

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Padronização de novo método *ex vivo* para avaliação da permeabilidade intestinal de fármacos utilizando epitélio intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*): comparação com células Caco-2

Paula Cristina Torres de Souza

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Orientadora:

Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri

São Paulo

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Padronização de novo método *ex vivo* para avaliação da permeabilidade intestinal de fármacos utilizando epitélio intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*): comparação com células Caco-2

Paula Cristina Torres de Souza

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Orientadora:

Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri

São Paulo

2014

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

S729p Souza, Paula Cristina Torres de
Padronização de novo método *ex vivo* para avaliação da permeabilidade intestinal de fármacos utilizando epitélio intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*): comparação com células Caco-2 / Paula Cristina Torres de Souza. -- São Paulo, 2014.
159p.

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

1. Biofarmacotécnica 2. Biofarmacêutica 3. Antivirais
4. Permeabilidade da membrana celular I. T. II. Consiglieri, Vladi Olga, orientador.

615.4b CDD

Paula Cristina Torres de Souza

Padronização de novo método *ex vivo* para avaliação da permeabilidade intestinal de fármacos utilizando epitélio intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*): comparação com células Caco-2

Comissão julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri
Orientador/Presidente

1º Examinador

2º Examinador

São Paulo, _____ de 2014.

Agradecimentos

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

Aos meus pais Fátima e Gilmar por tudo!

Ao meu irmão Luis pelo apoio e amizade.

Ao meu marido Alexandre pelo amor, companheirismo, compreensão e constantes palavras de incentivo.

A minha avó Clara pelo amor, orações e conselhos sempre.

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

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

À Profa. Dra. Maria Segunda Aurora Prado pela disposição do seu laboratório para a realização das minhas análises quantitativas e por todas as dúvidas esclarecidas.

À Profa Dra. Silvia Storpirtis pela disposição do seu laboratório para a realização dos experimentos de cultura celular e suas análises quantitativas.

Ao Ranário Santa Bárbara D'Oeste, especialmente ao Edvaldo, pelo fornecimento dos intestinos de rã.

À Talita Ferreira Monteiro pela amizade e ajuda durante todo tempo mesmo à distância!

Ao José Eduardo Gonçalves pela amizade, paciência e toda ajuda!!

À Vanessa Tavares pela sua amizade e ensinamento nos cálculos de validação.

À querida Laura pelos ensinamentos de eletroforese, amizade e disponibilidade de ir mais cedo abrir o laboratório!

Ao Rafael Paraíso pelo auxílio nos cálculos de permeação.

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

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

Aos colegas de laboratório Marcelo e Guilherme pelas orientações e amizade.

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

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

Aos motoristas, senhores Gelson e João pelo transporte ao ranário.

Ao Jorge da Veda quality pelos adaptadores fornecidos.

À bibliotecária Leila pelo auxílio na revisão das referências bibliográficas.

À Auriluce pelos auxílios de informática.

À Coordenação de Apoio a Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1	Biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos.....	5
2.2	Fatores relacionados às características fisiológicas que afetam a biodisponibilidade dos fármacos.....	7
2.2.1	Fisiologia da membrana.....	7
2.2.2	Características biológicas e físicas do trato intestinal humano.....	7
2.2.3	Trânsito de medicamentos pelo trato gastrointestinal.....	8
2.2.3.1	Via transcelular.....	10
2.2.3.2	Via paracelular.....	12
2.3	Fatores ligados ao fármaco.....	13
2.3.1	Poliformismo.....	13
2.3.2	Estado físico.....	13
2.3.3	Solvatos, hidratos e anidros.....	14
2.3.4	Coeficiente de partição.....	14
2.3.5	Quiralidade.....	14
2.3.6	Tamanho de partícula.....	15
2.3.7	Peso molecular.....	15
2.4	Considerações gerais sobre as formas farmacêuticas sólidas.....	16
2.5	Sistema de Classificação Biofarmacêutica.....	16
2.5.1	Solubilidade.....	20
2.5.2	Permeabilidade.....	23
2.5.2.1	Métodos para determinação da permeabilidade intestinal.....	24
2.5.2.1.1	Métodos Físico-químicos.....	24
2.5.2.1.2	Métodos de permeabilidade <i>in vitro</i>	26

2.5.2.1.2.1 Baseados em tecido intestinal animal.....	26
2.5.2.1.2.2 Baseados em monocamadas de células epiteliais.....	28
2.5.2.1.3 Métodos <i>in situ</i>	33
2.5.3 Métodos para estudo da permeabilidade <i>in vitro/ex vivo</i> que empregam membrana intestinal de rã.....	36
2.5.4 <i>Rana catesbeiana</i>	37
2.5.4.1 Classificação científica.....	37
2.5.4.2 Sistema digestório da rã touro.....	38
2.6 Fármacos antivirais.....	39
2.6.1 Zidovudina.....	39
2.6.2 Aciclovir.....	40
2.6.3 Marcadores internos de permeação.....	41
3. OBJETIVOS.....	43
3.1 Objetivo principal.....	43
3.2 Objetivos secundários.....	43
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1 Materiais, solvente e reagentes.....	44
4.2 Equipamentos e dispositivos diversos.....	45
4.3 Membranas.....	48
4.3.1 Caracterização da membrana biológica.....	48
4.4 Planejamento Experimental.....	49
4.5 Ensaio de permeabilidade com membrana intestinal de rã- touro.....	51
4.6 Ensaio de permeabilidade com células Caco-2.....	54
4.6.1 Cultivo das células Caco-2.....	55
4.6.2 Monitoramento da integridade da membrana de células Caco-2.....	55
4.6.3 Ensaio de permeabilidade.....	55

4.7 Validação do método de quantificação por Eletroforese Capilar.....	57
4.7.1 Instrumentação.....	57
4.7.2 Procedimento.....	58
4.7.2.1 Seletividade/Especificidade.....	58
4.7.2.2 Linearidade.....	59
4.7.2.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	59
4.7.2.4 Precisão.....	60
4.7.2.5 Exatidão.....	60
4.8 Validação do método de quantificação por HPLC.....	61
4.8.1 Preparo das soluções-padrão da curva analítica.....	61
4.8.2 Preparo de amostras de padrão.....	61
4.8.3 Preparo de amostras provenientes dos estudos de permeabilidade.....	62
4.8.4 Parâmetros de validação.....	62
4.9 Análise estatística dos resultados obtidos.....	63
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
5.1 Caracterização histológica do epitélio intestinal da <i>Rana catesbeiana</i>	64
5.2 Validação do método de quantificação por Eletroforese Capilar....	74
5.2.1 Estabelecimento das condições de análise.....	74
5.3 Determinação dos parâmetros de validação do método analítico desenvolvido	79
5.3.1 Seletividade/Especificidade.....	80
5.3.2 Linearidade.....	81
5.3.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	84
5.3.4 Precisão.....	84
5.3.5 Exatidão.....	85
5.4 Validação método HPLC-UV para células Caco-2.....	86

5.4.1	Seletividade.....	86
5.4.2	Linearidade.....	88
5.4.3	Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	90
5.4.4	Precisão.....	91
5.4.5	Exatidão.....	92
5.5	Planejamento experimental.....	94
5.5.1	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.....	95
6	Análise dos Resultados com membrana intestinal da <i>Rana catesbeiana</i>	95
6.1	Análise estatística do planejamento experimental.....	102
6.2	Estudos de permeabilidade com células Caco-2.....	107
6.3	Comparação entre os resultados de permeabilidade aparente dos modelos de epitélio intestinal de rã touro e de células Caco.....	111
7	CONCLUSÕES.....	116
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117
9	ANEXOS.....	128
	ANEXO A- Autorização de Funcionamento do Ranário Santa Bárbara D'oeste.....	129
	ANEXO B- Certificado Comitê de ética em Pesquisa.....	130
	ANEXO C- Informações para os membros de bancas julgadoras de Mestrado/Doutorado.....	131
	ANEXO D – Ficha do Aluno.....	132
	ANEXO E – Currículo Lattes.....	134

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração de rã touro.....	38
Figura 2. Fórmula estrutural da zidovudina.....	39
Figura 3. Fórmula estrutural do aciclovir.....	40
Figura 4. Representação esquemática do suporte do cultivo de células Caco-2.....	47
Figura 5. Representação esquemática da célula de difusão vertical e seus acessórios.....	47
Figuras 6 e 7. Rãs touro no tanque de criação no Ranário Santa Bárbara D' oeste à direita e rãs touro já eutanasiadas e sem pele à esquerda.....	52
Figura 8. Segmentos iniciais e finais de intestino delgado de rã touro com cerca de 5 cm.....	52
Figura 9. Experimento com 3 células de difusão vertical modificadas em banho-maria.....	53
Figura10. Organização da vilosidade do intestino delgado humano.....	65
Figura 11. Fotomicrografia de corte da extremidade de um vilo de íleo humano.....	66
Figura 12. Corte longitudinal do segmento inicial do intestino delgado de <i>Rana catesbeiana</i> focalizando a extremidade de um vilo (Microscópio ótico Olympus	

BX50, corante tricrômico de Mallory, aumento de 100X).....67

Figura 13. Corte transversal do segmento inicial do intestino delgado de *Rana catesbeiana* demonstrando as vilosidades (Corante tricrômico de Mallory, aumento de 12,5X).....68

Figura 14. Corte transversal do segmento médio do intestino delgado *Rana catesbeiana* demonstrando as vilosidades (Corante tricrômico de Mallory, aumento de 12,5X).....68

Figura 15. Corte transversal do segmento final do intestino delgado de *Rana catesbeiana* demonstrando as vilosidades (Corante tricrômico de Mallory, aumento de 12,5X).....69

Figura 16. Corte longitudinal do segmento inicial do intestino delgado de *Rana catesbeiana* demonstrando as vilosidades (Corante tricrômico de Mallory, aumento de 12,5X).....69

Figura 17. Corte longitudinal do segmento médio do intestino delgado de *Rana catesbeiana* demonstrando as vilosidades (Corante tricrômico de Mallory, aumento de 12,5X).....70

Figura 18. Corte longitudinal do segmento final do intestino delgado de *Rana catesbeiana* demonstrando as vilosidades (Corante tricrômico de Mallory, aumento de 12,5X).....70

Figura 19. Corte transversal focalizando o lúmen do segmento inicial do intestino delgado de *Rana catesbeiana* demonstrando as vilosidades (Corante tricrômico de Mallory, aumento de 40X).....71

Figura 20. Corte transversal focalizando o lúmen do segmento médio do intestino

delgado de *Rana catesbeiana* demonstrando as vilosidades (Corante tricrômico de Mallory, aumento de 40X).....71

Figura 21. Corte transversal mostrando o lúmen do segmento final do intestino delgado de *Rana catesbeiana* demonstrando as vilosidades (Corante tricrômico de Mallory, aumento de 40X).....72

Figura 22. Eletroferograma de MECK de aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol em Ringer. Capilar: 75 μ m, 40 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9,2), 10% etanol (v/v); voltagem: 20kV; 25°C; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/10 s; λ =214 nm.....75

Figura 23. Eletroferograma de MECK de aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol em Ringer. Capilar: 75 μ m, 40 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9,2), 10% etanol(v/v); corrente: 80 μ A; 25 °C; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/10 s; λ =214 nm.....76

Figura 24. Eletroferograma de MECK de aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol em Ringer. Capilar: 75 μ m, 40 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9,2), 5% etanol (v/v); corrente: 80 μ A; 25 °C; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/10 s; λ =214 nm.....76

Figura 25. Eletroferograma de MECK de aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol em Ringer. Capilar: 75 μ m, 40 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9,2), 15% etanol (v/v); corrente: 80 μ A; 25 °C; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/10 s; λ =214 nm.....77

Figura 26. Eletroferograma de MECK de aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol em Ringer. Capilar: 75 μ m, 40 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9,2), 25% etanol (v/v); corrente: 80 μ A; 25 °C; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/10 s; λ =214 nm.....78

Figura 27. Eletroferograma de MECK de aciclovir, zidovudina, floridizina e metoprolol em Ringer. Capilar: 75 μ m, 40 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9,2), 25% etanol (v/v); voltagem: 25 kV; 25 °C; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/10 s; λ =214 nm.....78

Figura 28. Eletroferograma de MECK de metoprolol, zidovudina, aciclovir e floridizina em Ringer. Capilar: 75 μ m, 30 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9,2), 30% etanol (v/v); corrente: 85 μ A; 25°C; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/10 s; λ =214 nm.....79

Figura 29. Eletroferograma de MECK de metoprolol (1), Zidovudina (2), aciclovir (3), floridizina (4) em Ringer, na presença da membrana biológica. Capilar: 75 μ m, 30 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9.2), 30% (v/v) etanol; corrente: 85 μ A ; 25°C; injeção hidrodinâmica: 0.5 psi/10 s; λ =214 nm para parâmetro de seletividade do método.....80

Figura 30. Curva analítica do metoprolol em solução de Ringer. Capilar: 75 μ m, 30 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9.2), 30% (v/v) etanol; corrente: 85 μ A ; 25°C; injeção hidrodinâmica: 0.5 psi/10 s; λ =214 nm.....82

Figura 31. Curva analítica da zidovudina em solução de Ringer. Capilar: 75 μ m, 30 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9.2), 30% (v/v) etanol; corrente: 85 μ A ; 25°C; injeção hidrodinâmica: 0.5 psi/10 s; λ =214 nm.....82

Figura 32. Curva analítica do aciclovir em solução de Ringer. Capilar: 75 μ m, 30 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9.2), 30% (v/v) etanol; corrente: 85 μ A ; 25°C; injeção hidrodinâmica: 0.5 psi/10 s; λ =214 nm.....83

Figura 33. Curva analítica da floridizina em solução de Ringer. Capilar: 75 μ m, 30 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9.2), 30% (v/v) etanol; corrente: 85 μ A ; 25°C; injeção hidrodinâmica: 0.5 psi/10 s; λ =214 nm.....83

Figura 34. Cromatograma das injeções da solução do branco (solução tampão Hanks pH 7,4) (a). Cromatograma da injeção de ACV 4000ng/mL em Tampão Hanks pH 7,4 (b).....	87
Figura 35. Cromatograma das injeções da solução do branco (solução tampão Hanks pH 4) (a). Cromatograma da injeção de Zidovudina a 2500 ng/mL (b) em Tampão Hanks pH 4,0.....	88
Figura 36. Curva analítica obtida a partir do método de quantificação do Aciclovir em tampão de Hanks empregando-se HPLC-UV. Solvente: HCl 0,1M/ MeOH: ACN (8:2,v/v).....	89
Figura 37. Curva analítica obtida a partir do método de quantificação da Zidovudina em tampão de Hanks empregando-se HPLC-UV. Solvente: tampão fosfato pH 4 0,02M/ ACN (8:2,v/v).....	90
Figura 38. Quantidade permeada de zidovudina (ng/mL) através do epitélio intestinal da rã-touro (<i>Rana catesbeiana</i>) em função do tempo (min). Os resultados são expressos como a média de 3 determinações. Condições experimentais: 26° C, secção inicial do intestino, pH 8,2.....	100
Figura 39. Quantidade permeada de aciclovir (ng/mL) através do epitélio intestinal da rã-touro (<i>Rana catesbeiana</i>) em função do tempo (min). Os resultados são expressos como a média de 3 determinações. Condições experimentais: 37 °C, secção final, pH 7,4	101
Figura 40. Quantidade permeada de metoprolol (ng/mL) através do epitélio intestinal da rã-touro (<i>Rana catesbeiana</i>) em função do tempo (min). Os resultados são expressos como a média de 3 determinações para o experimento. Condições experimentais: 26 °C, secção final, pH 8,2.....	101

Figura 41. Gráfico demonstrando a significância dos efeitos das variáveis estudadas obtido pelo programa Statística a partir da Tabela 20. A linha vertical vermelha representa $p=0,10$104

Figura 42. Quantidade permeada de aciclovir (ng/mL) através das membranas das células Caco-2 em função do tempo. Os resultados são expressos como a média de 3 determinações.....108

Figura 43. Quantidade permeada de zidovudina (ng/mL) através das membranas das células Caco-2 em função do tempo. Os resultados são expressos como a média de 3 determinações.....108

Figura 44. Médias de coeficiente de permeabilidade aparente obtido pelo modelo de que emprega células Caco-2 e seus intervalos de confiança.....110

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Características fisiológicas do trato intestinal humano.....8

Quadro 2. Matriz de ensaios codificada do Projeto fracionado 2^{4-1} em 4 blocos de tamanho 4 obtida com o programa Minitab 16.0 e utilizada para os estudos de permeabilidade intestinal.....49

Quadro 3. Legenda das variáveis codificadas presentes no planejamento estatístico utilizado para o estudo de permeação intestinal.....50

Quadro 4. Matriz do planejamento experimental em unidades originais.....50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados estatísticos obtidos por meio da regressão linear a partir das curvas analíticas para a quantificação de aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol em solução de Ringer.....81

Tabela 2. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos na validação do método analítico para quantificação de aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol utilizando a técnica de cromatografia eletrocínética micelar (MEKC).....84

Tabela 3. Precisão obtida para 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).....84

Tabela 4. Exatidão obtida para 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).....85

Tabela 5. Resultados estatísticos obtidos por meio da regressão linear a partir das curvas analíticas para a quantificação de aciclovir e zidovudina em solução de Hanks.....89

Tabela 6. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos na validação do método analítico para quantificação de aciclovir e zidovudina utilizando a técnica de HPLC.....90

Tabela 7. Precisão obtida para aciclovir e zidovudina 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 Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....91

Tabela 8. Exatidão obtida para aciclovir e zidovudina 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 HPLC.....92

Tabela 9. Estabilidade de aciclovir e zidovudina em tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente (TA). Resultados representam a média de seis determinações.....93

Tabela 10. Quantidade total permeada (Q_t) de zidovudina durante o período de cinco horas através da membrana intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*) obtidos com concentração de 300 µg/mL em solução de Ringer.....96

Tabela 11. Constante de absorção aparente de primeira ordem (k_a) para a zidovudina permeada através da membrana intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante o período de cinco horas e obtidos com concentração de 300 µg/mL em solução de Ringer.....96

Tabela 12. Coeficiente de permeabilidade aparente (P_{app}) para a zidovudina permeada através da membrana intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante o período de cinco horas e obtidos com concentração de 300 µg/mL em solução de Ringer.....97

Tabela 13. Quantidade total permeada (Q_t) de aciclovir durante o período de cinco horas através da membrana intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*) obtidos com concentração de 300 µg/mL em solução de Ringer.....97

Tabela 14. Constante de absorção aparente de primeira ordem (k_a) para o aciclovir permeada através da membrana intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante o período de cinco horas e obtidos com concentração de 300 µg/mL em solução de Ringer.....98

Tabela 15. Coeficiente de permeabilidade aparente (P_{app}) para o aciclovir permeado através da membrana intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante o período de cinco horas e obtidos com concentração de 300 µg/mL em solução de Ringer.....98

Tabela 16. Quantidade total permeada (Q_t) de metoprolol durante o período de cinco horas através da membrana intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*) obtidos com concentração de 200 µg/mL em solução de Ringer.....99

Tabela 17. 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 cinco horas e obtidos com concentração de 200 µg/mL em solução de Ringer.....99

Tabela 18. Coeficiente de permeabilidade aparente (P_{app}) para o metoprolol permeado através da membrana intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante o período de cinco horas e obtidos com concentração de 200 µg/mL em solução de Ringer.....100

Tabela 19. Análise estatística para a determinação dos coeficientes da equação matemática que define a influência das variáveis sobre o coeficiente de permeabilidade aparente do aciclovir e zidovudina. (P_{app} versus temperatura; fármaco; secção.intestinal; pH) Cálculo dos parâmetros para ajuste do planejamento fatorial.....102

Tabela 20. Análise de variância para coeficiente de permeabilidade aparente do aciclovir e zidovudina (Papp versus Temperatura; Fármaco; Secção.Intestinal.; pH) Cálculo dos parâmetros usando software Statistica.....	103
Tabela 21. Teste t com 2 graus de liberdade e variâncias desiguais.....	109
Tabela 22. Teste de comparação das variâncias.....	110
Tabela 23. Intervalos de confiança obtidos no cálculo do Papp para os fármacos no modelo de células Caco-2.....	111
Tabela 24. Valores de coeficiente de permeabilidade aparente (Papp- x 10 ⁻⁶ cm/s) para aciclovir, zidovudina e metoprolol nos modelos de membrana intestinal de rã e de células Caco-2 comparados com dados da literatura.....	112

Resumo

SOUZA, P.C.T. **Padronização de novo método *ex vivo* para avaliação da permeabilidade intestinal de fármacos utilizando epitélio intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*): comparação com células Caco-2.** 159p. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2014.

Métodos *in vitro* utilizando epitélio intestinal animal são importantes ferramentas para avaliar a permeabilidade de fármacos, propriedade que é um importante parâmetro de biodisponibilidade. Considerando que o maior objetivo na indústria farmacêutica é desenvolver novos fármacos com boa biodisponibilidade oral, o projeto teve como objetivo padronizar o modelo de permeação com membrana de intestino de rã (*Rana catesbeiana*) em células de Franz, comparando seus resultados com ensaios de células Caco-2. Os fármacos modelo utilizados foram os antivirais zidovudina e aciclovir. A quantidade de fármaco permeado foi determinada por método de eletroforese capilar para o método com intestino de rã touro e por HPLC-UV para os ensaios com células Caco-2. O parâmetro de permeação foi o coeficiente de permeabilidade aparente (Papp) dos fármacos para ambos modelos experimentais. Para estabelecimento do protocolo experimental dos estudos de permeabilidade intestinal de rã, foi proposto um projeto fracionado 2^{4-1} com 4 ensaios adicionais usando o software Minitab, e as variáveis foram: secção intestinal, pH da solução de Ringer e temperatura. A análise do planejamento experimental feita pela estimativa dos parâmetros da regressão obtidos através dos resultados do modelo fatorial possibilitou a determinação dos coeficientes da equação matemática que definiu a influência das variáveis sobre o coeficiente de permeabilidade aparente dos fármacos. Os efeitos das variáveis pH e temperatura interpretados conjuntamente apresentaram interferência leve, porém as variáveis fármaco e secção intestinal interpretados juntos tiveram interferência importante, mostrando maior permeação dos fármacos através da secção inicial do intestino da rã. Os resultados de Papp foram: para o metoprolol, pelo método das células Caco-2 foi de 28×10^{-6} cm/s, valor que está de acordo com demais dados de células Caco-2 na literatura e o valor obtido com células de Franz que mais se adequa a estes resultados e demais disponíveis provenientes de outras técnicas na literatura, foi de $28,1 \times 10^{-6}$ cm/s, em uma das condições do planejamento estatístico utilizando segmento final da membrana epitelial da rã. No caso do aciclovir, o resultado de Papp de $0,48 \times 10^{-6}$ cm/s também obtido em uma das condições envolvendo segmento intestinal final da rã foi exatamente igual ao valor $0,48 \times 10^{-6}$ cm/s, encontrado com células Caco-2 no presente estudo e estão de acordo com outros valores disponíveis na literatura por Trapani e colaboradores, 2004 e também com células Caco-2. Para zidovudina o valor de Papp obtido em uma das condições utilizando segmento intestinal inicial da rã, de 13×10^{-6} cm/s, foi a que mais se assemelhou ao obtido pela técnica de células Caco-2, $13,6 \times 10^{-6}$ cm/s, e também está de acordo com demais dados da literatura.

Palavras chave: permeabilidade intestinal, epitélio intestinal de rã-touro, células Caco-2, zidovudina, aciclovir.

Abstract

SOUZA, P.C.T. **Standardization of new *ex vivo* method to assess intestinal permeability of drugs using intestinal epithelium of bullfrog (*Rana catesbeiana*): comparison with Caco-2 cells.** 159p. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2014.

There are lots of different *in vitro* technics in the literature using animal intestinal epithelium to estimate permeability of drugs, property that is an important parameter of bioavailability. Considering that the main objective of Pharmaceutical Companies is the development of new drugs with good oral bioavailability, the aim of this work was to standardize the permeability of antivirals using in *vitro/ex vivo* method of intestinal epithelium of *Rana catesbeiana* in Franz cells and compare these results to those obtained from studies using Caco-2 cells. Zidovudine and Acyclovir were selected as model drugs. The amount of drug permeated will be determined by the method of capillary electrophoresis for assays using *Rana Catesbeiana* and HPLC-UV for studies with Caco-2 cells. The permeation parameter determined was the apparent permeability coefficient (Papp) of drugs for both experimental models. To establish the experimental protocol to studies of intestinal permeability of frog, it was proposed a fractional 2^{4-1} design with 4 additional tests using Minitab software and the variables were: intestinal section, pH of Ringer solution and temperature. The analysis of the experimental design made by the estimate of the regression parameters obtained from the factorial model results allowed the determination of the coefficients of the mathematical equation that defines the influence of the variables on the apparent permeability coefficient of acyclovir and zidovudine. The effects of pH and temperature interpreted jointly presented a slight interference, but the variables drug and intestinal section interpreted together had major interference, showing greater permeation of drugs through the initial section of the intestine of the frog. The results of Papp were: for metoprolol, with the method of Caco- 2 cells was 28×10^{-6} cm /s, a value which is consistent with other data of Caco-2 cells provided in the literature and the condition obtained with Franz cells that are most suitable for these and other results obtained from other techniques available in the literature, was 28.1×10^{-6} cm/s, provided with the final intestinal segment using frog epithelial membrane. In the case of acyclovir, the result of Papp of 0.48×10^{-6} cm/s obtained in one condition with final frog intestinal segment was exactly equal to the value of 0.48×10^{-6} cm/s, found with Caco-2 cells in the present study and are in agreement with other values available in the literature for Trapani and colleagues, 2004 and also with Caco-2 cells. The Papp value for zidovudine obtained with the initial gut segment of frog, 13×10^{-6} cm /s was which more resembled that obtained by the technique of Caco- 2 cells, 13.6×10^{-6} cm/s and is also consistent with other literature data.

Key words: intestinal permeability, frog intestinal epithelium, Caco-2 cells, zidovudine, acyclovir.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, com o explosivo crescimento no campo do genoma acoplado aos avanços da inovação tecnológica, sintetizar um grande número de potenciais candidatos a fármacos não é problema no processo de descobrimento de medicamentos para indústria farmacêutica. O maior desafio, entretanto, vem a ser a triagem dos compostos que possuam, simultaneamente, boa atividade biológica e propriedades biofarmacêuticas compatíveis (BALIMANE, CHONG, MORRISON, 2000).

A eficácia terapêutica depende diretamente da biodisponibilidade dos fármacos, característica relacionada às propriedades de permeabilidade e solubilidade. Dessa forma, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi desenvolvido para permitir a classificação dos fármacos e baseada essas características que, em combinação com as propriedades de dissolução da forma farmacêutica, possibilita o oferecimento de informações quanto à predição de sua biodisponibilidade. Assim, o principal objetivo do SCB é constituir uma ferramenta regulatória para substituir, com segurança, os estudos de bioequivalência por testes de dissolução *in vitro*. Desta forma, reduziria custos e tempo no processo de desenvolvimento de novos medicamentos e minimizaria a exposição desnecessária de voluntários sadios aos efeitos colaterais dos fármacos ensaiados nos estudos de biodisponibilidade e bioequivalência. Atualmente, o sistema de classificação biofarmacêutica destina-se apenas a produtos orais de liberação imediata que são absorvidos pelo trato gastrointestinal. Isso é uma consequência do fato de que a via oral é a preferida para administração de fármacos: haja vista que 84% dos 50 produtos farmacêuticos mais vendidos no mercado Europeu e no Americano são apresentados nessa forma (LENNERSNAS, ABRAHAMSSON, 2005).

Uma boa biodisponibilidade oral ocorre quando o fármaco tem máxima permeabilidade e máxima solubilidade no sítio de absorção. Desse modo, a extensão da absorção do fármaco *in vivo* pode ser presumida com base na permeabilidade intestinal e na avaliação da solubilidade *in vitro*. Portanto, o estudo

da permeabilidade intestinal representa uma parte essencial na predição da biodisponibilidade oral de qualquer candidato a fármaco. Além disso, informações de permeabilidade proporcionam a elaboração adequada da formulação protótipo com conhecimentos biofarmacêuticos e regulatórios. Assim, esses dados de permeabilidade intestinal também são usados nos estudos de pré-formulação para avaliar os efeitos de vários excipientes farmacêuticos como co-solventes ou potencializadores de absorção ou de permeação de fármacos (ANSEL, POPOVICH, ALLEN, 2000; TRAPANI *et al.*, 2004).

Os principais métodos rotineiramente empregados na determinação da permeabilidade intestinal podem ser classificados em métodos físico-químicos, como a determinação da lipofilicidade e do coeficiente de partição e métodos biológicos, os quais são subdivididos em métodos *in vitro* (cromatografia de membrana artificial imobilizada e os ensaios de permeabilidade em membrana artificial paralela), métodos *in situ* (estudos de perfusão intestinal em modelo animal conveniente) e métodos *in vivo* (estudos de perfusão intestinal em modelo animal e estudos em humanos como estudos de biodisponibilidade absoluta, estudos de balanço de massa e de perfusão intestinal) (BALIMANE, CHONG, MORRISON, 2000).

A grande vantagem dos métodos *in vitro* para determinação da permeabilidade de fármacos é permitir uma avaliação mais direta da interação do fármaco com a respectiva membrana. Dentre os principais métodos *in vitro* empregados para determinar a permeabilidade dos fármacos podem ser citados aqueles que empregam tecidos animais como intestino invertido e transporte através de segmento intestinal lado-a-lado (Ussing chamber), passagem por membranas de vesículas isoladas e métodos baseados em monocamadas de células epiteliais, como Caco-2 ou TC-7 (BALIMANE, CHONG, MORRISON, 2000).

Dentre as alternativas para o uso de culturas celulares estão os procedimentos que empregam membranas animais baseados na técnica do intestino invertido, ideal para estudar o mecanismo de absorção de fármacos tanto para transporte passivo como para o transporte ativo. Com o recente interesse no

campo de atividade da glicoproteína P no intestino, esse modelo pode ser usado para avaliar o papel dos transportes do tipo efluxo na absorção intestinal de fármacos comparando os transportes cinéticos na ausência ou presença de inibidores ou substratos da glicoproteína P. O modelo de intestino invertido tem uma vantagem analítica adicional sobre outros métodos *in vitro* em função do volume de amostras no lado seroso ser relativamente pequeno e as substâncias se acumularem mais rápido. Algumas das desvantagens são a falta de atividade sanguínea e suprimento de nervos que podem levar à rápida perda de viabilidade. Além disso, inverter o tecido intestinal pode ocasionar dano morfológico acarretando resultados enganosos (BALIMANE, CHONG, MORRISON, 2000).

Existem também alguns estudos de permeabilidade utilizando segmento intestinal de rãs, uma vez que o intestino do anfíbio tem semelhante composição das membranas e do número de vilosidades dos vertebrados e os mesmos mecanismos de transporte. Dessa forma, esse tipo de membrana pode ser usado como modelo para absorção intestinal (TRAPANI *et al.*, 2004).

Na literatura são encontrados trabalhos com segmento intestinal de rã, como os realizados por Natochin e Prutskova (2004), Trapani e colaboradores (2004), Franco e colaboradores (2008), Yerasi e colaboradores (2010), os quais obtiveram resultados promissores, porém, estudos detalhados para melhorar o conhecimento, usando membrana intestinal de rã como modelo para avaliação da permeabilidade intestinal de fármacos em humanos ainda precisam ser relatados.

Uma vez que os dados de permeabilidade disponíveis na literatura não são abrangentes ou conclusivos e que uma importante demanda da indústria é o desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos com boa biodisponibilidade oral, este projeto visou padronizar novo modelo *in vitro-ex vivo* para avaliação da permeabilidade de fármacos. A técnica empregou epitélio intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*) e células de Franz que apresenta como vantagem aos métodos já descritos, a padronização da superfície de permeação nos experimentos, bem como do segmento do intestino a ser utilizado. Como fármacos-modelo foram estudados antivirais como zidovudina e aciclovir, cujos parâmetros de solubilidade, permeabilidade e biodisponibilidade já são bem

conhecidos na literatura. Assim, foram caracterizados parâmetros como pH, temperatura, secções intestinais e diferentes fármacos, que podem influir na permeação com o emprego desse modelo.

Vale ressaltar que os intestinos utilizados são considerados material de descarte, uma vez que a rã é eutanasiada em Ranário comercial para fins alimentícios. Dessa forma, este método pode ser considerado alternativo ao uso animal, tendo em vista o princípio dos 3Rs (*Refinement, Reduction and Replacement*). Essas diretrizes são atualmente normatizadas pelos Comitês de Ética no Uso de Animais (CEUA) que incentivam alternativas cientificamente válidas para os testes realizados em animais.

Os resultados foram comparados aos resultantes de estudos de permeação por cultura de células Caco-2.

Dessa forma, com o presente trabalho apresenta-se uma contribuição importante na elucidação da classificação biofarmacêutica de fármacos antivirais administrados por via oral. 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 saudáveis.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A taxa de sucesso dos testes clínicos iniciais para a aprovação final dos muitos compostos candidatos a fármacos tem se mantido decepcionantemente baixa. Mais de 90% dos compostos em fase de testes clínicos I não progridem, assim como 50% dos que entram em fase III (BALIMANE, HAN, CHONG, 2006).

Em geral, dentre as propriedades biofarmacêuticas, as propriedades físico-químicas de um composto administrado oralmente são os maiores determinantes de permeabilidade intestinal. Isto inclui peso molecular, pka, lipofilicidade (log P, log D), carga, ionização, solubilidade e tamanho molecular (BALIMANE, CHONG, MORRISON, 2000). Outras características desejáveis em triagem de permeabilidade no estágio inicial do desenvolvimento de medicamentos são alta eficiência, alta exatidão, tempo e custo (MARINO *et al.*, 2005).

2.1 Biodisponibilidade e Bioequivalência de medicamentos

Biodisponibilidade é a velocidade e a extensão com que um fármaco é absorvido e que se torna disponível no local de ação. O termo *biodisponibilidade absoluta* é aplicado quando um fármaco é administrado por via intravenosa, uma vez que toda a dose administrada é introduzida diretamente na circulação sistêmica. Nesse caso, não há barreiras na absorção e, em consequência, a dose total do fármaco é considerada totalmente biodisponível (ANSEL, POPOVICH, ALLEN, 2000).

Em caso de fármacos que não podem ser administrados por injeção intravenosa, em vez de biodisponibilidade absoluta, é determinada a biodisponibilidade relativa ou comparativa. Nesse caso, a biodisponibilidade relativa é uma medida da fração da dose de um determinado fármaco que é absorvido intacto na circulação sistêmica, a partir da administração extra vascular de uma forma farmacêutica, em comparação a uma forma farmacêutica de

referência reconhecida daquele fármaco também de administração extra vascular (AULTON, 2005; BRASIL, 2003).

