

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

Desenvolvimento de novo método *ex vivo* para estudo da permeabilidade de fármacos utilizando epitélio intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*)

**Talita Ferreira Monteiro**

Dissertação para obtenção do grau de  
MESTRE

Orientadora:  
Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri

São Paulo

2012

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

Desenvolvimento de novo método *ex vivo* para estudo da permeabilidade de fármacos utilizando epitélio intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*)

**Talita Ferreira Monteiro**

Dissertação para obtenção do grau de  
**MESTRE**

Orientadora:  
Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri

São Paulo

2012

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

Monteiro, Talita Ferreira  
M775d      Desenvolvimento de novo método *ex vivo* para estudo da permeabilidade de fármacos utilizando epitélio intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*) / Talita Ferreira Monteiro. -- São Paulo, 2012.  
146p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.  
Orientador : Consiglieri, Vladi Olga

1. Biofarmacotécnica 2. Biofarmacêutica I. T. II. Consiglieri, Vladi Olga, orientador.

615.4b      CDD

Talita Ferreira Monteiro

Desenvolvimento de novo método *ex vivo* para estudo da permeabilidade de fármacos utilizando epitélio intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*)

Comissão julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

---

Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri  
Orientador/Presidente

---

1º Examinador

---

2º Examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Aos meus queridos pais, Acyr e LÍgia, pelo amor incondicional dispensado, pela dedicação imensurável, por todas as abdições em meu favor e pelo incentivo constante.

Ao meu irmão, Gabriel, pela amizade e motivação.

Ao meu esposo, Diogo, pelo amor, admiração e carinho em todo o tempo.

Amo-os com todo o meu coração!

# Agradecimentos

Acima de tudo, a Deus, pela vida, saúde e sustento diário.

Aos meus pais Acyr e Lúcia por tudo que são para mim.

Ao meu irmão Gabriel pelo incentivo, apoio e ajuda sincera.

Ao meu esposo Diogo pelo companheirismo, pela compreensão, pelas constantes palavras de incentivo e por me ajudar da maneira que pôde.

À Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri pela oportunidade, confiança, amizade, paciência e orientação.

À Universidade de São Paulo, especificamente à Faculdade de Ciências Farmacêuticas, por me proporcionar esse trabalho.

Às Profas. Dras. Maria Segunda Aurora Prado e Telma Mary Kaneko pelas dúvidas esclarecidas.

À Profa. Dra. Marina Franco Magi Tavares pela disposição do seu laboratório para a realização das minhas análises quantitativas e pela confiança depositada.

Às Profas. Dras. Cristina Helena dos Reis Serra e Valentina Porta pelo uso do equipamento de permeação.

Ao Ranário Atibaia, especialmente à Gê, pelo fornecimento dos intestinos de rã.

Aos colegas, Karina, Aline, Grazielle, Gisele, Maryanne e Daniel pela acolhida e confiança de vocês.

Ao Claudinei Alves da Silva pela sua imensa colaboração no desenvolvimento e validação do método analítico.

Ao Guilherme Diniz Tavares pela sua amizade, pelas discussões proporcionadas e por todo ensino dedicado.

Ao Rafael Paraíso pela amizade e pelo auxílio durante os experimentos de permeação intestinal.

Ao André Dezani pelos ensinamentos sobre os experimentos de permeabilidade intestinal.

Ao Prof. Dr. André Rolim Baby pelas explicações sobre o uso do equipamento de permeação.

À Profa. Dra. Leticia Norma Carpentieri Rodrigues e suas alunas, Beatriz e Thaís, pelos trabalhos realizados no seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Luiz Antonio Gioielli pelo uso do microscópio.

À Profa. Dra. Maria Elena Santos Takeda pelo auxílio na parte estatística.

Aos demais colegas de laboratório, Paula, Marcelo, Vanessa, Francinalva, Marina e José Eduardo pela companhia no dia-a-dia.

À Claudinéia, Edgar, Eremita e Dóra pela amizade e auxílio diário.

Aos funcionários, David, Bete, Alexandre e Jorge pelo trabalho que realizam.

Aos motoristas, senhores Gelson, João e Luís.

Aos funcionários da biblioteca do Conjunto das Químicas.

À Sara e ao Davi pela ajuda e paciência.

Às queridas, Paula Karina, Roxana, Aline e Ana Cristina pela amizade e por compartilharem diversos momentos comigo.

À Coordenação de Apoio a Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido ao projeto.

# Sumário

Lista de figuras .....	iv
Lista de tabelas .....	viii
Resumo .....	xi
Abstract .....	xii
1 – INTRODUÇÃO .....	1
2 - REVISÃO DA LITERATURA .....	6
2.1. Biodisponibilidade e bioequivalência .....	7
2.2. Fatores que afetam a biodisponibilidade dos fármacos .....	11
2.2.1. Propriedades físico-químicas do fármaco .....	11
2.2.1.1. Solubilidade .....	11
2.2.1.2. Polimorfismo .....	13
2.2.1.3. Tamanho de partícula e área superficial .....	15
2.2.2. Características fisiológicas .....	17
2.2.2.1. Fisiologia da membrana biológica .....	17
2.2.2.2. Anatomia e fisiologia do trato gastrintestinal .....	21
2.2.2.2.1. Esvaziamento gástrico .....	22
2.2.2.2.2. Motilidade gastrintestinal .....	23
2.2.2.2.3. Fluxo sanguíneo do trato gastrintestinal .....	24
2.2.2.3. Alimentação .....	25
2.3. O Sistema de Classificação Biofarmacêutica .....	26
2.4. Avaliação da solubilidade dos fármacos .....	32
2.5. Avaliação da permeabilidade dos fármacos .....	32
2.5.1. Métodos de estudo <i>in vitro</i> .....	35
2.5.1.1. Baseados em culturas de células .....	35
2.5.1.2. Baseados em tecido intestinal animal .....	37
2.5.1.2.1. Células intestinais isoladas .....	37
2.5.1.2.2. Anéis intestinais invertidos .....	38
2.5.1.2.3. Saco intestinal invertido .....	39
2.5.1.2.4. Células de difusão .....	40
2.5.1.2.5. Saco intestinal não invertido .....	41
2.5.2. Membranas artificiais – PAMPA .....	41
2.5.3. Perfusão <i>in situ</i> .....	42
2.6. Fármaco antiretroviral em estudo .....	43
2.6.1. Lamivudina .....	43
2.7. Marcadores internos de permeação .....	45
2.8. Métodos analíticos para determinação da lamivudina .....	45
2.9. Planejamento Experimental .....	46
3 - OBJETIVO .....	48
4 - MATERIAL E MÉTODOS .....	50
4.1. Materiais, solvente, reagentes .....	51
4.2. Equipamentos e dispositivos diversos .....	51
4.3. Membranas .....	52
4.4. Desenvolvimento do método analítico para quantificação dos fármacos permeados .....	53
4.4.1. Instrumentação .....	53
4.4.2. Seleção do eletrólito de corrida e estabelecimento das condições de análise .....	54
4.5. Validação do método analítico desenvolvido .....	54

4.5.1. Seletividade/Especificidade.....	55
4.5.2. Linearidade .....	55
4.5.3. Limite de Detecção e Limite de Quantificação .....	56
4.5.4. Precisão .....	56
4.5.5. Exatidão .....	57
4.5.6. Estabilidade.....	58
4.6. Caracterização morfológica e histológica do epitélio intestinal da rã-touro ( <i>Rana catesbeiana</i> ) .....	58
4.7. Estudo da permeabilidade intestinal .....	58
4.7.1. Planejamento experimental.....	58
4.7.2. Obtenção e preparação dos segmentos intestinais de rã .....	60
4.7.2.1. Obtenção dos segmentos intestinais.....	60
4.7.2.2. Preparação dos segmentos intestinais.....	61
4.7.3. Avaliação da integridade dos segmentos intestinais utilizados no estudo .....	61
4.7.4. Ensaios de permeabilidade para avaliação da influência das variáveis em estudo – temperatura, pH da solução de Ringer e secção intestinal - e seleção das condições do experimentais .....	61
4.7.4.1. Quantificação dos fármacos permeados nos ensaios de permeabilidade.....	62
4.7.4.2. Análise dos resultados .....	62
4.7.4.3. Análise do planejamento experimental.....	63
4.7.5. Ensaio de permeabilidade intestinal da lamivudina empregando as condições experimentais selecionadas.....	63
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
5.1. Desenvolvimento de método analítico para quantificação dos fármacos permeados.....	65
5.1.1. Seleção do eletrólito de corrida e estabelecimento das condições de análise.....	65
5.2. Validação do método analítico desenvolvido .....	70
5.2.1. Seletividade/Especificidade.....	70
5.2.2. Linearidade .....	71
5.2.3. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ).....	75
5.2.4. Precisão .....	76
5.2.5. Exatidão .....	78
5.2.6. Estabilidade.....	79
5.3. Caracterização morfológica e histológica do epitélio intestinal da rã-touro ( <i>Rana catesbeiana</i> ) .....	81
5.4. Estudo de permeabilidade intestinal .....	84
5.4.1. Planejamento experimental.....	84
5.4.2. Avaliação da integridade dos segmentos intestinais utilizados no estudo .....	85
5.4.3. Ensaios de permeabilidade para avaliação da influência das variáveis em estudo – temperatura, pH da solução de Ringer e secção intestinal - e seleção das condições experimentais .....	87
5.4.3.1. Análise dos resultados .....	87
5.4.3.2. Análise do planejamento experimental.....	94
5.4.4 Ensaio de permeabilidade intestinal da lamivudina empregando as condições experimentais selecionadas.....	95
6. CONCLUSÃO.....	101

7. REFERÊNCIAS.....	103
8. ANEXOS .....	118
ANEXO A .....	119
Informações para os membros de bancas julgadoras de Mestrado/Doutorado .....	119
ANEXO B .....	121
Ficha do aluno.....	121
ANEXO C .....	124
Currículo Lattes .....	124

## Lista de figuras

Figura 1. Parâmetros relacionados à eficácia e segurança de um medicamento (STORPIRTIS, 1999).....	9
Figura 2. Relação entre a permeabilidade humana e a fração absorvida da dose (LÖBENBERG; AMIDON, 2000).....	30
Figura 3. Subdivisão entre os métodos de estudo da permeabilidade intestinal de fármacos baseada no modo de avaliação: captação ou sistemas de transporte (TUKKER, 2000).....	34
Figura 4. Estrutura química da lamivudina (3 TC) (MOFFAT <i>et al.</i> , 2004).....	43
Figura 5. Representação esquemática da célula de difusão vertical e seus acessórios (HANSON RESEARCH, 2004).....	52
Figura 6. Rãs-touro ( <i>Rana catesbeiana</i> ), no tanque de criação e preparadas para o abate.....	53
Figura 7. Eletroferograma de lamivudina, aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol em Ringer. Capilar: 75 $\mu$ m, 40 cm; eletrólito: 10 mM tampão fosfato (pH 2,5); corrente: 80 $\mu$ A; 25°C; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/10 s; $\lambda$ =214 nm.....	67
Figura 8. Eletroferograma de lamivudina, aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol em Ringer. Capilar: 75 $\mu$ m, 40 cm; eletrólito: 10 mM tampão fosfato (pH 2,5) e 0,5% TEA (trietilamina); corrente: 80 $\mu$ A; 25°C; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/10 s; $\lambda$ =214 nm.....	67
Figura 9. Eletroferograma de MECK de lamivudina, aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol em Ringer. Capilar: 75 $\mu$ m, 40 cm; tampão: 40 mM SDS, 10 mM TBS (pH 9,2); corrente: 80 $\mu$ A; 25°C; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/10 s; $\lambda$ =214 nm.....	68

Figura 10. Eletroferograma de MECK de lamivudina, aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol em Ringer. Capilar: 75  $\mu$ m, 40 cm; tampão: 40 mM SDS, 10 mM TBS (pH 9,2), 20% (v/v) metanol; corrente: 80  $\mu$ A; 25°C; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/10 s;  $\lambda$ =214 nm.....68

Figura 11. Eletroferograma de MECK de lamivudina, aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol em Ringer. Capilar: 75  $\mu$ m, 40 cm; tampão: 30 mM SDS, 10 mM TBS (pH 9,2), 10 mM  $\beta$ -ciclodextrina; corrente: 80  $\mu$ A; 25°C; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/10 s;  $\lambda$ =214 nm.....69

Figura 12. Eletroferograma de MECK de lamivudina, aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol em Ringer. Capilar: 75  $\mu$ m, 40 cm; tampão: 20 mM SDS, 10 mM TBS (pH 9,2), 30% acetonitrila (v/v) e 5% etanol (v/v); corrente: 80  $\mu$ A; 25°C; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/10 s;  $\lambda$ =214 nm.....69

Figura 13. Eletroferograma de MECK de lamivudina, aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol em Ringer. Capilar: 75  $\mu$ m, 40 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9,2), 10% etanol (v/v); corrente: 80  $\mu$ A; 25°C; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/10 s;  $\lambda$ =214 nm.....70

Figura 14. Eletroferograma de MECK de lamivudina (1), aciclovir (2), zidovudina (3), flordizina (4) e metoprolol (5) em Ringer, na presença da membrana biológica. Capilar: 75  $\mu$ m, 40 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9.2), 10% (v/v) etanol; corrente: 80  $\mu$ A ; 25°C; injeção hidrodinâmica: 0.5 psi/10 s;  $\lambda$ =214 nm .....71

Figura 15. Curva analítica da lamivudina em solução de Ringer. Capilar: 75  $\mu$ m, 40 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9.2), 10% (v/v) etanol; corrente: 80  $\mu$ A ; 25°C; injeção hidrodinâmica: 0.5 psi/10 s;  $\lambda$ =214 nm.....73

Figura 16. Curva analítica do aciclovir em solução de Ringer. Capilar: 75  $\mu$ m, 40 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9.2), 10% (v/v) etanol; corrente: 80  $\mu$ A ; 25°C; injeção hidrodinâmica: 0.5 psi/10 s;  $\lambda$ =214 nm.....73

Figura 17. Curva analítica da zidovudina em solução de Ringer. Capilar: 75 $\mu$ m, 40 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9.2), 10% (v/v) etanol; corrente: 80 $\mu$ A ; 25°C; injeção hidrodinâmica: 0.5 psi/10 s; $\lambda$ =214 nm.....	74
Figura 18. Curva analítica da floridizina em solução de Ringer. Capilar: 75 $\mu$ m, 40 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9.2), 10% (v/v) etanol; corrente: 80 $\mu$ A ; 25°C; injeção hidrodinâmica: 0.5 psi/10 s; $\lambda$ =214 nm. ....	74
Figura 19. Curva analítica do metoprolol em solução de Ringer. Capilar: 75 $\mu$ m, 40 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9.2), 10% (v/v) etanol; corrente: 80 $\mu$ A ; 25°C; injeção hidrodinâmica: 0.5 psi/10 s; $\lambda$ =214 nm.....	75
Figura 20. Intestino delgado da rã-touro ( <i>Rana catesbeiana</i> ) em corte transversal, porções inicial (1), mediana (2) e final (3) observados em microscópio óptico (HE, aumento 12,5X).....	82
Figura 21. Intestino delgado da rã-touro em corte longitudinal, porções inicial (1), mediana (2) e final (3) observados em microscópio óptico (HE, aumento 12,5X).....	83
Figura 22. Quantidade permeada de lamivudina (ng) através do epitélio intestinal da rã-touro ( <i>Rana catesbeiana</i> ) em função do tempo (min). Média de duas determinações.....	96
Figura 23. Quantidade permeada de metoprolol (ng) através do epitélio intestinal da rã-touro ( <i>Rana catesbeiana</i> ) em função do tempo (min). Média de duas determinações.....	97
Figura 24. Quantidade permeada da lamivudina (ng) através do epitélio intestinal da rã-touro ( <i>Rana catesbeiana</i> ) em função do tempo. Obtenção da constante de absorção de primeira ordem ( $k_a$ ) por egressão linear. Média de duas determinações.....	97

Figura 25. Quantidade permeada do metoprolol (ng) através do epitélio intestinal da rã-touro (*Rana catesbeiana*) em função do tempo. Obtenção da constante de absorção de primeira ordem ( $k_a$ ) por regressão linear. Média de duas determinações.....98

## Lista de tabelas

Tabela 1. Matriz de ensaios codificada da Análise de Variância <i>three-way</i> obtida com o programa STATISTICA 7.0 <i>for Windows</i> e utilizada para os estudos de permeabilidade intestinal.....	59
Tabela 2. Codificação das variáveis presentes no planejamento estatístico utilizado para o estudo de permeação intestinal.....	60
Tabela 3. Resultados estatísticos obtidos por meio da regressão linear a partir das curvas analíticas para a quantificação de lamivudina, aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol em solução de Ringer.....	72
Tabela 4. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos na validação do método analítico para quantificação de lamivudina, aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol utilizando a técnica de cromatografia eletrocínética micelar (MEKC).....	76
Tabela 5. Precisão obtida para lamivudina, aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol a partir da determinação de 3 diferentes concentrações em um mesmo dia (intra-dia) e em 2 dias consecutivos (inter-dia) utilizando a técnica de cromatografia eletrocínética micelar (MEKC).....	77
Tabela 6. Exatidão obtida para lamivudina, aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol a partir da determinação de 3 diferentes concentrações em um mesmo dia (intra-dia) e em 2 dias consecutivos (inter-dia) utilizando a técnica de cromatografia eletrocínética micelar (MEKC).....	78
Tabela 7. Ensaio de estabilidade para lamivudina, aciclovir, zidovudina, flordizina em solução de Ringer pH 8,2, após 6 horas a temperatura ambiente.....	79

Tabela 8. Estabilidade para lamivudina, aciclovir, zidovudina e flordizina em solução de Ringer pH 8,2, após 30 dias a -20°C.....	80
Tabela 9. Ensaio de estabilidade para lamivudina, aciclovir, zidovudina e flordizina em solução de Ringer pH 8,2, após ciclos de congelamento e descongelamento.....	80
Tabela 10. Ensaio de estabilidade para o metoprolol em solução de Ringer pH 8,2, após 6 horas a temperatura ambiente.....	80
Tabela 11. Ensaio de estabilidade para o metoprolol em solução de Ringer pH 8,2, após 30 dias a -20°C.....	81
Tabela 12. Ensaio de estabilidade para o metoprolol em solução de Ringer pH 8,2, após ciclos de congelamento e descongelamento.....	81
Tabela 13. Média dos valores de resistência elétrica transepitelial (RET) medidos no início e no fim dos experimentos de permeabilidade intestinal.....	86
Tabela 14. Resultados de quantidade total permeada ( $Q_t$ ) de lamivudina durante o período de duas horas através da membrana intestinal de rã-touro ( <i>Rana catesbeiana</i> ) obtidos com concentração de 300 µg/mL em solução de Ringer.....	88
Tabela 15. Resultados de constante de absorção aparente ( $k_a$ ) para a lamivudina permeada através da membrana intestinal de rã-touro ( <i>Rana catesbeiana</i> ) durante o período de duas horas e obtidos com concentração de 300 µg/mL em solução de Ringer.....	89
Tabela 16. Resultados obtidos de coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) para a lamivudina permeada através da membrana intestinal de rã-touro ( <i>Rana catesbeiana</i> ) durante o período de duas horas e obtidos com concentração de 300 µg/mL em solução de Ringer.....	90

Tabela 17. Resultados de quantidade total permeada ( $Q_t$ ) de metoprolol durante o período de duas horas através da membrana intestinal de rã-touro ( <i>Rana catesbeiana</i> ) obtidos com concentração de 200 µg/mL em solução de Ringer.....	91
Tabela 18. Resultados de constante de absorção aparente ( $k_a$ ) para o metoprolol permeado através da membrana intestinal de rã-touro ( <i>Rana catesbeiana</i> ) durante o período de duas horas e obtidos com concentração de 200 µg/mL em solução de Ringer.....	92
Tabela 19. Resultados obtidos de coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) para o metoprolol permeado através da membrana intestinal de rã-touro ( <i>Rana catesbeiana</i> ) durante o período de duas horas e obtidos com concentração de 200 µg/mL em solução de Ringer.....	93
Tabela 20. Análise de variância (ANOVA) <i>three-way</i> para o coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) da lamivudina.....	94
Tabela 21. Análise de variância (ANOVA) <i>three-way</i> para o coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) do metoprolol.....	94
Tabela 22. Resultados de quantidade total permeada ( $Q_t$ ), constante de absorção de primeira ordem ( $k_a$ ) e coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) obtidos para a lamivudina e para o metoprolol em estudos de permeação utilizando epitélio intestinal de rã-touro ( <i>Rana catesbeiana</i> ).....	98
Tabela 23. Valores de coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app} \cdot 10^{-4}$ cm/s) para lamivudina e metoprolol obtidos no presente trabalho e os observados na literatura por meio de outros modelos experimentais.....	99

# Resumo

MONTEIRO, T.F. **Desenvolvimento de novo método *ex vivo* para estudo da permeabilidade de fármacos utilizando epitélio intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*)**. 146 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Este trabalho teve como objetivo propor novo método para estudar a permeabilidade de fármacos, utilizando epitélio intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*) em método *ex vivo*, empregando células de Franz. Por utilizar epitélio intestinal, um material de descarte proveniente de um animal utilizado como alimento humano, pode ser considerado um método alternativo, pois não implica no sacrifício de animais. A quantidade de fármaco permeada foi determinada por método de eletroforese capilar com detecção ultravioleta e validado para os antivirais lamivudina, zidovudina e aciclovir, na presença de metoprolol e flordizina. O fármaco escolhido como modelo nos ensaios de permeabilidade foi a lamivudina. Para estabelecimento do protocolo experimental dos estudos de permeabilidade, foi proposta uma análise de variância *three-way* para verificar a influência na permeabilidade dos fármacos, das seguintes variáveis: secção intestinal, pH da solução de Ringer e temperatura. Foram determinados a quantidade total de fármaco permeado ( $Q_t$ ), o coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) e a constante de absorção de primeira ordem ( $k_a$ ). A partir da análise do planejamento experimental, os efeitos das variáveis não foram significativos, exceto para a secção intestinal. Os resultados de coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) obtidos foram de  $0,09 \times 10^{-4}$  cm/s para lamivudina e de  $0,22 \times 10^{-4}$  cm/s para o metoprolol. O valor de  $P_{app}$  obtido de para o metoprolol é próximo dos valores encontrados na literatura para outras técnicas. Para a lamivudina, entretanto, a diferença encontrada em comparação às células Caco-2 pode ser devida às diferentes técnicas empregadas.

Palavras-chave: permeabilidade, epitélio intestinal, rã, célula de Franz, lamivudina

# Abstract

MONTEIRO, T.F. **Development of a new *ex vivo* method to study drugs permeability using intestinal epithelium of frog (*Rana catesbeiana*)** 146 p. Dissertation (Masters degree) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

This work aimed to propose a new method for studying drug permeability using frog intestinal epithelium (*Rana catesbeiana*) in *ex vivo* method, using Franz cells. By using intestinal epithelium, a disposal material from an animal used as human food, can be considered an alternative method, because it doesn't involve the sacrifice of animals. The amount of permeated drug was determined by capillary electrophoresis method with UV detection and validated for antiviral drugs lamivudine, zidovudine and acyclovir in the presence of metoprolol and floridizina. The drug chosen as a model in permeability studies was lamivudine. To establish the experimental protocol for the permeability studies, a three-way analysis of variance was proposed to check the influence of intestinal section, pH of Ringer's solution and the temperature on the permeability. Total amount of drug permeated ( $Q_t$ ), apparent permeability coefficient ( $P_{app}$ ) and first-order constant absorption ( $k_a$ ) were determined. By the analysis of experimental design, the effects of the variables were not significant, except for intestinal section. The results of apparent permeability coefficient ( $P_{app}$ ) obtained were  $0.09 \times 10^{-4}$  cm/s for lamivudine and  $0.22 \times 10^{-4}$  cm/s for metoprolol. The value of  $P_{app}$  obtained for metoprolol is quite close to the values found in literature for other methods. For lamivudine, however, the difference found in comparison to Caco-2 cells may be due to different techniques.

Key words: permeability, intestinal epithelium, frog, Franz cell, lamivudine

# **1 – INTRODUÇÃO**

Um dos principais desafios da indústria farmacêutica é introduzir, no mercado, novos medicamentos com boa biodisponibilidade oral, o que implica no desenvolvimento de uma grande variedade de produtos tendo em vista diferentes formas farmacêuticas, adequações de doses e outras modificações da formulação para aumentar a eficácia e segurança e, portanto, obter melhor adesão do paciente ao tratamento.

A eficácia terapêutica depende diretamente da biodisponibilidade dos fármacos, característica esta relacionada às propriedades de permeabilidade e solubilidade. Dessa forma, o sistema de classificação biofarmacêutica (SCB), proposto por AMIDON e colaboradores (1995), representa uma das ferramentas mais importantes para a predição desses parâmetros. Esse sistema é fundamentado no princípio de que o controle da extensão e velocidade de absorção de um fármaco, administrado por via oral, depende basicamente de dois aspectos: a solubilidade do próprio fármaco nos líquidos do trato gastrointestinal e sua permeabilidade através das membranas biológicas (LÖBENBERG; AMIDON, 2000; LINDENBERG *et al.*, 2004).

Nesse sentido, o SCB pode auxiliar na substituição dos estudos *in vivo* de biodisponibilidade e bioequivalência, por ensaios *in vitro/ex vivo*, que permitam conclusões sobre a solubilidade e a permeabilidade dos fármacos. A expectativa dessa medida é a redução da exposição de voluntários sadios aos fármacos candidatos à bioisenção, bem como a diminuição do custo e do tempo necessário para o desenvolvimento dos medicamentos (LÖBENBERG; AMIDON, 2000; POLLI *et al.*, 2004; LENNERNÄS; ABRAHAMSSON, 2005).

Uma boa disponibilidade oral ocorre quando o fármaco tem máxima permeabilidade e máxima solubilidade no sítio de absorção, portanto, a quantidade absorvida de fármaco pode ser estimada com base nas suas características de permeabilidade e solubilidade (EGAN; LAURI, 2002). Dessa forma, a avaliação da permeabilidade intestinal é essencial na estimativa da biodisponibilidade oral de candidatos a novos fármacos, em estudos de pré-formulação e no desenvolvimento farmacotécnico para avaliação dos efeitos dos vários excipientes e na eleição de adjuvantes para atuar como co-solventes ou promotores da absorção na permeabilidade intestinal (SAHA; KOU, 2000).

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

O uso de monocamadas de células Caco-2 ganhou popularidade como ferramenta de avaliação *in vitro* da absorção primária em várias companhias farmacêuticas e diversos exemplos de sucesso na correlação com estudos de biodisponibilidade foram obtidos (ARTURSSON; KARLSSON, 1991; LENNERNÄS *et al.*, 1996; LENTZ *et al.*, 2000; CHENG *et al.*, 2006). Entretanto, a realização dos ensaios em membranas de cultura celular Caco-2 apresenta algumas desvantagens, tais como, um maior tempo necessário, alto custo por ensaio, além de requerer um período de mais de 21 dias para o crescimento celular e cuidados regulares durante o preparo de monocamadas estáveis (TUKKER, 2000).

Vários trabalhos demonstram os esforços para diminuir o tempo e o custo do método de cultura celular, com a aplicação de protocolos com menores períodos de tempo para o estudo (YAMASHITA *et al.*, 2002; ALSENZ; HAENEL, 2003). Ainda, pelo fato das culturas celulares Caco-2 serem conhecidas por aumentar o efluxo de glicoproteína-P, o que pode levar à diminuição da estimativa da absorção de alguns compostos, novos modelos para prever a permeabilidade intestinal em humanos passaram a ser objeto de interesse deste tipo de estudo (TRAPANI *et al.*, 2004). Além das células Caco-2, as células TC-7, as 2/4/A1 e as MDCK (Madin-Darby canine kidney) também podem ser usadas na avaliação da permeabilidade intestinal de fármacos (BALIMANE *et al.*, 2000).

Dentre as alternativas para o uso de culturas celulares, estão os procedimentos baseados na perfusão *in situ* e o uso de sacos intestinais isolados de animais e humanos. Um dos obstáculos desses métodos, no entanto, é o fato de serem inadequados para a avaliação de um grande número de compostos. Os estudos de permeabilidade deste tipo são rotineiramente realizados em diferentes espécies de animais, incluindo: ratos, coelhos, porcos, cachorros e macacos (TUKKER, 2000).

No entanto, os dispositivos mais empregados nos ensaios de permeabilidade com membrana intestinal animal incluem cubas de difusão verticais, separadas pela membrana em estudo (ZAKELJ *et al.*, 2004; ZAKELJ *et al.*, 2006) e saco intestinal invertido (TUKKER, 2000) ou não (TRAPANI *et al.*, 2004, FRANCO *et al.*, 2008). Todavia, modelos que incluem células de Franz são frequentemente usados em estudos de permeação cutânea (LOPEZ *et al.*, 2000; RÖPKE *et al.*, 2002; HERAI *et al.*, 2007).

Não obstante, é importante ressaltar que há carência de protocolos padronizados para os estudos de permeabilidade. Assim, muitos dos dados disponíveis na literatura sobre essa importante propriedade podem não ser confiáveis ou conclusivos.

O uso de membrana intestinal de rã (*Rana esculenta*) tem sido estudado, recentemente, por TRAPANI e colaboradores (2004) e FRANCO e colaboradores (2008), como alternativa aos demais modelos de membranas animais, demonstrando que o coeficiente de permeabilidade obtido a partir dos experimentos com intestinos delgados isolados de rãs apresenta uma boa correlação com estudos *in vivo* da absorção peroral em humanos para compostos que são passivamente ou ativamente absorvidos. Consequentemente, os autores também demonstraram que os modelos de permeabilidade empregando intestino de rãs podem ser usados como ferramenta de classificação biofarmacêutica (TRAPANI *et al.*, 2004; FRANCO *et al.*, 2008).

Como o intestino delgado da rã possui a composição de suas membranas e vilosidades igual às dos demais vertebrados, assim como os mesmos mecanismos de transporte, ele demonstrou ser adequado para os estudos de absorção intestinal (SAIDANE *et al.*, 1997; TUKKER, 2000; TRAPANI *et al.*, 2004; FRANCO *et al.*, 2008). Considerando que há

pouquíssimos estudos sobre o emprego do epitélio intestinal de rã nos estudos da permeabilidade de fármacos e, frente aos promissores resultados apresentados por TRAPANI e colaboradores (2004) e FRANCO e colaboradores (2008), é de grande importância o desenvolvimento de novos protocolos de ensaios de permeabilidade intestinal considerando essa membrana (TRAPANI *et al.*, 2004; FRANCO *et al.*, 2008).

## **2 - REVISÃO DA LITERATURA**

## 2.1. Biodisponibilidade e bioequivalência

As formas farmacêuticas sólidas são as mais prescritas na prática médica, pois nesse caso, há maior adesão do paciente uma vez que a administração é segura e prática (GILMAN, 2006). Em uma pesquisa feita nos Estados Unidos e na Europa em 2001, 84% dos 50 tipos de medicamentos mais vendidos são de administração oral, o que mostra a necessidade de uma atenção maior aos processos que ocorrem com o esse tipo de medicamento no organismo após sua administração (LENNERNÄS; ABRAHAMSSON, 2005).

