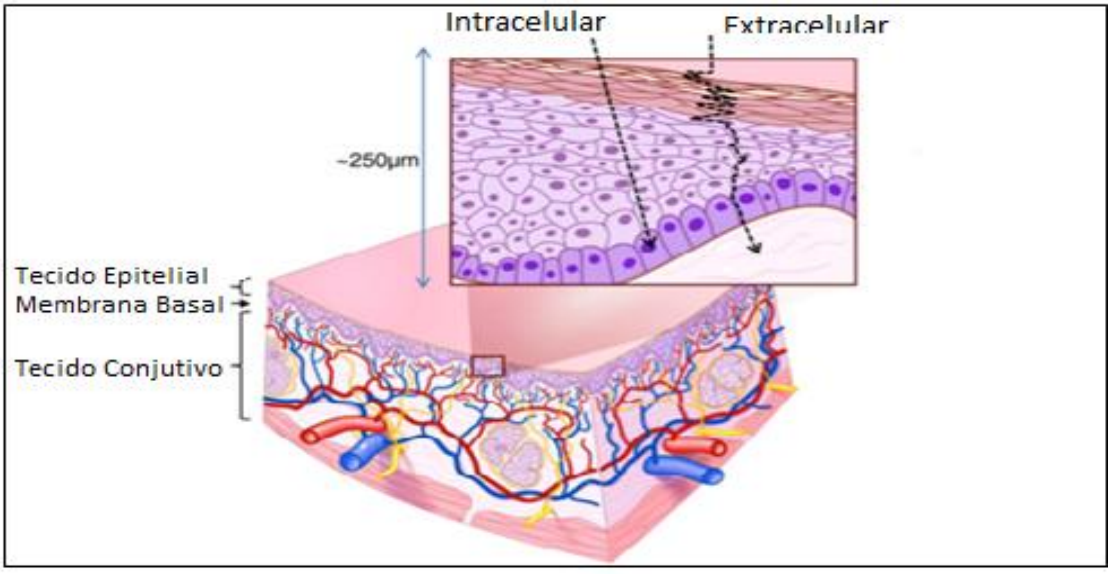


Figura 3-Esquema representativo da mucosa bucal apresentando a via intracelular e extracelular (Adaptada Hearnden et al., 2012).

Já o transporte mediado por proteínas carreadoras ocorre em menor

escala e depende da concentração e da afinidade do fármaco pelo transportador (RATHBONE, 1990). Porém, há pouquíssimos relatos sobre transportatores específicos presentes na mucosa bucal (KIMURA *et al*, 2000; Raghav *et al.,* 2011;LIU& BROWN, 2011). Kimura e colaboradores (2000) demonstraram que a absorção da D-glicose e da L-arabinose através da mucoa bucal é tanto saturável como estereoespecífica. Além desses transportadores específicos para o açúcar, a absorção de vitaminas, incluindo o ácido L-ascórbico, o ácido nicotínico e a nicotinamida, tem demonstrado ser dependente da presença de íons de sódio, o que indica que a absorção destas substâncias através da mucosa bucal, pode envolver alguns mecanismos de transporte mediado por carreadores (RAGHAV *et al*., 2011).

Porém, não há relatos na literatura sobre os tipos de transportadores que existem nessa mucosa como, por exemplo, transportadores de efluxo, como a glicoproteína-P (Pg-P), entre outros. Também não há relatos sobre a ação de enzimas da CYP no metabolismo de fármacos administrados por esta via.

3. 3 Fatores que influenciam a absorção de fármacos através da mucosa bucal

Conforme descrito anteriormente, a absorção de fármacos na mucosa bucal apresenta como principais barreiras: os MCG, película salivar, camada de muco e membrana basal (HAO, HENG, 2003; MADHAV *et al.,* 2009). Os fatores que têm impacto sobre o processo de absorção de fármacos na mucosa bucal, podem ser classificados em: fatores biológicos relacionados ao sítio de absorção; fatores físico-químicos relacionados aos fármacos e fatores farmacêuticos (SHARGEL, YU, 2005; SUDAHAKAR *et al.,* 2006; MADHAV *et al.,* 2009).

Dentre os aspectos relacionados às propriedades biológicas, destacam-se: a saliva e sua composição aquosa; o pH da saliva e o fluxo salivar (HAO, HENG, 2003; MADHAV *et al*., 2009; PATEL; LIU, BROWN, 2011). A saliva, é rica em água, o que favorece a solubilização e a liberação do fármaco contido

em um forma farmacêutica, principalmente quando há a preseça de um polímero hidrofílico. Ressalta-se que o pH salivar também pode influenciar na solubilidade do fármaco, e este varia de 5,5 a 7,3. O fluxo salivar, por sua vez, pode determinar o tempo de retenção da forma farmacêutica e a liberação do fármaco, e este varia de 0,5 L a 2,0 L por dia, podendo aumentar ou diminuir, dependendo da hora do dia, do tipo de estímulo e do grau de estimulação (MADHAV *et al*., 2009). Entretanto, o volume de saliva presente constantemente na cavidade bucal é de 1,1 mL, ou seja, volume relativamete baixo para liberação do fármaco (PATEL; LIU, BROWN, 2011). Por outro lado existem fatores que podem elevar o volume salivar e assim, com um fluxo elevado, pode ocorrer o mecanismo de deglutição involuntária com consequente redução da absorção do fármaco. Porém, ainda não foi comprovado que este efeito pode influenciar de modo significativo na absorção de fármaco pela mucosa bucal, por mais que muitos autores o reconheçam como um fator limitante para essa via (AUNGST, 1999; HAO, HENG, 2003; PATEL, LIU, BROWN, 2011). O fluxo salivar também contribui para a permeabilidade, pois quanto maior for o fluxo, maior será o consumo de oxigênio resultando em aumento da vasodilatação nessa região e em uma melhor absorção. O fluxo salivar mais elevado proporciona também o aumento da concentração de sódio e de bicarbonato na saliva, o que resulta em uma elevação do pH salivar, podendo assim influenciar na solubilidade do fármaco e consequentemente na permeabilidade (SUDAHAKAR *et al.,* 2006; MADHAV *et al.,* 2009).

Outros fatores relacionados à mucosa são: área superfiícial, que quanto maior melhor será a absorção do fármaco; a espessura da membrana que o fármaco irá permear, ou seja, quanto menor a espeesura, menor números de barreiras para o fármaco ultrapassar e atingir a corrente sangínea; as condições patológicas da membrana bucal influenciam na permeabilidade e na biodisponibilidade de fármacos; a vascularização, pois quanto mais vascularizada a região, mais fácilmente o fármaco terá acesso à corrente sanguínea; a atividade enzimática que pode fazer com que ocorra a degradação do fármaco acarretando em uma menor biodisponibilidade (HAO, HENG, 2003; MADHAV *et al*., 2009; PATEL; LIU, BROWN, 201).

Dentre os fatores físico-químicos relacionados aos fármacos, os fatores

mais relevantes que infleunciam a permeabilidade destes através da mucosa bucal são: pKA e coeficiente de partição, que são parâmetros físico-químicos relacionados intimamente à solubilidade do fármaco. Quanto menor o coeficiente de partição, mais hidrofílico é o fármaco e, consequentemente menor será a sua permeabilidade, considerando o mecanismo de difusão passiva transcelular (HAO, HENG, 2003; MADHAV *et al*., 2009). Outro aspecto importante a ser considerado é o peso molecular, que normalmente, quanto menor for o peso molecular do fámaco mais facilmente este será solubilizado e permeado pela via paracelular. Por outro lado, a via transcelular vem apresentando ótimos resultados de permeabilidade para derivados de peptídeos e para complexos imunológicos, que normalmente são moléulas grandes. Isso ocorre devido à não degradacão ocasionada pela variação do pH, uma vez que a variação desse parâmentro na mucosa bucal é menor do que a observada no TGI. Corroborando, a atividade enzimática na mucosa bucal é menor do que a obsevada no TGI (PATEL; LIU, BROWN, 2011)

Ainda podem ser destacados como fatores importantes e determinantes da permeabilidade de fármacos na mucosa bucal, aqueles relacionados às características farmacêuticas, como por exemplo (AUNGST, 1999; METSUGI *et al*., 2008; SOUZA *et al*., 2007): o tempo de contato, que para esta via de administração, quanto maior tempo de contato melhor será a biodisponibilidade do fármaco; o tipo de excipiente, pois podem facilitar ou dificultar a biodisponibilidade do fármaco; a concentração do fármaco na forma farmacêutica, tais como tensoativos, esterato de magnésio e alguns tipo de polímeros; o tipo de veiculo utilizado na formulação; a forma que o fármaco é liberado da forma farmacêutica a e a tecnologia utilizada na obtenção do produto farmacêutico.

3.4 Métodos que permitem a avaliação da permeabilidade de fármacos através da mucosa bucal

Para a determinação e caracterização da permeabilidade de fármacos, através da mucosa bucal vêm sendo empregados os métodos *in vivo*, *in situ, in*

vitro e ex- vivo (NIELSEN, RASSING, 1999; NIELSEN *et al*.,1999; NIELSEN, RASSING, 2000b; NIELSEN, RASSING, 2002a*).*

O método *in vivo* é realizado em seres humanos, e neste ensaio, uma solução contendo o fármaco de interesse é administrada a um voluntário, que é orientado a manter esta solução em contato com a mucosa oral, por um determinado intervalo de tempo. Posteriormente, a quantidade de fármaco permeada é avaliada indiretamente, por meio da determinação da concentração de fármaco remanescente na solução retirada da cavidade bucal (ADRIAN *et al*., 2006). No método *in situ*, também empregado em seres humanos, uma câmera de perfusão bucal é colocada em contato com a mucosa, em local específico de interesse no estudo, e a solução que contém o fármaco é mantida em contato com a mucosa, por um intervalo de tempo pré-definido, o que o torna mais específico do que o anterior. Neste, a quantidade de fármaco permeada é estimada indiretamente, da mesma forma que no método *in vivo,* e de forma semelhante, os resultados obtidos não têm sido correspondidos à quantidade de fato permeada, e que atinge a circulação sistêmica (BARSUHN *et al*., 1988; ADRIAN *et al*., 2006).

Tanto o método *in vivo*, quanto o *in situ,* são pouco utilizados, uma vez que são métodos que empregam principalmente seres humanos, e os resultados muitas vezes obtidos não correspondem às concentrações na circulação sistêmica (ADRIAN *et al*., 2006). Além disso, estes métodos apresentam a desvantagem da variação interindividual (BARSUHN *et al*., 1988; ADRIAN *et al*., 2006).

O método *in vitro* por sua vez, utiliza células provenientes de carcinoma bucal, que são denominadas de TR146. Neste método é possível produzir a partir do cultivo destas células, múltiplas camadas de epitélio escamoso estratificado, semelhante a mucosa bucal de seres humanos. Porém, para o cultivo destas células são necessários 23 dias de incubação, tempo apropriado para produzir camada celular com maior semelhança com a mucosa de humanos (NIELSEN& RASSING, 1999; NIELSEN *et al*.,1999; NIELSEN, RASSING, 2000b; NIELSEN, RASSING, 2002a).

Desenvolveu-se ainda, cultura de células, derivadas de biópsia da mucosa bucal humana saudável, que apresentou morfologia muito similar à mucosa bucal, inclusive em relação às estruturas dos grânulos, que se

mostraram semelhantes em relação à morfologia e à composição lipídica do tecido bucal intacto. A natureza de barreira do presente modelo é semelhante à da mucosa bucal intacta, e por isso esta cultura de células pode ser um modelo alternativo para a cultura de TR146. Tais modelos podem ser muito úteis para avaliar a permeabilidade bucal e metabolismo de muitos compostos (NICOLAZZO, J. A; REED, 2003)

Outra alternativa é o método *ex- vivo*, o qual utiliza segmentos de tecido provenientes da mucosa bucal de animais, obtidos após a eutanásia, e devidamente dispostos em câmaras de difusão. Este método será descrito com mais detalhamento no item seguinte.

3.4.1 Método *ex vivo*

Estudos de permeabilidade por meio da técnica *ex vivo* costumam empregar câmaras de difusão horizontal como a câmara de *Ussing*. No entanto, as câmaras de difusão vertical, tais como células de *Franz*, são abudantemente utilizadas em estudos de permeação da pele, e também podem ser utilizadas em estudos de permeabilidade bucal e intestinal (DEZANI *et al*.,2013; LOPEZ *et al.,* 2000; ROPKE *et al*., 2002; HERAI *et al*., 2007). Porém, existem poucos estudos de permeabilidade intestinal de fármacos com emprego deste tipo de câmara (DEZANI *et al*.,2013; NICOLAZZO, FINNIN, 2008). Nestes ensaios *ex vivo* com animais, os segmentos da mucosa bucal são adequadamente removidos, dispostos entre as duas câmaras, e mantidos a 37ºC em meio líquido (FAGERHOLM *et al*., 1996; FAGERHOLM *et al*., 1999) e uma das vantagem que esta técnica apresenta é a pequena quantidede de animais.

Para o estudo, os segmentos de mucosa obtidos de animais (rato, coelho, cachorro e suínos) são dispostos em sistemas constituídos de câmaras de difusão, que apresentam um compratimento doador e outro, receptor. Os segmentos são dispostos entre estes dois compartimentos ou câmaras. Existem câmaras de difusão de fluxo horizontal, como é o caso da câmara de *Ussing* e a câmera de difusão vertical denominada de células de *Franz* (LESTARI, M. L.D; NICOLAZZO, J. A & FINNIN, 2009; DEZANI *et al*., 2013).

Estes dois tipos de câmaras podem se diferenciar também em relação à agitação dos meios que irão banhar os segmentos de tecido. No caso da câmara de *Ussing*, a agitação ocorre tanto no compartimento receptor como no doador, por meio do borbulhamento de gás (MADHAV *et al*., 2009). Já na célula de *Franz*, a agitação no compartimento doador ocorre pelo borbulhamento de gás, e no receptor esse processo ocorre por meio de agitação magnética, sendo mais intensa que a agitação proporcionada pelo gás.

No ensaio de permeabilidade com emprego da câmara de difusão do tipo *Franz*, o composto a ser avaliado é solubilizado no meio, o qual apresenta composição semelhantes ao meio fisiológico, ou está contido numa formulação, que é adicionada à superfície da mucosa bucal, constituindo compartimento doador. O volume da câmara receptora é de 6-8 Ml, e uma barra de agitação magnética mantém a mistura homogênea. A temperatura do banho de água é mantida aquecida em 37°C. As amostras provenientes da solução receptora são colhidas através da saída lateral na célula de difusão, em intervalos regulares de tempo, normalmente até 180 minutos, pois a membrana deve manter-se continuamente viável para a realização do teste de permeabilidade (LESTARI; NICOLAZZO, FINNIN, 2009; DEZANI *et al*., 2013).

O método *ex vivo* apresenta alguams vantagens em relação a outros métodos, o que possibilita: estudar a permeabilidade em segmentos diferentes da mucosa bucal, de forma isolada; a administração do fármaco diretamente no local de absorção a ser avaliado, não favorecendo a perda devido ao ato de engolir, o que é comum acontecer nos estudos *in vivo;* avaliar a viabilidade dos tecidos empregados nos estudos de permeabilidade; amplo número de testes, facilitando portanto o estudo do impacto de excipientes na permeabilidade. Além destas vantagens, destaca-se também que estes ensaios permitem o emprego de segmentos de mucosas de diferentes animais que, cujos dados de permeabilidade bucal podem ser correlacionados com os resultados de estudos *in vivo* em seres humanos (ARTUSI *et al*., 2002).

Para os estudos de permeabilidade por meio do método *ex vivo* são comumente empregados tecidos provenientes da mucosa bucal de diferentes animais, dentre eles, destacam-se: cão, suíno, hamster, rato, coelho e macaco. A seleção do animal que será utilizado no ensaio de permeabilidade leva em

consideração a semelhança com a mucosa de humano, região da cavidade bucal que será utilizada no estudo, questões éticas e questões econômicas. Em relação à semelhança da estrutura da mucosa bucal desses animais, as principais características estão demostradas no **Quadro 2:**

Quadro2 - Comparação de mucosas bucais de diferentes modelos de animais (Adaptado KUROSAKI *et al.,* 1991; ROBINSON & HARRIS, 1992; SQUIER & WERTZ, 1996; OBRADOVIC, HIDALGO, 2008).