Por outro lado, o conceito de bioequivalência é uma ampliação do conceito de biodisponibilidade relativa e consiste em determinar se as formas farmacêuticas teste e referência contendo idêntica composição qualitativa e quantitativa do fármaco são equivalentes ou não, em termos de suas velocidades e extensões de absorção (AULTON, 2005; BRASIL, 1999).

Baseado neste conceito a definição de medicamento genérico é uma especialidade farmacêutica fabricada para ser intercambiável com o produto inovador e sua produção ocorre após expiração da patente ou outros direitos de exclusividade (WHO, 1993).

Segundo a agência americana Food and Drug Administration (FDA) um medicamento genérico é considerado bioequivalente se a velocidade e a extensão da absorção não apresentarem diferenças significativas com relação ao medicamento pioneiro, quando administrado na mesma dose molar do princípio ativo, nas mesmas condições experimentais. Tendo em vista que no caso de fármaco de absorção sistêmica, as concentrações sanguíneas podem variar entre os indivíduos, mesmo com um produto idêntico, nos estudos de bioequivalência, cada indivíduo recebe o medicamento pioneiro e o medicamento testado e assim, funciona como seu próprio controle (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

As situações em que os ensaios de biodisponibilidade de medicamentos são exigidos segundo a FDA-USA são: estudos de bioequivalência de medicamentos, medicamentos que contenham princípios ativos recentemente introduzidos na terapêutica, novas formulações envolvendo princípios ativos já utilizados na terapêutica, alterações de medicamentos anteriormente aprovados para comercialização, formas farmacêuticas de liberação controlada e medicamentos que contenham vários princípios ativos (FDA, 2003).

Alguns fatores que podem influenciar a biodisponibilidade de fármacos administrados por via oral são: propriedades físico-químicas do fármaco, características dos excipientes e das formas farmacêuticas e fatores fisiológicos e características dos pacientes. Boa disponibilidade oral ocorre quando o fármaco

tem máxima permeabilidade e máxima solubilidade no sítio de absorção. Assim, a extensão da absorção do fármaco *in vivo* pode ser prevista baseada na permeabilidade e medidas da solubilidade *in vitro*. Portanto, a avaliação da permeabilidade intestinal representa uma parte essencial na previsão da biodisponibilidade oral de qualquer candidato a fármaco. Além disso, informações de permeabilidade proporcionam a elaboração adequada da formulação protótipo com conhecimentos biofarmacêuticos e regulatórios. Adicionalmente, os dados de permeabilidade intestinal tem sido usados nos estudos de pré-formulação para avaliar os efeitos de vários excipientes farmacêuticos como co-solventes ou potencializadores de absorção ou, ainda, permeação de fármacos (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; TRAPANI *et al.*, 2004).

2.2 Fatores relacionados às características fisiológicas que afetam a biodisponibilidade dos fármacos

2.2.1 Fisiologia da membrana

As membranas do organismo são semi-permeáveis e tem natureza lipoproteica apresentando em sua composição colesterol, fosfolipídios, triglicerídeos e ácido graxos como componentes da bicamada lipídica e apresentam também duas camadas externas proteicas que conferem propriedades hidrofílicas às membranas (STORPIRTIS *et al.*,1999).

2.2.2 Características biológicas e físicas do trato intestinal humano

A principal função do epitélio intestinal é absorver nutrientes, eletrólitos e água. O epitélio também funciona como barreira para compostos potencialmente perigosos e microrganismos no lúmen intestinal (DUIZER *et al.*,1997).

O trato intestinal é a principal porta de entrada para muitos nutrientes e fármacos (DUIZER *et al.*,1997). O intestino delgado humano tem de 2 a 6 metros

de comprimento e é dividido em três partes: duodeno, jejuno e íleo que correspondem, respectivamente, a 5%, 50% e 45% do comprimento (BALIMANE, CHONG, 2005). As principais características fisiológicas do trato gastrointestinal (TGI) de interesse na biodisponibilidade de medicamentos estão resumidas no Quadro 1.

Quadro1. Características fisiológicas do trato intestinal humano.

Segmento gastrointestinal	Área superficial (m ²)	Comprimento do segmento (cm)	pH do segmento
Estômago	3,5	0,25	1.0-2.0
Duodeno	1,9	~35	4.0-5.5
Jejuno	184	~280	5,5-7.0
Íleo	276	~420	7.0-7,5
Cólon e reto	1,3	~150	7,0-7,5

Fonte: Balimane, Chong, 2005.

Sendo a via oral a principal via de administração de medicamentos, é importante conhecer como os fármacos se comportam durante sua passagem pelo trato gastrointestinal (ASHFORD, 2005b).

2.2.3 Trânsito de medicamentos pelo trato gastrointestinal

O fluido gastrointestinal é composto de saliva, secreções gástricas, dieta alimentar e líquida . A composição do fluido muda à medida que ele é misturado e liberado no duodeno. Alguns componentes importantes para disposição do fármaco incluem concentração de íons hidrogênio, sais biliares, lipase e pepsina (GIBALDI, 1991).

Os tempos normais de permanência gástrica variam de 5 min. a 2 horas. O esvaziamento gástrico no estômago é influenciado pelo tipo de forma farmacêutica, presença e composição do alimento, postura corpórea, efeitos de fármacos e estados de doença. De modo geral os alimentos, principalmente os gordurosos, retardam o esvaziamento gástrico e, conseqüentemente, a absorção dos fármacos. No epitélio gástrico ocorre a absorção de fármacos não ionizados e ácidos fracos (ASHFORD, 2005b).

O trânsito pelo intestino delgado é um importante fator em relação à biodisponibilidade, pois este é o principal sítio de absorção da maioria dos fármacos no TGI que são principalmente absorvidos pelo intestino delgado proximal (jejuno), em relação ao restante do intestino delgado. O tempo de trânsito entre o estômago e o ceco é relativamente constante, em torno de três horas e sua função chave é a absorção seletiva dos principais nutrientes. Além disso, funciona como uma barreira para enzimas digestivas e substâncias externamente ingeridas (AULTON, 2005; BALIMANE; CHONG, 2005, STORPIRTIS *et al*, 2009).

Ao contrário, o trânsito pelo cólon é longo e variável e depende dos tipos de forma farmacêutica, de dieta, dos padrões de alimentação e de estados patológicos (ASHFORD, 2005b).

O fluxo sanguíneo do TGI também desempenha papel fundamental na absorção devido à manutenção do gradiente de concentração em torno da membrana epitelial. Moléculas lipossolúveis e as que penetram através dos poros aquosos dependem da intensidade desse fluxo (GIBALDI, 1991).

Assim que é liberado pela forma farmacêutica e dissolvido nos fluidos gastrointestinais, o fármaco encontra algumas barreiras à absorção como pH gastrointestinal e enzimas do lúmen pois, para ser absorvido, o fármaco precisa permanecer em solução e não estar ligado aos alimentos ou a outro material dentro do TGI. Também é necessário que seja quimicamente estável, conseguindo resistir ao pH do TGI e à degradação enzimática. Na seqüência, o fármaco precisa difundir pela mucosa, sem ligar-se à esta, atravessando a camada de água estacionária (camada mais ou menos fixa, composta de água, muco ou glicocálice, adjacente à parede intestinal; sendo que alguns fármacos são

capazes de formar complexos com o muco, o que reduz a sua biodisponibilidade em termos de absorção) e, subsequentemente, a membrana gastrointestinal, que é a principal barreira celular. Após ter atravessado esta barreira celular, o fármaco chega ao fígado, antes mesmo de alcançar a circulação sistêmica o que, por conseguinte, pode ter um efeito prejudicial sobre sua biodisponibilidade. A presença de alimentos no TGI pode influenciar a velocidade e o grau de absorção direta ou indiretamente por meio de uma ampla variedade de mecanismos como complexação de fármacos com componentes da dieta, alteração de pH, alteração do esvaziamento gástrico, estimulação das secreções gastrointestinais, competição entre componentes alimentícios e fármacos pelos mecanismos de absorção especializada, aumento na viscosidade do conteúdo gastrointestinal, alterações no metabolismo pré-sistêmico induzidas por alimentos e alterações no fluxo sanguíneo também induzidos por alimentos (ASHFORD, 2005b).

Estados de doenças e de desordens podem provocar alterações no pH gástrico, as quais, por sua vez, podem afetar a estabilidade, a dissolução e/ou a absorção de um fármaco (ASHFORD, 2005b).

A membrana gastrointestinal separa o lúmen do estômago e dos intestinos da circulação sistêmica. É composta por colesterol, fosfolípidos, triglicerídeos e ácidos graxos distribuídos em uma bicamada. Apresenta também duas camadas externas proteicas que conferem propriedades hidrofílicas à membrana. A peneira lipóide semipermeável permite a passagem de moléculas lipossolúveis, água e moléculas hidrofílicas pequenas. Possui também diversas proteínas de transporte ou moléculas carreadoras de membrana. Os mecanismos de transporte pela membrana podem ocorrer por via transcelular, pelas células, ou paracelular por entre as células (STORPIRTIS, 1999).

2.2.3.1 Via transcelular

Pela via transcelular o transporte de substâncias pode ser dar por difusão passiva, transporte ativo, difusão facilitada, endocitose e pinocitose.

- Difusão passiva: as moléculas de fármaco passam pela membrana lipóide, de uma região de alta concentração, o lúmen, para outra de menor concentração, o sangue. A difusão passiva de fármacos é descrita matematicamente pela primeira lei de Fick da difusão: $dC/dt = k(C_g - C_b)$, que estabelece que a velocidade de difusão por uma membrana (dC/dt) é proporcional à diferença entre as concentrações de cada lado dela (ASHFORD, 2005b).
- Transporte ativo: um carreador de membrana é responsável pela ligação do fármaco e pelo transportador deste pela membrana. As substâncias são transportadas contra gradiente de concentração, por esta razão consome energia e cada carreador tem especificidade própria por um substrato relacionada à estrutura química da substância. Assim, quando um fármaco é parecido com uma substância natural a ser transportada, é possível que ele também seja transportado. Pode haver inibição competitiva por substratos análogos e há dependência da temperatura (ASHFORD, 2005b). Difusão facilitada: mediada por carreadores. Não transporta substâncias contra gradiente de concentração. As substâncias movimentam-se no sentido do gradiente de concentração com velocidades muito mais elevadas. É passível de saturação, sujeito a inibição competitiva; papel minoritário na absorção. Os sistemas transportadores mais estudados são transportador dipeptídeo (PepT1) e glicoproteína P (transportador de efluxo, funciona como barreira à absorção, dependente de ATP, está presente em inúmeros órgãos e tecidos) (SOUZA, 2007). Dentre as demais principais famílias de transportadores de fármacos que promovem a absorção estão:
 - ABC, compostos pelos grupos MDR, cujos substratos típicos são os compostos hidrofóbicos, agentes antitumorais, digoxina e imunossupressores;
 - MRP, cujos substratos típicos são conjugados aniônicos, agentes antitumorais, metotrexato e pravastatina;
 - Peptídicos (PEPT) que são responsáveis pelo transporte de di e tripeptídeos e antibióticos β -lactâmicos;

- Transportadores de ácido monocarboxílico (MCT) que atuam na permeação de ácido láctico e ácido salicílico;
- Transportadores de ânions orgânicos (OATP), cujo exemplo de substrato típico é a tiroxina e íons orgânicos (SOUZA, 2007).
- Endocitose: processo pelo qual a membrana da célula invagina-se e as invaginações formadas fecham um cerco, dando origem a pequenas vesículas intracelulares que englobam determinado volume de material que poderá ser transportado para o interior das células. Acredita-se que seja o principal mecanismo de transporte de macromoléculas (ASHFORD, 2005b).
- Pinocitose: endocitose de fase fluida, pequenas gotículas de fluido extracelular são engolfadas por vesículas da membrana. A eficiência é muito escassa (ex: vitaminas A, D, E, K) (ASHFORD, 2005b).

2.2.3.2 Via paracelular

O transporte de substâncias é feito pelos poros aquosos existentes entre as células. As células estão unidas umas as outras por junções firmes, compactas. Os espaços ocupam apenas cerca de 0,01% da superfície total do epitélio. Importante para transporte de íons e açúcares quando excedem a capacidade dos seus transportadores. Fármacos hidrofílicos, pequenos e com carga atravessam epitélio por esta via. A absorção paracelular tem um componente convectivo (arraste por água) e um difusivo (ASHFORD, 2005b).

2.3 Fatores ligados ao fármaco e à forma farmacêutica que afetam a biodisponibilidade dos fármacos

2.3.1 Polimorfismo

O polimorfismo é a propriedade de algumas substâncias apresentarem mais de uma forma de cristalização. A diferença nos tipos de cristais pode ocasionar diferentes comportamentos de solubilidade, ponto de fusão e demais propriedades físicas e, portanto, a presença de polimorfismo no desenvolvimento de medicamentos é de extrema importância. As formas polimórficas apresentam diferenças em suas ligações de hidrogênio, velocidade de dissolução, densidade e estabilidade (CID CÁRCAMO, 1992; UPUDA, 1987).

Em geral os polimorfos de maior energia livre, termodinamicamente mais instáveis, são os mais solúveis (CID CÁRCAMO, 1992). Outras características físicas que os diferenciam são solubilidade e velocidade de dissolução ou hidrólise, quando se trata de ésteres. Os polimorfos podem ser classificados em enantiótopos e monótopos sendo que os enantiótopos são reversíveis e podem passar da forma metaestável para a forma mais estável, porém menos energética (CID CÁRCAMO, 1992).

Fatores tecnológicos como a utilização de solventes de cristalização, processos de compressão e redução do tamanho de partícula são determinantes na transição polimórfica de alguns fármacos (STORPIRTIS *et al.*, 1999).

2.3.2 Estado físico

Os sólidos podem apresentar-se no estado amorfo ou cristalino, estado físico este determinante na absorção já que os sólidos amorfos são geralmente mais absorvidos que no estado cristalino. Tal fato baseia-se na energia reativa envolvida no processo de dissolução (STAVCHANSKY, MCGINITY, 1990).

Um sólido no estado amorfo apresenta força de coesão entre as partículas que são arranjadas ao acaso e, portanto, baixa energia é requerida para separá-

las. Conseqüentemente, a dissolução é mais rápida em relação à forma cristalina. O estado amorfo pode ser considerado instável, com tendência a se transformar em cristalino (STAVCHANSKY, MCGINITY, 1990).

2.3.3 Solvatos e hidratos

Outro parâmetro que influencia a solubilidade de fármacos é a capacidade de solvatação. Solvatos são substâncias de forma cristalina que se associam com moléculas de solventes, também chamados de pseudopolimorfos (STORPIRTIS *et al.*,1999). Quando o solvente é a água o solvato é denominado hidrato (STAVCHANSKY, MCGINITY, 1990). Há diferença na solubilidade, no grau e velocidade de dissolução entre a forma anidra e solvatada do mesmo fármaco (STORPIRTIS *et al.*,1999).

2.3.4 Coeficiente de partição

As membranas do trato gastrintestinal apresentam caráter predominantemente lipofílico logo, uma indicação da lipossolubilidade relativa é determinar como as substâncias se distribuem entre água e um solvente orgânico. Essa relação é conhecida como coeficiente de partição ou coeficiente de distribuição usualmente entre octanol e tampão aquoso, pelo método de agitação em frasco que conta com a distribuição de um fármaco no equilíbrio, entre a fase oleosa e a aquosa (WADKE, JACOBSON,1980; ASHFORD, 2005b).

2.3.5 Quiralidade

As moléculas quirais existem em duas formas enantioméricas. Além das características de absorção distintas, os enantiômeros geralmente apresentam ações farmacológicas diferentes (STORPIRTIS *et al.*1999).

Diante disso é extremamente importante a determinação da pureza isomérica das substâncias ativas que muitas vezes devem ser administradas como um de seus enantiômeros puros. Nesse caso, a presença do outro será considerada como contaminante pelo controle de qualidade (CHO, 1993).

2.3.6 Tamanho de partícula (granulometria)

É indiscutível a importância da granulometria de um pó em relação a sua velocidade de dissolução, haja vista que a dissolução de um sólido é diretamente proporcional à área superficial exposta ao líquido solvente (STORPIRTIS *et al.*,1999).

Caso a velocidade de dissolução seja um fator limitante, como ocorre quando é inferior à própria velocidade de absorção, o tamanho de partícula torna-se fundamental para a biodisponibilidade do fármaco (STORPIRTIS *et al.*1999).

Quando o fármaco não é satisfatoriamente absorvido para ser ativo sistemicamente e não é solúvel o suficiente para ser utilizado para absorção no intestino, a redução no tamanho de partícula pode melhorar sua eficácia terapêutica, mas pode ser necessário tamanho de partícula maior para gerar ação local no TGI (STORPIRTIS *et al.*1999).

Porém é importante ressaltar que a diminuição no tamanho de partícula nem sempre assegura absorção melhor ou mais rápida e pode gerar efeitos tóxicos (STORPIRTIS *et al.*, 1999).

2.3.7 Peso molecular

Vários estudos de permeabilidade intestinal têm sido realizados após ingestão oral de moléculas marcadoras hidrofílicas nos quais se observou que a permeabilidade de um dado segmento intestinal varia com o tamanho da molécula marcadora. Moléculas menores podem permear mais facilmente do que as maiores. Para uma série de compostos homogêneos (polietilenoglicóis), a

permeabilidade é inversamente relacionada com peso molecular (ARTURSSON, UNGELL, LOFROTH, 1993).

2.4 Forma farmacêutica

A velocidade de absorção dos fármacos é diretamente influenciada pelas formas farmacêuticas. As formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral tendem a retardar a absorção devido aos processos de desagregação, desintegração e dissolução em comparação com aquelas em que o fármaco encontra-se em solução. A velocidade de absorção de fármacos administrados na forma sólida, isto é, não dissolvidos, geralmente aumenta na seguinte ordem: comprimidos revestidos ou drágeas, comprimidos, cápsulas, pós e suspensões (CONSIGLIERI, STORPIRTIS, FERRAZ, 2000).

A etapa de dissolução assume importância fundamental na absorção uma vez que a grande maioria dos fármacos é absorvida por difusão passiva das moléculas dissolvidas. Uma das principais causas relacionadas à absorção insuficiente é a inadequada liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica, que se deve a deficiências na fórmula ou nas técnicas de fabricação. Outras variáveis como pH, adjuvantes farmacotécnicos e técnicas de produção influenciam na velocidade de dissolução (CONSIGLIERI, STORPIRTIS, FERRAZ, 2000).

2.5 Sistema de Classificação Biofarmacêutica

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi desenvolvido para permitir a classificação de fármacos, quanto à solubilidade e permeabilidade intestinal que, em combinação com as propriedades de dissolução da forma farmacêutica de liberação oral imediata, possa oferecer informações quanto à liberação. O principal objetivo do SCB é constituir uma ferramenta regulatória para substituir, com segurança, os estudos de bioequivalência por testes de dissolução

in vitro, aceitação comumente conhecida como bioisenção. Isso, certamente, reduz custos e tempo no processo de desenvolvimento de novos medicamentos e reduz a exposição desnecessária de voluntários sadios aos efeitos colaterais dos fármacos ensaiados nos estudos de biodisponibilidade e bioequivalência. Atualmente, o sistema de classificação biofarmacêutica destina-se apenas a produtos orais de liberação imediata que são absorvidos pelo TGI. Isso é uma consequência do fato de que a via oral é a preferida para administração de fármacos: haja vista que 84% dos 50 produtos farmacêuticos mais vendidos nos mercados Europeu e Americano, são apresentados nessa forma. Ademais, o SCB tem se mostrado muito útil para identificação da etapa limitante e para prever a absorção intestinal de fármacos baseando nas propriedades biofarmacêuticas como solubilidade e permeabilidade intestinal efetiva (LENNERSNAS, ABRAHAMSSON, 2005).

O SCB divide os fármacos em quatro classes com base na solubilidade e permeabilidade (AMIDON *et al.*, 1995):

Classe I: alta solubilidade e alta permeabilidade. Classe onde a droga é bem absorvida e a etapa limitante de sua absorção é a dissolução ou esvaziamento gástrico caso a dissolução seja muito rápida. A expectativa da correlação *in vitro-in vivo* (IVIV) ocorre se a taxa de dissolução for mais lenta que o esvaziamento gástrico; de outro modo, a correlação será limitada ou nenhuma.

Classe II: baixa solubilidade e alta permeabilidade. A dissolução *in vivo* é a etapa limitante da absorção da droga. Os fármacos nesta classe podem ter variabilidade de absorção devido a fatores das formulações e variáveis *in vivo* que podem afetar o perfil de dissolução. Meios de dissolução e métodos que refletem o controle do processo *in vivo* são particularmente importantes para obter boa correlação IVIV.

Classe III: alta solubilidade e baixa permeabilidade. A permeabilidade é a etapa determinante na absorção do fármaco. Ambos, velocidade e extensão da absorção da droga podem ser altamente variáveis para esta classe, portanto se a dissolução for rápida, esta variação vai ocorrer devido à variação do trânsito

gastrointestinal, conteúdos do lúmen e permeabilidade de membrana e não a fatores da forma farmacêutica.

Classe IV: baixa solubilidade e baixa permeabilidade. A correlação é limitada ou nenhuma. Esta classe de fármacos apresenta significantes problemas de efetiva liberação oral. O número de fármacos nesta classe vai depender de limites precisos usados para classificação de solubilidade e permeabilidade.

Um fármaco é considerado altamente permeável pelo FDA quando fração maior ou igual a 90% da dose absorvida é completa em humanos. Um fármaco é classificado como altamente solúvel se a maior dose clínica pode ser dissolvida em 250 mL de meio aquoso, no intervalo de pH 1 a 7,5. O volume estimado de 250 mL é derivado de protocolos típicos de estudo de biodisponibilidade que determinam a administração de um fármaco para voluntários sadios em jejum com um copo (em torno de 8 partes) de água. Esse critério é atualmente aplicado por ambos os guias regulatórios Europeus e Americano e, no Brasil, pela ANVISA. Um fármaco é considerado altamente permeável quando 90% ou mais é absorvido (BRASIL, 2003; FDA GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2000; LENNERSNAS, ABRAHAMSSON, 2005).

Ainda com relação à permeabilidade, compostos com coeficiente de permeabilidade aparente (Papp) menor que 1×10^{-6} cm/s podem ser classificados como pouco absorvidos (0- 20%), entre 1 a 10×10^{-6} cm/s como moderadamente absorvidos (20-70%) e muito absorvidos com Papp maior que 10×10^{-6} cm/s (YEE, 1997).

Embora o SCB tenha sido primeiramente desenvolvido para aplicações regulatórias, houve, porém muitas outras implicações nos processos de desenvolvimento pré-clínico e clínico de medicamentos, o que trouxe grande reconhecimento na pesquisa realizada na indústria. A importância da dissolução de fármacos no TGI e da permeabilidade pela barreira da parede do intestino no processo de absorção oral tem sido bem conhecidas desde a década de sessenta, mas as pesquisas realizadas para constituir o SCB tem fornecido novos dados quantitativos para o moderno desenvolvimento de medicamentos. Assim, a ferramenta SCB tem implicações na seleção de fármacos candidatos para

completo desenvolvimento, previsão e elucidação de interações com alimentos, incluindo adequação para administração oral de liberação estendida, e a possibilidade de correlação *in vitro/in vivo* no teste de dissolução para formas sólidas (LENNERSNAS, ABRAHAMSSON, 2005).

O SCB fornece números adimensionais que são combinações de parâmetros físico-químicos e fisiológicos e apresentam a visão mais simplificada e fundamental da absorção gastrointestinal (LOBENBERG, AMIDON, 2000; OLIVEIRA, MANZO, 2009). São eles:

- Número de absorção: (A_n): razão entre a permeação (P) e o raio do intestino (R) multiplicada pelo tempo de residência no intestino delgado (t_{res}). Também pode ser definido como a razão entre o t_{res} e o tempo de absorção, como demonstra a Equação 1:

$$A_n = \frac{P}{R} \times t_{res} = \frac{t_{res}}{t_{abs}} \quad (\text{Equação 1})$$

- Número de dissolução: razão entre o T_{res} e o tempo de dissolução (t_{dis}) e contempla a solubilidade C_s , a difusividade (D), a densidade (ρ) e o raio inicial da partícula do fármaco (r) conforme Equação 2:

$$D_n = \left(\frac{3D}{r^2}\right) \times \left(\frac{C_s}{\rho}\right) \times t_{res} = \frac{t_{res}}{t_{dis}} \quad (\text{Equação 2})$$

- Número de dose: razão da massa de fármaco (em g) dividido pelo produto do volume de ingestão ($V_0=250$ mL) e a solubilidade do fármaco segundo a equação 3:

$$D = \frac{M}{V_0/C_s} \quad (\text{Equação 3})$$

De modo geral, no cálculo destas variáveis pode-se assumir que $R=1$; $D=5 \times 10^6$ cm²/s; $\rho = 1,2$ mg/cm³, $t_{res}=180$ min (AMIDON *et al.*,1995; OLIVEIRA,

MANZO, 2009). A absorção de fármacos de acordo com a primeira Lei de Fick pode ser descrita pela Equação 4:

$$J = P \times C_i = \frac{\sigma M}{\sigma t} \times \frac{1}{A} \quad (\text{Equação 4})$$

Em que:

J=massa transportada pela parede intestinal;

P= permeabilidade efetiva;

C_i= concentração do fármaco na superfície da membrana;

A= área superficial da membrana

De acordo com a equação acima pode-se concluir que a permeabilidade e a solubilidade são variáveis fundamentais para descrever o transporte de massa através de uma membrana biológica (LOBENBERG, AMIDON, 2000; OLIVEIRA, MANZO, 2009).

2.5.1 Solubilidade

A solubilidade é uma importante propriedade físico-química dos fármacos. Para que entrem na circulação sistêmica e exerçam efeito terapêutico é preciso que os fármacos estejam na forma de solução, independente da via de administração (ANSEL, POPOVICH, ALLEN, 2000).

Do ponto de vista da Biofarmacotécnica, o termo solubilidade indica a quantidade de um dado soluto que pode ser dissolvida em um volume especificado de solvente. A solubilidade aquosa de um composto é função de sua capacidade de formar pontes de hidrogênio com as moléculas de água. Geralmente, a solubilidade aquosa é diretamente proporcional ao número de ligações de hidrogênio que se pode formar com a água (STORPIRTIS *et al.*, 2009).

A dissolução de formas farmacêuticas sólidas é um pré-requisito para a disposição do fármaco no fluido biológico que circunda o local de administração. O

teste de dissolução que anteriormente era indicado para fármacos de baixa solubilidade está sendo mais amplamente utilizado. Para realização do teste é necessário estabelecer condições, como: tipo de agitação, volume e características do meio de dissolução e valor de cedência do fármaco em função do objetivo terapêutico do medicamento. Para isso são consideradas as características físico-químicas da molécula e o poder discriminativo desejável para o teste. Os resultados favoráveis devem possibilitar comparar a influência do processo produtivo e das variáveis da formulação com a adequada e completa liberação do fármaco em determinado tempo (SOUZA, FREITAS, STORPIRTIS, 2007).

A forma cristalina de um fármaco e o tamanho de partícula são aspectos determinantes da sua característica de dissolução. Grande parte das moléculas orgânicas é polimórfica, incluindo as formas cristalinas e não cristalinas (amorfas). Cada polimorfo geralmente exhibe características físico-químicas próprias, incluindo ponto de fusão e solubilidade aquosa. Desta forma, os sólidos amorfos são quase sempre mais solúveis em água que as formas cristalinas correspondentes, por requererem menos energia para sua dissolução, o que pode ter impacto significativo na sua biodisponibilidade (STORPIRTIS *et al.*, 2009).

Também é válido ressaltar que solutos polares e espécies ionizadas são mais solúveis em água. Embora a ionização diminua a transferência de fármacos através das membranas biológicas, aumenta sua taxa de dissolução nos fluidos gastrintestinais. Enquanto uma grande parte do fármaco se encontra ionizada, a fração não ionizada é rapidamente absorvida, sendo repostada na mesma velocidade, de forma que dificilmente torna-se uma etapa limitante da absorção. A solubilidade de ácidos e bases fracas é, geralmente, dependente do pH (BLANCHARD, 1978; LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG, 2001).

Portanto, para fármacos absorvidos por difusão passiva, aqueles que apresentam uma solubilidade reduzida em água tendem a ter uma velocidade de absorção oral menor do que aqueles que apresentam uma solubilidade aquosa mais elevada (LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG, 2001).

Os compostos de pouca solubilidade podem apresentar absorção incompleta ou irregular, levando à resposta mínima na dose desejada. Nesse caso é preciso considerar seu aprimoramento. Os métodos para tanto dependem da natureza química do fármaco e do tipo de produto farmacêutico. Uma técnica muito usada para que uma maior solubilidade aquosa possa ser atingida é a preparação de derivados mais solúveis do composto base, como sais ou ésteres, por meio da complexação química ou da redução do tamanho das partículas. Outra técnica usada, quando é necessária a forma líquida, é o ajuste do pH do solvente no qual o fármaco será dissolvido para ampliar a solubilidade (ANSEL, POPOVICH, ALLEN, 2000).

A solubilidade de um fármaco é determinada pelo método de solubilidade do equilíbrio, pelo qual um excesso de solvente é colocado e agitado em temperatura constante por um período prolongado, até que se atinja o equilíbrio. A análise química do fármaco em solução é realizada para determinar o grau de solubilidade (ANSEL, POPOVICH, ALLEN, 2000).

No tradicional método do shake-flask, o período de agitação da solução saturada com agitador magnético a 100 rpm é de 24 horas até o platô do equilíbrio ser alcançado, seguido de filtração e ensaio por HPLC com detecção UV (FDA GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2000; HEIKKILÄ *et al.*, 2011).

O objetivo da avaliação do sistema de classificação biofarmacêutica é determinar o equilíbrio de solubilidade de um fármaco sob condições de pH fisiológico. O perfil de pH de candidatos à fármacos deve ser determinado a 37 ± 1 °C, em meio aquoso, com intervalo de pH de 1 a 7,5. Um número suficiente de condições de pH para determinação de solubilidade devem ser baseados em características de ionização dos candidatos à fármacos. Um mínimo de três réplicas para determinação de solubilidade é recomendado em cada condição de pH (FDA GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2000).

2.5.2 Permeabilidade

O epitélio intestinal é composto principalmente por enterócitos dispostos em monocamadas e tem sua área estendida devido à presença de vilosidades e microvilosidades. O transporte de fármacos através do epitélio intestinal pode ocorrer por um ou mais dos seguintes mecanismos: transporte passivo paracelular, transporte passivo transcelular, transporte mediado por carreadores e transporte por vesículas (BALIMANE, CHONG, MORRISON, 2000).

A absorção de fármacos, através das membranas do TGI, é um processo que envolve um grande e complexo mecanismo influenciado por vários fatores, como características de solubilidade, que podem ser afetadas pela composição dos líquidos fisiológicos do TGI, a precipitação no local de absorção, a adsorção do fármaco aos compostos presentes no lúmen, a degradação química ou bacteriana, a degradação na própria parede do TGI e os múltiplos mecanismos de transporte que determinam suas rotas de absorção (DRESSMAN, LENNERNAS, 2000; SOUZA, FREITAS, STORPIRTIS, 2007).

A velocidade de absorção dos fármacos é maior quando este está sob a forma não ionizada e o grau de ionização depende do pH (STORPIRTIS *et al.*, 1999).

Devido aos variados processos envolvendo absorção de fármacos no intestino é frequentemente difícil usar apenas um modelo *in vitro* para prever precisamente as características de permeabilidade *in vivo* (BALIMANE, CHONG, MORRISON, 2000). Como resultado, uma grande variedade de modelos vem sendo desenvolvido e recentemente revisto. A seleção do método depende dos objetivos do estudo, do tipo de medicamento e das técnicas analíticas disponíveis, devendo priorizar aquele de maior exatidão, sensibilidade e reprodutibilidade (CONSIGLIERI, STORPIRTIS, 2000).

2.5.2.1 Métodos para a determinação da permeabilidade intestinal

Os principais métodos rotineiramente empregados na determinação da permeabilidade intestinal podem ser classificados em métodos físico-químicos, métodos *in vitro* ou *ex vivo*, métodos *in situ* e métodos *in vivo*.

2.5.2.1.1 Métodos físico-químicos (BALIMANE, CHONG, MORRISON, 2000):

- *Coefficiente de partição (logP/LogD)*

É a relação entre permeabilidade (Log P, fração absorvida em humanos) e lipofilicidade Log D (HO *et al.*, 1977).

O valor do Log P fornece informações indiretas da extensão do transporte transcelular passivo possível para várias drogas (HO *et al.*, 1977). Como medida de interação fármaco-membrana, o coeficiente de partição é um dos parâmetros físico-químicos mais importantes na predição e interpretação de permeabilidade pela membrana. A absorção oral de medicamentos foi demonstrada ser dependente da lipofilicidade de fármacos na maior parte dos estudos realizados anteriormente (DRESSMAN, AMIDON, FISHER, 1985; HOUSTON, UPSHALL, BRIDGES, 1974; SCHANKER, TOCCO, BRODIE, HOGBEN, 1958).

O coeficiente de partição entre uma fase oleosa e uma fase aquosa (Log P) fornece a medida de lipofilicidade de uma molécula. O octanol é o solvente usualmente escolhido para a fase oleosa. Se uma fase aquosa está a um pH específico, o coeficiente de distribuição é determinado para aquele valor de pH (log D). Para isto considera-se a ionização da molécula naquele pH pelo método de agitação em frasco que conta com a distribuição de um fármaco no equilíbrio, entre uma fase oleosa e uma aquosa (ASHFORD, 2005b).

- *Cromatografia de membrana artificial imobilizada*

A coluna de cromatografia de membrana artificial imobilizada (IAM) simula um ambiente de lipídeos de membranas celulares. IAM é uma superfície cromatográfica preparada por imobilização covalente de membrana de células fosfolipídicas para superfícies sólidas na espessura da monocamada. É experimentalmente simples e potencialmente capaz de triar um grande número de compostos. Mede a partição da fase lipídica contida na coluna cromatográfica. Pidgeon e colaboradores demonstraram a utilidade desta metodologia como uma precisa, custo-efetiva e eficiente preditora da permeabilidade de candidatos a fármacos. O fator predominante que regula a passagem de fármacos pela mucosa gastrointestinal é a habilidade para passar pelas membranas de células lipídicas. O log de K derivado da coluna IAM mostrou razoável correlação com particionamento de fármacos em lipossomas e valores de permeabilidade determinados pelas monocamadas de células Caco-2 (BALIMANE, CHONG, MORRISON, 2000, PIDGEON, 1990 a).

