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

**Avaliação da permeabilidade intestinal da furosemida e da
furosemida complexada com hidroxipropil- β -ciclodextrina
por meio do modelo de perfusão *in situ* de passagem tripla
em ratos**

Juliana Pereira Maura Rossato

São Paulo
2015

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

**Avaliação da permeabilidade intestinal da furosemida e da
furosemida complexada com hidroxipropil- β -ciclodextrina
por meio do modelo de perfusão *in situ* de passagem tripla
em ratos**

Juliana Pereira Maura Rossato

Versão Corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

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

Dissertação para Obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra

São Paulo
2015

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

Rossato, Juliana Pereira Maura
R823a Avaliação da permeabilidade intestinal da furosemida e da
furosemida complexada com hidroxipropil- β -ciclodextrina por
meio do modelo de perfusão *in situ* de passagem tripla em ratos /
Juliana Pereira Maura Rossato. -- São Paulo, 2015.
165p.

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

1. Biofarmácia 2. Biofarmacotécnica I. T. II. Serra, Cristina
Helena dos Reis, orientador.

615.4b CDD

Juliana Pereira Maura Rossato

**Avaliação da permeabilidade intestinal da furosemida e da
furosemida complexada com hidroxipropil- β -ciclodextrina
por meio do modelo de perfusão *in situ* de passagem tripla
em ratos**

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do Título de **MESTRE**

Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra
Orientadora/Presidente

Profa. Dr.
1° examinador

Profa. Dr.
2° examinador

São Paulo, 18 de fevereiro de 2016.

*“... Alguém me disse que sonhou
Que estava numa praia caminhando com Jesus
E olhando o céu viu sua vida
Tanta estrada percorrida
Sempre em busca de uma luz
E olhando as marcas na areia
Viu ao lado dos seus passos as pegadas de Jesus
E aí ele falou:
"Não te entendo, meu Senhor!*

*Nos caminhos mais difíceis, eu não vejo as tuas marcas
Por que me deixaste só?"
Jesus respondeu:
"Os passos são só meus, jamais te abandonei
É que nos momentos mais difíceis de viver
Nos meus braços te levei"*

Padre Zezinho

*“ O Senhor Deus é a minha força.
Ele torna o meu andar firme
Como o de uma corça
E me leva para as montanhas,
Onde estarei seguro ”*

Habacuque 3:19

Dedico esse trabalho ao meu esposo,

Alexandre Ferreira Rossato

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao autor da vida, Deus. Obrigada Senhor por essa oportunidade concedida e por mais uma vitória em minha vida.

Agradeço ao apoio do meu esposo, Alexandre Rossato, o qual participou ativamente de cada etapa do curso de pós-graduação, sofreu, sorriu e festejou comigo e muitas vezes, enxugou minhas lágrimas. Te amo Xandy pra sempre.

Aos meus pais Wagner e Eliane, meus irmãos Fabiana e Wagner Junior e ao meu sobrinho e afilhado Antônio. Obrigada mãe pelo incentivo, pelos conselhos, pelas broncas. Aos meus padrinhos Luís Cláudio e Elsa e aos meus primos, Henrique e Eduardo. Obrigada tia Neide Rossato Sampaio. Obrigada minha querida família por terem torcido por mim.

À colaboração dos funcionários do Instituto Butantan, prof. Dr. Robson Melo e Regiane Spirandelli. Aos funcionários do Departamento de Patologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Cláudio e Luciano e ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) por terem contribuído na construção desse trabalho.

Aos seguranças da Farmácia pela amizade e por tudo o que fizeram por mim, me ajudaram muito: João, Januário, Paulo, Fábio, seu Valdiael, seu Gilberto, Duacir e seu Eugênio.

Agradeço a equipe do Biotério (Flávia, Lívia, Renata, Eliane, Fátima, Sílvia, Silvânia, Rosenir) por terem me treinado e terem tido muita paciência para comigo.

Aos queridos funcionários: David Lima, Alexandre, Luís Carlos, Doralice, Claudinéia Aparecida Sales de Oliveira Pinto, Edgar Muniz, Inês, Irineu, Miriam Wrigg, Sueli Duarte, Erbert, Jorge Lima, Roberto, Eremita e Leila Bonadio.

À colaboração dos colegas de laboratório: André, Thaísa e Mônica.

À primeira profa que me acolheu e me fez sentir no coração e descobrir que essa era a minha verdadeira vocação, obrigada profa Dra. María Segunda Aurora Prado.

Agradeço à família Morimoto por terem me ajudado a vencer mais essa etapa: prof. Dr. Nilton, Edna, Aline e Letícia. Obrigada pela torcida.

Aos queridos amigos que fiz ao longo dessa jornada, que me auxiliaram e me ampararam em todos os momentos, principalmente naqueles mais difíceis: Marina Silva, Michelle Barão, Rafael Paraíso, José Eduardo Gonçalves, Marcelo Guimarães, Ruberlan Santos, Cristiane Barbeiro, Arianne Cavalcante, Caio Huerta, Thayane Araújo, Raquel Galante, Roxana Flores, Juliana Barbosa, Carola Romañuk, Flávia Neto de Jesus, Andrea Sofo, Tácio Lima, Daniela Perez, Michelli Dário, Camila Areias, Fabíola Ornellas, Gabriela D'Ângelo, Thalita Cândido, Mayara, Michele Issa, Amanda Fortes, Eduardo Barbosa, Katherine Melo, Ivan Andres, Márcia Spuri, Andrea Sofo, Tércio Martins, Alberto Vetore Neto e Sheila Fernandes. Que a partir dessa etapa, nossa amizade cresça e fortaleça cada vez mais.

Aos queridos docentes que tanto me auxiliaram: Dr. André Rolim Baby, Dra. Maria Valéria Robles Velasco, Dr. Humberto Gomes Ferraz, Dra. Nádia Bou-Chacra, Vladi Consiglieri, Dra. Valentina Porta, Dra. Veni Nakasone e Dra. Eunice Kazue Kano, Dr. Felipe Lourenço e Dra Sílvia Storpirtis.

Com muito carinho, quero agradecer à Dra. Marina de Freitas Silva, pela paciência, dedicação, pela amizade, por ter compartilhado seu conhecimento, por ter não somente me apontado o caminho, mas também por ter me guiado durante essa jornada. Deus te abençoe e te guie em todos os dias de sua vida, sucesso.

E, mais uma vez agradeço à Deus por ter me permitido encontrar pessoas que se tornaram muito especiais em minha vida. Nos momentos que precisei, estenderam suas mãos para me ajudar e ofereceram seus ombros para chorar, obrigada: Nei Zimmermann, Vanessa Moura, Raquel Cardoso, Jéssica Zaghi, Guilherme Compri e Adriana França.

À todos que participaram dessa etapa que foi muito importante pra mim e quero compartilhar com todos àqueles que participaram dela tanto direta quanto indiretamente.