Modelo	**Composição da mucosa**	**Espessura da mucosa µm**
Humano	Não queratinizado	580 ± 90
CÃO	Não queratinizado	126 ± 20
Suíno	Não queratinizado	772 ± 150
Hamster	Queratinizado	115,3 ± 11,5
Rato	Queratinizado	Não disponível
Coelho	Parcialmente queratinizado	600
Macaco	Não queratinizado	271 ± 50

Considerando os parâmetros destacados no **Quadro 2**, observa-se que o modelo que mais se assemelha ao humano, é o suíno. Além disso, há uma grande semelhança em relação à composição bioquímica dos lipídeos da mucosa bucal do suíno e dos seres humanos, conforme demostrado no **Quadro 3**. Considerando as as semlhanças em relação à mucosa bucal dos seres humanos, relacionadas à estrutura **(Quadro 2**) e composição bioquímica (**Quadro 3**), os segmentos de tecidos bucais de suínos são os eleitos para os

estudos de permeabilidade bucal, por meio do método *ex-vivo* (GANEN-QUINTANAR; FALSON-REIG, BURI, 1997; OBRADOVIC, HIDALGO, 2008).

Quadro3 - Comparação da composição lipídica da mucosa bucal de suíno e de seres humanos (Adaptado PATEL; LIU, BROWN, 2012).

Lipídeos	**Mucosa bucal de suíno (µg por mg de tecido seco)**	**Mucosa bucal de humanos (µg por mg de tecido seco) (n = 14)**
Colesterol	20.4	23.7
Ester de Colesterol	4.1	7.4
Sulfato de Colesterol	6.1	–
Ácidos Graxos	10.8	9.2
Ceramidas	0.8	0.4
Glicoceramidas	15.9	13.8
Triglicerídeos	4.7	–
Esfigomeilina	16.3	7.7
Fosfadicolina	17.5	18.4
fosfodilserina	11.3	0.8
fosfadilinositol	6.0	1.8
fosfoetiletanolamina	16.6	16.8
Fosfolipídeo (total)	130	45.5

Outro fator a ser considerado na avaliação da permeabilidade de fármacos através de segmentos de mucosa bucal, com emprego dos métodos *ex vivo,* é a viabilidade do segmento utilizado no ensaio. Contudo, não há um protocolo padronizado para verificar tal parâmetro durante o ensaio de permeabilidade. O método mais adequando para a avalição da viabilidade tecidual é o próprio ensaio de permeabilidade, uma vez que, se o fluxo de permeação do fármaco manteve-se praticamente constante, durante todo o

ensaio, mesmo sob diferentes condições experimentais, tais como pH e temperatura, pode-se concluir que a membrana da mucosa bucal se manteve viável (SUDHAKAR; KUOTSU; BANDYOPADHYAY,2006). Normalmente quando se tem a morte tecidual durante o ensaio, são observadas alterações no fluxo de permeação para determinada substância, que se mostrará diferente daquele observado durante todo o ensaio de permeabilidade. Há ainda outras técnicas que vêm sendo empregadas para verificação deste parâmetro, tais como: análises histológicas; análises morfológicas; utilização do corante azul terpeno, que permite a identificação microscópica das células viáveis (não coradas) e das células não viáveis (coradas) (LANGOTH; BERNKOP; SCHNURCH; KURKA, 2005); utilização da técnica colorimétrica com tetrazólio (MTT), que permite avaliar a viabilidade celular por meio da quantificação de uma substância gerada pela conversão do MTT (formazan), em função da atividade mitocondrial das células vivas (MOSMANN,1983) resistência elétrica transepitelial (TEER), que é avaliada através da medição da resistência transepitelial (DEZANI *et al*., 2013; HOLM *et al.,* 2013).

A avalição do TEER vem sendo empregada nos estudos de permeação de mucosa bucal objetivando verificar a viabilidade da membrana. Tal parâmetro é aferido no início e no final do ensaio de permeação, porém não há um protocolo padronizado que indique os intervalos de aceitação para cada tipo de segmento de mucosa. A literatura tem descrito valores de TEER bastante distintos e que contemplam intervalos de 136 ± 17 a 950 ± 392 Ω/ cm^2 (HOLM *et al*.,2013; NIELSEN, RASSING, 2002). NIELSEN e RASSING (2002) descreveram valores de TEER para segmentos de mucosa bucal, no início do ensaio, de 144 ± 12 Ω/ cm^2 e de 109 ± 21 Ω/ cm^2, após 6h de experimentos. Os pesquisadores ainda avaliaram o impacto da solução tampão fosfato sobre os segmentos (contato pelo período de 1 hora) e observaram valores de TEER de 123 ± 12 Ω/ cm^2. Por meio destes estudos, NIELSEN e RASSING (2002), concluíram que a integridade da mucosa não foi afetada de forma irreversível e que essa técnica permite mensurar a viabilidade da mucosa bucal. Outros pesquisadores têm empregado esta técnica para avaliar a viabilidade dos segmentos da mucosa bucal (KOWAPRADIT *et al*., 2010; HOLM et al.,2013; NIELSEN, RASSING, 2002).

3.5 Fármacos antirretrovirais selecionados para o estudo de permeabilidade pela via da mucosa bucal.

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

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

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

A lamivudina (3TC; C8H11N3O3S) é um fármaco antirretroviral sintético análogo de nucleosídeo (ITRAN) e atua inibindo a enzima transcriptase reversa do HIV. Normalmente este fármaco é utilizado em associação com outros antirretrovirais como estavudina, zidovudina e didanosina (LI; CHAN, 1999; BALINT, 2001; FERNANDES *et al*., 2006; WHO, 2006; JAIN; JADON; RADHAPYARI, 2007; MISTRI *et al*., 2007; STRAUCH *et al*., 2011).

A lamivudina (3TC) (Figura 4) apresenta biodisponibilidade de aproximadamente 80%, e o mecanismo envolvido na sua permeabilidade intestinal ainda não está bem elucidado (DEZANI *et al*., 2013; REIS *et al*., 2013; LI & CHAN,1990; WACLAWSKI & SINKO, 1996). Sabe-se que este fármaco permeia por difusão passiva e é um fraco substrato da glicoproteína P (P-gp), motivo pelo qual, o mecanismo de efluxo não interfere de maneira expressiva na sua permeabilidade e consequentemente na sua biodisponibilidade. Já em relação à metabolização pré-sistêmica no lúmen

intestinal, pouco é descrito na literatura. Porém a lamivudina é principalmente excretada na urina, na forma inalterada (BALINT, 2001; SOUZA, 2005; MISTRI *et al*., 2007; GUALDEIS; BRIÑ & QUEVEDO, 2012). Não há relatos na literatura sobre a permeabilidade da lamivudina (3TC) na mucosa bucal.

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

As propriedades físico-químicas da 3TC são (FERNANDES *et al*., 2006; WHO, 2006; STRAUCH *et al*., 2011; MERCK INDEX, 2001):

- Apresenta-se como pó branco a branco amarelado, peso molecular igual a 229,3 g/mol, pKa de 4,3 e 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;
- Com relação à solubilidade, o fármaco 3TC apresenta-se solúvel em metanol e praticamente insolúvel em acetona. Segundo o Merck Index (2001), o valor de solubilidade da 3TC é de aproximadamente 70,0 $mg.mL^{-1}$ a 20°C.

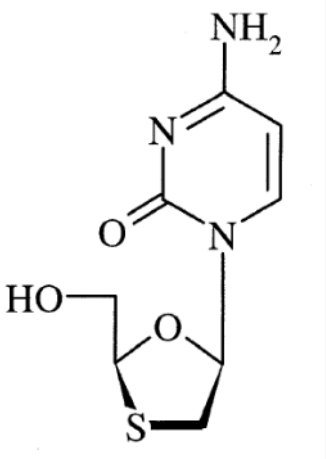


Figura 4- Estrutura química da 3TC (BALIMANE; SINKO, 1999; LI; CHAN, 1999; WHO, 2006; STRAUCH *et al*., 2011).

A estavudina (d4T, C10H12N2O4) (Figura 5) também é um fármaco sintético inibidor da transcritas reversa análogo de nucleosídeo (ITRAN). A d4T apresenta uma boa biodisponibilidade (85 %), segundo o EMA (*European Medicines Agency*), porém para o FDA (*U.S. Food and Drug Administration*), essa fração absorvida é considerada baixa (FDA, 2015). A d4T é excretada na forma inalterada na urina. Esse fármaco é classificado como pertencente à classe I do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), ou seja, apresenta alta solubilidade e alta permeabilidade e é considerado como candidato à bioisenção no Brasil (BRASIL, 2011). Porém, seu mecanismo de permeabilidade não está bem esclarecido (WACLAWSKI & SINKO, 1996; SILVA *et al*., 2011). Não há relatos sobre os mecanismos envolvidos na permeabilidade através da mucosa bucal deste fármaco.

As principais propriedades físico-químicas da d4T são (UNITED STATES, 2009):

•. Apresenta-se como pó branco ou levemente amarelado com peso molecular igual a 224,2 g/mol;

- Seu pKa é igual a 9,8;
- Possui Log P igual a – 0,47 e o Colog P é de – 0,73;

•. Não se encontra na forma ionizável em pH fisiológico;

•A solubilidade da d4T em água na temperatura de 23°C é de aproximadamente 83 $mg.mL^{-1}$ (BALIMANE; SINKO, 1999; LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004; MISTRI *et al*., 2007;

STRYDOM *et al*., 2009; SILVA *et al*., 2011).

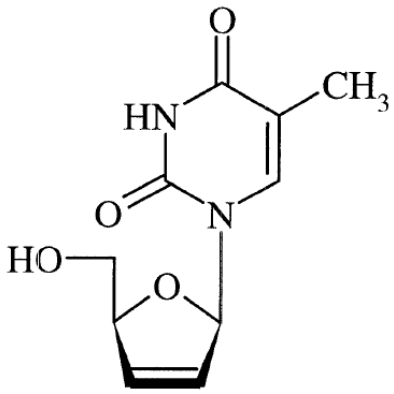


Figura 5- Estrutura química da d4T (BALIMANE; SINKO, 1999; LI; CHAN, 1999)

4.1 Materiais, solventes e reagentes

- Metanol, acetonitrila, fosfato de potássio monobásico (grau de pureza cromatográfica), Merck;
- Estavudina (teor 99,7%): grau de pureza farmacêutica; gentilmente fornecida pela Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos (São Paulo, Brasil);
- Lamivudina: grau de pureza farmacêutica (teor de 101); gentilmente fornecida pela Fundação do Remédio Popular (FURP, São Paulo, Brasil);
- Cloreto de Sódio (NaCl), Cloreto de Potássio (KCl), Fosfato de Sódio (NaH_2PO_4), Cloreto de Cálcio ($CaCl_2$), Sulfato de Magnésio ($MgSO_4$), Carbonato de Sódio ($NaCO_3$) e D- Glucose, Synth , PA;
- HEPES, Sigma
- Ácido clorídrico e hidróxido de sódio, ácido orto–fosfórico e trietanolamina P.A;
- Água ultrapurificada obtida pelo equipamento Mili-Q (Milipore, USA).

4.2 Equipamentos e dispositivos diversos

- Micropipeta monocanal de 20 a 100 µL (Pipetman P100) – Gilson;
- Micropipeta monocanal de 100 a 1.000 µL (mod.4500) –Labsystems;
- Micropipeta monocanal de 500 a 5.000 µL (Série 2.100) –Eppendorf;
- Cromatógrafo Merck Hitachi LaChrom®, com detector fluorescência (L-7485) e bomba (L-7100);
- pHmetro Hanna®;
- Balança analítica Shimadzu® mod. AX200;
- Ultrassom Unique®;

- Plataforma manual para teste tópicos e transdérmico*start up 6 cells* – Variomag / Hanson Research;
- Células de difusão vertical (58-001-455) adaptadas, orifício de 5mm, volume de 7,0 mL e área de exposição de 1,77 cm^2 - Hanson Research;
- Eletro dermátomoNouvag 75mm;
- Lâmina de bisturi nº 22.

4.3 Métodos

4.3.1 Obtenção e preparação do segmento da mucosa o bucal de suíno

Inicialmente, o projeto foi elaborado e submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, obtendo aprovação conforme ofício anexo (OFÍCIO CEUA/FCF 440 - Anexo A).

A mucosa bucal foi adquirida a partir de suínos eutanásiados no Frigorífico Raja, que eram destinados à produção de alimentos. Estes animais tinham idade média de 5 meses e aproximadamente 85 a 100 kg.

A cabeça do suíno, separada imediatamente após a eutanásia, foi transportada para o Laboratório da UNIFESP, em solução Ringer-Krebs-HEPES modificada (pH 7,4), mantida sob temperatura de 4ºC e com a seguinte composição: (1) cloreto de sódio (NaCl)115,5 mm;(2) cloreto de potássio (KCl) 4,2 mM; cloreto de cálcio ($CaCl_2$) 2,5 mM; (4) fosfato de sódio (NaH_2PO_4)1,6 mM , sulfato de magnésio ($MgSO_4$) 0,8 mM , 4 mM HEPES, carbonato de sódio (Na_2CO_3) 17,3 mM e 12,2 mM de Glicose (IMBERT, D & CULLANDER, 1998; REED & FINNIN, 2004; PATEL, V. F; LUI, F; BROWMN, M, 2011). A mucosa bucal foi inicialmente preparada com o auxílio de um bisturi, que permitiu a separação da parte de tecido que contém o segmento da mucosa a ser empregada. Após esse processo, o segmento obtido foi fixado em uma placa de isopor e com o auxílio do dermátomo elétrico Nouvag, com rotação de 8000 rpm, foi separado o fragmento da mucosa bucal com 700 µm de espessura (GANEN-QUINTANAR, A; FALSON-REIG, F & BURI, P, 1997; OBRADOVIC, T & HIDALGO, I. J, 2008). A dimensão da espessura foi

determinada com base na literatura, pois toda a estrutura da mucosa bucal está contemplada entre 500 a 800 µm de espessura (GANEN-QUINTANAR, A; FALSON-REIG, F & BURI, P, 1997; OBRADOVIC, T & HIDALGO, I. J, 2008). Foram desconsideradas as regiões mais próxima dos limites inferior, superior e lateral da gengiva (mucosa queratinizada), aproximadamente de 1 mm a 2 mm da extremidade desse segmento, com a finalidade de garantir que a mucosa dermatomizada fosse somente a não queratinizada.

Em seguida, os segmentos da mucosa obtidos foram devidamente fixados em discos de acetato de etileno vinil (E.V.A) com aproximadamente a mesma área da câmara de difusão vertical, tipo células de *Franz*. Esse procedimento garante que a membrana utilizada no estudo de permeabilidade, fique em contato com a solução a 4ºC. Tais segmentos foram imergidos em solução Ringer-Krebs-HEPES modificado, dentro de recipiente apropriado, e armazenados no isopor com gelo e mantido a 4ºC, para transporte ao Laboratório de Permeabilidade e Biodisponibilidade (LPB) da Faculdade de Ciências Farmacêutica (FCF) da Universidade de São Paulo, local onde foi realizado o estudo de permeabilidade

As **Figuras 6 a 9** ilustram as etapas de obtenção do segmento de interesse a partir da cabeça do suíno**.**

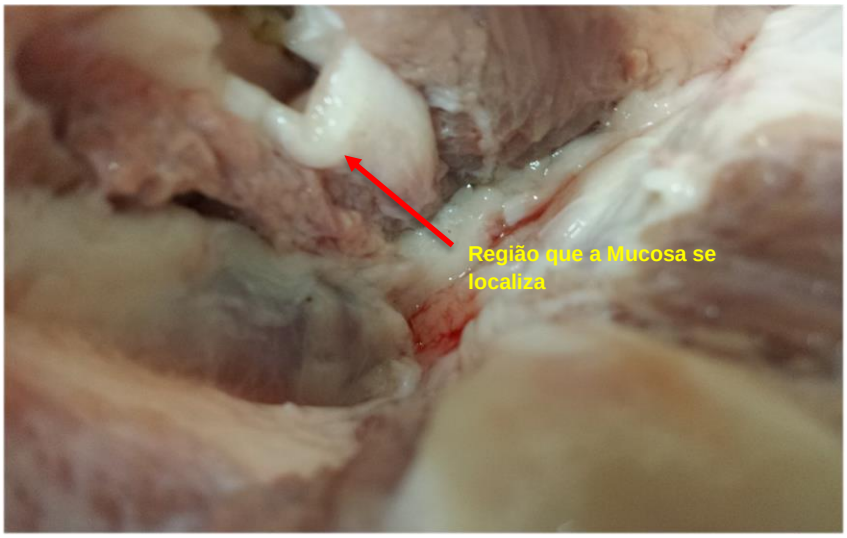


Figura 6 - Região que contém a mucosa conforme indicado na figura.