- *Ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA).*

O Pampa é constituído de uma placa de micro titulação com 96 poços completamente preenchidos com soluções de meios aquosos (pH 7,4/6,5) tampado com uma placa de filtro de micro titulação no tipo de uma construção sanduíche. O material do filtro hidrofóbico usado como suporte dos primeiros 48 poços (amostras) da placa de filtro é impregnado com solução de 1-20% de lecitina em um solvente orgânico (dodecano, hexadecano, 1,9-decadieno). A superfície dos 48 poços restantes (referência) é molhada com um pequeno volume (4-5 µL) de uma solução metanol/água 50% (v/v). Estudos de transporte são iniciados pela transferência de 100-200 µL de uma solução estoque de 250 ou 500 µM no topo da placa de filtro na amostra e na seção referência respectivamente (KANSY, SENNER, GUBERNATOR, 1998).

Os ensaios de permeação com membrana artificial paralela permitem a mais rápida determinação de propriedades de permeação de fármacos através de membrana artificial relacionados com processos de absorção transcelular *in vivo*. PAMPA também pode fornecer informações sobre lipofilicidade e estado de ionização das substâncias. O grande potencial do PAMPA é triar grande quantidade de compostos. De acordo com a escala de classificação modificada descrita por Amidon, podem-se separar os fármacos em estudo em 3 grupos: compostos muito absorvidos (absorção humana de 70 a 100 %, fluxo PAMPA entre 25 e 100 %); compostos absorvidos intermediariamente (absorção humana de 30 a 70 %, fluxo PAMPA, entre 5 e 25 %) e compostos com baixa absorção (absorção humana de 0 a 30 %, fluxo PAMPA, menor de 5 %) (KANSY, SENNER, GUBERNATOR, 1998).

2.5.2.1.2 Métodos para avaliação da permeabilidade *in vitro*

Dentre os principais métodos *in vitro* empregados para determinar a permeabilidade dos fármacos, podem ser citados métodos que empregam tecidos animais como intestino invertido e transporte através de segmento intestinal lado-a-lado, câmara horizontal (Ussing chamber), passagem por membranas de vesículas isoladas e métodos baseados em monocamadas de células epiteliais, como Caco-2 ou TC-7 (BALIMANE, CHONG, MORRISON, 2000):

2.5.2.1.2.1 Baseados em tecido intestinal animal

- *Transporte in vitro/ex vivo através de segmento intestinal horizontal (Ussing chamber)*

Estudos de transporte por segmentos intestinais de animais são largamente utilizados como método *in vitro* para estudar a absorção de fármacos. Esse método envolve o isolamento de tecidos intestinais, cortando em tiras de tamanho

apropriado, travando-as em um instrumento adequado e então a taxa do transporte de fármacos pelo tecido é medida. A utilidade desse instrumento *in vitro* (Ussing Chamber) foi primeiramente demonstrada por Ussing e Zerahn (1951). Nesse método, a permeabilidade é medida com base no aparecimento do fármaco no lado seroso da membrana e no seu desaparecimento no lado mucoso. Um recurso dessa abordagem é que a resistência elétrica da membrana pode ser medida durante o curso do experimento (BALIMANE, CHONG, MORRISON, 2000).

A técnica de Ussing Chamber é o método ideal para estudar diferenças na absorção de substâncias para montagem de tecidos intestinais de várias regiões intestinais (UNGELL *et al.*, , 1998). As desvantagens desta técnica incluem: falta de sangue e suprimento de nervos, rápida perda de viabilidade de tecidos durante o experimento e mudanças na morfologia e funcionalidade de transportadores de proteínas durante o processo de cirurgia e montagem de tecidos (BALIMANE, CHONG, MORRISON, 2000).

- *Transporte in vitro/ex vivo através da técnica do intestino invertido*

É uma técnica ideal para estudar o mecanismo de absorção de fármacos tanto para transporte passivo como para o transporte ativo. Com o recente interesse no campo de atividade da glicoproteína P no intestino, esse modelo pode ser usado para avaliar o papel dos transportes do tipo efluxo na absorção intestinal de fármacos comparando os transportes cinéticos na ausência ou presença de inibidores ou substratos da glicoproteína P. O modelo de intestino invertido tem uma vantagem analítica adicional sobre outros métodos *in vitro* por causa do volume de amostras no lado seroso ser relativamente pequena e as substâncias se acumularem mais rápido. Algumas das desvantagens são a falta de atividade sanguínea e suprimento de nervos que podem levar à rápida perda de viabilidade. Além disso, inverter o tecido intestinal pode ocasionar dano

morfológico acarretando resultados enganosos (BALIMANE, CHONG, MORRISON, 2000).

Estudos de permeabilidade baseados no isolamento do saco intestinal são rotineiramente realizados usando diferentes espécies de animais incluindo ratos, coelhos, porco, cachorro e macaco (BALIMANE, CHONG, MORRISON, 2000).

- *Transporte in vitro através de vesículas isoladas de membrana*

Mede a captura em vesículas da borda da membrana apical, preparadas de fragmentos intestinais ou enterócitos isolados (ASHFORD, 2005 b).

Vesículas isoladas de membranas preparadas de tecidos intestinais propiciam a flexibilidade de examinar a interação de fármacos para uma membrana específica de interesse. Esse método oferece uma oportunidade única para estudar as propriedades das substâncias e o transporte de nutrientes em nível celular. Estudos com vesícula de membrana podem ser feitos com pequena quantidade de substâncias (miligramas) e múltiplos experimentos podem ser realizados com vesículas preparadas de um único animal de laboratório. A vantagem desse método é que as vesículas podem ser criopreservadas e usadas por longo tempo. Porém vesículas de membranas preparadas não são puras e muito frequentemente contém outras membranas e fragmentos de organelas. Praticamente não é viável isolar, com 100% de pureza, as bordas das membranas sem contaminação com outros tipos de vesículas. Como o volume das vesículas é muito pequeno, geralmente esse método requer técnicas analíticas muito sensíveis (BALIMANE, CHONG, MORRISON, 2000).

2.5.2.1.2.2 *Baseados em monocamadas de células epiteliais*

- *Células Caco-2*

As células Caco-2 são oriundas de um adenocarcinoma de cólon humano e tornaram-se um método popularmente conhecido a partir da década de 1980 como um método *in vitro* de absorção primária, ferramenta de triagem em muitas

companhias farmacêuticas, e muitos exemplos de correlação com absorção em humanos tem sido relatados com sucesso devido ao fato destas células apresentarem capacidade de diferenciação espontânea em cultivo *in vitro*, expressando muitas características morfológicas e bioquímicas presentes no intestino delgado humano (STORPIRTIS *et al.*, 2009).

Mantidas as condições adequadas de cultivo, as células Caco-2 crescem formando uma monocamada de células cilíndricas polarizadas com microvilosidades na borda apical, junções oclusivas sobre as células adjacentes e expressam atividade enzimática de hidrolases, comum no intestino delgado (SAMBUY, *et al.*, 2005).

Existem, porém, diferenças consideráveis entre a expressão de carreadores para transporte ativo através das membranas do intestino e nas células Caco-2, embora transportadores farmacologicamente importantes estejam presentes nessas células (transportadores peptídicos, transportadores de cátions orgânicos e transportadores de ânions orgânicos estão em menor quantidade quando comparados com os níveis de produção *in vivo*). Em decorrência disso, o modelo *in vitro* é empregado mais eficientemente na caracterização da permeabilidade de compostos absorvidos passivamente pela via transcelular (BALIMANE, CHONG, 2005).

Como a resistência elétrica transepitelial do epitélio colônico (medida direta da resistência das monocamadas para eletrólitos passivos e permeação iônica) é muito mais alta do que a do epitélio do intestino delgado, as células Caco-2 excluem a passagem de muitas moléculas hidrofílicas que são, provavelmente, transportadas por algumas extensões que permitem a passagem no epitélio do intestino delgado *in vivo* (BALIMANE; CHONG, 2005).

No caso de fármacos poucos solúveis, a previsão da precisão do Papp usando o modelo de células Caco-2 representa um grande desafio. A falha para solubilização no meio aquoso de tampão convencional aliado à propensão de retenção na monocamada de células impõe sérias restrições para aplicabilidade deste modelo para fármacos com essa característica físico-química. Isso pode resultar especificamente numa situação onde a permeação de substâncias é

limitada pelo seu particionamento fora das células. Além disso, o gradiente de concentração estabelecido é inadequado necessitando do uso de ferramentas analíticas de alta precisão (BUCKLEY *et al.*, 2012).

Com relação aos problemas associados à solubilização, co-solventes orgânicos tem sido incorporados na solução dentro do compartimento doador. Embora existam relatos sobre sua citotoxicidade e potenciais efeitos deletérios na integridade das junções protéicas, em baixas concentrações os co-solventes orgânicos parecem exibir boa compatibilidade com células Caco-2 (BUCKLEY *et al.*, 2012).

Dificuldades em estabelecer condições de fluxo “sink conditions” (força motriz que direciona o transporte mantendo o gradiente de concentração para que a substância permeada não retorne ao compartimento doador) também podem ser superadas pelo uso do soro albumínico-bovino no compartimento receptor. Alternativamente, estudos sugerem que problemas associados às condições de fluxo podem ser superados por modificações do emprego da equação para calcular o Papp. Além dos problemas de solubilização, a baixa permeabilidade de fármacos poucos solúveis que são altamente lipofílicos pode ser afetada pelas condições hidrodinâmicas existentes neste sistema de cultura de células. Na ausência de agitação, uma camada de água estacionária é criada, o que pode adversamente afetar o transporte transcelular de moléculas lipofílicas. Essa camada de água “imperturbável” representa uma significativa barreira no uso das células Caco-2. Alguns estudos têm demonstrado que a presença dessa camada de água no sistema de células Caco-2 pode diminuir o Papp de fármacos lipofílicos com baixa solubilidade. Para minimizar estes efeitos, os pesquisadores têm empregado várias técnicas para garantir agitação adequada no sistema do experimento (BUCKLEY *et al.*, 2012).

Portanto, a adequação das células colônicas Caco-2, como modelo para estudar a permeabilidade paracelular de substâncias que são absorvidas incompletamente, é limitado. Esse fato, aliado à menor expressão dos carreadores, indica que existe claramente uma necessidade por modelos

adicionais de cultura de células mais próximos do transporte paracelular do epitélio do intestino delgado (DUIZER *et al.*, 1997).

Vale lembrar também que a maior parte da absorção ocorre no intestino delgado, onde o pH varia de ácido pra neutro (~5). Assim, na parte superior do intestino delgado, um ácido fraco vai ser primeiramente deionizado levando o caminho passivo transcelular a ser a rota de permeação dominante. Porém, os estudos com células Caco-2 sob uma condição fixa de pH (apical, pH 6,5 e basolateral pH 7,4) são incapazes de simular o ambiente dinâmico de pH a que o composto é exposto *in vivo* (BALIMANE, CHONG, 2005).

Além disso, ensaios baseados em células Caco-2 têm outras desvantagens como alto custo por ensaio, período longo de crescimento (21 dias) e manutenção de alimentação regular para preparação de monocamadas estáveis. Vale também ressaltar que as células Caco-2 tem sido conhecidas por aumentarem o sistema de efluxo da glicoproteína P. Esse transportador de efluxo, comprovadamente varia de modo significativo com a idade/duração da cultura de células Caco-2 e isso pode subestimar a absorção de alguns compostos (TRAPANI *et al.*, 2004, BALIMANE, CHONG, 2005).

No entanto, com relação ao período de tempo para crescimento das células Caco-2, este pode ser substancialmente reduzido (menos de uma semana) modificando tanto o material de revestimento como o meio de crescimento (CHONG *et al.*, 1997; LENTZ, HAYASHI, POLLI, 1998). Um período de crescimento menor das células para gerar uma monocamada funcional não apenas aumenta a produtividade total, mas também reduz a chance de contaminação por bactérias e/ou fungos (BALIMANE, CHONG, 2005).

Já a variabilidade entre as células Caco-2 cultivadas em diferentes laboratórios pode ser atribuída a diferentes condições de cultura e composição de subpopulação de células. Todavia, dentro de cada laboratório individual, fármacos absorvidos completamente podem ser facilmente separados dos pobremente absorvidos por esse modelo de células. A recente tendência, em muitas pesquisas de laboratórios farmacêuticos, é automatizar completamente a triagem de permeabilidade utilizando as células Caco-2 com a robótica. Um sistema

completamente automatizado de células Caco-2 vai permitir estudos de 500-2000 compostos por mês sem um aumento proporcional nos recursos (BALIMANE, CHONG, 2005).

Por outro lado, um novo método usando células Caco-2 está sendo proposto por Yu e colaboradores (2012) para ensaiar a permeabilidade de fármacos com características de cultura de células humanas em suporte hidrogel visando replicar precisamente a forma e o tamanho das vilosidades do intestino delgado humano (a densidade do modelo de vilosidades foi feito para simular o real espaço das vilosidades 25 vilosidades/mm² e a profundidade de cada vilosidade foi aproximadamente 565 µm, simulando as condições existentes no intestino humano), características que tem sido apontadas como uma das razões para a baixa correlação entre drogas absorvidas lentamente *in vitro* e *in vivo* (YU *et al.*, 2012).

- Células epiteliais TC-7

As células TC-7, um dos subclones isolados das células Caco-2, tendo uma morfologia celular muito parecida com as células Caco-2, presença de microvilosidades e a presença das junções oclusivas. Porém, as células TC-7 tem resistência transepitelial significativamente maior em 21 dias de cultura e também posteriormente (BALIMANE, CHONG, MORRISON, 2000).

- Células 2/4/A1

São células originárias do intestino fetal de ratos. Estas podem mimetizar a permeabilidade do intestino delgado humano para transporte passivo (transcelular e paracelular). Estas células formam monocamadas diferenciáveis com finas junções e presença de borda em “escova”. As desvantagens de sua utilização são

a alta variabilidade na sua constituição e viabilidade devido a mudanças na temperatura (SOUZA, FREITAS, STORPIRTIS, 2007).

- Células MDCK

As células MDCK são um modelo de células de rim canino (“Madin-Darby”). Estas células quando cultivadas em membranas semi-permeáveis se diferenciam em epiteliais colunares, com junções semelhantes às células Caco-2 (SOUZA, FREITAS, STORPIRTIS, 2007).

As células MDCK são inseridas em cultura de membranas de alta densidade e incubadas por 3 dias, representando tempo significativamente inferior ao necessário para o crescimento de células Caco-2 (SOUZA, FREITAS, STORPIRTIS, 2007).

Estas células são largamente utilizadas para estudar a fisiologia tubular distal renal, incluindo o transporte de íons. Os íons Na⁺ e Cl⁻ são filtrados nos rins e cerca de 5-10% de sua reabsorção é regulado por co-transportadores. As células MDCK representam um dos poucos modelos que expressam quantidade adequada de co-transportadores. Esses estudos são relevantes no delinamento da terapêutica com compostos diuréticos tiazídicos empregados no tratamento da hipertensão (JONG *et al.* 2003; WEGMANN, NUSING, 2003).

2.5.2.1.3 Métodos *in situ*

- Estudos de perfusão intestinal *in situ* em um modelo animal conveniente.

O uso do método de perfusão *in situ* é severamente limitado porque esse método confia no desaparecimento do composto do lado do lúmen como uma indicação de absorção, mas a taxa de decaimento de concentração do perfusato

nem sempre representa a taxa de absorção do fármaco na circulação sistêmica. O método também é limitado por causa do fator custo que requer um grande número de animais para obter dados estatisticamente significantes. Relativamente, grandes quantidades dos componentes do teste são requeridas para estudo de performance (>10 mg), o que não é viável no início do desenvolvimento de fármacos. Também foi demonstrado que a manutenção cirúrgica do intestino combinado com anestesia causa uma significativa mudança no fluxo do sangue para o intestino e tem um notável efeito na taxa de absorção (UHING, KIMURA, 1995).

- Estudos em humanos (estudos de biodisponibilidade absoluta, estudos de balanço de massa e de perfusão intestinal).

Método utilizado para formas farmacêuticas destinadas a produzir efeito sistêmico do fármaco, ou seja, cujo fármaco sofra o processo de absorção e seja distribuído pelo sangue ao sítio de ação. A concentração do fármaco, ou parte ativa do mesmo, ou ainda de seus produtos de biotransformação, quando for o caso, é quantificada no sangue, plasma ou outro líquido biológico, em função do tempo (CONSIGLIERI, STORPIRTIS, 2000).

Para os fármacos de ação sistêmica cuja excreção urinária seja mecanismo expressivo de sua eliminação, a excreção urinária do fármaco pode ser determinada em função do tempo e os intervalos das medidas devem ser os menores possíveis para que a velocidade de absorção determinada seja a mais exata possível (CONSIGLIERI, STORPIRTIS, 2000);

No caso de formas farmacêuticas que não liberam o fármaco para a corrente sanguínea para distribuição sistêmica, mede-se o efeito farmacológico do fármaco função do tempo, desde que com suficiente exatidão, sensibilidade e reprodutibilidade. Sua aplicação é recomendada na inexistência de métodos para quantificar o fármaco nos líquidos biológicos, empregando método capaz de medir efeito farmacológico agudo (CONSIGLIERI, STORPIRTIS, 2000).

Nos estudos de biodisponibilidade absoluta, determina-se a biodisponibilidade oral e esta é comparada com a biodisponibilidade obtida pela administração intravascular, tomada como referência (STORPIRTIS *et al.*, 2009).

Nos estudos de balanço de massa, utilizam-se substâncias não marcadas, marcadas com isótopos estáveis ou ainda radiomarcadas para determinar a extensão da absorção. Entretanto por meio deste método obtém-se uma estimativa altamente variável da permeabilidade, e, por consequência, outros métodos alternativos estão sendo desenvolvidos (STORPIRTIS *et al.*, 2009).

- Sistemas integrados dissolução/absorção

Para prever a absorção de novos fármacos, atualmente também são realizadas pesquisas objetivando criar modelos associando dissolução/permeação (SOUZA, FREITAS, STORPIRTIS, 2007).

Foram descritos na literatura sistemas que mimetizam as mudanças fisiológicas e de pH do TGI. Para tal, o medicamento ou fármaco é adicionado, sob agitação, a um recipiente contendo meio líquido com pH 1, sendo este acoplado a outro recipiente cujo pH do meio foi modificado para 6. O sistema contínuo é ligado a uma câmara contendo membrana formada de células Caco-2 visando determinar a permeabilidade do fármaco (SOUZA, FREITAS, STORPIRTIS, 2007).

No trabalho de GINNSKI e colaboradores (1999), para determinar a relação entre dissolução e permeação foram traçados gráficos contendo as frações dissolvidas (F_d) e absorvidas (F_a) em função do tempo. Os dados de F_d são obtidos diretamente quantificando a concentração em determinado tempo. Os valores de tempo associados à F_a devem ser ajustados, pois antes que a permeação se inicie é necessário que tenha ocorrido a dissolução. Devido a isso, o tempo médio de dissolução foi calculado e o valor encontrado foi somado aos tempos de permeação, que foram 20, 40, 60, 90, 120 e 180 min. Com esse estudo foi possível conhecer previamente as frações absorvida e dissolvida de formulações antes dos estudos clínicos em humanos (GINNSKI *et al.*, 1999).

Kobayashi e colaboradores (2001) descreveram um modelo que possibilita empregar tecidos isolados de animais para determinar a permeação. Este também ajusta o pH do meio à valores semelhantes ao do pH estomacal e intestinal. As amostras são coletadas em diferentes compartimentos e tempos. Os dados de fração dissolvida e absorvida são empregados em um modelo farmacocinético monocompartimental para o cálculo da área sob a curva de concentração plasmática do fármaco em função do tempo (KOBAYASHI *et al.*, 2001; HE *et al.*, 2003).

2.5.3 Métodos para estudo da permeabilidade *in vitro/ex vivo* que empregam membrana intestinal de rã

Existem estudos de permeabilidade utilizando segmento intestinal de sapo, pois o intestino do sapo tem a mesma composição de membranas e vilosidades dos vertebrados e os mesmos mecanismos de transporte, portanto, pode ser usado como modelo para absorção intestinal (TRAPANI *et al.*, 2004).

Alguns trabalhos utilizando segmento intestinal de sapo obtiveram resultados promissores como os realizados por Trapani e colaboradores (2004) que utilizaram saco intestinal de sapo isolado, com aproximadamente 5 cm de comprimento preenchidos com solução de Ringer em vials (2,7cm x 5,73 cm) em banho maria mantidos a 26° C, para observar a permeabilidade durante 2-5 horas de 20 fármacos absorvidos passivamente. A análise quantitativa foi feita por HPLC e concluíram que os valores de coeficiente de permeabilidade aparente (Papp) obtidos por este modelo puderam satisfatoriamente classificar estes fármacos no sistema de Classificação Biofarmacêutica e que o modelo pode ser usado para prever a absorção oral de compostos absorvidos passivamente em humanos.

Dando sequência ao trabalho de Trapani e *col.* (2004), Franco e colaboradores (2008) observaram que há evidências de relevantes transportadores de fármacos no intestino do sapo sendo possível, com mais

estudos, avaliar o transporte ativo, que apresenta tantas limitações em outros métodos *in vitro*, também através deste modelo.

Em 2010, Yerasi e colaboradores avaliaram a confiabilidade da técnica de perfusão intestinal *in situ* em sapo para avaliação da permeabilidade de fármacos que são substratos da enzima CYP3A4 e os resultados obtidos permitiram concluir que é possível determinar o coeficiente de permeabilidade efetiva (P_{eff}) para compostos substratos desta enzima usando esta técnica.

2.5.4 *Rana catesbeiana* (rã touro)

A rã-touro (*Rana catesbeiana*) é uma espécie de rã nativa da América do Norte (IUCN, 2010). Essa espécie foi originalmente encontrada nos Estados Unidos, Canadá e México. No entanto, devido à ação humana, têm sido distribuída por todo o mundo. É carnívora e consome insetos, mamíferos pequenos (ratos), peixes, pássaros, serpentes e também outras rãs (IUCN, 2010).

As rãs-touro são anfíbios grandes e podem atingir o comprimento de 20 cm e peso de 1.500 g. São geralmente verdes ou de cor bronzeada, com castanho escuro, verde escuro, ou negro e uma parte inferior amarela ou branca, que varia acentuadamente na época do acasalamento (IUCN, 2010). A Figura 1 ilustra um exemplar da espécie.

2.5.4.1 Classificação científica:

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Amphibia

Ordem: Anura

Família: Ranidae

Gênero: Rana

Espécie: *R. catesbeiana*

Nome binomial: *Rana Catesbeiana* Shaw, 1802



Figura 1. Ilustração de rã touro (Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/R%C3%A3-touro-americana>)

2.5.4.2 Sistema digestório da rã-touro

Há muito pouca informação descrita sobre o aparelho digestório de rãs, menos ainda para a espécie *Rana catesbeiana*. A maioria dos trabalhos trata de girinos dada sua importância no controle da qualidade ambiental.

George e Castro (1998) descrevem que em rãs existe uma estrutura semelhante à valva entre os intestinos delgado e grosso. Seu epitélio intestinal é colunar simples e consiste de dois tipos celulares: as células absorptivas, as quais apresentam bordas apicais estriadas, correspondentes aos microvilos que aumentam a superfície de absorção, e as células calciformes (GEORGE, CASTRO, 1998).

O tubo digestivo de girinos pode ser dividido em: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior. Nesse caso, o intestino anterior, no animal metamorfoseado, origina o esôfago e o estômago. O intestino médio, histologicamente semelhante ao intestino anterior, deriva-se no intestino delgado e o intestino posterior, por sua vez, no intestino grosso (SANTANA, 1998).

2.6 Fármacos antirretrovirais

2.6.1 Zidovudina

A zidovudina (3'-azido-3'-desoxitimidina; comumente denominada AZT) é um análogo da timidina com atividade antiviral contra o HIV-1, o HIV-2, (HTLV)-I, o vírus linfotrófico T humano (ou da leucemia) e outros retrovírus (GOODMAN, GILMAN, 1996).

Sua estrutura molecular está indicada na Figura 2, a seguir:

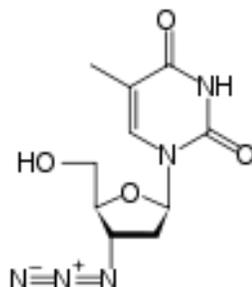


Figura 2. Fórmula estrutural da zidovudina (ZDV) (Veal, Back, 1995).

Baixas concentrações inibem a infecção aguda por HIV-1 em linhagens humanas de células T e em linfócitos sanguíneos periféricos. A zidovudina é menos ativa em monócitos-macrófagos humanos ou em células quiescentes, mas inibe a replicação do HIV em macrófagos cerebrais humanos. A zidovudina também é inibitória para o HBV e EBV (GOODMAN, GILMAN, 1996).

Ainda, baixas concentrações de zidovudina inibem o crescimento das células mielóides e eritróides progenitoras humanas e a blastogênese nas células mononucleares do sangue periférico (GOODMAN, GILMAN, 1996).

Apresenta-se neutra na faixa de pH que varia de 3,5-5,5 e pka igual a 9,8 (SOUZA, STORPIRTIS, 2004).

A absorção é rápida e quase completa por difusão passiva e a biodisponibilidade oral é de aproximadamente 60-70 % da dose administrada. A

absorção varia amplamente nos pacientes infectados por HIV e fica retardada pela ingestão de alimentos (GOODMAN, GILMAN, 1996).

Os picos plasmáticos e os níveis mínimos são de 0,4 a 0,5 µg/mL e 0,1 µg/mL, respectivamente, naqueles indivíduos que recebem 100 mg a cada 4 horas. As concentrações líquóricas variam amplamente, mas são, em média, 53% das concentrações plasmáticas nos adultos e 24 % nas crianças. As concentrações no sangue são semelhantes às encontradas na saliva, porém menores que as do sêmen (GOODMAN, GILMAN, 1996).

A meia-vida ($t_{1/2}$) plasmática de eliminação é de aproximadamente 0,9 a 1,5 hora. A zidovudina sofre metabolismo hepático de primeira passagem e é rapidamente convertida em seu metabólito 5'-O-glicuronídeo, que possuiu uma $t_{1/2}$ de eliminação semelhante, mas é isento de atividade anti-HIV. Após sua administração oral, a recuperação da zidovudina e seu metabólito na urina são em média de 14 e 75 %, respectivamente. A depuração renal envolve tanto a filtração glomerular quanto a secreção tubular (GOODMAN, GILMAN, 1996). A zidovudina é considerada classe I pelo SCB.

2.6.2 Aciclovir

Aciclovir, (ACY), 9-[2-hydroxyethoxymethyl]-guanina é um análogo nucleosídeo com potente atividade antiviral para o grupo herpes vírus. (Elion *et al.*, 1977; Schaeffer *et al.*, 1978). Sua fórmula estrutural pode ser observada na Figura 3.

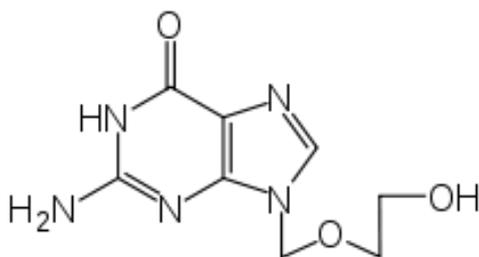


Figura 3. Fórmula estrutural do Aciclovir (ACY) (GOODMAN.,1996).

Por mais de duas décadas o aciclovir tem sido considerado fármaco de primeira escolha para tratamento de vírus de herpes simples (HSV) tipos 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2), mas também tem se mostrado efetivo no tratamento da varicela-zoster, citomegalovírus e infecções por vírus Epstein-Barr. (De Clercq, 1993; Jain *et al.*, 2005). O ACY esta disponível comercialmente na forma intravenosa, oral e administrações tópicas (Stagni, Ali, & Weng, 2004). A administração oral de aciclovir é a rota preferida do ponto de vista de conveniência para o paciente. Porém, seguindo administração oral, a administração do fármaco pelo trato gastrointestinal é pobre, lenta e variável. A biodisponibilidade do ACY é baixa (10-30%) e requer administração de 800 mg 5 x ao dia para tratamento de HSV genital (Tolle-Sander, Lentz, Maeda, Coop, & Polli, 2004; de Miranda & Blum, 1983). A razão para a baixa disponibilidade do aciclovir na sua administração oral é o seu limite de permeabilidade na absorção (BCS classe III, Tolle-Sander *et al.*, 2004). Além da sua baixa permeabilidade, ACY é transportado via difusão passiva pela rota paracelular (De Vruh, Smith, & Lee, 1998; Kristl & Tukker, 1998). Como tal, a rota paracelular ocupa uma área superficial muito pequena comparada com a rota transcelular e é selada pelas junções íntimas, o que restringe o transporte de moléculas hidrofílicas pelo epitélio (Noach *et al.*, 1994; Shah, Jogani, Bagchi, & Misra, 2006). O aciclovir é muito pouco solúvel em água, insolúvel em álcool e solúvel em solução de HCl 0,1 mol/L (United States Pharmacopeia 32 NF/27, 2010).

2.6.3 Marcadores internos de permeação para modelo com membrana intestinal de rã-touro

A FDA sugere o uso de vários fármacos modelos de alta ou baixa permeabilidade como padrões internos para estabelecer a adequação do método, além de identificar os substratos para as bombas de efluxo (OLIVEIRA; MANZO, 2009).

O metoprolol é um fármaco que apresenta alta permeabilidade e é indicado pela FDA como um potencial candidato a padrão interno. 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, dessa forma o manitol utilizado é rádio marcado (SAHA; KOU, 2000) e por isso sua utilização se torna, às vezes, inviável diante da infra-estrutura necessária para sua quantificação. Contudo Trapani e colaboradores (2004) utilizaram em estudos de permeação com saco intestinal de rã, a floridizina como padrão interno de baixa permeação, assim como o metoprolol como padrão interno de alta permeação (TRAPANI *et al.*, 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

Avaliar e selecionar as principais condições experimentais para o método de permeação *in vitro/ex vivo* empregando membrana intestinal de rã touro em células de Franz comparando sua eficácia com os resultados obtidos por meio do modelo clássico que emprega células Caco-2, empregando os fármacos modelo aciclovir e zidovudina.

3.2 Objetivos secundários

- Caracterizar o intestino delgado de rã-touro quanto à morfologia e histologia;
- Verificar a influência das diferentes condições experimentais de pH (7,4 e 8,2), temperatura de 26 e 37 °C e segmentos de intestino com diferentes densidade de vilosidades no modelo por meio de planejamento experimental;
- Aplicar o planejamento experimental Projeto fracionado 2^{4-1} em 4 blocos de tamanho 4, obtido com o programa Minitab 16 *for Windows* para ensaiar as diferentes condições do experimento com membrana intestinal de rã.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Soluções, solventes e reagentes

- Zidovudina, matéria-prima de grau farmacêutico de pureza- Farmanguinhos- Rio de Janeiro
- Zidovudina, substância química de referência, grau de pureza > 99 % - Farmanguinhos- Rio de Janeiro
- Aciclovir, substância química de referência, grau de pureza > 99% (Biosintética Farmacêutica, São Paulo – SP);
- Floridizina diidratada, 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, CaCl₂ 1,0 mmol, NaHCO₃ 2,5 mmol -Synth, Diadema – SP;
- Solução de Bouin preparada de acordo com a seguinte composição: 75 mL de ácido pícrico saturado, 25 mL de formaldeído 37-40% e 5 mL de ácido acético glacial;
- Tricrômico de Malory: obtido pela mistura de solução de fucsina, ácido fosfotúngstico, ácido fósforo molíbdico e azul de anilina aquosa;
- Água purificada Milli-Q -Millipore, MA, EUA.
- Dodecilssulfato de sódio, reagente de grau analítico de pureza (Merk, Darmstadt, Germany);
- Tetraborato de sódio, reagente de grau analítico de pureza (Merk, Darmstadt, Germany);
- Meio DMEM em pó (mistura de sais inorgânicos, aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular) Cultilab®;
- Meio DMEM líquido sem fenol- Cultilab®;
- Solução tampão Hanks- Cultilab®;
- Solução de aminoácidos não essenciais- Sigma Aldrich®;
- Solução de glutamina 200 mM- Sigma Aldrich®;
- Amoxicilina, substância química de referência (99,3%)- Sigma Aldrich®;

- Solução de antibióticos estreptomicina (100 µg/mL)/penicilina (100 UI/mL)- Cultilab®;
- Solução de Tripsina 0,25% e EDTA 1mM- Cultilab®;
- Glicose-Sigma Aldrich®;
- Sais de ácido N-2, hidróxietilpiperazina-N-etano sulfônico (HEPES)-Sigma Aldrich;- Mucina Suína-Sigma Aldrich®;
- Soro fetal bovino- Sigma Aldrich®;
- Metanol, grau cromatográfico Merck;
- Etanol, grau cromatográfico Merck;
- Acetonitrila, grau cromatográfico de pureza - JT Baker;

4.2 Equipamentos e dispositivos diversos

- Fita adesiva 100 x 4,5 (Transpore) – 3 M;
- PARAFILM “M”- LABORATORY FILM, Pechiney Plastic Packaging, Chicago.
- Micropipeta monocanal 20 a 100 µL (Pipetman P100) – Gilson;
- Micropipeta monocanal 100 a 1.000 µL – Gilson;
- Micropipeta monocanal 500 a 5.000 µL- Gilson;
- Seringa de precisão para amostragem manual de volume igual a 1,0 mL;
- 3 Células de Franz modificadas com dimensões: 15 mm diâmetro, 80 mm de altura, 12 mL capacidade receptor, conforme esquema da Figura 4;
- Banho de água com termostato regulável Nova Ética MODELO 500/3D;
- Sistema de eletroforese capilar (modelo HP 3D CE, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) equipado com detector de arranjo de diodos e software (HP ChemStation, verA.08.03);
- Capilares de sílica fundidos revestidos internamente com poliimida, diâmetro interno de 75 µm (ISB, Brasil);
- Incubadora de CO₂ Termo Forma;
- Minivoltímetro Millicell ERS® Millipore;
- Microscópio (Olympus® BX50) e software Image Pro-Plus®, versão 4.5.1.29.
- Lavadora ultrasônica Unique;
- PHmetro Hanna, Digimed;

- Garrafas de cultivo celular 25 e 75 cm²;

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu composto por bomba LC-10ADVP, degaseificador DGU-14^a, injetor automático de amostras SIL-10ADVP, detector DAD SPD-M10AVVP, forno de coluna CTO10AVP; Certificado de Qualificação operacional e de Performance no 512/11-HPLC Instrumentação Analítica;

- Coluna cromatográfica Luna C18, 250 mm de comprimento e 4,60 mm de diâmetro interno, contendo partículas de 5 µm, Phenomenex®

- Sistema de filtração a vácuo Quimis;

- Placas Transwell de 6 e 12 poços com *inserts* de policarbonato com 4 µm de poro, conforme esquema da Figura 5.