Apenas a correta ingestão do medicamento ao paciente não garante sua eficácia terapêutica; é necessário que a forma farmacêutica se desintegre, liberando o fármaco para ser absorvido através do trato gastrointestinal e assim, estar biodisponível na corrente sanguínea (ASHFORD, 2005a). A biodisponibilidade pode ser definida como a velocidade e a extensão com que um fármaco é absorvido a partir do medicamento, tornando-se disponível no local de ação (SHARGEL *et al.*, 2005). Segundo a agência regulatória americana “*Food and Drug Administration*” (FDA), é definida como a quantidade de fármaco absorvida a partir de uma forma farmacêutica e a velocidade com que isso ocorre (FDA, 2003). Diante dessa definição, verifica-se que a biodisponibilidade é decorrente da administração do fármaco no organismo e que, por citar a forma farmacêutica, torna explícito que a mesma pode influenciá-la (STORPIRTIS *et al.*, 1999).

O “*Note for Guidance on the Investigation of Bioavailability and Bioequivalence*” do “*Committee for Proprietary Medicinal Products*” (CPMP) traz uma definição mais abrangente: “biodisponibilidade é a extensão e a velocidade com a qual a substância ativa é absorvida a partir de uma forma farmacêutica e se torna disponível na circulação sistêmica” (EMA, 2001).

Um fármaco administrado por via intravenosa, isto é, quando colocado diretamente no sangue, apresenta 100% de biodisponibilidade, entretanto, quando outra via for utilizada, como, por exemplo, a oral, não existe garantia de que toda a dose administrada alcançará a circulação sistêmica de maneira intacta. Essa quantidade de fármaco administrada e que alcança a circulação sanguínea de forma inalterada é chamada de dose biodisponível e a velocidade com que isso ocorre é a biodisponibilidade. Portanto, esta tem uma

importância peculiar, pois determina se o fármaco se encontra em seu sítio de ação numa quantidade terapêuticamente adequada (ASHFORD, 2005a).

Novas formulações contendo substâncias farmacologicamente ativas, para serem aprovadas pela FDA, devem passar pelos estudos de biodisponibilidade, antes de entrarem no mercado. Esses estudos definem o efeito causado pelas propriedades físico-químicas do fármaco e pela forma farmacêutica na farmacocinética do fármaco e, além disso, determinam a segurança e a eficácia do medicamento (SHARGEL *et al.*, 2005).

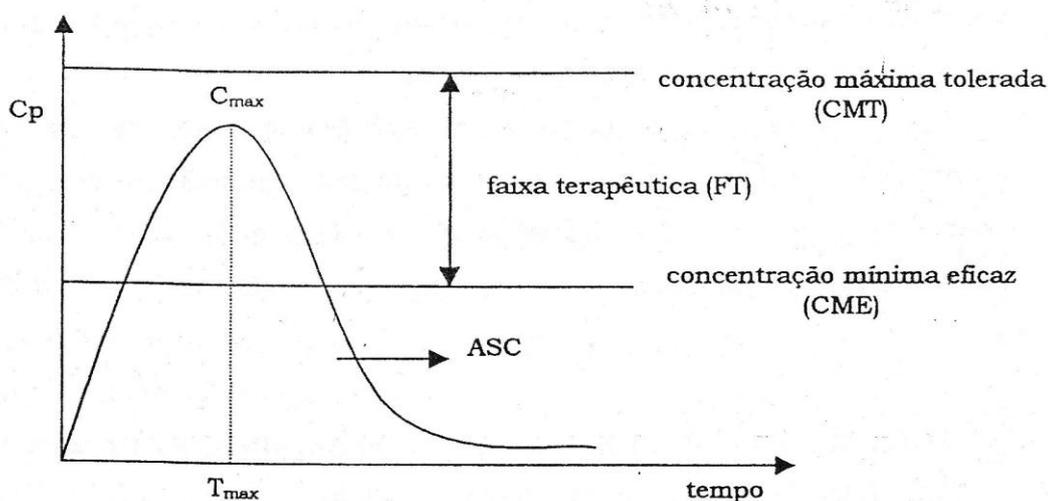
Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a bioequivalência é a demonstração de equivalência farmacêutica entre produtos apresentados sob a mesma forma farmacêutica, contendo a mesma composição qualitativa e quantitativa de princípio (s) ativo (s) e que tenham comparável biodisponibilidade quando estudados sob um mesmo desenho experimental (BRASIL, 1999).

A FDA define bioequivalência como a ausência de diferença significativa na velocidade e extensão pelas quais o fármaco presente em equivalentes farmacêuticos (ou alternativas farmacêuticas) torna-se disponível no local de ação, quando administrado na mesma dose molar e nas mesmas condições, em um estudo planejado adequadamente (FDA, 2003). Conforme a definição dada pela “European Agency for the Evaluation of Medicinal Products” (EMEA), dois produtos farmacêuticos são bioequivalentes se forem equivalentes farmacêuticos ou alternativas farmacêuticas e, quando administrados na mesma dose molar, apresentem biodisponibilidades semelhantes garantindo os mesmos efeitos relacionados à eficácia e à segurança (EMA, 2001).

Com o aparecimento de casos de intoxicação por alguns medicamentos ou de ineficácia clínica pelo uso de outros, a biodisponibilidade dos produtos farmacêuticos passou a ser investigada. Além disso, a falta da bioequivalência entre produtos comercializados como genéricos ou similares também demonstrou que, possíveis variações na formulação ou na técnica de produção poderiam alterar, significativamente, a absorção do fármaco. Diante disso, a FDA buscou a regulamentação dos critérios relativos à biodisponibilidade e à bioequivalência de medicamentos (STORPIRTIS; CONSIGLIERI, 1995; CONSIGLIERI *et al.*, 2000).

Os estudos de biodisponibilidade são exigidos em situações tais como: estudos de bioequivalência entre medicamentos, aprovação de medicamentos que contenham fármacos novos na terapêutica, desenvolvimento de novas formulações contendo fármacos terapêuticamente já utilizados, estudo de formulações já utilizadas na terapêutica, mas que sofreram alterações significativas, desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação controlada e de formulações que contem mais de um princípio ativo (STORPIRTIS; CONSIGLIERI, 1995).

Nos estudos de biodisponibilidade, parâmetros, como a ASC (área sob a curva de concentração plasmática *versus* tempo),  $C_{max}$  (concentração plasmática máxima atingida após a administração da dose de fármaco) e  $T_{max}$  (tempo em que  $C_{max}$  é alcançada) são determinados, pois refletem o perfil de absorção do fármaco, outros parâmetros como a concentração máxima tolerada (CMT) e a concentração mínima eficaz (CME) podem ser determinados e refletem a segurança e a eficácia do medicamento (STORPIRTIS, 1999), respectivamente, conforme o esquema na Figura 1.



**Figura 1.** Parâmetros relacionados à eficácia e segurança de um medicamento (STORPIRTIS, 1999).

Na determinação da biodisponibilidade de um medicamento, devem-se usar organismos vivos. Para substâncias administradas por via oral, altamente solúveis, altamente permeáveis e de rápida dissolução, a biodisponibilidade e a

bioequivalência podem ser avaliadas utilizando-se modelos *in vitro*, baseados no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (FDA, 2003).

A biodisponibilidade sistêmica pode ser determinada a partir de amostras de sangue ou de urina do paciente que recebeu uma dose do fármaco por via oral, comparando-se esses valores com os obtidos a partir da administração intravenosa (GIBALDI, 1991).

O planejamento de um estudo de biodisponibilidade depende de seus objetivos, da capacidade de analisar a substância e seus metabólitos nos fluidos biológicos, da farmacodinâmica do fármaco, da via de administração e ainda, do tipo de forma farmacêutica. Parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos, assim como estudos *in vitro* e observações clínicas podem ser usados para determinar a biodisponibilidade de um fármaco a partir da forma farmacêutica (SHARGEL *et al.*, 2005).

Vários fatores podem influenciar a biodisponibilidade do fármaco (STORPIRTIS; CONSIGLIERI, 1995; STORPIRTIS *et al.*, 1999; CONSIGLIERI *et al.*, 2000; KARALIS *et al.*, 2008), podendo estar relacionados:

- **ao paciente:** idade, fisiologia da membrana biológica, pH e fluxo sanguíneo do trato gastrintestinal, tempo de esvaziamento gástrico, alimentação, entre outros.
- **ao fármaco:** tamanho de partícula, polimorfismo, estado físico,  $pK_a$ , coeficiente de partição óleo-água ( $\log P$ ), quiralidade, metabolismo pré-sistêmico.
- **à natureza dos excipientes presentes na formulação:** natureza química, capacidade de adsorção, quantidade utilizada.
- **ao processo de fabricação do medicamento:** técnica de produção (mistura, agitação, secagem), força de compressão, entre outros.

Para a maioria dos fármacos, quando uma dose é administrada por via oral, não há completa absorção. Alguns apresentam baixa permeabilidade e são lentamente absorvidos, ainda que administrados em solução. Outros possuem baixa solubilidade aquosa, apresentando um perfil de dissolução deficiente no momento em que deveriam estar disponíveis para serem absorvidos. E ainda, há aqueles que apresentam baixa biodisponibilidade por sofrerem degradação química ou bacteriana no trato gastrintestinal (GIBALDI, 1991).

## **2.2. Fatores que afetam a biodisponibilidade dos fármacos**

O trânsito do fármaco pelo organismo é algo complexo, devido à diversidade de interações que ocorrem entre a substância e os mecanismos fisiológicos ou com fatores externos, que acabam afetando a resposta terapêutica esperada (KARALIS *et al.*, 2008).

O desenvolvimento de um medicamento adequado requer o entendimento dos fatores que afetam a absorção do fármaco, para garantir sua eficácia terapêutica e evitar possíveis interações (SHARGEL *et al.*, 2005).

Os fatores que afetam a absorção dos fármacos podem estar relacionados às suas características físico-químicas (solubilidade, polimorfismo, tamanho de partícula, coeficiente de partição), às características farmacêuticas (tipo de forma farmacêutica, adjuvantes farmacotécnicos, tecnologia envolvida na produção), e às características fisiológicas (anatomia do trato gastrointestinal, esvaziamento gástrico, trânsito intestinal, fluxo sanguíneo intestinal) (ASHFORD, 2005b; STORPIRTIS *et al.*, 1999).

### **2.2.1. Propriedades físico-químicas do fármaco**

#### **2.2.1.1. Solubilidade**

A passagem de moléculas de uma substância do seu estado sólido para a solução é chamada de dissolução e a extensão em que isso ocorre, sob determinadas condições experimentais, é denominada solubilidade (AULTON, 2005). Essa propriedade pode ser estimada pela habilidade da substância partir de um ambiente lipídico para outro aquoso. Esse comportamento se dá em função do pH do solvente, uma vez que esse influencia a ionização do fármaco (MARTINEZ; AMIDON, 2002).

A grande maioria das moléculas de fármacos são ácidos ou bases fracas, cujo grau de ionização depende do pH do meio e do  $pK_a$  (constante de ionização) da substância. A ionização tem grande importância na absorção dos fármacos, pois a forma ionizada apresenta maior solubilidade aquosa que a forma não-ionizada. Portanto, a velocidade de dissolução do soluto num meio

aquoso é bastante afetada pelo pH desse meio (MARTINEZ; AMIDON, 2002; MAYERSOHN, 1996).

Substâncias com solubilidade aquosa menor que 100 µg/mL apresentam, frequentemente, a dissolução limitando sua absorção (HÖRTER; DRESSMAN, 2001).

Para determinar o efeito do pH do meio no grau de ionização, pode-se usar a equação de Henderson-Hasselback (MARTINEZ; AMIDON, 2002):

Para ácido fraco:

$$\% \text{ não ionizada} = \frac{100}{[1 + \text{antilog}(pH - pKa)]} \quad (\text{Equação 1})$$

Para base fraca:

$$\% \text{ não ionizada} = \frac{100}{[1 + \text{antilog}(pKa - pH)]} \quad (\text{Equação 2})$$

Substâncias fracamente básicas se dissolvem lentamente em pH básico, pois, nesse caso, a maioria das moléculas está na forma não ionizada, porém, substâncias fracamente ácidas se dissolvem rapidamente em pH elevado, já que, a maioria das moléculas está na forma ionizada (MARTINEZ; AMIDON, 2002). Dessa forma, a solubilidade de fármacos fracamente ácidos vai aumentando à medida que vai avançando ao longo do trato gastrintestinal, do estômago para o intestino; porém, no caso de bases fracas, diminui à medida que o fármaco desce o trato gastrintestinal. Sendo assim, é importante que fármacos de caráter básico se dissolvam no estômago, já que no intestino isso acontecerá de modo mais lento (ASHFORD, 2005c).

Geralmente, a solubilidade aquosa de um fármaco é diretamente proporcional à sua capacidade de fazer ligações de hidrogênio com a água. Uma elevada solubilidade aquosa facilita a dissolução do fármaco em meios aquosos, porém dificulta a permeação do fármaco devido à sua elevada polaridade e à sua baixa lipofilicidade. Quando se comparam a porcentagem absorvida *versus* a solubilidade do fármaco ou a porcentagem absorvida *versus* a capacidade da molécula do fármaco em fazer ligações de hidrogênio, verifica-se uma correlação negativa (MARTINEZ; AMIDON, 2002).

A proporção do fármaco na sua forma não-ionizada não é o único fator que determina a sua absorção a partir do trato gastrointestinal. Ácidos fracos, apesar de estarem ionizados, também são bem absorvidos no intestino delgado, podendo apresentar, muitas vezes, velocidade de absorção intestinal maior do que sua velocidade de absorção no estômago. Isso acontece, pois a superfície de absorção intestinal é maior, o que compensa o elevado grau de ionização no intestino. E ainda, o tempo de residência mais prolongado no intestino delgado e o fato do pH da superfície da mucosa do intestino delgado ser menor que o pH do lúmen intestinal são elementos que também favorecem a absorção de ácidos fracos no intestino delgado (ASHFORD, 2005c).

#### **2.2.1.2. Polimorfismo**

Polimorfismo é a capacidade que muitos fármacos têm de existirem em mais de uma forma cristalina. Essas formas são, quimicamente, idênticas, porém apresentam diferentes propriedades físicas tais como, densidade, ponto de fusão, solubilidade e velocidade de dissolução. A uma determinada temperatura e pressão, somente um cristal será estável, enquanto os demais, metaestáveis. Estas formas apresentam a maior energia, o menor ponto de fusão, a maior solubilidade e a maior velocidade de dissolução, no entanto, elas podem se converter nas formas mais estáveis ainda que lentamente (GIBALDI, 1991).

Existem ainda, as formas amorfas que ocorrem com alguns fármacos, essas são, pelo menos, dez vezes mais solúveis que a forma cristalina. Outras substâncias podem se associar com moléculas de solvente formando um solvato e, quando o solvente é a água, é chamado hidrato. Vários estudos sugerem que a forma solvatada com solventes orgânicos deve dissolver-se mais rapidamente que a forma anidra (GIBALDI, 1991).

As formas polimórficas podem ser caracterizadas pela aparência externa do cristal e pelas estruturas internas. A forma do cristal varia de tabular, laminar, prismática, acicular a cúbica, enquanto que a estrutura interna possui arranjos moleculares detectáveis por espectros obtidos por difração de raios-X (STORPIRTIS *et al.*, 1999).

O polimorfismo de alguns fármacos pode influenciar sua solubilidade e, conseqüentemente a velocidade de dissolução. Porém nem sempre, o aumento dessa velocidade por meio da escolha do polimorfo apropriado significa uma melhora na biodisponibilidade. Para o analgésico diflunisal, a solubilidade da sua forma metaestável é duas vezes maior que a da forma mais estável, contudo, não se observa diferença estatisticamente significativa na concentração plasmática do fármaco. Existem casos em que o aumento da biodisponibilidade se dá também pela escolha do polimorfo apropriado, mas não, necessariamente, pelo aumento da solubilidade do fármaco. Para o palmitato de cloranfenicol, por exemplo, a velocidade das reações de hidrólise enzimáticas são diferentes entre seus polimorfos e, diante do fato que a base livre é melhor absorvida, o controle da velocidade de absorção se dá, nesse caso, pela velocidade de conversão do éster em base (HÖRTER; DRESSMAN, 2001).

Durante o desenvolvimento de novas formulações, prefere-se formular utilizando-se o polimorfo termodinamicamente mais estável, a fim de garantir a estabilidade do medicamento além do tempo em que ele permanece armazenado na prateleira do estabelecimento de saúde, embora em condições reais de armazenamento. Porém, em alguns casos, o uso do polimorfo metaestável ou do amorfo é justificável quando algum benefício clínico é alcançado (SINGHAL; CURATOLO, 2004).

O desenvolvimento de um produto farmacêutico bioequivalente contendo um polimorfo metaestável é uma tarefa difícil, no entanto, às vezes, é possível. Embora não seja fácil, o elevado valor de  $C_{max}$  obtido pela alta velocidade de dissolução apresentada pelo polimorfo metaestável pode ser reduzido (SINGHAL; CURATOLO, 2004).

O grande problema em utilizar um polimorfo metaestável, que resulta na melhora da velocidade de dissolução, é a eventual conversão dessa forma com a maior energia e maior solubilidade em outra forma cristalina com a menor energia. A utilização comercial de formas metaestáveis é limitada pela possibilidade de conversão entre os polimorfos durante a produção e, posteriormente, durante o armazenamento do medicamento (HÖRTER; DRESSMAN, 2001).

O maior efeito sobre a velocidade de dissolução entre polimorfos é esperado para substâncias que apresentam alta permeabilidade e baixa solubilidade (classificadas como Classe II, segundo o SCB), pois nesse caso, a solubilidade estará limitando a absorção oral da substância. Já, para substâncias que apresentam alta solubilidade no trato gastrointestinal, a diferença na biodisponibilidade dos polimorfos será mínima ou poderá nem existir, pois nesse caso, a solubilidade não estará limitando a absorção oral da substância (SINGHAL; CURATOLO, 2004).

As formas metaestáveis, assim como as amorfas, podem ser estabilizadas, utilizando-se, durante a formulação, excipientes adequados, a fim de garantir estabilidade química e física durante seu armazenamento e sem comprometer a absorção oral da substância. Porém, é um desafio, pois o uso de aditivos para aumentar a estabilidade envolve um sistema de duas fases (polimorfo e estabilizante) em que o fármaco não está em contato íntimo com o estabilizante. Além disso, todo cuidado deve ser tomado para garantir que os estudos de estabilidade englobem todas as condições reais que o medicamento encontrará durante sua produção e armazenamento (SINGHAL; CURATOLO, 2004).

Portanto, a não ser que sejam tomadas as devidas precauções no sentido de assegurar a incorporação de um polimorfo menos estável e terapeuticamente mais efetivo a uma forma farmacêutica, poderão surgir variáveis inaceitáveis na eficácia terapêutica do medicamento (ASHFORD, 2005c).

### **2.2.1.3. Tamanho de partícula e área superficial**

A redução do tamanho de partícula aumenta, consideravelmente, a área superficial do fármaco. Como a dissolução da substância depende da sua área superficial exposta para o solvente, quanto maior a área, maior será a velocidade de dissolução do fármaco. Dessa forma, o conhecimento e o estudo do tamanho das partículas são importantes, principalmente, para substâncias que apresentam baixa solubilidade aquosa (SHARGEL *et al.*, 2005).

Noyes e Whitney (1991) afirmaram que a velocidade de dissolução de um sólido é diretamente proporcional a sua área superficial exposta ao meio de

dissolução (STORPIRTIS *et al.*, 1999), conforme mostra a equação a seguir (ASHFORD, 2005c):

$$\frac{dC}{dt} = \frac{D \cdot A \cdot (C_s - C)}{h} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

$dC / dt$ : velocidade de dissolução das partículas de fármaco

D: coeficiente de difusão fármaco em solução nos fluidos gastrintestinais

A: superfície efetiva das partículas de fármaco em contato com as partículas gastrintestinais

h: espessura da camada difusional ao redor de cada partícula de fármaco

$C_s$ : solubilidade de saturação do fármaco em solução na camada difusional

C: concentração de fármaco nos fluidos gastrintestinais

A redução do tamanho de partícula para 3-5  $\mu\text{m}$  é, frequentemente, uma excelente estratégia para o aumento da dissolução de fármacos pouco solúveis (HÖRTER; DRESSMAN, 2001).

Quando a substância não é suficientemente absorvida para ser terapeuticamente eficaz e também não é solúvel o bastante para uma ação intestinal local, a redução do tamanho de partícula pode melhorar a eficácia terapêutica. Para uma ação local no trato gastrintestinal, pode ser necessário utilizar partícula com tamanho maior (STORPIRTIS *et al.*, 1999).

A área superficial está relacionada com a capacidade do solvente em penetrar e molhar as partículas de fármaco. Quando o meio de dissolução tem baixa capacidade de molhar, a micronização das partículas do fármaco pode, algumas vezes, diminuir a velocidade de dissolução devido à aglomeração das mesmas (HÖRTER; DRESSMAN, 2001). Ou, a diminuição do tamanho de partícula pode não exercer influência alguma sobre a absorção do fármaco quando este for suficientemente solúvel (STORPIRTIS *et al.*, 1999).

Para alguns fármacos, principalmente os de natureza hidrofóbica, a micronização e outras técnicas de redução de tamanho de partícula a seco podem aumentar a tendência de aglomeração das partículas de pó, acabando por diminuir a área superficial em contato com os líquidos gastrintestinais,

reduzindo a velocidade de dissolução e, conseqüentemente, a biodisponibilidade do fármaco (ASHFORD, 2005c; GIBALDI, 1991).

A aglomeração pode, no entanto, ser evitada com a adição de um agente molhante à formulação. Ou ainda, pode-se misturar o fármaco hidrofóbico a um excesso de carreador hidrofílico, como a lactose (GIBALDI, 1991).

A melhora na absorção, como resultado da diminuição do tamanho de partícula, pode gerar efeitos tóxicos (STORPIRTIS *et al.*, 1999). Além disso, a redução de tamanho de partícula pode favorecer a degradação química do fármaco e, assim, reduzir sua quantidade, na forma intacta, disponível para ser absorvida (ASHFORD, 2005c).

## **2.2.2. Características fisiológicas**

### **2.2.2.1. Fisiologia da membrana biológica**

A barreira que separa o lúmen do trato gastrintestinal da circulação sistêmica é uma estrutura complexa composta por lipídios, proteínas, lipoproteínas e polissacarídeos distribuídos em uma bicamada, (ASHFORD, 2005b). Essa barreira gastrintestinal é semipermeável, permitindo e facilitando a rápida passagem de algumas substâncias, enquanto dificulta e lentifica a de outras. Como a maioria dos medicamentos é administrada por via oral, eles devem atravessar essa barreira para que alcancem a circulação sanguínea e por isso, o conhecimento das características da membrana do trato gastrintestinal é de extrema importância para a biofarmácia (GIBALDI, 1991).

Pelo fato do fármaco ter que, primeiramente, atravessar membranas biológicas, os estudos recentes de pré-formulação incluem também a avaliação inicial da passagem das moléculas de fármaco através dessas membranas (ANSEL *et al.*, 2007).

A membrana biológica contém numerosos poros ou canais aquosos e uma série de moléculas carreadoras que a atravessam. Substâncias hidrofóbicas penetram a membrana diretamente pela porção lipídica, enquanto que os poros são permeáveis à água, aos íons monovalentes, aos solutos hidrofílicos com tamanho molecular pequeno, pois os poros da região proximal

do intestino têm um raio de 7.5 Å ( $7.5 \times 10^{-7}$  mm) e os da região distal são de 3.5 Å ( $3.5 \times 10^{-7}$  mm). Pelo tamanho molecular da maioria das substâncias, sugere-se que esse tipo de transporte seja o de menor importância para a absorção do fármaco. As substâncias hidrofílicas com um tamanho que as impossibilita de atravessar os poros são transportadas por carreadores também presentes na membrana (GIBALDI, 1991).

O transporte através da membrana pode acontecer de diferentes maneiras: transporte passivo (difusão) transcelular, ou seja, pelas células; transporte passivo (difusão) paracelular, por entre as células; transporte mediado por carreadores no sentido absorptivo ou secretório; e transporte por vesículas (LOBENBERG; AMIDON, 2000; ESCUDER-GILABERT *et al.*, 2003; GONÇALVES *et al.*, 2009).

A difusão passiva é o tipo mais comum de transporte de fármacos através das membranas biológicas. Esse transporte se dá, espontaneamente, de uma região mais concentrada do fármaco para outra de menor concentração do fármaco e, por ir a favor de uma gradiente de concentração, não envolve gasto energético (GIBALDI, 1991). O transporte passivo pode ser descrito pela Lei de difusão de Fick, conforme a equação abaixo (SHARGEL *et al.*, 2005):

$$\frac{dQ}{dt} = \left[ \frac{D \cdot A \cdot K}{h} \right] \times (C_{gi} - C_p) \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

$dQ / dt$  = velocidade de difusão;

D = coeficiente de difusão;

K = coeficiente de partição óleo/água do fármaco na membrana biológica;

A = área superficial da membrana;

h = espessura da membrana;

$C_{gi} - C_p$  = diferença entre as concentrações do fármaco no trato gastrointestinal e no plasma.

Segundo a Lei de Fick, vários fatores podem influenciar a velocidade de absorção de substâncias absorvidas passivamente, dentre eles podem ser

citados: (i) o grau de solubilidade lipídica da substância, representado por K, uma vez que quanto maior for a hidrofobicidade das substâncias, maior será o valor de K e (ii) a área superficial da membrana, representada por A: as substâncias podem ser absorvidas pela maior parte do trato gastrintestinal, porém, o duodeno apresenta maior absorção, devido à presença das microvilosidades que aumentam, efetivamente, a área superficial (SHARGEL *et al.*, 2005).

O processo de difusão passiva indica que a transferência de uma substância a partir de uma fase aquosa para a membrana pode ser descrito pelos princípios físico-químicos e pelas propriedades da membrana biológica, a qual não participa do processo de transferência, apenas age como uma simples barreira para a difusão (MAYERSOHN, 1996; NELSON e COX, 2006).

O transporte passivo pode ocorrer de maneira paracelular ou transcelular, entretanto, para fármacos com peso molecular acima de 200 Da, a rota paracelular tem menor importância (PELKONEN *et al.*, 2001). Essa rota se dá, principalmente, para os fármacos catiônicos (KARLSSON *et al.*, 1993), além disso, fármacos de pequeno tamanho e hidrofílicos podem permear, significativamente, o epitélio intestinal por essa via, principalmente, na porção inicial do intestino delgado em que esse transporte é mais marcante (ARTURSSON *et al.*, 1993).

O transporte mediado por carreadores é o tipo de transporte que se dá contra um gradiente de concentração, isto é, a substância é transportada de um local de baixa concentração para outro de alta concentração e, por isso, envolve gasto energético (ASHFORD, 2005b). Há uma série de proteínas transportadoras envolvidas no processo de absorção intestinal e a quantidade delas no intestino é limitada e ainda, conforme aumenta a concentração do fármaco, a quantidade de carreadores livres diminui, diminuindo-se assim, a quantidade de fármaco que atravessa, efetivamente, a membrana, até atingir a saturação desse sistema. Isso sugere que a biodisponibilidade de um fármaco absorvido desse modo deve diminuir conforme aumenta a dose administrada (GIBALDI, 1991).

As proteínas transportadoras estão envolvidas em processos de influxo e efluxo de substâncias nos diversos tecidos (MARTINEZ; AMIDON, 2002). Os transportadores de captação facilitam a translocação dos fármacos através das

células. Dentro desta classe estão os polipeptídeos aniônicos orgânicos e os cátions orgânicos, além da família dos transportadores peptídicos (PEPT). Os transportadores de efluxo agem expulsando o fármaco do ambiente intracelular, a maioria deles pertencem à família das proteínas transmembrânicas de ATP e usam a energia derivada da hidrólise do ATP para transportar o substrato através da membrana biológica. Dentro desta classe de transportadores, está a família das glicoproteínas-P (BONAMICI, 2009).

Como exemplo de transportadores e seus substratos, podem-se citar os monocarboxilatos que transportam o ácido salicílico e a pravastatina e, também, o dipeptídeo intestinal (PepT1) que transporta análogos de nucleosídeos, antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, inibidores da enzima conversora de angiotensina, entre outros (LEE, 2000).

Os sistemas transportadores mais estudados são: transportador dipeptídeo (PepT1) e glicoproteína P (P-gp), devido à grande quantidade de substratos específicos que transportam (MARTINEZ; AMIDON, 2002).

Outra característica do transporte mediado por carreadores é a competição entre substâncias similares pelo mesmo mecanismo de translocação e, conseqüentemente, a inibição da absorção de uma delas ou de ambas (GIBALDI, 1991).

O transporte vesicular, conhecido também como endocitose, é o processo em que as substâncias são absorvidas pelas células da membrana por meio da formação de vesículas. Existem três principais formas desse tipo de transporte: a fagocitose, em que as células emitem os pseudópodos na ingestão de partículas grandes; a pinocitose, em que os fluidos são ingeridos por pequenas vesículas; e a endocitose mediada por um receptor, em que uma molécula do meio extracelular se liga à membrana, formando nela uma depressão, que aumenta até formar um vacúolo e entra na célula (GONÇALVES *et al.*, 2009).

### **2.2.2.2. Anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal**

O trato gastrointestinal (TGI) é uma região corpórea altamente especializada. Suas principais funções são: secreção, digestão e absorção. Dentre as secreções, têm-se os eletrólitos, as secreções enzimáticas da saliva e do pâncreas e o muco, cada uma com sua função específica. As enzimas, por exemplo, estão envolvidas no processo de digestão (SHARGEL *et al.*, 2005).

O TGI é composto pela cavidade oral, esôfago, estômago, intestino delgado (duodeno, jejuno, íleo), intestino grosso (cólon, reto), o pâncreas, o fígado e a vesícula biliar (MAYERSOHN, 1996). Seus principais segmentos, estômago, intestino delgado e grosso, diferem-se entre si anatômica e morfológicamente e, também, com relação às secreções e ao pH local (GIBALDI, 1991).

A absorção de ácidos fracos e de certas bases fracas pode ocorrer no estômago, porém, sob condições normais de esvaziamento gástrico, o papel absorptivo do estômago é moderado. Já o intestino delgado é o principal local para a absorção de fármacos no trato gastrointestinal (GIBALDI, 1991).

O intestino delgado é a maior porção do TGI e a responsável pela maior absorção de compostos ingeridos. A área superficial dessa região, onde ocorre a absorção das substâncias é, significativamente, maior devido à presença de projeções da mucosa em direção ao lúmen, sendo essas conhecidas como vilosidades e ainda, projetando-se a partir dessas, têm-se as microvilosidades que aumentam, ainda mais, a área superficial efetiva do intestino. As microvilosidades possuem a borda estriada, sendo nesse local o início do processo absorptivo. Além de aumentarem a área superficial, apresentam também, importante atividade bioquímica (MAYERSOHN, 1996).

O intestino grosso, de acordo com suas funções, pode ser dividido em duas partes. A primeira, que inclui o ceco, o cólon ascendente e porções do cólon transversal, é responsável pela absorção de água e eletrólitos, enquanto a segunda parte, constituída pelo cólon descendente, o reto e as regiões anais, é responsável pelo armazenamento da massa fecal (MAYERSOHN, 1996). Essa porção final do TGI, apesar de não possuir enzimas, apresenta uma

marcante flora bacteriana que pode conter diferentes microrganismos capazes de realizar reações de redução ou de produzir enzimas que degradem alimentos ou fármacos ingeridos (BEAUMONT, 2003).

#### **2.2.2.2.1. Esvaziamento gástrico**

O tempo que uma forma farmacêutica leva para atravessar o estômago pode ser denominado como tempo de residência gástrica ou tempo de esvaziamento gástrico. Os tempos de residência gástrica normais variam de cinco minutos a duas horas, mas, no caso de formas farmacêuticas unitárias com tamanhos maiores podem ser registrados tempos superiores a 12 horas (ASHFORD, 2005b).