Figura 7- Remoção da região que contém a mucosa bucal, segmento de interesse para o presente estudo.

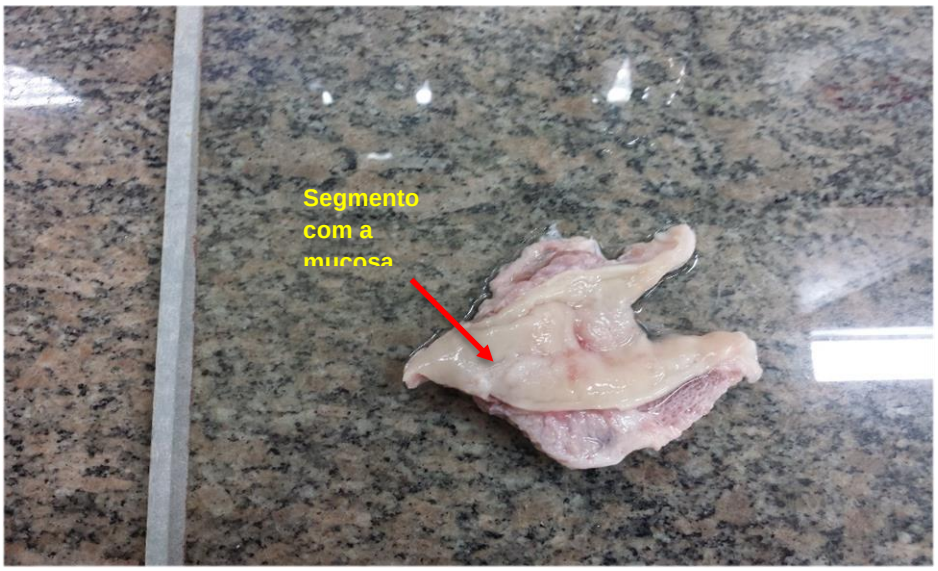


Figura 8– A figura indica o segmento de interesse para o estudo.

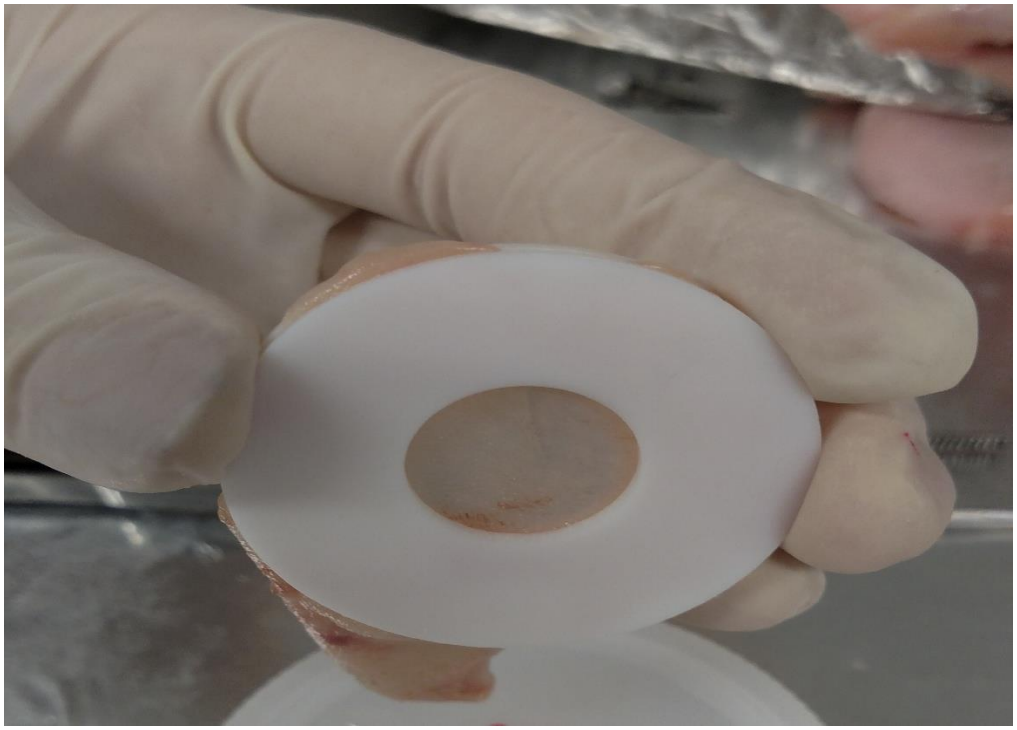


Figura 9 - Segmento da mucosa bucal após a dermatomização.

4.3.2 Estudo da viabilidade da mucosa bucal

A viabilidade da mucosa bucal foi avaliada utilizando a medição da resistência transepitelial (TEER). A resistência transepitelial foi medida em cada segmento de mucosa bucal, com o auxílio do equipamento Millicell®-ERS, nos seguintes períodos: logo após a dermatomização da mucosa bucal **(INICIAL);** antes de iniciar o teste de permeabilidade **(INTERMEDIÁRIO**), ou seja, depois do transporte desse segmento da UNIFESP até o LPB da FCF/ USP e, imediatamente após a finalização do estudo de permeabilidade **(FINAL).** Segmentos com valores de TEER menores que 320 $\Omega.cm^{2,}$ no início (INICIAL) foram descartados. Padronizaram-se como valores aceitos de TEER INTERMEDIÁRIO e FINAL, maiores ou igual a 290$\Omega.cm^2$ e 240$\Omega.cm^2$ respectivamente. Os segmentos que apresentassem valores TEER abaixo destes citados foram descartados para as análises (SUDHAKAR; KUOTSU; BANDYOPADHYAY, 2006).

4.3.3 Estudo de Permeabilidade

Para o estudo de permeabilidade foi empregada a câmara de difusão vertical, ou células de *Franz*, que é composta pelos compartimentos, doador e receptor. No compartimento doador houve o borbulhamento de gás carbogênico, contendo 95% O_2 e 5% CO_2, enquanto que no receptor a agitação magnética de 50 rpm foi promovida para garantir a homogeneidade da solução. Entre estes dois compartimentos foi colocado o segmento da mucosa bucal de suíno, obtido conforme descrito no item 4.2.1.1. No início do teste, o compartimento receptor, contendo 7mL de solução Ringer- Krebs-HEPES modificado, pH 7,4, foi estabilizado a 37ºC, sob constante agitação de 50 rpm, por 20 minutos. Após essa etapa, o segmento da mucosa bucal, com as dimensões de 700 µm de espessura e 1,77 cm^2 de área, obtido conforme descrito no item 4.2.1.1, foi cuidadosamente colocado na célula de difusão, composta pelos compartimentos, receptor e doador, como demostrado na **Figura 10**. A oxigenação da mucosa foi fornecida por borbulhamento de uma mistura de gás contendo 95% O_2 e 5% CO_2, com o fluxo de oxigenação de 1,0 mL/min na câmara doadora com a finalidade de manter a viabilidade do tecido da mucosa bucal por mais tempo. A agitação magnética na câmara receptora foi mantida constante em 50 rpm durante todo o ensaio objetivando uma melhora homogeneização das soluções na célula receptora (HIDALGO *et al.*, 1993; HILLGREN *et al.*, 1995; LEGEN; KRISTL, 2003; LEGEN *et al.*, 2005; ZAKELJ *et al*., 2006).

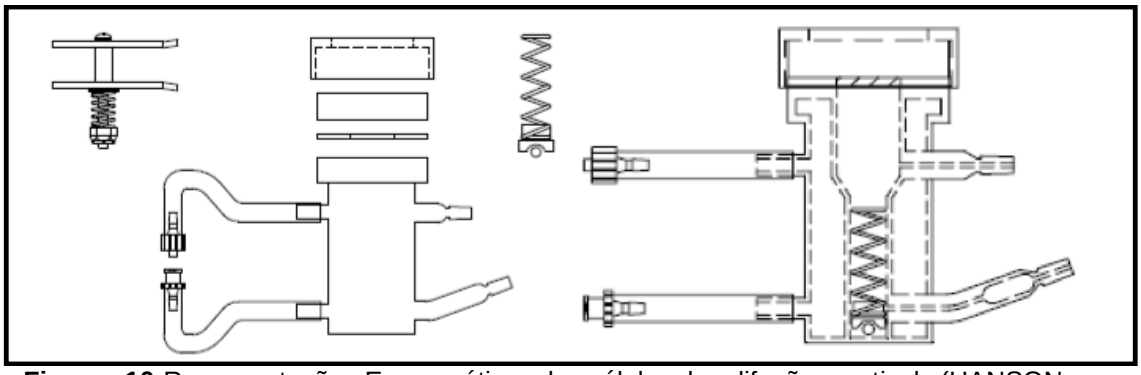


Figura 10-Representação Esquemática da célula de difusão vertical (HANSON RESEARCH CORPORATION, 2004).

Após um período de estabilização do segmento da mucosa no sistema de difusão vertical, de 20 minutos, as soluções contendo os fármacos antirretrovirais, lamivudina (3TC; concentração de 300µg/mL) e estavudina (d4T; concentração de 40 µg/mL), e os marcadores de transporte transcelular (metoprolol; concentração de 100 µg/mL) e de transporte paracelular (fluoresceína; concentração de 25 µg/mL), solubilizados em meio Ringer-Krebs-HEPES modificado (pH 7,4), foram adicionadas no compartimento doador da célula (volume total de 5,0 mL).

As amostragens de 1,0 mL foram realizadas a partir do compartimento receptor em intervalos pré-estabelecidos (30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 minutos), com reposição imediata de solução Ringer-Krebs-HEPES modificado (pH 7,4). O tempo total do experimento, compreendido entre a retirada do tecido animal e a finalização do mesmo não ultrapassou 10 h (NIELSEN, H & RASSING, M. R, 1999; PATEL, V.F; LIU, F & BROWN, M, 2012).

As Figuras 11 e 12 apresentam um fluxograma da forma como foram realizados os ensaios de permeabilidade bucal para os marcadores e para os fármacos antirretrovirais, respectivamente.

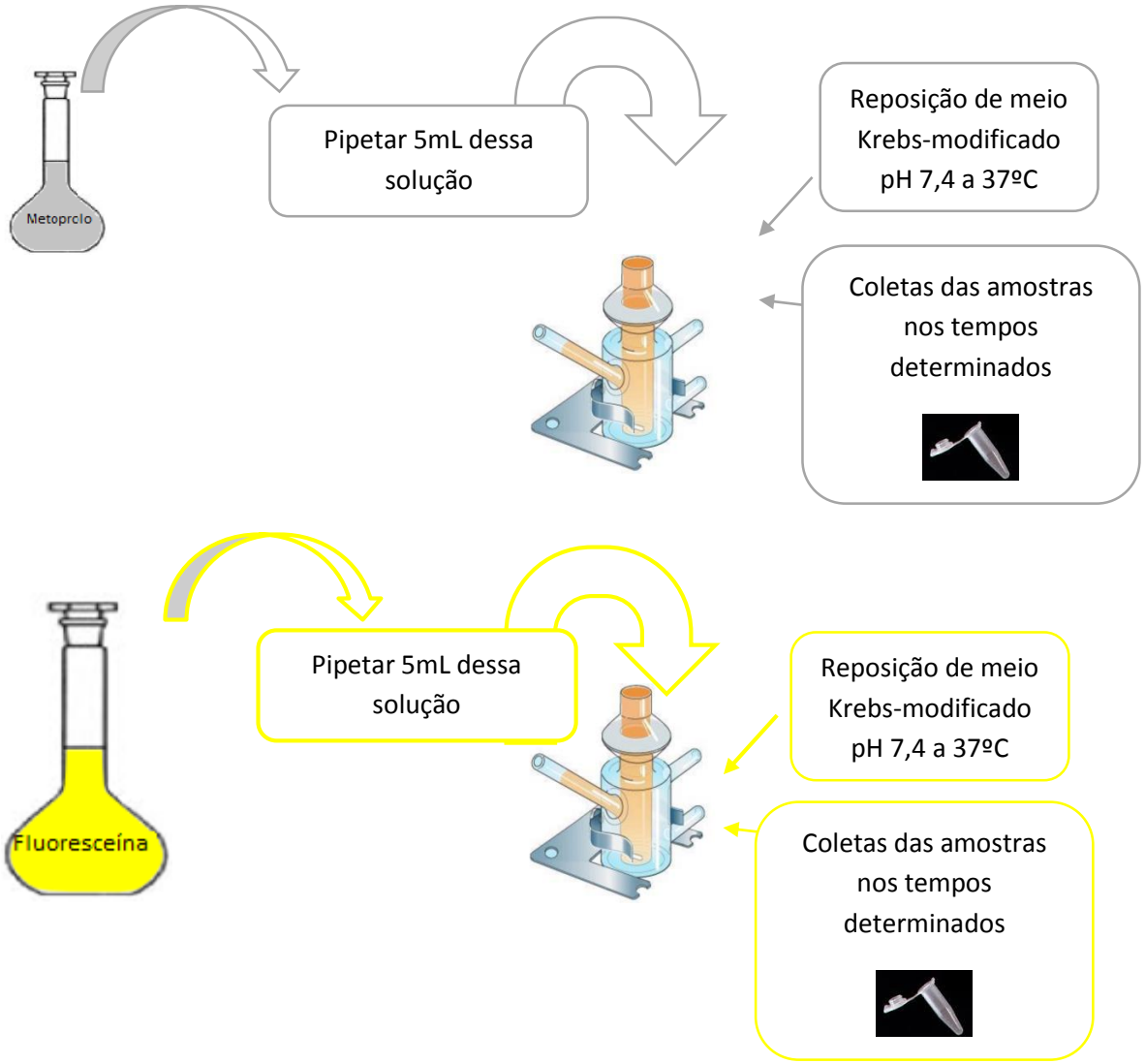


Figura 11- Resumo das etapas do estudo de permeabilidade dos marcadores transcecular (metoprolol) e paracelular (fluoresceína) em segmento da mucosa bucal.

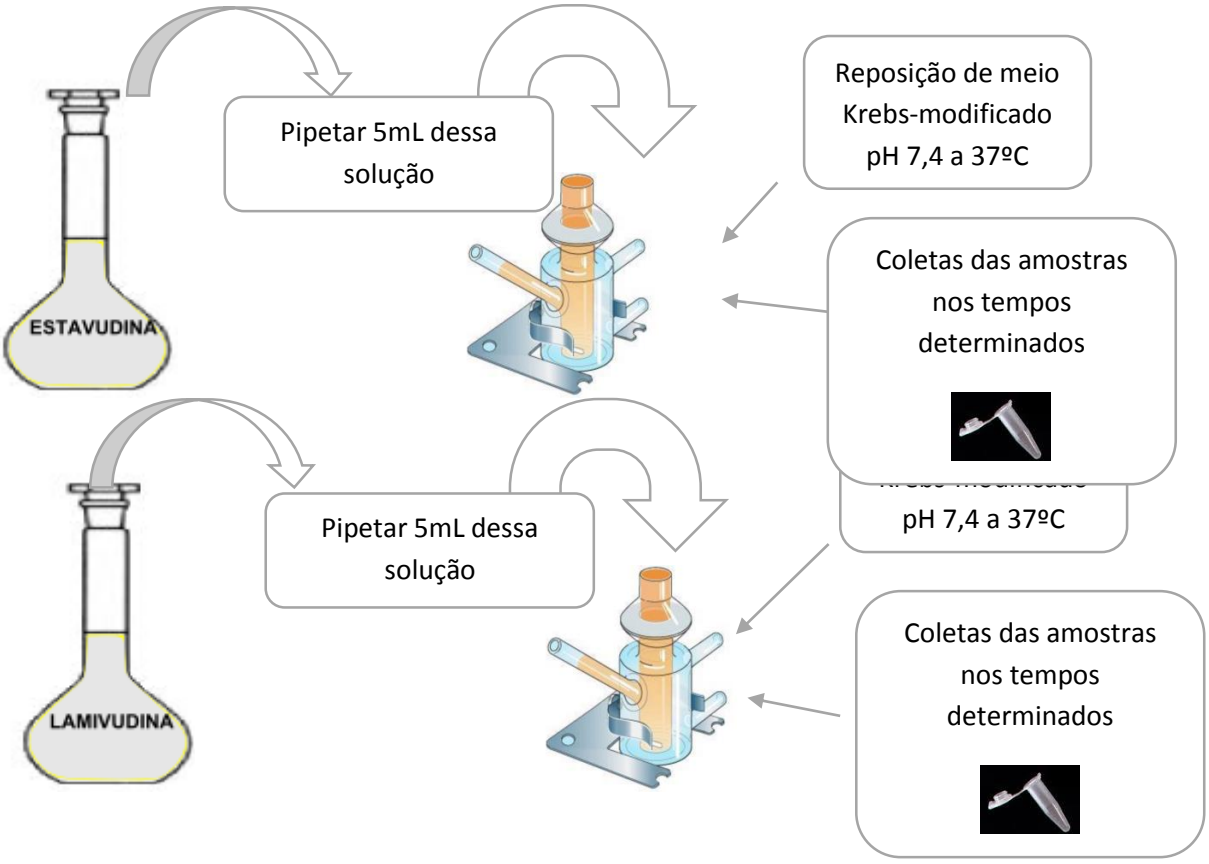


Figura 12- Resumo das etapas do estudo de permeabilidade dos antirretrovirais em segmento da mucosa bucal

A quantificação dos fármacos nas amostras foi realizada por meio do método cromatográfico, cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção em UV (lamivudina e estavudina) e em fluorescência (metoprolol e fluoresceína), previamente desenvolvido e validado conforme descrito no item 4.2.5.