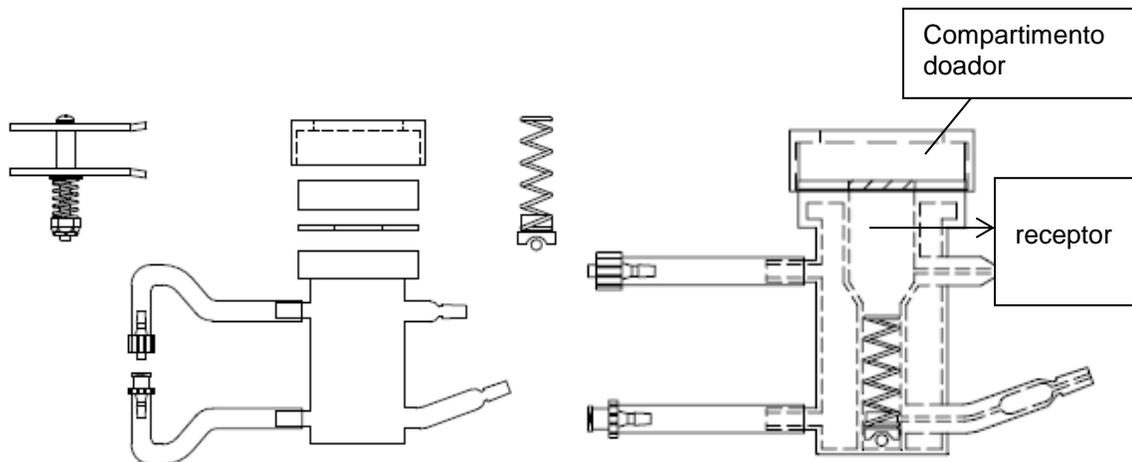


Figura 4. Representação esquemática da célula de difusão vertical e seus acessórios (HANSON RESEARCH, 2004).

Compartimento doador: antiviral: 300 $\mu\text{g/mL}$
 floridizina: 50 $\mu\text{g/mL}$
 metoprolol: 200 $\mu\text{g/mL}$ } 5 mL

Compartimento receptor: 12,0 mL de solução de Ringer.

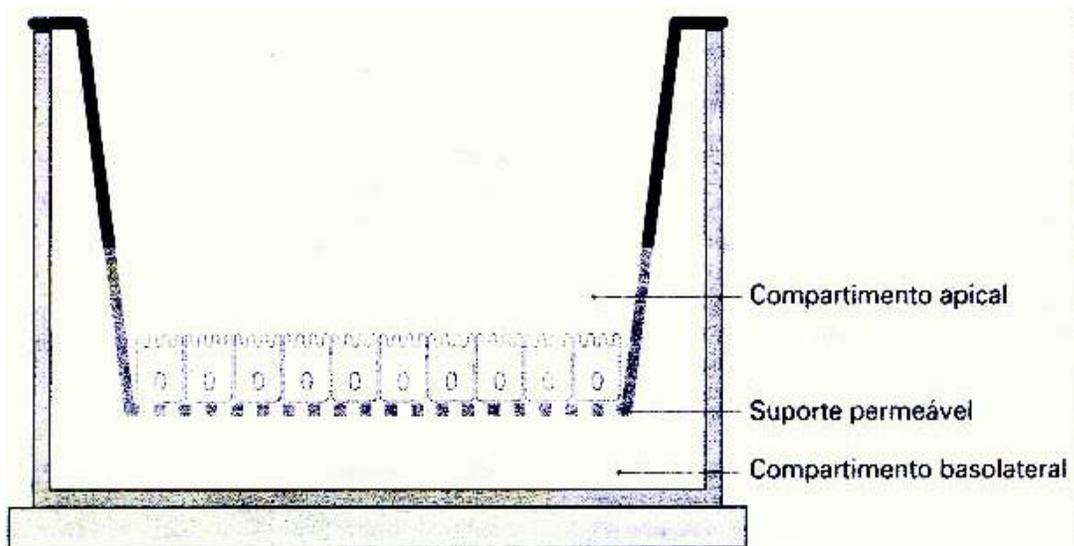


Figura 5. Representação esquemática do suporte de cultivo de células Caco-2 (STORPIRTIS *et al.*, 2009).

4.3 Membranas

Segmentos de intestinos de, aproximadamente, 5,0 cm de comprimento, pesando em média 3,5 g, retirados da porção imediatamente após o estômago, de rãs-touro adultas (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802), fornecidos pelo Ranário de Santa Bárbara D'oeste- SP. Células Caco-2 fornecidas por *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, USA).

4.3.1 Caracterização histológica da membrana biológica

Foram realizados estudos para caracterização da membrana biológica. Dessa forma, depois de obtidas as membranas foram fixadas em solução de Bouin e, em seguida, foram preparadas as lâminas para avaliação morfométrica e caracterização histológica em microscópio ótico.

O protocolo do experimento incluiu a retirada do intestino por laparotomia, sendo que os cortes das secções intestinais foram realizados da seguinte maneira: o segmento inicial do intestino delgado foi retirado imediatamente após o estômago; o segmento médio foi retirado a cerca de 4 cm após o estômago e o segmento final foi retirado a cerca de 1 cm antes do intestino grosso.

Na sequência, foi realizada a limpeza do tubo digestivo com solução de Ringer e colocado em contato com solução fixadora de Bouin, por 48 h, para melhor preservação da mucosa. Após a fixação dos fragmentos feita em Bouin, os materiais foram desidratados em banhos sucessivos de etanol em concentrações crescentes (70-100%) e diafanizados em xilol. Três banhos de 2 h em parafina precederam a inclusão em bloco no mesmo material. Foram obtidos cortes com 5 µm de espessura, em micrótomo manual. Os cortes uma vez coletados em lâminas, foram desparafinizados e as lâminas foram coradas por Tricrômico de Malory e por HE (Hematoxilina-Eosina).

As lâminas foram analisadas em microscópio ótico BX 50 e fotomicrografadas com fotomicroscópio ótico com capacidade de aumento de 400 vezes com o uso do programa Image-Pro-Plus-The Proven Solution. Versão: 4.5.1.29 for Windows 98/NT/ME/2000/XP Prof. Serial number: 41n50000-41229 Copyright 1993-2003 Media Cybernetics, Inc.

4.4 Planejamento Experimental

Diante da possibilidade de padronização de um novo método, foi verificada a influência de algumas variáveis na permeabilidade intestinal, são elas: temperatura, pH da solução de Ringer, secção intestinal da rã e dois diferentes fármacos. Para tanto, foi proposto o Planejamento fatorial 2^{4-1} em 4 blocos de tamanho 4, contemplando as variáveis citadas, apresentadas no Quadro 2.

Quadro 2. Matriz de ensaios codificada do Planejamento fatorial 2^{4-1} em 4 blocos de tamanho 4, obtida com o programa Minitab 16 *for Windows* e utilizada para os estudos de permeabilidade intestinal.

Projeto original com 4 ensaios adicionais						
Ordem padrão	Ordem aleatória	Blocos (sec. int.)	A	B	C	D
1	1	1	1	-1	-1	1
2	3	1	-1	1	-1	1
3	2	1	1	-1	1	-1
4	4	1	-1	1	1	-1
5	6	2	-1	-1	-1	-1
6	7	2	1	1	-1	-1
7	5	2	-1	-1	1	1
8	8	2	1	1	1	1
9	10	1	-1	-1	-1	-1
10	9	1	1	1	1	1
11	12	2	-1	-1	-1	1
12	11	2	1	1	1	-1

Quadro 3. Legenda das variáveis codificadas presentes no planejamento estatístico utilizado para o estudo de permeação intestinal.

Variáveis	Níveis reais		Níveis codificados	
	Nível 1	Nível 2	Nível 1	Nível 2
A=Temperatura	26 °C	37 °C	-1	1
B=Fármaco	zidovudina	aciclovir	-1	1
C=Secção	inicial	final	-1	1
D=pH	7,4	8,2	-1	1

Quadro 4. Matriz do planejamento em unidades originais

Planejamento com 4 ensaios adicionais ordenado pela ordem de correr					
Experimento	Grupo	A Temperatura (°C)	B Fármaco	C Secção intestinal	D pH
1	1	37	zidovudina	inicial	8,2
2	1	37	zidovudina	final	7,4
3	1	26	aciclovir	inicial	8,2
4	1	26	aciclovir	final	7,4
5	2	26	zidovudina	final	8,2
6	2	26	zidovudina	inicial	7,4
7	2	37	aciclovir	inicial	7,4
8	2	37	aciclovir	final	8,2
9	1	37	aciclovir	final	8,2
10	1	26	zidovudina	inicial	7,4
11	2	37	aciclovir	final	7,4
12	2	26	zidovudina	inicial	8,2

4.5 Ensaio de permeabilidade com membrana intestinal de rã-touro

Segmentos iniciais e finais de intestino delgado de 5,0 cm foram retirados de rãs-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802), com peso entre 150,0 e 200,0 g, após jejum de 48 h antes do experimento, conforme ilustrado pela Figura 8. As rãs foram eutanasiadas, conforme procedimentos adotados no Ranário de Santa Bárbara, São Paulo conforme demonstrado nas Figuras 6 e 7. Os intestinos delgados foram retirados por laparotomia (abertura cirúrgica da cavidade abdominal). A eutanásia das rãs foi realizada 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 segmentos de intestino foram, imediatamente, lavados com solução de Ringer tamponada em pH 8,2 e pH 7,4, em temperatura ambiente (TRAPANI *et al.*, 2004) onde foram mantidos sob refrigeração até sua utilização, no máximo por 2 h quando foram cuidadosamente abertos e inseridos nas 3 câmaras de difusão vertical.



Figuras 6 e 7. Rãs touro no tanque de criação no Ranário Santa Bárbara D' oeste à direita e rãs touro já eutanasiadas e sem pele à esquerda.



Figura 8. Segmentos iniciais e finais de intestino delgado de rã touro com cerca de 5 cm.

- As câmaras de difusão apresentam um compartimento receptor e outro doador. O compartimento receptor foi preenchido com solução de Ringer tamponada e foi mantido a $37 \pm 0,5$ °C ou $26 \pm 0,5$ °C (, sob constante agitação, até estabilização. Cada fármaco foi colocado no compartimento doador em solução de concentração conhecida, juntamente com os padrões internos de permeação e, em intervalos pré-estabelecidos (0,5, 1, 1,5, 2,0, 3, 4, 5h.) foi feita a amostragem a partir do compartimento receptor. Segue ilustração do experimento montado na Figura 9.

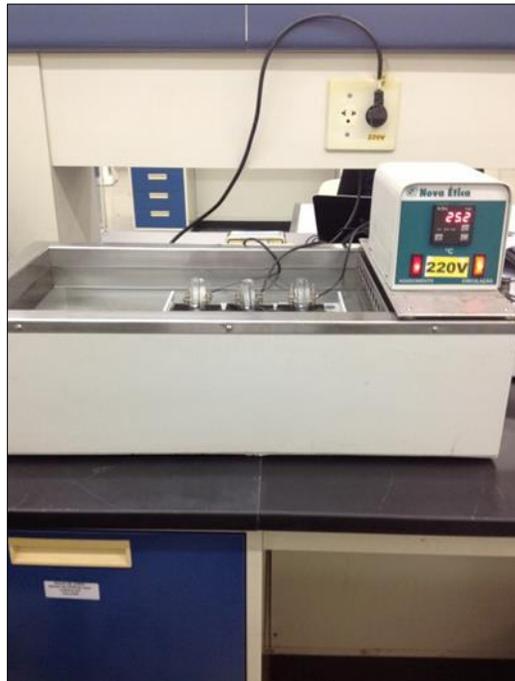


Figura 9. Experimento com três células de difusão vertical modificadas em banho-maria.

A integridade das membranas foi avaliada usando flordizina e metoprolol como padrões internos de baixa e alta permeação, respectivamente.

A quantidade de fármaco permeada pelo método que emprega membrana intestinal de rã foi determinada por eletroforese capilar e foram obtidos os perfis de permeação em função dos intervalos de amostragem.

A partir da determinação das quantidades permeadas de fármacos, foram calculados os principais parâmetros de permeação (BARRY, 1983; SHAH, 1994, TRAPANI *et al.*, 2004):

a) Porcentagem cumulativa de fármaco permeado através das membranas no período de 5 h (Q_t);

b) Os perfis de fármaco permeado *versus* tempo foram plotados em curvas semi-log, fornecendo as constantes de absorção aparente de primeira ordem por meio do cálculo dos coeficientes angulares das curvas (k_a).

4.6 Ensaios de permeabilidade com células Caco-2.

As células Caco-2 foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, EUA) e cultivadas em meio DMEM (*Dulbecc's Modified Eagle's Medium*) com alta concentração de glicose (4,5 g/L), 2,2 g/L de bicarbonato de sódio e suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 1 % de solução de aminoácidos não essenciais, 1 % de solução de glutamina 200mM e antibióticos (penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL). As células foram utilizadas entre os repiques de passagem 20 a 30. O banco celular foi mantido em cultivo em garrafas roux de 75 cm², sendo o meio substituído a cada dois dias. O subcultivo foi realizado quando a cultura atingia, no mínimo, 80 % de cobertura da garrafa (cerca de 3 a 4 dias), da seguinte maneira: o meio de cultivo foi aspirado e descartado, as células aderidas a parede da garrafa foram isoladas com 2 mL de solução de tripsina (0,25%) e EDTA (1 mM) e incubadas à 37 °C por 5 min.. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio DMEM e divididas na proporção 1:4 em novas garrafas contendo 15 mL de meio DMEM. As culturas

foram mantidas em incubadora sob temperatura de 37 °C, atmosfera constituída de 5 % de CO₂ e 90 % de umidade relativa.

4.6.1 Cultivo das células Caco-2

Para os ensaios de permeabilidade, as células foram transferidas para placas Transwell® contendo 12 poços, com suporte de policarbonato de 0,4 µm de poro e área de 1,12 cm². Nos ensaios, foi empregada suspensão de células com densidade igual a 5x 10⁴ cel/cm².

4.6.2 Monitoramento da integridade da membrana de células Caco-2

As monocamadas formadas pelas células em cultivo foram monitoradas quanto ao valor de resistividade elétrica utilizando o minivoltímetro Millicell ERS® Millipore. A determinação do valor de Resistência Elétrica Transepitelial (RET) foi realizada aos 10, 15 e 21 dias de cultivo e aos 30, 60, 90 e 120 min. durante a realização do experimento de permeabilidade.

4.6.3 Ensaio de permeabilidade

As células foram previamente lavadas com tampão Hanks contendo 200 mM de sais de HEPES (tampão de permeabilidade) com pH 7,4. As células foram mantidas com este tampão por 20 min. a 37 °C e a RET foi medida em cada membrana.

Foram consideradas aptas para o experimento apenas membranas que apresentaram valor de RET acima de 300 Ω/cm² como já padronizado anteriormente (GONÇALVES 2010).

Os experimentos foram iniciados com a adição de solução de fármaco na concentração de 10,0 µg/mL para aciclovir (pH 6,8) e zidovudina (pH 7,4) aos compartimentos apicais das placas Transwell®. Além disso, foram adicionadas também aos compartimentos apicais, as soluções dos padrões de permeabilidade: amoxicilina e metoprolol nas concentrações iniciais de 25 µg/mL e 5 µg/mL,

respectivamente. O pH do compartimento basolateral foi fixado em 7,4 e as placas foram mantidas sob agitação em agitador orbital a 37 °C (25 rpm). Foram realizadas coletas de 200 µL de tampão de permeabilidade fresco, mantido a 37 °C, com finalidade de manutenção do volume do meio no compartimento.

Os valores de Permeabilidade Aparente (P_{app}) em cm/s para os modelos foram determinados segundo as Equações 5:

$$P = \frac{\Delta Q}{\Delta t} \cdot \frac{1}{60} \cdot \frac{1}{A} \cdot \frac{1}{C_0}$$

(Equação 5)

$$P_{app} = \frac{V_R}{(A \times C_0)} \times \frac{dC}{dt}$$

(Equação 6)

Em que:

Para Equação 5:

A= área de exposição membrana (0,2 cm²)

Concentração inicial do fármaco na solução em contato com a membrana

Equação 6:

P_{app} = permeabilidade aparente

V_R = volume do compartimento receptor (basolateral) em (1,5) cm³

A= área do suporte de cultivo celular (1,12 cm²)

C_0 = concentração inicial adicionada no compartimento doador (apical)

dC/dt = diferencial da concentração em relação ao tempo do experimento.

4.7 Validação do método de quantificação por Eletroforese Capilar

4.7.1 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 μm de diâmetro interno e 50,2 cm de comprimento total (comprimento efetivo de 30 cm), revestidos externamente com poliimida, foram utilizados na realização dos experimentos.

As lavagens para o condicionamento de capilares novos foram realizadas por pressão de, aproximadamente, 20 psi, com passagem de hidróxido de sódio 1 mol/L, por 30 min., seguida pela passagem de água deionizada, por mais 30 min. e, por último, seguiu-se a passagem do eletrólito de corrida durante 30 min (3mL de SDS (dodecil sulfato de sódio), 2 mL de TBS (tetraborato de sódio), 3mL de etanol e 2 mL de H₂O Milli-Q). No início do dia, o capilar foi condicionado com hidróxido de sódio 1 mol/L por 10 min., seguido por água deionizada durante 10 min. e por 8 min. com o eletrólito de corrida. No intervalo entre as corridas, o capilar foi recondicionado com o eletrólito por 2 min. e, no término das análises, o capilar foi lavado com hidróxido de sódio 1 mol/L por 3 min. e água deionizada por mais 3 min., para a limpeza.

Para os testes, foi utilizada corrente de 80 e 85 μA , a detecção foi realizada a 214 nm e a injeção da amostra foi de 0,5 psi, por 10 s. A temperatura do sistema foi mantida a 25 °C.

4.7.2 Procedimento

O método analítico por Eletroforese Capilar (Monteiro, 2012) foi modificado para a análise dos fármacos zidovudina, aciclovir, flordizina e metoprolol conforme será detalhado no item 5.2.

Para validação foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade/especificidade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão (BRASIL, 2003; ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).

4.7.2.1 Seletividade/Especificidade

A membrana intestinal de rã-touro foi lavada e, em seguida, colocada em contato com solução de Ringer por, 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, zidovudina, metoprolol e flordizina a 1000 µg/mL em Ringer foi contaminada com a solução descrita anteriormente, resultando em outra que foi analisada posteriormente.

4.7.2.2 Linearidade

Foram preparadas e injetadas soluções dos fármacos 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 do fármaco 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 e 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 empregando regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

4.7.2.3 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 (α), conforme a equação a seguir:

$$LD = 3 \times \frac{S}{\alpha} \quad (\text{Equação 7})$$

Onde:

S: desvio padrão

α : inclinação da curva analítica

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

$$LQ = \frac{S}{\alpha} \times 10 \quad (\text{Equação 8})$$

Onde:

S: desvio padrão

α : inclinação da curva analítica

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

4.7.2.4 Precisão

A precisão do método foi avaliada através da repetibilidade ou precisão intra-dia e, para isso, utilizaram-se soluções nas concentrações de 0,6, 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, 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 referidas acima, 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, conforme a seguinte equação:

$$CV = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (\text{Equação 9})$$

Onde:

DP: desvio padrão

CMD: concentração média determinada

4.7.2.5 Exatidão

Para a avaliação da exatidão do método, soluções nas concentrações 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, foram injetadas em triplicata em um mesmo dia (exatidão intra-dia) e em dois dias consecutivos (exatidão inter-dia). Os resultados das áreas obtidas com essas soluções foram comparadas com os valores teóricos, obtendo-se assim, a exatidão do método (%), por meio da seguinte equação:

$$E\% = \frac{C}{C_0} \times 100 \quad (\text{Equação 10})$$

Onde:

C = média das concentrações determinadas experimentalmente;

C₀ = concentração teórica inicial

4.8 Validação do método de quantificação por HPLC

4.8.1 Preparo das soluções-padrão da curva analítica

As soluções padrão das curvas de calibração foram preparadas a cada dia de análise a partir da solução estoque na concentração de 1,0 mg/mL, recentemente preparada. A solução estoque foi preparada a partir da pesagem de 10 mg para o aciclovir e para zidovudina, seguida de solubilização em balão volumétrico calibrado de 10 mL, utilizando-se como solvente água Milli-Q. Para auxiliar na solubilização no caso do aciclovir, tornou-se necessária a utilização do banho ultrassônico por 20 min.. A partir da solução estoque foram preparadas as soluções padrão por diluições sucessivas em solução tampão Hanks até atingir as seguintes concentrações para construção da curva analítica: 250 ng/mL; 500 ng/mL; 1.000 ng/mL; 2.500 ng/mL; 5.000 ng/mL e 10.000 ng/mL.

4.8.2 Preparo das soluções padrão

As soluções do padrão de baixa (CQB), média (CQM) e alta concentrações (CQA) para o aciclovir e zidovudina foram preparadas a partir da solução estoque, conforme procedimento descrito no item anterior. Os respectivos valores de concentração foram iguais a 500 ng/mL; 4000 ng/mL; 8000 ng/mL. Após o preparo, essas soluções foram aliqüotadas para frascos de vidro âmbar e armazenadas sob refrigeração até o momento das injeções.

4.8.3 Preparo das amostras dos estudos de permeabilidade

Para análise das amostras provenientes dos estudos de permeabilidade, optou-se pela injeção direta no sistema cromatográfico, sem necessidade de procedimentos de extração ou purificação.

4.8.4 Parâmetros de validação

Os parâmetros de validação adotados são os mesmos apresentados para validação do método de eletroforese capilar citados no item 4.7.2 bem como as fórmulas e métodos de cálculos adotados.

4.8.5 Seletividade e Estabilidade de curta duração

Apenas os parâmetros de seletividade e estabilidade foram realizados diferente da descrição apresentada para o método de rã-touro devido a diferenças nos materiais envolvidos. Sendo o seguinte procedimento para seletividade: a especificidade do método foi avaliada por meio da análise de seis amostras de solução tampão de Hanks em comparação com outra solução contendo aciclovir e zidovudina, a fim de que possíveis interferências provenientes do tampão fossem avaliadas.

Para determinação do parâmetro de estabilidade foram utilizadas 3 amostras de padrão de controle de qualidade em três concentrações (baixa, média e alta), mantidas a temperatura ambiente durante 6 horas. A concentração dos analitos nas amostras de padrão de controle de qualidade foi comparada aos resultados de amostras recém preparadas. Os resultados foram comparados aqueles obtidos da análise de amostras recém preparadas.

4.9 Análise estatística dos resultados obtidos

Os resultados de coeficiente de permeabilidade aparente (Papp) obtidos com os métodos de permeação por membrana intestinal de rã e pelo modelo de células Caco-2 foram comparados utilizando teste t com 2 graus de liberdade, para duas amostras, considerando variâncias desiguais usando software Minitab v.16 e pôde ser visto por meio da análise do intervalo de confiança obtido para os resultados de Papp para os dois fármacos no modelo de células Caco-2 quais os valores do coeficiente de permeabilidade da rã touro eram considerados estatisticamente equivalentes quando estavam dentro do intervalo calculado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização histológica do epitélio intestinal da *Rana catesbeiana*

A literatura carece de informações sobre a divisão do intestino de rãs, vilosidades, ou capacidade absorptiva. Na maioria dos trabalhos o intestino dos anfíbios é dividido em delgado e grosso, cuja porção anterior é denominada de duodeno por Duellman e Trueb (1986) e por George e colaboradores (1998). Outros autores dividem o intestino do anfíbio em região anterior, posterior e cólon (SAIDANE *et al.*, 1997).

Desse modo, considerando a falta de publicações sobre a capacidade absorptiva e/ou caracterização histológica das diferentes porções do intestino de rãs, a importância deste ensaio tornou-se relevante para o presente estudo uma vez que a área utilizada no experimento de permeação com células de Franz é muito pequena, cerca de 0,2 cm². Além disso, como não se utilizam os intestinos inteiros, é necessário comparar as diferentes porções e verificar as diferenças para a padronização da secção a ser empregada nos experimentos de permeação.

Adicionalmente, é conveniente comparar morfologicamente os tecidos intestinais de humanos e rãs uma vez que se pretende adotar o modelo para estimar a permeabilidade humana de substâncias.

Nas Figuras 10 e 11 são apresentadas representações histológicas da membrana de intestino delgado humano, com a organização da vilosidade e o corte da extremidade de um vilão.

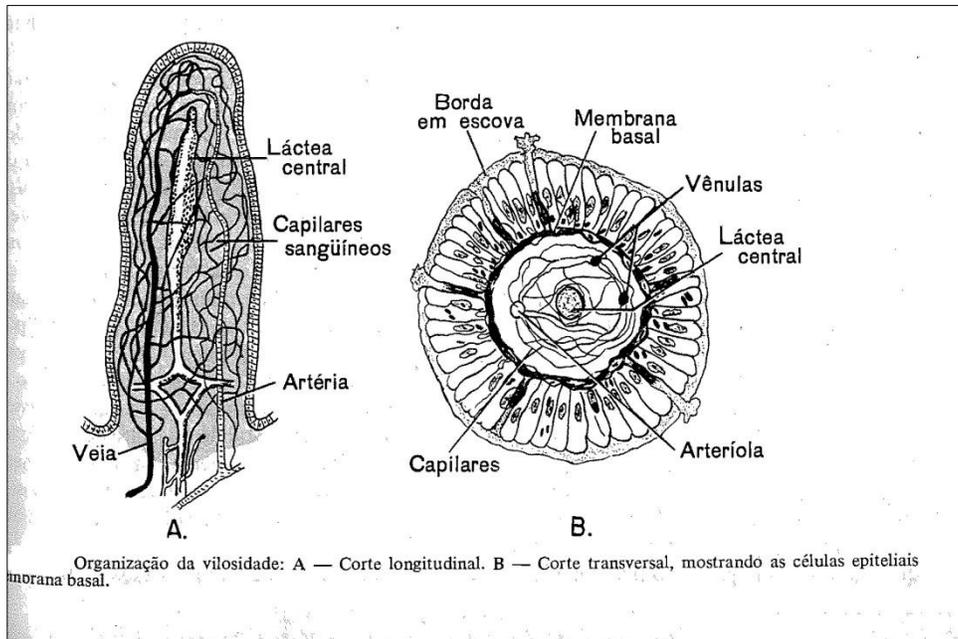


Figura 10. Organização da vilosidade do intestino delgado humano (Guyton, 1997).

As células epiteliais intestinais humanas se caracterizam pela borda em escova que consiste em aproximadamente 600 microvilosidades com 1 μm de comprimento e 0,1 μm de diâmetro (GUYTON, 1997).

Os vilos ou vilosidades intestinais são evaginações da membrana mucosa que se projetam na luz do intestino delgado. Seu comprimento varia entre 0,5 e 1,5 mm. São de forma foliada no duodeno e no íleo assumem um aspecto digitiforme (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1990).

As células absortivas apresentam microvilos que aumentam sua superfície de absorção. São colunares prismáticas e se caracterizam pela presença de uma condensação em sua superfície apical, a cutícula. Ao microscópio, essa cutícula se apresenta como uma camada de microvilos densamente agrupados. Estima-se que cada uma dessas células tenha em média 3000 microvilos e que 1 mm^2 de mucosa contenha 200 milhões de microvilos (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1990).

A seguir, na Figura 11 é apresentada a extremidade de um vilos humano e a Figura 12 focaliza a extremidade de um vilos do intestino delgado de *Rana*

catesbeiana demonstrando a semelhança estrutural entre as microvilosidades e as cutículas.

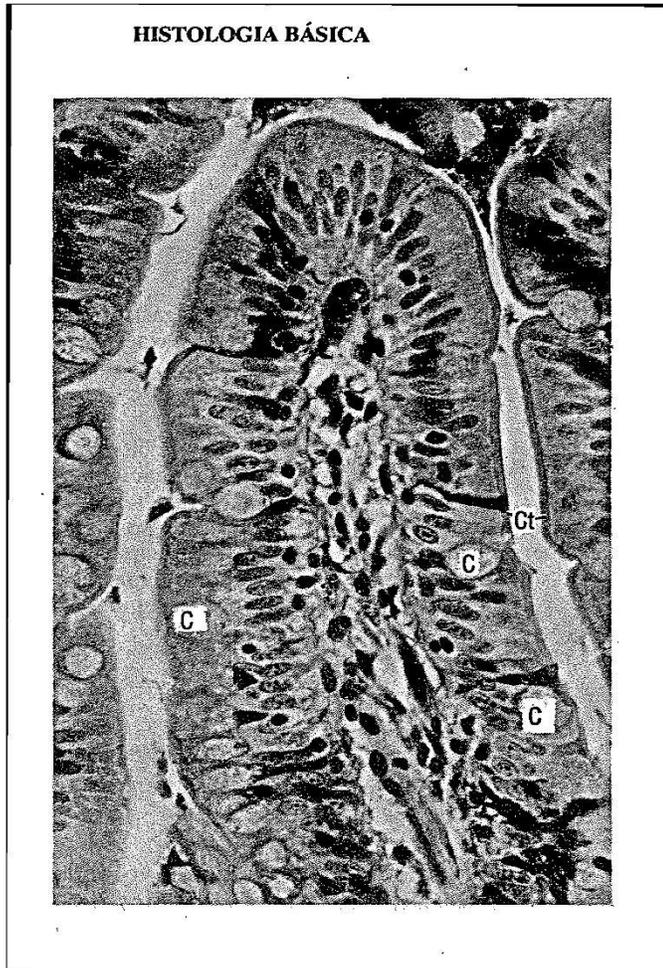


Figura 11. Fotomicrografia de corte da extremidade de um vilão de íleo humano. (C) representa o eixo conjuntivo vascular do vilão e seu epitélio de revestimento intercalado com células calciformes. A direita observa-se nitidamente a cutícula (Ct) que aparece, ao microscópio, como microvilos. Coloração hematoxilina e eosina (HE) aumento de 450 vezes (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1990).

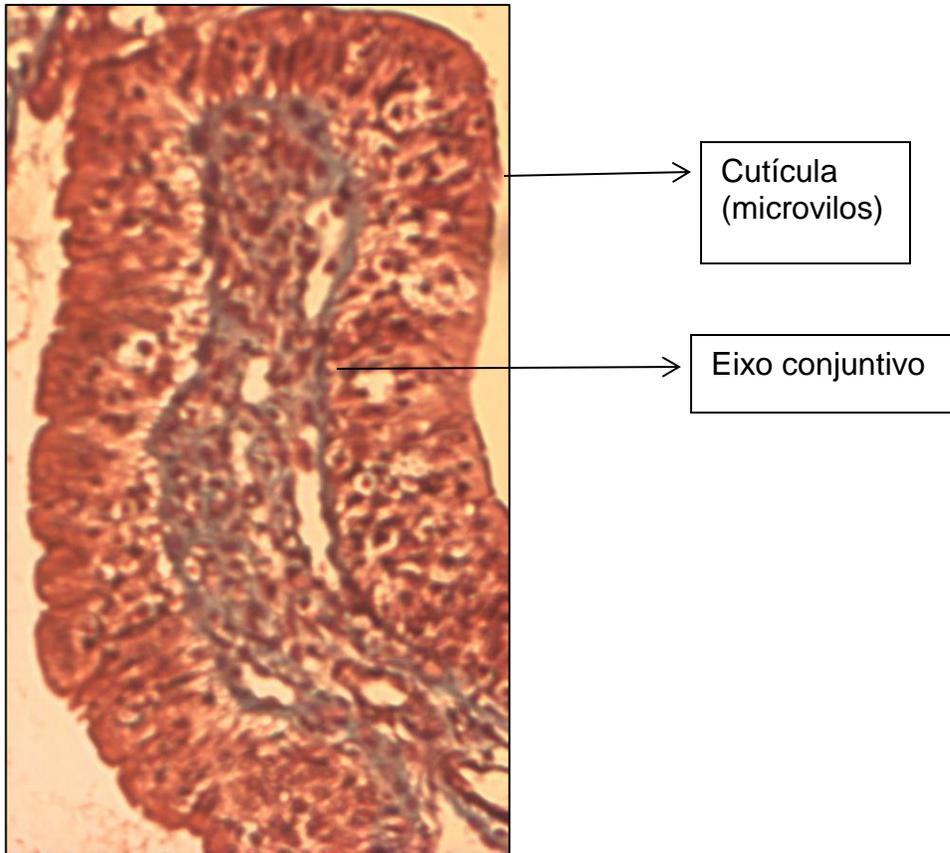


Figura 12. Corte longitudinal do segmento inicial do intestino delgado de *Rana catesbeiana* focalizando a extremidade de um vilo (Microscópio ótico Olympus BX50, corante tricrômico de Mallory, aumento de 100X).

Nas Figuras de 13 a 21, são apresentados os resultados da avaliação histológica de cortes longitudinais e transversais de intestino de rã-touro (*Rana catesbeiana*) nas diferentes porções estudadas, realizadas em microscópio ótico Olympus BX50, com aumento de 12,5 a 40X.



Figura 13. Corte transversal do segmento inicial do intestino delgado de *Rana catesbeiana* demonstrando as vilosidades (Corante tricrômico de Mallory, aumento de 12,5X).

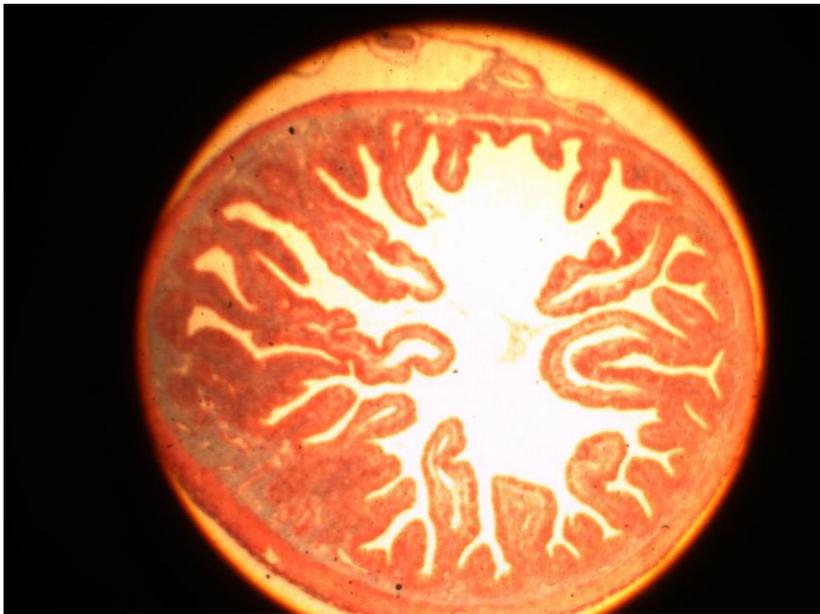


Figura 14. Corte transversal do segmento médio do intestino delgado de *Rana catesbeiana* demonstrando as vilosidades (Corante tricrômico de Mallory, aumento de 12,5X).