Visto que a maior parte da absorção ocorre no intestino, a velocidade com que o fármaco deixa o estômago e alcança o intestino delgado pode afetar significativamente sua velocidade de absorção (HOENER; BENET, 1996). Portanto, os fatores que promovem o esvaziamento gástrico tendem a aumentar a velocidade de absorção do fármaco. Um esvaziamento gástrico rápido é importante, principalmente, para fármacos que são instáveis no fluido estomacal, pelo pH baixo ou pela ação de enzimas nesse local (GIBALDI, 1991).

O esvaziamento gástrico é um dos principais fatores que contribuem para a alta variabilidade na absorção de comprimidos com revestimento entérico, assim como de formas farmacêuticas convencionais (GIBALDI, 1991).

A atividade física moderada pode estimular o esvaziamento gástrico, enquanto uma atividade física pesada pode retardá-lo. O estado emocional do paciente também pode aumentar ou retardar a velocidade de esvaziamento gástrico (HOENER; BENET, 1996).

Dietas ricas em gorduras, altas concentrações de eletrólitos, paciente deitado e voltado para o seu lado esquerdo, gastrenterites, úlceras gástricas, refluxos, hipotireoidismo, dentre outros fatores, retardam o esvaziamento gástrico. Já, o estado de jejum, soluções alcalinas, ansiedade, paciente deitado e voltado para o seu lado direito, doenças como o hipertireoidismo, dentre outros fatores, aumentam a velocidade de esvaziamento gástrico (GIBALDI, 1991).

Se o pH, a temperatura, a osmolaridade ou a viscosidade do conteúdo estomacal diferirem consideravelmente das condições esperadas pelo intestino, o esvaziamento gástrico tornar-se-á mais lento até que as condições do conteúdo estomacal se tornem mais semelhantes àquelas esperadas pelo intestino. Dessa forma, de acordo com a composição e volume do alimento, a velocidade de esvaziamento gástrico pode variar e, portanto, o horário das refeições em relação ao horário de administração do medicamento também influencia na biodisponibilidade do fármaco (HOENER; BENET, 1996).

O esvaziamento gástrico não é apenas um importante determinante da absorção do fármaco, mas em alguns casos, pode ser seu fator limitante (GIBALDI, 1991).

#### **2.2.2.2.2. Motilidade gastrintestinal**

Os movimentos peristálticos normais provocam a mistura do conteúdo do duodeno, permitindo que as partículas de fármaco entrem em contato íntimo com as células da mucosa intestinal e num tempo suficiente para que ocorra a absorção. Esses movimentos intestinais melhoram a absorção do fármaco por duas razões: aumento da velocidade de dissolução principalmente de substâncias com baixa solubilidade em água e pelo aumento da área de contato entre o fármaco e a membrana intestinal (MAYERSOHN, 1996). Entretanto, se a motilidade intestinal estiver muito elevada, como ocorre nos casos de diarreia, o fármaco não ficará em contato com as paredes intestinais tempo suficiente para que a sua absorção seja adequada (SHARGEL *et al.*, 2005).

O grau de atividade física, a idade, doenças e as condições emocionais podem aumentar ou diminuir a motilidade gastrintestinal. Outros fármacos, quando administrados concomitantemente, também podem afetar a motilidade gastrintestinal, alterando-se assim, a velocidade com que o fármaco alcança seu sítio de absorção. Mudanças na motilidade gastrintestinal podem aumentar, diminuir ou provocar nenhum efeito na biodisponibilidade de um fármaco a partir de uma forma farmacêutica oral (HOENER; BENET, 1996).

Dessa forma, é necessário conhecer o efeito de um fármaco sobre a motilidade gastrintestinal, para prever corretamente seu possível efeito sobre a

biodisponibilidade de outro fármaco administrado concomitantemente, mas isso somente se a motilidade for o fator determinante da velocidade de absorção (HOENER; BENET, 1996).

O movimento propulsivo determina a velocidade do trânsito intestinal e, portanto, o tempo de permanência do fármaco no intestino e, esse tempo é importante, pois ele indica o tempo que a forma farmacêutica tem para liberar o fármaco, de modo que a dissolução aconteça e finalmente a absorção. Dessa forma, quanto maior a motilidade intestinal, menor será o tempo de residência. Essa motilidade é importante, principalmente, para formas farmacêuticas que liberam o fármaco lentamente (MAYERSOHN, 1996).

#### **2.2.2.2.3. Fluxo sanguíneo do trato gastrintestinal**

Todo o trato gastrintestinal é altamente vascularizado e por isso bem irrigado pela corrente sanguínea. Uma grande quantidade de capilares e vasos linfáticos perfundem a região do duodeno e do peritônio. A circulação esplâncnica recebe 28% do total de sangue bombeado pelo coração. Uma vez que o fármaco é absorvido, entra através do mesentério, na veia porta-hepática e alcança o fígado, antes da circulação sistêmica. Este é o primeiro sítio em que o fármaco sofre metabolização e nisso, ele pode ser metabolizado extensivamente, isto é denominado de efeito de primeira passagem e tem importantes efeitos sobre a biodisponibilidade da substância (MAYERSOHN, 1996; SHARGEL *et al.*, 2005).

O fluxo sanguíneo do trato gastrintestinal tem importante papel no processo de absorção por manter o gradiente de concentração ao redor da membrana biológica (STORPIRTIS *et al.*, 1999).

Moléculas polares que são absorvidas com maior dificuldade não demonstram dependência do fluxo sanguíneo, já moléculas lipofílicas e outras bastante pequenas e capazes de penetrar os poros presentes na membrana são altamente dependentes do fluxo sanguíneo para alcançar a circulação sistêmica (GIBALDI, 1991).

Normalmente, a velocidade de absorção não é afetada por uma variação normal no fluxo sanguíneo do mesentério. Entretanto, é necessária uma grande

redução no fluxo para que a absorção do fármaco seja afetada (GIBALDI, 1991).

### **2.2.2.3. Alimentação**

A presença de alimento no trato gastrintestinal pode afetar a biodisponibilidade de um fármaco a partir de sua forma farmacêutica. Dentre os efeitos do alimento que podem alterar a biodisponibilidade do fármaco, podem-se citar: retardo no esvaziamento gástrico, aumento do fluxo biliar, mudanças no pH gastrintestinal, aumento do fluxo sanguíneo esplâncnico, mudanças no metabolismo do fármaco, interação física ou química do alimento com o medicamento ou mesmo com o fármaco (SHARGEL *et al.*, 2005).

Os nutrientes podem influenciar a absorção dos fármacos, dependendo do tipo de alimento, da formulação farmacêutica, do intervalo de tempo entre a ingestão do alimento e a administração do medicamento, além do volume de líquido com o qual ele é administrado (MOURA; REYES, 2002).

A alimentação pode modificar de maneira marcante, porém o efeito é imprevisível sobre a biodisponibilidade do fármaco. O alimento pode diminuir a velocidade de esvaziamento gástrico, atrasando, frequentemente, a absorção do fármaco, tende a aumentar o pH gástrico, aumentando ou diminuindo a dissolução ou ainda, provocando a degradação química de algumas substâncias. Além disso, o alimento pode interagir com algumas substâncias, aumentando ou reduzindo sua biodisponibilidade e também estimulando a liberação de secreção gastrintestinal, o que facilita a dissolução de substâncias pouco solúveis em meio aquoso (GIBALDI, 1991).

Certos fármacos apresentam problemas na absorção quando em presença de alimentos específicos (MAYERSOHN, 1996). Sendo assim, na maioria das vezes, os fármacos apresentam melhor biodisponibilidade a partir de uma forma farmacêutica quando administrados com um grande volume de água em pacientes em jejum (SHARGEL *et al.*, 2005).

Um maior conhecimento da interação entre fármaco e alimento conduz a um controle mais efetivo da administração do medicamento e da ingestão de alimentos levando a terapias mais eficazes (MOURA; REYES, 2002).

### 2.3. O Sistema de Classificação Biofarmacêutica

A maioria dos fármacos, quando administrados por via oral, deve estar biodisponível para gerar resposta terapêutica eficaz. Sabe-se que a biodisponibilidade de um fármaco depende de sua absorção, isto é, da quantidade que alcança a corrente sanguínea e essa absorção depende diretamente das propriedades biofarmacêuticas da substância, como a solubilidade nos fluidos gastrintestinais e a permeabilidade no epitélio gastrintestinal (LÖBENBERG; AMIDON, 2000; LINDENBERG *et al.*, 2004).

Os estudos de biodisponibilidade relativa e bioequivalência devem garantir que um medicamento de referência e um em análise apresentem o mesmo perfil farmacológico *in vivo*. São testes que vem sendo muito utilizados nos últimos anos, porém, inúmeros estudos têm sido feitos para estabelecer novas metodologias *in vitro* que substituam os ensaios de biodisponibilidade e bioequivalência de novos produtos, baseando-se nas propriedades biofarmacêuticas dos fármacos (LENNERNÄS; ABRAHAMSSON, 2005).

Nesse sentido, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto, em 1995, por AMIDON e colaboradores, como uma ferramenta científica para auxiliar a previsão da disponibilidade humana de fármacos por métodos *in vitro*. O SCB propõe uma classificação dos fármacos segundo sua solubilidade e sua permeabilidade e, juntamente com os estudos de dissolução da forma farmacêutica sólida de liberação imediata que contém o fármaco, leva em conta os três principais fatores que governam a velocidade e a extensão da absorção dos fármacos: dissolução, solubilidade e permeabilidade (AMIDON *et al.*, 1995; FDA, 2000; WU; BENET, 2005; BREDA *et al.*, 2009).

O objetivo principal do SCB é prever o desempenho farmacocinético *in vivo* de um medicamento a partir de valores de permeabilidade e solubilidade, podendo assim, auxiliar na decisão dos casos de isenção dos estudos de biodisponibilidade relativa ou bioequivalência (KARALIS *et al.*, 2008)

Com o uso e a aplicação adequados do SCB, os estudos de biodisponibilidade para fármacos contidos em formas farmacêuticas sólidas de uso oral e liberação imediata poderão ser eliminados, diminuindo-se assim, a exposição de voluntários sadios a riscos, os custos e o tempo envolvidos no

desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos (LINDENBERG, 2004; LENNERNÄS; ABRAHAMSSON, 2005).

Segundo o sistema, um fármaco é considerado altamente solúvel, quando a maior dose do produto referência disponível é solúvel em 250 mL ou menos de solução aquosa, com pH variando de 1,0 a 7,5, à temperatura de  $37 \pm 0,5$  °C. Considera-se o volume de 250 mL, pois equivale a um copo de água, que também é a quantidade prevista nos estudos de biodisponibilidade. A classificação da permeabilidade é baseada, indiretamente, na extensão da absorção intestinal do fármaco em humanos ou, diretamente, pela medida da sua velocidade de transferência através da membrana intestinal humana. Modelos de estudo *in vitro* ou *ex vivo* capazes de prever a extensão de absorção intestinal também podem ser usados alternativamente. Um fármaco é considerado altamente permeável quando 90% ou mais é absorvido (FDA, 2000; YU *et al.*, 2002), mas segundo a EMEA, para um fármaco ser considerado altamente permeável, ele deve ser completamente absorvido (LENNERNÄS; ABRAHAMSSON, 2005).

Ainda, com relação à permeabilidade, um fármaco é considerado pouco absorvido quando seu coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) é menor que  $1 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ , com absorção moderada, quando o  $P_{app}$  está compreendido entre  $1$  a  $10 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$  e bem absorvido quando  $P_{app}$  é maior que  $10 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$  (YEE, 1997).

Com o emprego do SCB pode-se, claramente, conhecer o fator limitante do processo de absorção implicando-se assim, em prever possíveis interações com alimentos, escolha da formulação, além de possibilitar a correlação *in vitro* / *in vivo* nos testes de dissolução de formulações sólidas (FLEISHER *et al.*, 1999; POLLI *et al.*, 2004).

O SCB estabelece três números adimensionais que demonstram os parâmetros que controlam a absorção dos fármacos: número de dose ( $D_o$ ), número de dissolução ( $D_n$ ) e número de absorção ( $A_n$ ), os quais são combinações de parâmetros físico-químicos e fisiológicos e representam a visão mais fundamental da absorção do fármaco no trato gastrointestinal (LOBENBERG; AMIDON, 2000; OLIVEIRA; MANZO, 2009).

O número de absorção ( $A_n$ ) é a razão entre o coeficiente de permeabilidade ( $P_{eff}$ ) e o raio intestinal ( $R$ ), multiplicado pelo tempo de

residência ( $T_{si}$ ) do fármaco no intestino, ou ainda pode ser representado como a razão entre o tempo de residência ( $T_{si}$ ) e o tempo de absorção ( $T_{abs}$ ), conforme mostra a equação a seguir (LÖBENBERG; AMIDON, 2000):

$$An = \frac{P_{eff}}{R} \times T_{si} = \frac{T_{si}}{T_{abs}} \quad (\text{Equação 5})$$

O número de dissolução ( $Dn$ ) é a razão entre o tempo de residência ( $T_{si}$ ) do fármaco no intestino e o tempo de dissolução ( $T_{diss}$ ), e contempla a solubilidade ( $C_s$ ), a difusividade ( $D$ ), a densidade ( $\rho$ ), o raio inicial da partícula ( $r$ ) e o tempo de trânsito intestinal ( $T_{si}$ ), conforme mostra a equação a seguir (LÖBENBERG; AMIDON, 2000):

$$Dn = \frac{T_{si}}{T_{diss}} = \frac{3D}{r^2} \times \frac{C_s}{\rho} \times T_{si} \quad (\text{Equação 6})$$

Finalmente, o número de dose ( $D_0$ ) é a razão entre a massa de fármaco ( $M$ ) e a solubilidade ( $C_s$ ) do fármaco, conforme mostra a equação a seguir (LÖBENBERG; AMIDON, 2000):

$$D_0 = \frac{M/V_0}{C_s} \quad (\text{Equação 7})$$

Onde:

$V_0$ : Volume de água tomado com a dose administrada (geralmente 250 mL)

A fração absorvida da dose ( $F$ ) pode ser calculada pela seguinte equação (LÖBENBERG; AMIDON, 2000):

$$F = 1 - e^{-2An} \quad (\text{Equação 8})$$

Onde:

An: Número de absorção

Para a permeabilidade, de acordo com a Primeira Lei de Fick, a absorção de substâncias a partir de uma membrana pode ser descrita pela seguinte equação (LÖBENBERG; AMIDON, 2000):

$$J_w = P_w \times C_w = \frac{dM}{dt} \times \frac{1}{A} \quad (\text{Equação 9})$$

Onde:

$J_w$ : Fluxo do fármaco através da parede intestinal

$P_w$ : Permeabilidade efetiva

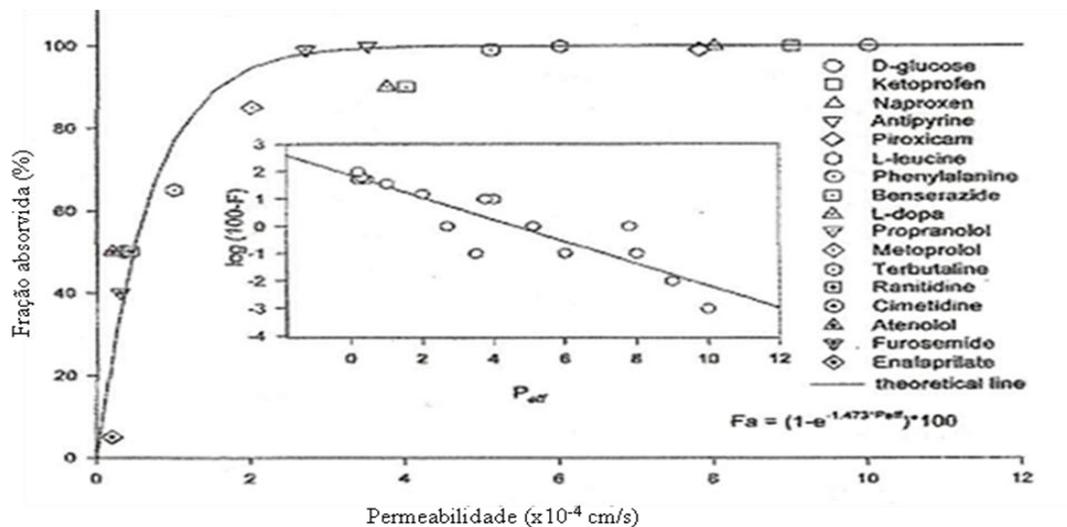
$C_w$ : Concentração do fármaco

A: Área superficial

$dM / dt$  = velocidade de absorção passiva do fármaco (concentração / tempo)

De acordo com a equação acima, tanto a permeabilidade quanto a solubilidade são parâmetros importantes na descrição do fenômeno de absorção através de uma membrana (LOBENBERG; AMIDON, 2000).

A Figura 2, a seguir, referente ao trabalho publicado por AMIDON e colaboradores (1995), mostra uma relação entre a permeabilidade efetiva ( $P_{\text{eff}}$ ) em humanos e a fração absorvida da dose (F) (AMIDON *et al.*, 1995). Segundo a curva mostrada na figura, fármacos que apresentam valores de  $P_{\text{eff}}$  menores que  $2 \times 10^{-4}$  cm/s terão absorção incompleta, porém, fármacos que apresentam valores de  $P_{\text{eff}}$  maiores que  $2 \times 10^{-4}$  cm/s poderão ter absorção completa, isto é, superior a 95% (OLIVEIRA; MANZO, 2009).



**Figura 2.** Relação entre a permeabilidade humana e a fração absorvida da dose (LÖBENBERG; AMIDON, 2000).

Baseando-se nas equações anteriores que demonstram a relação existente entre a dissolução, a solubilidade, a permeabilidade e a absorção gastrointestinal de fármacos, o SCB divide os fármacos em quatro classes e explica a possibilidade de não ocorrer correlação *in vitro* – *in vivo*:

**Classe I:** contém fármacos que apresentam alta solubilidade e alta permeabilidade; neste caso, o fármaco é bem absorvido e o que pode limitar sua absorção é a sua dissolução ou o esvaziamento gástrico. Para formas farmacêuticas de liberação imediata que se dissolvem rapidamente, a absorção será controlada pela velocidade de esvaziamento gástrico e nenhuma correlação com a taxa de dissolução é esperada. Sugere-se então, uma especificação de dissolução para formas farmacêuticas de liberação imediata que, se 85% do fármaco se dissolver em menos que quinze minutos, pode-se assegurar bioequivalência (AMIDON *et al.*, 1995).

**Classe II:** contém fármacos que apresentam baixa solubilidade e alta permeabilidade; neste caso o número de absorção ( $A_n$ ) é elevado e, o número de dissolução ( $D_n$ ) é baixo. A absorção será, geralmente, menor que na Classe I e a dissolução do fármaco *in vivo* é que será a etapa limitante da sua absorção. Devido às alterações no conteúdo e na membrana intestinal ao longo do intestino, o perfil de dissolução do fármaco é que determinará sua concentração pelo intestino e assim, a absorção ocorrerá por um período maior de tempo. Fármacos que pertencem a esta classe devem apresentar absorção

variável, em função da formulação e de parâmetros *in vivo* que podem afetar a dissolução e, por isso, necessitam que os perfis de dissolução sejam mais bem definidos. Devido a isso, o perfil de dissolução deve ser determinado por, pelo menos, 4-6 pontos e, no mínimo, 85% de dissolução em vários valores de pH fisiológicos. Os meios de dissolução utilizados devem refletir a situação *in vivo*, como a adição de tensoativo, além disso, os métodos empregados também devem refletir as condições *in vivo* necessárias para se obter uma boa correlação *in vitro - in vivo* (AMIDON *et al.*, 1995).

**Classe III:** contém fármacos que apresentam alta solubilidade e baixa permeabilidade; nesse caso, a permeabilidade é que controla a absorção dos fármacos. Como o perfil de dissolução pode ser bem definido, assim como na Classe I, uma simplificação na especificação de dissolução é aplicável para formas farmacêuticas de liberação imediata, já que a entrada do fármaco no intestino depende da velocidade de esvaziamento gástrico. Para essa classe de fármacos, tanto a velocidade como a quantidade de fármaco absorvida podem ser muito variáveis. Mas, se 85% do fármaco é dissolvido em menos de quinze minutos, essa variação na absorção pode ser devida ao trânsito gastrointestinal, ao conteúdo luminal e à permeabilidade da membrana e não a fatores relacionados à forma farmacêutica (AMIDON *et al.*, 1995).

**Classe IV:** contém fármacos que apresentam baixa solubilidade e baixa permeabilidade. Fármacos presentes nesta classe apresentam problemas significativos de biodisponibilidade quando administrados por via oral. Dificilmente é possível obter uma correlação *in vitro - in vivo* (AMIDON *et al.*, 1995).

A indústria farmacêutica tem tido vantagens ao usar o SCB e os testes de dissolução, em vez dos estudos *in vivo*, mas esses princípios também vêm sendo usados ao longo de toda fase de desenvolvimento e vários estudos de casos demonstram seu uso na fase de desenvolvimento clínico (COOK *et al.*, 2008). A possibilidade da aplicação do SCB para a isenção dos testes de biodisponibilidade relativa e bioequivalência para fármacos das Classes II, III e IV ainda está sendo discutida (LINDENBERG *et al.*, 2004). Segundo a “*European Medicines Agency*” (EMA), a bioisenção baseada no SCB pode ser aplicada a uma forma farmacêutica de liberação imediata que contenha um fármaco com alta solubilidade e limitada absorção - Classe III do SCB (EMA,

2008). Conforme a Organização Mundial de Saúde (OMS), produtos de liberação imediata que contenham fármacos com baixa solubilidade e alta permeabilidade – Classe II do SCB – podem ser considerados para a bioisenção desde que sejam ácidos fracos com uma relação dose:solubilidade, em pH 6,8, de 250 mL ou menos. Além disso, para considerar a bioisenção, tanto o produto de liberação imediata contendo fármaco Classe II em teste, como o referênciadevem apresentar velocidade de dissolução muito rápida (WHO, 2005).

#### **2.4. Avaliação da solubilidade dos fármacos**

A solubilidade aquosa é uma importante propriedade físico-química do fármaco, pois, para ser terapêuticamente eficaz, ele deve ter alguma solubilidade aquosa para, em solução, alcançar a corrente sanguínea (ANSEL *et al.*, 2007).

A determinação da solubilidade de um fármaco depende das condições de pH. Para isso, deve ser determinada, em meio aquoso, em pH variando 1-7,5 a  $37\pm 1$  °C. Para determinar os valores de pH que serão estudados, verificam-se as características de ionização da substância em questão. Recomenda-se, no mínimo, três determinações, em triplicata, da solubilidade do fármaco em cada pH escolhido. A Farmacopéia Americana fornece a descrição das soluções tampão apropriadas para os estudos de solubilidade. O método, tradicionalmente, usado é o *shake-flask*, porém, outros métodos podem ser usados, desde que a habilidade de preverem a solubilidade da substância seja comprovada (FDA, 2000).

#### **2.5. Avaliação da permeabilidade dos fármacos**

Para a avaliação da permeabilidade, diversos modelos de baixo custo e altamente capazes de prever a permeabilidade e a absorção *in vivo* têm sido desenvolvidos. No entanto, devido aos vários processos que envolvem a absorção intestinal dos fármacos, frequentemente, há grande dificuldade de um único modelo *in vitro* determinar precisamente a permeabilidade *in vivo* da substância (BALIMANE *et al.*, 2000).

Existem vários métodos recomendáveis para avaliação da permeabilidade intestinal sem a utilização de seres humanos. Na maioria dos casos, o uso de apenas um desses métodos já é suficiente, mas quando esse não permite uma classificação conclusiva a respeito da permeabilidade do fármaco, aconselha-se usar dois diferentes métodos para o estudo da permeabilidade. A estrutura química e o conhecimento das propriedades físico-químicas da substância são indicativos das características de permeabilidade da mesma (FDA, 2000).

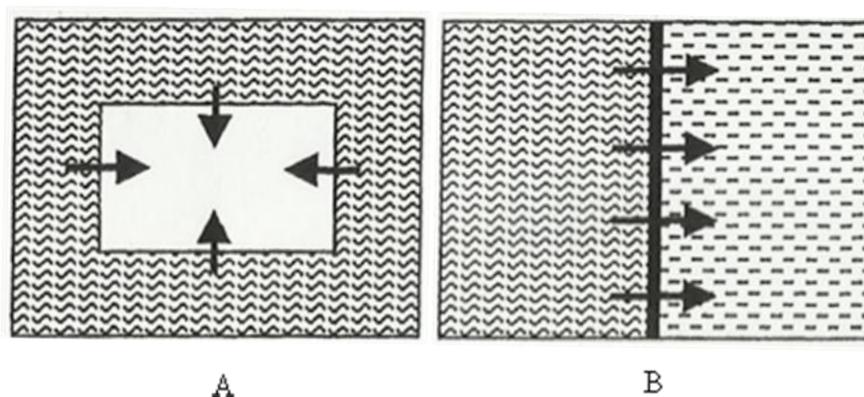
Devido a fatores como a possibilidade dos líquidos fisiológicos alterarem as características de solubilidade do fármaco, a precipitação no local de absorção, a adsorção do fármaco a outros compostos presentes no trato gastrointestinal, possível degradação química ou bacteriana, diversos mecanismos de absorção presentes na membrana biológica, entre outros, torna-se bastante desafiador a correta determinação da permeabilidade de um fármaco por meio de técnicas *in vitro*. Até o momento, nenhuma dessas técnicas demonstrou a capacidade de aliar todos os fatores citados acima e determinar, de forma confiável, a permeabilidade de uma substância, pois para que um modelo *in vitro* seja reprodutível, ele deve agir simulando todas as características da membrana biológica (GONÇALVES *et al.*, 2009).

A avaliação da permeabilidade utilizando modelos *in vivo*, *in vitro* ou *ex vivo* é considerada apropriada apenas para substâncias absorvidas passivamente, já que algumas substâncias podem ser substratos de transportadores de efluxo, como a glicoproteína-p (P-gp) e, dessa forma, apresentarão baixa permeabilidade e, se esses modelos não expressam esse tipo de transportador, existirá uma grande probabilidade de se obter um resultado errado a respeito da permeabilidade do fármaco em questão (FDA, 2000).

Os estudos para a determinação da permeabilidade intestinal podem ser realizados por diversas técnicas, dentre elas: emprego de tecido intestinal de diferentes animais, membranas sintéticas, monocamadas de células obtidas por cultura celular, modelos computacionais e ainda, podem ser utilizados métodos cromatográficos com membranas artificiais imobilizadas (FDA GUIDANCE, 2000; TUKKER, 2000; EGAN; LAURI, 2002; YU *et al.*, 2002; ESCUDER-GILABERT *et al.*, 2003; KATAOKA *et al.*, 2003; LEGEN; KRISTL,

2003; RINAKI *et al.*, 2003; LEGEN *et al.*, 2005; FLATEN *et al.*, 2006; ZAKELJ *et al.*, 2006).

O transporte através da membrana biológica pode ser considerado, experimentalmente, de dois diferentes modos: o primeiro diz respeito à captação da substância permeante pelo sistema e, o segundo refere-se ao transporte da substância permeante ao longo do sistema, conforme apresentado na Figura 3. O primeiro modo inclui modelos, como os anéis intestinais invertidos, as células intestinais isoladas, já o segundo modo inclui modelos, como o saco intestinal invertido, as células de difusão, os estudos de perfusão *in situ* / *in vivo*. O método que utiliza as culturas de células pode ser incluído em ambos os modos citados (TUKKER, 2000).



**Figura 3.** Subdivisão entre os métodos de estudo da permeabilidade intestinal de fármacos baseada no modo de avaliação: captação ou sistemas de transporte (TUKKER, 2000).

Para que um método de estudo da permeabilidade intestinal de fármacos seja adequado para utilização no SCB, deve ser feita uma comparação entre os coeficientes de permeabilidade obtidos com dados sobre a fração absorvida da dose em humanos para uma quantidade suficiente de fármacos modelos e, essa quantidade dependerá da variabilidade do estudo (FDA, 2000).

Além disso, para que o fármaco seja classificado corretamente, devem-se utilizar padrões internos de alta e baixa permeabilidade, adicionados juntamente com as substâncias em estudo no compartimento doador ou no fluido de perfusão. Os padrões internos escolhidos não devem apresentar

interações físicas, químicas ou, ainda, com relação à permeação dos fármacos em avaliação. Se isso não for possível, a permeabilidade dos padrões internos escolhidos deverá ser determinada no mesmo indivíduo ou animal ou camada de células ou tecido intestinal e, seguidamente, deverá ser avaliada a permeabilidade dos fármacos em estudo (FDA, 2000).

Sabe-se que, durante o processo absorptivo, forma-se uma camada de água estacionária adjacente à membrana intestinal e isso é um fator limitante da absorção de fármacos altamente lipofílicos. Contudo, estudos *in vivo* demonstram que, devido ao constante movimento dos fluidos gastrintestinais, essa camada torna-se bem mais fina do que o previsto. Por isso, é necessário reduzir essa camada e para tanto, é importante a presença de um sistema de agitação nos estudos *in vitro* / *ex vivo* (HIDALGO *et al.*, 1991; HIDALGO, 1996; LENNERNÄS, 2007).

### **2.5.1. Métodos de estudo *in vitro***

#### **2.5.1.1. Baseados em culturas de células**

Nos estudos de permeabilidade a partir de culturas celulares, podem-se utilizar as células Caco-2, pois os resultados permitem uma boa correlação com dados obtidos de absorção oral (KATAOKA *et al.*, 2003). Essas células são oriundas de adenocarcinoma de cólon humano e diferenciam-se, espontaneamente *in vitro*, tornando-se muito semelhantes às células intestinais, pois apresentam microvilosidades na borda apical, junções oclusivas entre células adjacentes, além de apresentar semelhante atividade enzimática de hidrolases (SAMBUY *et al.*, 2005).

A integridade das células pode ser verificada através da medida da resistência elétrica transepitelial (RET) (LEGEN *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2006). Substâncias com permeabilidade conhecida também podem ser utilizadas na avaliação da integridade da membrana (WANG *et al.*, 2008).

O uso de cultura de células apresenta como vantagens, em relação a outros métodos que utilizam intestino *in vivo* ou *in vitro*, a simplicidade da camada celular utilizada, sem apresentar muco, camada submucosa e

muscular e a fácil manutenção da viabilidade do tecido com origem humana (AZENHA *et al.*, 2004).

As células Caco-2 permitem estudar os mecanismos de transporte do fármaco, seu metabolismo durante o processo de absorção, a ação dos carreadores, a toxicidade da mucosa e, além disso, permitem que a permeabilidade obtida para diversos compostos possa correlacionar-se com a fração absorvida da dose em humanos. Porém, essas células apresentam algumas desvantagens, tais como o uso de um meio tamponado em pH 7,4, pois, sendo o pH intestinal por volta de 6,5, o resultado obtido com relação à permeação poderá estar errado, uma vez que ele influencia o grau de ionização da substância. Além disso, os tampões, geralmente utilizados nos experimentos com as células Caco-2, oferecem baixa solubilidade para muitos dos compostos estudados, visto que esses meios são bastante hidrofóbicos e apresentam contra íons que podem influenciar negativamente a solubilidade dos fármacos (INGELS *et al.*, 2002).