Os dados de permeabilidade foram calculados a partir dos resultados obtidos nos experimentos em função do tempo de amostragem (concentração das substâncias determinadas nas amostras dos ensaios). Os principais parâmetros de permeação estão descritos abaixo. O perfil de permeação foi obtido em função do tempo da amostragem (BARRY, 1983; SHAH, 1993, TRAPANI *et al*., 2004; KOKATE, A; LI, X & JASTI, B, 2007).

a) Porcentagem acumulada de fármaco permeado através das membranas no período de 2 horas (*Qt*).

b) Constantes de absorção aparente de primeira ordem, expressas pelos coeficientes angulares das curvas (ka), calculados a partir dos perfis de fármaco permeado *versus* tempo.

c) Permeabilidade aparente (P), calculada pela seguinte **equação 1**:

$$Papp = \frac{\Delta Q}{\Delta t} \times \frac{1}{A} \times \frac{1}{c_o}$$

Onde ΔQ/Δt é o fluxo em mmol/ min ou a quantidade de fármaco permeado pela mucosa no tempo (t). *A* corresponde à área de exposição da membrana (de 1,77 cm^2) e C_0corresponde à concentração inicial do fármaco na solução colocado em contato com a mucosa bucal (câmara doadora).

4.3.4 Análise Estatística dos Resultados

Os resultados obtidos nos ensaios de permeabilidade bucal foram analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) seguida do Teste de Tukey. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando o índice de significância foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

4.3.5 Quantificação dos fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e dos marcadores de transporte paracelular (fluoresceína) e transcelular (metoprolol) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

4.3.5.1 Preparo das amostras

Após o descongelamento sob temperatura ambiente, as amostras obtidas a partir dos ensaios de permeabilidade foram preparadas da seguinte forma: (1) para determinação dos marcadores (fluoresceína e metoprolol): foi transferido um volume de 600 µL para um tubo de ensaio e para as amostras de metoprolol também foram adicionados 30µL de padrão interno (ciprofloxacino a 100 µg/mL). Posteriormente, foram secas sob corrente de nitrogênio, em banho maria a 40ºC. Após essa etapa foram ressupendidas com 150 µL de fase móvel selecionada para cada um dos marcadores; (2) para a quantificação da lamivudia (d4T) e da estavudina (3TC): as amostras de d4T e 3TC foram transferidas para um tubo de ensaio o volume de 600 µL e 100 µL de padrão interno (didanosina 100 µg/mL). Em seguidas foram secas sob corrente de nitrogênio em banho maria a 40ºC. Após essa etapa foram ressupendidas com 250 µL de fase móvel seleciona para esses fármacos (DEZANI, 2010, PEREIRA, 2012; DEZANI *et al*., 2013).

Após o preparo, todas as amostras foram submetidas a agitação em agitador tipo vórtex por 1min, transferidas para *vials*, e posteriormente analisadas por CLAE, conforme descrito no item 4.2.3.2

4.3.5.2 Condições Cromatográficas

As quantificações dos marcadores, paracelular e transcelular, (respectivamente, fluoresceína e metoprolol) e dos fármacos antirretrovirais (3TC e d4T), nas amostras provenientes dos ensaios de permeabilidade bucal, foram realizadas por meio CLAE. O Quadro 4 apresenta as condições cromatográficas empregadas nas análises.

A fase móvel foi preparada com tampão fosfato a 20 mM e acetonitrila na proporção descrita no Quadro 4. Em seguida, procedeu-se a filtração das soluções em membrana filtrante de acetato de celulose regenerada, com 47 mm de diâmetro e poro de 0,22 µm. Após este procedimento, cada fase móvel foi levada em banho ultrassônico por 30 minutos, para degaseificação ((DEZANI, 2010, PEREIRA, 2012; DEZANI *et al*., 2013).

Tabela 1- Condições cromatográficas empregadas para quantificação de fluoresceína, metoprolol, d4T e 3TC

Condições	Fluoresceína	Metoprolol	d4T	3TC
Detector	Fluorescência		UV	
Comprimento de onda (λ)	Ex*: 485nm Em**:515 nm	Ex*:225 nm Em**: 310 nm	270 nm	
Fase Móvel	Tampão fosfato 20 mM, acetonitrila e trietilamanina (60:40:0,5) pH 4,5	Tampão fosfato 20 mn, acetonitrila e trietilamina (84: 16: 1) pH 4,5	Tampão fosfato 20 mM, acetonitrila e metanol (94:5:1) pH 4,5	
Fase estacionária	C18 de 25 cm PhenomenexGemini ®		C 18 de 15 cm PhenomenexGemini ®	
Temperatura do forno	35ºC	50ºC	35ºC	
Fluxo	1,0 mL/min	1,0 mL/min	1,0 mL/min	

**comprimento de onda de excitação do fármaco*

*** comprimento de onda de emissão do fármaco*

4.3.5.3 Validação dos métodos analíticos

O método desenvolvido para a quantificação dos marcadores (fluoresceína e metoprolol) e dos fármacos antirretrovirais lamivudina (d4T) e estavudina (3TC) nas amostras provenientes do estudo de permeabilidade bucal foi realizado como descrito no item 4.2.3. Esses métodos foram validados conforme preconizado na RDC 899 de 2003, no ICH (2005) e na RDC de 27 de 2012, com relação a: linearidade, especificidade, seletividade, limite de detecção e limite de quantificação, precisão, exatidão e estabilidade (BRASIL, 2003; BRASIL, 2012; ICH, 2005).

a) Linearidade

Este parâmetro foi determinado por meio da construção das curvas analíticas com soluções em metanol e água purificada Mili- Q (80%: 20%, v/v), contendo padrão de: fluoresceína (teor 93,5%), metoprolol (teor 100,2 %), estavudina (teor 99,7%) e lamivudina (teor 101%), em diferentes concentrações, conforme descrito na **Tabela 2**. Para cada solução padrão, uma quantidade da respectiva substância, devidamente corrigida de acordo com o teor declarado, foi pesada analiticamente e transferida para balão volumétrico de 50 mL, solubilizando-a com a solução de metanol.

A faixa de concentração utilizada na validação do método cromatográfico compreendeu o intervalo de 10 $ng.mL^{-1}$ a 600 $ng.mL^{-1}$ para fluoresceína, de 10 $ng.mL^{-1}$ a 1500 $ng.mL^{-1}$ para o metoprolol e para os fármacos antirretrovirais, o intervalo foi de 10 $ng.mL^{-1}$a 2500 $ng.mL^{-1.}$ No entanto para o metoprolol foi utilizado como padrão interno o ciprofloxacino e para os antirretrovirais a didanosina como padrão interno (BRASL, 2003; ICH, 2005; BRASIL, 2012).

As concentrações definidas para a construção das curvas, para cada solução diluída, estão descritas na **Tabela 2**. As equações da reta foram obtidas por regressão linear, através do método dos mínimos quadrados (BRASIL, 2003; BRASIL, 2012).

Tabela 2: Concentrações das soluções contendo os padrões dos marcadores e dos fármacos antirretrovirais utilizadas para a obtenção das curvas analíticas e os respectivos padrões internos

Solução Padrão	Concentração ($ng.mL^{-1}$)	Padrão Interno
Fluoresceína	10,15,20,50, 100,150,300,600	--------
Metoprolol	10,20,50,150,300,750, 1500	Ciprofloxacino 100 µg/mL
Lamivudina	10,20,50,100,250,625,1250,2500	Didanosina 100 µg/mL
Estavudina	10,20,50,100,250,625,1250,2500	Didanosina 100 µg/mL

b) Seletividade

A especificidade foi verificada por meio da comparação dos cromatogramas obtidos a partir das análises das soluções-padrão e das amostras, contendo fluoresceína, metoprolol, lamivudina e estavudina, com os cromatogramas obtidos a partir da fase móvel e da matriz isenta de fármaco (solução de Ringer-Krebs-HEPES modificado presente no estudo de permeabilidade), mas com a presença de interferentes da membrana (BRASIL, 2012; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2014; BRASIL, 2003; ICH, 2005).

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

O LD foi determinado utilizando a concentração inferior ao limite de quantificação, não sendo necessário determinar a exatidão e precisão (BRASIL, 2003; BRASIL, 2012).

O LQ foi determinado utilizando concentrações decrescentes e conhecidas das substâncias do estudo, em seis repetições, até o menor ponto determinável com precisão e exatidão (BRASIL, 2003; BRASIL, 2012).

d) Precisão

O parâmetro de precisão foi determinado analisando-se três concentrações diferentes, controles de baixa concentração (CQB), de média concentração (CQM) e de alta concentração (CQA), conforme descrito na **Tabela 3,** em seis réplicas de cada concentração no mesmo dia (precisão intraensaio) e em dias consecutivos (precisão interensaios). Essas soluções foram preparadas a partir das diluições das soluções das curvas analíticas. Essas soluções foram preparadas de forma semelhante à descrita no item linearidade, uma vez CQB, CQM e CQA fazem parte da curva analítica. Esse parâmetro foi obtido pelo cálculo realizado segundo a **Equação 2.**

$$DPR\ \% = \frac{DP}{Cmédia} \times 10$$

Onde: DPR (%): desvio padrão relativo DP: desvio padrão Cmédia: concentração média determinada.

Tabela 3: Concentrações das soluções padrões dos marcadores e dos fármacos antirretrovirais utilizadas para determinar a precisão

Solução Padrão	Concentração ($ng.mL^{-1}$)		
	CQB	**CQM**	**CQA**
Fluoresceína	15	150	300
Metoprolol	20	300	750
Lamivudina	20	250	625
Estavudina	20	250	625

e) Exatidão

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

nove, no total) foi realizada utilizando três concentrações (CQA, CQB e CQM) diferentes para cada fármaco e foi calculada segundo a **Equação 3** (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2014; BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Equação 3:

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

Onde: Ca: quantidade dos marcadores e antirretrovirais determinada na solução amostra Cp: quantidade nominal dos padrões dos marcadores e antirretrovirais

f) Estabilidade

A estabilidade das substâncias em estudo, fluoresceína, metoprolol, lamivudina e estavudina, foi determinada em: (a) soluções padrão mantidas a -20°C utilizadas para a preparação diária das curvas analíticas; (b) amostras descongeladas e mantidas à temperatura ambiente durante 4 horas (estabilidade de curta duração) e, (c) amostras processadas e mantidas por 24 e 48 horas à temperatura ambiente. Esta análise foi realizada com emprego de soluções de controle de qualidade para cada uma das substâncias (CQB, CQM e CQA) em matriz de solução de Ringer-Krebs-Hepes modificado (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2014; BRASIL, 2003).

g) Estabilidade em ciclo de congelamento e descongelamento

A determinação da estabilidade em ciclo de congelamento e descongelamento baseou-se na utilização das soluções padrão mantidas a -20°C, as quais foram empregadas na preparação diária das curvas analíticas. As amostras foram descongeladas e mantidas à temperatura ambiente nas diferentes concentrações em matriz Ringer-Krebs-HEPES modificado e, então, foram relacionadas com a concentração detectada das mesmas concentrações quando recém preparadas (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2014; BRASIL, 2003).

5.1 Ensaio de Permeabilidade através de segmento bucal de suínos

5.1.1 Avaliação da viabilidade dos segmentos de mucosa bucal de suínos

Para o ensaio de permeabilidade bucal empregando o método ex-*vivo,* um parâmetro relevante é a viabilidade do tecido utilizado. Conforme descrito no item 4.2.2 (MÉTODOS), este parâmetro foi avaliado logo após a dermatomização da mucosa bucal (INICIAL), antes de iniciar o teste de permeabilidade (INTERMEDIÁRIO), ou seja, depois do transporte desse segmento da UNIFESP até LPB da FCF/ USP e, imediatamente após a finalização do estudo de permeabilidade (FINAL). A viabilidade dos segmentos de mucosa foi verificada por meio das medidas da resistência elétrica transepitelial (TEER) com o auxílio do equipamento Millicell®-ERS (DEZANI *et al*., 2013; Jones *et al.,* 2013).

Os dados de TEER ($\Omega.cm^2$) obtidos para os seguimentos da mucosa bucal utilizados no ensaio de permeabilidade do metoprolol (marcador de transporte transcelular), fluoresceína (marcador de transporte paracelular), estavudina e lamivudina estão descritos na **Tabela 4**.

Os fatores que influenciam a viabilidade tecidual são basicamente: composição do meio, temperatura e tempo.

Conforme descrito no item 4.2.3 (métodos), em relação ao meio foi utilizado como meio a solução de Ringer-Krebs-HEPES modificado, cuja composição foi: NaCl 115,5 mM; KCl 4,2 mM; $CaCl_2$ 2,5 mM; NaH_2PO_4 1,6 mM; $MgSO_4$ 0,8 mM; tampão HEPES 4 mM; Na_2CO_3 17.3 mM e Glicose 12, 2mM; pH 7,4 (IMBERT, D & CULLANDER, 1998; REED, FINNIN, 2004). Essa solução fornece nutrientes e sais para que as células do tecido possam manter-se vivas, mesmo após a eutanásia do suíno e separação da mucosa (tecido de

interesse desse estudo). Além disso, esta solução foi preparada no pH 7,4, que é o mesmo pH da cavidade bucal.

Em relação à temperatura, destaca-se que a temperatura de transporte foi de 4ºC, pois é nessa temperatura que ocorre a diminuição das atividades enzimáticas e das reações que acarretam na degradação e perda de viabilidade celular. Uma enzima responsável por esse processo, relatada na literatura, é NADH Tetrazólio Redutase, que apresenta atividade reduzida na temperatura de 4ºC, e isto mantém a mucosa bucal com características muito próximas das observadas no tecido *in vivo* (IMBERT, D & CULLANDER, 1998; PATEL, V. F; LUI, F; BROWMN, M, 2011). Por outro lado, a temperatura utilizada no ensaio de permeabilidade foi de 37ºC ± 1ºC, que é a temperatura fisiológica. Assim, logo após o preparo do segmento bucal na câmera de difusão vertical, manteve-se um período de 20 minutos (tempo de equilíbrio) para que o segmento atingisse a temperatura de 37ºC, com o objetivo de permitir as condições fisiológicas semelhantes àquelas observadas *in vivo.*

Outro fator importante é o tempo, pois o tecido tem um tempo limite de viabilidade após a sua remoção do animal, mesmo quando são mantidas condições muito próximas àquelas observadas *in vivo*. Portanto todo esse processo foi realizado o mais rápido possível para que esse parâmetro se mantivesse durante todo o ensaio.

Tendo como base os resultados apresentados na Tabela 4, pode-se notar que ocorreu uma diminuição do TEER quando são comparados os valores médios dos períodos, INICIAL, INTERMEDIÁRIO e FINAL. Essa redução pode estar relacionada com o tempo, uma vez que o intervalo de tempo entre a aferição do TEER inicial e intermediário foi por volta de 3h e do intermediário e final foi de 3 h e 40 min. Considerando o período inicial e final, observa-se que houve uma redução de no máximo 21%, para o metoprolol, de 20 % para a fluoresceína e para estavudina e de 11% para lamivudina na viabilidade do tecido da mucosa bucal de suínos. Jones e colaboradores (2013) descreveram redução de 24% para a mucosa bucal, logo essa pequena variação encontrada no presente trabalho comprova que o segmento da mucosa utilizado no estudo de permeabilidade mantivera sua viabilidade. Corroborando com este resultado encontrado no presente estudo, em estudos realizados por Kowapradit e colaboradores (KOWAPRADIT *et al*., 2010)

verificou a TEER no início do estudo (144 ± 12 / cm²) e após 6h (109 ± 21 / cm²), e a redução entre as duas medições foi de 24%. Conforme resultados descritos na Tabela 4, observa-se que em todos os casos, os valores encontram-se dentro do intervalo descrito na literatura, de 136 ± 17 a 950 ± 392/cm^2 (HOLM *et al*.,2013; NIELSEN, RASSING, 2002). Somando-se a isto, as diferenças observadas, em relação ao TEER INICIAL e

TEER FINAL, não ultrapassaram 21%, valor que ficou abaixo do descrito nos estudos relatados na literatura (24%) (HOLM *et al*., 2013).