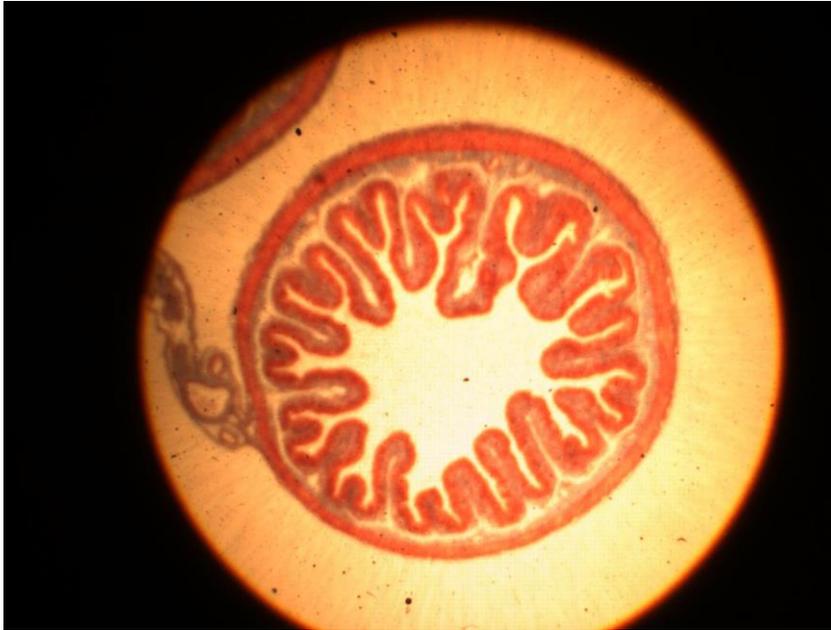


Figura 15. Corte transversal do segmento final do intestino delgado de *Rana catesbeiana* demonstrando as vilosidades (Corante tricrômico de Mallory, aumento de 12,5X).

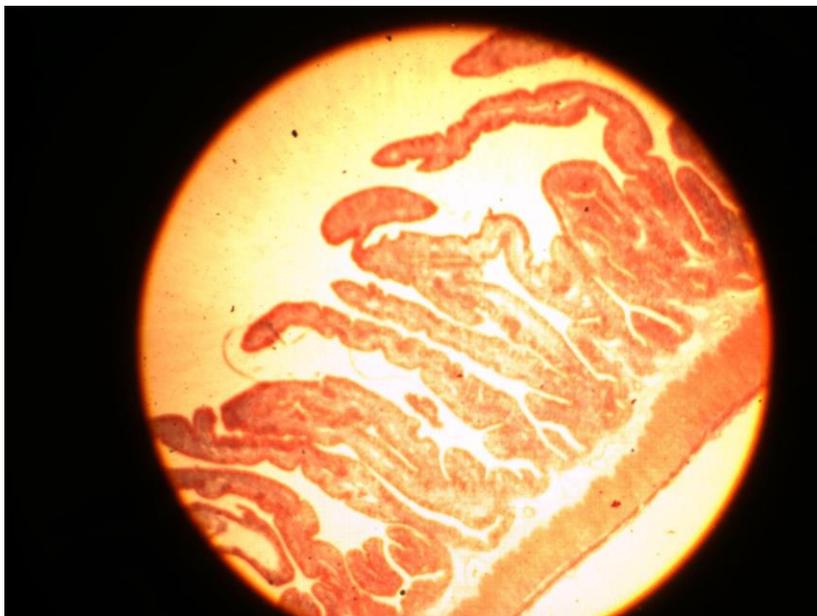


Figura 16. Corte longitudinal do segmento inicial do intestino delgado de *Rana catesbeiana* demonstrando as vilosidades (Corante tricrômico de Mallory, aumento de 12,5X).

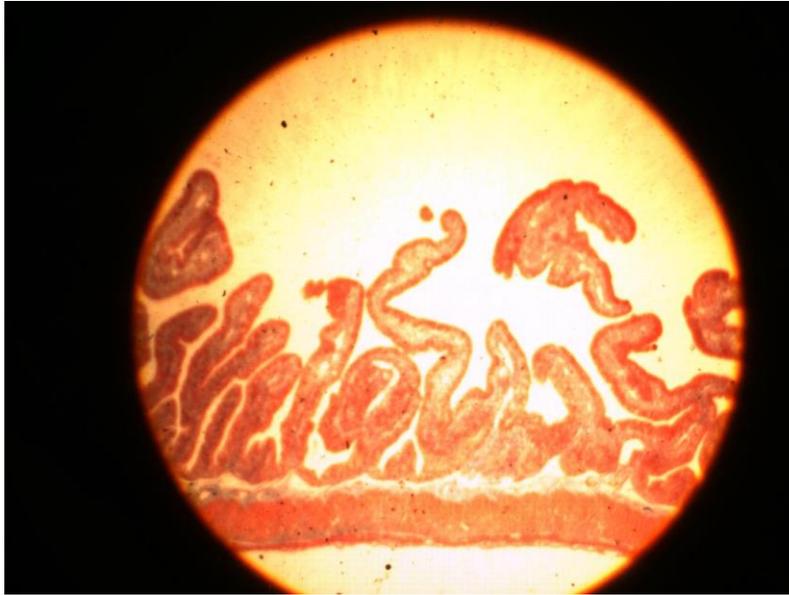


Figura 17. Corte longitudinal do segmento médio do intestino delgado de *Rana catesbeiana* demonstrando as vilosidades (Corante tricrômico de Mallory, aumento de 12,5X).



Figura 18. Corte longitudinal do segmento final do intestino delgado de *Rana catesbeiana* demonstrando as vilosidades (Corante tricrômico de Mallory, aumento de 12,5X).

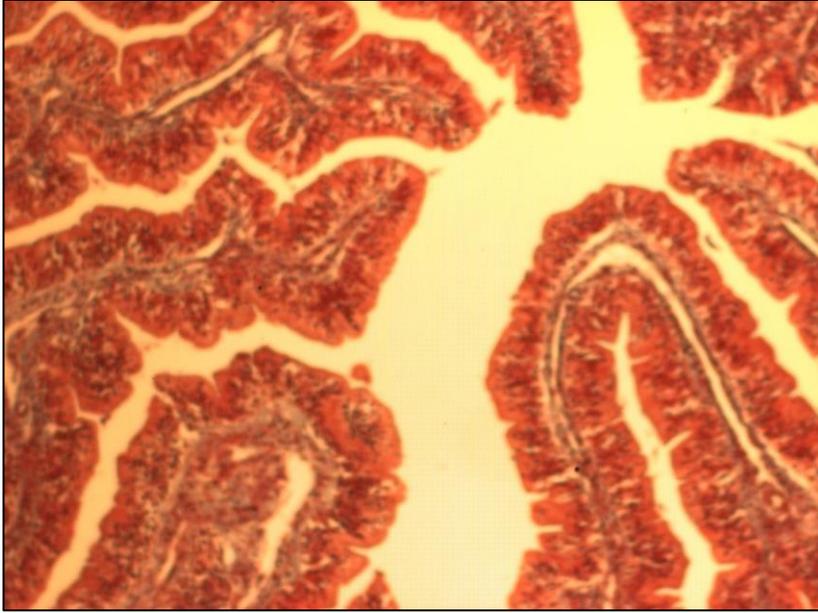


Figura 19. Corte transversal focalizando o lúmen do segmento inicial do intestino delgado de *Rana catesbeiana* demonstrando as vilosidades (Corante tricrômico de Mallory, aumento de 40X).

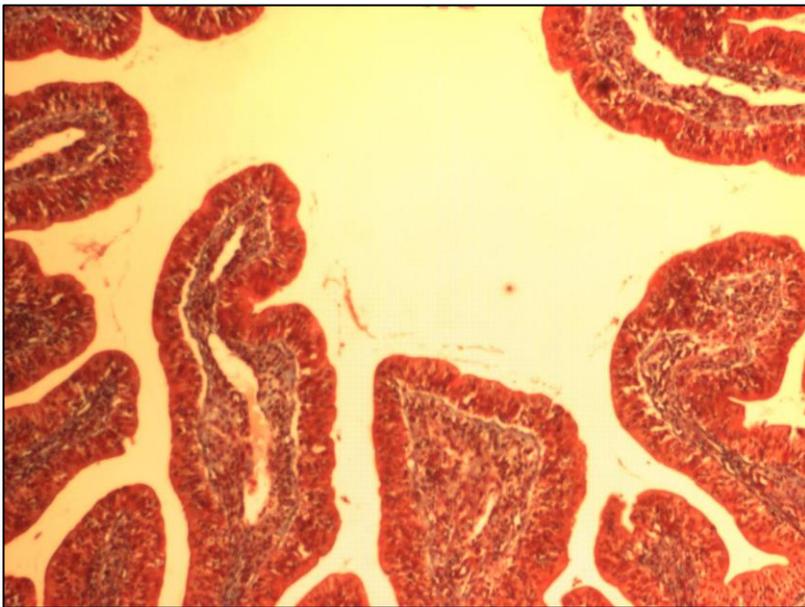


Figura 20. Corte transversal focalizando o lúmen do segmento médio do intestino delgado de *Rana catesbeiana* demonstrando as vilosidades (Corante tricrômico de Mallory, aumento de 40X).

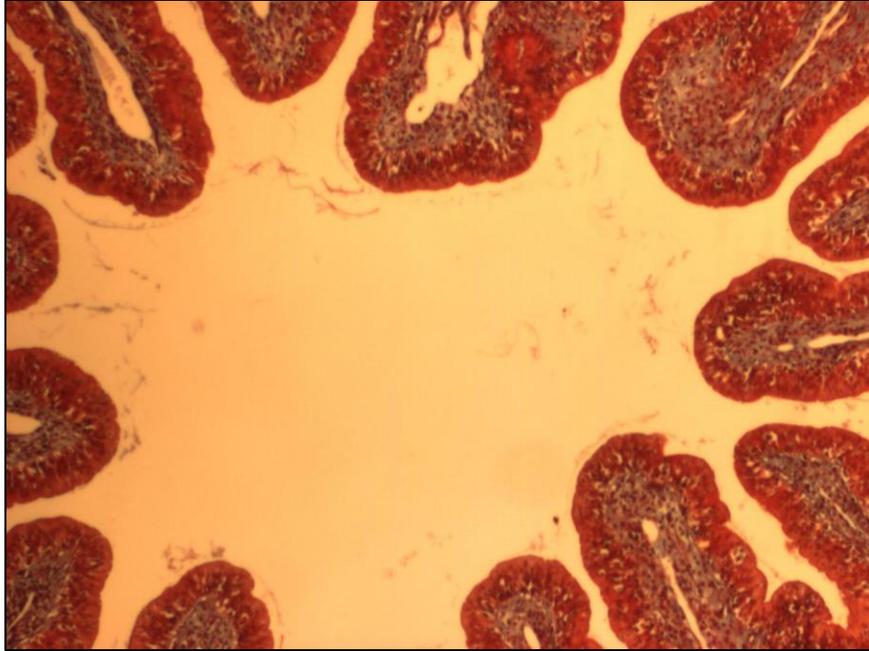


Figura 21. Corte transversal mostrando o lúmen do segmento final do intestino delgado de *Rana catesbeiana* demonstrando as vilosidades (Corante tricrômico de Mallory, aumento de 40X).

Embora tenham sido feitas colorações nos tecidos intestinais com hematoxilina-eosina (HE) e corante tricrômico (mistura de solução de fucsina, ácido fosfotúngstico, ácido fósforo molíbdico e azul de anilina aquosa) de Mallory, estão apresentados apenas os resultados das fotomicrografias coradas por Mallory uma vez que esse corante permitiu uma diferenciação melhor entre tecidos, o que proporcionou melhores imagens.

O diâmetro do segmento intestinal no corte transversal inicial (Figura 13) é maior que na porção média (Figura 14), sendo que a porção final apresenta o menor diâmetro (Figura 15). Realizados os cálculos dos diâmetros por meio do programa Image-Pro-Plus-The Proven Solution. Versão: 4.5.1.29 for Windows 98/NT/ME/2000/XP Prof. Serial number: 41n50000-41229 Copyright 1993-2003 Media Cybernetics, Inc., foi possível comprovar esta informação. O diâmetro médio obtido para corte transversal do segmento inicial na Figura 13 foi de 3.860 μm , o diâmetro do segmento médio, na Figura 14, foi de 3.702 μm e o diâmetro do segmento final do intestino, na Figura 15, foi de 2.727 μm . Devido aos diâmetros do segmento inicial e médio não apresentarem diferenças significativas em relação ao comprimento e área total da secção será utilizado no planejamento experimental apenas a secção inicial e a final do intestino delgado de rã. Por outro lado, o lúmen intestinal é menor na porção inicial do intestino devido ao grande comprimento dos vilos aumentando na porção média e sendo maior na porção final onde os vilos apresentam menor comprimento.

Considerando que as microvilosidades são constituintes das células absorptivas que aumentam a superfície de absorção e estão localizadas nas bordas apicais estriadas dos vilos ou vilosidades, pode-se inferir que quanto mais longos os vilos, maior número de microvilosidades e, portanto, maior a capacidade de absorção de uma porção intestinal. O mesmo se pode dizer a respeito da quantidade de vilosidades.

Diante dos cortes histológicos obtidos foi constatado que o segmento inicial do intestino delgado da *Rana catesbeiana* é o que apresenta maior quantidade de vilosidades (total de 30 vilos em área aproximada de 11,69 mm^2 ou 2,5 vilos/ mm^2) sendo estes mais compridos; seguido pelo segmento médio (26 vilos em área

aproximada de 10,75 mm² ou 2,41 vilos/ mm²) e o segmento final é o que apresenta vilos irregulares (22 vilos em área aproximada de 5,83 mm² ou 3,77 vilos/ mm²) e de menor comprimento conforme pode ser observado nas Figuras 13, 14 e 15, respectivamente.

Espera-se, portanto, que ocorra maior absorção por transporte passivo dos fármacos no segmento inicial, pois este apresenta maior superfície de absorção, seguida pelo segmento médio do intestino. Similarmente, menor absorção é esperada para a porção terminal do intestino uma vez que essa secção apresenta menores e irregulares vilosidades e conseqüentemente menos microvilosidades, o que pode ocasionar uma menor superfície de absorção, no caso destes fármacos sujeitos apenas ao processo de absorção por difusão passiva.

Segundo Artursson e colaboradores, 1993, em geral, nos estudos de permeabilidade intestinal, a permeabilidade decai na seguinte ordem: jejuno > ileum > colon e o coeficiente de permeabilidade é mais baixo nos modelos *in vitro* do que nos segmentos correspondentes de intestino humano *in vivo*. Foi o que ocorreu nos resultados obtidos pelos autores para permeabilidade *in vitro* usando segmentos intestinais de rato e células Caco-2. No entanto, os perfis de permeabilidade foram similares aos resultados *in vivo* e foi obtida uma correlação linear aceitável. De acordo com os autores, os fatores que podem contribuir para essa diferença são a ausência de fluxo sanguíneo, a motilidade reduzida e a espessura da camada mucosa no caso dos segmentos de rato e ausência do eixo de criptas e vilosidades, baixa taxa de renovação celular e ausência de células globosas em células Caco-2.

5.2 Validação do método de quantificação por Eletroforese Capilar

5.2.1 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.

Inicialmente, foi empregado o eletrólito desenvolvido por MONTEIRO, 2012 constituído de 20 mM tetraborato de sódio (pH 9,2), 30 mM dodecil sulfato de sódio em solução etanólica 10% (v/v). Porém, devido à dificuldade na reprodutibilidade para a separação dos fármacos aciclovir e zidovudina novos testes para esse método com diferentes concentrações de etanol foram realizados.

No eletroferograma da Figura 22 foi ensaiada a voltagem de 20 kV mantendo as demais condições originais do método mas, como pode ser observado, não houve separação de todos componentes da amostra.

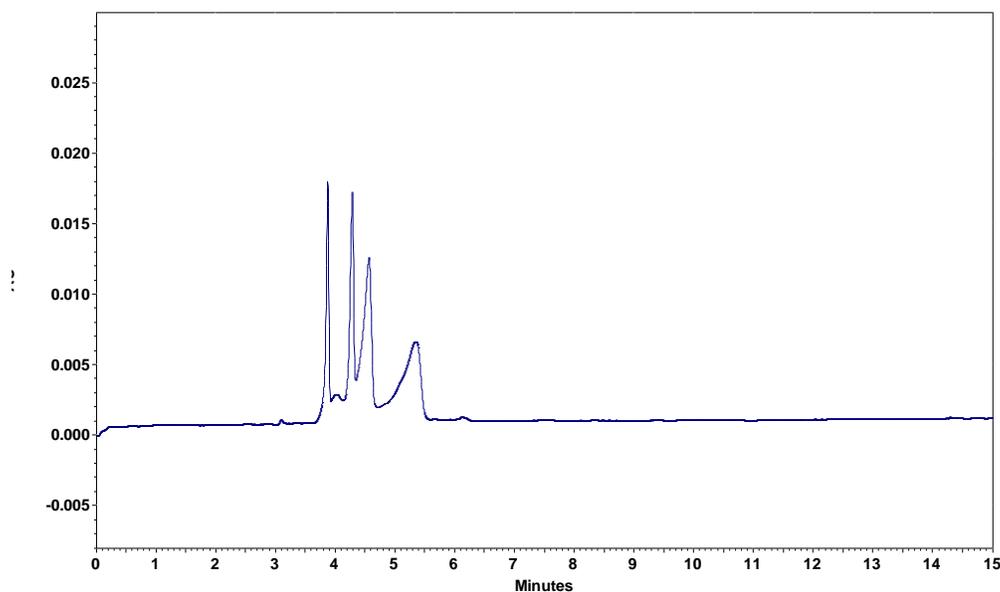


Figura 22. Eletroferograma de MECK de aciclovir, zidovudina, floridizina e metoprolol em Ringer. Capilar: 75 μ m, 40 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9,2), 10% etanol (v/v); voltagem: 20kV; 25 °C; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/10 s; λ =214 nm.

Conforme demonstrado na Figura 23 a corrente foi modificada para 80 μ A, mas também não houve separação adequada.

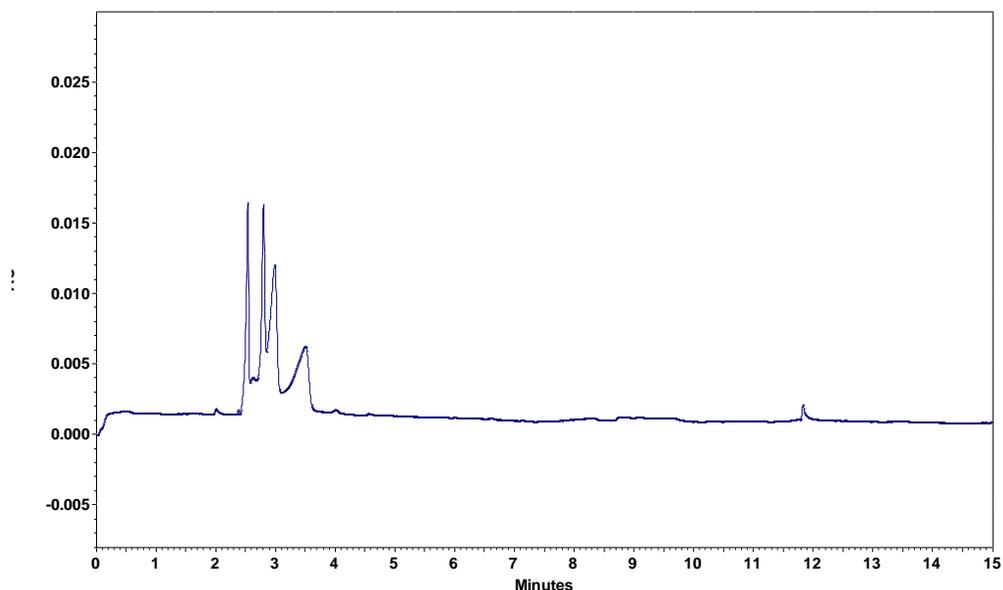


Figura 23. Eletroferograma de MECK de aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol em Ringer. Capilar: 75 μ m, 40 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9,2), **10% etanol (v/v)**; corrente: **80 μ A**; 25 °C; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/10 s; $\lambda=214$ nm.

No caso da Figura 24 foi então variada a concentração de etanol, com redução para 5%, entretanto essa modificação prejudicou ainda mais a separação.

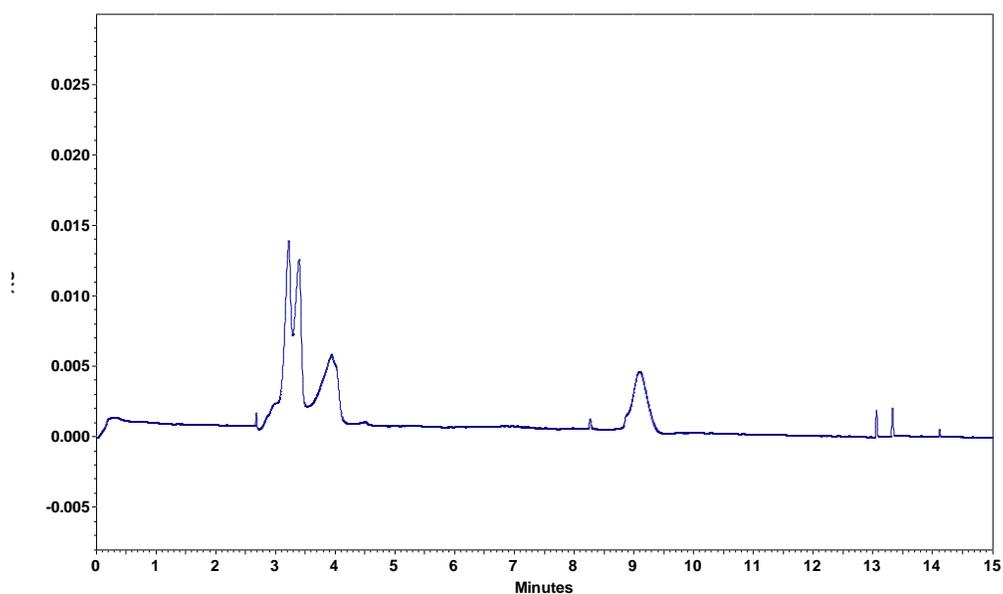


Figura 24. Eletroferograma de MECK de aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol em Ringer. Capilar: 75 μ m, 40 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH

9,2), **5% etanol (v/v)**; corrente: **80 μ A**; 25 °C; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/10 s;
 $\lambda=214$ nm.

Na Figura 25, optou-se pela concentração de 15% de etanol havendo separação incompleta.

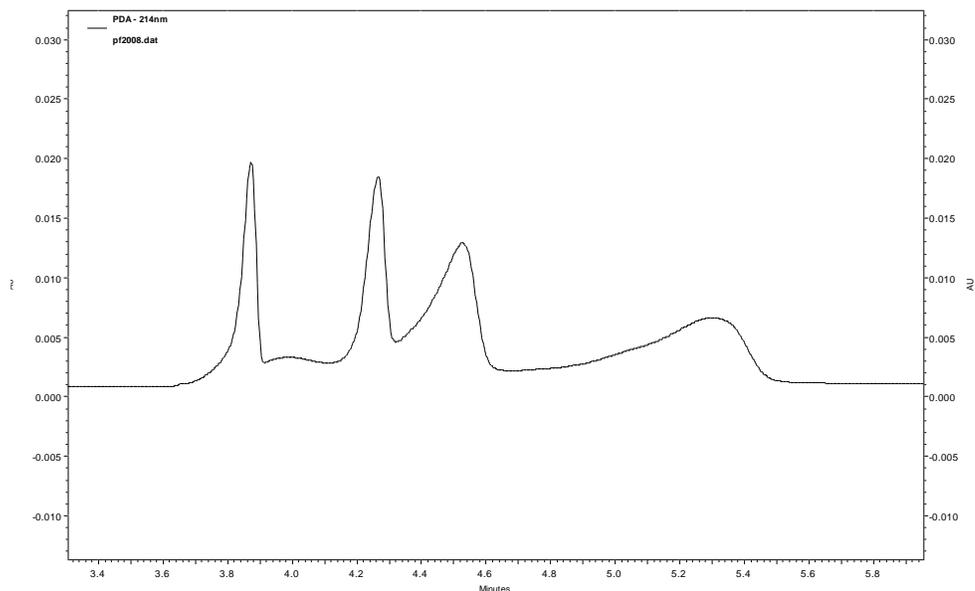


Figura 25. Eletroferograma de MECK de aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol em Ringer. Capilar: 75 μ m, 40 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9,2), **15% etanol (v/v)**; corrente: **80 μ A**; 25 °C; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/10 s; $\lambda=214$ nm.

Na Figura 26 foi ensaiada concentração de 25% de etanol e ocorreu separação, porém com cauda para dois dos componentes.

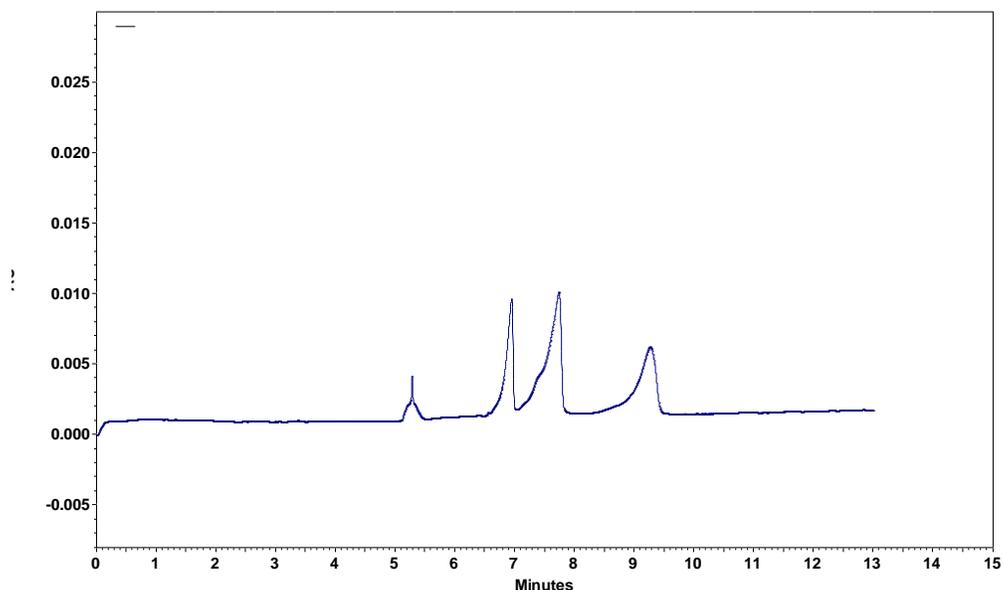


Figura 26. Eletroferograma de MECK de aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol em Ringer. Capilar: 75 μ m, 40 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9,2), **25% etanol (v/v)**; corrente: **80 μ A**; 25 °C; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/10 s; $\lambda=214$ nm.

Na Figura 27 também foi ensaiada a concentração de 25 % de etanol, porém usando corrente de 25 Kv (utilizando a voltagem), piorando a separação.

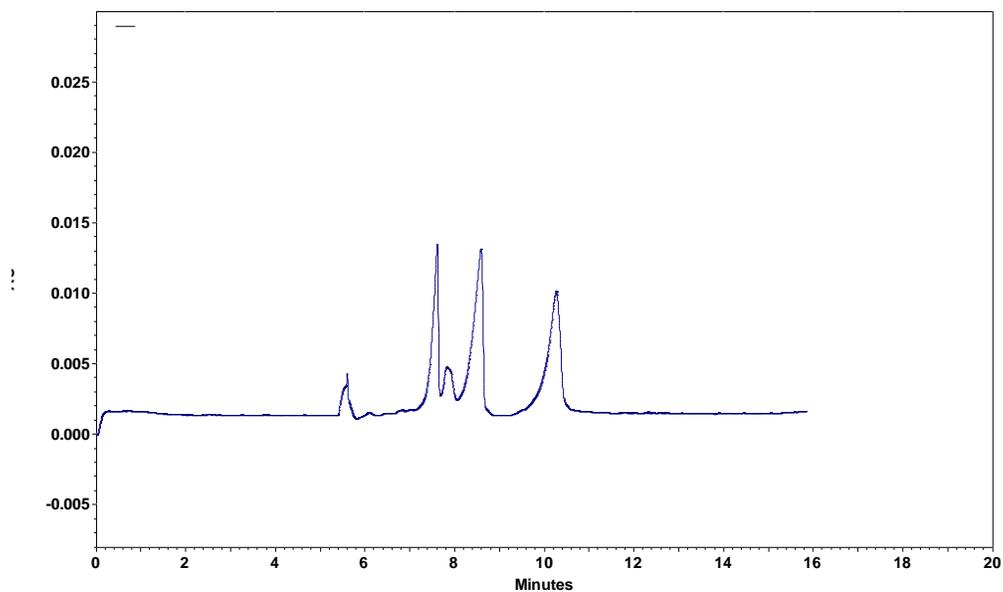


Figura 27. Eletroferograma de MECK de aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol em Ringer. Capilar: 75 μ m, 40 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH

9,2), **25% etanol (v/v)**; **voltagem: 25 kV**; 25 °C; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/10 s; $\lambda=214$ nm.

Na Figura 28 foi modificado comprimento efetivo do capilar para 30 cm até o detector e, com a corrente aumentada para 85 μ A, os fármacos foram separados em 11 min..

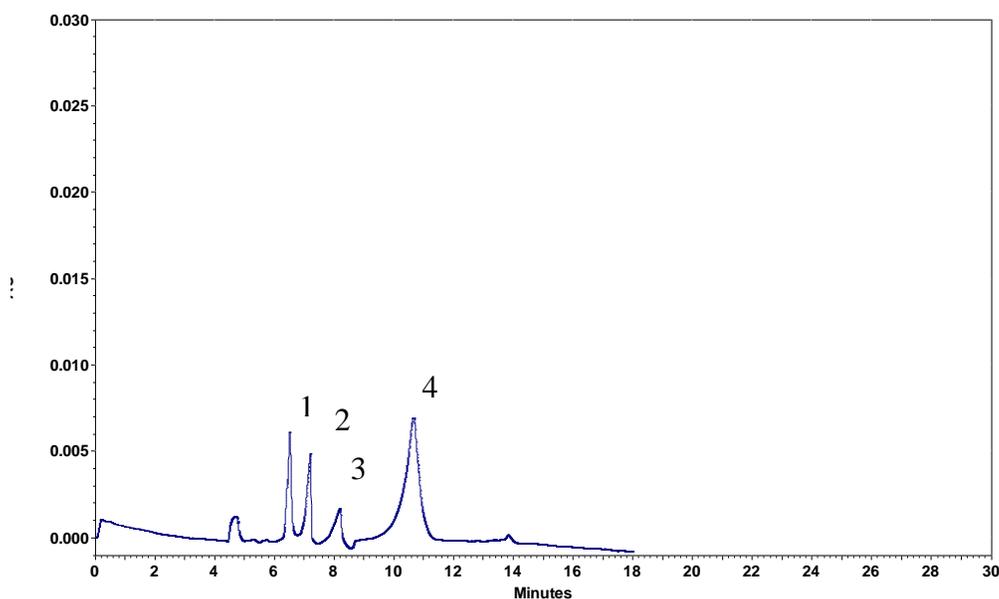


Figura 28. Eletroferograma de MECK de metoprolol, zidovudina, aciclovir e floridizina em Ringer. Capilar: 75 μ m, **30 cm**; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9,2), **30 % etanol (v/v)**; **corrente: 85 μ A**; 25 °C; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/10 s; $\lambda=214$ nm.

5.3 Determinação dos parâmetros de 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 atenda aos atributos preconizados no Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da Anvisa e no Validation of Analytical Procedures do ICH, a fim de

garantir a confiabilidade dos resultados obtidos pela aplicação do método (ANVISA, 2003; ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).

5.3.1 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 biológica não interferiu na separação dos analitos, apenas aumentou em 1 minuto o tempo da corrida, por isso a seletividade do método foi comprovada, conforme mostrado na Figura 29.

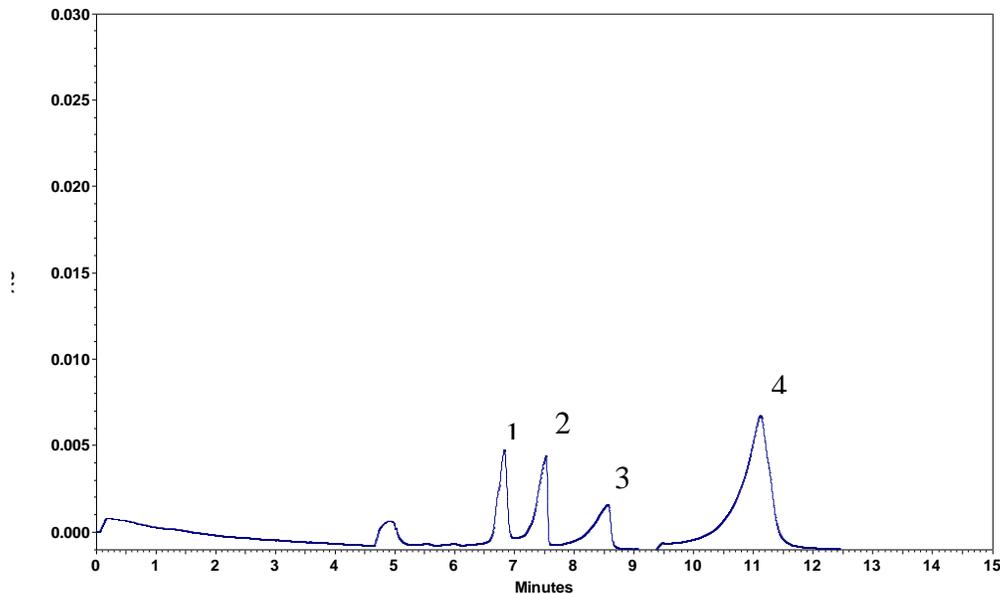


Figura 29. Eletroferograma de MECK de metoprolol (1), zidovudina (2), aciclovir (3), floridizina (4) em Ringer, na presença da membrana biológica. Capilar: 75 μ m, 30 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9.2), 30% (v/v) etanol; corrente: 85 μ A ; 25 °C; injeção hidrodinâmica: 0.5 psi/10 s; λ =214 nm.

5.3.2 Linearidade

O método apresentou linearidade nas faixas de concentrações estudadas para o aciclovir, a zidovudina, a floridizina e o metoprolol e as equações de reta foram calculadas, conforme resultados apresentados na Tabela 1 e nas Figuras 30 a 33. Os coeficientes de determinação foram: 0,99989999 para zidovudina, 0,9967447 para aciclovir, 0,99969995 para floridizina e 0,99523866 para metoprolol, o que comprova boa linearidade do método.

Tabela 1. Resultados estatísticos obtidos por meio da regressão linear a partir das curvas analíticas para a quantificação de aciclovir, zidovudina, floridizina e metoprolol em solução de Ringer.