Outros inconvenientes do uso das células Caco-2 são: (i) grande variabilidade existente entre resultados de permeação obtidos em laboratórios diferentes dificultando a comparação entre os coeficientes de permeabilidade apresentados na literatura; (ii) importantes transportadores são expressos pelas células Caco-2 em baixa quantidade quando comparados com a expressão dos mesmos *in vivo* e por isso é possível obter resultado falso negativo para algumas substâncias transportadas ativamente; (iii) o uso de co-solventes orgânicos é limitado, pois pode comprometer as junções entre as células e aderência do fármaco ao material plástico do filtro, acarretando perda significativa e subestimar os resultados de permeabilidade; (iv) elevado período de tempo necessário para obtenção das células que é de cerca de 3 semanas (BALIMANE *et al.*, 2000).

Outros tipos de célula também podem ser utilizados nos estudos de permeabilidade, tais como as células TC-7 que são subclones das células Caco-2 e apresentam borda em “escova”, microvilosidades e junções entre as células adjacentes (BALIMANE *et al.*, 2000). Quando comparadas às células Caco-2, apresentam menor tempo de crescimento, borda em “escova” mais desenvolvida e a secreção de glicoproteínas é mais semelhante às das células intestinais (GONÇALVES *et al.*, 2009).

As células 2/4/A1, originadas de intestino fetal de rato, permitem o estudo do transporte intestinal passivo pela rota paracelular, assim como, pela rota transcelular. Apresentam junções intercelulares, membrana com borda em escova, enzimas e proteínas transportadoras. Esse tipo de células é mais adequado que as células Caco-2 para o estudo do transporte passivo de substâncias pela via paracelular, pois é comparável ao transporte que acontece no intestino humano (BALIMANE *et al.*, 2000).

As células Madin-Darby, originadas de rim canino e representadas pela sigla MDCK também são utilizadas nos ensaios de permeação intestinal bem como a sua variação, MDCK-MDR1, que possuem, adicionalmente, o gene humano MDR1 e, por isso, apresentam alta expressão dos transportadores envolvidos no processo secretório, como a glicoproteína-P (GONÇALVES *et al.*, 2009).

As células MDCK, quando cultivadas em membranas semipermeáveis, se diferenciam em células epiteliais colunares e com junções intercelulares. O coeficiente de permeabilidade obtido a partir dessas células apresenta boa correlação com aqueles obtidos em humanos, porém, por apresentarem origens diferentes, os transportadores expressos pelas células MDCK são diferentes daqueles expressos pelas células Caco-2 (BALIMANE *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2007). Por outro lado, um menor tempo de cultivo (três dias) traz às células MDCK uma grande vantagem em relação às células Caco-2, já que isso implica em menos trabalho e tempo dispendidos (BALIMANE *et al.*, 2000).

### **2.5.1.2. Baseados em tecido intestinal animal**

#### **2.5.1.2.1. Células intestinais isoladas**

Células intestinais isoladas da mucosa, com origem animal ou humana, podem ser utilizadas em experimentos de permeação. Essas células devem ser adequadamente removidas, tratadas e armazenadas para que a viabilidade seja mantida (TUKKER, 2000). As células intestinais isoladas podem ser obtidas praticamente de qualquer espécie animal. Esses animais são deixados em jejum por 12 a 24 horas. A maioria dos tampões fisiológicos podem ser usados nessa técnica. Essas células podem ser isoladas por dois modos: por

tratamento *ex vivo* do intestino utilizando agentes quelantes, força mecânica ou enzimas ou ainda, pela perfusão *in situ* de enzimas na vasculatura intestinal, ambos a fim de dissociar o epitélio celular (FIX, 1996).

A verificação da viabilidade celular, nesse caso, se dá com o uso de corante azul de Trypan. As células, após ficarem em contato com o corante a 25 °C, são observadas em microscópio: células com algum dano na membrana plasmática apresentarão coloração azul ou roxa. Pelo menos, são necessários 80% de viabilidade celular, contudo, alguns consideram o valor de 90-95% como o mínimo aceitável para posterior aplicação da técnica. A manutenção da morfologia também é verificada por microscopia e essa se mostra alterada quando se observam perda da coloração, aumento do núcleo e espaços extracelulares maiores que o normal (edema) (FIX, 1996).

Embora seja essencial a integridade morfológica das células, estudos bioquímicos do transporte celular são melhores para indicar a viabilidade celular, além da integridade da membrana, nesse sentido, a captação da glicose e seu metabolismo têm sido usados na avaliação da viabilidade celular (FIX, 1996).

#### **2.5.1.2.2. Anéis intestinais invertidos**

O uso dos anéis intestinais invertidos nos estudos de permeação, apesar de ser bastante simples, é pouco empregado. Pelo fato do segmento intestinal estar invertido, há maior contato entre a substância em estudo e a superfície absorptiva intestinal. As vantagens deste método são a fácil preparação e que, a partir de um segmento intestinal, diversos anéis podem ser obtidos. É um método relativamente barato e que emprega equipamentos comuns presentes num laboratório de pesquisa. Esse método é capaz de demonstrar o transporte passivo e aquele mediado por carreadores, que podem ser avaliados pela adição de agentes inibidores dos transportadores conhecidos. Adicionalmente, as influências iônicas podem ser estudadas por variações na composição do tampão (FIX, 1996; TUKKER, 2000).

Porém, o método que utiliza anéis intestinais invertidos também apresenta a desvantagem de impossibilitar a distinção entre o transporte através da rota paracelular e aquele pela rota transcelular. Outra desvantagem

é que o transporte do fármaco ocorre por toda a área exposta à solução, ou seja, a membrana intestinal, tecido conjuntivo e muscular, que devem ser incluídos nos cálculos de absorção (TUKKER, 2000).

Devido à simplicidade do método *in vitro* que utiliza anéis intestinais invertidos, ele serve, principalmente, para os estudos iniciais relacionados à absorção de fármacos e na identificação dos possíveis fatores que podem ser modificados para melhorar a absorção (FIX, 1996).

### **2.5.1.2.3. Saco intestinal invertido**

O método que utiliza o saco intestinal invertido é rápido, fácil, barato e bastante reprodutível. Todo o intestino animal é retirado e lavado com solução salina à temperatura ambiente e invertido com o auxílio de um bastão de vidro, posteriormente é preenchido com meio de cultura oxigenado e dividido em fragmentos de 2 -4 cm, sendo cada um costurado resultando em vários sacos. Estes são então mergulhados num recipiente contendo uma solução de fármaco com concentração conhecida e, sob agitação, o que assegura a mistura que, normalmente, ocorreria devido ao peristaltismo. Em intervalos de tempo pré-determinados, o saco intestinal é removido e o seu conteúdo interior é analisado (BARTHE *et al.*, 1999; AVADI *et al.*, 2004; CHAN *et al.*, 2006).

Este método permite o estudo da absorção de fármacos pelas vias passiva e ativa e pode ser utilizado tanto na análise do papel das proteínas transportadoras, como também para testar o efeito de promotores da absorção e para verificar os melhores sítios de absorção intestinal. Permite ainda, a discriminação entre os transportes paracelular e transcelular e pode ser utilizado na investigação do metabolismo do fármaco pelas células intestinais (BARTHE *et al.*, 1999; BALIMANE *et al.*, 2000; TUKKER, 2000; LI *et al.*, 2011 ).

No entanto, como as demais técnicas *in vitro*, também apresenta algumas desvantagens, tais como: a falta de irrigação sanguínea e de inervação o que acelera a diminuição da viabilidade e, devido ao procedimento para inverter o intestino, pode ser provocado algum dano na morfologia da superfície absorptiva, podendo dessa forma, gerar resultados equivocados (BALIMANE *et al.*, 2000).

#### 2.5.1.2.4. Células de difusão

As células de difusão têm sido utilizadas na determinação do transporte de substâncias em tecidos vivos. O sistema apresenta dois compartimentos, um doador e outro receptor, sendo a membrana intestinal colocada entre os dois compartimentos. A substância em estudo é adicionada ao compartimento doador e a permeabilidade é baseada no aparecimento da substância no compartimento receptor (BARTHE *et al.*, 1999; BALIMANE *et al.*, 2000; LEGEN *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2007).

A viabilidade do tecido é verificada através da medida da diferença de potencial ou da corrente de curto-circuito, enquanto a integridade do tecido é verificada pela medida da resistência elétrica transepitelial antes e durante o experimento (SMITH, 1996; ZAKELJ *et al.*, 2004). Além disso, um marcador da integridade também pode ser usado, geralmente, uma substância com baixa permeabilidade, como manitol ou fluoresceína (TUKKER, 2000). Quando o tecido intestinal fica mantido a 37 °C em meios de culturas adequados, a integridade e a viabilidade podem ser mantidas por cerca de 2 horas (SOUZA *et al.*, 2007).

Este método permite o estudo da permeabilidade de fármacos em diferentes regiões intestinais, assim como a influência do metabolismo intestinal sobre a absorção de fármacos. Porém, a falta de inervação e de irrigação sanguínea, diminui mais rapidamente a viabilidade do tecido, alterando a morfologia e a funcionalidade das proteínas transportadoras durante o experimento (BALIMANE *et al.*, 2000).

Desde 1950, essa técnica vem sendo usada e um dos primeiros modelos foi a câmara de difusão de Ussing. Nesse método, os segmentos de intestino são colocados adequadamente entre os dois compartimentos que estão cheios de solução tampão contendo glicose a 37 °C. Continuamente, é borbulhado uma corrente com a mistura de gases contendo 95 % de O<sub>2</sub> / 5 % de CO<sub>2</sub> em ambos os compartimentos, aumentando a viabilidade do tecido e garantindo uma boa mistura. Assim, a substância em estudo é adicionada na câmara doadora e, em intervalos de tempos pré-determinados, a coleta é realizada na câmara receptora. Os parâmetros elétricos são avaliados para a

determinação da viabilidade, durante e ao final do experimento (TUKKER, 2000).

No entanto, câmaras de difusão vertical, também conhecidas como células de Franz são, principalmente, utilizadas nos estudos de permeação cutânea. Não se encontram, na literatura, estudos de permeação intestinal envolvendo esse sistema. Elas funcionam de modo semelhante às câmaras de Ussing, possuindo, da mesma forma, um compartimento doador e outro receptor, a membrana é acoplada entre os dois compartimentos e existe um sistema de agitação (SHAH *et al.*, 1994; LOPEZ *et al.*, 2000; RÖPKE, 2002; HERAI *et al.*, 2007; SONAVANE *et al.*, 2008).

#### **2.5.1.2.5. Saco intestinal não invertido**

A técnica do saco intestinal não invertido é importante na determinação da biodisponibilidade de compostos com possíveis ações terapêuticas e que apresentam baixa solubilidade em água, baixa permeabilidade e baixa estabilidade (RUAN *et al.*, 2006; SHISHU, 2010).

Esse método foi usado, recentemente, por TRAPANI e colaboradores (2004), que utilizaram saco intestinal de rã (*Rana esculenta*) na avaliação da permeabilidade intestinal de alguns fármacos. Os resultados obtidos pelos autores demonstraram boa correlação com resultados de absorção oral *in vivo* para substâncias absorvidas passivamente. Porém, verificaram que esse método não é adequado para o estudo de um elevado número de substâncias (TRAPANI *et al.*, 2004). E como os demais métodos *in vitro* que utilizam tecido animal, pela ausência do fluxo sanguíneo e da inervação, o tecido apresenta reduzida viabilidade (SOUZA *et al.*, 2007).

Diferentes espécies de animais, incluindo rato, coelho, rã, cachorro e macaco podem ser utilizadas nesses estudos (TRAPANI *et al.*, 2004).

#### **2.5.2. Membranas artificiais – PAMPA**

O ensaio conhecido como PAMPA (*parallel artificial membrane permeability assay*) é empregado na avaliação de candidatos a novos fármacos (MASUNGI *et al.*, 2008). Diversas indústrias farmacêuticas aplicam esse

método na seleção de compostos com baixa permeabilidade durante os estudos de desenvolvimento (KERNS, 2001; ZHU *et al.*, 2002).

Esse método utiliza uma membrana não biológica e, por isso é útil apenas no estudo do transporte passivo transcelular de fármacos (KERNS, 2001; MASUNGI *et al.*, 2008). Uma mistura contendo lecitina (fosfolípido) e solvente orgânico é adicionada para cobrir o suporte do filtro formando a membrana artificial lipídica (BALIMANE *et al.*, 2000).

Dentre as vantagens desse método, podem-se citar: o baixo custo, a possibilidade de automação (MASUNGI *et al.*, 2008), a análise de um grande número de substâncias, o fato de ser uma técnica menos trabalhosa que as culturas de células e os estudos *in vivo* e ainda, apresenta uma boa correlação com os resultados obtidos a partir de estudos *in vivo* (BALIMANE *et al.*, 2000).

Porém, pode-se citar como desvantagem, o fato do método subestimar a absorção de alguns compostos que são absorvidos ativamente ou de compostos hidrofílicos com baixo peso molecular (BALIMANE *et al.*, 2000), além de permitir o estudo da permeabilidade apenas de compostos absorvidos pela via transcelular passiva uma vez que envolve o uso de membrana não biológica (KERNS, 2001; MASUNGI *et al.*, 2008).

### **2.5.3. Perfusão *in situ***

Os ensaios de permeação que envolvem a técnica de perfusão *in situ* em segmentos intestinais são utilizados, frequentemente, no estudo da cinética de absorção de fármacos (BALIMANE *et al.*, 2000).

Nesse método, os animais, principalmente roedores (ratos e coelhos), são anestesiados e têm o intestino canulado. A região proximal em que a cânula foi inserida recebe a solução de perfusão que contém o fármaco em estudo e a coleta das amostras é realizada na região distal; posteriormente, as amostras são analisadas por método analítico pré-validado (BALIMANE *et al.*, 2000; JAIN *et al.*, 2007).

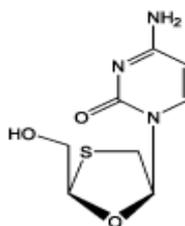
Dentre as vantagens desse método, tem-se a presença de nervos e fluxo sanguíneo durante o experimento, aproximando-o dos estudos *in vivo* (BARTHE *et al.*, 1999; BALIMANE *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2012). Além

disso, o método permite o estudo dos efeitos dos promotores de absorção (BALIMANE *et al.*, 2000).

No entanto, a medida da quantidade de substância que desaparece do lúmen intestinal pode, nem sempre, representar a quantidade que alcançou a circulação sanguínea, principalmente, se ocorre metabolismo pré-sistêmico ou metabolismo intracelular intestinal (BARTHE *et al.*, 1999; BALIMANE *et al.*, 2000). Além disso, para que um resultado significativo seja obtido, é necessário um elevado número de animais, assim como uma grande quantidade do composto em estudo, o que nem sempre está disponível na fase inicial de descoberta de fármacos. E ainda, a manipulação do intestino, assim como o fato do animal receber anestesia, altera, significativamente, o fluxo sanguíneo intestinal, afetando-se assim, a absorção do fármaco (BALIMANE *et al.*, 2000).

## 2.6. Fármaco antiretroviral em estudo

### 2.6.1. Lamivudina



**Figura 4.** Estrutura química da lamivudina (3 TC) (MOFFAT *et al.*, 2004).

O fármaco lamivudina (3TC) é um antiretroviral pertencente à classe dos análogos nucleosídicos e age inibindo, seletivamente, os vírus da imunodeficiência humana tipos I e II (FERNANDES *et al.*, 2006).

A forma ativa é o composto trifosforilado e essas reações de fosforilação ocorrem dentro da célula. A 3TC atua inibindo a enzima transcriptase reversa viral, já que se ligam ao DNA viral, acarretando a terminação da cadeia de aminoácidos (SOUZA; STORPIRTIS, 2004).

A dose recomendada de lamivudina, por via oral e em combinação com outros antirretrovirais, é de 300 mg por dia em adultos, sendo administrada uma única vez, ou então, 150 mg, duas vezes ao dia. Para crianças, até doze

anos de idade, recomenda-se a dose oral de 4 mg/kg duas vezes ao dia. Em neonatos, a dose oral recomendada é de 2 mg/kg duas vezes ao dia (STRAUCH *et al.*, 2011)

A lamivudina pode apresentar polimorfismo, isto é, duas diferentes formas cristalinas: acicular e bipiramidal (STRAUCH *et al.*, 2011). Embora, a literatura não traga dados sobre diferenças na solubilidade ou biodisponibilidade dessas formas, a forma bipiramidal é a mais apropriada para o uso na fabricação de comprimidos, devido às suas melhores propriedades de fluxo e maior estabilidade (JOZWIAKOWSKI *et al.*, 1996; FERNANDES *et al.*, 2006).

Esse fármaco é uma base fraca e apresenta constante de ionização ( $pK_a$ ) de 4,3 e, quando dissolvido em água, encontra-se primariamente na forma não-ionizada. A lamivudina, no estado sólido ou em solução aquosa, é estável à luz e à temperatura (FERNANDES *et al.*, 2006). Apresenta coeficiente de partição octanol / água ( $\log P$ ) de 0,06 e solubilidade em água de 70 mg/mL (KASIM *et al.*, 2004).

A 3TC apresenta meia-vida de 5 a 7 horas e biodisponibilidade de 80 a 87 %. (MOFFAT *et al.*, 2004). Em geral, é um fármaco que apresenta baixa toxicidade. Os efeitos adversos mais comuns são relacionados aos distúrbios gastrintestinais, assim como dores de cabeça, dores abdominais, náusea e fadiga. É improvável a indução de efeitos adversos, clinicamente importantes, como neuropatias e miopatias pela 3TC (SOUZA; STORPIRTIS, 2004).

Quanto às suas propriedades biofarmacêuticas, é um fármaco que apresenta alta solubilidade e alta permeabilidade, além de rápida velocidade de dissolução, sendo classificada pelo SCB como classe I. No entanto, existe uma variação interpacientes (SOUZA; STORPIRTIS, 2004). E ainda, segundo LINDENBERG e colaboradores (2004), a classificação da lamivudina segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica é inconclusiva, pois apesar de apresentar alta solubilidade, os dados relativos à permeabilidade são incertos e, dessa forma, ela poderia ser classificada como classe I ou III (LINDENBERG *et al.*, 2004). KASIM e colaboradores (2004) classificam-na como Classe III, concordando com LINDENBERG e colaboradores (2004) (KASIM *et al.*, 2004). Segundo STRAUCH e colaboradores (2011), ela é altamente solúvel, porém,

as características de permeabilidade não estão bem definidas (STRAUCH *et al.*, 2011).

## **2.7. Marcadores internos de permeação**

A “*Food and Drug Administration*” (FDA) sugere o uso de vários fármacos modelos de alta ou baixa permeabilidade como padrões internos para estabelecer a adequação do método, por exemplo, atenolol, manitol, metoprolol e PEG 4000, dentre outros (OLIVEIRA; MANZO, 2009).

O metoprolol é um fármaco que apresenta coeficiente de partição octanol/água (logP) de 1,72, 95 % é absorvido a partir do trato gastrointestinal e por isso, pode ser utilizado como um padrão interno de alta permeabilidade (KIM *et al.*, 2006; DAHAN *et al.*, 2009), o que também é recomendado pela FDA. Para padrão interno de baixa permeabilidade, a FDA recomenda o manitol (FDA, 2000). No entanto, a quantificação desse composto apresenta algumas limitações analíticas, pois é um açúcar e apresenta baixa permeabilidade, utiliza-se o manitol rádio marcado (SAHA; KOU, 2000) e por isso sua utilização se torna, às vezes, inviável diante da infra-estrutura necessária. Contudo, em estudos de permeabilidade intestinal usando rãs, foi utilizada a floridizina como padrão interno de baixa permeação, apresentando nenhuma permeação (TRAPANI *et al.*, 2004; TRAPANI *et al.*, 2007; FRANCO *et al.*, 2008). A literatura traz pouca informação sobre a floridizina, somente que é proveniente da macieira, podendo ser encontrada também nas árvores de pêra, ameixa e cereja e, experimentalmente, é também usada para produzir glicosúria em animais (MERCK INDEX, 2006).

## **2.8. Métodos analíticos para determinação da lamivudina**

A literatura traz diversos trabalhos sobre a determinação da lamivudina no plasma sanguíneo de animais na presença de outros antirretrovirais utilizando a técnica da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em estudos farmacocinéticos, caracterizando essas metodologias como altamente sensíveis, específicas e rápidas (FAN; STEWART, 2002; SINGH *et al.*, 2011; BAHRAMI *et al.*, 2005). Alguns trabalhos utilizam a detecção ultravioleta (UV),

outros a espectrometria de massa ou imunoenaios (FAN; STEWART, 2002). Por outro lado, a técnica da eletroforese capilar, conhecida pelas suas vantagens de utilizar baixa quantidade de solvente, necessitar de uma pequena quantidade de amostra, ter alta eficiência de separação e curtos tempos de análise, além do fácil manuseio do capilar, também pode ser utilizada, embora a literatura não traga muitos trabalhos a respeito disso (PEREIRA *et al.*, 2005). GUTLEBEN e colaboradores (2002) trabalharam, pela primeira vez, utilizando a técnica da eletroforese capilar, especificamente, a eletroforese capilar de zona co-eletrósmótica, na separação e na determinação de todos os antirretrovirais inibidores de protease e para seis antirretrovirais inibidores da transcriptase reversa, incluindo a lamivudina, e demonstraram que a versatilidade da técnica, juntamente com a sua rapidez, permitem que seja bastante útil para as análises clínicas (GUTLEBEN *et al.*, 2002). SEKAR e AZHAGUVEL (2005) utilizaram, pela primeira vez, a técnica da cromatografia eletrocínética micelar (MEKC) para a simultânea determinação da lamivudina e da zidovudina presentes em uma formulação farmacêutica, definindo o método como simples e preciso, sem qualquer interferência dos excipientes presentes (SEKAR; AZHAGUVEL, 2005).

Em estudos de permeação intestinal ou de bioequivalência envolvendo a lamivudina, a técnica da cromatografia líquida (CL) e a da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são as mais difundidas (KANO *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2009), não havendo, na literatura, nenhum trabalho sobre permeação intestinal que utilize como metodologia analítica a técnica da eletroforese capilar.

## **2.9. Planejamento Experimental**

Segundo Neto e colaboradores, o planejamento estatístico é a atividade estatística mais importante, pois quando isso não acontece, o experimentador pode obter, como resultado, muitos números estéreis, dentre os quais, o estatístico não chegaria à conclusão alguma (NETO *et al.*, 1995).

O planejamento experimental tem seu grande valor, pois, baseado em fundamentos estatísticos, é uma importante ferramenta para a descoberta das melhores condições de um processo, desenvolvimento de formulação ou ainda,

para avaliar os efeitos das variáveis sobre as respostas esperadas durante o desenvolvimento de um novo produto ou processo (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

A utilização de um planejamento experimental diminui o número de experimentos a serem realizados, além de melhorar a qualidade das informações obtidas como resultados, acarretando na diminuição do custo e do tempo envolvidos na realização dos experimentos. Além disso, o planejamento experimental permite que diferentes fatores sejam analisados simultaneamente, verificando, dessa forma, a influência de um sobre o outro. E ainda, permite o cálculo do erro experimental (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

A literatura traz sete etapas para o planejamento de experimentos, arrolados a seguir (COLEMAN; MONTEGOMERY, 1993):

1. Reconhecimento do problema;
2. Escolha dos fatores de influência e níveis;
3. Seleção das variáveis de resposta;
4. Determinação de um modelo experimental;
5. Condução do experimento;
6. Análise dos resultados obtidos;
7. Conclusões e recomendações.

### **3 - OBJETIVO**

O presente trabalho teve como objetivo propor um novo método para estudar a permeabilidade intestinal de fármacos, utilizando epitélio intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*) em modelo *ex vivo* empregando células de Franz. O fármaco selecionado como modelo foi a lamivudina.

### **Objetivos específicos:**

- Desenvolver e validar método analítico para quantificação simultânea dos fármacos permeados;
- Caracterizar morfológica e histologicamente o epitélio intestinal da rã-touro (*Rana catesbeiana*) por meio da observação de lâminas ao microscópio;
- Verificar a influência de variáveis como secção intestinal, temperatura e pH da solução de Ringer na permeabilidade dos fármacos estudados pelo método proposto;
- Aplicar o método de estudo da permeabilidade proposto para avaliar a permeabilidade intestinal da lamivudina;
- Calcular os principais parâmetros de permeação da lamivudina e do metoprolol - quantidade total de fármaco permeada ( $Q_t$ ), coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) e constante de absorção de primeira ordem ( $k_a$ ) - e comparar os coeficientes de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) com dados da literatura.

## **4 - MATERIAL E MÉTODOS**

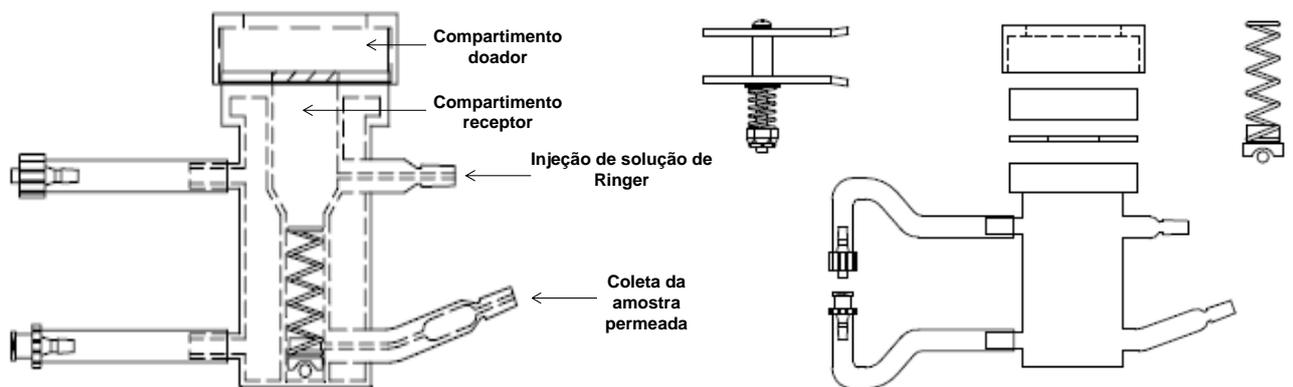
#### 4.1. Materiais, solvente, reagentes

- lamivudina matéria-prima de grau farmacêutico de pureza (Farmanguinhos, Rio de Janeiro - RJ);
- zidovudina, lamivudina substâncias químicas de referência, grau de pureza > 99 % (Farmanguinhos, Rio de Janeiro – RJ);
- aciclovir, substância química de referência, grau de pureza > 99% (Biosintética Farmacêutica, São Paulo – SP);
- floridizina, substância química de referência, grau de pureza > 99% (Sigma Chemical Company St Louis, MO, EUA);
- metoprolol, matéria-prima de grau farmacêutico de pureza (Medley, Campinas – SP);
- solução de Ringer preparada de acordo com a seguinte composição: NaCl 283 mmol, KCl 5,0 mmol, CaCl<sub>2</sub> 1,0 mmol, NaHCO<sub>3</sub> 2,5 mmol (STEVENS, 1992);
- NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, NaHCO<sub>3</sub> (Synth, São Paulo – SP);
- dodecilssulfato de sódio, reagente de grau analítico de pureza (Merck, Darmstadt, Germany);
- tetraborato de sódio, reagente de grau analítico de pureza (Merck, Darmstadt, Germany);
- metanol, solvente de grau analítico de pureza (Merck, Darmstadt, Germany);
- água purificada Milli-Q (Millipore, MA, EUA).

#### 4.2. Equipamentos e dispositivos diversos

- sistema de eletroforese capilar (MDQ PROTEOME LAB PA 800, Beckman Coulter) equipado com um sistema de detecção UV/VIS e software;
- capilares de sílica fundida revestidos internamente com poliimida, diâmetro interno de 75 µm (ISB, Brasil).
- micropipeta monocanal 20 a 100 µL (*Pipetman* P100) – Gilson;
- micropipeta monocanal 100 a 1.000 µL (4500) – Gilson;
- micropipeta monocanal 500 a 5.000 µL (Série 2.100) – Gilson;
- microscópio (Olympus® BX50) e software Image Pro-Plus®, versão 4.5.1.29;

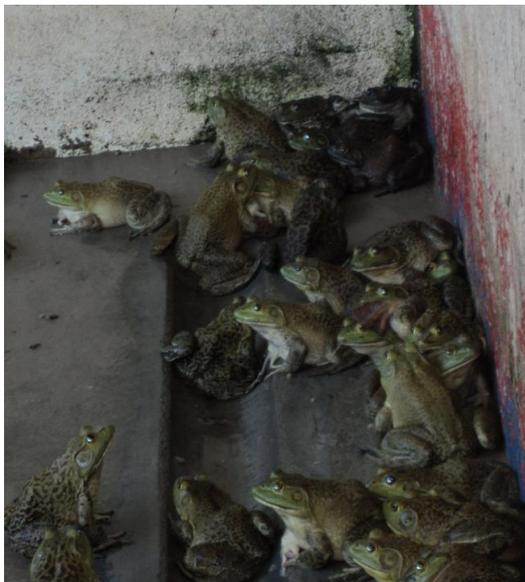
- minivoltímetro Millicell ERS<sup>®</sup> - Millipore
- plataforma manual para testes de tópicos e transdérmicos *Start Up 6 Cells* – Variomag/Hanson Research;
- seringa de precisão para amostragem manual de volume igual a 1,0 mL;
- células de difusão vertical (58-001-455) adaptadas, orifício de 0,5 cm, volume de 7,0 mL e área de exposição de 0,20 cm<sup>2</sup>– Hanson Research, conforme esquema da Figura 5.



**Figura 5.** Representação esquemática da célula de difusão vertical e seus acessórios (HANSON RESEARCH, 2004).

### 4.3. Membranas

Segmentos intestinais de, aproximadamente, 5,0 cm de comprimento (começando imediatamente após o estômago), de rãs-touro adultas (*Rana catesbeiana*) (Figura 6) foram fornecidos pelo Ranário Atibaia - São Paulo - SP.



**Figura 6.** Rãs-touro (*Rana catesbeiana*), no tanque de criação e preparadas para o abate.

#### **4.4. Desenvolvimento do método analítico para quantificação dos fármacos permeados**

##### **4.4.1. Instrumentação**

Os experimentos foram conduzidos em um sistema de eletroforese capilar (MDQ PROTEOME LAB PA 800, Beckman Coulter) equipado com um sistema de detecção UV/VIS e software. O equipamento possui sistema de refrigeração do capilar através da circulação do líquido refrigerante “cooler”.

Capilares de sílica fundida (ISB, Brasil) com 75  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno e 50,2 cm de comprimento total (comprimento efetivo de 40 cm), revestidos externamente com poliimida, foram utilizados na realização dos experimentos.

As lavagens para o condicionamento dos capilares novos eram realizadas por pressão de, aproximadamente, 20 psi, com passagem de hidróxido de sódio 1 mol/L, por 30 minutos, seguida pela passagem de água deionizada, por mais 30 minutos e, por último, seguia-se a passagem do eletrólito de corrida durante 30 minutos. No início do dia, o capilar era condicionado com hidróxido de sódio 1 mol/L por 10 minutos, seguido por 10 minutos de água deionizada e por 8 minutos do eletrólito de corrida. No intervalo entre as corridas, o capilar era reconicionado com o eletrólito por 2

minutos e, no término das análises, o capilar era lavado com hidróxido de sódio 1 mol/L por 3 minutos e água deionizada por mais 3 minutos para a limpeza.