Finalmente, com muito carinho, respeito e muita gratidão por ter me conduzido ao amadurecimento tanto pessoal quanto profissional, por ter me dado essa grande oportunidade e pela confiança a mim depositada, obrigada profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	IV
LISTA DE EQUAÇÕES.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
RESUMO.....	XII
ABSTRACT.....	XIV
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	04
2.1. Objetivo geral.....	05
2.2. Objetivos específicos.....	05
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	06
3.1. Absorção de fármacos no trato gastrointestinal (TGI).....	07
3.1.1. Enterócitos.....	11
3.2. Permeabilidade dos fármacos no TGI.....	14
3.2.1. P-gp e CYP3A4.....	19
3.2.2. Métodos empregados na avaliação da permeabilidade de fármacos.....	21
3.2.2.1. Método de perfusão <i>in situ</i> utilizando os segmentos intestinais.....	25
3.3. Furosemida.....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1. Substâncias de referência e marcadores utilizados.....	34
4.2. Solventes e reagentes.....	34
4.3. Equipamentos e dispositivos diversos.....	35
4.4. Métodos.....	36
4.4.1. Obtenção e caracterização da furosemida complexada com hidroxipropil- β -ciclodextrina.....	36
4.4.1.1. Preparação.....	36
4.4.1.2. Caracterização.....	37
4.4.1.2.1. Determinação do teor.....	37
4.4.1.2.2. Caracterização das amostras utilizando a técnica termoanalítica.....	38
4.4.2. Avaliação da permeabilidade da FURO e FURO CD em diferentes segmentos intestinais por meio do método de perfusão <i>in situ</i> de passagem tripla.....	39
4.4.2.1. Etapa cirúrgica.....	39
4.4.2.2. Estudo de permeabilidade por meio da perfusão <i>in situ</i> de passagem tripla.....	42
4.4.2.3. Cálculos da permeabilidade intestinal efetiva.....	45
4.4.2.4. Cálculos do fluxo de água.....	45
4.4.2.5. Análise estatística dos resultados.....	47
4.4.2.6. Preparação do material para análise histológica.....	47
4.5. Desenvolvimento e validação do método bioanalítico de cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação de FURO, METO e FLUOR nas amostras dos estudos de permeabilidade.....	48
4.5.1. Preparo das amostras.....	48

4.5.2. Preparo das soluções padrões e soluções de trabalho para a construção da curva analítica....	48
4.5.3. Condições cromatográficas adotadas.....	50
4.5.4. Validação do método bioanalítico de CLAE para a quantificação dos fármacos utilizados nos estudos de permeabilidade	52
4.5.1.4.1. Exatidão.....	52
4.5.1.4.2. Precisão	53
4.5.1.4.3. Linearidade	54
4.5.1.4.4. Sensibilidade	54
4.5.1.4.5. Estabilidade.....	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1. Obtenção e caracterização das substâncias de interesse.....	57
5.1.1. Análise do teor de FURO no complexo de inclusão.....	57
5.1.2. Caracterização das substâncias utilizando a técnica termoanalítica (DSC e TG).....	58
5.2. Estudo de permeabilidade efetiva das substâncias de interesse nos segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo)	61
5.2.1. Estudo de permeabilidade efetiva das substâncias de interesse nos segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo) sob a influência de inibidores de P-gp e de CYP3A4.....	73
5.2.2. Taxa de fluxo de água das substâncias de interesse nos segmentos intestinais.....	81
5.2.3. Análise histológica dos segmentos contendo a FURO CD.....	85
5.3. Validação do método cromatográfico para a quantificação de FURO e dos marcadores METO e FLUOR.....	87
5.3.1. Linearidade.....	87
5.3.2. Precisão, Exatidão, LD e LQ.....	91
5.3.3. Estabilidade.....	92
5.3.3.1. Estabilidade de curta duração e de ciclos de congelamento e descongelamento.....	92
6. CONCLUSÕES.....	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

ANEXOS

ANEXO I - INFORMAÇÕES PARA OS MEMBROS DA BANCA JULGADORA DE MESTRADO/DOCTORADO

ANEXO II - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DA FCF/USP

ANEXO III - FICHA DO ALUNO

ANEXO IV - *Curriculum lattes*

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Abs	Absorbância
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
α	Alfa
AP-BS	Alta permeabilidade e baixa solubilidade
β	Beta
BS-BP	Baixa solubilidade e baixa permeabilidade
°C	Graus Celsius
CAE	Camada de água estacionária
CD	Ciclodextrina / ciclodextrina
CDs	Ciclodextrinas / ciclodextrinas
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-fluor	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por fluorescência
cm	Centímetros
CQA	Controle de qualidade alto
CQB	Controle de qualidade baixo
CQM	Controle de qualidade médio
CV	Coeficiente de variação
DP	Desvio padrão
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
FDA	Food and Drug Administration
FLUOR	Fluoresceína / fluoresceína
FURO	Furosemida / furosemida
γ	Gama
g	Gramas
HP- β -CD	Hidroxipropil- β -Ciclodextrina / hidroxipropil- β -ciclodextrina
HE	Hematoxilina- eosina
METO	Metoprolol / metoprolol
MF	Mistura física
mg	Miligramas
mM	Mili Molar
min	Minutos
OMS	Organização Mundial de Saúde
P_{ef}	Permeabilidade efetiva
PI	Padrão Interno
P-gp	Glicoproteína P
%	Porcentagem
μ	Micro

µL	Microlitro
µg/mL	Micrograma por mililitro
nm	Nanômetro
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
TFA	Taxa de Fluxo de Água / taxa de fluxo de água
TG	Termogravimetria
TGI	Trato Gastrointestinal
tr	Tempo de Retenção
USP	United States Pharmacopeia
WHO	World Health Organization

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração dos marcadores na solução de perfusão para o estudo de permeabilidade utilizando o modelo de perfusão <i>in situ</i> sendo metoprolol (METO) e fluoresceína (FLUOR).....	43
Tabela 2 - Concentração de FURO e FURO CD na solução de perfusão para o estudo de permeabilidade utilizando o modelo de perfusão <i>in situ</i>	44
Tabela 3 - Concentrações das soluções utilizadas de cada uma das substâncias empregadas no estudo para a construção das curvas analíticas para as análises da FURO (furosemida), METO (metoprolol) e FLUOR (fluoresceína).....	49
Tabela 4 - Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação FURO (furosemida), METO (metoprolol) e FLUOR (fluoresceína) nas amostras obtidas dos estudos de permeabilidade.....	51
Tabela 5 - Concentrações utilizadas para o preparo das soluções de controle de qualidade (CQ) de FURO (furosemida), METO (metoprolol) e FLUOR (fluoresceína) (CQA -CQ alto; CQM - CQ médio; CQB -CQ baixo).....	53
Tabela 6 - Termos utilizados para descrever as substâncias empregadas no presente trabalho.....	57
Tabela 7 - Teor de FURO na matéria-prima empregada na obtenção do complexo e FURO CD conforme descrito no item 4.4.1.2.1.....	58
Tabela 8 - Valores médios ($n = 6$) de permeabilidade efetiva ($P_{ef} \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$); os desvios padrões ($DP \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$) e desvios padrões relativos (DPR %) para os grupos de marcadores de permeabilidade (METO e FLUOR) obtidos a partir do modelo de perfusão <i>in situ</i> de passagem tripla.....	62
Tabela 9 - Valores médios ($n = 6$) de permeabilidade efetiva (P_{ef}) obtidos no presente trabalho para os três segmentos de estudo (duodeno, jejuno e íleo) para FLUOR e resultados obtidos a partir da literatura com emprego de diversos métodos para a avaliação da permeabilidade de FLUOR.....	65
Tabela 10 - Valores médios ($n = 6$) de permeabilidade efetiva (P_{ef}) obtidos no presente trabalho para os três segmentos de estudo (duodeno, jejuno e íleo) para METO e resultados obtidos a partir da literatura com emprego de diversos métodos para avaliação da permeabilidade de METO.....	66
Tabela 11 - Valores médios ($n = 7$) de permeabilidade efetiva ($P_{ef} \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$); os desvios padrões ($DP \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$) e desvios padrões relativos (DPR %) para os grupos de estudo (FURO e FURO CD) obtidos a partir do modelo de perfusão <i>in situ</i> de passagem tripla.....	69
Tabela 12 - Valores médios ($n = 7$) de permeabilidade efetiva (P_{ef}) obtidos no presente trabalho para os três segmentos de estudo (duodeno, jejuno e íleo) para FURO e resultados obtidos a partir da literatura com emprego de diversos métodos para avaliação da permeabilidade de FURO.....	70
Tabela 13 - Valores médios ($n = 7$) de permeabilidade efetiva (P_{ef}) obtidos no presente trabalho para os três segmentos de estudo (duodeno, jejuno e íleo) para FURO CD e resultados obtidos a partir da literatura com emprego de diversos métodos para avaliação da permeabilidade de FURO CD.....	72
Tabela 14 - Valores médios ($n = 7$) de permeabilidade efetiva ($P_{ef} \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$); os desvios padrões ($DP \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$) e desvios padrões relativos (DPR %) para os grupos de estudo (FURO; FURO CD) sob influência dos inibidores de P-gp (VERA) e de CYP3A4 (CETO) obtidos a partir do modelo de perfusão <i>in situ</i> de passagem tripla.....	75