Fármaco	Equação reta	Coefficiente angular (a)	Coefficiente linear (b)	Coefficiente de determinação (R^2)	Coefficiente de correlação (r)
Zidovudina	$y = 35806x - 233,6$	35806	-233,6	0,9998	0,99989999
Aciclovir	$y = 11848x + 653,5$	11848	653,5	0,9935	0,9967447
Floridizina	$y = 3823,5x + 19,5$	3823,5	19,5	0,9994	0,99969995
Metoprolol	$y = 2472,4x - 7405,1$	2472,4	7405,1	0,9905	0,99523866

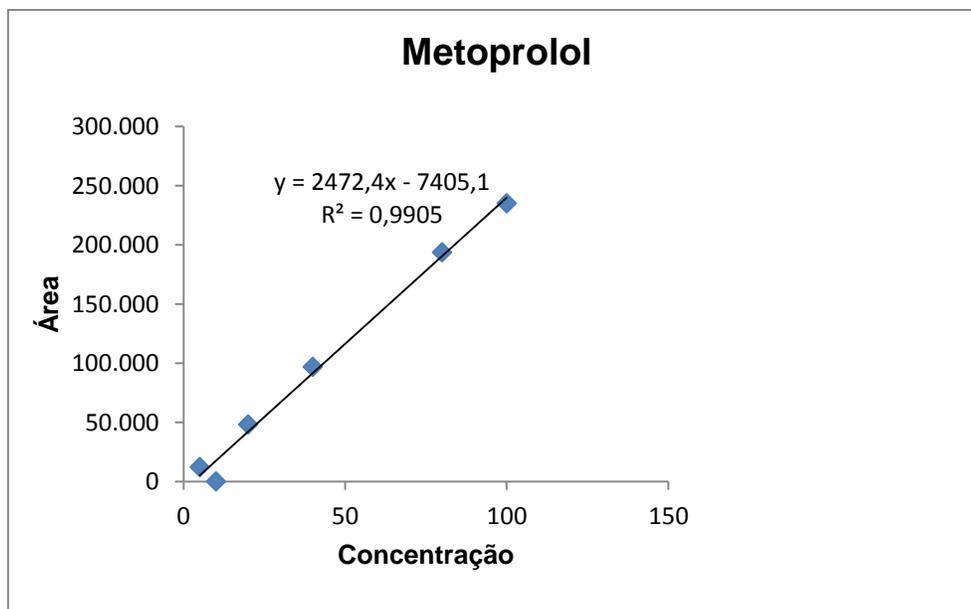


Figura 30. Curva analítica do metoprolol em solução de Ringer. Capilar: 75 μ m, 30 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9.2), 30 % (v/v) etanol; corrente: 85 μ A ; 25 °C; injeção hidrodinâmica: 0.5 psi/10 s; λ =214 nm.

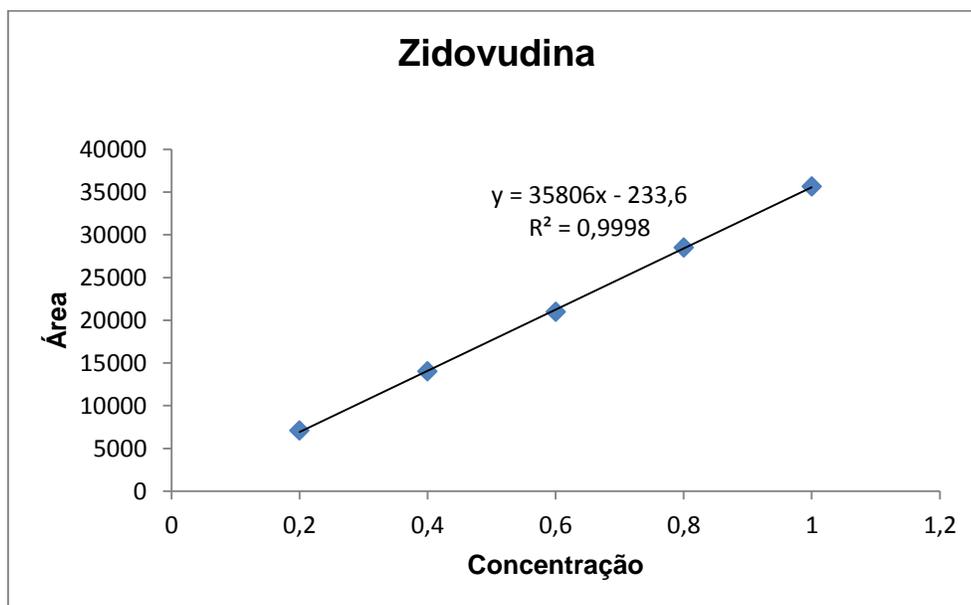


Figura 31. Curva analítica da zidovudina em solução de Ringer. Capilar: 75 μ m, 30 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9.2), 30 % (v/v) etanol; corrente: 85 μ A ; 25 °C; injeção hidrodinâmica: 0.5 psi/10 s; λ =214 nm.

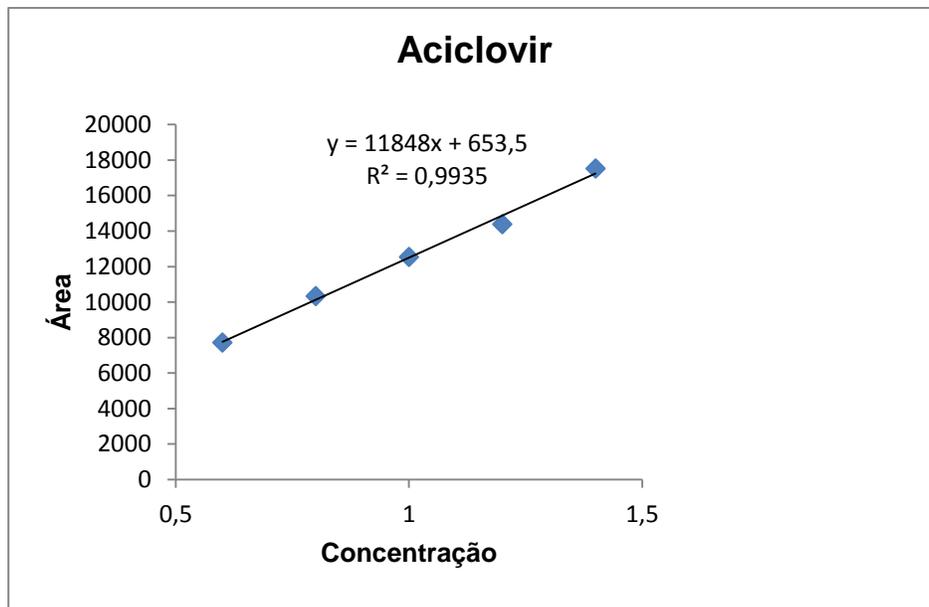


Figura 32. Curva analítica do aciclovir em solução de Ringer. Capilar: 75 μ m, 30 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9.2), 30 % (v/v) etanol; corrente: 85 μ A; 25 °C; injeção hidrodinâmica: 0.5 psi/10 s; λ =214 nm.

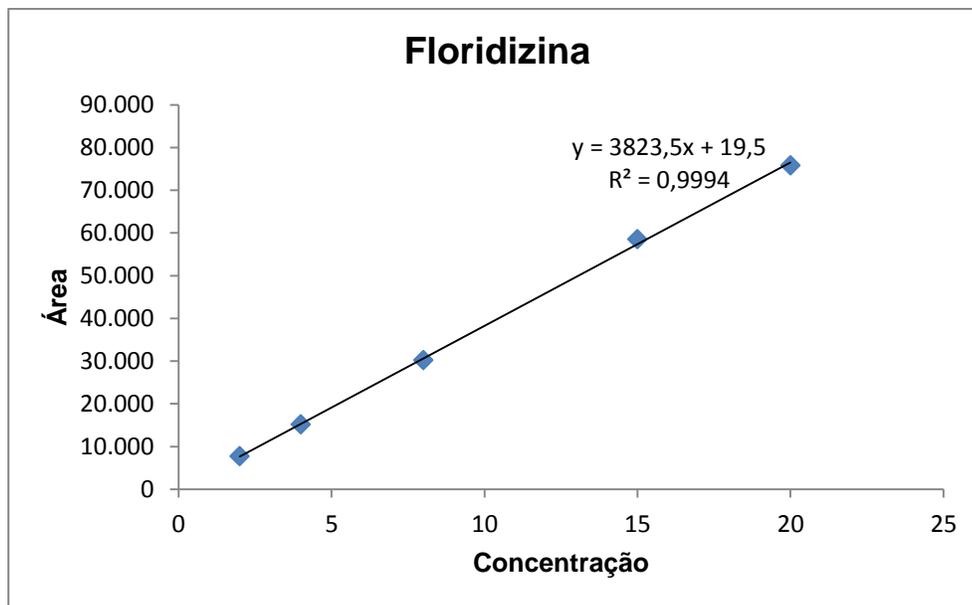


Figura 33. Curva analítica da floridizina em solução de Ringer. Capilar: 75 μ m, 30 cm; tampão: 30 mM SDS, 20 mM TBS (pH 9.2), 30 % (v/v) etanol; corrente: 85 μ A; 25 °C; injeção hidrodinâmica: 0.5 psi/10 s; λ =214 nm.

5.3.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Tabela 2. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos na validação do método analítico para quantificação de aciclovir, zidovudina, flordizina e metoprolol utilizando a técnica de cromatografia eletrocinética micelar (MEKC).

Limites ($\mu\text{g/mL}$)	Flordizina	Aciclovir	Zidovudina	Metoprolol
Detecção	0,67	0,22	0,07	5,0
Quantificação	2,0	0,6	0,2	2,0

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

5.3.4 Precisão

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

Fármacos	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)	
		Intra-dia	Inter-dia
Zidovudina	0.3	4.04	4.90
	0.6	1.91	3.05
	0.9	2.55	1.87
Aciclovir	0.6	1.04	3.83
	0.95	4.52	3.80
	1.3	2.42	4.07
Flordizina	4.5	2.44	3.19
	11.3	0.59	1.69
	18.0	0.82	0.84
Metoprolol	26.7	1.43	1.10
	58.4	0.43	0.31
	90.0	0.27	0.28

Valores de coeficiente de variação (CV) menores que 5% são considerados aceitáveis (ANVISA, 2003; ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010). Dessa forma, os valores obtidos e apresentados na Tabela 3 demonstram a precisão do método nos intervalos de concentração ensaiados.

5.3.5 Exatidão

Tabela 4. Exatidão obtida para aciclovir, zidovudina, floridizina e metoprolol a partir da determinação de três diferentes concentrações em um mesmo dia (intra-dia) e em dois dias consecutivos (inter-dia) utilizando a técnica de cromatografia eletrocínética micelar (MEKC).

Substância	Concentração (µg/mL)	E %	
		Intra-dia	Inter-dia
Aciclovir	0.6	104.43	101.30
	1.0	101.42	101.78
	1.3	104.16	103.69
Zidovudina	0.3	97.64	98.67
	0.6	95.39	99.05
	0.9	97.02	97.48
Floridizina	4.5	97.08	97.25
	11.3	101.41	102.0
	18.0	102.75	97.69
Metoprolol	26.7	103.78	96.41
	58.4	101.41	96.54
	90.0	102.75	96.62

Os valores obtidos encontram-se próximos de 100% e por isso confirmam uma adequada exatidão do método analítico considerando que o desvio máximo aceito é de 15% (ANVISA, 2003).

5.4 Validação método HPLC-UV para células Caco-2

As condições cromatográficas usadas para validação do método para quantificação do aciclovir nos ensaios de permeabilidade foram:

- 20 mM de NaH_2PO_4 em pH 7.4 e metanol (60:40 v/v)
- Coluna Luna C18
- Fluxo 1 mL/min
- Comprimento de onda: 284 nm.

As condições usadas para validação do método para quantificação da zidovudina foram:

- 20 mM de NaH_2PO_4 em pH 4 e acetonitrila (80:20 v/v)
- Coluna Luna C18
- Fluxo 1 mL/min
- Comprimento de onda: 268 nm.

5.4.1 Seletividade

Na Figura 35 estão representados os cromatogramas das injeções da solução do branco (tampão Hanks pH 7,4), bem como da injeção da solução de padrão de Aciclovir em tampão Hanks pH 7,4. Por meio da observação dos cromatogramas pode-se concluir que o método desenvolvido mostrou-se seletivo para o analito em estudo, não ocorrendo diferenças perceptíveis no pico em seu respectivo tempo de retenção de 4,9 min.

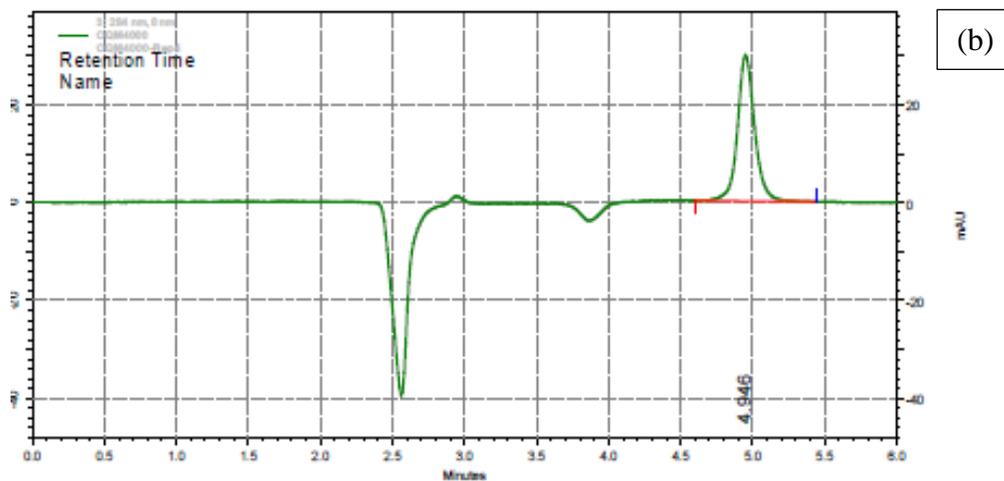
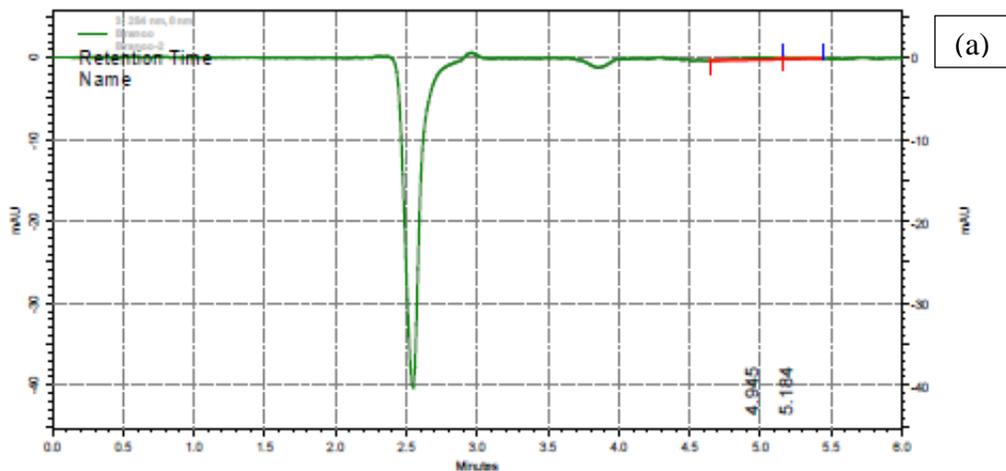


Figura 34. Cromatograma das injeções da solução do branco (solução tampão Hanks pH 7,4) (a). Cromatograma da injeção de ACV 4000 ng/mL em Tampão Hanks pH 7,4 (b).

Na Figura 35 estão representados os cromatogramas das injeções da solução do branco (tampão Hanks pH 4,0), bem como da injeção da solução de zidovudina em tampão Hanks pH 4,0. Por meio da observação dos cromatogramas pode-se concluir que o método desenvolvido apresentou-se

seletivo para o analito em estudo, não ocorrendo diferenças perceptíveis no pico em seu respectivo tempo de retenção de 6,48 min..

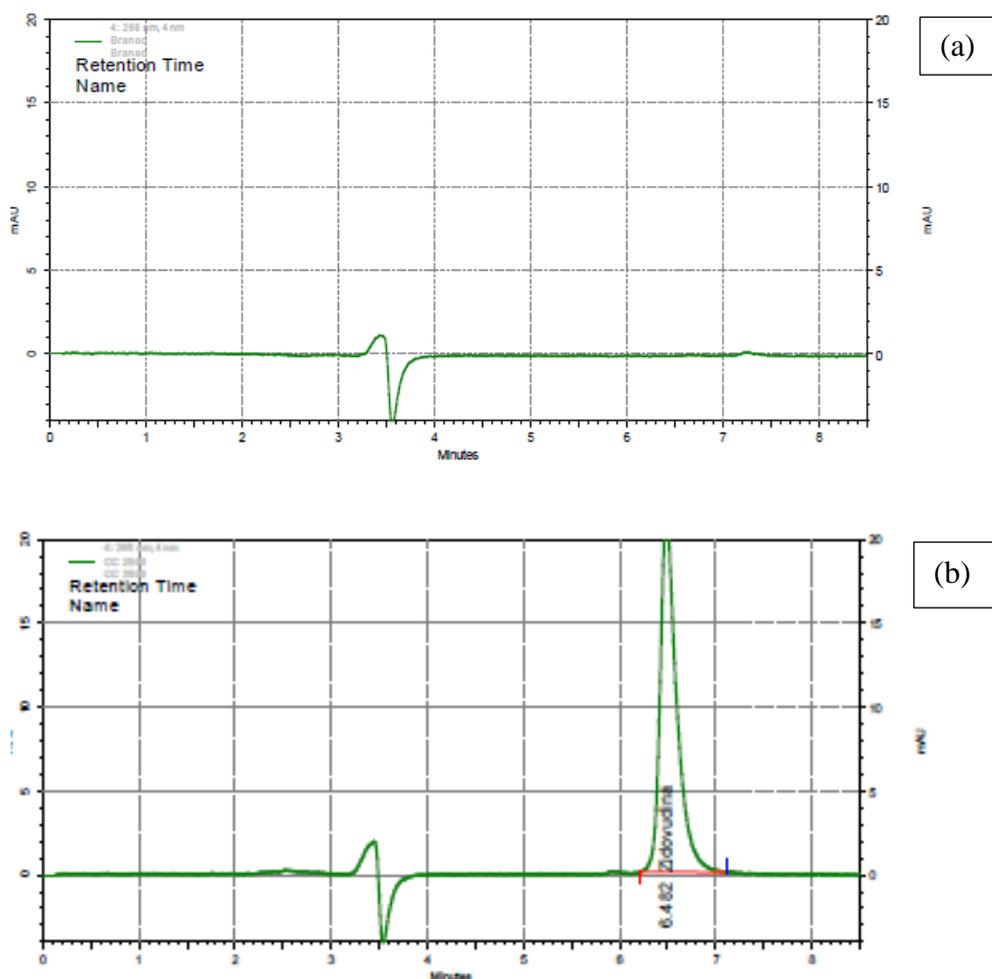


Figura 35. Cromatograma das injeções da solução do branco (solução tampão Hanks pH 4) (a). Cromatograma da injeção de Zidovudina a 2500 ng/mL (b) em Tampão Hanks pH 4,0.

5.4.2 Linearidade

Para a avaliação da linearidade foram preparadas soluções de aciclovir em HCl 0,1M e de zidovudina nas concentrações de 250, 500, 1000, 2500, 5000 e 10.000 ng/mL. Na Tabela 5 são apresentados os resultados das equações de reta obtidos por meio de regressão linear e os respectivos coeficientes de

determinação. A curva analítica construída a partir da amplitude dos picos a 284 nm para Aciclovir e 268 nm para Zidovudina são mostradas nas Figuras 36 e 37.

Tabela 5. Resultados estatísticos obtidos por meio da regressão linear a partir das curvas analíticas para a quantificação de aciclovir e zidovudina em solução de Hanks.

Fármaco	Equação reta	Coefficient e angular (a)	Coefficiente linear (b)	Coefficiente de determinação (R ²)
Aciclovir	$y = 56,958x + 4596$	56,95789	4595,951	0,9998
Zidovudina	$y = 104x + 1994,5$	104	1994,5	0,9999

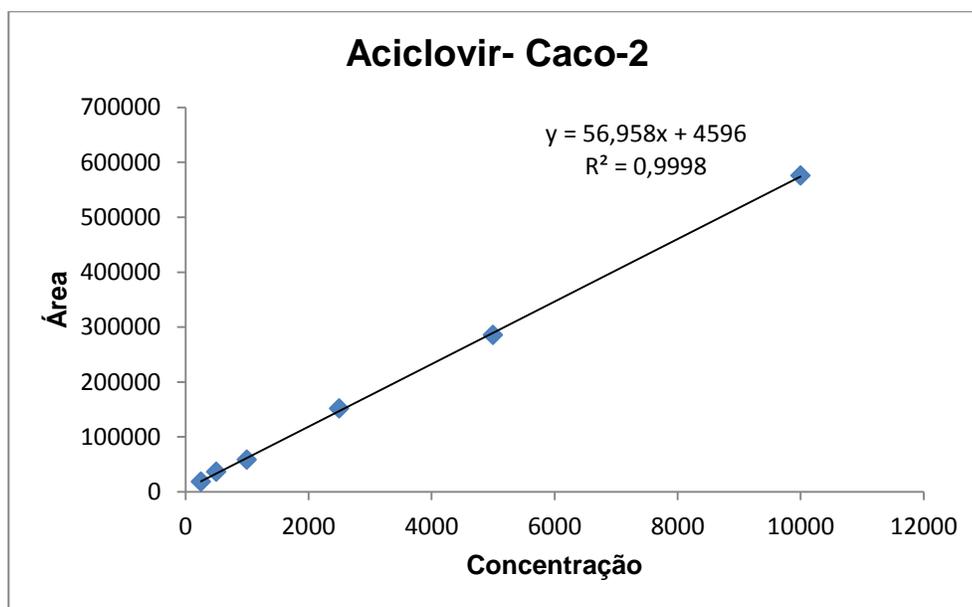


Figura 36. Curva analítica obtida a partir do método de quantificação do Aciclovir em tampão de Hanks empregando-se HPLC-UV. Solvente: HCl 0,1M/ MeOH: ACN (8:2,v/v).

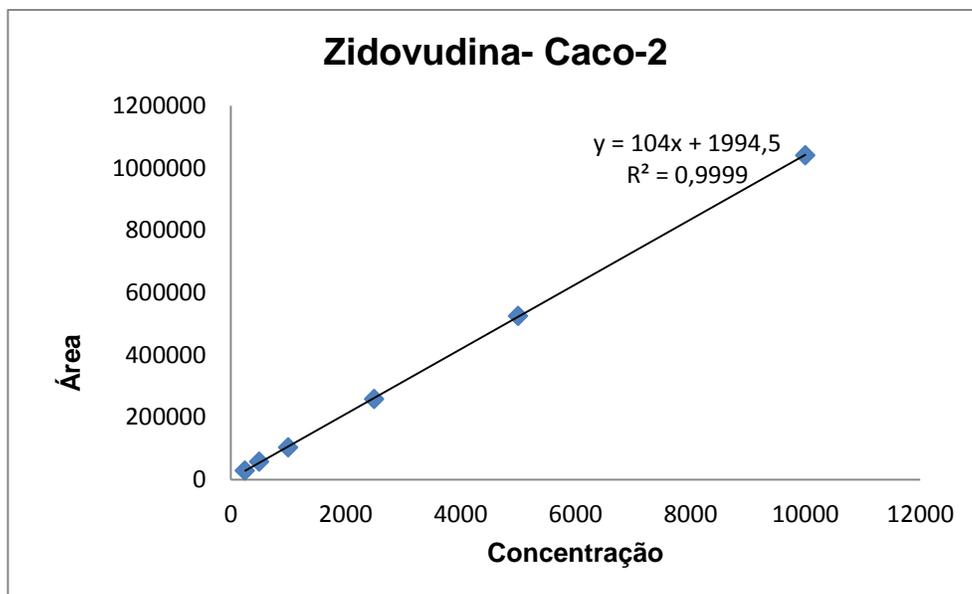


Figura 37. Curva analítica obtida a partir do método de quantificação da Zidovudina em tampão de Hanks empregando-se HPLC-UV. Solvente: tampão fosfato pH 4 0,02 M/ACN (8:2,v/v).

A partir dos resultados encontrados para as curvas analíticas, observou-se o coeficiente de determinação de 0,9998 para aciclovir, e de 0,9999 para zidovudina, assim portanto, o método apresentou-se linear em toda faixa de concentração estudada para ambos os fármacos.

5.4.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Tabela 6. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos na validação do método analítico para quantificação de aciclovir e zidovudina utilizando a técnica de HPLC.

Limites	(ng/mL)	
	Aciclovir	Zidovudina
Detecção	75	80
Quantificação	250	250

Os limites de detecção e quantificação foram adequados para o tipo de ensaio e para as quantidades esperadas de fármacos permeadas e demonstram boa sensibilidade do método (BRASIL,2003).

5.4.4 Precisão

Os valores de Precisão calculados como CV (%) e Exatidão (E%) intra e inter-dia são mostrados nas Tabelas 7 e 8, respectivamente.

Tabela 7. Precisão obtida para aciclovir e zidovudina a partir da determinação de três diferentes concentrações em um mesmo dia (intra-dia) e em dois dias consecutivos (inter-dia) utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

Fármaco	Concentração (ng/mL)	CV (%)	
		Intra-dia n=3	Inter-dia n=6
Aciclovir	500	0,32	1,85
	4000	0,39	2,79
	8000	0,25	0,39
Zidovudina	500	0,49	0,51
	4000	0,93	0,93
	8000	0,56	0,56

Os valores de coeficiente de variação (CV menores que 5 % são considerados aceitáveis) (ANVISA, 2003; ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010). Dessa forma, os valores obtidos e apresentados na Tabela 7 demonstram a precisão do método.

5.4.5 Exatidão

Tabela 8. Exatidão obtida para aciclovir e zidovudina a partir da determinação de três diferentes concentrações em um mesmo dia (intra-dia) e em dois dias consecutivos (inter-dia) utilizando a técnica de HPLC.

Fármaco	Concentração (ng/mL)	E %	
		Intra-dia n=3	Inter-dia n=6
Aciclovir	500	95,97	100,60
	4000	104,61	103,71
	8000	104,78	104,97
Zidovudina	500	104,14	103,97
	4000	97,56	97,95
	8000	96,79	96,44

Os valores obtidos para exatidão na Tabela 8 encontram-se próximos de 100 % e por isso também confirmam uma adequada exatidão do método analítico considerando que o desvio máximo aceito é de 15% (ANVISA, 2003).

Tabela 9. Estabilidade de aciclovir e zidovudina em tampão Hanks após seis horas em temperatura ambiente (TA). Resultados representam a média de seis determinações.

Concentração (ng/mL)	Desvio %	
	Aciclovir	Zidovudina
500	98,12	104,92
4000	103,65	100,23
8000	104,5	96,11

Analisando os resultados obtidos pode-se dizer que as amostras são consideradas estáveis já que não foi observado desvio superior a 15 % do valor obtido em relação às amostras recém-preparadas (BRASIL,2003). Esses resultados são importantes pois asseguram que os fármacos em estudo se mantiveram estáveis durante a realização dos experimentos de permeação.

5.5 Planejamento experimental

Segundo o planejamento experimental, foram gerados 12 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 dos fármacos em estudo. Porém, em trabalho anterior desenvolvido por Monteiro (2012) não foi observada diferença significativa no Papp entre as regiões inicial e mediana, portanto, neste planejamento foram incluídas apenas as regiões inicial e final do intestino da rã, em cujo trabalho foram demonstradas diferenças significativas na permeabilidade aparente do fármaco estudado.

O pH da solução de Ringer e a temperatura do experimento, apesar de não terem influenciado o Papp no estudo de Monteiro (2012), foram novamente investigados uma vez que outros fármacos estão sendo estudados e para confirmar/aprimorar as condições experimentais do modelo de permeação *in vitro/ex vivo* empregando membrana intestinal de rã touro em células de Franz. Adicionalmente, foi aumentado o tempo de permeação do experimento para cinco horas.

A variável temperatura foi ensaiada 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; FRANCO *et al.*, 2008), enquanto que, trabalhos utilizando intestino humano, de ratos e de células Caco-2, usam a temperatura de 37 °C (LEGEN *et al.*, 2005; DIXIT *et al.*, 2012). Assim, o 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 permeação, utilizam o pH 8,2 (TRAPANI *et al.*, 2004; FRANCO *et al.*, 2008) e nos

ensaios que empregam epitélio intestinal de outros animais é utilizado o pH de 7,4 (ROZEHNAL *et al.*, 2012).

5.5.1 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.

6 Análise dos Resultados com membrana intestinal da *Rana catesbeiana*

A partir da determinação analítica das amostras provenientes do ensaio de permeabilidade intestinal de rã, foram calculados os principais parâmetros de permeação: quantidade total de fármaco permeada através da membrana intestinal durante o período de cinco 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 (BARRY, 1983; SHAH, 1994, TRAPANI *et al.*, 2004).

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

Nas Tabelas 10 à 18 e figuras 38 à 40 são apresentados os resultados obtidos.

Tabela 10. Quantidade total permeada (Q_t) de zidovudina durante o período de cinco 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 (°C)	pH	Secção	Q_t (ng)
1	37	7,4	Final	10.79
		8,2	Inicial	14.60
2	26	7,4	Inicial	13.54
3	26	7,4	Inicial	15.72
		8,2	Inicial	15.17
			Final	9.86

Tabela 11. Constante de absorção aparente de primeira ordem (k_a) para a zidovudina permeada através da membrana intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante o período de cinco horas e obtidos com concentração de 300 $\mu\text{g/mL}$ em solução de Ringer.

Dia	Temperatura (°C)	pH	Secção	K_a
1	37	7,4	Final	34.25
		8,2	Inicial	45.29
2	26	7,4	Inicial	43.67
3	26	7,4	Inicial	50.27
		8,2	Inicial	48.97
			Final	28.43

Tabela 12. Coeficiente de permeabilidade aparente (P_{app}) para a zidovudina permeada através da membrana intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante o período de cinco horas e obtidos com concentração de 300 $\mu\text{g/mL}$ em solução de Ringer.

Dia	Temperatura (°C)	pH	Secção	P_{app} (10^{-6} cm/s)
1	37	7,4	Final	9.5
		8,2	Inicial	12.6
2	26	7,4	Inicial	12.1
3		7,4	Inicial	14.0
		8,2	Inicial	13.6
			Final	7.9

Tabela 13. Quantidade total permeada (Q_t) de aciclovir durante o período de cinco 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 (°C)	pH	Secção	Q_t (ng)
1	37	8,2	Final	7.95
2	26	7,4	Final	7.94
		8,2	Inicial	8.13
4	37	7,4	Inicial	8.11
		7,4	Final	7.96
		8,2	Final	7.98

Tabela 14. Constante de absorção aparente de primeira ordem (k_a) para o aciclovir permeada através da membrana intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante o período de cinco horas e obtidos com concentração de 300 µg/mL em solução de Ringer.

Dia	Temperatura (°C)	pH	Secção	k_a
1	37	8,2	Final	1.67
2	26	7,4	Final	1.64
		8,2	Inicial	2.60
4	37	7,4	Inicial	2.46
		7,4	Final	1.74
		8,2	Final	1.85

Tabela 15. Coeficiente de permeabilidade aparente (P_{app}) para o aciclovir permeado através da membrana intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante o período de cinco horas e obtidos com concentração de 300 µg/mL em solução de Ringer.

Dia	Temperatura (°C)	pH	Secção	P_{app} (10^{-6} cm/s)
1	37	8,2	Final	0.46
2	26	7,4	Final	0.45
		8,2	Inicial	0.72
4	37	7,4	Inicial	0.68
		7,4	Final	0.48
		8,2	Final	0.51

Tabela 16. Quantidade total permeada (Q_t) de metoprolol durante o período de cinco horas através da membrana intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*) obtidos com concentração de 200 µg/mL em solução de Ringer.

Dia	Temperatura (°C)	pH	Secção	Q_t (ng)
1	37	7,4	Final	28.27
		8,2	Inicial	32.42
			Final	29.27
2	26	7,4	Inicial	31.70
			Final	27.58
		8,2	Inicial	33.61
3	26	7,4	Inicial	31.03
		8,2	Inicial	33.15
			Final	25.84
4	37	7,4	Inicial	32.05
		7,4	Final	25.41
		8,2	Final	26.96

Tabela 17. 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 cinco horas e obtidos com concentração de 200 µg/mL em solução de Ringer.

Dia	Temperatura (°C)	pH	Secção	k_a
1	37	7,4	Final	76.95
		8,2	Inicial	86.40
			Final	76.40
2	26	7,4	Inicial	81.40
			Final	66.70
		8,2	Inicial	89.14
3	26	7,4	Inicial	79.46
		8,2	Inicial	83.14
			Final	67.56
4	37	7,4	Inicial	81.05
		7,4	Final	65.87
		8,2	Final	69.15

Tabela 18. Coeficiente de permeabilidade aparente (P_{app}) para o metoprolol permeado através da membrana intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante o período de cinco horas e obtidos com concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ em solução de Ringer.

Dia	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	pH	Secção	P_{app} (10^{-6} cm/s)
1	37	7,4	Final	32.0
		8,2	Inicial	36.0
			Final	31.8
2	26	7,4	Inicial	33.9
			Final	27.8
		8,2	Inicial	37.1
3	26	7,4	Inicial	33.1
			Inicial	34.6
		8,2	Final	28.1
4	37	7,4	Inicial	33.7
		7,4	Final	27.4
		8,2	Final	28.8

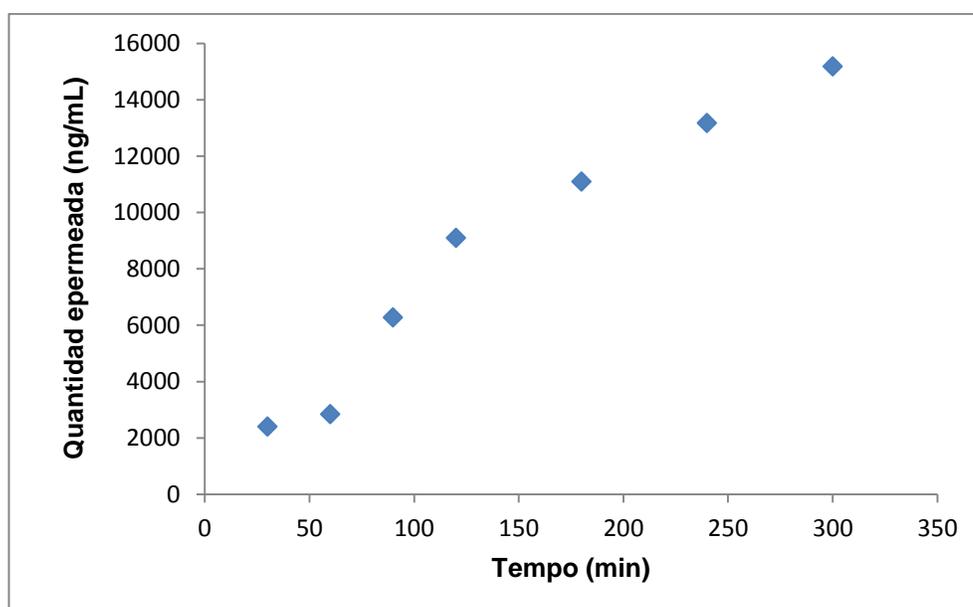


Figura 38. Quantidade permeada de zidovudina (ng/mL) através do epitélio intestinal da rã-touro (*Rana catesbeiana*) em função do tempo (min). Os resultados são expressos como a média de 3 determinações. Condições experimentais: 26 $^{\circ}\text{C}$, secção inicial do intestino, pH 8,2.