#### **4.4.2. Seleção do eletrólito de corrida e estabelecimento das condições de análise**

Diversos eletrólitos foram ensaiados para verificar a separação dos compostos:

- 10 mM fosfato (pH 2,5);
- 10 mM fosfato (pH 2,5) + 0,5% TEA (trietilamina);
- 20 mM tetraborato de sódio (pH 9,2) + 30 mM dodecil sulfato de sódio;
- 20 mM tetraborato de sódio (pH 9,2) + 30 mM dodecil sulfato de sódio + metanol;
- 20 mM tetraborato de sódio (pH 9,2) + 30 mM dodecil sulfato de sódio + 10 mM  $\beta$ -ciclodextrina;
- 20 mM tetraborato de sódio (pH 9,2) + 30 mM dodecil sulfato de sódio + acetonitrila + etanol;
- 20 mM tetraborato de sódio (pH 9,2) + 30 mM dodecil sulfato de sódio + 10% (v/v) etanol.

Durante as análises, utilizou-se uma corrente de 80  $\mu$ A, a detecção foi realizada a 214 nm e a injeção da amostra foi de 0,5 psi por 10 segundos. A temperatura do sistema foi mantida a 25 °C.

#### **4.5. Validação do método analítico desenvolvido**

O método analítico foi estudado para a análise não apenas dos fármacos envolvidos nesse trabalho - lamivudina, flordizina e metoprolol - mas também, para outros dois antivirais estudados pelo grupo de pesquisa: zidovudina e aciclovir.

Foram avaliados os seguintes parâmetros de validação: seletividade/especificidade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão e estudo de estabilidade (BRASIL, 2003; ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2012).

#### **4.5.1. Seletividade/Especificidade**

Com o objetivo de verificar a interferência de algum componente da solução de Ringer ou da membrana biológica na capacidade do método quantificar os fármacos que permearão a membrana, a seletividade do método foi verificada contaminando-se uma amostra contendo os fármacos em estudo com uma solução resultante do contato da solução de Ringer com a membrana intestinal e comparando-se o resultado obtido com o de uma amostra não contaminada.

A membrana intestinal de rã-touro foi lavada e, em seguida, colocada em contato com solução de Ringer por, aproximadamente, duas horas (GUIMARÃES, 2001). Posteriormente, a membrana foi retirada da solução e a mesma foi filtrada usando papel de filtro comum. Obtendo-se-assim, uma solução resultante que foi utilizada nesse ensaio. Para a determinação da especificidade, uma solução contendo padrões de aciclovir, lamivudina, zidovudina, metoprolol e flordizina a 1000 µg/mL em Ringer foi contaminada com a solução descrita anteriormente, resultando em outra que foi analisada posteriormente.

#### **4.5.2. Linearidade**

Com o objetivo de verificar a linearidade do método analítico, foram preparadas e injetadas soluções dos fármacos lamivudina, zidovudina, aciclovir, flordizina e metoprolol nas concentrações de 5; 10; 20; 40; 80; 100 µg/mL, porém, buscando-se a menor faixa detectável, foram também preparadas e injetadas soluções dos fármacos lamivudina e zidovudina, nas concentrações de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 µg/mL; do aciclovir, soluções nas concentrações de 0,6; 0,8; 1; 1,2; 1,4 µg/mL e para a flordizina, nas concentrações de 2; 4; 8; 15; 20 µg/mL. Essas soluções foram analisadas, em triplicata, por eletroforese capilar, utilizando-se o eletrólito selecionado e as condições estabelecidas e, a partir dos resultados encontrados, foram construídas curvas analíticas relacionando as áreas dos picos *versus* a concentração e posterior regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

#### 4.5.3. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção (LD) foi determinado baseando-se no desvio padrão (S) e na inclinação da curva analítica ( $\alpha$ ), conforme a equação a seguir:

$$LD = 3 \times \frac{S}{\alpha} \quad (\text{Equação 10})$$

Onde:

S: desvio padrão

$\alpha$ : inclinação da curva analítica

O limite de quantificação (LQ) foi determinado baseando-se no desvio padrão (S) e na inclinação da curva analítica ( $\alpha$ ), conforme a equação a seguir:

$$LQ = \frac{S}{\alpha} \times 10 \quad (\text{Equação 11})$$

Onde:

S: desvio padrão

$\alpha$ : inclinação da curva analítica

O desvio padrão das respostas foi determinado pelo erro padrão estimado na regressão linear.

#### 4.5.4. Precisão

A precisão do método foi avaliada através da repetibilidade ou precisão intra-dia e, para isso, utilizaram-se soluções nas concentrações de 0,5; 0,7 e 0,9  $\mu\text{g/mL}$  para a lamivudina, de 0,6; 0,95 e 1,3  $\mu\text{g/mL}$  para o aciclovir, de 0,3; 0,6 e 0,9  $\mu\text{g/mL}$  para a zidovudina, de 4,5; 11,3 e 18  $\mu\text{g/mL}$  para a floridizina e de 26,7; 58,4 e 90  $\mu\text{g/mL}$  para o metoprolol com três réplicas cada, injetadas em triplicata em um mesmo dia. Esse parâmetro também foi avaliado por meio

da precisão intermediária ou inter-dia. Para tanto, soluções nas respectivas concentrações tratadas acima, também com três réplicas cada, foram injetadas em triplicata durante dois dias consecutivos. O resultado da precisão do método foi obtido com o cálculo do coeficiente de variação (CV%) obtido a partir dos resultados preliminares, conforme a seguinte equação:

$$CV = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad \text{(Equação 12)}$$

Onde:

DP: desvio padrão

CMD: concentração média determinada

#### 4.5.5. Exatidão

Para a avaliação da exatidão do método, soluções nas concentrações de 0,5; 0,7 e 0,9 µg/mL para a lamivudina, de 0,6; 0,95 e 1,3 µg/mL para o aciclovir de 0,3; 0,6 e 0,9 µg/mL para a zidovudina, de 4,5; 11,3 e 18 µg/mL para a floridizina e de 26,7; 58,4 e 90 µg/mL para o metoprolol com três réplicas cada, foram injetadas em triplicata em um mesmo dia (exatidão intra-dia) e em dois dias consecutivos (exatidão inter-dia). Comparou-se então, o resultado da injeção dessas soluções com os teóricos, obtendo-se assim, a porcentagem de exatidão do método, pela seguinte equação:

$$E\% = \frac{C}{C_0} \times 100 \quad \text{(Equação 13)}$$

Onde:

C = média das concentrações determinadas experimentalmente;

C<sub>0</sub> = concentração teórica inicial

#### **4.5.6. Estabilidade**

A estabilidade de soluções de lamivudina, aciclovir, zidovudina, e flordizina, contendo 4 ou 12 µg/mL, foram avaliadas após o armazenamento a -20 °C por 30 dias (estabilidade de longa duração). Além disso, para esses fármacos, soluções nessas mesmas concentrações foram também avaliadas, após seis horas a temperatura ambiente (estabilidade de curta duração). E ainda, foi avaliada a estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento.

Para o metoprolol, soluções contendo 7 ou 75 µg/mL foram avaliadas da mesma forma, quanto à estabilidade de longa e curta durações e após ciclos de congelamento e descongelamento.

Em todos os casos, foram utilizadas três amostras de cada concentração para cada fármaco. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos das análises de amostras recém-preparadas.

#### **4.6. Caracterização morfológica e histológica do epitélio intestinal da rã-touro (*Rana catesbeiana*)**

O estudo histológico foi realizado utilizando o microscópio óptico binocular Olympus BX50, pela análise das lâminas contendo diferentes secções de intestino delgado da rã-touro (*Rana catesbeiana*) coradas pelo método Hematoxilina-Eosina (HE) (SANTANA, 1998).

#### **4.7. Estudo da permeabilidade intestinal**

##### **4.7.1. Planejamento experimental**

Diante da possibilidade de desenvolvimento de um novo método, foi verificada a influência de algumas variáveis na permeabilidade intestinal de substâncias e são elas: temperatura, pH da solução de Ringer e secção intestinal da rã. Para tanto, foi proposta uma análise de variância *three-way*, contemplando as variáveis citadas, apresentada na Tabela 1.

**Tabela 1.** Matriz de ensaios codificada da Análise de Variância *three-way* obtida com o programa STATISTICA 7.0 *for Windows* e utilizada para os estudos de permeabilidade intestinal.

Ordem dos experimentos	Temperatura	pH da solução de Ringer	Secção	Célula de difusão
1	1	2	1	Célula 1
2	1	2	3	Célula 2
3	1	2	2	Célula 3
4	1	1	1	Célula 4
5	1	1	2	Célula 5
6	1	1	3	Célula 6
7	2	1	2	Célula 1
8	2	1	3	Célula 2
9	2	2	2	Célula 3
10	2	2	3	Célula 4
11	2	1	1	Célula 5
12	2	2	1	Célula 6
13	1	2	3	Célula 1
14	1	1	2	Célula 2
15	1	1	3	Célula 3
16	1	1	1	Célula 4
17	1	2	2	Célula 5
18	1	2	1	Célula 6
19	2	2	3	Célula 1
20	2	1	2	Célula 2
21	2	1	3	Célula 3
22	2	1	1	Célula 4
23	2	2	2	Célula 5
24	2	2	1	Célula 6

**Tabela 2.** Codificação das variáveis presentes no planejamento experimental utilizado para o estudo de permeabilidade intestinal.

Variáveis	Níveis reais		
	1	2	3
Temperatura (°C)	26	37	-
pH da solução de Ringer	8,2	7,4	-
Secção intestinal	Inicial	Mediana	Final

\* ausência de nível

#### **4.7.2. Obtenção e preparação dos segmentos intestinais de rã**

##### **4.7.2.1. Obtenção dos segmentos intestinais**

Segmentos de intestino delgado foram obtidos de rãs-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802), com peso entre 300,0 g e 350,0 g, após jejum de 48 horas, antes do experimento. As rãs foram sacrificadas por decapitação e extração da medula e os intestinos delgados foram retirados por laparotomia (abertura cirúrgica da cavidade abdominal), tais procedimentos foram realizados no Ranário Atibaia, São Paulo-SP, que foi o fornecedor dos intestinos, material esse de descarte. O sacrifício das rãs foi realizado pelo pessoal técnico do ranário, em conformidade com as normas éticas nacionais para fornecimento da carne dos animais a restaurantes e comércio em geral (BRASIL, 1952). A secção dos intestinos e o preparo para uso nos experimentos foi responsabilidade do pesquisador. Os intestinos foram, imediatamente, lavados com solução de Ringer pH 8,2 (TRAPANI *et al.*, 2004; TRAPANI *et al.*, 2007; FRANCO *et al.*, 2008) ou 7,4 (ROZEHNAL *et al.*, 2012), em temperatura ambiente, para remover o conteúdo dos mesmos e foram mantidos em solução de Ringer até sua utilização. Considerando que o trabalho não envolveu a utilização de organismos vivos, não houve necessidade de submissão a comitês de ética para experimentação animal ou humana (CEUA ou CEP). O material utilizado como membrana de permeação foi o intestino de rãs-touro (*Rana catesbeiana*) criadas para alimentação

humana e as vísceras não são aproveitadas. Assim, esse material é desprezado pelo ranário uma vez que não é utilizado como alimento.

#### **4.7.2.2. Preparação dos segmentos intestinais**

Em até 2 horas, os segmentos de intestino delgado foram abertos e fragmentados em tamanho adequado para inserção nas seis câmaras de difusão vertical.

#### **4.7.3. Avaliação da integridade dos segmentos intestinais utilizados no estudo**

A integridade das membranas foi avaliada pela medida da resistência elétrica transepitelial (RET), utilizando o equipamento Millicell<sup>®</sup>-ERS, no início e no fim dos experimentos de permeabilidade, para isso, um eletrodo foi colocado na porção apical e outro na porção basolateral em contato com a solução de Ringer. E ainda, avaliou-se a integridade das membranas intestinais, durante a realização dos experimentos de permeabilidade usando flordizina e metoprolol como padrões internos de baixa e alta permeabilidade, respectivamente.

#### **4.7.4. Ensaio de permeabilidade para avaliação da influência das variáveis em estudo – temperatura, pH da solução de Ringer e secção intestinal - e seleção das condições do experimentais**

Para a realização dos ensaios de permeabilidade, o compartimento receptor foi preenchido com 7,0 mL de solução de Ringer (pH 8,2 ou 7,4) tamponada e foi mantido a  $26 \pm 0,1$  °C ou  $37 \pm 0,1$  °C, sob constante agitação, a 200 rpm (SONAVANE *et al.*, 2008) por 20 minutos antes dos experimentos de permeação (DEZANI, 2010). Posteriormente, as secções intestinais foram inseridas adequadamente nas câmaras de difusão entre o compartimento doador e o receptor. Os fármacos foram colocados no compartimento doador dissolvidos em solução de Ringer (pH 8,2 ou 7,4) em uma concentração

conhecida de 300 µg/mL para a lamivudina, 25 µg/mL para a flordizina e 200 µg/mL para o metoprolol, resultando num volume de 5,0 mL. Em intervalos de 30 minutos, foram realizadas as coletas das amostras, durante 120 minutos (TRAPANI *et al.*, 2004).

#### 4.7.4.1. Quantificação dos fármacos permeados nos ensaios de permeabilidade

A quantidade de fármaco permeada foi determinada pelo método de eletroforese capilar, previamente desenvolvido e validado. Sendo que, para o metoprolol, foi feita a adição de 10 µg/mL de padrão nas amostras, pois a quantidade presente nas mesmas estava abaixo do seu limite de detecção. Dessa forma, foram obtidos os perfis de permeação do fármaco em função dos intervalos de amostragem.

#### 4.7.4.2. Análise dos resultados

A partir dos dados obtidos no item 4.7.4.1, foram calculados os principais parâmetros de permeação (BARRY, 1983; SHAH, 1994, TRAPANI *et al.*, 2004):

**a)** Quantidade total de fármaco permeada através das membranas no período de 2 horas ( $Q_t$ );

**b)** Os perfis de fármaco permeado *versus* tempo foram plotados e obtiveram-se as constantes de absorção aparente de primeira ordem por meio do cálculo dos coeficientes angulares da porção linear das curvas ( $k_a$ );

**c)** Coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ), calculado pela seguinte equação:

$$P_{app} = \frac{\Delta Q}{\Delta t} \cdot \frac{1}{60} \cdot \frac{1}{A} \cdot \frac{1}{C_0} \quad (\text{Equação 14})$$

Onde:  $\frac{\Delta Q}{\Delta t}$  é o fluxo em ng/min ou a quantidade de fármaco permeado pela membrana no tempo  $t$ ,  $A$  é a área de exposição da membrana (cerca de

0,20 cm<sup>2</sup>) e  $C_0$  é a concentração inicial do fármaco na solução colocada em contato com a membrana em ng/cm<sup>3</sup>.

#### **4.7.4.3. Análise do planejamento experimental**

Os resultados obtidos para o coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) foram analisados segundo a Análise de Variância *three-way* por meio do programa STATISTICA 7.0 *for Windows*, para verificação.

#### **4.7.5. Ensaio de permeabilidade intestinal da lamivudina empregando as condições experimentais selecionadas**

Foi realizado um ensaio de permeabilidade intestinal empregando as condições experimentais selecionadas conforme as conclusões do planejamento experimental.

Esse ensaio se deu conforme descrito no item 4.7.4, exceto o tempo de duração que foi de cinco horas e os seguintes intervalos de coleta: 30 min, 1 h, 2 h, 3 h e 5 h. Os fármacos presentes nas amostras foram quantificados conforme descrito no item 4.7.4.1.

A quantidade total permeada ( $Q_t$ ), a constante de absorção aparente de primeira ordem ( $k_a$ ) e o coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) para a lamivudina e para o metoprolol foram calculados conforme o item 4.7.4.2 e, posteriormente, os coeficientes de permeabilidade aparente foram comparados com outros valores de  $P_{app}$  presentes na literatura para os mesmos fármacos utilizando outras técnicas no estudo da permeabilidade intestinal.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## **5.1. Desenvolvimento de método analítico para quantificação dos fármacos permeados**

### **5.1.1. Seleção do eletrólito de corrida e estabelecimento das condições de análise**

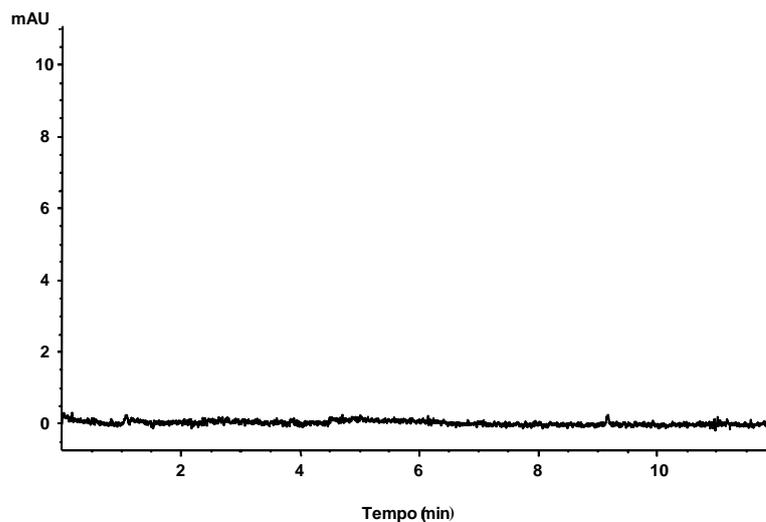
Nos ensaios de permeabilidade, cada amostra pode conter um dos antivirais, o padrão interno de alta permeabilidade (metoprolol), em alguns casos, o padrão interno de baixa permeabilidade (floridizina) e os sais presentes na solução de Ringer, assim, o eletrólito de corrida deve separar, simultaneamente, esses fármacos para que sejam detectados e quantificados.

A literatura traz poucos métodos eletroforéticos aplicados às análises dessas substâncias, porém não em misturas complexas. LOREGIAN e colaboradores (2001) analisaram o aciclovir presente em amostra de plasma, pela técnica de eletroforese capilar, empregando eletrólito com tampão acetato pH 4,2. FAN e STEWART (2002) desenvolveram e validaram o método de cromatografia eletrocínética micelar para a separação de duas misturas de antiretrovirais em plasma, uma delas contendo zidovudina, didanosina e nevirapina e a outra contendo zidovudina, didanosina e ritonavir, utilizando um eletrólito contendo 18 mM de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 15 mM de tampões fosfato e borato (pH9,0). SEKAR e AZHAGUVEL (2005) aplicaram a técnica da cromatografia eletrocínética micelar (MEKC) para a simultânea determinação da lamivudina e da zidovudina presentes em uma formulação farmacêutica utilizando um eletrólito contendo 12,5 mM de tetraborato de sódio decahidratado (TBS), 15 mM de ácido bórico (pH 10,8), 90 mM de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 5% (v/v) de acetonitrila. PENG e colaboradores (2005) desenvolveram um método de eletroforese capilar com detecção eletroquímica para a determinação simultânea de floridizina, epicaequina, ácido clorogênico e miricetina em suco de maçã empregando como eletrólito uma solução contendo 50 mM/L de tampão borato (pH 8,7). WANG e colaboradores (2005) também desenvolveram um método de eletroforese capilar com detecção eletroquímica para a determinação de cinco fármacos  $\beta$ -agonistas, dentre eles o metoprolol, presentes em amostras de plasma tendo como eletrólito uma

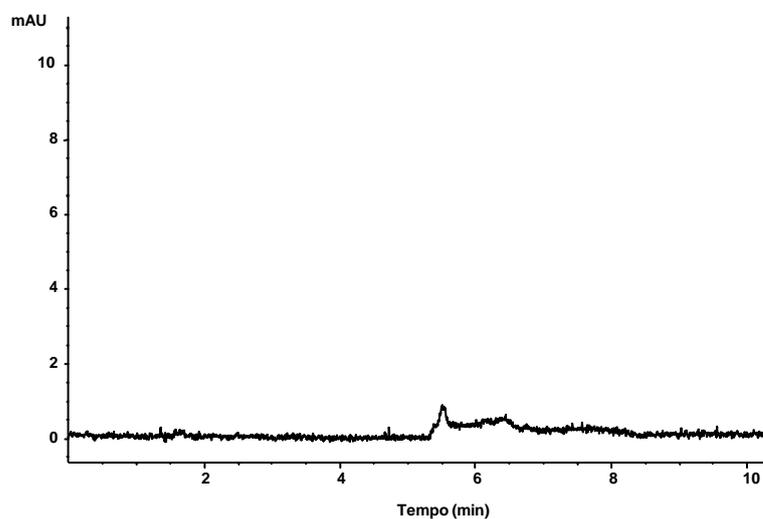
solução a 100 mM de  $H_3BO_3 - Na_2B_4O_7$  (LOREGIAN et al., 2001 ; FAN, STEWART, 2002 ; PENG *et al.*, 2005 ; SEKAR, AZHAGUVEL, 2005 ; WANG *et al.*, 2005). Foi desenvolvido um eletrólito e foram empregadas determinadas condições para que os analitos fossem separados, ao mesmo tempo, com a melhor resolução e no menor tempo possíveis.

Foi utilizado um eletrólito contendo 10 mM de solução tampão fosfato (pH 2,5), porém, não se obteve a separação dos analitos, como mostrado na Figura 7, o mesmo também foi observado, quando se utilizou outro eletrólito contendo 10 mM de solução tampão fosfato (pH 2,5) e 0,5% TEA (trietilamina), como pode ser verificado na Figura 8.

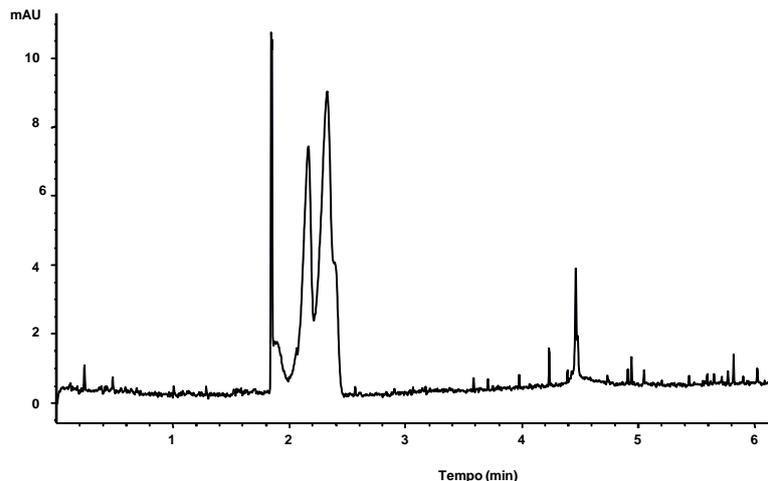
No entanto, quando a técnica de Cromatografia Eletrocínética Micelar (MEKC) foi utilizada, tendo como eletrólito tetraborato de sódio (TBS), adicionando o tensoativo dodecil sulfato de sódio (SDS), os picos dos analitos começaram a aparecer, porém sem a separação, o que pode ser observado na Figura 9. A adição do solvente orgânico metanol, também permitiu uma melhor separação, mas não efetiva, conforme a Figura 10. Outra tentativa foi adicionar 10 mM  $\beta$ -ciclodextrina, com separação de alguns analitos, mas não todos, o que é verificado pela Figura 11. Optou-se então, pela adição de acetonitrila e etanol ao eletrólito, mas que também não resultou na separação de todas as substâncias, conforme mostra a Figura 12. Por fim, foi ensaiado um eletrólito contendo 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9,2) e 10% (v/v) etanol, em que se observou a separação de todas as substâncias, num tempo menor que oito minutos, como observado na Figura 13. Verificou-se também que, aplicando uma corrente de 80  $\mu$ A, uma boa separação foi obtida e os picos apresentaram melhor resolução a 214 nm. O tempo de injeção de 10 s foi utilizado pela baixa concentração de fármaco presente nas soluções analisadas.



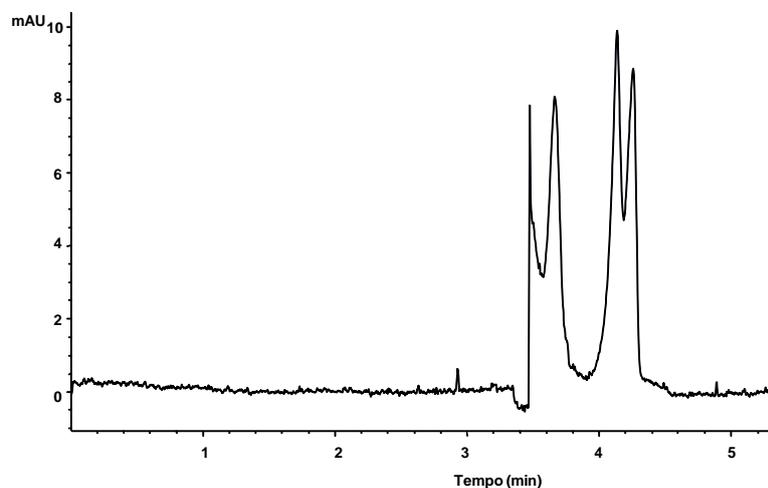
**Figura 7.** Eletroferograma de lamivudina, aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol em Ringer. Capilar: 75  $\mu\text{m}$ , 40 cm; eletrólito: 10 mM tampão fosfato (pH 2,5); corrente: 80  $\mu\text{A}$ ; 25  $^{\circ}\text{C}$ ; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/10 s;  $\lambda=214$  nm.



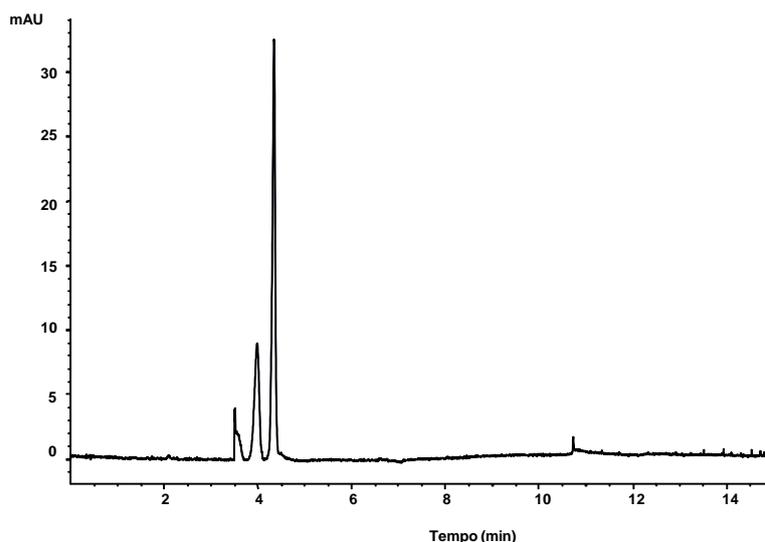
**Figura 8.** Eletroferograma de lamivudina, aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol em Ringer. Capilar: 75  $\mu\text{m}$ , 40 cm; eletrólito: 10 mM tampão fosfato (pH 2,5) e 0,5% TEA (triethylamina); corrente: 80  $\mu\text{A}$ ; 25  $^{\circ}\text{C}$ ; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/10 s;  $\lambda=214$  nm.



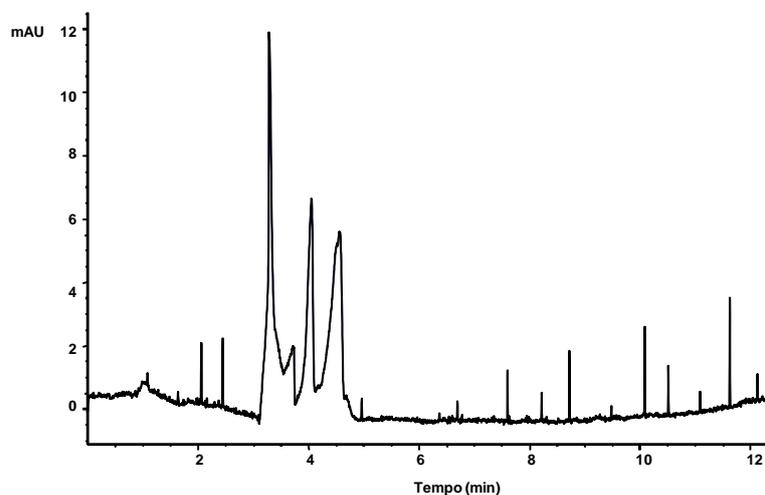
**Figura 9.** Eletroferograma de MEKC de lamivudina, aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol em Ringer. Capilar: 75  $\mu\text{m}$ , 40 cm; tampão: 40 mM SDS, 10 mM TBS (pH 9,2); corrente: 80  $\mu\text{A}$ ; 25  $^{\circ}\text{C}$ ; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/10 s;  $\lambda=214$  nm.



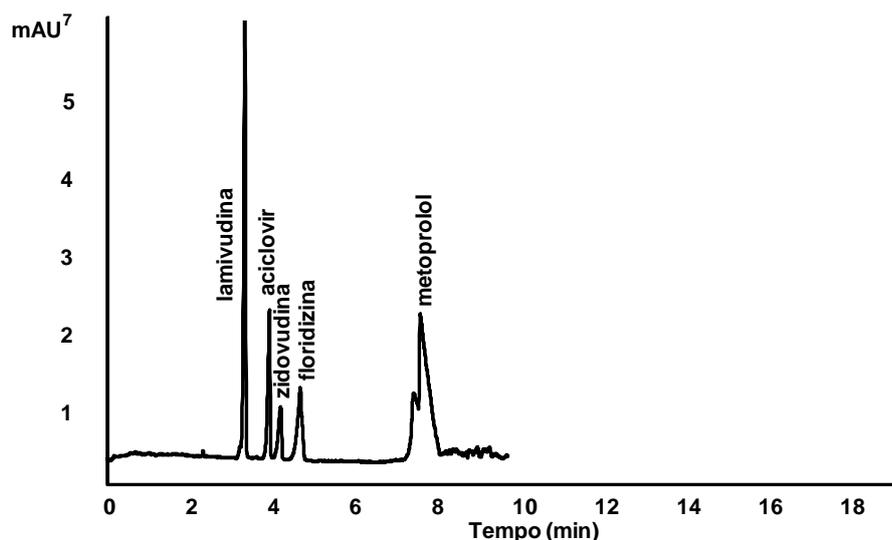
**Figura 10.** Eletroferograma de MEKC de lamivudina, aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol em Ringer. Capilar: 75  $\mu\text{m}$ , 40 cm; tampão: 40 mM SDS, 10 mM TBS (pH 9,2), 20% (v/v) metanol; corrente: 80  $\mu\text{A}$ ; 25  $^{\circ}\text{C}$ ; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/10 s;  $\lambda=214$  nm.



**Figura 11.** Eletroferograma de MEKC de lamivudina, aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol em Ringer. Capilar: 75  $\mu\text{m}$ , 40 cm; tampão: 30 mM SDS, 10 mM TBS (pH 9,2), 10 mM  $\beta$ -ciclodextrina; corrente: 80  $\mu\text{A}$ ; 25  $^{\circ}\text{C}$ ; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/10 s;  $\lambda=214$  nm.



**Figura 12.** Eletroferograma de MEKC de lamivudina, aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol em Ringer. Capilar: 75  $\mu\text{m}$ , 40 cm; tampão: 20 mM SDS, 10 mM TBS (pH 9,2), 30% acetonitrila (v/v) e 5% etanol (v/v); corrente: 80  $\mu\text{A}$ ; 25  $^{\circ}\text{C}$ ; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/10 s;  $\lambda=214$  nm.