Tabela 15 - Valores médios ($n = 7$) de permeabilidade efetiva (P_{ef}) obtidos no presente trabalho para os três segmentos de estudo (duodeno, jejuno e íleo) para FURO sob ação do inibidor de P-gp e resultados obtidos a partir da literatura com emprego de diversos métodos para avaliação da permeabilidade de FURO com inibidor de P-gp.....	76
Tabela 16 - Valores médios ($n = 7$) de permeabilidade efetiva (P_{ef}) obtidos no presente trabalho para os três segmentos de estudo (duodeno, jejuno e íleo) para FURO sob ação de inibidores de CYP3A4 e resultados obtidos a partir da literatura com emprego de diversos métodos para avaliação da permeabilidade de FURO com inibidor de CYP3A4.....	76
Tabela 17 - Valores de p e T resultantes da comparação estatística dos resultados de P_{ef} para as substâncias de estudo FURO e FURO CD, contendo ou não os inibidores de P-gp e de CYP3A4 e ainda, os marcadores de alta e baixa permeabilidades, sendo respectivamente, METO e FLUOR, considerando $p < 0,05$	80
Tabela 18 - Valores médios referentes à TFA ($\mu\text{L/h/cm}$) obtidos a partir do método gravimétrico para a avaliação da permeabilidade intestinal nos três segmentos selecionados em animais pertencentes ao grupo controle METO e FLUOR.....	83
Tabela 19 - Valores médios referentes à TFA ($\mu\text{L/h/cm}$) obtidos a partir do método gravimétrico para a avaliação da permeabilidade intestinal nos três segmentos selecionados em animais pertencentes ao grupo de estudo contendo FURO e FURO CD.....	83
Tabela 20 - Valores médios referentes à TFA ($\mu\text{L/h/cm}$) obtidos a partir do método gravimétrico para a avaliação da permeabilidade intestinal nos três segmentos selecionados em animais pertencentes ao grupo de estudo sob ação do inibidor de P-gp, VERA, nos fármacos FURO e FURO CD.....	84
Tabela 21 - Valores médios referentes à TFA ($\mu\text{L/h/cm}$) obtidos a partir do método gravimétrico para a avaliação da permeabilidade intestinal nos três segmentos selecionados em animais pertencentes ao grupo de estudo sob ação do inibidor da CYP3A4, CETO, nos fármacos FURO e FURO CD.....	84
Tabela 22 - Parâmetros relacionados à regressão linear das curvas analíticas obtidas para a quantificação de METO, FLUOR e FURO por CLAE e detecção por fluorescência.....	88
Tabela 23 - Parâmetros obtidos a partir da média de três leituras em três dias distintos para a obtenção de LD; LQ; Precisão e Exatidão para a quantificação de METO, FLUOR e FURO.....	91
Tabela 24 - Resultados referentes ao estudo de estabilidade do metoprolol, fluoresceína e furosemda em amostras de perfusatos comparando análises imediatas de amostras recém preparadas com amostras descongeladas e mantidas por seis horas sob temperatura ambiente.....	93
Tabela 25 - Resultados referentes ao estudo de estabilidade do METO; FLUOR e FURO em amostras de perfusatos, comparando análises imediatas de amostras recém preparadas com amostras mantidas à temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e posteriormente submetidas à sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento.....	94

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Cálculo do teor da furosemida	38
Equação 2 - Cálculo da permeabilidade efetiva	45
Equação 3 - Cálculo da densidade (d) de cada amostra coletada.....	46
Equação 4 - Cálculo para taxa de fluxo de água	46
Equação 5 - Cálculo da exatidão.....	52
Equação 6 - Cálculo da precisão.....	53
Equação 7 - Cálculo do limite de detecção.....	54
Equação 8 - Cálculo do limite de quantificação.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1a - Visão macroscópica das vilosidades intestinais (Adaptado de GABRIELRBRUNOABIOIFES, 2014).....	10
Figura 3.1b - Visão microscópica do intestino delgado (Adaptado de FISIOLOGIA HUMANA, 2014; TALENS, 2008).....	11
Figura 3.1.1a - Demonstração da estrutura de um enterócito (Adaptado de de JOHNSON, 2005).....	12
Figura 3.1.1b - Demonstração das principais proteínas presentes nas junções íntimas dos enterócitos (Adaptado de GONZÁLEZ-MARISCAL <i>et al.</i> , 2014).....	14
Figura 3.2a - Principais vias de absorção de fármacos: (a) transporte passivo transcelular; (b) transporte mediado por carreadores, (c) transporte passivo paracelular, (d) transporte ativo efluxo dependente de ATP (limitada por P-gp, limita a absorção do fármaco) e (e) transporte ativo mediado por enzimas metabólicas das células (Adaptado de BALIMANE; CHONG, 2005).....	18
Figura 3.2b - Ilustração do mecanismo de transporte facilitado sob ação das proteínas carreadoras, também denominadas permeases (Adaptado de SOBIOLOGIA, 2015).....	18
Figura 3.2c - A endocitose ilustrada em suas três maneiras: A. fagocitose (envolvendo partículas sólidas); B. pinocitose (envolvendo partículas líquidas) e C. endocitose mediada por um receptor (ligação de uma molécula extracelular com o receptor proteico da membrana celular) (Adaptado de WIKIWAND, 2015).....	18
Figura 3.2.2.1a - Modelo de perfusão <i>in situ</i> de passagem simples (Adaptado de ZHANG <i>et al.</i> , 2012).....	28
Figura 3.2.2.1b - Modelo de perfusão <i>in situ</i> de tripla passagem (Adaptado de DAHAN; WEST; AMIDON, 2009).....	28
Figura 3.3. - Estrutura molecular da furosemda.....	29
Figura 4.4.1.1. - Etapas da preparação do complexo: (A) béquer com tampão fosfato contendo FURO e HP- β -CD sob agitação em agitador magnético (B) solução pronta (C) solução em processo de congelamento (D) solução submetida ao processo de liofilização.....	37
Figura 4.4.2.1a - Etapas da preparação para execução do processo cirúrgico: (A) rato com peso entre 250 a 300 gramas já anestesiado; (B) posicionamento adequado para iniciar processo cirúrgico; (C) demarcação do local onde haverá incisão; (D) abertura da cavidade abdominal.....	41
Figura 4.4.2.1b - Etapa de inserção de cateteres (cor amarelo) nos segmentos intestinais. 1. duodeno; 2. jejuno e 3. íleo para posterior coleta de amostras (cateteres laranjas): 1a. duodeno; 2a. jejuno e 3a. íleo.....	41
Figura 5.1.2a - Curva DSC obtida sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min de FURO (pura); da HP- β -CD (pura); FURO CD e; mistura física FURO/HP- β -CD (na proporção 1:1).....	59
Figura 5.1.2b - Curva TG/DTG obtida sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min de FURO (pura); HP- β -CD (pura); FURO CD e; mistura física FURO/HP- β -CD (na proporção 1:1).....	60
Figura 5.2a - Representação gráfica dos resultados de P_{ef} para os marcadores de alta e baixa permeabilidades sendo respectivamente, METO e FLUOR e para os fármacos: FURO e FURO CD por meio do modelo de perfusão <i>in situ</i> . Os resultados representam a média de seis determinações para os marcadores e de sete determinações para os demais grupos. As barras de erros	