Tabela 4. Valores médios de TEER (desvio ou erro padrão) referentes aos ensaios de permeabilidade para os marcadores de transporte transcelular (metoprolol), paracelular (fluoresceína) e para os fármacos antirretrovirais (lamivudina e estavudina)

	TEER INICIAL	**TEER INTERMEDIÁRIO**	**TEER FINAL**
Metoprolol	399,66 ± 44,00	354,83 ± 43,00	318,83 ± 35,00
Fluoresceína	402,33 ± 39,00	362,16 ± 41,00	321,83 ± 32,00
Estavudina	401,83 ± 16,00	359 ± 22,00	323,33 ± 69,00
Lamivudina	427,83 ± 25,00	399,16 ± 12,00	382,66 ± 25,00

Não há muitos relatos na literatura sobre dados de TEER em mucosa bucal utilizada em ensaios *ex-vivo*. NIELSEN e RASSING (1999) descreveram valores de TEER de 843 ± 278 Ω.cm^{2,} para segmentos de mucosa bucal empregados em estudos *ex vivo*. Este valor foi bastante diferente dos observados no presente trabalho (**Tabela 4**). Tais diferenças podem ser atribuídas à: espessura do segmento da mucosa bucal empregado, que no presente trabalho foi de 750 µm e, os referidos autores empregaram segmentos de 500 µm; ou à área do segmento utilizado, neste trabalho foi de 1,77 cm² e no trabalho citado foi de 0,50 cm² ou ainda em relação à composição do meio, uma vez que os autores empregaram como meio, solução composta por Glicose-Ringer, diferente do presente trabalho, que foi utilizado como meio, solução de Ringer-Krebs-HEPES modificado (conforme descrito no item 4.2.3 métodos). Segundo estudos de Imbert e Cullender (1998), que avaliaram a manutenção da viabilidade de segmentos da mucosa bucal em diferentes meios, o meio mais apropriado, que permitiu maior viabilidade, foi o Ringer-Krebs-HEPES. Este meio mostrou resposta melhor do que o meio Ringer, acrescido de glicose e que o meio Ringer-Krebs (IMBERT, CULLENDER, 1998). Neste trabalho eles utilizaram a técnica colorimétrica com tetrazólio (MTT) para verificação da viabilidade do segmento da mucosa bucal de suínos nos diferentes meios. Segundo estes autores, o tecido se manteve viável por 10 horas.

5.1.2 Avaliação da permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio de modelo *ex vivo* com emprego de segmentos da mucosa bucal de suínos

O estudo da permeabilidade dos fármacos lamivudina e estavudina, e dos marcadores de transporte paracelular (fluoresceína) e transcelular (metoprolol) foi conduzido conforme descrito no item 4.2.3.

As **Tabelas 5 e 6** apresentam os valores médios das quantidades permeadas dos fármacos antirretrovirais (lamivudina e estavudina) e dos marcadores (fluoresceína e metoprolol) utilizados nesse estudo. A **Figura 13** representa por meio de gráficos os dados de permeabilidade. Já a **Tabela 7** apresenta os parâmetros relativos à regressão linear das curvas obtidas, pela

relação da quantidade permeada dos fármacos e dos marcadores empregados no estudo (µg) *versus* tempo (minutos), conforme descrito no item 4.2.1.3.

Os valores apresentados nas **Tabelas 5 e 6**, e representados graficamente na Figura **14,** indicam a crescente permeação dos fármacos e dos marcadores. Tal observação demonstra que não ocorreu a saturação da membrana e do meio da câmara receptora, durante o ensaio de permeabilidade. Os resultados dos valores dos coeficientes de correlação (R^2) obtidos, em todos os casos, indicam que o fluxo de permeação foi constante, sinalizando a viabilidade dos segmentos empregados (Tabela 7).

Tabela 5- Valores médios da quantidade permeada (P) do metoprolol e da fluoresceína, expressa em µg. mL^{-1} em função do tempo de coleta (T). Esses valores refletem a média de seis determinações

T (Min)	P Metoprolol µg. mL^{-1}	DP	DPR%	P Fluoresceína µg. mL^{-1}	DP	DPR %
30	0,212	0,208	97,910	8,062	0,697	8,643
45	0,656	0,344	52,455	9,652	0,285	2,948
60	1,462	0,743	50,840	10,766	0,668	6,202
75	2,357	1,053	44,688	12,097	1,401	11,585
90	3,520	1,056	30,016	13,116	1,828	13,936
105	4,041	1,109	27,462	14,303	2,641	18,468
120	4,812	1,041	21,631	15,558	3,383	21,745

Os valores representam a média de 6 determinações, conforme descrito no item 4.2.3.

Tabela 6- Valores médios da quantidade permeada (P) de Estavudina e Lamivudina, expressa em µg. mL^{-1} em função do tempo de coleta (T). Esses valores refletem a média de seis determinações

T (Min)	P Estavudina µg. mL^{-1}	DP	DPR%	P Lamivudina µg. mL-1	DP	DPR%
30	0,352	0,386	109,684	7,092	5,137	72,443
45	0,546	0,216	39,503	9,522	7,993	83,940
60	0,626	0,519	82,908	11,709	7,158	61,132
75	0,875	0,521	59,498	13,234	7,738	58,474
90	0,844	0,588	69,580	15,853	8,469	53,426
105	0,990	0,602	60,773	17,639	8,927	50,612
120	1,126	0,664	58,980	19,794	9,896	49,995

Os valores representam a média de 6 determinações, conforme descrito no item 4.2.3.

Tabela 7 – Parâmetros relativos à regressão linear das curvas obtidas a partir da relação da quantidade permeada (µg) dos fármacos antirretrovirais, lamivudina e estavudina, e dos marcadores, metoprolol e fluoresceína, em função do tempo (minutos)

Parâmetro	Valor			
	Metoprolol	**Fluoresceína**	**Estavudina**	**Lamivudina**
Coeficiente angular (a)	0,053	0,014	0,008	0,139
Coeficiente linear (b)	1,603	5,839	0,1533	105
Coeficiente de correlação (r^2)	0,9903	0,9974	0,9603	0,9978

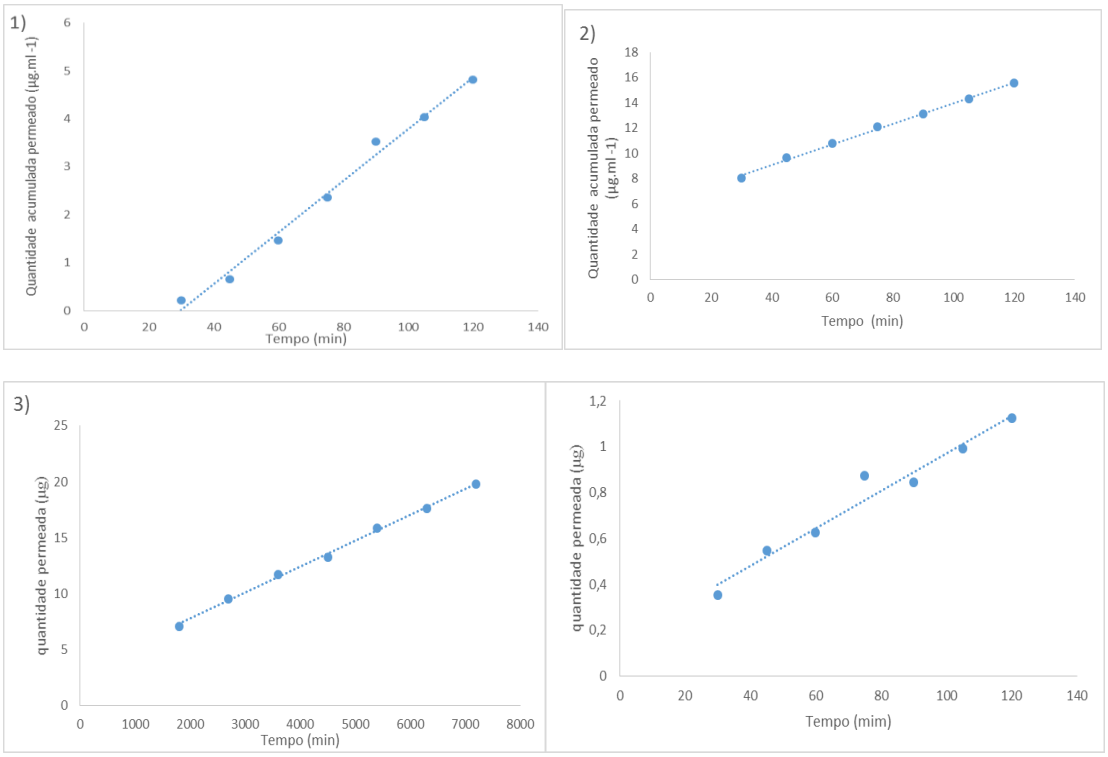


Figura 13 - Curvas obtidas a partir dos valores médios das quantidades permeadas de metoprolol (1), fluoresceína (2), Lamivudina (3) e Estavudina (4), em função do tempo (minutos).

Conforme relatado anteriormente, os mecanismos envolvidos no transporte de fármacos através da mucosa bucal, descritos na literatura, são: difusão passiva transcelular, difusão passiva paracelular e transporte ativo mediado por carreadores. A difusão passiva transcelular é o principal mecanismo de permeação responsável pelo transporte da maioria dos fármacos. Este processo depende das características da molécula do fármaco como, por exemplo, Log P e pKa (NICOLAZZO, FINNIN, 2005). A difusão passiva paracelular ocorre através dos espaços intercelulares das células da mucosa bucal, que possuem lipídeos mais polares (mucosa não queratinizada) ou lipídeos apolares (mucosa queratinizada).

Assim, com a finalidade de caracterizar o tipo de transporte pelo qual os fármacos permeiam a mucosa bucal, alguns estudos têm empregado substâncias marcadoras para caracterizar o transporte passivo paracelular e transcelular (HOLM et al., 2013). Dentre os marcadores de transporte

paracelular, têm sido empregados, a cafeína (NIELSEN, RASSING, 1999) e fluoresceína complexada com dextranas, de diferentes pesos moleculares (HOOGSTRAATE *et al*., 1996; SENEL *et al*., 1996). Como marcadores de transporte transcelular, têm sido empregados, o estradiol (JACOBSEN *et al*., 1995) e metoprolol (HOLM et al., 2013).

No presente trabalho foram selecionados para marcadores de transporte transcelular, o metoprolol, e para transporte paracelular, a fluoresceína sódica. A escolha destes marcadores foi fundamentada na literatura e teve por finalidade indicar, ou sugerir, as vias pelas quais os fármacos do estudo permeiam através da mucosa bucal (NIELSEN, RASSING, 1999; NIELSEN et al.,1999; NIELSEN, RASSING, 2000b; NIELSEN, RASSING, 2002a; NICOLAZZO, J. A; REED, 2003; ZAMBITO et al., 2006).

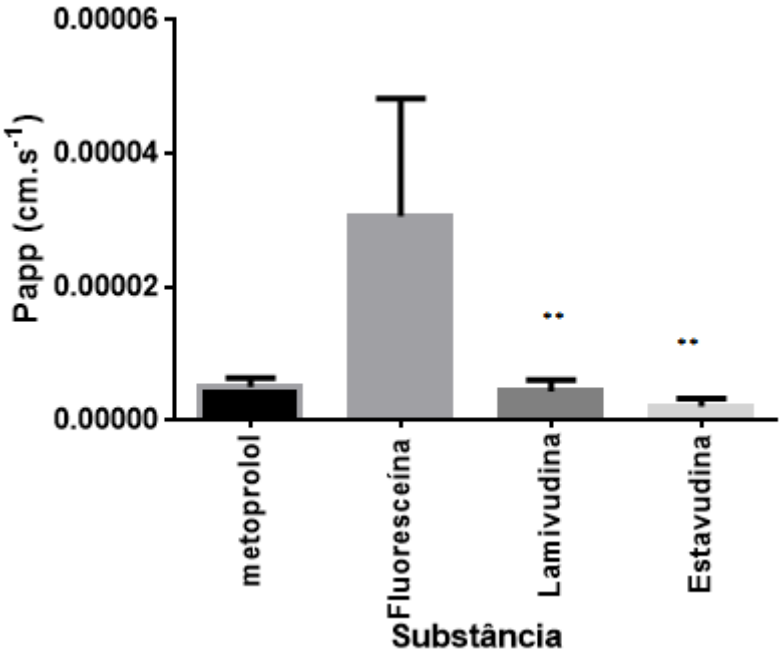
A partir das quantidades permeadas foram obtidos os valores de coeficiente de permeabilidade aparente (Papp) nos segmentos da mucosa bucal de suínos, conforme descrito no item 4.2.1.3. O coeficiente de permeabilidade aparente (Papp) representa a velocidade de difusão do fármaco através da membrana, em função da área da membrana, da área de superfície da mesma, e da concentração do fármaco na solução doadora (BARRY, 1983; SHAH, 1993, TRAPANI *et al*., 2004; KOKATE, A; LI, X & JASTI, B, 2007).

A **Tabela 8** apresenta os valores de Papp para os fármacos antirretrovirais (lamivudina e estavudina) e para os marcadores de transporte transcelular (metoprolol) e de transporte paracelular (fluoresceína). A Figura **16** apresenta uma representação gráfica destes valores. A **Tabela 9** demonstra os valores de p e F obtidos pela comparação estatísticas dos resultados.

Os resultados de Papp (**Tabela 8)** indicam que o metoprolol, lamivudina e estavudina apresentaram valores significativamente inferiores ao observado para a fluoresceína sódica ($p < 0,05$; **Tabela 9**). Os valores das médias de permeabilidade do metoprolol e da lamivudina, apesar de próximos, foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$; **Tabela 9**), assim como na comparação com os resultados para a estavudina ($p < 0,05$; **Tabela 9**).

Tabela 8- Valores médios de permeabilidade (Papp) obtidos a partir dos resultados dos ensaios de permeabilidade com os fármacos antirretrovirais, lamivudina e estavudina, e com os marcadores de transporte transcelular (metoprolol) e paracelular (fluoresceína). Os valores representam a média de seis determinações.

Fármaco	Papp ($x\ 10^{-6}$ cm/s)	Desvio Padrão ($x10^{-6}$)
Metoprolol	5,073	0,5517
Fluoresceína	30,61	0,07184
Estavudina	2,141	0,4847
Lamivudina	4,370	0,7110



*p= 0,001 em relação ao metoprolol

** p=0,000 em relação à fluoresceína

Figura 14. Representação gráfica dos resultados de Papp para os fármacos, lamivudina, estavudina e para os marcadores, metoprolol e fluoresceína, obtidos por meio de modelo *ex-vivo* em segmento bucal de suínos. Os resultados apresentam a média de seis determinações para essas mesmas substâncias. As barras de erros representam os desvios padrão para cada uma das substâncias. O asterisco representa os índices de significâncias; * $p< 0,05$ em relação ao metorpolol e ** $p < 0,05$ em relação à fluoresceína.