**Figura 13.** Eletroferograma de MEKC de lamivudina, aciclovir, zidovudina, floridizina e metoprolol em Ringer. Capilar: 75  $\mu\text{m}$ , 40 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9,2), 10% etanol (v/v); corrente: 80  $\mu\text{A}$ ; 25  $^{\circ}\text{C}$ ; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/10 s;  $\lambda=214$  nm.

## 5.2. Validação do método analítico desenvolvido

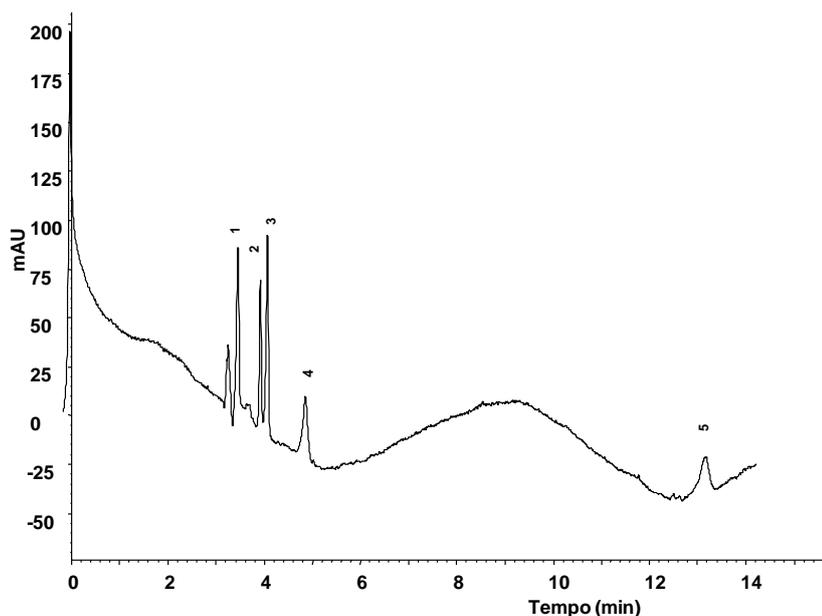
Os procedimentos de validação foram realizados para garantir, experimentalmente, que a metodologia proposta para a quantificação dos fármacos que permearam a membrana intestinal nos estudos de permeação atendesse às exigências preconizadas, a fim de garantir a confiabilidade dos resultados obtidos pela aplicação do método (BRASIL, 2003; ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2012).

### 5.2.1. Seletividade/Especificidade

Seletividade é a capacidade do método em determinar exatamente um composto na presença de outras substâncias, tais como: impurezas, componentes da membrana biológica e produtos de degradação. Para a determinação desse parâmetro de validação, pode-se analisar uma amostra de fármacos contendo esses possíveis interferentes, determinando-se assim, a

capacidade do método em gerar resultados confiáveis, embora na presença deles.

A membrana biológica não interferiu na separação dos analitos, apenas alterou, um pouco, a linha de base e aumentou o tempo de separação dos analitos e, por isso, a seletividade do método foi comprovada, conforme mostrado na Figura 14.



**Figura 14.** Eletroferograma de MEKC de lamivudina (1), aciclovir (2), zidovudina (3), flordizina (4) e metoprolol (5) em Ringer, na presença da membrana biológica. Capilar: 75  $\mu\text{m}$ , 40 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9.2), 10% (v/v) etanol; corrente: 80  $\mu\text{A}$  ; 25°C; injeção hidrodinâmica: 0.5 psi/10 s;  $\lambda=214$  nm.

### 5.2.2. Linearidade

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

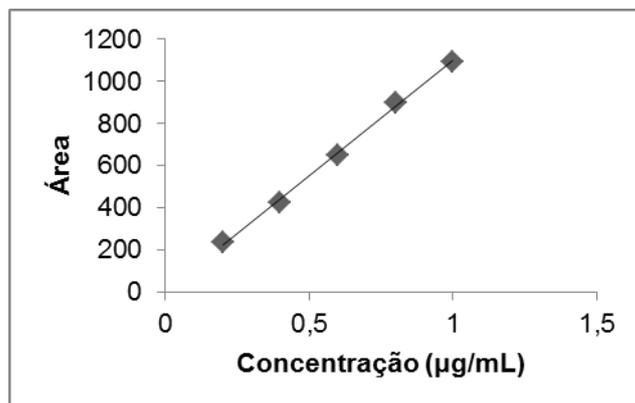
O método apresentou linearidade nas faixas de concentrações estudadas para a lamivudina, o aciclovir, a zidovudina, a flordizina e o

metoprolol e as equações de reta foram calculadas, conforme resultados apresentados na Tabela 3 e nas Figuras 15 a 19.

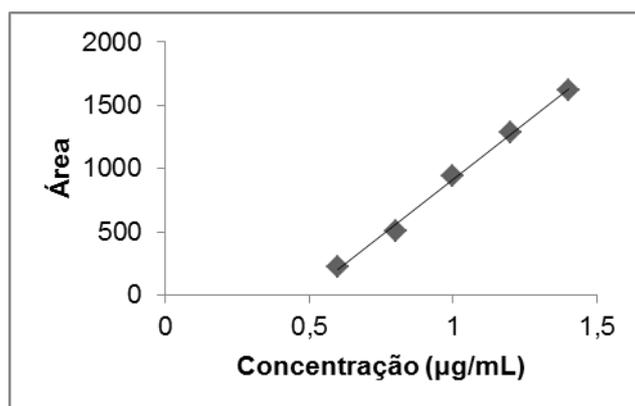
A faixa de concentração escolhida foi a menor detectável, visto que, em alguns momentos dos ensaios de permeação era esperado que pouca ou nenhuma quantidade de fármaco permeasse a membrana.

**Tabela 3.** Resultados estatísticos obtidos por meio da regressão linear a partir das curvas analíticas para a quantificação de lamivudina, aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol em solução de Ringer.

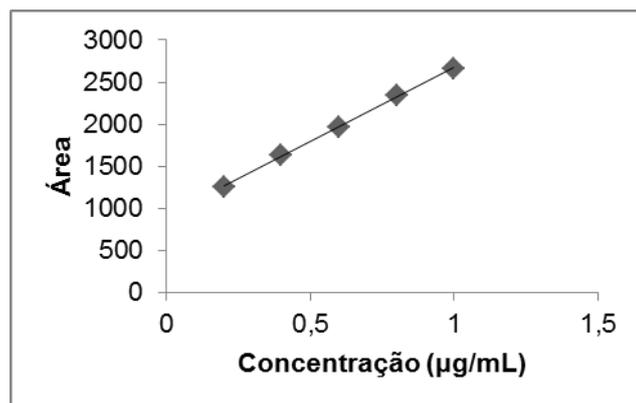
Substância	Equação da reta	Coefficiente angular (a)	Coefficiente linear (b)	Coefficiente de correlação (r)
Lamivudina	$y = 1095,3x + 2,133$	1095,3	2,133	0,9982
Aciclovir	$y = 1793,7x - 879,8$	1793,7	879,8	0,9969
Zidovudina	$y = 1768,7x + 909$	1768,7	909	0,9993
Flordizina	$y = 638,48x + 447,5$	638,48	447,5	0,9942
Metoprolol	$y = 455,63x - 1232,6$	455,63	1232,6	0,9996



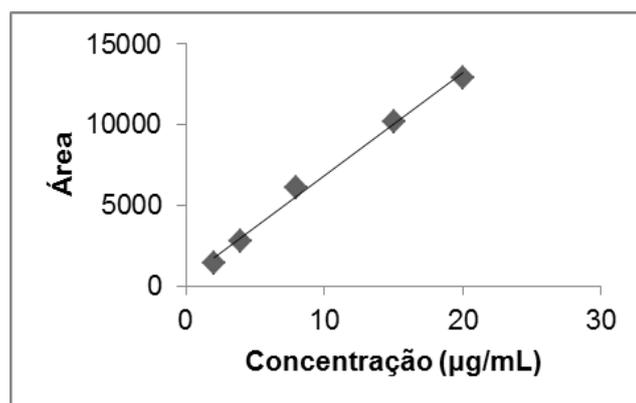
**Figura 15.** Curva analítica da lamivudina em solução de Ringer. Capilar: 75 µm, 40 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9.2), 10% (v/v) etanol; corrente: 80 µA ; 25 °C; injeção hidrodinâmica: 0.5 psi/10 s;  $\lambda=214$  nm.



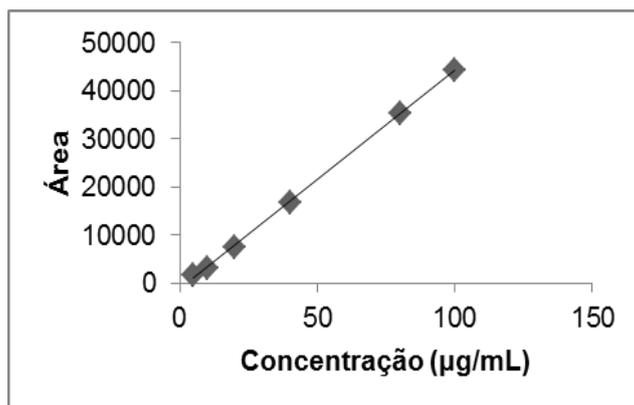
**Figura 16.** Curva analítica do aciclovir em solução de Ringer. Capilar: 75 µm, 40 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9.2), 10% (v/v) etanol; corrente: 80 µA ; 25 °C; injeção hidrodinâmica: 0.5 psi/10 s;  $\lambda=214$  nm.



**Figura 17.** Curva analítica da zidovudina em solução de Ringer. Capilar: 75 µm, 40 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9.2), 10% (v/v) etanol; corrente: 80 µA ; 25 °C; injeção hidrodinâmica: 0.5 psi/10 s;  $\lambda=214$  nm.



**Figura 18.** Curva analítica da flordizina em solução de Ringer. Capilar: 75 µm, 40 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9.2), 10% (v/v) etanol; corrente: 80 µA ; 25 °C; injeção hidrodinâmica: 0.5 psi/10 s;  $\lambda=214$  nm.



**Figura 19.** Curva analítica do metoprolol em solução de Ringer. Capilar: 75 µm, 40 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9.2), 10% (v/v) etanol; corrente: 80 µA ; 25 °C; injeção hidrodinâmica: 0.5 psi/10 s; λ=214 nm.

Conforme a Tabela 3 e as Figuras 15 a 19, o método apresentou linearidade para cada fármaco em estudo ( $r > 0,99$ ).

### 5.2.3. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção é a menor quantidade de analito presente na amostra e que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. O limite de quantificação é a menor quantidade de analito presente na amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Os limites de detecção e quantificação calculados para o método analítico proposto estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos na validação do método analítico para quantificação de lamivudina, aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol utilizando a técnica de cromatografia eletrocínética micelar (MEKC).

Limites ( $\mu\text{g/mL}$ )	Lamivudina	Aciclovir	Zidovudina	Flordizina	Metoprolol
LD	0,051	0,067	0,033	2,010	2,940
LQ	0,156	0,203	0,100	6,690	8,910

Os limites de detecção e quantificação foram adequados para o tipo de ensaio e para as quantidades esperadas de fármacos permeadas.

#### 5.2.4. Precisão

A precisão de um método analítico mede a proximidade entre uma série de medidas obtidos a partir de múltiplas amostragens provenientes de uma mesma amostra homogênea. Pode ser expressa como uma estimativa do desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação (CV%). A precisão pode ser avaliada em três diferentes níveis: repetibilidade (precisão intra-dia); precisão intermediária (precisão inter-dia) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial)

Os resultados obtidos com relação à precisão do método analítico desenvolvido estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Precisão obtida para lamivudina, aciclovir, zidovudina, floridizina e metoprolol a partir da determinação de 3 diferentes concentrações em um mesmo dia (intra-dia) e em 2 dias consecutivos (inter-dia) utilizando a técnica de cromatografia eletrocinética micelar (MEKC).

Substância	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	CV %	
		Intra-dia	Inter-dia
Lamivudina	0,5	1,276	1,296
	0,7	0,680	0,453
	0,9	0,885	0,440
Aciclovir	0,6	1,586	1,461
	1	2,115	1,642
	1,3	2,146	1,326
Zidovudina	0,3	0,495	1,317
	0,6	1,056	0,953
	0,9	0,284	0,896
Floridizina	4,5	0,872	0,738
	11,3	1,407	1,449
	18	0,626	0,743
Metoprolol	26,7	0,748	1,187
	58,4	0,882	0,659
	90	1,008	0,900

Valores de coeficiente de variação (CV%) menores que 5% são considerados aceitáveis (BRASIL, 2003; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2012). Dessa forma, os valores obtidos e apresentados na Tabela 5 demonstram a precisão do método.

### 5.2.5. Exatidão

A exatidão do método analítico é a proximidade entre os resultados obtidos pela aplicação do método e o resultado considerado verdadeiro.

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Exatidão obtida para lamivudina, aciclovir, zidovudina, floridizina e metoprolol a partir da determinação de 3 diferentes concentrações em um mesmo dia (intra-dia) e em 2 dias consecutivos (inter-dia) utilizando a técnica de cromatografia eletrocínética micelar (MEKC).

Substância	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	E %	
		Intra-dia	Inter-dia
Lamivudina	0,5	100,12	100,07
	0,7	99,75	100,21
	0,9	99,49	100,07
Aciclovir	0,6	102,02	101,83
	1	99,37	99,98
	1,3	99,18	100,23
Zidovudina	0,3	97,00	98,10
	0,6	101,67	97,97
	0,9	97,78	97,88
Floridizina	4,5	99,48	99,83
	11,3	100,63	99,92
	18	101,80	102,47
Metoprolol	26,7	100,93	100,01
	58,4	102,13	102,64
	90	103,30	101,45

Os valores obtidos encontram-se próximos de 100% e por isso confirmam uma adequada exatidão do método analítico.

### 5.2.6. Estabilidade

Para a obtenção de resultados confiáveis, deve-se assegurar que os padrões utilizados apresentem estabilidade durante um período razoável de tempo no meio biológico utilizado (RIBANI *et al.*, 2004).

A determinação da estabilidade de um fármaco em uma matriz biológica depende de diversos fatores, tais como: propriedades químicas do fármaco, condições de armazenamento, características da matriz biológica e material de acondicionamento (ANVISA, 2003; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010). A avaliação da estabilidade é necessária por mostrar que não existe variação na concentração de analito presente na amostra desde sua amostragem até sua análise (CAUSON, 1997).

Portanto, a estabilidade de curta duração, de longa duração e de ciclos de congelamento e descongelamento foi avaliada para a lamivudina, aciclovir, zidovudina, floridizina e metoprolol com o propósito de garantir que os fármacos permeados no meio receptor permaneceram estáveis desde o ensaio de permeabilidade até a sua quantificação.

Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 7 a 12.

**Tabela 7.** Ensaio de estabilidade para lamivudina, aciclovir, zidovudina, floridizina em solução de Ringer pH 8,2, após 6 horas a temperatura ambiente.

Concentração (µg/mL)	Razão%			
	Lamivudina	Aciclovir	Zidovudina	Floridizina
4	98,82	98,47	98,01	98,25
12	99,52	101,80	99,30	98,81

Razão: entre a amostra analisada e a recém-preparada

**Tabela 8.** Estabilidade para lamivudina, aciclovir, zidovudina e flordizina em solução de Ringer pH 8,2, após 30 dias a -20°C.

Concentração (µg/mL)	Razão%			
	Lamivudina	Aciclovir	Zidovudina	Flordizina
4	97,87	98,25	103,71	95,16
12	97,83	100,12	102,64	98,45

Razão: entre a amostra analisada e a recém-preparada

**Tabela 9.** Ensaio de estabilidade para lamivudina, aciclovir, zidovudina e flordizina em solução de Ringer pH 8,2, após ciclos de congelamento e descongelamento.

Concentração (µg/mL)	Razão%			
	Lamivudina	Aciclovir	Zidovudina	Flordizina
4	99,49	100,48	100,00	100,71
12	100,06	98,93	100,23	98,97

Razão: entre a amostra analisada e a recém-preparada

**Tabela 10.** Ensaio de estabilidade para o metoprolol em solução de Ringer pH 8,2, após 6 horas a temperatura ambiente.

Concentração (µg/mL)	Razão%
	Metoprolol
7	98,29
75	97,08

Razão: entre a amostra analisada e a recém-preparada

**Tabela 11.** Ensaio de estabilidade para o metoprolol em solução de Ringer pH 8,2, após 30 dias a -20°C.

Concentração (µg/mL)	Razão%
	Metoprolol
7	101,36
75	95,47

Razão: entre a amostra analisada e a recém-preparada

**Tabela 12.** Ensaio de estabilidade para o metoprolol em solução de Ringer pH 8,2, após ciclos de congelamento e descongelamento.

Concentração (µg/mL)	Razão%
	Metoprolol
7	99,51
75	99,53

Razão: entre a amostra analisada e a recém-preparada

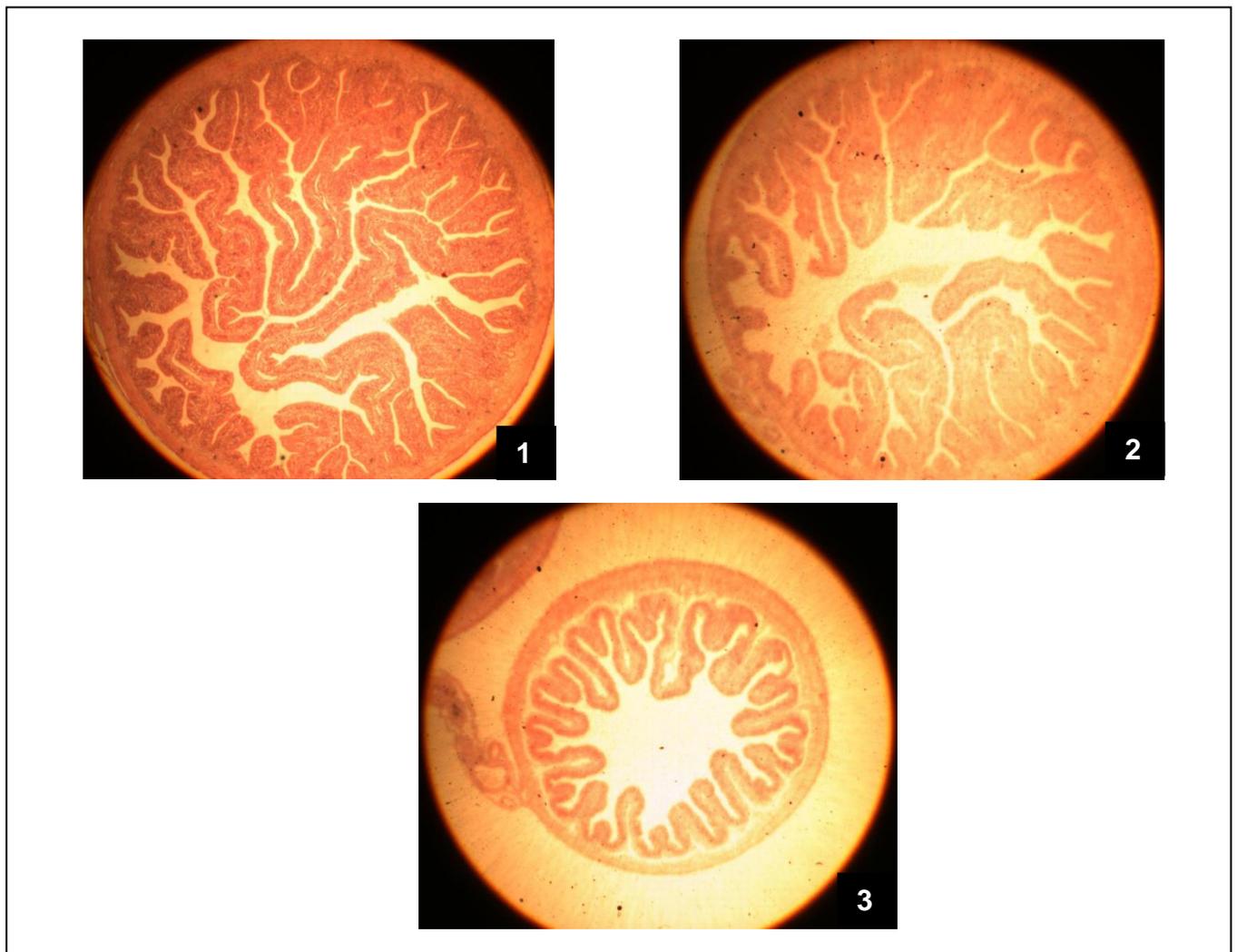
Conforme os resultados encontrados, as amostras foram consideradas estáveis nas condições experimentadas, pois apresentaram desvios inferiores a 5%, estando de acordo com o preconizado no “Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos” da Agência Nacional de Vigilância Sanitária que preconiza desvios inferiores a 15% (BRASIL, 2003).

### **5.3. Caracterização morfológica e histológica do epitélio intestinal da rã-touro (*Rana catesbeiana*)**

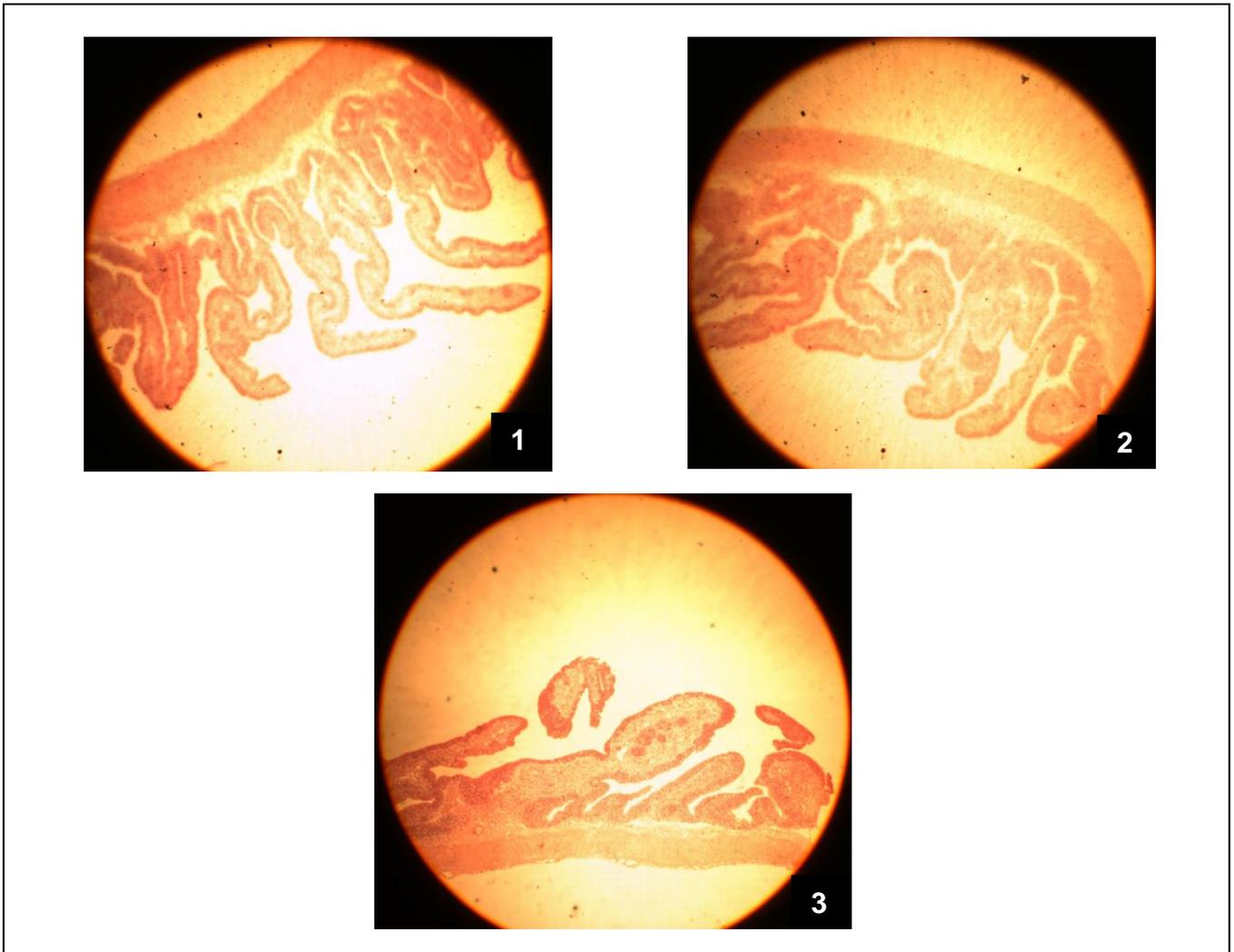
Com relação ao segmento intestinal, a literatura não traz, claramente, a divisão do intestino do anfíbio, divide-o em intestino delgado e grosso, sendo a porção anterior chamada de duodeno (DUELLMAN; TRUEB, 1986; GEORGE *et al.*, 1998). Outros autores dividem o intestino do anfíbio em região anterior, posterior e cólon (SAIDANE *et al.*, 1997), sendo assim, neste trabalho, com relação ao intestino delgado, a porção logo abaixo do estômago foi

denominada de inicial, a seguinte (com mais de 3 cm após o estômago), de mediana e a última (retirada aproximadamente 5 cm após o estômago) de final para facilitar o estudo.

As Figuras 20 e 21 ilustram os diferentes segmentos de intestino delgado da rã-touro (*Rana catesbeiana*) em cortes transversal e longitudinal corados pelo método Hematoxilina-Eosina (HE).



**Figura 20.** Intestino delgado da rã-touro (*Rana catesbeiana*) em corte transversal, porções inicial (1), mediana (2) e final (3) observados em microscópio óptico (HE, aumento 12,5X).



**Figura 21.** Intestino delgado da rã-touro em corte longitudinal, porções inicial (1), mediana (2) e final (3) observados em microscópio óptico (HE, aumento 12,5X).

Conforme o ilustrado nas Figuras 20 e 21 referentes ao intestino delgado da rã-touro (*Rana catesbeiana*), a porção inicial (1), também conhecida como duodeno, apresenta maior área de absorção, pela maior quantidade de vilosidades, sendo essas mais longas e, por isso, essa região pode caracterizar maior absorção intestinal. A porção mediana (2), se comparada à porção inicial (1), apresenta menor quantidade de vilosidades, sendo essas também mais curtas. E ainda, a porção final (3), se comparada às porções inicial (1) e mediana (2), apresenta poucas e curtas vilosidades, podendo caracterizar uma região de menor absorção. Devido a essas diferenças, diferentes valores de coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) podem ser obtidos para as diversas secções do intestino delgado.

Em humanos, a maior parte da absorção intestinal de substâncias deve ocorrer no duodeno e na porção proximal do jejuno (DESESSO; JACOBSON, 2001; SOUZA *et al.*, 2007). Essas regiões podem corresponder à região inicial (1) e à região mediana (2) do intestino delgado da rã apresentado nesse trabalho. A presença de vilosidades mais desenvolvidas na porção inicial, o que aumenta sensivelmente a área superficial da membrana, além da presença nessa região de uma estrutura mais frouxa, são fatores que contribuem para maior permeabilidade de substâncias hidrofílicas (MASAOKA *et al.*, 2006).

TRAPANI e colaboradores (2004), grupo que trabalhou com saco intestinal não invertido de *Rana esculenta*, utilizaram em seus experimentos de permeação a porção integral de 5 cm de intestino delgado iniciando logo abaixo do estômago (TRAPANI *et al.*, 2004), sem discriminar regiões. Por outro lado, algumas substâncias também podem apresentar maior permeabilidade nas porções posteriores do intestino delgado e no cólon, embora a área superficial seja menor e a estrutura da membrana menos frouxa, isso acontece, provavelmente, em virtude das características físico-químicas das substâncias (THOMSON *et al.*, 1986; MASAOKA *et al.*, 2006).

## **5.4. Estudo de permeabilidade intestinal**

### **5.4.1. Planejamento experimental**

Segundo o planejamento experimental, foram gerados 24 experimentos de permeação que foram realizados em quatro dias diferentes.

Tendo em vista as diferenças morfológicas e histológicas observadas nas três secções (inicial, mediana e final) estudadas do intestino delgado das rãs (*Rana catesbeiana*) e as possíveis diferenças quanto à permeação de substâncias, o planejamento experimental contemplou essas regiões a fim de verificar a influência desse parâmetro na permeação do fármaco em estudo.

O pH da solução de Ringer e a temperatura do experimento também foram ensaiados para verificar suas possíveis influências na permeabilidade. A variação da temperatura se deu pelo fato dos poucos trabalhos presentes na literatura que empregam epitélio intestinal de rã utilizarem a temperatura de 26 °C em seus experimentos (TRAPANI *et al.*, 2004; TRAPANI *et al.*, 2007;

FRANCO *et al.*, 2008), enquanto que, trabalhos utilizando intestino humano, de ratos ou de outro mamífero, assim como as células Caco-2, usam a temperatura de 37 °C (GRASS; SWEETANA, 1989; LEGEN *et al.*, 2005; ESPIÑA *et al.*, 2011; DIXIT *et al.*, 2012). A variação do pH da solução de Ringer utilizada nos experimentos se deu pois, da mesma forma como a variação da temperatura, os trabalhos presentes na literatura que utilizam epitélio intestinal de rã para estudos de permeabilidade, utilizam o pH 8,2 (TRAPANI *et al.*, 2004; TRAPANI *et al.*, 2007; FRANCO *et al.*, 2008) e nos ensaios que empregam epitélio intestinal de outros animais é utilizado o pH de 7,4 (GRASS; SWEETANA, 1989; LEGEN *et al.*, 2005; ROZEHNAL *et al.*, 2012).

#### **5.4.2. Avaliação da integridade dos segmentos intestinais utilizados no estudo**

A medida da resistência elétrica transepitelial (RET) da membrana intestinal é utilizada em estudos de permeabilidade para avaliar a viabilidade e a integridade da mesma, assim como nos estudos que utilizam as monocamadas de células Caco-2. Valores adequados de RET podem indicar a integridade da membrana (LEGEN; KRISTL, 2003; LEGEN *et al.*, 2005; ZAKELJ *et al.*, 2006; GONÇALVES *et al.*, 2009).

Não existe dado na literatura sobre a resistência elétrica transepitelial (RET) do intestino delgado de rã-touro (*Rana catesbeiana*), assim, foram feitas medidas após a retirada das secções intestinais obtendo valores variando entre 24 e 17  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ . Dessa forma, foram escolhidas as secções que apresentaram valores maiores que 20  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ .

Após seleção das secções, com base nesse parâmetro, os adaptadores das células de difusão foram montados e foi medida a resistência elétrica transepitelial (RET) no início e fim dos experimentos. As médias entre os resultados obtidos para a medida da resistência elétrica transepitelial (RET) no início e no fim dos experimentos de permeabilidade estão apresentadas na Tabela 13.

**Tabela 13.** Média dos valores de resistência elétrica transepitelial (RET) medidos no início e no fim dos experimentos de permeabilidade intestinal.

Secção intestinal	RET ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) $\pm$ DP	
	Início	Fim
Inicial (n = 8)	22 $\pm$ 2	21 $\pm$ 2
Mediana (n = 8)	23 $\pm$ 2	21 $\pm$ 1
Final (n = 8)	24 $\pm$ 1	21 $\pm$ 1

DP: desvio padrão dos valores em relação à média

SAIDANE e colaboradores (1997) estudaram três diferentes porções do intestino de rã (*Rana esculenta*), as quais chamaram de anterior, posterior e cólon e também verificaram que as porções anterior e posterior apresentam menores valores de resistência elétrica transepitelial, sendo assim, também por esse motivo, regiões de maior absorção de substâncias. E ainda, observaram que o intestino da rã mantinha, nas condições experimentais, uma diferença de potencial positivo por diversas horas e também que a resistência elétrica transepitelial (RET) não era afetada, significativamente, durante o período de experimento. No entanto, o valor observado de RET pelos autores difere dos verificados nesse trabalho, eles notaram um valor de  $118 \pm 10,8 \Omega \cdot \text{cm}^2$  para a região anterior (SAIDANE *et al.*, 1997). Essa discrepância pode ser devido às diferentes espécies envolvidas. A ausência, nas amostras permeadas, da floridizina - padrão interno de baixa permeabilidade e que não permeia a membrana (TRAPANI *et al.*, 2004) – reforça a comprovação de que a membrana permaneceu íntegra e viável durante os estudos de permeabilidade intestinal.