representam os desvios padrão para cada substância e as médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$).....73

Figura 5.2.1a - Representação gráfica dos resultados de P_{ef} para FURO com seus respectivos inibidores de P-gp e CYP3A4 por meio do modelo de perfusão *in situ*. Os resultados representam a média de sete determinações para esses grupos. As barras de erros representam os desvios padrão para cada substância e as médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$).....77

Figura 5.2.1b - Representação gráfica dos resultados de P_{ef} para a FURO CD com seus respectivos inibidores de P-gp e CYP3A4 por meio do modelo de perfusão *in situ*. Os resultados representam a média de sete determinações para esses grupos. As barras de erros representam os desvios padrão para cada substância e as médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$).....78

Figura 5.2.1c. - Representação gráfica dos resultados obtidos para todas as substâncias utilizadas para os estudos empregando o modelo de perfusão *in situ* nos diferentes segmentos intestinais. Em **A**, observa-se o comportamento de cada substância em cada segmento intestinal de estudo e ainda, que não houve diferença estatística entre os segmentos de estudo (duodeno, jejuno e íleo). Em **B**, observa-se a intensidade de permeação de cada substância avaliada nos diferentes segmentos intestinais. Em **C**, observa-se detalhadamente que, não houve diferença estatística quanto à permeação nos segmentos de estudo (duodeno, jejuno e íleo). Em **D**, observa-se o impacto dos inibidores de P-gp e de CYP3A4 nos segmentos intestinais tanto para FURO quanto para FURO CD.....79

Figura 5.2.1d. - Ilustração dos resultados obtidos para os valores de p e de T de todas as substâncias utilizadas para os estudos empregando o modelo de perfusão *in situ* de passagem tripla. Os valores que não compreendem zero em seus intervalos são considerados significativamente diferentes de modo que, quando contemplam zero nos intervalos, pode-se afirmar que não houve diferença significativa entre as substâncias comparadas.....81

Figura 5.2.3. - Fotomicrografias das vilosidades intestinais obtidas antes (isentas de fármacos) e após o ensaio de perfusão *in situ* com FURO CD. Nos grupos controle (A; B; C) observa-se a arquitetura vilositária preservada (HE) e nos grupos de estudo também observa-se a estrutura conservada para os três segmentos de estudo. Em 1 observa-se a presença de Glândulas de Brunner característica do duodeno; em 2 observa-se vilosidades alongadas características do jejuno e em 3, observa-se as Células de Paneth características do íleo.....86

Figura 5.3.1a - Curvas analíticas obtidas para (A) METO; (B) FLUOR e; (C) FURO utilizando o método CLAE com detector de fluorescência.....88

Figura 5.3.1b - Cromatogramas obtidos para: (1) solução de perfusão isenta de substância de estudo (branco); (2) METO (marcador de alta permeabilidade) e PROP (padrão interno); (3) FLUOR (marcador de baixa permeabilidade) e PROP (padrão interno) e; (4) FURO e PROP (padrão interno) utilizando o método CLAE com detector de fluorescência.....90

RESUMO

ROSSATO, J.P.M. **Avaliação da permeabilidade intestinal da furosemida e da furosemida complexada com hidroxipropil- β -ciclodextrina por meio do modelo de perfusão *in situ* de passagem tripla em ratos.** 2015. 165f. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A furosemida é um fármaco de ação diurética e amplamente utilizado em tratamentos de doenças renais, cardíacas e pulmonares. Sua absorção é problemática e de alta variabilidade inter e intraindividual. Este fármaco tem sido classificado como pertencente às classes II (baixa solubilidade e alta permeabilidade) ou IV (baixa permeabilidade e baixa solubilidade) do Sistema de Classificação de Biofarmacêutica (SCB). Em estudos anteriores da equipe de pesquisa, SPRICIGO e colaboradores (2008) e SILVA (2014) desenvolveram complexos de furosemida com hidroxipropil- β -ciclodextrina que permitiram a otimização da solubilidade deste fármaco. Entretanto, dados sobre a sua permeabilidade intestinal, quando complexado, não foram determinados. Somando-se a isto, a literatura apresenta informações distintas em relação a este parâmetro, o que corrobora a importância de se avaliar a permeabilidade deste fármaco. Diversas técnicas têm sido empregadas para a avaliação da permeabilidade intestinal dos fármacos. No presente trabalho empregou-se o modelo de perfusão *in situ* de passagem tripla, cuja técnica possibilita avaliar a permeabilidade em três segmentos diferentes em um mesmo animal e ainda, apresenta características interessantes, pois trata-se de um método que proporciona, durante todo o experimento, condições mais próximas daquelas encontradas durante o processo *in vivo* de absorção de fármacos no intestino tais como: suprimento sanguíneo, inervação intacta, preservação das proteínas transportadoras de membranas e presença da camada de muco. O presente trabalho foi dividido nas seguintes etapas: (i) obtenção da furosemida complexada com hidroxipropil- β -ciclodextrina, (ii) caracterização dos fármacos utilizando técnicas de análises térmicas, (iii) estudo de perfusão *in situ* de passagem tripla nos três segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo) de ratos machos *Wistar* na ausência e na presença de inibidores da glicoproteína P e de enzimas metabolizadoras CYP3A4 com posterior análise estatística do impacto da ciclodextrina e inibidores na permeabilidade da furosemida e; (iv) análise histológica das microvilosidades intestinais após o ensaio de perfusão *in situ* nos três segmentos intestinais. Os valores encontrados em cada segmento para furosemida complexada foram: $8,58 \pm 0,002 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$; $9,15 \pm 0,003 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ e; $8,06 \pm 0,002 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$, respectivamente para duodeno, jejuno e íleo enquanto que para furosemida pura encontraram-se os seguintes: $3,42 \pm 0,08 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ para duodeno; $3,87 \pm 0,11 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ para jejuno e $3,08 \pm 0,001 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ para íleo. Assim sendo, os valores obtidos para a permeabilidade da furosemida complexada foram significativamente superiores ($p < 0,05$) aos da furosemida pura, sugerindo que, a ciclodextrina pode ter influência no mecanismo de transporte da furosemida, que é via passiva paracelular. Quanto aos mecanismos envolvidos na permeabilidade da furosemida através dos enterócitos, pode-se sugerir que observou-se pouca influência dos inibidores da glicoproteína P (P-gp) e da enzima CYP3A4, sugerindo que não há uma participação importante destes mecanismos em sua absorção intestinal.