Tabela 9- Demostram os dados estatístico obtido pelo Mini Tab ®

Substância	**Fluoresceína**		**Metoprolol**		**Lamivudina**		**Estavudina**	
	P	F	P	F	P	F	P	F
Fluoresceína	---	---	**0,000**	1015,56	**0,000**	148,67	**0,000**	436,78
Metoprolol	**0,000**	1015,56	-------	---------	**0,000**	25,75	**0,001**	51,50
Lamivudina	**0,000**	148,67	**0,001**	25,75	**--------**	-------	**0,017**	**0,000**
Estavudina	**0,000**	436,78	**0,001**	51,50	**0,017**	**0,000**	---------	-------

A **Tabela 10** tem por objetivo apresentar de forma comparativa os valores de Papp obtidos no presente trabalho para os marcadores (metoprolol e fluoresceína), conforme condições experimentais descritas no item 4.2.3, e os dados relatados na literatura para as mesmas substâncias. Em relação aos fármacos do estudo (lamivudina e estavudina), destaca-se que não há relatos na literatura referente à permeabilidade destes em mucosa bucal. Com relação ao marcador de transporte transcelular avaliado nesse trabalho, destaca-se que há poucos dados. Por outro lado, a literatura é escassa em relação a dados de permeabilidade referentes à fluoresceína sódica na mucosa bucal. Por outro lado, existem vários trabalhos que descrevem a permeabilidade da fluoresceína, não na forma iônica e sim na forma complexada à dextranas, de diferentes pesos moleculares (NIELSEN et al, 2000). Esta substância tem sido empregada como marcador paracelular para estudos em mucosa nasal, vaginal e também para segmentos intestinais (NIELSEN *el. al*, 1999).

De acordo com os resultados apresentados na **Tabela 10**, a Papp do metoprolol obtida no presente estudo foi de 5,073 x 10^{-6} cm.s^{-1}. Este valor é diferente do descrito (0,0005 x 10^{2} cm/h) por Amores e colaboradores (2014), que empregaram segmentos de mucosa bucal de suíno em câmara de difusão do tipo células e *Franz,* semelhante ao presente estudo, entretanto, as condições diferiram em relação a: meio (Glicose-Ringer); área do segmento (1,1cm^2), sendo que no presente estudo foi de 1,77 cm^2; e concentração do fármaco na câmera doadora, que foi de 32131µg.mL^{-1} e no presente estudo foi 100 µg. mL^{-1}. Por outro lado, o valor de permeabilidade do metoprolol, obtido

por HOLM e colaboradores (2013), com o emprego do método *ex-vivo em* câmera de *Ussing*, foi de 8x 10^{-6} cm.s^{-1}. Este dado também difere do que Nielsen e colabores (2000) descrevem (165 x 10^{-6} cm.s^{-1}). Ressalta-se que neste último foram empregadas as seguintes condições: meio Ringer; área de 0,5 cm² (NIELSEN *et al*., 2000)

Amores e colaboradores (2014) determinaram ainda a permeabilidade para o metoprolol com emprego do método de cultivo celular de TR146. Segundo os autores, os valores foram distintos (8x 10^{-6} cm.s^{-1}) daqueles encontrados quando se utilizou o segmento de mucosa de suínos em câmara de *Ussing (*AMORES *et al.,* 2014*)* (**Tabela 10**). Tal diferença pode ser atribuída em função da menor quantidade de barreiras à permeabilidade que as células cultivadas apresentam (NIELSEN et al, 2000; NIELSEN et.al. 1999; HOLM et al, 2013).

Com relação à fluoresceína sódica, utilizada no presente trabalho como marcador de transporte paracelular, conforme descrito no item 4.2.1.3, observa-se que os valores de permeabilidade obtidos foram significativamente superiores aos observados para o metoprolol ($p < 0,05$; Tabela 9). Isso pode ter ocorrido devido o mecanismo de permeabilidade via paracelular, uma vez que a mucosa bucal apresenta modificações nos espaços intercelulares favorecendo desta forma a permeação de moléculas pequenas e iônicas, caso da fluoresceína sódica (SUDHAKAR et al., 2006). Outro aspecto relacionado à mucosa bucal que favorece a permeabilidade pela via paracelular é que a estrutura formadora destas junções intercelulares, no caso da mucosa bucal, é mais frouxa do que as junções oclusivas dos enterócitos, células do trato gastrointestinal. A esta característica tem sido atribuída maior permeabilidade para algumas substâncias, o que tem justificado a administração de grandes moléculas, como insulina e derivados de proteínas, por esta via (SOJAEI, 1998; SUDHAKAR et al., 2006). O valor de permeabilidade da fluoresceína, observado no presente trabalho (30,61 x 10-6 cm/s) diferiu daquele descritos por Zambito e colaboradores (ZAMBITO et al., 2006) que foi de 5,96 x 10^{-8} cm/s (**Tabela 10**). Atribui-se a esta diferença, aas distintas condições experimentais empregadas pelos pesquisadores (tampão fosfato pH 7,4, área de 1,13 cm² e 60 rpm.).

Estudos de permeabilidade de fluoresceína complexada à dextranas, de vários pesos moleculares, têm sido realizados com a finalidade de caracterizar a permeabilidade de substâncias hidrofílicas macromoleculares (NIELSEN *et al*, 2000). Neste sentido, NIELSEN e colaboradores (1999) determinaram a permeabilidade da fluoresceína, complexada com dextranas de diferentes pesos moleculares (FD4 - 4400, FD10 - 12000, FD20 - 19600 e FD40 - 38900), e concluíram, em função dos resultados, que a permeabilidade diminui linearmente em função do aumento do peso molecular (NIELSEN *el. al*, 1999). A fluoresceína empregada no presente estudo foi a fluoresceína sódica, molécula pequena, com peso molecular de 332.306 g/mol, e em solução, encontra-se na forma ionizada, o que favorece sua permeação através da via paracelular, pelos espaços intercelulares da mucosa bucal (ZAMBITO et al., 2006; KOLJONEN et al., 2006, DEZANI et al.,2013).

Tabela 10 – Resultados de Papp obtidos por meio do modelo *ex-vivo* e os dados descritos na literatura paras as substâncias do presente estudo

Método		Substância	Papp
Ex–vivo	Dados obtidos no presente trabalho Papp ($x10^{-6}$) cm/s	metoprolol	5,073
		Metoprolol	165 $x10^{-6}$ $cm.s^{-1}$ (2)
	Câmera vertical do tipo células de Franz	Metoprolol	0,00-805 x 10^{2} cm/h (3)
		Fluoresceína Sódica	5,96 x 10^{-8} cm· s^{-1}
In vitro	TR146 – cultivo celular	Metoprolol	8x 10-6 $cm.s^{-1}$
		Metoprolol	1,09 x 10-5cm.s-1 (1)
		Fluoresceína (FD4)	19,0 X10^{-8} $cm.s^{-1}$ (4)
		Fluoresceína (FD 10)	11,0 x 10^{-8} cm.s-1 (4)
		Fluoresceína (FD 20)	5,0 ×10^{-8} cm.s-1 (4)
		Fluoresceína (FD 40)	0,65 x 10^{-8} $cm.s^{-1}$ (4)

(1) HOLM et al., 2012; (3) AMORES et al., 2014; (2) Nielsen et al, 2000; (4) NIELSEN et.al. 1999.

Com relação aos fármacos antirretrovirais avaliados neste trabalho, lamivudina e estavudina, destaca-se que não há relatos sobre estudos de permeabilidade bucal. Alguns trabalhos têm descrito estudos de permeabilidade destes fármacos, porém em mucosa intestinal (DEZANI, 2010, PEREIRA, 2012). O resultado descrito em estudos *ex vivo*, com segmentos de intestino de rato, foi de 48,00 X 10--^{5} cm.s^{-1} para a lamivudina. Para a estavudina não há relatos na literatura da permeabilidade determinada por método *ex vivo* (DEZANI et al 2013).

Os resultados de Papp apresentados na **Tabela 8** indicaram que o metoprolol, a lamivudina e a estavudina apresentaram valores significativamente inferiores aos da fluoresceína (**Tabela 9**). Os resultados podem sugerir que tanto a lamivudina, quanto a estavudina, não demonstraram seguir o comportamento da fluoresceína sódica. De acordo com os resultados observa-se que o comportamento de ambos fármacos antirretrovirais se assemelhou mais ao metoprolol, do que à fluoresceína sódica. Conforme relatos da literatura, tanto a lamivudina, quanto a estavudina, apresentam como principal mecanismo de permeabilidade, nas células intestinais, o transporte passivo transcelular (DEZANI *et al*., 2010; PEREIRA, 2012)

Estudos de Waclawski e Sinko (1996) avaliaram a permeabilidade da estavudina em segmentos intestinais por meio de método *in situ* e descrevem que a estavudina apresenta permeabilidade concentração-dependente em concentrações variadas, ou seja, quando a concentração do fármaco aumenta, a permeabilidade também aumenta (WACLAWSKI, SINKO, 1996). Em estudo realizado com membranas de intestino de ratos (*brush-border membrane vesicles*), Waclawsky e Sinko observaram que os mecanismos de permeação da estavudina estão relacionados à participação de carreadores e aos processos passivos (WACLAWSKI; SINKO, 1996).

Dados referentes à permeabilidade da lamivudina são escassos na literatura, porém estudos têm indicado que a sua absorção no intestino é mais complexa, podendo ter a participação de mecanismos envolvendo transporte passivo transcelular e outros mecanismos como transporte ativo (DEZANI et al., 2013; REIS et al., 2013; QUEVEDO et al., 2013). Souza e colaboradores estudaram a permeabilidade da lamivudina em células Caco-2 e MDCK-MDR1. A P_{app} em Caco-2 foi de 0,10 x 10^{-5} cm.s^{-1}, enquanto que em células MDCK-

MDR1 o resultado obtido foi de 0,01 x 10^{-5} cm.s^{-1} (SOUZA et al., 2009). Em ensaios de permeabilidade utilizando o modelo *ex vivo* com o emprego de tecido intestinal isolado em câmaras de difusão vertical (*Franz* Cells), a lamivudina apresentou P_{app} igual a 48,00 x 10^{-5} cm.s^{-1} (DEZANI, 2010; DEZANI et al., 2013).

Diante do exposto e conforme resultados apresentados, pode-se sugerir que os fármacos antirretrovirais, lamivudina e estavudina, permeiam a mucosa bucal pelo mecanismo transcelular, uma vez que os resultados obtidos para ambos foram mais próximos ao do metoprolol (marcador trancelular). O que pode indicar que esses fármacos apresentam mecanismo transcelualr pela mucosa bucal.

5.2 Desenvolvimento e validação do método cromatográfico para a quantificação dos fármacos nos estudos de permeabilidade por meio do modelo ex vivo (células de Franz).

Os métodos cromatográficos desenvolvidos demonstraram-se adequados para a quantificação da fluoresceína (marcador de transporte paracelular), do metoprolol (marcador de transporte transcelular) e dos antirretrovirais (lamivudina e estavudina) nas amostras provenientes dos ensaios de permeabilidade por meio do modelo *ex vivo*. Sendo assim, os procedimentos de validação dos métodos seguiram os parâmetros descritos anteriormente no item 4.2.4, atendendo às especificações, conforme apresentado a seguir.

Os métodos desenvolvidos demonstraram-se específicos para a análise das substâncias em estudo, fluoresceína, metoprolol, lamivudina e estavudina, uma vez que todas as substâncias do estudo apresentaram boa separação dos componentes da matriz e com os seguintes tempos de retenção (em minutos), respectivamente: 10,7 ;14,02;4,67 e 6,87. Os cromatogramas obtidos em relação ao branco (amostra isenta das substâncias do estudo) e após a adição dos marcadores e dos fármacos antirretrovirais não revelaram nenhum sinal

relevante nos tempos de retenção de interesse (conforme demonstrado na **Figura 15**).

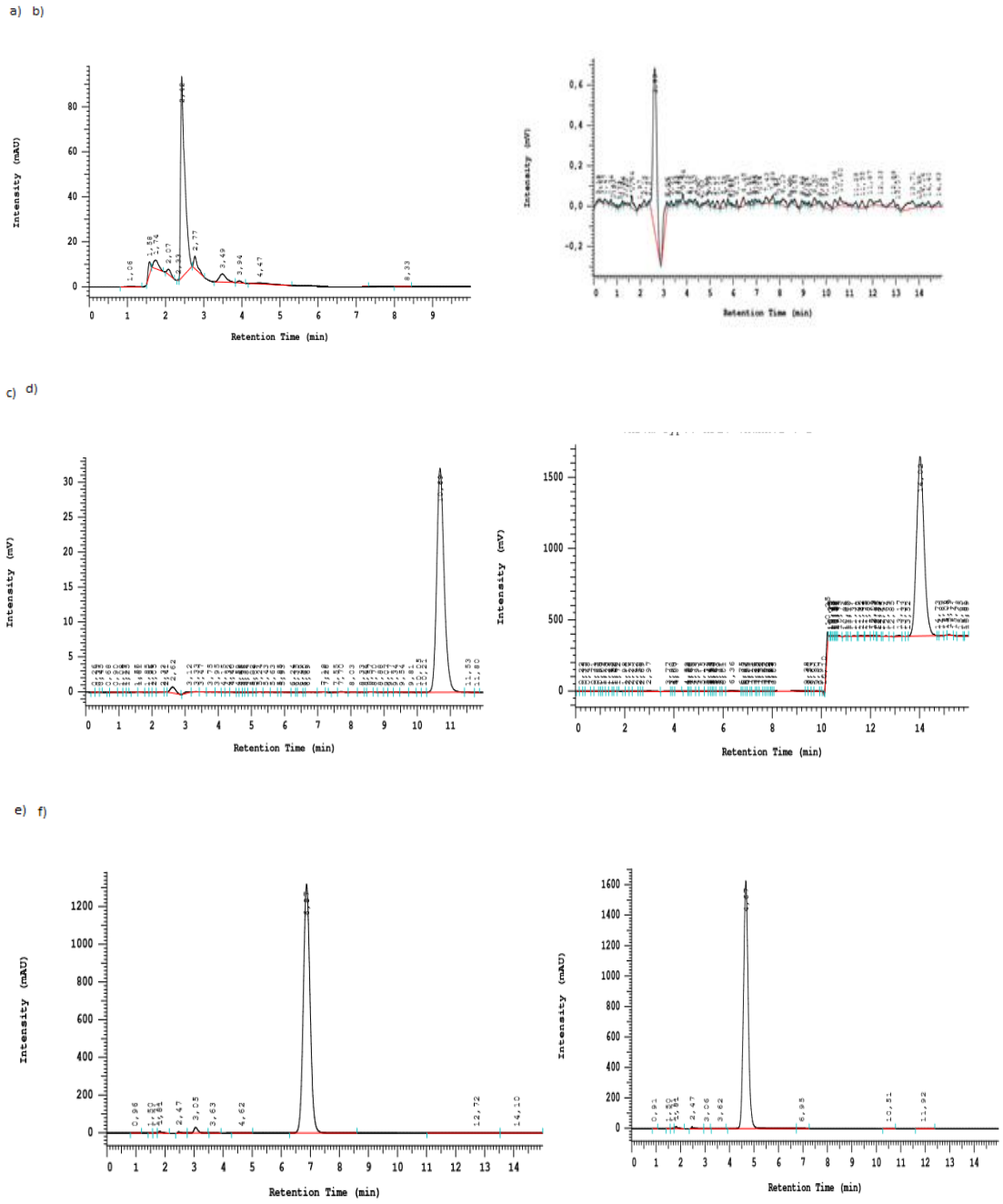


Figura 15 - (a) Cromatogramas obtidos das amostras: (a) solução de Ringer-Krebs-HEPES modificado presente no estudo depermeabilidade com a presença de interferentes da membrana, (b) fase móvel, (c) solução padrão de fluoresceína 300 ng/ mL, d) solução padrão de metoprolol 750 ng/ mL, e) solução padrão de 6000 ng/ mL de estavudina e (f) solução padrão de 6000 ng/ mL de Lamivudina. Esses cromatogramas obtidos por detecção UV.