### **5.4.3. Ensaio de permeabilidade para avaliação da influência das variáveis em estudo – temperatura, pH da solução de Ringer e secção intestinal - e seleção das condições experimentais**

O ensaio de permeabilidade foi realizado de acordo com o planejamento experimental proposto.

#### **5.4.3.1. Análise dos resultados**

A partir da determinação analítica das amostras provenientes do ensaio de permeabilidade, foram calculados os principais parâmetros de permeação: quantidade total de fármaco permeada através da membrana intestinal durante o período de duas horas ( $Q_t$ ), constante de absorção aparente de primeira ordem ( $k_a$ ) e coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) para os experimentos 1, 2, 3 e 4 da Tabela 1 (BARRY, 1983; SHAH, 1994, TRAPANI *et al.*, 2004).

Como a floridizina não foi detectada, durante a quantificação, nas amostras provenientes dos estudos de permeabilidade intestinal, os parâmetros de permeação para essa substância não foram calculados.

Nas Tabelas 14 a 19 são apresentados os resultados obtidos.

**Tabela 14.** Resultados de quantidade total permeada ( $Q_t$ ) de lamivudina durante o período de duas horas através da membrana intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*) obtidos com concentração de 300  $\mu\text{g/mL}$  em solução de Ringer.

Dia	Temperatura	pH	Secção	$Q_t$ (ng)
1	26	7,4	Inicial	6850
			Mediana	4907
			Final	<0,057*
		8,2	Inicial	<0,057*
			Mediana	2398
			Final	7097
2	37	7,4	Inicial	9750
			Mediana	7378
			Final	3318
		8,2	Inicial	5037
			Mediana	7326
			Final	<0,057*
3	26	7,4	Inicial	2974
			Mediana	<0,057*
			Final	<0,057*
		8,2	Inicial	<0,057*
			Mediana	13692
			Final	3010
4	37	7,4	Inicial	<0,057*
			Mediana	<0,057*
			Final	3526
		8,2	Inicial	<0,057*
			Mediana	2824
			Final	14046

\* limite de detecção ( $\mu\text{g/mL}$ )

**Tabela 15.** Resultados de constante de absorção aparente de primeira ordem ( $k_a$ ) para a lamivudina permeada através da membrana intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante o período de duas horas e obtidos com concentração de 300 µg/mL em solução de Ringer.

Dia	Temperatura	pH	Secção	$k_a$
1	26	7,4	Inicial	82,80
			Mediana	49,07
			Final	-
		8,2	Inicial	-
			Mediana	30,61
			Final	73,23
2	37	7,4	Inicial	111,23
			Mediana	78,12
			Final	33,18
		8,2	Inicial	55,61
			Mediana	87,34
			Final	-
3	26	7,4	Inicial	36,90
			Mediana	-
			Final	-
		8,2	Inicial	-
			Mediana	99,36
			Final	30,10
4	37	7,4	Inicial	-
			Mediana	-
			Final	37,47
		8,2	Inicial	-
			Mediana	34,84
			Final	110,27

**Tabela 16.** Resultados de coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) para a lamivudina permeada através da membrana intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante o período de duas horas e obtidos com concentração de 300 µg/mL em solução de Ringer.

Dia	Temperatura	pH	Secção	$P_{app}$ ( $10^{-4}$ cm/s)
1	26	7,4	Inicial	0,23
			Mediana	0,10
			Final	-*
		8,2	Inicial	-*
			Mediana	0,09
			Final	0,20
2	37	7,4	Inicial	0,31
			Mediana	0,22
			Final	0,09
		8,2	Inicial	0,15
			Mediana	0,24
			Final	-*
3	26	7,4	Inicial	0,10
			Mediana	-*
			Final	-*
		8,2	Inicial	-*
			Mediana	0,28
			Final	0,08
4	37	7,4	Inicial	-*
			Mediana	-*
			Final	0,10
		8,2	Inicial	-*
			Mediana	0,10
			Final	0,31

\*Na análise do planejamento experimental, foi adotado como valor zero, visto que não houve quantidade suficiente de fármaco na amostra para ser detectada pelo método analítico.

**Tabela 17.** Resultados de quantidade total permeada ( $Q_t$ ) de metoprolol durante o período de duas horas através da membrana intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*) obtidos com concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$  em solução de Ringer.

Dia	Temperatura	pH	Secção	$Q_t$ (ng)
1	26	7,4	Inicial	23000
			Mediana	11762
			Final	15557
		8,2	Inicial	12110
			Mediana	25255
			Final	13055
2	37	7,4	Inicial	12831
			Mediana	14726
			Final	4715
		8,2	Inicial	17803
			Mediana	2526
			Final	4215
3	26	7,4	Inicial	15482
			Mediana	25906
			Final	12304
		8,2	Inicial	21156
			Mediana	14288
			Final	6016
4	37	7,4	Inicial	27184
			Mediana	8232
			Final	30420
		8,2	Inicial	12727
			Mediana	13799
			Final	24612

**Tabela 18.** Resultados de constante de absorção aparente de primeira ordem ( $k_a$ ) para o metoprolol permeado através da membrana intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante o período de duas horas e obtidos com concentração de 200 µg/mL em solução de Ringer.

Dia	Temperatura	pH	Secção	$k_a$
1	26	7,4	Inicial	224,17
			Mediana	125,18
			Final	130,30
		8,2	Inicial	145,77
			Mediana	258,68
			Final	160,20
2	37	7,4	Inicial	145,46
			Mediana	162,40
			Final	56,55
		8,2	Inicial	153,53
			Mediana	28,07
			Final	48,95
3	26	7,4	Inicial	157,88
			Mediana	199,36
			Final	130,18
		8,2	Inicial	231,22
			Mediana	151,23
			Final	74,77
4	37	7,4	Inicial	303,13
			Mediana	93,13
			Final	302,37
		8,2	Inicial	135,38
			Mediana	133,42
			Final	178,97

**Tabela 19.** Resultados obtidos de coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) para o metoprolol permeado através da membrana intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante o período de duas horas e obtidos com concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$  em solução de Ringer.

Dia	Temperatura	pH	Secção	$P_{app}$ ( $10^{-4}$ cm/s)
1	26	7,4	Inicial	0,93
			Mediana	0,52
			Final	0,54
		8,2	Inicial	0,61
			Mediana	1,08
			Final	0,67
2	37	7,4	Inicial	0,61
			Mediana	0,68
			Final	0,24
		8,2	Inicial	0,64
			Mediana	0,12
			Final	0,20
3	26	7,4	Inicial	0,66
			Mediana	0,83
			Final	0,54
		8,2	Inicial	0,96
			Mediana	0,63
			Final	0,31
4	37	7,4	Inicial	1,26
			Mediana	0,39
			Final	1,26
		8,2	Inicial	0,56
			Mediana	0,56
			Final	0,75

#### 5.4.3.2. Análise do planejamento experimental

A significância das variáveis foi obtida por meio da Análise de Variância *three-way* conforme as Tabelas 20 e 21.

**Tabela 20.** Análise de variância (ANOVA) *three-way* para o coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) da lamivudina.

Variáveis	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F	p
Temperatura	80,7	1	80,7	0,60	0,449
pH da solução de Ringer	37,5	1	37,5	0,28	0,604
Secção intestinal	50,1	2	25,0	0,19	0,832
Resíduo	2561,1	19	134,8		
Total	2729,3	23			

**Tabela 21.** Análise de variância (ANOVA) *three-way* para o coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) do metoprolol.

Variáveis	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F	p
Temperatura	425,0	1	425,0	0,47	0,500
pH da solução de Ringer	782,0	1	782,0	0,87	0,363
Secção intestinal	2110,3	2	1055,2	1,17	0,331
Resíduo	17112,5	19	900,7		
Total	20430,0	23			

Segundo os resultados da análise de variância *three-way*, os efeitos das variáveis independentes (temperatura, pH da solução de Ringer e secção intestinal) não foram significativos ( $p > 0,05$ ), isto é, as variáveis não interferem nos resultados obtidos. Portanto, o cálculo das médias representa melhor o que acontece nesse experimento com o coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) - em média, a lamivudina é menos permeável que o metoprolol.

Para o metoprolol, a secção intestinal inicial (nível 1) apresentou, comparando-se com as demais variáveis, uma maior interferência positiva na permeabilidade, o que pode ser confirmado pelos resultados obtidos no estudo morfológico e histológico das secções intestinais.

Diante desses resultados, a utilização de qualquer nível para a variável de temperatura e pH da solução de Ringer não influencia os resultados obtidos e por isso, na aplicação do método para estudo da permeabilidade de fármacos, podem ser selecionadas, dentre os níveis apresentados, as condições nas quais se deseja trabalhar e desenvolver os experimentos.

#### **5.4.4 Ensaio de permeabilidade intestinal da lamivudina empregando as condições experimentais selecionadas**

Na análise do planejamento experimental para definição dos parâmetros do experimento de permeabilidade (item 5.4.3), foi verificada uma tendência para efeito positivo na permeabilidade do metoprolol relacionada à secção intestinal o que é confirmado pela análise morfológica e histológica do intestino da rã-touro (*Rana catesbeiana*), por isso, a secção inicial foi selecionada nos ensaios para determinação da permeabilidade da lamivudina. As seguintes condições adicionais foram selecionadas para a realização dos ensaios: temperatura de 26 °C e pH 8,2, adotando os mesmos parâmetros empregados por TRAPANI e colaboradores (2004) que trabalharam com membrana intestinal de *Rana esculenta* (TRAPANI *et al.*, 2004).

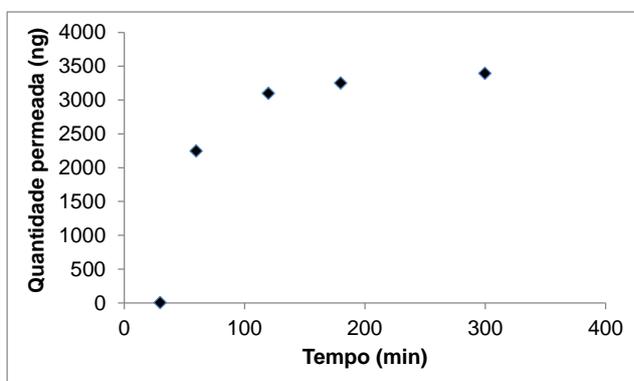
As curvas que mostram a permeação do fármaco modelo – lamivudina- e do padrão interno de alta permeabilidade – metoprolol – estão apresentadas nas Figuras 22 e 23.

A partir do cálculo dos coeficientes angulares das porções lineares das curvas apresentadas nas Figuras 22 e 23, obtiveram-se as constantes de

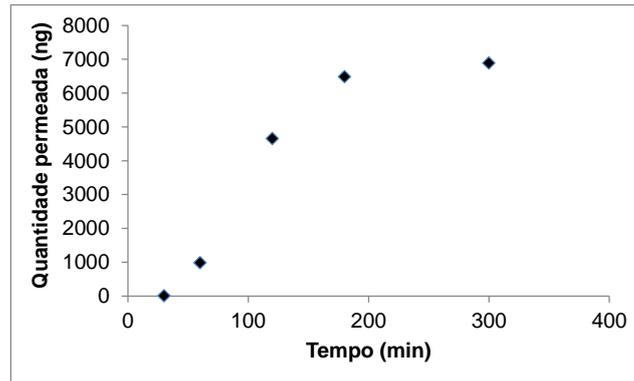
absorção aparente de primeira ordem ( $k_a$ ), conforme mostrado nas Figuras 24 e 25.

Os resultados de quantidade total permeada ( $Q_t$ ), constante de absorção aparente de primeira ordem ( $k_a$ ) e coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ), obtidos para a lamivudina e para o metoprolol, estão sumarizados na Tabela 22.

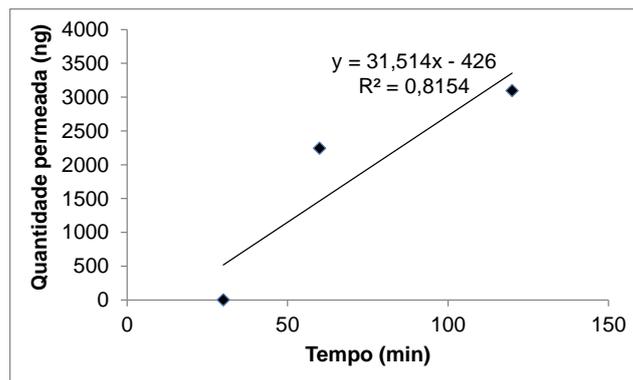
Na Tabela 23, encontram-se os resultados de coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) obtidos para a lamivudina e para o metoprolol utilizando o método proposto, assim como aqueles provenientes de diferentes técnicas encontradas na literatura.



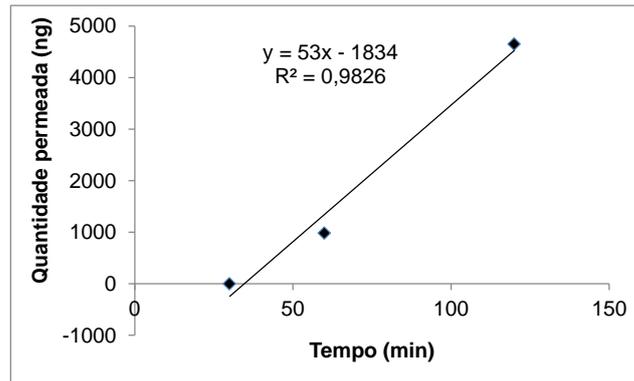
**Figura 22.** Quantidade permeada de lamivudina (ng) através do epitélio intestinal da rã-touro (*Rana catesbeiana*) em função do tempo (min). Média de duas determinações.



**Figura 23.** Quantidade permeada de metoprolol (ng) através do epitélio intestinal da rã-touro (*Rana catesbeiana*) em função do tempo (min). Média de duas determinações.



**Figura 24.** Quantidade permeada da lamivudina (ng) através do epitélio intestinal da rã-touro (*Rana catesbeiana*) em função do tempo. Obtenção da constante de absorção de primeira ordem ( $k_a$ ) por egressão linear. Média de duas determinações.



**Figura 25.** Quantidade permeada do metoprolol (ng) através do epitélio intestinal da rã-touro (*Rana catesbeiana*) em função do tempo. Obtenção da constante de absorção de primeira ordem ( $k_a$ ) por regressão linear. Média de duas determinações.

**Tabela 22.** Resultados de quantidade total permeada ( $Q_t$ ), constante de absorção de primeira ordem ( $k_a$ ) e coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) obtidos para a lamivudina e para o metoprolol em estudos de permeação utilizando epitélio intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*).

Substância	$Q_t$ (ng)	$k_a$	$P_{app}$ ( $10^{-4} \text{ cm.s}^{-1}$ )
Lamivudina	3390	31,514	0,09
Metoprolol	6882	53,0	0,22

**Tabela 23.** Valores de coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app} \cdot 10^{-4}$  cm/s) para lamivudina e metoprolol obtidos no presente trabalho e os observados na literatura por meio de outros modelos experimentais.

Substâncias	$P_{app}$ provenientes de diferentes técnicas ( $10^{-4}$ cm/s)			
	Células de Franz	Câmaras de Ussing	Saco intestinal de rã	Células Caco – 2
Lamivudina	0,09	-	-	0,0105 <sup>(1)</sup>
Metoprolol	0,22	0,24 <sup>(2)</sup>	0,1399 <sup>(3)</sup>	0,27 <sup>(4)</sup>

<sup>(1)</sup> SOUZA *et al.*, 2009; <sup>(2)</sup>WATANABE *et al.*, 2004; <sup>(3)</sup>TRAPANI *et al.*, 2004 ;  
<sup>(4)</sup>UCHIDA *et al.*, 2009

Os resultados de coeficiente de permeabilidade aparente para o metoprolol presentes na Tabela 23 indicam semelhanças entre os obtidos nesse trabalho e aqueles verificados na literatura utilizando as câmaras de Ussing e intestino de rato, uma vez que as técnicas empregadas são semelhantes. Também, aproximam-se com o resultado obtido usando as células Caco-2, isso pode ser explicado pelo fato do metoprolol ser uma substância com alta permeabilidade e por isso não haver grandes discordâncias quanto ao seu coeficiente de permeabilidade aparente e, conseqüentemente, quanto a sua classificação biofarmacêutica, sendo considerado pela FDA um padrão interno de alta permeabilidade nos estudos de permeação intestinal. Porém, não se aproxima do resultado obtido por TRAPANI e colaboradores (2004), sendo um valor maior e isso pode ser explicado pelo fato dos autores terem usado um saco de intestino delgado, enquanto nesse trabalho, foi usada a porção desse intestino logo abaixo do estômago, caracterizada pelo estudo morfológico e histológico como a de maior absorção (TRAPANI *et al.*, 2004)

Para a lamivudina, a literatura não traz resultados de coeficiente de permeabilidade aparente provenientes de estudos utilizando câmaras de Ussing como aparato, sendo assim, a partir dos resultados do metoprolol,

pode-se deduzir que esses resultados da lamivudina deveriam ser semelhantes aos da câmara de Ussing caso houvesse para comparação. Porém, os resultados da lamivudina diferem-se daqueles provenientes das células Caco-2. Essa diferença nos valores de  $P_{app}$  pode ser explicada pela variabilidade entre os próprios resultados de  $P_{app}$  obtidos utilizando as células Caco-2 em diferentes laboratórios e também pelo fato dessas células possuírem elevada expressão de transportadores de efluxo, o que pode subestimar a absorção da lamivudina, embora esta seja um fraco substrato de P-gp (TRAPANI, 2004; SOUZA, 2005).

## **6. CONCLUSÃO**

Com o desenvolvimento deste trabalho, foi desenvolvido e validado o método analítico para a quantificação dos fármacos permeados, o epitélio intestinal da rã-touro foi caracterizado e com isso, foi proposto um novo método de estudo para a permeabilidade intestinal de fácil execução, baixíssimo custo e resultados que podem ser comparados a outras técnicas atualmente empregadas. Adicionalmente, o método aperfeiçoa aquele anteriormente proposto na literatura utilizando saco intestinal não invertido de rã (*Rana esculenta*), pois define com maior precisão a área de permeação e as secções intestinais utilizadas, o que explica a maior permeabilidade encontrada para o metoprolol.

Por outro lado, mais experimentos com outros fármacos devem ser realizados para a obtenção de novos resultados, a fim de correlacioná-los com os estudos de biodisponibilidade *in vivo*, possibilitando a aplicação desse novo método nos estudos de permeabilidade intestinal e, conseqüentemente, na elucidação da classificação biofarmacêutica dos fármacos.

É importante salientar que a substituição dos ensaios de biodisponibilidade por técnicas alternativas é um objetivo constantemente perseguido pelos pesquisadores nos últimos anos em função das sérias limitações econômicas, técnicas e éticas apresentadas nos ensaios envolvendo indivíduos humanos sadios. Dessa forma, com a fundamentação e aplicação do presente método, poder-se-á fortalecer a criação de uma nova plataforma tecnológica para aplicação em estudos de permeabilidade intestinal de fármacos.

## **7. REFERÊNCIAS**

- ALSENZ, J.; HAENEL, E. Development of a 7-day, 96-well Caco-2 permeability assay with high-throughput direct UV compound analysis. *Pharmaceutical Research*, v.20, p.1961-1969, 2003.
- AMIDON, G.L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharmaceutical Research*, v.12, n.3, p.413-420, 1995.
- ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, L.V. *Delineamento de formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. 8.ed. São Paulo: Artmed, 2007, 775p.
- ARTURSSON, P.; KARLSSON, J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.175, n.3, p.880-885, 1991.
- ARTURSSON, P.; UGELL, A.; LÖFROTH, J. Selective paracellular permeability in two models of intestinal absorption: cultured monolayer of human intestinal epithelial cells and rat intestinal segments. *Pharmaceutical Research*, v.10, n.8, p.1123-1129, 1993.
- ASHFORD, M. Introdução à biofarmácia. In: AULTON, M.E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005a. cap.15, p.225-228.
- ASHFORD, M. O trato gastrintestinal – fisiologia e absorção de fármacos. In: AULTON, M.E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005b. cap.16, p.229-244.
- ASHFORD, M. Biodisponibilidade – fatores físico-químicos e relacionados à forma farmacêutica. In: AULTON, M.E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005c. cap.17, p.245-263.
- AULTON, M. Dissolução e solubilidade. In: AULTON, M.E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap.2, p.31-47.
- AVADI, M.R.; ERFAN, M.; SADEGHI, A.M.M.; MOEZI, L.; DEHPOUR, A.R.; YOUNESSI, P.; RAFIEE-TEHRANI, M.; SHAFIEE, A. N,N-diethyl N-methyl chitosan as an enhancing agent for colon drug delivery. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v.19, p.421-433, 2004.
- AZENHA, M.A.; EVANGELISTA, R.; MARTEL, F.; VASCONCELOS, M.T. Estimation of the human intestinal permeability of butyltin species using the Caco-2 cell line model. *Food and Chemical Toxicology*, v.42, p.1431-1442, 2004.
- BAHRAMI, G.; MIRZAEI, S.; KIANI, A.; MOHAMMADI, B. High-performance liquid chromatographic determination of lamivudine in human serum using liquid-liquid

- extraction; application to pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography B*, v.823, p.213-217, 2005.
- BALIMANE, P.V.; CHONG, S.; MORRISON, R.A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v.44, p.301-312, 2000.
- BARRY, B.W. *Dermatological formulations: percutaneous absorption*. New York: Marcel Dekker, 1983. v.18, 480 p.
- BARTHE, L.; WOODLEY, J.; HOUIN, G. Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies. *Fundamental Clinical Pharmacology*, v.13, p.154-168, 1999.
- BCS. Biopharmaceutical Classification System. Disponível em: <http://www.tsrlinc.com/services/bcs/search.cfm>. Acesso em: 08 maio 2010.
- BEAUMONT, K. The importance of gut wall metabolism in determining drug bioavailability: *In Drug Bioavailability: Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability*. Editado por Han van de Waterbeemd, Hans Lennernäs e Per Artursson, Wiley-VCH, cap.13, p.311-329, Weinheim, 2003.
- BONAMICI, D. *Sistema de classificação biofarmacêutica e bioisotopos*. São Paulo, 2009. 171p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. RIISPOSA – Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Rio de Janeiro, 1952.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. VISALEGIS. Lei n.9787, de 10 de fevereiro de 1999. Altera a Lei n.6360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/consolidada/lei\\_9787\\_99.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/consolidada/lei_9787_99.htm). Acesso em: 10 jan. 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. VISALEGIS. Resolução RE n.899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm). Acesso em: 08 fev. 2011.
- BREDA, S.A.; JIMENEZ-KAIRUZ, A.F.; MANZO, R.H.; OLIVERA, M.E. Solubility behavior and biopharmaceutical classification of novel high-solubility ciprofloxacin and norfloxacin pharmaceutical derivatives. *International Journal of Pharmaceutics*, v.371, p.106-113,

2009.

- BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. *Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica*. 11.ed. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill, 2006, 1821 p.
- CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. *Journal of Chromatography B*, v.689, p.175-180, 1997.
- CHAN, K.; LIU, Z.Q.; JIANG, Z.H.; ZHOU, H.; WONG, Y.F.; XU, H-X.; LIU, L. The effects of sinomenine on intestinal absorption of paeoniflorin by the everted rat gut sac model. *Journal of Ethnopharmacology*, v.103, p.425-432, 2006.
- CHENG , K-C.; LI, C.; HSIEH, Y.; MONTGOMERY, D.; LIU, T.; WHITE, R.E. Development of a high-throughput in vitro assay using a novel Caco-2/rat hepatocyte system for the prediction of oral plasma area under the concentration versus time curve (AUC) in rats. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v.53, p.215-218, 2006.
- COLEMAN, D.E.; MONTEGOMERY, D.C. A systematic approach to planning for a designed industrial experiments. *Technometrics*, v.35, n.1, p.1-12, 1993.
- CONSIGLIERI, V.O.; STORPIRTIS, S.; FERRAZ, H.G. Aspectos farmacotécnicos relacionados à biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, v.21, p.23-41, 2000.
- COOK, J.; ADDICKS, W.; WU, Y.H. Application of the biopharmaceutical classification system in clinical drug development – An industrial view. *The AAPS Journal*, v.10, n.2, p.306-310, 2008.
- DAHAN, A.; MILLER, J.M.; AMIDON, G.L. Prediction of solubility and permeability class membership: provisional BCS classification of the world's top oral drugs. *The AAPS Journal*, v.11, p.740-746, 2009.
- DESESSO, J.M.; JACOBSON, C.F. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food and Chemical Toxicology*, v.39, p.209-228, 2001.
- DEZANI, A.B. Avaliação in vitro da solubilidade e da permeabilidade da lamivudina e da zidovudina. Aplicações na Classificação Biofarmacêutica. São Paulo, 2010. 140p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- DIXIT, P.; JAIN, D.K.; DUMBWANI, J. Standardization of an ex vivo method for determination of intestinal permeability of drugs using everted rat intestine apparatus. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v.65, p.13-17, 2012.

- DUELLMAN, W.E.; TRUEB, L. *Biology of amphibians*. 2.ed. New York: McGraw-Hill Book Company, 1986, 670p.
- EGAN, W.; LAURI, G. Prediction of intestinal permeability. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.54, p.273–289, 2002.
- ESCUDE-GILABERT, L.; MARTINEZ-PLA, J.J.; SAGRADO, S.; VILLANUEVA CAMAÑAS, R.M.; MEDINA HERNÁNDEZ, M.J. Biopartitioning micellar separation methods: modeling drug absorption. *Journal of Chromatography B*, v.797, p.21-35, 2003.
- EMA Evaluation of Medicines for Human Use. Committee for Proprietary Medicinal Products. *Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence*. London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 2001. 17p.
- EMA Pre-Authorisation Evaluation of Medicines for Human Use. Committee for Medicinal Products for Human Use. *Guideline on the investigation of bioequivalence*. London:European Medicines Agency, 2008. 29p.
- ESPIÑA, B.; OTERO, P.; LOUZAO, M.C.; ALFONSO, A.; BOTANA, L.M. 13- Desmethyl spiroside-c and 13,19-didesmethyl spiroside-c trans-epithelial permeabilities: Human intestinal permeability modelling. *Toxicology*, v.287, p.69-75, 2011.
- FAN, B.; STEWART, J.T. Determinations of zidovudine/didanosine/nevirapine and zidovudine/didanosine/ritonavir in human serum by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.30, p.955-960, 2002.
- FDA. Guidance for industry: bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products: general considerations. Rockville: FDA, 2003. 23p.
- 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. 13p.
- FERNANDES, C.; JUNQUEIRA, R.G.; CAMPOS, L.M.M.; PIANETTI, G.A. Dissolution test for lamivudine tablets: Optimization and statistical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.42, p.601-606, 2006.
- FIX, J.A. Intestinal rings and isolated intestinal mucosa cells. In: BORCHARDT, R.T.; SMITH, P.L.; WILSON, G. *Models for assessing drug absorption and metabolism*. New York: Plenum Press, 1996. cap.4, p.51-66.
- FLATEN, G.E.; DHANIKULA, A.B.; LUTHMANN, K.; BRANDL, M. Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier: a novel approach for studying passive diffusion. *Eur.*

- J. Pharmaceutical Sciences*, v.27, p.80-90, 2006.
- FLEISHER, D.; LI, C.; ZHOU, Y.; PAO, L.H.; KARIM, A. Drug meal and formulation interactions influencing drug absorption after oral administration. Clinical implications. *Clinical Pharmacokinetics*, v.36, p.233-254, 1999.
- FRANCO, M.; LOPEDOTA, A.; TRAPANI, A.; CUTRIGNELLI, A.; MELELEO, D.; MICELLI, S.; TRAPANI, G. Frog intestinal sac as an *in vitro* method for the assessment of intestinal permeability in humans: Application to carrier transported drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.352, p.182-188, 2008.
- GEORGE, L.L.; CASTRO, R.R. *Histologia comparada*. 2.ed. São Paulo: Editora Roca LTDA, 1998, 286p.
- GIBALDI, M. *Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics*. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991.406p.
- GONÇALVES, J.E.; SOUZA, J.; STORPIRTIS, S. Avaliação da permeabilidade de fármacos empregando culturas celulares. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. *Biofarmacotécnica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. cap.19, p.204-211.
- GRASS, G.M.; SWEETANA, S.A. A correlation of permeabilities for passively transported compounds in monkey and rabbit jejunum. *Pharmaceutical Research*, v.6, n.10, p.857-862, 1989.
- GUIMARÃES, M. *Avaliação da liberação e permeação em membrana sintética de cetoconazol em cremes O/A*. São Paulo, 2001. 170p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- GUTLEBEN, W.; SCHERER, K.; TUAN, N.D.; STOIBER, H.; DIERICH, M.P.; ZEMANN, A. Simultaneous separation of 11 protease and reverse transcriptase inhibitors for human immune deficiency virus therapy by co-electroosmotic capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v.982, p.153-161, 2002.
- HANSON RESEARCH CORPORATION. *Manual Diffusion Cell: operation manual*. Chatsworth: Hanson Research, 2004.36p.
- HERAI, H.; GRATIERI, T.; THOMAZINE, J.A.; BENTLEY, M.V.L.B.; LOPEZ, R.F.V. Doxorubicin skin penetration from monoolein-containing propylene glycol formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, v.329, p.88-93, 2007.
- HIDALGO, I.J. Cultured intestinal epithelial cell models. In: BORCHARDT, R.T.; SMITH, P.L.; WILSON, G. *Models for assessing drug absorption and metabolism*. New York: Plenum

Press, 1996. cap.3, p.35-50.