Palavras chave: furosemida, hidroxipropil- β -ciclodextrina, perfusão *in situ*, glicoproteína P; CYP3A4; SCB.

ABSTRACT

ROSSATO, J.P.M. **Assessment of intestinal permeability of furosemide and furosemide complexed with hydroxypropyl- β -cyclodextrin by means of triple *in situ* perfusion model in rats.** São Paulo, 2015. 165p. [Master's Degree Dissertation]. Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo.

Furosemide, which is a diuretic drug, is widely used in heart, kidney and pulmonary disease treatments. The absorption is problematic with high variability inter and intra individuals. This drug has been classified as belonging to class II (low solubility and high permeability) or IV (low permeability and low solubility) of the Biopharmaceutical Classification System (BCS). In previous studies of the research team, Spricigo and colleagues (2008) and Silva (2014) developed complex of furosemide with hydroxypropyl- β -cyclodextrin which allowed the optimization of the solubility of this drug. However, datas concerning its intestinal permeability, when complexed, have not been determined. Addicted to this, the literature shows many information regarding to this parameter, which confirms the importance of the evaluation of the permeability of this drug. Some techniques have been employed in order to evaluate the intestinal permeability of drugs. In the present work, a triple single-pass intestinal perfusion technique was used for three different segments. This technique enables the evaluation of the permeability of different segments in the same animal and also has interesting features such as: it provides during all the experiment conditions closer to those found in *in vivo* process of a drug absorption in the gut; blood supply; intact innervations; preservation of membrane transporter proteins and presence of mucus layer. This study was divided into the following steps: (i) obtaining furosemide complexed with hydroxypropyl- β -cyclodextrin, (ii) characterization of drugs using techniques of thermal analysis, (iii) perfusion study *in situ* triple passage in three segments (duodenum, jejunum and ileum) from male *Wistar* rats in the absence and presence of inhibitors of P-glycoprotein and metabolizing enzymes CYP3A4 and subsequential statistical analysis of the impact of the cyclodextrin and the inhibitors in the permeability of furosemide and (iv) histological analysis of intestinal microvilli after *in situ* perfusion assay in three segments. The values found in each segment for complexed furosemide were: $8,58 \pm 0,002 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$; $9,15 \pm 0,003 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$; $8,06 \pm 0,002 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$, respectively for duodenum, jejunum and ileum while for pure furosemide, the values were: $3,42 \pm 0,08 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ to duodenum; $3,87 \pm 0,11 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ to jejunum and $3,08 \pm 0,001 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ to ileum. Thus, the values obtained for the permeability of the complexed furosemide were significantly higher ($p < 0,05$) than those found for pure furosemide, suggesting that the cyclodextrin might have an influence on the transport mechanism of furosemide, which is passive paracellular route. About the mechanisms involved in the permeability of furosemide through the enterocytes, it can be suggested that there was little effect of P-glycoprotein (P-gp) inhibitors and CYP3A4 enzyme, suggesting that there is an important role of these mechanisms in the furosemide intestinal absorption.

Keywords: furosemide, hydroxypropyl- β -cyclodextrin, *in situ* perfusion, P-glycoprotein; CYP3A4; BCS.

1. INTRODUÇÃO

A furosemida é um diurético amplamente empregado no tratamento de insuficiências cardíacas congestivas, doenças renais crônicas e crises hipertensivas (GRANERO, 2010; DIAS; OLIVEIRA NETO; MARTINS, 2004; CHUNGI; DITTER; SMITH, 1979). A absorção é errática com alta variabilidade intra e interindividual e ainda, com biodisponibilidade que varia entre 20 a 80 %. É um fármaco hidrofílico e que possui algumas particularidades, a título de exemplo é o fato de possuir duas classificações no Sistema de Classificação Biofarmacêutico (SCB), sendo classe II (WHO, 2006) ou ainda, classe IV (AL-MOHIZEA, 2010; GRANERO, 2010; DAVIS, 2005).

A furosemida é praticamente insolúvel em água (<1 mg/mL) e com isso, várias técnicas têm sido utilizadas para aumentar a sua solubilidade no estado sólido. Dentre elas, destaca-se a complexação com ciclodextrinas, técnica desenvolvida pela equipe de nosso laboratório, que demonstrou ser adequada para a melhoria das propriedades da molhabilidade, solubilidade, estabilidade e da dissolução da furosemida (SILVA, 2014; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010; SPRICIGO *et al.*, 2008; DEVARAKONDA *et al.*, 2007).

Em relação à permeabilidade, a literatura descreve que sua absorção intestinal se dá por meio de transporte passivo paracelular, ou seja, através das junções íntimas ou oclusivas entre os enterócitos (KAUKONEN *et al.*, 2007; FLANAGAN; TAKAHASHI; BENET, 2002). Estudos têm sugerido que a furosemida seja um forte substrato para a glicoproteína P, o que contribuiria ainda mais para uma baixa permeabilidade e portanto, para a sua classificação como fármaco pertencente à classe IV do SCB (PERIOLI *et al.*, 2011; GRANERO *et al.*, 2010; VARMA *et al.*, 2005; FLANAGAN; TAKAHASHI; BENET, 2002). Ainda, não foram encontrados relatos na literatura de que a furosemida também seja um possível metabólito da CYP3A4.

Dentre os métodos empregados para avaliar a permeabilidade dos fármacos, destaca-se a perfusão *in situ* que é caracterizado por proporcionar, durante todo o experimento, condições mais próximas daquelas encontradas durante o processo *in vivo* de absorção de fármacos no intestino, tais como: suprimento sanguíneo, inervação intacta, preservação das proteínas transportadoras de membranas e presença da camada de muco (LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2015; PEREIRA, 2011; DAHAN *et al.*, 2010; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; HO *et al.*, 2008; XIE *et al.*, 2008; BERGGREN, 2006).

Nesse sentido, o método de perfusão *in situ* destaca-se em relação aos demais métodos utilizados para determinar a permeabilidade, pois permite: caracterizar a permeabilidade intestinal dos fármacos e a cinética de absorção envolvida; elucidar os mecanismos de transportes envolvidos durante todo o processo de absorção e ainda, avaliar o impacto das enzimas metabolizadoras presentes na superfície e no interior dos enterócitos sobre a absorção dos fármacos no intestino) (LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2015; PEREIRA, 2011; DAHAN *et al.*, 2010; VOLPE, 2010; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; HO *et al.*, 2008; XIE *et al.*, 2008; BERGGREN, 2006; SONG; LI; LIU, 2006; VARMA *et al.*, 2005; KUNES *et al.*, 2005; LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; ROUGE; BURI; DOELKER, 1996; SCHURGERS *et al.*, 1986).