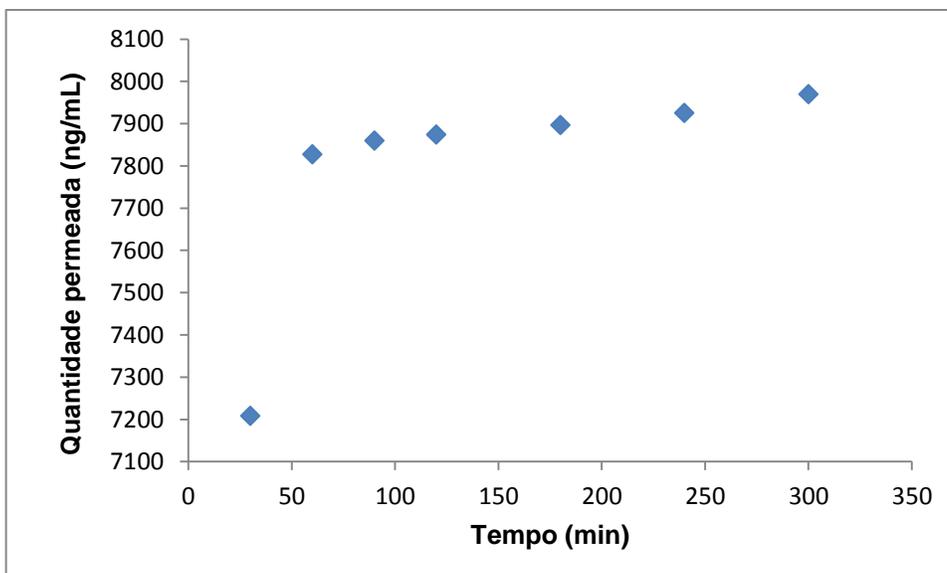


Figura 39. Quantidade permeada de aciclovir (ng/mL) através do epitélio intestinal da rã-touro (*Rana catesbeiana*) em função do tempo (min). Os resultados são expressos como a média de 3 determinações. Condições experimentais: 37 °C, secção final do intestino, pH 7,4.

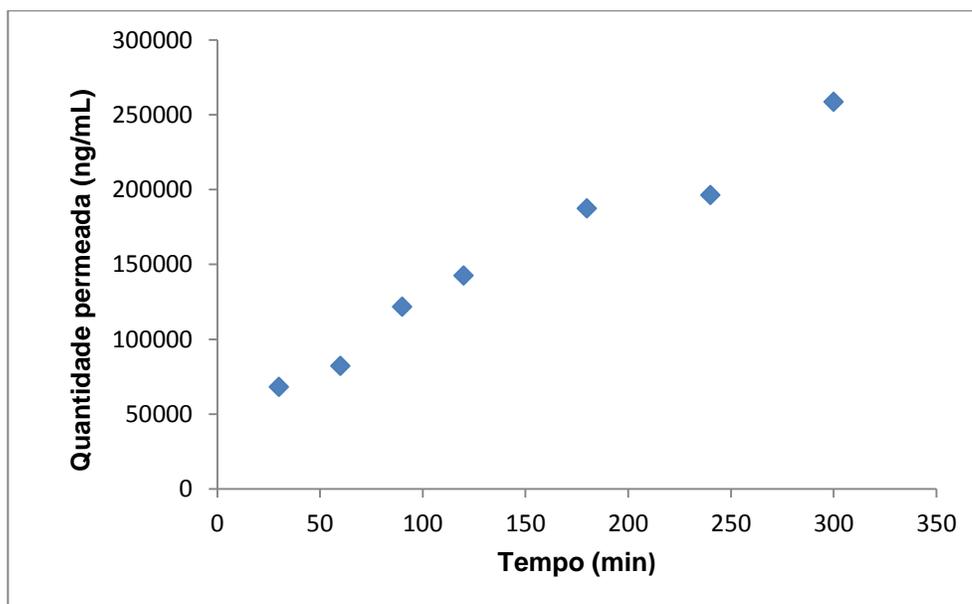


Figura 40. Quantidade permeada de metoprolol (ng/mL) através do epitélio intestinal da rã-touro (*Rana catesbeiana*) em função do tempo (min). Os resultados são expressos como a média de 3 determinações. Condições experimentais: 26 °C, secção final do intestino, pH 8,2.

6.1 Análise estatística do planejamento experimental para modelo com rã touro

O delineamento experimental proposto permitiu o ajuste do modelo para estudar os resultados. A significância das variáveis foi obtida, conforme a Tabela 19.

Tabela 19. Análise estatística para a determinação dos coeficientes da equação matemática que define a influência das variáveis sobre o coeficiente de permeabilidade aparente do aciclovir e zidovudina. (Papp versus temperatura; fármaco; secção.intestinal; pH) Cálculo dos parâmetros para ajuste do planejamento fatorial.

Efeitos estimados e Coeficientes para Papp (unidades codificadas)					
Termo	Efeito	Coeficiente	Erro padrão	t	p
Constante		0.000006	0.000000	15.28	0.001
Temperatura	0.000001	0.000000	0.000000	0.80	0.483
Fármaco	-0.000010	-0.000005	0.000000	-13.93	0.001
Secção intestinal	-0.000002	-0.000001	0.000000	-2.66	0.076
pH	-0.000001	0.000000	0.000000	-1.50	0.231
Temp. Fármaco	-0.000000	0.000000	0.000000	-0.39	0.724
Temp. Secção	0.000001	0.000000	0.000000	0.73	0.520
Temp. pH	-0.000002	-0.000001	0.000000	-2.53	0.085
Fármaco Secção	0.000004	0.000002	0.000001	4.05	0.027

Desvio padrão do modelo = 1,123000E-06, $R^2 = 98,96\%$, R^2 ajustado* = 96,20%

*Coeficiente de determinação ajustado para tamanho da amostra (n° de graus de liberdade)

A equação matemática obtida por meio desse modelo estatístico é:

$$Papp = 0,000006 - 0,000005 \times (\text{fármaco}) - 0,000001 \times (\text{sec.int.}) - 0,000001 \times (\text{temp.} \times \text{pH}) + 0,000002 \times (\text{farm.} \times \text{sec.int.}) \quad (\text{Equação 10})$$

A codificação das variáveis presentes na Equação 10, a partir do planejamento estatístico utilizado para o estudo de permeação intestinal foi apresentada anteriormente no Quadro 3, no item 4.4, rerepresentado a seguir. Através desta equação é possível estimar as condições de permeação desse modelo.

Quadro 3. Codificação das variáveis presentes no planejamento estatístico utilizado para o estudo de permeação intestinal.

Variáveis	Níveis reais		Níveis codificados	
	Nível 1	Nível 2	Nível 1	Nível 2
A=Temperatura	26 °C	37 °C	-1	1
B=Fármaco	zidovudina	aciclovir	-1	1
C=Secção	inicial	final	-1	1
D=pH	7,4	8,2	-1	1

A análise estatística do planejamento experimental também foi realizada pelo software *Statística*, pois este apresenta mais detalhes estatísticos, como mostra a Tabela 20, e possibilitou a construção do gráfico da Figura 41 no qual é possível melhor visualização da ordem de influência das variáveis do estudo.

Tabela 20. Análise de variância para coeficiente de permeabilidade aparente do aciclovir e zidovudina . (Papp versus Temperatura; Fármaco; Secção.Intestinal.; pH) Cálculo dos parâmetros usando software *Statística*.

	Efeito	t(3)	p	-90,%	+90,%	Coeficiente	Erro padrão coeficiente
				Limite confiança	Limite confiança		
Mean/Interc.	0,000006	15,2779	0,000609	0,000005	0,000007	0,0000057	0,0000004
(1)Temp.	0,000001	0,7979	0,483236	-0,000001	0,000002	0,0000003	0,0000004
(2)Fármaco	-0,000010	-13,9268	0,000802	-0,000012	-0,000008	-0,0000049	0,0000004
(3)Sec.Intes.	-0,000002	-2,6597	0,076357	-0,000004	0,000000	-0,0000009	0,0000004
(4)pH	-0,000001	-1,4982	0,231020	-0,000002	0,000001	-0,0000005	0,0000003
1 por 2	0,000000	-0,3878	0,724030	-0,000002	0,000001	-0,0000001	0,0000004
1 por 3	0,000001	0,7264	0,520158	-0,000001	0,000002	0,0000003	0,0000004
1 por 4	-0,000002	-2,5323	0,085254	-0,000005	0,000000	-0,0000012	0,0000005
2 por 3	0,000004	4,0488	0,027132	0,000002	0,000007	0,0000022	0,0000005

ANOVA; Var.:Papp; $R^2=,98962$; Ajustado: ,96195, 4 fatores e 2 níveis; MS Residual=0 DV: Papp

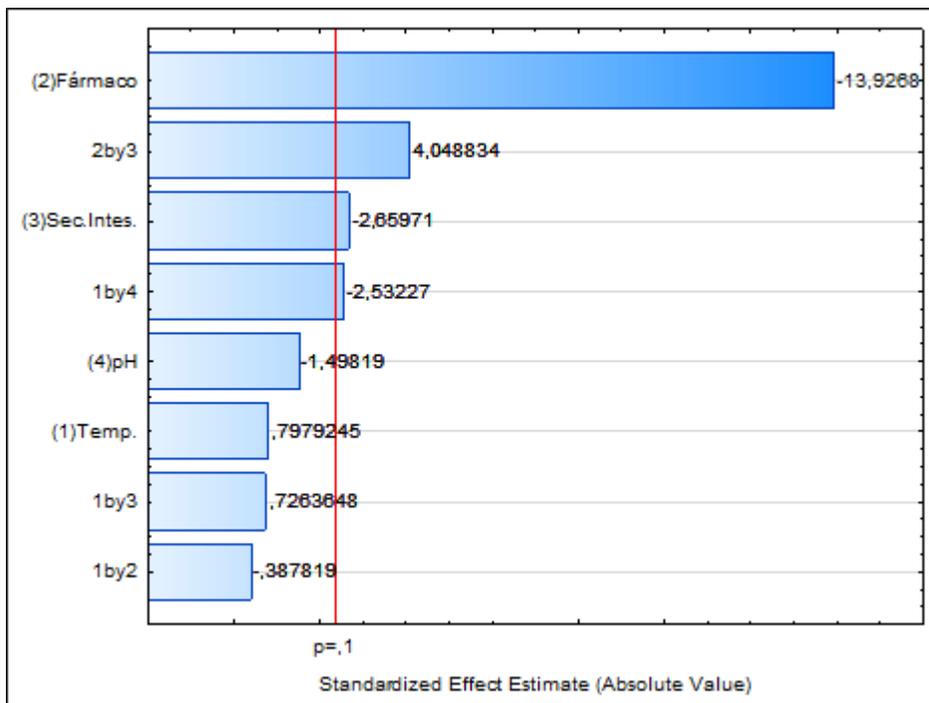


Figura 41. Gráfico demonstrando a significância dos efeitos das variáveis estudadas obtido pelo programa Statística a partir da Tabela 20. A linha vertical vermelha representa $p=0,10$.

Segundo os resultados da análise, em que as variáveis não podem ser interpretadas separadamente, os efeitos da temperatura e pH analisados conjuntamente apresentaram uma interferência leve ($p=0,085$), interação de duas variáveis com cerca de 10% de influência, isto é, há uma leve tendência de maior permeabilidade quando a temperatura está fixada em 26 °C e o pH é 8,2 (condições de TRAPANI *et al.*, 2004) e quando está fixada em 37 °C e o pH é 7,4 (conforme pode ser comprovado se substituídos os níveis codificados na Equação 10). Porém as variáveis fármaco e secção intestinal interpretados juntos apresentam interferência positiva importante, ou seja, o fármaco zidovudina é mais permeável que o fármaco aciclovir sendo que ambos permeiam mais através da secção intestinal inicial do que da secção final do intestino.

Maior permeabilidade na secção intestinal inicial (por difusão passiva) já era esperada uma vez que há maior número de microvilosidades nessa região conforme verificado na análise histológica realizada.

Para o fármaco zidovudina as condições do experimento 12 do planejamento experimental, que envolvem o binômio pH 8,2 e temperatura 26 °C e a secção intestinal inicial, são as que permitiram resultado do valor de Papp exatamente igual ao encontrado para Caco-2 no presente estudo e mais próximo aos demais dados *in vitro* da literatura. A Figura 38 ilustrou a quantidade permeada em função tempo para esta situação.

Para o fármaco aciclovir, as condições do experimento 11, que são pH 7,4 e temperatura de 37 °C envolvendo segmento intestinal final da rã resultaram num valor de Papp exatamente igual ao de células Caco-2 neste trabalho e está mais próximo dos demais dados *in vitro* da literatura. Na comparação com experimento de saco intestinal de rã de Trapani e colaboradores 2004, independente do binômio temperatura/pH, todos os experimentos envolvendo segmento final do intestino da rã deste trabalho estão muito próximos ao valor de Papp encontrado por eles. A Figura 39 ilustrou a quantidade permeada em função tempo para esta situação. Isto provavelmente ocorreu devido ao experimento de Trapani e colaboradores envolver o saco intestinal não invertido da rã como um todo, e no presente experimento, foram usados segmentos intestinais logo abaixo do estômago, já comprovado pelo estudo histológico e pelos experimentos como região de maior permeabilidade, então os valores de Papp que se aproximaram ao resultados de Trapani 2004 foram os envolvendo segmento final do intestino da rã, região que apresenta menos microvilosidades e permeia menos compensando esta diferença entre as técnicas.

Por fim, para o metoprolol o experimento 5, com pH 8,2 e temperatura de 26 °C também com segmento final do intestino da rã resultou em valor de Papp igual para ambos os modelos e também é o que melhor representa o que acontece nos demais métodos *in vitro* da literatura. A Figura 40 ilustrou a quantidade permeada em função tempo para esta situação.

Sendo assim, na aplicação do modelo proposto para o estudo da permeabilidade de fármacos, a secção intestinal da rã é o nível mais importante a ser considerado na padronização do método.

Em Quevedo e colaboradores, 2011, foi utilizada a técnica do saco intestinal invertido de rato para avaliar a permeabilidade da zidovudina nas diferentes regiões do jejuno e íleo e os valores de Papp encontrados para segmento inicial do intestino (jejuno) foram de 2.5×10^{-4} cm/min (ou $4,17 \times 10^{-6}$ cm/s) e para segmento distal (íleo) de $1,62 \times 10^{-4}$ cm/min (ou $2,7 \times 10^{-6}$ cm/s), cujos valores são menores que os encontrados para estas regiões utilizando membrana intestinal de rã mostrados na Tabela 12. Isto pode ser explicado pelo fato dos autores terem usado saco dos segmentos do intestino delgado invertidos, e devido ao procedimento para inversão pode ser provocado algum dano na morfologia da superfície absorptiva podendo alterar os resultados, enquanto nesse trabalho, foi usada a porção desse intestino logo abaixo do estômago, caracterizada pelo estudo morfológico e histológico como a de maior absorção e as diferenças também podem ter possível relação com a anestesia administrada nos ratos antes da incisão intestinal, que pode causar uma significativa mudança no fluxo do sangue intestinal e tem um notável efeito na taxa de absorção, bem como diferenças provocadas pelas diferentes espécies animais entre os dois modelos (BALIMANE *et al.*, 2000; UHING, KIMURA, 1995).

No entanto se substituirmos as condições do experimento de Quevedo e colaboradores que foram temperatura de 37 °C (+1), pH de 7,4(-1), fármaco zidovudina(-1) e secção inicial intestino rato (jejuno, -1) e final (íleo, +1) codificadas na Equação 10 proveniente do modelo experimental de rã touro, obtemos como previsão o valor de Papp de 15×10^{-6} cm/s quando do uso do segmento inicial do rato, e 9×10^{-6} cm/s quando do uso do segmento final do intestino do rato, ambos em concordância com os resultados de Papp obtidos no experimento com rã- touro para as correspondentes secções intestinais.

Além disso, apesar das diferenças entre os valores reais de Papp encontrados nos dois métodos (sem a previsão feita pelo presente modelo equacional), a conclusão dos autores do estudo com saco intestinal de rato foi a mesma do presente trabalho, os valores de Papp obtidos por Quevedo e colaboradores nas regiões mais próximas do intestino delgado foram maiores do

que nas mais distantes, o que foi explicado pelo fato da zidovudina sofrer leve efluxo da glicoproteína P nas regiões distais do intestino delgado.

E ainda segundo estudo histológico apresentado neste trabalho, menor absorção também é esperada para a porção terminal do intestino uma vez que essa secção apresenta menores e irregulares vilosidades e conseqüentemente menos microvilosidades, o que pode ocasionar uma menor superfície de absorção, no caso destes fármacos sujeitos apenas ao processo de absorção por difusão passiva.

6.2 Estudos de permeabilidade com células Caco-2

A partir da determinação analítica das amostras provenientes do ensaio de permeabilidade, foram calculados os coeficientes de permeabilidade aparente (Papp).

Foram utilizados neste ensaio os padrões internos de permeação amoxicilina e metoprolol, os quais são classificados como padrões de baixa e alta permeabilidade, respectivamente. A inclusão de tais padrões faz parte do guia de recomendações do FDA. Adicionalmente, os métodos para sua quantificação foram previamente validados e padronizados (TAVARES, 2013).

Os valores de Papp para estes padrões foram $0,68 \times 10^{-6}$ cm/s para a amoxicilina e 28×10^{-6} cm/s para o metoprolol, estando de acordo com a literatura e estudos anteriores (TAVARES, 2013), o que indica condições de cultivo adequadas e confiabilidade em relação aos resultados obtidos para aciclovir e zidovudina, os quais serão apresentados nas Figuras 42 e 43.

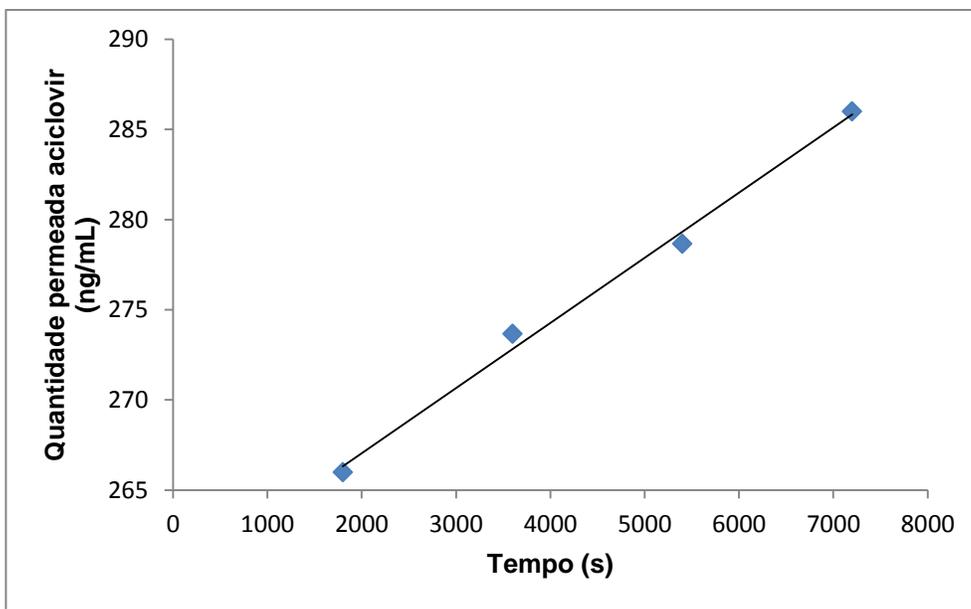


Figura 42. Quantidade permeada de aciclovir (ng/mL) através das membranas das células Caco-2 em função do tempo. Os resultados são expressos como a média de 3 determinações.

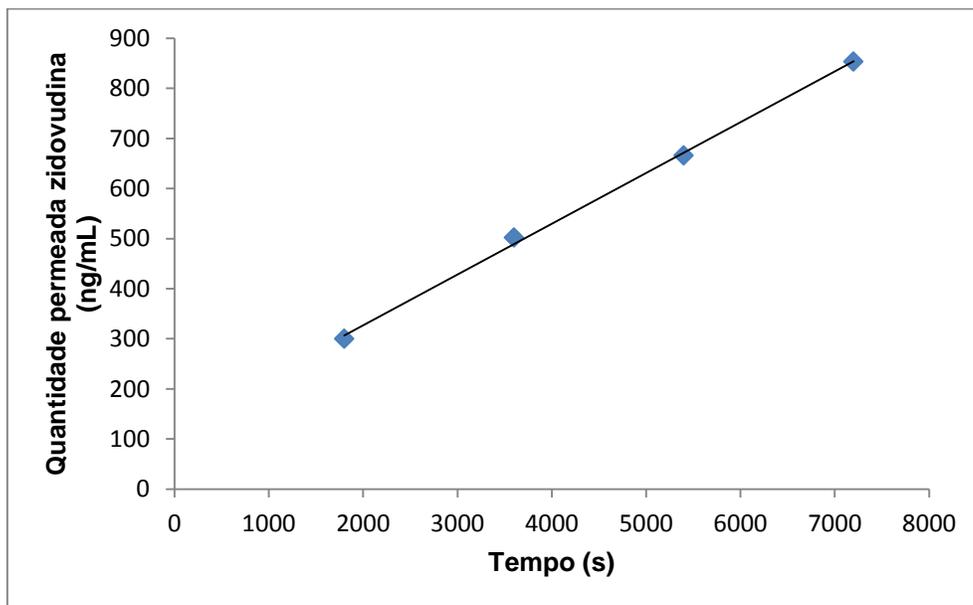


Figura 43. Quantidade permeada de zidovudina (ng/mL) através das membranas das células Caco-2 em função do tempo. Os resultados são expressos como a média de 3 determinações.

Foi também realizada comparação estatística entre os resultados de Papp dos fármacos aciclovir e zidovudina provenientes do modelo com células Caco-2 através de teste t com 2 graus de liberdade, para duas amostras, considerando variâncias desiguais usando software Minitab v.16, como mostra a Tabela 21 e Figura 44.

Tabela 21. Teste t com 2 graus de liberdade e variâncias desiguais.

Comparação entre Papp de aciclovir e Papp de zidovudina para células Caco-2				
	n	Média	Desvio padrão	Erro padrão
Papp aciclovir	3	4,82000E-07	2,70000E-08	0,000000016
Papp zidovudina	3	0,000013567	0,000000757	0,00000044

Diferença = média (Papp aciclovir células Caco-2) - média (Papp zidovudina células Caco-2)

Estimativa para a diferença: -0,000013

Intervalo de confiança para a diferença com 95% de coeficiente confiança:

(- 0,000015; - 0,000011)

A hipótese nula testada é que, a diferença entre as médias seja o (zero) e a alternativa é que a diferença entre as médias seja diferente de zero. O valor de t calculado foi de -29,91. Para este valor a probabilidade de significância é 0,001, para o teste t com 2 graus de liberdade. Portanto, adotando como nível de significância $\alpha=0,05$, conclui-se que o valor de Papp do aciclovir e de Papp da zidovudina, são estatisticamente diferentes, porque $0.001 < 0,05$.

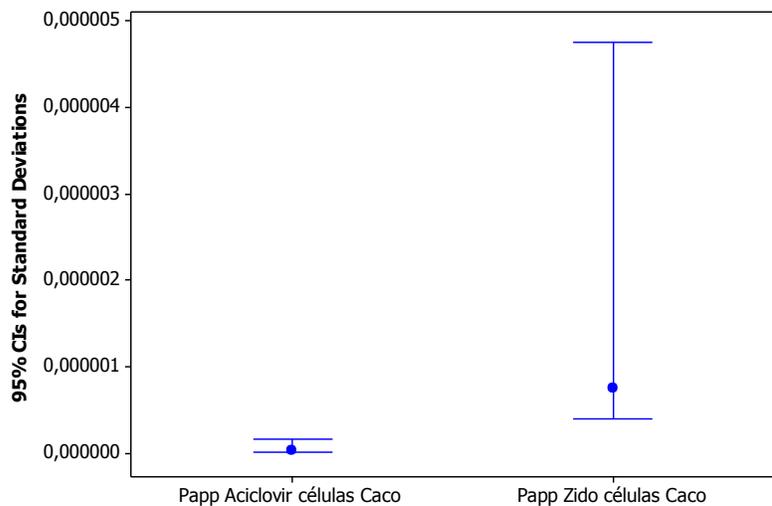


Figura 44. Médias de coeficiente de permeabilidade aparente obtido pelo modelo que emprega células Caco-2 e seus intervalos de confiança.

O gráfico apresentado na Figura 44 demonstra a forte desigualdade entre os valores das médias de permeabilidade aparente (Papp) do aciclovir e zidovudina. Nota-se que os intervalos não se superpõem. Isto é indicativo da diferença entre as médias. Também pode ser visto por meio do intervalo de confiança a diferença entre as variâncias. Pelo valor de p (nível de confiança) vê-se que as variâncias são estatisticamente diferentes. Por isso, o teste t foi feito a partir desta consideração como mostra a Tabela 22.

Tabela 22. Teste de comparação das variâncias

Método	DF1	DF2	Estatística	p
Teste F (normal)	2	2	0.000	0.003

A zidovudina, fármaco de alta permeabilidade, considerada classe I pelo SCB (LINDENBERG *et al.*, 2004) apresenta valor de Papp significativamente maior ($p=0,001$) do que o aciclovir, fármaco de baixa permeabilidade, considerado

Classe III, o que está de acordo com dados da literatura apresentados na discussão no item 6.3. Isto pode ser explicado pois a absorção da zidovudina é rápida e quase completa por difusão passiva e a biodisponibilidade oral é de quase 70% da dose administrada (GOODMAN, GILMAN, 1996) mesmo este fármaco sofrendo leve efluxo da glicoproteína P nas regiões distais do intestino, enquanto que o aciclovir apresenta absorção lenta, dose dependente variável e incompleta, com biodisponibilidade de 10-30% (LEMBO *et al.*, 2013) devido a ser transportado por difusão passiva pela rota paracelular, a qual ocupa menor área superficial quando comparada a rota transcelular, caso da rota de transporte da zidovudina (TUKKER, 1998).

Tabela 23. Intervalos de confiança obtidos no cálculo do Papp para os fármacos no modelo de células Caco-2.

	N válido	Significância	Confiança	Confiança
			-95,000%	95,000%
Papp zidovudina	3	0,000014	0,000012	0,000015
Papp aciclovir	3	0,000000	0,000000415	0,000000549

6.3. Comparação entre os resultados de permeabilidade aparente dos modelos de epitélio intestinal de rã touro e de células Caco-2

Diante dos resultados obtidos para os intervalos de confiança podemos afirmar que no caso do fármaco zidovudina, os resultados de Papp do método com membrana intestinal de rã touro considerados estatisticamente equivalentes aos de Papp obtidos pelo modelo com células Caco-2 são os quatro experimentos envolvendo segmento intestinal inicial da rã (quaisquer que sejam as outras variáveis envolvidas), que estão todos dentro do intervalo de confiança calculados para células Caco-2 como mostra a Tabela 23, o que pode ser explicado pelo fato

de a zidovudina, na porção final do intestino, sofrer leve efluxo da glicoproteína P, transportador que está presente no modelo com intestino de rã e que pode estar expresso em baixa quantidade na monocamada de células Caco-2 causando esta diferença entre os valores de Papp para esta porção intestinal (BALIMANE, CHONG, 2005).

Já no caso do aciclovir a situação é contrária, apenas os valores obtidos pelo segmento intestinal final da rã estão dentro do intervalo de confiança, sendo considerados estatisticamente equivalentes. Isto pode ser explicado pois na monocamada de células Caco-2, em decorrência da diminuição considerável na expressão de carreadores de transporte ativo o modelo é mais eficiente na caracterização da permeabilidade de compostos absorvidos passivamente pela via transcelular (BALIMANE, CHONG, 2005), o que não é o caso do composto aciclovir, que é absorvido pela via paracelular, o que nos leva a supor que o modelo com membrana intestinal da rã touro é mais próximo do transporte paracelular do epitélio do intestino delgado humano, apresentando resultados de maior permeabilidade nas porções iniciais do intestino da rã em relação ao método de células Caco-2 devido a estas condições (DUIZER, *et al.* 1997, FRANCO *et al.*, 2008).

Tabela 24. Valores de coeficiente de permeabilidade aparente ($P_{app} \cdot 10^{-6}$ cm/s) para aciclovir, zidovudina e metoprolol nos modelos de membrana intestinal de rã e de células Caco-2 comparados com dados da literatura.

Fármacos	Papp- $\times 10^{-6}$ (cm/s)							
	Métodos deste estudo		Dados da literatura					
	Membrana intestinal de rã-touro	Células Caco-2	Células de Franz (jejuno rato)	Células Caco-2	Ussing chambre (jejuno rato)	MDCK	Perfusão <i>In situ</i>	Perfusão <i>in vivo</i> (<i>Peff</i>)
Aciclovir	0,48	0,48	-	0,39 ^b	-	-	-	-
Zidovudina	13,6	13,6	19,0 ^a	12,64 ^c	-	10,0 ^e	-	-
Metoprolol	28,1	28,0	25,0 ^a	26,81 ^b	24,0 ^d	-	152,0 ^f	139,0 ^g

^a DEZANI *et al.* (2013).

^b TAVARES (2013).

^c GONÇALVES (2010).

^d WATANABE *et al.* (2004).

^e SOUZA *et al.* (2009).

^f MASAOKA *et al.* (2006).

^g LENNERNAS (2007).

Os resultados de coeficiente de permeabilidade aparente para o metoprolol presentes na Tabela 18 não se aproximam do resultado obtido por Trapani e colaboradores (2004), sendo valores maiores e isso pode ser pelo fato dos autores terem usado o saco do intestino delgado não invertido inteiro, enquanto nesse trabalho, foi usada a porção desse intestino logo abaixo do estômago, caracterizada pelo estudo morfológico e histológico como a de maior absorção. Quanto ao resultado obtido pelo método das células Caco-2 neste trabalho, 28×10^{-6} cm/s, está de acordo com demais dados de células Caco-2 na literatura como, $26,81 \times 10^{-6}$ cm/s, Tavares 2013, e a condição obtida com células de Franz que mais adequada a estes resultados, 28×10^{-6} cm/s é utilizando segmento final da membrana epitelial da rã. O resultado desta condição também é similar ao encontrado por Dezani e colaboradores 2013, 25×10^{-6} cm/s, usando jejuno de rato em células de Franz e por Watanabe e colaboradores 2004, 24×10^{-6} cm/s, usando câmaras de Ussing.

Com relação à comparação do resultado de permeabilidade intestinal da rã-touro obtido através das células de Franz com a técnica de perfusão *in situ* usando jejuno de ratos de Masaoka e colaboradores (2006) há diferenças entre os resultados de Papp, sendo menor valor proveniente do modelo com membrana intestinal de rã, o que pode ser explicado pela diferença entre as espécies animais e entre as técnicas envolvidas, sendo que o uso do método de perfusão *in situ* é limitado porque esse método confia no desaparecimento do composto do lado do lúmen como uma indicação de absorção, mas a taxa de decaimento de concentração do perfusato nem sempre representa a taxa de absorção do fármaco na circulação sistêmica e a manutenção cirúrgica do intestino com anestesia no método *in situ* causa uma significativa mudança no fluxo do sangue intestinal e tem um notável efeito na taxa de absorção, o que pode explicar a diferença (UHING, KIMURA, 1995).

O mesmo acontece na comparação com a técnica de perfusão *in vivo*, que apresenta valor do coeficiente Papp um pouco maior, situação que acontece em geral na comparação de modelos *in vitro* com dados de biodisponibilidade dos correspondentes segmentos intestinais humanos *in vivo* porque muitos fatores estão diminuídos ou ausentes nos métodos *in vitro* como: ausência de fluxo sanguíneo sistêmico, reduzida motilidade e diferenças na espessura da camada mucosa, o que pode explicar a diferença (ARTURSSON *et al.*, 1993). As condições envolvendo modelo que usa intestino de rã touro que melhor representam a permeabilidade descrita em modelos *in vivo* da literatura são as do experimento 3 do planejamento experimental (temperatura 26 °C, pH 8,2 e secção inicial do intestino da rã) apresentando resultado de Papp de $37,1 \times 10^{-6}$ cm/s.

No entanto, pelo fato do metoprolol ser uma substância com alta permeabilidade não há problemas com relativa discordância quanto ao seu coeficiente de permeabilidade aparente, sendo considerado pelo FDA um padrão interno de alta permeabilidade nos estudos de permeação intestinal. O valor da fração absorvida da dose em humanos é FA = 95 % (SKOLNIK *et al.*, 2010).

Neste estudo foi considerado de classe I, estando de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (WHO, 2006).

Já no caso do aciclovir o valor de Papp obtido com as Células de Franz para segmento final do intestino ($0,48 \times 10^{-6}$ cm/s) reproduz melhor o valor encontrado por Trapani e colaboradores 2004 ($0,44 \times 10^{-6}$ cm/s), é exatamente igual ao valor encontrado com células Caco-2 no presente estudo ($0,48 \times 10^{-6}$ cm/s) e está próximo de outros valores de células Caco-2 disponíveis na literatura como em Tavares 2013 ($0,39 \times 10^{-6}$ cm/s). Considerado por este trabalho como fármaco de baixa permeabilidade, classe III, também está de acordo com SCB (WHO, 2006).

A zidovudina não foi ensaiada por Trapani e colaboradores, no entanto o valor de Papp obtido nos experimentos com células de Franz para segmento intestinal inicial ($13,6 \times 10^{-6}$ cm/s) é igual ao obtido pela técnica de células Caco-2 ($13,6 \times 10^{-6}$ cm/s) e também está de acordo com dados da literatura de células Caco-2 como em Gonçalves 2010 ($12,64 \times 10^{-6}$ cm/s). O valor de Papp de $14 \times$

140⁻⁶ cm/s também obtido em uma das condições utilizando segmento intestinal inicial de rã com pH 7,4 e temperatura de 26 °C para zidovudina é o que mais se assemelha ao resultado de Dezani e colaboradores 2013, com Papp de 19 x 10⁻⁶ cm/s, também realizado pelo método de células de Franz porém utilizando jejuno de ratos machos albinos wistar, e esta pequena diferença nos valores pode ser explicada pelas diferenças entre as espécies animais envolvidas bem como diferenças na expressão de transportadores, sendo a zidovudina um fraco substrato da P-gp (SOUZA *et al.*,2009). Já comparando os resultados obtidos com células de Franz neste estudo com dados da literatura para células MDCK ,Souza e colaboradores, 2009, 10 x 10⁻⁶ cm/s, há uma condição muito próxima que é usando segmento final do intestino da rã e pH 7,4 quando o valor de Papp é 9,5 x 10⁻⁶ cm/s.