- HIDALGO, I.J.; HILLGREN, K.M.; GRASS, G.M.; BORCHARDT, R.T. Characterization of the unstirred water layer in Caco-2 cell monolayer using a novel diffusion apparatus. *Pharmaceutical Research*, v.8, n.2, p.222-227, 1991.
- HOENER, B.; BENET, L.Z. Factors influencing drug absorption and drug availability. In: BANKER, G.S.; RHODES, C.T. *Modern Pharmaceutics*, 3.ed. New York: Marcel Dekker, 1996. cap.4, p.121-153.
- HÖRTER, D.; DRESSMAN, J.B. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. *Advanced Drug Delivery Review*, v.46, p.75-87, 2001.
- ICH. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*. v. 2005.
- INGELS, F.; DEFERME, S.; DESTEXHE, E.; OTH, M.; VAN DE MOOTER, G.; AUGUSTIJNS, P. Simulated intestinal fluid as transport medium in the Caco-2 cell culture model. *International Journal of Pharmaceutics*, v.232, p.183-192, 2002.
- JAIN, R.; DUVVURI, S.; KANSARA, V.; MANDAVA, N.K.; MITRA, A.K. Intestinal absorption of novel-dipeptide prodrugs of saquinavir in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, v.336, p.233-240, 2007.
- JOZWIAKOWSKI, M.J.; NGUYEN, N.T.; SISCO, J.M.; SPANCAKE, C.W. Solubility behavior of lamivudine crystals forms in recrystallization solvents. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.85, n.2, p.193-199, 1996.
- KANO, E.K.; SERRA, C.H.R.; KOONO, E.E.M.; ANDRADE, S.S.; PORTA, V. Determination of lamivudine in human plasma by HPLC and its use in bioequivalence studies. *International Journal of Pharmaceutics*, v.297, p.73-79, 2005.
- KARALIS, V.; MACHERAS, P.; PEER, A.; SHAH, V. Bioavailability and bioequivalence: focus on physiological factors and variability. *Pharmaceutical Research*, v.25, n.8, p.1956-1962, 2008.
- KARLSSON, J.; WIKMAN, A.; ARTURSSON, P. The mucus layer as a barrier to drug absorption in monolayers of human intestinal epithelial HT29-H goblet cells. *International Journal of Pharmaceutics*, v.99, p.209-218, 1993.
- KASIM, N.A.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO, M.; LENNERNÄS, H.; HUSSAIN, A.S.; JUNGINGER, H.E.; STAVCHANSKY, S.A.; MIDHA, K.K.; SHAH, V.P.;

- AMIDON, G.L. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Molecular Pharmaceutics*, v.1, n.1, p.85-96, 2004.
- KATAOKA, M.; MASAOKA, Y.; YAMAZAKI, Y.; SAKANE, T.; SEZAKI, H.; YAMASHITA, S. In vitro system to evaluate oral absorption of poorly water-soluble drugs: Simultaneous analysis on dissolution and permeation of drugs. *Pharmaceutical Research*, v.20, p.1674–1680, 2003.
- KERNS, E.H. High throughput physicochemical profiling for drug discovery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.90, n.11, p.1838-1858, 2001.
- KIM, J.S.; MITCHELL, S.; KIJEK, P.; TSUME, Y.; HILFINGER, J.; AMIDON, G.L. The suitability of an in situ perfusion model for permeability determinations: utility for BCS class I biowaiver requests. *Molecular Pharmaceutics*, v.3, n.6, p. 686-694, 2006.
- LEE, V.H.L. Membrane transporters. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.11, p.41-50, 2000.
- LEGEN, I.; KRISTL, A. pH and energy dependent transport of ketoprofen across rat jejunum in vitro. *European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutical*, v.56, p.87-94, 2003.
- LEGEN, I.; SALOBIR, M.; KERK, J. Comparison of different intestinal epithelia as models for absorption enhancement studies. *International Journal of Pharmaceutics*, v.291, p.183-188, 2005.
- LENNERNÄS, H.; ABRAHAMSSON, B. The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.57, n.3, p.273-285, 2005.
- LENNERNÄS, H. Animal data: the contributions of the Ussing chamber and perfusion systems to predicting human oral drug delivery *in vivo*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.59, p.1103-1120, 2007.
- LENNERNÄS, H.; PALM, K.; FAGERHOLM, U.; ARTURSSON, P. Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells in vitro and human jejunum in vivo. *International Journal of Pharmaceutics*, v.127, p.103-107, 1996.
- LENTZ, K.A.; HAYASHI, J.; LUCISANO, L.J.; POLLI, J.E. Development of a more rapid reduced serum culture system for Caco-2 monolayers and application to the biopharmaceutics classification system. *International Journal of Pharmaceutics*, v.200, p.41-51, 2000.
- LI, F.; HONG, L.; MAU, C-I.; CHAN, R.; HENDRICKS, T.; DVORAK, C.; YEE, C.; HARRIS, J.;

- ALFREDSON, T. Transport of levorin prodrugs in the human intestinal caco-2 cell line. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.95 (6), p.1318-1325, 2006.
- LI, M.; SI, L.; PAN, H.; RABBA, A.K.; YAN, F.; QIU, J.; LI, G. Excipients enhance intestinal absorption of ganciclovir by P-gp inhibition: Assessed *in vitro* by everted gut sac and *in situ* by improved intestinal perfusion. *International Journal of Pharmaceutics*, v.403, p.37-45, 2011.
- LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J.B. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutical*, v.58, p.265-278, 2004.
- LOBENBERG, R.; AMIDON, G.L. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutical*, v.50, p.3–12, 2000.
- LOPEZ, R.F.V.; COLLETT, J.H.; BENTLEY, M.V.L.B. Influence of cyclodextrin complexation on the *in vitro* permeation and skin metabolism of dexamethasone. *International Journal of Pharmaceutics*, v.200, p.127-132, 2000.
- LOREGIAN, A.; GATTI, R.; PALÚ, G.; DE PALO, E.F.; Separation methods for acyclovir and related antiviral compounds. *Journal of Chromatography B*, v.764, p.289-311, 2001.
- MARIN, M.T.; MARGARIT, M.V.; SALCEDO, G.E. Characterization and solubility study of solid dispersions of flunarizine and polyvinylpyrrolidone. *Il Farmaco*, v.57, p.723-727, 2002.
- MARTINEZ, M.N.; AMIDON, G.L. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. *The Journal of Clinical Pharmacology*, v.42, p.620-643, 2002.
- MASAOKA, Y.; TANAKA, Y.; KATAOKA, M.; SAKUMA, S.; YAMASHITA, S. Site of drug absorption after oral administration: Assessment of membrane permeability and luminal concentration of drugs in each segment of gastrointestinal tract. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.29, p.240-250, 2006.
- MASUNGI, C.; MENSCH, J.; VAN DIJCK, A.; BORREMANS, C.; WILLEMS, B.; MACKIE, C.; NOPPE, M.; BREWSTER, M.E. Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) combined with a 10-day multiscreen Caco-2 cell culture as a tool for assessing new drug candidates. *Pharmazie*, v.63, n.3, p.194-199, 2008.
- MAYERSOHN, M. Principles of drug absorption. In: BANKER, G.S.; RHODES, C.T. *Modern*

- Pharmaceutics*. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 1996. cap.2, p.21-73.
- MERCK index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biological. 14.ed. New York: White House Edition, 2006, p.1263, 7327.
- MOFFAT, A.; OSSELTON, M.D.; WIDDOP, B. *Clarke's analysis of drugs and poisons*. 3.ed. London-Chicago: Pharmaceutical Press (PhP), 2004.
- MOURA, M.R.L.; REYES, F.G. Drug-nutrient interaction: a review. *Revista de Nutrição*, v.15, n.2, p.223-238, 2002.
- NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. *Planejamento e Otimização de Experimentos*, 2.ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1995, p.13-19.
- OLIVEIRA, M.E.; MANZO, R.H. O sistema de classificação biofarmacêutica e as bioisenções. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. *Biofarmacotécnica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. cap.18, p.187-203.
- PELKONEN, O.; BOOBIS, A.R.; REMY, U.G. In vitro prediction of gastrointestinal absorption and bioavailability: an experts' meeting report. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v.57, p.621-629, 2001.
- PENG, Y.; LIU, F.; PENG, Y.; YE, J. Determination of polyphenols in apple juice and cider by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chemistry*, v.92, p.169-175, 2005.
- PEREIRA, E.A.; MICKE, G.A.; TAVARES, M.F.M. Determination of antiretroviral agents in human serum by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A.*, v.1091, p.169-176, 2005.
- POLLI, J.R.; YU, L.X.; COOK, J.A.; AMIDON, G.L.; BORCHARDT, R.T.; BURNSIDE, B.A.; BURTON, P.S.; CHEN, M.L.; CONNER, D.P.; FAUSTINO, P.J.; HAWI, A.A.; HUSSAIN, A.S.; JOSHI, H.N.; KWEI, G.; LEE, V.H.; LESKO, L.J.; LIPPER, R.A.; LOPER, A.E.; NERURKAR, S.G.; POLLI, J.W.; SANVORDEKER, D.R.; TANEJA, R.; UPPOOER, R.S.; VATTIKONDA, C.S.; WILDING, I.; ZHANG, G. Summary workshop report: biopharmaceutics classification system implementation challenges and extension opportunities. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.93, n.6, p.1375-1381, 2004.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v.27, n.5, p.771-780, 2004.
- RINAKI, E.; VALSAMI, G.; MACHERAS, P. Quantitative biopharmaceutics classification system: The central role of dose/solubility ratio. *Pharmaceutical Research*, v.20, p.1917-1925, 2003.

- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. *Planejamento de Experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos*. 1.ed. Campinas: Casa do pão Editora, 2005. Cap.1, p.1-6.
- RÖPKE, C.D.; KANEKO, T.M.; RODRIGUES, R.M.; SILVA, V.V.; BARROS, S.; SAWADA, T.C.H.; KATO, M.J.; BARROS, S.B.M. Evaluation of percutaneous absorption of 4-nerolidylcatechol from four topical formulation. *International Journal of Pharmaceutics*, v.249, p.109-116, 2002.
- ROZEHNAL, V.; NAKAI, D.; HOEPNER, U.; FISCHER, T.; KAMIYAMA, E.; TAKAHASHI, M.; YASUDA, S.; MUELLER, J. Human small intestinal and colonic tissue mounted in the Ussing chamber as a tool for characterizing the intestinal absorption of drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012.
- RUAN, L.P.; CHEN, S.; YU, B.Y.; ZHU, D.N.; CORDELL, G.A.; QIU, S.X. Prediction of human absorption of natural compounds by the non-everted rat intestinal sac model. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.41, p.605-610, 2006.
- SAHA, P.; KOU, J.H. Effect of solubilizing excipients on permeation of poorly water-soluble compounds across Caco-2 cell monolayers. *European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutical*, v.50, p.403-411, 2000.
- SAIDANE, D.; LAHLOU, B.; TRITAR, B. Regional variations in electrical and ion transport properties along the isolated intestine of the frog *Rana esculenta*. *Archives of Physiology and Biochemistry*, v.105, n.1, p.45-52, 1997.
- SAMBUY, Y.; DE ANGELIS, I.; RANALDI, G.; SCARINO, M.L.; STAMMATI, A.; ZUCCO, F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and cultured-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology*, v.21, p.1-26, 2005.
- SANDRI, G.; BONFERRONI, M.C.; ROSSI, S.; FERRARI, F.; GIBIN, S.; ZAMBITO, Y.; COLO, G.D.; CARAMELLA, C. Nanoparticles based on N-trimethylchitosan: evaluation of absorption properties using in vitro (Caco-2 cells) and ex vivo (excised rat jejunum) models. *European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutical*, v.65, p.68-77, 2007.
- SANTANA, M.A. *Estudo anátomo-histológico e morfométrico do tubo digestivo de girinos de rã-pimenta, Leptodactylus labyrinthicus Spix*. Viçosa, 1998. 59p. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Viçosa.

- SEKAR, R.; AZHAGUVEL, S. Simultaneous determination of HIV-protease inhibitors lamivudine and zidovudine in pharmaceutical formulations by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.39, p.653-660, 2005.
- SHAH, J. C.; KAKA, I.; TENJARLA, S.; LAU, S.W.J.; CHOW, D. Analysis of permeation data: II. Evaluation of the lag time method. *International Journal of Pharmaceutics*, v.109, p.283-290, 1994.
- SHARGEL, L.; YU, A.B.C.; PONG, S.W. Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics. 5.ed. new York. Appleton & Lange Reviews, MacGraw-Hill, 2005. 892p.
- SHISHU; MAKESHWARI, M. Comparative bioavailability of curcumin, turmeric and Biocurcumax<sup>TM</sup> in traditional vehicles using non-everted rat intestinal sac model. *Journal of Functional Foods*, v.2, n.1, p.60-65, 2010.
- SINGH, A.V.; NATH, L.K.; PANI, N.R. Development and validation of analytical method for the estimation of lamivudine in rabbit plasma. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, v.1, n.4, p.251-257, 2011.
- SINGHAL, D.; CURATOLO, W. Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective. *Advanced Drug Delivery Review*, v.56, p.335-347, 2004.
- SMITH, P.L. Methods for evaluating intestinal permeability and metabolism *in vitro*. In: BORCHARDT, R.T.; SMITH, P.L.; WILSON, G. *Models for assessing drug absorption and metabolism*. New York: Plenum Press, 1996. cap.2, p.13-30.
- SONAVANE, G.; TOMODA, K.; SANO, A.; OSHIMA, H.; TERADA, H.; MAKINO, K. In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: Effect of particle size. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.65, p.1-10, 2008.
- SOUZA, J.; BENET, L.Z.; HUANG, Y.; STORPIRTIS, S. Comparison of bidirectional lamivudine and zidovudine transport using MDCK, MDCK-MDR1, and Caco-2 cell monolayers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.98, n.11, p.4413-4419, 2009.
- SOUZA, J.; FREITAS, Z.M.F.; STORPIRTIS, S. Modelos *in vitro* para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.43, n.4, p.515-527, 2007.
- SOUZA, J.; STORPIRTIS, S. Atividade anti-retroviral e propriedades farmacocinéticas da associação entre lamivudina e zidovudina. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.40, n.1, p.9-19, 2004.
- STEVENS, B.R. Vertebrate intestine apical membrane mechanisms of organic nutrient

- transport. *American Journal of Physiology*, v.263, p.458-463, 1992.
- STORPIRTIS, S. *Biofarmacotécnica: fundamentos de biodisponibilidade, bioequivalência, dissolução e intercambialidade de medicamentos genéricos*. São Paulo, 1999. 78p. (Apostila)
- STORPIRTIS, S.; CONSIGLIERI, V.O. Biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos: aspectos fundamentais para o planejamento e execução de estudos. *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo*, v.31, n.2, p.63-70, 1995.
- STORPIRTIS, S.; OLIVEIRA, P.G.; RODRIGUES, D.; MARANHO, D. Considerações biofarmacotécnicas relevantes na fabricação de medicamentos genéricos: fatores que afetam a dissolução e a absorção dos fármacos. *Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas*, v.35, n.1, jan/jun, p.1-16, 1999.
- STRAUCH, S.; JANTRATID, E.; DRESSMAN, J.B.; JUNGINGER, H.E.; KOPP, S.; MIDHA, K.K.; SHAH, V.P.; STAVCHANSKY, S.; BARENDS, D.M. Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Lamivudine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.100, N.6, p.2054-2063, 2011.
- THOMSON, A.B.R.; KEELAN, M.; CLANDININ, M.T.; WALKER, K. Dietary fat selectively alters transport properties of rat jejunum. *Journal of Clinical Investigation*, v.77, p.279-288, 1986.
- TRAPANI, A.; LAQUINTANA, V.; DENORA, N.; LOPEDOTA, A.; CUTRIGNELLI, A.; FRANCO, M.; TRAPANI, G.; LISO, G. Eudragit RS 100 microparticles containing 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and glutathione: Physicochemical characterization, drug release and transport studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.30, p.64-74, 2007.
- TRAPANI, G.; FRANCO, G.; 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.2909-2918, 2004.
- TUKKER, J.J. In vitro methods for the assessment of permeability. In: Dressman J.B., Lennernas H., editors. Oral drug absorption. New York: Marcel Dekker, pp 51–72, 2000.
- UNITED States Pharmacopeia. 35. ed. Rockville: United States Pharmacopeia Convention, 2012.
- UCHIDA, M.; FURAZAWA, T.; YAMAZAKI, Y.; HASHIMOTO, H.; MIYAMOTO, Y. A modified fast (4 day) 96-well plate Caco-2 permeability assay. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v.59, p.39-43, 2009.

- WANG, Q.; STRAB, R.; KARDOS, P.; FERGUSON, C.; LI, J.; OWE, A.; HIDALGO, I.J. Application and limitation of inhibitors in drug-transporter interactions studies. *International Journal of Pharmaceutics*, v.356, p.12-18, 2008.
- WANG, W.; ZHANG, Y.; WANG, J.; SHI, X.; YE, J. Determination of  $\beta$ -agonists in pig feed, pig urine and pig liver using capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Meat Science*, v.85, p.302-305, 2005.
- WATANABE, E.; TAKAHASHI, M.; HAYASHI, M. A possibility to predict the absorability of poorly water-soluble drugs in human based on rat intestinal permeability assessed by an *in vitro* chamber method. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.58, p.659-665, 2004.
- WHO Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for WHO Model List of Essential Medicines immediate-release, solid oral dosage forms. Geneva: World Health Organization, 2005, 45p.
- WU, C.Y.; BENET, L.Z. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharmaceutical Research*, v.22, n.1, p.11-23, 2005.
- YAMASHITA, S.; KONOSHI, K.; YAMAZAKI, Y.; TAKI, Y.; SAKANE, T.; SEZAKI, H.; FURUYAMA, Y. New and better protocols for a short-term Caco-2 cell culture system. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.91, p.669-679, 2002.
- YEE, S. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man – fact or myth. *Pharmaceutical Research*, v.14, n.6, p.763-766, 1997.
- YU, L.X.; AMIDON, G.L.; POLLI, J.E.; ZHAO, H.; MEHTA, M.U.; CONNER, D.P.; SHAH, V.P.; LESKO, L.J.; CHEN, M.L.; LEE, V.H.L.; HUSSAIN, A.S. Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. *Pharmaceutical Research*, v.19, n.7, p.921-925, 2002.
- ZAKELJ, S.; LEGEN, I.; VEBER, M.; KRISTL, A. The influence of buffer composition on tissue integrity during permeability experiments in vitro. *International Journal of Pharmaceutics*, v.272, p.173-180, 2004.
- 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.
- ZHANG, J.; LIU, D.; HUANG, Y.; GAO, Y.; QIAN, S. Biopharmaceutics classification and intestinal absorption of apigenin. *International Journal of Pharmaceutics*, v.436, p.311-

317, 2012.

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

## **8. ANEXOS**

## **ANEXO A**

### **Informações para os membros de bancas juladoras de Mestrado/Doutorado**



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

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de 30 minutos.
2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de 30 minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de 30 minutos para sua resposta.
  - 2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até 60 minutos por examinador.
  - 2.2 Tempo máximo total de arguição: 3 horas para o mestrado e 5 horas para o doutorado.
3. A sessão de defesa será aberta ao público.
4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.
  - 4.1 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.
  - 4.2 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.
5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: [pgfarma@usp.br](mailto:pgfarma@usp.br), (11) 3091 3621.

São Paulo, 26 de maio de 2011.

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

**ANEXO B**  
**Ficha do aluno**



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 7060629/1 - Talita Ferreira Monteiro

**Email:** talitamonteiro@usp.br  
**Data de Nascimento:** 04/09/1987  
**Cédula de Identidade:** RG - 43664282-7 - SP  
**Local de Nascimento:** Estado de São Paulo  
**Nacionalidade:** Brasileira  
**Graduação:** Farmacêutico-bioquímico - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - São Paulo - Brasil - 2010

**Curso:** Mestrado  
**Programa:** Fármaco e Medicamentos  
**Área:** Produção e Controle Farmacêuticos  
**Data de Matrícula:** 06/07/2010  
**Início da Contagem de Prazo:** 06/07/2010  
**Data Limite:** 06/01/2013  
**Orientador:** Prof(a). Dr(a). Madi Olga Consiglieri - 06/07/2010 até o presente. E.Mail: siglieri@usp.br  
**Proficiência em Línguas:** Inglês, Aprovado em 06/07/2010  
**Data de Aprovação no Exame de Qualificação:** Aprovado em 10/08/2011  
**Data do Depósito do Trabalho:**  
**Título do Trabalho:**  
**Data Máxima para Aprovação da Banca:**  
**Data de Aprovação da Banca:**  
**Data Máxima para Defesa:**  
**Data da Defesa:**  
**Resultado da Defesa:**  
**Histórico de Ocorrências:** Ingressou no Mestrado em 06/07/2010  
Matrícula de Acompanhamento em 16/07/2012

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 16/07/2012

Impresso em: 02/10/12 09:54:22



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

**FICHA DO ALUNO**

**9139 - 7060629/1 - Talita Ferreira Monteiro**

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
EDM5791-5/5	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	18/08/2010	30/11/2010	120	8	100	A	N	Concluída
FBF5784-1/3	Eletroforese Capilar: Princípios e Aplicações na Área Farmacêutica	18/08/2010	19/10/2010	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5777-2/3	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos	19/08/2010	01/12/2010	45	3	100	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBF0341 do Farmacotécnica, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1)	01/02/2011	30/06/2011	-	3	0	-	-	-
FBF5779-1/3	Preparo de Artigos Científicos na Área de Farmácia	08/04/2011	09/06/2011	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5803-1/3	Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíticos	11/04/2011	24/04/2011	30	0	0	-	N	Matrícula cancelada

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
<b>Disciplinas:</b>	0	25	26
<b>Estágios:</b>			
<b>Total:</b>	0	25	26

**Créditos Atribuídos à Dissertação: 71**

**Observações:**

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 26/10/2011.

**Conceito a partir de 02/01/1997:**

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

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

**Última ocorrência:** Matrícula de Acompanhamento em 16/07/2012

**Impresso em:** 02/10/12 09:54:22

**ANEXO C**  
**Currículo Lattes**



## Talita Ferreira Monteiro

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/0147203917412823>

Última atualização do currículo em 02/10/2012

### Resumo informado pelo autor

Farmacêutica - Bioquímica pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, especialista na área de Fármaco e Medicamentos. Atualmente, realiza mestrado na área de Produção e Controle Farmacêuticos, no laboratório de Farmacotécnica, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

(Texto informado pelo autor)

#### Dados pessoais

**Nome** Talita Ferreira Monteiro  
**Nome em citações bibliográficas** MONTEIRO, T. F.  
**Sexo** Feminino  
**Filiação** Lígia Cardoso Ferreira Monteiro  
**Nascimento** 04/09/1987 - Brasil  
**Carteira de Identidade** 436642827 SSP - SP - 07/04/2003  
**CPF** 341.683.308-26  
**Endereço residencial** Rua Martim Francisco  
Santa Cecília - São Paulo  
01226-000, SP - Brasil  
Telefone: 11 33612293  
**Endereço profissional** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Avenida Lineu Prestes, nº580, bloco 13  
Cidade Universitária - São Paulo  
05508-900, SP - Brasil  
**Endereço eletrônico** E-mail para contato : talitamonteiro@usp.br

#### Formação acadêmica/titulação

**2010** Mestrado em Fármacos e Medicamentos.  
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil  
Título: Desenvolvimento de novo método ex vivo para estudo da permeabilidade intestinal de fármacos utilizando epitélio intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*)  
Orientador: Vladí Olga Consiglieri   
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
**2005 - 2009** Graduação em Farmácia-Bioquímica.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

#### Formação complementar

**2011 - 2011** Curso de curta duração em Segurança no manuseio, descarte e transporte de re.  
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil  
**2010 - 2010** Eletroforese Capilar.  
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil  
**2010 - 2010** Curso de curta duração em Estruturação de Artigo para Publicação Internacion.  
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil  
**2009 - 2010** Estágio curricular.  
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil  
**2009 - 2009** Curso de curta duração em Seminário Empresarial.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil  
**2009 - 2009** Curso de curta duração em 4ª Semana Acadêmica.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil  
**2009 - 2009** Estágio supervisionado - Farmácia Escola.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil  
**2008 - 2009** Extensão universitária em All Pharma Júnior - Empresa Júnior.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil  
**2007 - 2008** Estágio - Bioquímica e Biologia Molecular.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil  
**2008 - 2008** Estágio supervisionado.  
Hospital Estadual de Bauru, HEB, Bauru, Brasil  
**2008 - 2008** Extensão universitária em 55ª Jornada Farmacêutica da UNESP.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil  
**2005 - 2008** Extensão universitária em SAFE - Semana de Assistência Farmacêutica.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil  
**2008 - 2008** Curso de curta duração em Intoxicações Agudas.

- Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Homeopatia (teórico e prático).  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2006 - 2007** Extensão universitária em AFEP - Atenção Farmacêutica Estudantil Permanente.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2007 - 2007** Extensão universitária em 54ª Jornada farmacêutica da Unesp.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2007 - 2007** Extensão universitária em 54ª Jornada farmacêutica da Unesp.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Garantia e controle de qualidade em Farmácia Hospi.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Vacinas Virais.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Drogas de abuso e pericia criminal.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2006 - 2006** Estágio de treinamento - Biquímica Clínica.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Ácidos graxos trans.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Gerenciamento de Resíduos.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Cultura de Células: Aplicações em Biotecnologia.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Células-Tronco e o Futuro da Terapia.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2005 - 2005** Extensão universitária em 53ª Jornada Farmacêutica da UNESP.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Farmácia Hospitalar.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Obesidade.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Atualidades em Doenças de Chagas.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Alimentos Nutracêuticos.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em HIV/AIDS.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2005 - 2005** Extensão universitária em 52ª Jornada Farmacêutica da UNESP.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Psicofarmacologia - Transtornos da Depressão.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil

#### Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

#### Vínculo institucional

- 2009 - 2010** Vínculo: Estagiário, Enquadramento funcional: Estagiário de Iniciação Científica, Carga horária: 30, Regime: Parcial  
Outras informações:  
Desenvolvimento de trabalhos com validação de metodologia analítica, desenvolvimento, obtenção e avaliação de nanopartícula e estudos de permeação.

#### Projetos

##### Projetos de pesquisa

- 2010 - Atual** Desenvolvimento de novo método ex vivo para estudo da permeabilidade de fármacos utilizando epitélio intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*)
- Descrição: A biodisponibilidade é fator imprescindível para a eficácia de fármacos e é dependente das características de permeabilidade e de solubilidade. Baseada nesses parâmetros, a classificação biofarmacêutica (SCB) foi proposta como uma ferramenta para o desenvolvimento de formas farmacêuticas, auxiliando a predição da biodisponibilidade in vivo. Os modelos in vitro, que fornecem dados sobre as propriedades de permeabilidade e de solubilidade dos fármacos indicam, indiretamente, a eficácia dos medicamentos sem expor voluntários sadios a risco. Apesar dos diversos modelos já desenvolvidos, há carência de protocolos padronizados para os estudos de permeabilidade e muitos dos dados disponíveis na literatura não são confiáveis ou conclusivos. Assim, o projeto tem como objetivo propor novo modelo ex vivo para o estudo da permeabilidade intestinal de fármacos, utilizando epitélio intestinal de rã-touro em células de Franz. O fármaco escolhido como modelo é a lamivudina. Serão determinados os seguintes parâmetros de permeação: quantidade acumulada de fármaco permeado, coeficiente de permeabilidade aparente, constante de absorção. Na avaliação estatística dos resultados será empregada ANOVA.
- Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa  
Alunos envolvidos: Graduação (1); Mestrado acadêmico (1); Doutorado (1);  
Integrantes: Talita Ferreira Monteiro (Responsável); Madi Olga Consiglieri; Guilherme Diniz Tavares; Claudinêia Aparecida Sales de Oliveira Pinto; Maria Valéria Robles Velasco; André Rolim Baby; Marina Franco Maggi Tavares; Maria Segunda Aurora Prado; Telma Mary Kaneko; Giselle Miké Ishikawa  
Financiador(es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

#### Idiomas

- Alemão** Escreve Pouco, Lê Pouco
- Inglês** Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Escreve Bem, Lê Bem
- Espanhol** Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Bem

#### Produção

**Artigos aceitos para publicação**

1. TAVARES, G. D., ISHIKAWA, G. M., MONTEIRO, T. F., BOTELHO, K. C. A., ZANOLINI, C., CHACRA, N. A. B., KEDOR, E. R. M., CONSIGLIERI, V.O. DERIVATIVE SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF ACYCLOVIR IN POLYMERIC NANOPARTICLES. *Química Nova (Online)*, 2011. Palavras-chave: acyclovir, polymeric nanoparticles, derivative spectrophotometry. Áreas do conhecimento: Farmacotecnia. Referências adicionais: Inglês.

**Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)**

1. MONTEIRO, T. F., SILVA, C. A., TAVARES, G. D., TAVARES, M.F.M., PRADO, M. S. A., CONSIGLIERI, V.O. Development and validation of a micellar eletrokinetic chromatographic method for simultaneous separation and quantification of drugs in in vitro permeation studies In: 17th Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology, 2011, Hollywood. **Book of Abstracts.**, 2011. Referências adicionais: Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: Impresso
2. MONTEIRO, T. F., SILVA, C. A., SOUZA, P. C. T., TAVARES, G. D., KANEKO, T. M., BABY, A.R., VELASCO, M.V.R., PRADO, M. S. A., CONSIGLIERI, V.O. VALIDATION OF A MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY METHOD USED TO QUANTIFY ANTIVIRALS IN IN VITRO INTESTINAL PERMEATION STUDIES In: XLVI SEMANA UNIVERSITÁRIA PAULISTA DE FARMÁCIA E BIOQUÍMICA, 2011, SÃO PAULO. **BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES.**, 2011. v.47. Palavras-chave: VALIDATION, MEKC, antivirals, PERMEATION. Áreas do conhecimento: Farmacotecnia, Química Analítica. Referências adicionais: Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso
3. MONTEIRO, T. F., ISHIKAWA, G. M., TAVARES, G. D., SILVA, C. A., TAVARES, M.F.M., PRADO, M. S. A., CONSIGLIERI, V.O. Intestinal permeability of antiviral drugs using intestinal epithelium of frog (*Rana catesbeiana*)-Analytical determination of antivirals using Micellar Electrokinetic Chromatography In: 16th Latin-American Symposium of Capillary Electrophoresis, 2010, Florianópolis. **Lace 2010-Book of Abstracts.** Suprema Gráfica e Editora, 2010. Palavras-chave: permeability, antivirals, capillary electrophoresis. Áreas do conhecimento: Farmacotecnia. Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

**Apresentação de trabalho e palestra**

1. TAVARES, G. D., ISHIKAWA, G. M., MONTEIRO, T. F., ZANOLINI, C., KEDOR, E. R. M., CHACRA, N. A. B., CONSIGLIERI, V.O. **Derivative Spectrophotometric Method for Determination of Acyclovir in Coreshell Nanoparticles**, 2011. (Simpósio, Apresentação de Trabalho) Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Paraíba, Brasil; Cidade: João Pessoa; Evento: 23 rd International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis; Inst.promotora/financiadora: PBA 2011 Organizing Committee
2. MONTEIRO, T. F., SILVA, C. A., SOUZA, P. C. T., TAVARES, G. D., KANEKO, T. M., BABY, A.R., VELASCO, M.V.R., PRADO, M. S. A., CONSIGLIERI, V.O. **VALIDATION OF A MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY METHOD USED TO QUANTIFY ANTIVIRALS IN IN VITRO INTESTINAL PERMEATION STUDIES**, 2011. (Simpósio, Apresentação de Trabalho) Palavras-chave: VALIDATION, MEKC, antivirals, PERMEATION. Áreas do conhecimento: Farmacotecnia, Química Analítica. Referências adicionais: Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: BRASIL; Cidade: SÃO PAULO; Evento: XLVI SEMANA UNIVERSITÁRIA PAULISTA DE FARMÁCIA E BIOQUÍMICA; Inst.promotora/financiadora: FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
3. MONTEIRO, T. F., ISHIKAWA, G. M., CONSIGLIERI, V.O. **Permeability of antiviral drugs through frog intestinal epithelium (*Rana catesbeiana*) in ex vivo model validation of analytical method for drug determination**, 2010. (Simpósio, Apresentação de Trabalho) Palavras-chave: permeability, antivirals, UV-visible spectrophotometry. Áreas do conhecimento: Farmacotecnia, Química Analítica. Referências adicionais: Brasil/Português; Local: Faculdade; Cidade: São Paulo; Evento: XV Semana Acadêmica; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo

**Totais de produção**

**Produção bibliográfica**

Artigos aceitos para publicação	1
Trabalhos publicados em anais de eventos	3
Apresentações de trabalhos (Simpósio)	3