Adicionalmente à todas essas vantagens, destaca-se que o método de perfusão *in situ* de passagem tripla permite também, a obtenção de muitos resultados a partir de um só animal e como consequência, a diminuição da quantidade de animais a serem utilizados nos estudos (LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2015; LUO *et al.*, 2013; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009).

Na literatura, existem poucos trabalhos que descrevem a utilização do modelo de perfusão *in situ*, mais raros ainda são aqueles que contemplam ensaios que utilizam os três segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo) em um mesmo ensaio (LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2015; PEREIRA, 2011; VOLPE, 2010; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; XIE *et al.*, 2008; HO *et al.*, 2008; KUNES *et al.*, 2005; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Nesse sentido, para o presente trabalho, selecionou-se o modelo de perfusão *in situ* de passagem tripla utilizando ratos, contemplando simultaneamente os três segmentos intestinais (duodeno; jejuno e íleo) com o intuito de avaliar e comparar a permeabilidade intestinal da furosemida e da furosemida complexada com hidroxipropil- β -ciclodextrina. Ainda, foi avaliado o impacto de inibidores tanto de P-gp quanto de CYP3A4 sobre a permeabilidade da furosemida na forma pura e na forma complexada.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar e comparar a permeabilidade intestinal da furosemida e da furosemida complexada com hidroxipropil- β -ciclodextrina nos três segmentos intestinais, sendo eles: duodeno, jejuno e íleo, empregando-se o modelo de perfusão *in situ* de passagem tripla em ratos machos *Wistar*.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliação da permeabilidade da furosemida e da furosemida complexada com hidroxipropil- β -ciclodextrina na presença de inibidores de P-gp e de CYP3A4, nos diferentes segmentos intestinais (duodeno, jejuno, íleo);
- ✓ Obtenção e caracterização da furosemida complexada com hidroxipropil- β -ciclodextrina utilizando a técnica de liofilização seguindo procedimentos previamente desenvolvidos e descritos na literatura;
- ✓ Avaliação da influência da HP- β -CD e do modelo de perfusão *in situ* de passagem tripla na morfologia do epitélio intestinal dos ratos após a realização do ensaio, a partir das condições experimentais adotadas no presente trabalho.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Absorção de fármacos no trato gastrointestinal (TGI)

A via de administração oral de um medicamento é a rota mais comum e conveniente quando comparada às outras vias, pois é menos invasiva e de fácil manipulação. Além disso, as indústrias de medicamentos também têm preferência pelas formas farmacêuticas sólidas orais, devido aos seus menores custos de produção (PERIOLI; MUTASCIO; PAGANO, 2013; PERIOLI *et al.*, 2011; PINTO, 2010; VOLPE, 2010; BERGGREN, 2006; MASAOKA *et al.*, 2006).

Quando administrado por via oral, o fármaco necessita ser absorvido pelas membranas biológicas do epitélio intestinal de modo que, alcance a circulação sistêmica e consiga assim, gerar seu efeito terapêutico. Esse fenômeno é denominado de biodisponibilidade oral (STORPIRTIS; GAI, 2011).

Todos os processos cinéticos a que um fármaco está sujeito serão determinantes na biodisponibilidade oral do mesmo. Processos esses que envolvem: a absorção, a distribuição, o metabolismo e excreção. Assim, biodisponibilidade oral está diretamente relacionada à quantidade absorvida de um fármaco e à velocidade pelo qual estes processos ocorrem (STORPIRTIS; GAI, 2011; GONÇALVES, 2010; SHARGEL; YO, 2005; WATERBEEMD, 2000).

A biodisponibilidade oral ideal ocorre quando o fármaco tem máxima solubilidade e máxima permeabilidade no sítio de absorção. Portanto, a quantidade absorvida de fármaco depende principalmente das características de solubilidade e de permeabilidade do mesmo. Tais aspectos são tão importantes que, em 1995, AMIDON e colaboradores desenvolveram o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) como ferramenta para facilitar e orientar o desenvolvimento de novos fármacos e de formulações farmacêuticas (ESTUDANTE *et al.*, 2013; PAPADOPOULOU *et al.*, 2008; MARTINEZ, AMIDON, 2002).

O SCB é fundamentado no princípio de que o controle da extensão e velocidade de absorção de um fármaco administrado por via oral, depende basicamente de dois aspectos: da solubilidade do próprio fármaco e de sua permeabilidade através das membranas biológicas. Nesse sentido, esta ferramenta classifica os fármacos em quatro classes distintas, em função da solubilidade em meio aquosos e permeabilidade (ESTUDANTE *et al.*, 2013; PAPADOPOULOU *et al.*, 2008; MARTINEZ, AMIDON, 2002).

O processo de absorção se dá principalmente na porção intestinal do TGI e depende da capacidade das moléculas do fármaco atravessarem a membrana das células intestinais. A membrana das células da mucosa gastrintestinal irá representar a principal barreira fisiológica à absorção de fármacos a partir do TGI. Isso se dá pelo fato desta ser composta por lipídeos, proteínas, lipoproteínas e polissacarídeos, apresentando uma estrutura de bicamada semipermeável que permite a passagem de algumas substâncias e ao mesmo tempo, impede ou limita a passagem de outras. Assim, para as moléculas polares e íons, torna-se impermeável, impedindo a passagem das mesmas enquanto que, para as substâncias lipossolúveis, a passagem pela membrana gastrintestinal é favorecida (SJÖGREN *et al.*, 2014; PERIOLI; MUTASCIO; PAGANO, 2013; GONÇALVES, 2010; SHARGEL; WU-PONG; YU, 2005; AULTON, 2005; MIRET; ABRAHAMSE; GROENE, 2004; ZANINI; OGA, 1994).

Infinitos são os fatores que podem influenciar no processo de absorção e portanto, na biodisponibilidade, sobretudo aqueles relacionados à solubilidade dos fármacos nos líquidos do TGI e à permeabilidade através das membranas dos enterócitos. Dentre eles, destacam-se: (i) os fatores físico-químicos relacionados ao fármaco; características moleculares; grau de ionização; solubilidade; lipofilicidade (coeficiente de partição óleo/água - *Log P*); tamanho de partícula; polimorfismo; (ii) os fatores farmacêuticos (forma farmacêutica; excipientes; tecnologia de produção) e (iii) os fatores fisiológicos relacionados às características do sítio de absorção (SJÖGREN *et al.*, 2014; PERIOLI; MUTASCIO; PAGANO, 2013; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2013; FANGUEIRO *et al.*, 2012; ESCRIBANO *et al.*, 2012; BRASIL, 2012; CORÁ *et al.*, 2011; STORPIRTIS; GAI, 2011; GONÇALVES, 2010; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2000; MACHERAS & ARGYRAKIS, 1997).

Considerando a via de administração oral, os principais aspectos fisiológicos que estão relacionados ao processo de absorção podem ser destacados os seguintes: pH dos líquidos presentes no TGI; velocidade de esvaziamento gástrico; motilidade intestinal; estabilidade do fármaco nos líquidos presentes; influência dos alimentos; superfície de absorção e mecanismos envolvidos na permeabilidade através dos enterócitos) (SJÖGREN *et al.*, 2014; PERIOLI; MUTASCIO; PAGANO, 2013; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2013; FANGUEIRO *et al.*, 2012; ESCRIBANO *et al.*, 2012; BRASIL, 2012; CORÁ *et al.*, 2011; STORPIRTIS; GAI, 2011; GONÇALVES,

2010; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2000; MACHERAS & ARGYRAKIS, 1997).