Esse fármaco também foi considerado de alta permeabilidade, classe I, novamente em concordância com SCB (WHO, 2006).

No entanto, mais experimentos com outros fármacos para a obtenção de mais resultados de permeabilidade intestinal, possibilitando assim, correlação com estudos de biodisponibilidade *in vivo*, podem contribuir para o desenvolvimento e definição precisa de protocolos a serem usados em futuros estudos para propostas de classificação biofarmacêutica.

Embora métodos *in vitro* como PAMPA, Caco-2, MDCK apresentem alto rendimento comparados com tecidos isolados estes modelos são menos preditivos e são usados para triagem preliminar de fármacos. Métodos com rendimento mais baixo como a técnica *ex vivo* usando células de Franz apresentada neste estudo, são mais preditivas e podem ser usadas em triagem secundária, estudos mecânicos, elucidação de caminhos de absorção e avaliação de interação de mecanismos efluxo ao novo candidato a fármaco (BALIMANE *et al.*, 2006).

Vale ressaltar que os intestinos utilizados são considerados material de descarte, uma vez que a rã é eutanasiada em Ranário comercial para fins alimentícios, sendo então este método considerado alternativo e, portanto, não necessita de aprovação por comitê de ética em pesquisa com animais ou humana (CEUA ou CEP).

7 CONCLUSÕES

Foi desenvolvido um modelo *in vitro* com membrana intestinal de rã que apresentou viabilidade de realização, baixíssimo custo e seus resultados podem ser comparados com técnicas atualmente usadas indicando que pode ser empregado em substituição aos modelos convencionalmente utilizados e que empregam seres vivos, humanos ou animais.

Foi realizada caracterização histológica dos segmentos da membrana intestinal de rã e de acordo com os experimentos foi possível padronizar a secção intestinal mais permeável aos fármacos deste estudo, secção inicial, e menos permeável, secção final, definindo também com maior precisão a área de permeação (0,2 cm²) nas células de Franz, reduzindo a variabilidade experimental, sendo uma vantagem em relação ao estudo de Trapani *et al.*, 2004.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- AMIDON, G. L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A teorical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavaiability. *Pharm. Res.*, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JR, L. V. Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. São Paulo: Premier, 2000p. 41, 77-78, 86-7, 90-1,120-4.
- ARTURSSON P.; UNGELL A.L.; LOFROTH, J.E, Selective Paracellular Permeability in Two Models of Intestinal Absorption: Cultured Monolayers of Human Intestinal Epitelial Cells and Rat Intestinal Segments. *Pharm. Res.*, Vol.10, N° 8,1993.
- 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. Avaliação de propriedades biofarmacêuticas. In: AULTON, M.E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005b. cap.18, p.264-284.
- BALIMANE, P.V.; CHONG, S.; MORRISON, R.A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, v.44, p.301-312, 2000.
- BALIMANE, P.V.; CHONG.S. Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. *Drug Discovery Today*, v. 10, n. 5, p. 335-343, 2005.
- BALIMANE,P.V.;HAN,Y;CHONG,S. Current Industrial practices of Assessing Permeability and P-Glycoprotein Interaction. *The AAPS Journal*,v.8(1),2006.
- BARRY, B.W. *Dermatological formulations: percutaneous absorption*. New York: Marcel Dekker, 1983. v. 18, 480 p.
- BLANCHARD, J. Gastrointestinal absorption II. Formulations factors affecting drug bioavaiability. *J. Pharm.*,v.150,p.132-51,1978.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 897, de 29 de maio de 2003. Recomendações da Anvisa para Alterações

Pós-Registro de Medicamentos. Recomendações Para Realização De Ensaio De Dissolução Para Formas Farmacêuticas Sólidas Orais De Liberação Imediata (FFSOLI). Recomendações têm por objetivo orientar o setor regulado e o agente regulador. Disponível em:

http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/cdc4b900474591da9a2cde3fbc4c6735/recomenda_dissolucao2.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em 19/08/2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. VISALEGIS. Resolução RDC n.27, de 17 de maio de 2012. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvsmis/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html. Acesso em: 19 fev. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lei nº 9.787, de 10 de fevereiro de 1999. Altera a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/leis/9787_99.htm. Acesso em: 22 ago. 2013.

BUCKLEY, S.T.; FISHER, S.M.; FRICKER, G.; BRANDL, M., In Vitro Models To Evaluate The Permeability Of Poor Soluble Drug Entities: Challenges And Perspectives. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v.45, p.235-250, 2012.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion, *J. Chromatog. B.: Biomed. Sci. Appl.*, v.689, n.3, p.269-282, 1997.

CHO, H.S. *Determinação de beta bloqueadores em medicamentos por cromatografia líquida de alta eficiência*. São Paulo: 1993.98p. [Dissertação de mestrado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo].

CHONG, S., DANDO, S., MORRISON, R. Evaluation of biocat intestinal epithelium differentiation environment (3 day cultured Caco-2 cells) as an absorption screening model with improved productivity. *Pharm Res.*, v. 14, p. 1835-1837, 1997.

CID CÁRCAMO, E. *Control de calidad biofarmaceutico de medicamentos*. Santiago: Balgraf, 1992. 362p.

CONSIGLIERI, V.O.; STORPIRTIS, S. Bioequivalência de medicamentos: objetivos, parâmetros farmacocinéticos, delineamento experimental e critérios de avaliação. *Rev. Cienc. Farm.* São Paulo: v. 36, n. 1, 2000.

CONSIGLIERI, V.O.; STORPIRTIS, S.; FERRAZ, H.G. Aspectos Farmacotécnicos Relacionados à Biodisponibilidade e Bioequivalência de Medicamentos. *Rev. Cienc. Farm.* São Paulo: v. 21, n. 1, p. 23-41, 2000.

DE CLERCQ, E. Antivirals for the treatment of herpesvirus infections. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 32, p. 121-132, 1993.

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

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.

DRESSMAN, J., AMIDON, G., FLEISHER, D., Absorption potencial: estimating the fraction absorbed for orally administered compounds. *J. Pharm Sci*, v. 74, p. 588-589, 1985.

DRESSMAN, J.B.; LENNERNAS, H. Oral Drug Absorption: prediction and assessment. New York: Marcel Dekker, Inc., p. 31-45, 2000.

DUELLMAN, W.E.; TRUEB, L. *Biology of amphibians*. 2.ed. New York: McGrawHill Book Company, 1986, 670p.

DUIZER, E.; PENNINKS, A.H.; STENHUIS, W.H.; GROTEN, J.P. Comparison of permeability characteristics of the human colonic Caco-2 and rat small intestinal IEC-18 cell lines. *J. Control. Release*, v. 49, p. 39-49, 1997.

ELION, G. B., FURMAN, P. A., DE MIRANDA, P., BEAUCHAMP, L. & SCHAEFFER, H.J. Selectivity of action of an antierpetic agent, 9-(2-

hidroxyethoxymethyl)guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.s.a.*, v. 74, p. 5716-5720, 1977.

FDA. *Guidance for industry: bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products: general considerations* Rockville: U.S. Department of Health and Human Services, 2003. 23p. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070124.pdf>. Acesso em: 20 set. 2013.

FDA. *Guidance for industry: waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms base on a biopharmaceutics classification system*. Rockville: U.S. Department of Health and Human Services, 2000. p.1-13. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070246.pdf>. Acesso em: 20 set. 2013.

FRANCO, M.; LOPEDOTA, 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. *J, pharm.sci*, v.352, p. 182-188, 2008.

George,L.L; Castro R.R. *Histologia Comparada*. 2ª edição. São Paulo: Editora Roca (Ltda, 1998,286p.).

GIBALDI, M. *Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics*. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991.406p.

GINSKI, J.M.; TANEJA, R.; POLLI, J.E. Prediction of dissolution-absorption relationships from a continuous dissolution/Caco-2 system. *AAPS Pharm. Sci.*, v.1, n. 3, p. 1-12, 1999.

GOODMAN,G.A. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Rio de Janeiro: Copyright-p.886,887,895, 1996. Tradução da nona edição em inglês.

GONÇALVES, J.E. *Padronização das condições de cultivo de células Caco-2 visando a obtenção de membranas viáveis ao estudo da permeabilidade in vitro da rifampicina*. São Paulo, 2010. 137p. Tese de doutorado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Universidade de São Paulo.

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.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. *Tratado de Fisiologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1014p., 1997.

HANSON RESEARCH CORPORATION. *Manual Diffusion Cell: operation manual*. Chatsworth: Hanson Research, 2004.36p.

HEIKKILA T.; KARJALAINEN M.; OJALA K.; PARTOLA K.; LAMMERT F. ; AUGUSTIJNS P.; URTTI A.; YLIPERTTULA M.; PELTONEN L.; HIRVONEN J. Equilibrium drug solubility measurements in 96-well plates reveal similar drug solubilities in phosphate buffer pH 6.8 and human intestinal fluid. *Int. J. Pharm.* n.405 p.132–136, 2011.

HO, N.; PARK, J.; MOROZOWICH, W.; HIGUCHI, W. Design of biopharmaceutical properties through pro-drugs and analogues. p.136-277. Washington, DC: APhA/APS, 1977.

HOUSTON, J., UPSHALL, D., BRIDGES, J. a Reevaluation of the importance of partition coefficients in the gastrointestinal absorption of nutrients. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 189, p. 244-254.

ICH. Quality Guidelines. View All Quality Guidelines. Analytical Validation Q2. *Q2(R1) Validation of analytical procedures: text and methodology. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*. 2005. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf. Acesso em: 24 jun. 2013.

JAIN, S.K., JAIN, R.K., CHOURASIA, M.K., JAIN, A.K., CHALASANI, K.B., & SONI, V., ET AL. Design and development of multivesicular liposomal depot delivery system for controlled systemic delivery of acyclovir sodium. *AAPS Pharm.Sci.Tech.*, v.6, p.E35-E41., 2005.

JOHNSON, M.A.; MOORE, K.H.P.; YUEN, G.J.; BYE, A.; PAKES, G.E. Clinical pharmacokinetics of lamivudine. *Clin. Pharmacokinet.*, v.36, n.1, p.41-66, 1999.

JONG, J.C.; WILLEMS, P.H.G.M.; HEUVEL, L.P.W.J.V.D.; KNOERS, N.V.A.M.; BINDELS, R.J.M. Function expression of the human thiazide-sensitive NaCl cotransporter in Madin-Darby Canine Kidney Cells. *J. Am. Soc. Nephrol.*, v. 14, p. 2428-2435, 2003.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J.; *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 388p. , 1990.

KANSY, M.; SENNER, F.; GUBERNATOR, K. Physicochemical high throughput screening: Parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J. Med. Chem.*, v. 41, n7, p. 1007-1010, 1998.

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. *Int. j. Phar.*, v. 297, p. 73-79, 2005.

KOBAYASHI, M.; SADA, N.; SUGAWARA, M.; ISEKI, K.; MIYAZAKI, K. Development of a new system for prediction of drug absorption that takes into account drug dissolution and pH change in the gastro-intestinal tract. *Int. J. Pharm.*, v. 221, p. 87-94, 2001.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. *Teoria e Prática na indústria Farmacêutica*. v.1, p. 386. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

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.

LEMBO, D.; SWAMINATHAN, S.; DONALISIO, M.; CIVRA, A.; PASTERO, L.; AQUILANO, D.; VAVIA, P.; TROTTA, F.; CAVALLI, R. Encapsulation of acyclovir in new carboxylated cyclodextrin-based nanosponges improves the agent's antiviral efficacy. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013.

LENNERNAS, H.; ABRAHAMSSON, B. The use of biopharmaceutical classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension. *J. Pharm. Pharmacol.*, 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*, 59, 1103–1120, 2007.

LENTZ, K., HAYASHI, J., POLLI, J. Development of a more rapid culture system for Caco-2 monolayers. *AAPS Eastern Regional Meeting*, 1998.

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

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*, 29, 240–250, 2006.

MIRANDA, P.D., & BLUM, M.R.. Pharmacokinetics of acyclovir after intravenous and oral administration. *J.Antimrob.Chemother.*, v.12, p. 29-37, 1983.

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

NATOCHIN, Y. V.; PRUTSKOVA, N. P. Absorption of Functionally Active Arginine-Vasotocin in the Frog Small Intestine. *Dokl. Biol. Sci.*, v. 394, p. 24–26, 2004.

NOACH, A. B. J., SAKAI, M., BLOM-ROOSEMALEN, M.C., DE JONGE, H.R., DE BOER, A.G., & BREIMER, D.D. Effect of anisotonic conditions on the transport hydrophilic model compounds across monolayers of human colonic cell lines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.270, p. 1373-1380, (1994).

OLIVEIRA, M.E.; MANZO, R.H. O sistema de classificação biofarmacêutica e as bioisemções. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E. CHIANN, C.; GAI, M.N. *Biofarmacotécnica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. Cap.18, p.187-203.

PALMA-AGUIRRE, J.A.; ABSALÓN-REYES, J.A.; NOVOA-HECKEL, G.; LAGO, A.; OLIVA, I.; REDRÍGUEZ, Z.; PARRA, M.G.; BURKE-FRAGA, V.; NAMUR, S. Bioavailability of two oral suspension and two oral tablet formulations of acyclovir 400mg: Two single-dose, open-label, randomized, two-period crossover comparisons on healthy mexican adult subjects. *Clinical Therapeutics*, v.29, n.6, p.1146-1152, 2007.

PIDGEON, C. *Immobilized artificial membrane-bearing chromatographic supports for separation/purification of biomolecules and for evaluation of membrane-binding characteristics of biomolecules*. PCT Int. Appl., WO 8908130 A1 19890908. 1989).

QUEVEDO, M.A.; NIETO, L.E.; BRINÓN, M.C. P-glycoprotein limits the absorption of the anti-HIV drug zidovudine through rat intestinal segments. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.43, p.151-159,2011.

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.

SAMBUY, Y. DE ANGELIS, I.; RANALADI, G.; SCARINO, M.L.; ZUCCO, F. The Caco-2 cell line as a model of intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 functional characteristics. *Cell Biol. and Toxicol.* v.21, p.21-26, 2005.

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.

SANTANA, M.A. Estudo Anátomo-histológico e Morfométrico do Tubo Digestivo de Girinos de Rã-pimenta, *Leptodactylus labyrinthicus* Spix, 1824 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae), Viçosa: p.61, 1997.

SCHANKER, L., TOCCO, D., BRODIE, B., HOGBEN, C. Absorption of drugs from the rat small intestine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.123, p. 81-88, 1958.

SCHAEFFER, H.J., BEAUCHAMP, L., DE MIRANDA, P., ELION, G.B., BAUER, D.J. & COLLINS, P. 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine activity against viruses of the herpes group. *Nature*, v.272, p. 583-585, 1978.

SKOLNIK, S., LIN, X., WANG, J., CHEN, X. -H., HE, T., & ZHANG, B. Towards prediction of in vivo intestinal absorption using a 96-well Caco-2 assay. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99, 3246–3265, 2010.

SHAH, J. C.; KAKA, I.; TENJARLA, S.; LAU, S.W.J.; CHOW, D. Analysis of permeation data: II. Evaluation of the lag time method. *Int. j. Pharm.*, v.109, p.283-290, 1994.

SHAH, P.J., JOGANI, V., BAGCHI, T.&MISRA, A. Role of Caco-2 cells monolayers in the prediction of intestinal drug absorption. *Biothechnol. Prog.*, v.22, p. 186-198, 2006.

SERRA, C.H.R.; KOONO, E.E.M.; KANO, E.K.; SHRAMM, S.G.; ARMANDO, Y.P.; PORTA, V. Bioequivalence and Pharmacokinetics of Two Zidovudine Formulations in Healthy Brazilian Volunteers: An Open-Label, Randomized, Single-Dose, Two-Way Crossover Study. *Clinical Therapeutics*, v.30, n.5, p.902-908, 2008.

SOUZA, J., FREITAS, Z. M. F., STORPIRTIS, S., Modelos *in vitro* para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. São Paulo: *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v.43, n.4, 2007.

SOUZA, J.; STORPIRTIS, S., Atividade anti-retroviral e propriedades farmacocinéticas da associação entre lamivudina e zidovudina. São Paulo: *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v.40, n.1/mar., 2004.

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*, 98, 4413–4419, 2009.

STAGNI, G., ALI, M.E., & WENG, D. Pharmacokinetics of acyclovir in rabbit after IV-bolus, ointment, and iontoporetic administrations. *Int. J. Pharm.*, v. 274, p. 201-211, 2004.

STAVCHANSKY, S.A., MCGINITY, J.W. Bioavailability in tablet technology. In: LIEBERMAN, H.A., LACHMAN, L., SCHWARTZ, J.B. *Pharmaceutical dosage forms: Tablets*. 2ed. New York: Marcel Dekker, 1990. v.2, p.345-476.

STEVENS, B.R. Vertebrate intestine apical membrane mechanisms of organic nutrient transport. *American Journal of Physiology*, v.263, p.458-463, 1992.

STORPIRTIS, S.; CONSIGLIERI, V.O. Biodisponibilidade e Bioequivalência de Medicamentos: Aspectos fundamentais para o planejamento e execução de estudos. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. 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. *Rev. Bras. de Cienc. Farm.*, v.35,n1,jan/jun,p.1-16,1999.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN. C.; GAI, M. N. Biofarmacotécnica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 191, 204, 2009.

TAVARES, G.D. *Nanopartículas de poli (n-butil-cianoacrilato) revestidas com N,N,N- trimetilquitosana: desenvolvimento, caracterização e estudos de permeabilidade in vitro*. São Paulo, 2013. Tese de doutorado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Universidade de São Paulo.

TOLLE-SANDER, S., LENTZ, K.A., MAEDA, D.Y., COOP, A., &POLLY, J.E. Increased acyclovir oral bioavailability via a bile acid conjugate. *Mol.Pharm.*, v.1, p. 40-48, 2004.

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. *J. pharm. sci.*, v 93, n.12, p. 2909-2918, 2004.

TSUME,Y; AMIDON,G.L., *Mol. Pharmaceutics* v. 7, n. 4, p.1235–1243,2010.

UHING, M., KIMURA, R. The effect of surgical bowel manipulation and anesthesia on intestinal glucose absorption in rats. *Journal of Clinical Investigation*, v. 95, p.2790-2798, 1995.

UNITED States Pharmacopeia: USP33; the National Formulary: NF28. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2010.

UPUDA,N. Effect of crystallinity and solubilizing agent on absorption and excretion patterns of ibuprofen *East. Pharm.*, New Delhi,v.30,n.350,p.137-140,1987.

VEAL,G..J.BACK,J.D. Metabolism of zidovudine. *Gen. Pharmacol.*,v.26,n.7,p.1469-1475,1995.

VRUEH, R.L.A., DE SMITH, P.L., &LEE, C.P. Transport of L-valine-acyclovir via the oligopeptide transporter in the human intestinal cell line, Caco-2. *J. Pharmacol.Expt., Ther.*, v.286, p. 1166-1170, 1998.

WADKE,D. A., JACOBSON,H. Preformulation testing. In: LIEBERMAN,H.A.,LACHMAN,L. *Pharmaceutical dosage forms: tablets*. New York: Marcel Dekker,1980.v.1,p.1-59.

WATANABE, E.; TAKAHASHI, M.; HAYASHI, M. A possibility to predict the absorbability 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.

YEE, S. *In vitro* Permeability Across Caco-2 Cells (colonic) Can Predict *In vivo* (small intestine) Absorption in Man- Fact or Myth. *Pharm. Res.*, v.14, n.6, p.763-766, 1997.

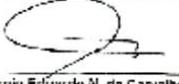
YERASI, N.; DEVARAKONDA, K.; VURIMINDI, H. Evaluation of frog as an animal model to study the effective permeability co-efficient: Application to CYP3A4 substrates. *Annals of Biological Research*, v.1, n.4, p.161-170, 2010.

YU, J.; PENG, S.; LUO, D.; MARCH, J.C.; *In Vitro* 3d Human Small Intestinal Villous Model For Drug Permeability Determination. *Biotechnology and Bioengineering*. New York: vol.xxx, n°xxx, 2012.

WEGMANN, M.; NÜSING, R.M. Prostaglandin E2 stimulates sodium reabsorption in MDCK C7 cells, a renal collection duct principal cell model. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids*, v. 69, p. 315-322, 2003.

9. ANEXOS

Anexo A: Autorização de Funcionamento do Ranário Santa Bárbara D'oeste

	MUNICÍPIO DE SANTA BÁRBARA D'OESTE SECRETARIA MUNICIPAL DE PLANEJAMENTO	DATA DE EMISSÃO 14/01/2012
	ALVARÁ DE LICENÇA PARA LOCALIZAÇÃO E FUNCIONAMENTO	
DE ACORDO COM AS EXIGÊNCIAS LEGAIS EM VIGOR, POR ESTE ALVARÁ FICA CONCEDIDA A LICENÇA DE LOCALIZAÇÃO E FUNCIONAMENTO CONFORME IDENTIFICADO ABAIXO.		
REGIÇÃO MUNICIPAL:	8.242	
MONICIAÇÃO SOCIAL:	EDVALDO FERRAZ	
CNPJ/Nº:	100.679.268-24	
ENDEREÇO:	RUA ANTONIO DE OLIVEIRA LINO 322 JD STA ALICE	
ATIVIDADE:	RANARIO	
HORÁRIO DE FUNCIONAMENTO	SEGUNDA A SEXTA: DAS 08:00 AS 18:00 SÁBADO: DOMINGO: FERIADOS:	
As(s) licença(s) poderá(ão) ser cassada(s) e determinada o fechamento, e interdicação e/ou lacração do estabelecimento, a qualquer tempo, desde que venham de existir as condições que justificaram a concessão da(s) licença(s), ou quando o contribuinte, mesmo após a aplicação das penalidades cabíveis, não cumprir as exigências e determinações da Prefeitura para regularizar a situação do estabelecimento.		
 Sérgio Eduardo N. de Carvalho ASSINATURA		
Em caso de anuenciamento, alterações e transferências de atividades, comunicar a Secretaria Municipal de Fazenda, por meio de requerimento protocolado, no prazo legal de 30 (trinta) dias, sob pena de responder pelos tributos lançados posteriormente.		
ESTA LICENÇA DEVERÁ SER COLOCADO EM LOCAL DE DESTAQUE		
1.782		

Anexo B: Certificado Comitê de Ética



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Assistência Técnica Acadêmica



Ofício CEEA/FCF/29 /2009

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “**Estudo da permeabilidade intestinal de fármacos antiretrovirais, utilizando epitélio intestinal de rã-touro (Rana catesbeiana) em modelo ‘in vitro’**” (Protocolo nº 190), de responsabilidade do pesquisador **Guilherme Diniz Tavares** sob a orientação do(a) Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal – CEEA, desta Faculdade, em 13 de abril de 2009.

São Paulo, 14 de abril de 2009.

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

Av. Prof. Líneu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3677 / Fax: (11) 3813-5093 - e-mail: rtrigo@usp.br

ANEXO C: Informações para os membros de bancas julgadoras de Mestrado/Doutorado



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de 30 minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de 30 minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de 30 minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até 60 minutos por examinador.

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

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

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

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

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

São Paulo, 26 de maio de 2011.

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

ANEXO D: Ficha do aluno

8/4/2014

Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



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

9139 - 7714405/1 - Paula Cristina Torres de Souza

Email: pctsouza@usp.br
Data de Nascimento: 24/05/1987
Cédula de Identidade: RG - 437421855 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira

Curso: Mestrado
Programa: Fármaco e Medicamentos
Área: Produção e Controle Farmacêuticos
Data de Matrícula: 07/02/2012
Início da Contagem de Prazo: 07/02/2012
Data Limite para o Depósito: 07/08/2014
Orientador: Prof(a). Dr(a). Vadi Olga Consiglieri - 07/02/2012 até o presente. E.Mail: siglieri@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 07/02/2012
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 04/04/2013
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 07/02/2012
Matrícula de Acompanhamento em 10/02/2014

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 10/02/2014

Impresso em: 08/04/14 15:12:16

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 7714405/1 - Paula Cristina Torres de Souza

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5777-2/6	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	08/03/2012	21/06/2012	45	3	86	A	N	Concluída
EDM5791-5/8	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	14/03/2012	29/06/2012	120	0	0	-	N	Pré-matricula indeferida
FBF5784-1/4	Betroforese Capilar: Princípios e Aplicações na Área Farmacêutica	01/08/2012	02/10/2012	90	0	0	-	N	Turma cancelada
FBF5805-1/1	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	02/08/2012	05/09/2012	45	3	100	A	N	Concluída
EDM5791-5/9	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	15/08/2012	30/11/2012	120	8	83,3	A	N	Concluída
FBF5766-3/1	Biodisponibilidade e Bioequivalência de Medicamentos	25/09/2012	30/11/2012	90	6	100	B	N	Concluída
FBF5784-2/1	Betroforese Capilar: Princípios e Aplicações na Área Farmacêutica	17/10/2012	18/12/2012	90	6	89	A	N	Concluída

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

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 10/02/2014

Impresso em: 08/04/14 15:12:16

ANEXO E: Currículo Lattes

8/4/2014

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Paula Cristina Torres de Souza)



Paula Cristina Torres de Souza

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/1677554584723181>
Última atualização do currículo em 11/03/2014

Possui graduação pela Pontifícia Universidade Católica de Campinas (2009). Atualmente realiza mestrado na Universidade de São Paulo. Tem experiência na área de Farmácia, com ênfase em biofarmacotécnica. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome Paula Cristina Torres de Souza 
Nome em citações bibliográficas SOUZA, P. C. T.

Endereço

Endereço Profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacéuticas.
Av. Prof. Lineu Prestes, 580- Bloco 13
Butatã
05508900 - São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 30913623
Ramal: 2

Formação acadêmica/titulação

2006 - 2009 Graduação.
Pontifícia Universidade Católica de Campinas.

Formação Complementar

2009 - 2009 Extensão universitária em XII Jornada Farmacêutica.
Pontifícia Universidade Católica de Campinas.

2009 - 2009 Análise Sensorial de Alimentos.
Pontifícia Universidade Católica de Campinas.

2009 - 2009 Preparações Cosméticas e Farmácia Magistral.
Pontifícia Universidade Católica de Campinas.

2008 - 2008 Extensão universitária em XI Jornada Farmacêutica.
Pontifícia Universidade Católica de Campinas.

2008 - 2008 Neurocosmética e Silicône- Tipos e Aplicações.
Pontifícia Universidade Católica de Campinas.

2007 - 2007 Extensão universitária em X Jornada Farmacêutica.
Pontifícia Universidade Católica de Campinas.

2007 - 2007 Nanotecnologia Presente e Futuro. (Carga horária: 17h).
Pontifícia Universidade Católica de Campinas.

2007 - 2007 Tecnologia Aplicada a pesquisa Científica Biológica. (Carga horária: 34h).
Pontifícia Universidade Católica de Campinas.

2006 - 2006 Extensão universitária em IX Jornada Farmacêutica.
Pontifícia Universidade Católica de Campinas.

2006 - 2006 Animais Peçonhentos.
Pontifícia Universidade Católica de Campinas.

2006 - 2006Fitoterapia Chinesa.
Pontifícia Universidade Católica de Campinas.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional**2012 - Atual**

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: mestranda em Fármaco e Medicamentos, Regime: Dedicção exclusiva.

Vínculo institucional**2012 - 2012**

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitora em Farmacovigilância HU, Carga horária: 20

Vínculo institucional**2011 - 2011**

Vínculo: Outro, Enquadramento Funcional: prática profissionalizante, Carga horária: 24

Outras informações

Prática profissionalizante para desenvolvimento de projeto científico exigido como etapa de ingresso no mestrado da FCF, USP-SP.

Eh Restaurant, EH, Canadá.

Vínculo institucional**2010 - 2010**

Vínculo: funcionária, Enquadramento Funcional: hostess and cashier, Carga horária: 30

Outras informações

hostess and cashier in a Canadian restaurant

Janssen Cilag Pharmaceutica (Johnson & Johnson), J & J, Brasil.

Vínculo institucional**2009 - 2009**

Vínculo: estagiária, Enquadramento Funcional: estagiária da Garantia da Qualidade, Carga horária: 30

Farmácia Santo Antônio- Guaratinguetá, SANFARMA, Brasil.

Vínculo institucional**2008 - 2008**

Vínculo: estagiária, Enquadramento Funcional: estagiária atenção farmacêutica, Carga horária: 16

Projetos de pesquisa

2010 - AtualDesenvolvimento de novo método *ex vivo* para avaliação da permeabilidade intestinal de fármacos utilizando epitélio intestinal de rã-touro (*Rana catesbeiana*): Comparação com métodos convencionais

Descrição: A eficácia terapêutica depende diretamente da biodisponibilidade dos fármacos, característica esta relacionada às propriedades de permeabilidade e solubilidade. A classificação biofarmacêutica (SCB), baseada nesses parâmetros, foi proposta como ferramenta para o desenvolvimento de formas farmacêuticas, com o objetivo de auxiliar na predição da disponibilidade *in vivo*, uma vez que existem limitações técnicas, econômicas e éticas nos ensaios diretos de biodisponibilidade. Assim, a avaliação da permeabilidade e solubilidade dos fármacos, embora indiretamente, proporcionam indicações objetivas sobre a eficácia dos medicamentos, além de oferecer modelos facilmente reprodutíveis e sem expor voluntários sadios a riscos. Apesar das diferentes técnicas disponíveis para os estudos de permeabilidade *in vitro/ex vivo*, há carência de protocolos padronizados e muitos dos dados

disponíveis na literatura sobre essa propriedade não são confiáveis ou conclusivos. Esse projeto busca propor novo método para estudar a permeabilidade intestinal de fármacos, utilizando epitélio intestinal de rã-touro em modelo ex vivo empregando células de Franz e avaliar sua correlação com estudos de biodisponibilidade. Os fármacos escolhidos como modelo são zidovudina, lamivudina e aciclovir. A quantidade de fármaco permeado será determinada por método de eletroforese capilar equipado com detector de arranjo de díodos. Os parâmetros de permeação a serem determinados serão: quantidade acumulada de fármaco permeado, coeficiente de permeabilidade aparente, constante de absorção e fluxo. Tais parâmetros serão correlacionados com dados de biodisponibilidade de estudos prévios. Na avaliação estatística dos resultados serão empregados ANOVA e Teste de Tukey. Processo: 2010/17240-6.

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Mestrado acadêmico: (1) / Doutorado: (1) .

Integrantes: Paula Cristina Torres de Souza - Integrante / Guilherme Diniz Tavares - Integrante / Maria Segunda Aurora Prado - Integrante / Talita Ferreira Monteiro - Integrante / André Rolim Baby - Integrante / Maria Valéria Robles Velasco - Integrante / Telma Mary Kaneko - Integrante / Vladi Olga Consiglieri - Coordenador. Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Auxílio financeiro.

Áreas de atuação

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

Idiomas

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

Prêmios e títulos

- 2013** Melhor trabalho de Pós-graduação - Nível MESTRADO, 5 Simpósio anual de pesquisas em Ciências Farmacêuticas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. USP., UNIVERSIDADE ESTADO SAO PAULO.

Produções

Produção bibliográfica

Resumos publicados em anais de congressos

- MONTEIRO, T. ; SILVA, C. ; **SOUZA, P. C. T.** ; KANEKO, T. M. ; TAVARES, M. F. M. ; PRADO, M. A. ; cordenador . Application of a micellar electrokinetic chromatographic method for the simultaneous separation and quantification of drugs in a new in vitro permeation study. In: LACE, 2012, Buenos Aires. THE 18TH LATIN-AMERICAN SYMPOSIUM ON BIOTECHNOLOGY, BIOMEDICAL, BIOPHARMACEUTICAL AND INDUSTRIAL APPLICATIONS OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS AND MICROCHIP TECHNOLOGY, 2012.
- MONTEIRO, T. ; SILVA, C. ; **SOUZA, P. C. T.** ; integrante ; KANEKO, T. M. ; BABY, A. R. ; PRADO, M. A. ; VELASCO, M. V. R. ; cordenador . Validation of a micella electrokinetic chromatography method used to quantify antivirals in in vitro intestinal permeation studies. In: Monteiro, T.F. ; SILVA, C. ; 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 micella electrokinetic chromatography method used to quantify antivirals in in vitro intestin, 2011, Sao Paulo. Science and Pharmaceutical Technology Meeting of the Pharmaceutical Sciences Faculty of the University of São Paulo. Sao Paulo: Brazilian Journal of Pharmaceutical Science, 2011. v. 47. p. 46-46.

Apresentações de Trabalho

1. ★ **SOUZA, P. C. T.** ; integrante ; GUIMARAES, M. ; coordenador . HISTOLOGIC EVALUATION OF FROG INTESTINAL MEMBRANE FOR USE IN PERMEABILITY ASSAYS. 2013. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
2. ★ **SOUZA, P. C. T.** ; integrante ; coordenador ; integrante ; TAVARES, V. F. ; GUIMARAES, M. . MORPHO-HISTOLOGIC EVALUATION OF FROG INTESTINAL MEMBRANE FOR USE IN PERMEABILITY ASSAYS. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
3. MONTEIRO, T. ; **SOUZA, P. C. T.** ; coordenador ; SILVA, C. A. ; integrante ; TAVARES, M. F. M. . DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A MICELLAR ELETROKINETIC CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR SIMULTANEOUS SEPARATION AND QUANTIFICATION OF DRUGS IN IN VITRO PERMEATION STUDIES . 2012. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
4. MONTEIRO, T. ; **SOUZA, P. C. T.** ; SILVA, C. A. ; coordenador ; TAVARES, M. F. M. ; AURORA, M. S. . APPLICATION OF A MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR SIMULTANEOUS SEPARATION AND QUANTIFICATION OF DRUGS IN IN-VITRO PERMEATION STUDIES. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
5. GUIMARAES, M. ; **SOUZA, P. C. T.** ; integrante ; integrante ; TAVARES, V. F. ; coordenador . ZIDOVUDINE AND POLY N-BUTYLCYANOCRYLATE NANOPARTICLES COATED WITH HYALURONIC ACID: DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
6. MONTEIRO, T. ; coordenador ; SILVA, C. A. ; **SOUZA, P. C. T.** ; AURORA, M. S. ; integrante ; TAVARES, M. F. M. . Intestinal Permeability of Antiviral Drugs Using Intestinal Epithelium of Frog (Rana Catesbeiana) Analytical Determination of Antivirals Using Micellar Electrokinetic Chromatography. 2011. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
7. ★ **SOUZA, P. C. T.** ; autora . Determinação de Impurezas na Droga Vegetal Sene adquiridas em diferentes estabelecimentos da região de Campinas. 2009. (Apresentação de Trabalho/Outra).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. Saúde na Praça.Prevenção é a solução. 2007. (Outra).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 08/04/2014 às 14:46:52

[Imprimir currículo](#)