A **Tabela 11** apresenta os valores de limite de quantificação para as substâncias do estudo (fluoresceína; metoprolol, lamivudina e estavudina). Os resultados obtidos com relação à precisão e exatidão para os limites de quantificação (10 $ng.mL^{-1}$) para todas as substâncias indicam que o método está de acordo para o propósito indicado, uma vez que permitirá a análise de concentrações superiores a 10 $ng.mL^{-1}$, com precisão e exatidão (BRASIL, 2003; ICH, 2005; BRASIL, 2012)**.**

Tabela 11- Valores experimentais obtidos na avaliação do limite de quantificação em meio de Ringer-Krebs-HEPES modificado. Os resultados expressam a média das amostras analisadas em seis réplicas

Substância	Limite de quantificação	Precisão (%)	Exatidão (%)
Fluoresceína	10 $ng.mL^{-1}$	8,40	90,83
Metoprolol	10 $ng.mL^{-1}$	1,16	113,62
Lamivudina	10 $ng.mL^{-1}$	8,93	115,14
Estavudina	10 $ng.mL^{-1}$	5,03	115,20

O método cromatográfico mostrou-se linear na faixa de 10 a 600 ng.mL-1 para a quantificação da fluoresceína, de 10 ng.mL-1 a 1500 ng.mL-1 para o metoprolol e de 10 ng.mL-1 a 2500 ng.mL-1 para lamivudina e estavudina. A **Figura 16** apresenta as curvas analíticas dos e os parâmetros obtidos por regressão linear, a partir desta curva, estão apresentados na **Tabela 12.**

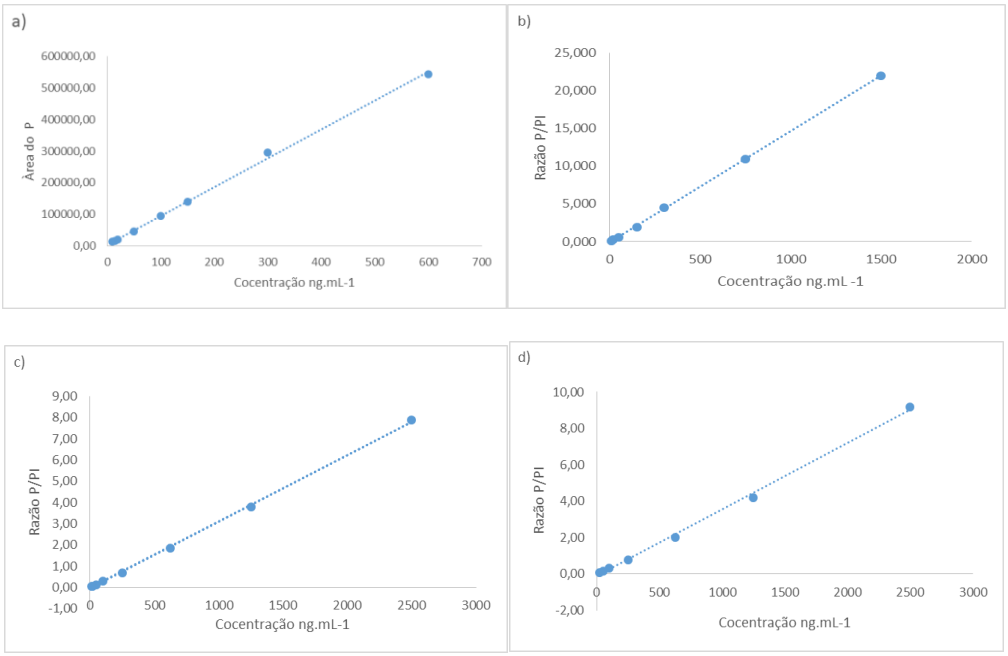


Figura 16- Curva analítica da fluoresceína (a), do Metoprolol (b), da Estavudina (c) e da Lamivudina (d) em meio Ringer-Krebs-HEPES modificado. Em cromatografia líquida conforme condição descrita no item

Tabela 12-Resultados obtidos por meio da regressão linear a partir da curva analítica obtida pela análise das soluções contendo fluoresceína e metoprolol em meio Ringer-Krebs-HEPES modificado. Os resultados expressam a média de amostras analisadas em seis réplicas

Parâmetro	Fluoresceína	Metoprolol	Lamivudina	Estavudina
Coeficiente angular (a)	925,4667	0,0147	0,003655	0,003146
Coeficiente Linear (b)	15022,4942	0,1038	0,12526	0,049402206
Coeficiente de correlação (r^2)	0,9983	0,9998	0,9978	0,9995

5.2.1 Precisão e Exatidão

Os valores que indicam precisão e exatidão (intraensaios e interensaios) referentes ao método cromatográfico para a quantificação de fluoresceínametoprolol, lamivudina e estavudina estão apresentadas nas **Tabelas 13 a 14**. Os resultados obtidos em relação à precisão (desvio máximo de 10% e 15%) estão de acordo com o preconizado pela literatura (BRASIL, 2003; ICH, 2005; BRASIL, 2012). Portanto, o método apresentou-se preciso e exato para as determinações das substâncias do estudo de permeabilidade segundo estabelecido pela RE N°899/2003 e RDC N°27/2012 (BRASIL, 2003; BRASIL, 2012).

Tabela 13- Resultados referentes à precisão e à exatidão (intraensaio e interensaio) do método analítico para a quantificação da Fluoresceína por cromatografia líquida de alta eficiência

Concentração	Precisão (%)		Exatidão (%)	
	intersaio	**Intraensaios**	**Interensaios**	**Intraensaios**
15 ng.mL-1	4,51	8,10	99,83	99,63
150 ng.mL-1	2,54	5,90	93,25	92,89
300 ng.mL-1	2,13	5,78	107,83	102,84

Tabela 14- Resultados referentes à precisão e à exatidão (intraensaio e interensaio) do método analítico para a quantificação do metoprolol por cromatografia líquida de alta eficiência

Concentração	Precisão (%)		Exatidão (%)	
	intersaio	**Intraensaios**	**Interensaios**	**Intraensaios**
20 ng.mL-1	3,60	15,11	108,59	107,85
300 ng.mL-1	3,59	6,45	100,78	101,73
750 ng.mL-1	2,53	5,18	99,13	99,01

Tabela 15- Resultados referentes à precisão e à exatidão (intraensaio e interensaio) do método analítico para a quantificação da lamivudina por cromatografia líquida de alta eficiência

	Precisão (%)		Exatidão (%)	
Concentração	**intersaio**	**Intraensaios**	**Interensaios**	**Intraensaios**
20 ng.mL-1	5,45	5,39	114,65	114,55
250 ng.mL-1	6,37	4,22	103,22	93,74
625 ng.mL-1	4,49	2,74	97,42	97,66

Tabela 16- Resultados referentes à precisão e à exatidão (intraensaio e interensaio) do método analítico para a quantificação da Estavudina por cromatografia líquida de alta eficiência

Concentração	Precisão (%)		Exatidão (%)	
	intersaio	**Intraensaios**	**Interensaios**	**Intraensaios**
20 ng.mL-1	5,45	5,39	114,65	114,55
250 ng.mL-1	6,37	4,22	103,22	93,74
625 ng.mL-1	4,49	2,74	97,42	97,66

5.2.2 Estabilidade

Para realização do estudo de estabilidades amostras foram injetada após serem preparadas e deixada em condição ambiente durante 24h e 48h. Essas amostras contendo os padrões da fluoresceína, metoprolol, Lamivudina e Estavudina em meio Ringer-Krebs-HEPES modificado mantiveram-se estáveis por, no mínimo, 48 horas à temperatura ambiente, conforme apresentados nas **Tabela 17 a 20.**

Tabela 17- Valores experimentais de exatidão obtidos a partir da avaliação da estabilidade de amostras de fluoresceína analisada por cromatografia líquida

Tempo em horas	Exatidão %		
	15 ng.mL^{-1}	**150 ng.mL^{-1}**	**300 ng.mL -^{1}**
24 horas	93,83	101,94	106,65
48 horas	96,07	103,35	109,13

Tabela 18- Valores experimentais de exatidão obtidos a partir da avaliação da estabilidade de amostras de metoprolol analisada por cromatografia líquida

Tempo em horas	Exatidão %		
	20 ng.mL^{-1}	**300 ng.mL^{-1}**	**750 ng.mL -^{1}**
24 horas	103,50	99,01	100,23
48 horas	102,20	98,90	99,48

Tabela 19- Valores experimentais de exatidão obtidos a partir da avaliação da estabilidade de amostras da Lamivudina analisada por cromatografia líquida

Tempo em horas	Exatidão %		
	20 ng.mL^{-1}	**250 ng.mL^{-1}**	**625 ng.mL -^{1}**
24 horas	114,5	99,44	101,46
48 horas	115,14	104,07	114,44

Tabela 20- Valores experimentais de exatidão obtidos a partir da avaliação da estabilidade de amostras da Estavudinaanalisada por cromatografia líquida

Tempo em horas	Exatidão %		
	20 ng.mL^{-1}	**250 ng.mL^{-1}**	**625 ng.mL -^{1}**
24 horas	112,34	99,78	100,36
48 horas	114,97	103,03	99,26

5.2.3 Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento

A avaliação dos resultados obtidos pela avaliação da estabilidade das amostras de Fluoresceína (concentrações de, 15 ng.mL-1, 150 ng.mL-1 e 300 ng.ml-1), de Metoprolol (concentrações de, 20 ng.mL-1, 300 ng.mL-1 e 750

ng.mL-1) e da Lamivudina e Estavudina (concentrações de 20 ng.mL-1, 250 ng.mL-1 e 625 ng.mL-1) avaliadas por um ciclo de congelamento e descongelamento mostra que estas se mantiveram estáveis, apresentando precisão e exatidão aceitáveis, conforme apresentados **nas Tabelas 21 a 24.**

Tabela 21- Exatidão e precisão das análises das amostras contendo Fluoresceína após ciclos de congelamento e descongelamento. Os resultados expressam a média das amostras analisadas em triplicatas

Concentração ng.mL-^{1}	Exatidão %	Precisão %
15	95,73	0,57
150	98,51	0,19
300	103,67	1,26

Tabela 22- Exatidão e precisão das análises das amostras contendo Metoprolol após ciclos de congelamento e descongelamento. Os resultados expressam a média das amostras analisadas em triplicatas

Concentração ng.mL-^{1}	Exatidão %	Precisão %
20	113,55	0,73
300	103,07	2,88
750	100,02	0,12

Tabela 23- Exatidão e precisão das análises das amostras contendo Laivudina após ciclos de congelamento e descongelamento. Os resultados expressam a média das amostras analisadas em triplicatas

Concentração ng.mL-^{1}	Exatidão %	Precisão %
20	115,25	9,32
250	103,21	4,69
625	100,55	0,83

Tabela 24- Exatidão e precisão das análises das amostras contendo Estavudina após ciclos de congelamento e descongelamento. Os resultados expressam a média das amostras analisadas em triplicatas

Concentração ng.mL-^{1}	Exatidão %	Precisão %
20	114,95	10,32
250	99,31	5,85
625	99,85	1,73

As Conclusões deste trabalho foram:

I. Os métodos cromatográficos desenvolvidos para a quantificação dos marcadores (metoprolol e fluoresceína) e dos fármacos antirretrovirais (lamivudina e estavudina) demostram-se precisos e seletivos para as análises;

II. O protocolo desenvolvido para avaliação de permeabilidade bucal em segmento de mucosa bucal de suíno, empregando o método *ex- vivo,* permitiu a manutenção da viabilidade tecidual;

III. O protocolo desenvolvido para avaliação de permeabilidade bucal em segmento de mucosa bucal de suíno, empregando o método *ex- vivo,* apresentou-se adequado para diferenciar os mecanismos distintos envolvidos no transporte passivo de substâncias (transcelular e paracelular);

IV. Os resultados de permeabilidade aparente sugerem que os fármacos lamivudina e estavudina permeiam a mucosa bucal pelo mecanismo transcelular, uma vez que os resultados obtidos para ambos foram mais próximos ao do metoprolol (marcador trancelular).

ADRIAN, C. L; OLIN H, B. D; DALHOFF. K & JACOBSEN, J.*In vivo* human buccal permeability of nicotine, **Intenational Journal of Pharmacutics, v.311, p.196- 102, 2006.**

ANSEL, H. C; POPOVICH, N. G & ALLEN JR, L. V. **Formas farmacêuticas de liberação de Fármacos**. 8 e.d Porto Alegre: Artmed, 2007, p.729.

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.

ARTUSI, M; SANTI, P; COLOMBO, P & JUNGINGER, H. E. Buccal delivery of thiocolchicoside*: in vitro* and *in vivo* permeation studies. **Intenational Journal of Pharmacutics**, v. 250, p. 203- 213, 2002.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, p.668

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.

ASHIRU, D. A.I; PATEL, R & BASIT, A. W. Simple and universal HPLC-UV method to determine cimetidine, ranitidine, famotidine and nizatidine in urine: Application to the analysis of ranitidine and its metabolites in human volunteers. **Journal of Chromatography**, v.860, p. 235- 240, 207.

BECKETT, A.H. & TRIGGS, E.J., Buccal absorption of basic drugs and its application as *an in vivo* model of passive drug transfer through lipid membranes. ***J. Pharm. Pharma- col***, v. 19, p. 31-41, 1967.

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).

BARSUHN, C. L; OLANOFF, L.S; GLEASON, D. D; ADKINS, E.L & HO, F.H. Human buca labsorption of flurbiprofen. ***Clinical Pharmacology and Therapeutic**s*, v.44, p. 225-231, 1988

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

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

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

BRASIL. RDC N 37, de 3 de agosto de 2011. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência e dá outras providências.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico do HIV de dezembro de 2013.** Disponível em: <http://www.aids.gov.br/publicacao/2013/boletim-epidemiologico-aids-e-dst-2013> Acessado em 6 de janeiro de 2014.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST Aids e Hepatites Virais. **AIDS no Brasil, 2012.** Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pagina/aids-no-brasil>. Acesso em: 11-de agosto de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Protocolo de Assistência Farmacêutica em DST/HIV/Aids: recomendações do Grupo de Trabalho de Assistência Farmacêutica.** Brasília, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. **Manual de adesão ao tratamento para pessoas vivendo com HIV e Aids.**Brasília:, p. 75-82, 2008.

CARO, V; GIANDALIA, G; SIRAGUSA, M. G & GIANNOLA, L. I; Buccal Delivery of Methimazole as an Alternative Means for Improvement of DrugBioavailability: Permeation Studies and Matrix System Design**, Current pharmaceutical Desing,** v. 18, p. 5405-5410, 2012.

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

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.

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. Nova York, 2008. p.182-215. (Biotechnology: Pharmaceutical Aspects, v.7).

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

DEZANI, A.B; PEREIRA,T.M; CAFFRO, A. M; REIS, J.M; SERRA, .C .H.R. Determination of lamivudine and zidovudine permeability using a different *ex vivo* method in *Franz* cells. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.67, p. 194- 202, 2013.

DRAFT. Guideline on the investigations of bioequivalence. London, 2008. (CPMP/EWP/QWP/1401/98).

EMEA - EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Pre-Authorization Evaluation of Medicines for Human Use. Committee for Medicinal Products for Human Use.

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.

GANEM- QUINTANAR, A; FALSON- REIG, F & BURI, P. Contribution of lipid componentes to the permeability barrier of oral mucosa. **European jornal of Phatmacetics and Biopharmaceutics**, v.44, p. 107- 120, 1997.

GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L.E. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil. 10 ed. p. 413, 867, 971, 972, 982.

HEARNDEN et al., New developments and oprtunities in oral mucosal drug for local and systemic disease**. Advanced Drug Delivery Reviews,** v. 64, p. 16-28, 2012.

HOLM, R; LOUND, M; ANDERSEN, M. B; JESPERSEN, M.L; KARLSSON, J.J; GARMER, M; JØRGENSEN, E. B & JACOBSEN, J. In vitro, *ex vivo* and in vivo examination of buccal absorption of metoprolol with varying pH in TR146 cell culture, porcine buccal mucosa and Göttingen minipigs.**European Journal of Pharmaceutical Sciences,** v.49, p. 117- 124, 2013.

HOOGSTRAATE, A. J & BOODDÉ, H. E. Methods for assessing the buccal mucosa as a route of drug delivery**. Advanced Drug Delivery Reviews**, v.12, p.99- 125, 1993.

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.

JACOBSEN, J; VANDEURS. B; PEDERSEN .M & RASSING. M. R. TR146 cells grown on filters as a mocel for human buccal epithelium. 1. Morphology, growth, barrier properties, and permeability. ***International Journal of Pharmaceutics***, v.125, p. 165–184, 1995.

KHARASCH ED, WHITTINGTON. D & HOFFER C. Influence of hepatic and intestinal cytochrome P4503A activity on the acute disposition and effects of oral transmucosal fentanyl. **Anesthesiology** , v.101, p.729–737, 2004.

KOKATE, A; LI, XIAOLIN, L & JASTI, B. HPLC detectin of marker compounds during buccal permeation enhancement studies. **Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.47, p. 190-194, 2008.

LAM, J. K. W; XU, Y; WORSELY, A & WONG, I. C. K. Oral Transmucosal drug delivery for pediatric use. **Advanced Drug Delivery Reviews**, in presse, 2013

LI, l. Y; AMIDON, G. L; KIM, S. J; HEIMBACH, T; KESISOGLUO; TOPLISS, J. T & FLEISHER, D. Intestinal Metabolism Promotes Regional Differences in Apical Uptake of Indinavir: Coupled Effect of P-Glycoprotein and Cytochrome P450 3A on Indinavir Membrane Permeability in Rat. THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, v. 301, p.586-593, 2002.