O TGI tem como principais funções os processos de digestão, secreção e absorção de substâncias. É composto por quatro principais órgãos (esôfago, estômago, intestino delgado e intestino grosso), os quais diferem em relação às propriedades, constituição de suas membranas e padrões de motilidade. Tais diferenças promovem variações nos processos de absorção dos fármacos (PERIOLI; MUTASCIO; PAGANO, 2013; CORÁ *et al.*, 2011; FAGERHOLM; LINDAHL; LENNERNÄS, 2007; SALANA; EDDINGTON; FASANO, 2006; SHARGEL; WU-PONG; YU, 2005; WILSON, 2000; FAGERHOLM *et al.*, 1999; KARARLI, 1995; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

Outro aspecto de destaque é a variação do pH ao longo do TGI, sendo ácido a partir do estômago e tornando-se alcalino, conforme avança para o intestino grosso. Entretanto, o valor do pH pode ser modificado dependendo da enfermidade, da ingestão de alimentos e idade do paciente (PERIOLI; MUTASCIO; PAGANO, 2013; CORÁ *et al.*, 2011; WARD, 2010; SALANA; EDDINGTON; FASANO, 2006; SHARGEL; WU-PONG; YU, 2005; MARTINEZ; AMIDON, 2002; FAGERHOLM *et al.*, 1999; CHARMAN *et al.*, 1997; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995; RUSSELL *et al.*, 1993).

A absorção de fármacos se dá principalmente no intestino delgado, pois trata-se de um órgão bastante longo (com cerca de 6 metros), representando cerca de 60% do TGI e que apresenta superfície com alta capacidade absorptiva em função das vilosidades e microvilosidades. O intestino delgado está dividido em duodeno, jejuno e íleo (CORÁ *et al.*, 2011; WARD, 2010; SALANA; EDDINGTON; FASANO, 2006; SHARGEL; WU-PONG; YU, 2005; MARTINEZ; AMIDON, 2002; FAGERHOLM *et al.*, 1999; CHARMAN *et al.*, 1997; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995; RUSSELL *et al.*, 1993).

A porção interna do intestino delgado (luminal) apresenta as vilosidades e as dobras de Kerckring. A superfície das vilosidades é constituída por células epiteliais, sobretudo por enterócitos, que representam 90% das células (CORÁ *et al.*, 2011; HILLGREN; KATO; BORCHARDT, 1995). Além dos enterócitos, o epitélio intestinal possui em sua estrutura: células caliciformes, células de Paneth (características do segmento do jejuno), células de Brunner (características do segmento do íleo), dentre outras (CAPALDO; NUSRAT, 2015; CORÁ *et al.*, 2011; WARD, 2010;

MARTINEZ; AMIDON, 2002; CHARMAN *et al.*, 1997; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995; RUSSELL *et al.*, 1993). As células caliciformes possuem as funções de secretar muco e produzir glicoproteínas que, lubrificam e protegem o epitélio intestinal. A distribuição das células caliciformes são escassas no duodeno, porém vai se intensificando conforme se direciona ao íleo (CAPALDO; NUSRAT, 2015; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

A **Figura 3.1a** e a **Figura 3.1b** ilustram a parede interna do intestino que, quando observado a olho nu, nota-se uma série de pregas que formam as dobras da mucosa (as dobras de Kerckring) e da submucosa intestinais e quando observado microscopicamente, observa-se os enterócitos, as estruturas como os vilos e as vilosidades intestinais aparecem como evaginações da membrana da mucosa que se projetam na luz do intestino delgado.

Figura 3.1a - Visão macroscópica das vilosidades intestinais (Adaptado de GABRIELRBRUNOABIOFES, 2014).

Figura 3.1b - Visão microscópica do intestino delgado (Adaptado de FISILOGIA HUMANA, 2014; TALENS, 2008).

3.1.1. Enterócitos

Os enterócitos são células epiteliais altamente polarizadas que revestem o lúmen do TGI e são constituídas por um lado apical (lúmen do intestino) e outro basolateral (camada serosa). O lado apical da membrana se difere do lado basolateral quanto  morfologia, composição bioquímica e tipos de proteínas envolvidos no mecanismo de absorção de um fármaco. Quanto  composição bioquímica, o lado basolateral da membrana  caracterizado por ser mais fluído e permeável do que o lado apical. Isso se deve ao fato de, o lado basolateral possuir teores de colesterol e glicolípídeos menores do que quando comparados ao teores do lado apical da membrana (CORÁ *et al.*, 2011; FAGERHOLM *et al.*, 1999; FAGERHOLM; LINDAHL; LENNERNS, 1997; KARARLI, 1995).

Os enterócitos, presentes nas microvilosidades que formam a camada apical, estão interligados por conta de um complexo intercelular, chamado juneso intimas ou ainda, juneso oclusivas. Além das juneso intimas, o enterócito  também, estruturalmente composto por juneso de adesão e de desmosomos (YU; YANG, 2009). A **Figura 3.1.1a** ilustra a estrutura de um enterócito.

A característica lipídica presente tanto no lado apical da membrana enterócitos quanto nas junções íntimas é a principal barreira física para a absorção de fármacos. As microvilosidades são responsáveis por aumentarem a superfície e a capacidade de absorção de nutrientes e ainda realizarem o movimento peristáltico. Esse último ocorre graças à contração das células musculares lisas presentes no eixo dos vilos e assim, bombeiam todo o conteúdo presente nos capilares linfáticos em direção aos vasos linfáticos do mesentério (YU; YANG, 2009; FAGERHOLM; LINDAHL; LENNERNÄS, 2007; SALANA; EDDINGTON; FASANO, 2006; FAGERHOLM *et al.*, 1999; KARARLI, 1995).

Figura 3.1.1a - Demonstração da estrutura de um enterócito (Adaptado de de JOHNSON, 2005).

Dentre as principais estruturas ilustradas na **Figura 3.1.1a**, destacam-se as junções íntimas que são estruturas de adesão célula-célula localizadas na porção lateral da superfície apical da membrana celular (FU *et al.*, 2015). Elas permitem, de modo limitado através da via paracelular (**item 3.2.1.**), a entrada de água, nutrientes, íons, moléculas para o lado basal do enterócito. Trata-se de um complexo, cujas barreiras não são estáticas, com estruturas altamente dinâmicas e que podem ser moduladas dependendo da substância a ser permeada. Além do mais, as junções íntimas contribuem para a manutenção da polaridade celular controlando a polarização apical-basal e orientando o transporte vesicular à superfície da célula, sinalizando os mecanismos que guiam o comportamento das células e assim,

influenciando diretamente na seletividade do tipo de transporte e metabolismo dos fármacos (FU *et al.*, 2015; BALDA; MATTER, 2014; GONZÁLEZ-MARISCAL *et al.*, 2014; ITALLIE; ANDERSON, 2014; GONÇALVES, 2010).