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

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

LESTARI, M. L.A.D; NICOLAZZO, J. A & FINNIN, B. C. A novel flow through diffusion cell for assessing drug transport across the Buccal Mucosa In vitro. **Journal of Phrmaceutical Sciences**, v. 98, p. 4577-4588, 2009.

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.

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.

NICOLAZZO, J; FINNIN, B. C & HEEMSTRA, L. B. The Buccal Mucosa as an Alternative Route for Systemic Delivery of Risperidona. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 11, p.4584- 4591, 2010.

NIELSEN, H,N & RASSING, M.R. TR146 cells grown on filters as a modelo human buccal epithelium: III. Permeability encgancement by differnt pH values,

diferente osmolality values, and bile salts. **International Journal of Pharmaceutics**, v.185, p. 215-225, 1999.

NIELSEN, H.M & RASSING, M.R. TR146 cells grown on filters as a model of human buccal epithelium. IV. Permability of water, mannitol, testosterone and ß-adrenoreceptor antagonists. Comparison to human, monkeyand porcine buccal mucosa. **International Journal of Pharmaceutics** v.194, p.155–167, 2000b.

NIELSEN, H.M. & RASSING, M.R. Nicotine permeability across the buccal TR146 cell culture model and porcine buccal mucosa in vitro: effect of pH and concentration. ***European Journal of Pharmaceutics Science***, v.16, p.151–157,2002.

NICOLAZZO, J. A; REDD, B.L & FINNIN, B.C. Buccal penetration enhncer-How do they really work? **Journal Controlled Release**, v.105, p.1-15, 2005.

NICOLAZZO, J. A, REDD, B & FINNIN, B. Assessment of the effects of sodium Dodecyl Sulfate on the Buccal Permeability of Caffeine and Estradiol. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 93, n.2, p.431-440, 2003.

PATEL, V.F; LIU, F & BROWN, M. B. Advances in oral transmucosal drug delivery. **Journal of Controlld Release**, v. 106-116, 2011.

PATEL, V.F; LIU, F & BROWN, M. B. Modeling the oral cavity: In vitro and in vivo evaluations of buccal drug delivery systems. **Journal of Controlld Release**, v. 161, p. 746-756, 2012.

RATHBONE, M.J. Human buccal absorption. I. A method for estiating th transfer Kinextis of Drug across the human buccal membrane. **Internation Journal of Pharmaceutics**, v. 69, p. 103- 108, 1991.

RATHBONE, M. J & HADGRAFT, J. Absorption of drugs from the human oral cavity**.** **Internatinal Journal of Pharmaceutics**, v. 74, p. 9- 24, 1991.

REBIERE, H; MAZEL, B; CIVADE, C & BONNET, P. A. Determination of 19 antiretroviral agents in pharmaceuticals or suspected products with two methods using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 850, p. 376–383, 2007.

REIS, J; DEZANI, A.B; PEREIRA, T.M; AVDEEF, A & SERRA, C.H.R. Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, *ex vivo* and in situ Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum. ***European Journal of Pharmaceutics Science****, v. 48, p. 781-789, 2013.*

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.

SHOJAEI, A. H. Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review. **Journal Pharm Pharmaceutic Sciences**, v. 1, n. 1, p. 15-30, 1998.

SALAMAT- MILLER, N; CHITTCHANG, M & JOHNSTON, T. P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. **Advnced Drug Delivery Reviews**. v. 57, p. 1666-1691, 2005.

SMART, J B. Drug delivery using buccal- adhesive systems. **Advanced drug delivery Reviews**, v. 11, p. 253- 270, 1993.

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

STAPPAERTS, J; ANNAER, P & AUGUSTIINS.Site dependent intestinal absorption of darunavir and its interaction with ketoconazole. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, p. 51- 56, 2013.

SUDHAKAR, Y; KOUTSU, K & BANDYOPADHYAY, A. K. Buccal bioadhesive drug delivery- A Promising option for orally less efficient drugs. **Journal of Controlled Release**, v.114, p. 15-40, 2006

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.

VRIES, M. E; BODDÉ, H. E; VERHOEF, J.C; PONEC, M, CRAANE, W. I.H.M & JUNGINGER, H.E. Localization of permeability barrier inside porcine buccal mucosa: a combined in vitro study of drug permeability, electrical resistance and tissue morphology. **International Journal Of Pharmaceutics**, v.76, p.25-35, 1991.

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

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

ANEXO A

Informações para os membros da banca julgadora de mestrado/ doutorado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

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

2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir 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 argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição 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 argüição.

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

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

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

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091 3621 - Fax (11) 3091 3141 – e-mail: pgfarma@usp.br

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 no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF **106.2013-P440**

São Paulo, 13 de novembro de 2013.

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP), em reunião realizada em 11 de novembro de 2013, **apreciou** o projeto de pesquisa "**Avaliação da permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio de modelo ex vivo com emprego de segmentos da mucosa bucal de suínos**" (Protocolo CEUA nº 440).

Tendo em vista que a procedência do material biológico será decorrente de abate frigorífico, conduzido sem a interferência do pesquisador responsável e da instituição, a CEUA entendeu que o projeto não requer sua análise ética, deliberando apenas por **registrar** e **arquivar**.

Cordialmente,

Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri
Vice-Coordenadora da CEUA/FCF/USP

Ilmo(a) Sr(a).
Mônica Maria Coquemala da Silva
Orientador(a)/supervisor(a): Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra
FBF/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3622 / Fone/Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: ceuafcf@usp.br

ANEXO C

Ficha do aluno

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

FICHA DO ALUNO

9139 - 8447271/1 - Mônica Maria Coquemala da Silva

Email:	monica_coquemala@usp.br
Data de Nascimento:	26/03/1987
Cédula de Identidade:	RG - 43.664.280-3 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Farmácia - Faculdade de Ciências Sociais e Agrárias de Itapeva - Associação Cultural e Educacional de Itapeva - São Paulo - Brasil - 2012

Curso:	Mestrado
Programa:	Fármaco e Medicamentos
Área:	Produção e Controle Farmacêuticos
Data de Matrícula:	17/06/2013
Início da Contagem de Prazo:	17/06/2013
Data Limite para o Depósito:	17/12/2015
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Cristina Helena dos Reis Serra - 17/06/2013 até o presente. Email: chserra@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 17/06/2013
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 14/08/2014
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:	Primeira Matrícula em 17/06/2013

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 20/07/2015

Impresso em: 13/12/2015 23:15:30

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

9139 - 8447271/1 - Mônica Maria Coquemala da Silva

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5810-1/1	Tópicos Avançados em Fármaco e Medicamentos. Espectroscopias Raman e no Infravermelho Próximo Associadas à Quimiometria: Aplicação no Desenvolvimento e no Controle em Processo de Medicamentos com Base Nanotecnológica	24/06/2013	30/06/2013	30	2	100	A	N	Concluída
EDM5791-5/11	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	13/08/2013	29/11/2013	120	8	100	A	N	Concluída
FBF5805-1/2	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	14/08/2013	17/09/2013	45	3	80	B	N	Concluída
EDM5102-3/5	Preparação Pedagógica PAE (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	20/08/2013	30/09/2013	60	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
QBQ5747-6/5	Animais de Laboratório (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	26/08/2013	02/09/2013	15	1	100	A	N	Concluída

FBF5751-7/2	Introdução aos Métodos Termoanalíticos	27/08/2013	04/11/2013	150	10	100	A	N	Concluída
FBF5777-3/2	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	13/02/2014	28/05/2014	45	3	100	B	N	Concluída
FBF5766-3/2	Biodisponibilidade e Bioequivalência de Medicamentos	30/09/2014	01/12/2014	90	6	100	B	N	Concluída

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

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 20/07/2015
Impresso em: 13/12/2015 23:15:30

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

9139 - 8447271/1 - Mônica Maria Coquemala da Silva

Comissão julgadora da dissertação de mestrado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
205252	Cristina Helena dos Reis Serra	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 20/07/2015
Impresso em: 13/12/2015 23:15:30

Mônica Maria Coquemala da Silva

- Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/0085278792197067
- Última atualização do currículo em 07/04/2015

Possui graduação em Farmácia pela Faculdade de Ciências Sociais e Agrárias de Itapeva(2012). Atualmente é Aluno de Mestrado da Universidade de São Paulo. Atuando principalmente nos seguintes temas:mucosa bucal, permeabilidade, atirretrovirais. **(Texto gerado automaticamente pela aplicação CVLattes)**

Identificação

Nome

Mônica Maria Coquemala da Silva

Nome em citações bibliográficas

SILVA, M. M. C.

Endereço

Endereço Profissional

Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.
Avenida Professor Lineu Prestes, 580, Laboratório de Permeabilidade e Biodisponibilidade, Bloco 15 inferior
Butantã
05508000 - São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 26480050
Fax: (11) 38154418
URL da Homepage: www.fcf.usp.br

Formação acadêmica/titulação

2013

Mestrado em andamento em Fármacos e Medicamentos (Conceito CAPES 4).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Avaliação da permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio de modelo ex vivo com emprego de segmentos da mucosa bucal de suínos,Orientador: Cristina Helena dos Reis Serra.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Palavras-chave: mucosa bucal, permeabilidade, atirretrovirais.
Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia.
Setores de atividade: Fabricação de produtos farmoquímicos e farmacêuticos.

2008 - 2012

Graduação em Farmácia.
Faculdade de Ciências Sociais e Agrárias de Itapeva, FAIT, Brasil.
Título: Nanopartículas poliméricas com sistema carreador de fármacos para aumento da solubilidade.
Orientador: Michelle Maria Gonçalves Barão Aguiar

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2013 - Atual

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Aluno de Mestrado, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Vínculo institucional

2011 - 2012

Vínculo: iniciação Científica, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 20, Regime: Dedicação exclusiva.

Projetos de pesquisa

2013 - Atual

Avaliação da permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio de modelo ex vivo com emprego de segmentos da mucosa bucal de suínos

Descrição: A via de administração oral é a forma favorita de administração de fármacos em função das vantagens que apresenta tais como, adesão do paciente, conveniência e praticidade. A maioria dos medicamentos comercializados encontra-se disponível na forma farmacêutica de administração oral. O sucesso de um tratamento medicamentoso requer que a absorção intestinal do fármaco seja suficiente para assegurar a sua disponibilidade no local de ação (VOLPE, 2010). No entanto, a absorção do fármaco no trato gastrointestinal é complexa e pode ser influenciada por vários fatores, os quais têm impacto sobre a dissolução, solubilidade e

permeabilidade do fármaco. Com o intuito de aumentar a biodisponibilidade de fármacos que possuem uma absorção dificultada pela via oral, a via de administração pela mucosa bucal vem sendo uma alternativa na atualidade farmacêutica. Esta mucosa é um tecido não queratinizado, altamente vascularizado, não apresenta enzimas metabolizadoras. Tais características da mucosa bucal possibilitam boa absorção de fármacos sem que ocorra a metabolização pré-sistêmica, ou efeito de primeira passagem, somando-se ao fato desta apresentar fácil acessibilidade para a administração de fármacos (VRIES, M. E et al., 1991; NIELSEN, H. M & RASSING, M. R, 1999). Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a permeabilidade dos fármacos antirretrovirais (lamivudina, estavudina e zidovudina), na presença e na ausência de inibidores da glicoproteína P e da isoenzima CYP, em segmentos de mucosa bucal de suínos, por meio de modelo ex vivo, com emprego de câmaras de difusão do tipo células de *Franz*. O estudo de permeabilidade dos fármacos através da mucosa bucal será realizado por meio de método ex- vivo, em câmaras de difusão vertical, ou células de *Franz*s, com emprego da mucosa suína. As amostras obtidas a partir do estudo serão quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência..
Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Mônica Maria Coquemala da Silva - Coordenador / Cristina Helena dos Reis Serra - Integrante.

2011 - 2012

Obtenção e Caracterização de Nanocarreadores Lipídicos de Nistatina

Descrição: Iniciação Científica.
Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Mônica Maria Coquemala da Silva - Integrante / Michelle Maria Golçaves Barão de Aguiar - Integrante / Cristina Helena dos Reis Serra - Coordenador.

Áreas de atuação

Idiomas

Inglês

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

Espanhol

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

Produções

Produção bibliográfica

Apresentações de Trabalho

1.

SILVA, M. M. C. ; AGUIAR, M. M.G. B . Sistemas Coloidais de Liberação de Fármacos. 2011. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

2.

SILVA, M. M. C. ; DE CONTI, Andreia Cressoni . Estudo Epidemiológico do H1N1 através da Modelagem Matemática. 2009. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

3.

SILVA, A. c ; TOMAZ, E ; GLAUSER, L. E. N ; **SILVA, M. M. C.** ; FENIMA-DE- STEFANO, G.M. M . Terapia Alternativa: Florais de Bach. Revisão Bibliográfica e Utilização pela População de Itapeva. 2009. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

4.

SILVA, M. M. C. ; DE CONTI, Andreia Cressoni . Parâmetro da Epidemiologia Matemática. 2008. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1.

49ª Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica.014. Development of a HPLC-UV method for quantification of zidovudine in buccal permeability studies.. 2014. (Congresso).

2.

49ª Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica. Biopharmaceutical Classification System: solubility evaluation of didanosine (ddI). 2014. (Congresso).

3.

49ª Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica. Single-pass intestinal perfusion as a method to predict absorption of drugs in humans: a study with cephalexin. 2014. (Congresso).

4.

Workshop Polimorfos em Medicamentos - United States Pharmacopeia.13..Workshop Polimorfos em Medicamentos - United States Pharmacopeia.. 2013. (Outra).

5.

VII Simpósio de Ciências Farmacêuticas da FAIT. 2012. (Simpósio).

6.

XLVII SEMANA UNIVERSITÁRIA PAULISTA DE FARMÁCIA E BIOQUÍMICA.LIPID NANOCARRIERS CONTAINING NYSTATIN NANOCRYSTAL FOR THE TREATMENT OF THE ORAL MUCOSA. 2012. (Simpósio).

7.

21 Semana Racine- Congresso de Farmácia. 2011. (Congresso).

8.

VIII Simpósio de Ciências Aplicadas da FAIT.SISTEMA COLOIDAIS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO. 2011. (Simpósio).

9.

MINI CURSO DROGAS ILÍCITAS DA III JORNADA FARMACÊUTICA DA FAIT. 2011. (Oficina).

10.

III JORNADA FARMACEUTICA DA FAIT. 2011. (Encontro).

11.

Treinamento Operacional do Dissolutor Sotax CE7 Smart..Treinamento Operacional do Dissolutor. 2011. (Outra).

12.

X Workshop de Genética. 2010. (Congresso).

13.

IX ENCONTRO INTERNACIONAL DE MEDICINA INTEGRADA E III CONGRESSO BRASILEIRO DE NATUROLIGIA. 2010. (Congresso).

14.

XVI CONGRESSO PAULISTA DE FARMACÊUTICO. 2010. (Congresso).

15.

X Workshop de Genética, Farmacoquímica de produtos naturai. 2010. (Oficina).

16.

APLICAÇÃO DA ELETROFORESE CAPILAR DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS E SEUS COMPOSTOS DE DEGRADAÇÃO. 2010. (Oficina).

17.

COSMÉTICOS ORGÂNICOS E NATURAIS. 2010. (Oficina).

18.

DESENVOLVIMENTOS DE PRODUTOS COSMÉTICOS. 2010. (Oficina).

19.

II JORNADA FARMACEUTICA DA FAIT. 2010. (Encontro).

20.

VI Simpósio de Ciencias Aplicadas da FAIT. 2009. (Simpósio).

21.

VI Simpósio de Ciencias Aplicadas da FAIT.TERApia Alternativa: Florais de Bach. Revisão Bibliográfica e Utilização pela População de Itapeva. 2009. (Simpósio).

22.

VI Simpósio de Ciencias Aplicadas da FAIT.Estudo Epidemiológico do H1N1 através da Modelagem Matemática. 2009. (Simpósio).

23.

I OFICINA DE FARMÁCIA- LEGISLAÇÃO SANITÁRIA. 2009. (Oficina).

24.

I Semana Saúde. 2008. (Congresso).

25.

V Simpósio de Ciências Aplicadas da FAIT.PArâmetro da Epidemiologia Matemática. 2008. (Simpósio).

26.

V Simpósio de Ciências Aplicadas da FAIT. 2008. (Simpósio).

27.

V Simpósio de Ciências Aplicadas da FAIT.Parâmetro da Epidemiologia Matemática. 2008. (Simpósio).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 13/12/2015 às 23:01:13