As junções íntimas são compostas por várias proteínas e dentre as principais, podem-se citar: as claudinas, as ocludinas, as proteínas da família Marvel (marvel D3 e tricelulina) e as proteínas citoplasmáticas (tais como ZO-1, ZO-2 e ZO-3) (FU *et al.*, 2015; STAAT *et al.*, 2015; MATTER; BALDA, 2014). As proteínas presentes nas junções íntimas variam quanto ao nível de expressão e distribuição fazendo com que a permeação das substâncias no epitélio intestinal também seja variada (FU *et al.*, 2015). A **Figura 3.1.1b** ilustra as proteínas presentes na estrutura dos enterócitos.

As ocludinas e as claudinas são classificadas como proteínas transmembranares e são responsáveis por regular o fluxo de íons e solutos entre as junções íntimas. Essas proteínas estão envolvidas na reorganização das estruturas das junções íntimas permitindo que, pequenas moléculas solúveis possam atravessar a junção íntima por via paracelular (**item 3.2.1.**) (SUZUKI *et al.*, 2015; STAAT *et al.*, 2015; MATTER; BALDA, 2014).

Como característica de cada proteína, a claudina possui peso molecular que varia de 20 a 27 kDa. Já a ocludina possui duas isoformas, sendo a ocludina não fosforilada e a fosforilada, ambas com peso molecular de 65 kDa. Porém, a isoforma fosforilada da ocludina é a que medeia, juntamente com a claudina, o mecanismo via paracelular (**item 3.2.1.**) (FU *et al.*, 2015; STAAT *et al.*, 2015; HARTSOCK; NELSON, 2008; BALDA; MATTER, 2000; FURUSE *et al.*, 1998; FURUSE *et al.*, 1993).

As proteínas citoplasmáticas (ZO-1, ZO-2 e ZO-3) são responsáveis por sustentarem o citoesqueleto dos enterócitos e também servem como barreira física para a permeação de xenobióticos que possam atravessar o epitélio intestinal (FU *et al.*, 2015; STAAT *et al.*, 2015; BALDA; MATTER, 2000; FURUSE *et al.*, 1998; FURUSE *et al.*, 1993).

Figura 3.1.1b - Demonstração das principais proteínas presentes nas junções íntimas dos enterócitos (Adaptado de GONZÁLEZ-MARISCAL *et al.*, 2014).

3.2. Permeabilidade dos fármacos no TGI

A permeabilidade intestinal de fármacos refere-se à capacidade de um determinado fármaco atravessar a membrana dos enterócitos. Sendo assim, a permeabilidade é baseada indiretamente na extensão da absorção de um fármaco em humanos e de modo direto, por meio da medida da velocidade de transferência de massa através da membrana intestinal humana. Além do mais, considera-se que, um fármaco apresenta alta permeabilidade quando sua biodisponibilidade absoluta for maior do que 90 % (ZAKERI-MILANI *et al.*, 2013; ESCRIBANO *et al.*, 2012; BRASIL, 2012; STORPIRTIS; GAI, 2011; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2000).

A permeabilidade de fármacos através da membrana biológica do epitélio intestinal pode ocorrer através de dois mecanismos sendo basicamente: paracelular (através das junções íntimas dos enterócitos) ou transcelular (através das membranas dos enterócitos). O transporte transcelular pode ocorrer de forma passiva, facilitada, ativa ou ainda, por endocitose. Enquanto que, o transporte paracelular ocorre apenas de forma passiva. A maioria dos fármacos permeiam por difusão passiva. Qualquer que seja o tipo de transporte, a condição necessária é que a substância deva estar dissolvida no meio quando em contato com a membrana (**Figura 3.2a**) (SJÖGREN *et al.*, 2014; ESTUDANTE *et. al.*, 2013; CORÁ

et. al, 2011; STORPIRTIS; GAI, 2011; ZHOU; QIU, 2009; CAO *et al.*, 2006; AULTON, 2005; ENGMAN, 2003; WATERBEEMD, 2000; ZANINI; OGA, 1994).

i. transporte passivo

No transporte passivo, a passagem das substâncias se dá a favor do gradiente de concentração entre os dois meios separados pela membrana biológica do epitélio intestinal e o movimento cessa, quando a concentração da substância ficar semelhante em ambos os lados ocorrendo assim, um equilíbrio. Esse tipo de transporte é subdividido em duas categorias sendo: transporte passivo transcelular e transporte passivo paracelular (SJÖGREN *et al.*, 2014; ZHOU; QIU, 2009; SHARGEL; WU-PONG; YU, 2005; AULTON, 2005; ENGMAN, 2003; WATERBEEMD, 2000; ZANINI; OGA, 1994).

O transporte passivo transcelular é um processo que ocorre quando a substância lipossolúvel dissolve-se na fase lipídica da membrana. A velocidade e a extensão do transporte dependem da diferença de concentração de fármaco entre os dois lados da membrana e de sua lipossolubilidade. Como exemplos de fármacos que utilizam esse mecanismo de transporte podem ser citados: lamivudina, estavudina, zidovudina (SJÖGREN *et al.*, 2014; ZHOU; QIU, 2009; SHARGEL; WU-PONG; YU, 2005; AULTON, 2005; ENGMAN, 2003; ZANINI; OGA, 1994).

Já o transporte passivo paracelular ocorre quando uma substância hidrossolúvel tem suas moléculas e/ou íons transportados de modo passivo através das junções intercelulares da membrana. Sendo assim, as características requeridas para esse tipo de transporte são hidrossolubilidade e tamanho de íons dos fármacos que devem ser menores do que essas junções. Além do mais, a carga elétrica gerada pelos íons do meio e o equilíbrio elétrico da membrana podem tanto facilitar como também dificultar a passagem de moléculas ionizadas pelas junções íntimas. A furosemida é um exemplo de fármaco que utiliza esse mecanismo de transporte (SJÖGREN *et al.*, 2014; ZHOU; QIU, 2009; SHARGEL; WU-PONG; YU, 2005; AULTON, 2005; ENGMAN, 2003; ZANINI; OGA, 1994).

ii. transporte ativo mediado por carreadores

O transporte ativo é caracterizado por transportar substâncias contra um gradiente de concentração que exige um gasto de energia celular. Nesse tipo de transporte, o processo dependerá da interação entre o fármaco e um transportador. É um processo saturável, já que o número de transportadores é limitado. Logo, há a possibilidade de ocorrer competição entre as moléculas do fármaco e moléculas de estrutura química semelhante e como consequência, a limitação da velocidade de transporte (SJÖGREN *et al.*, 2014; ZHOU; QIU, 2009; AULTON, 2005; ENGMAN, 2003; ZANINI; OGA, 1994).

Existem os transportadores de influxo e os transportadores de efluxo. Os primeiros são pertencentes à super família SLC e podem ser subdivididos em famílias OATP, OAT e OCT. Aqueles pertencentes à família OATP são responsáveis por transportarem metabólitos endógenos; hormônios tireoideanos; antimicrobianos; anti-histamínicos e ainda, diuréticos. Enquanto que, aqueles pertencentes à família OCT transportam cátions orgânicos como: substâncias neurotransmissoras; hormônios; anestésicos; betabloqueadores; antidepressivos e hipoglicemiantes orais. E finalmente, aqueles pertencentes à família OAT que são transportadores de ânions e que à título de exemplo, transportam os metabólitos endógenos (KÖNIG; MÜLLER; FROMM, 2013).

Já em relação aos transportadores de efluxo, dentre os principais podem-se destacar aqueles que integram a família ABC; integrantes das proteínas resistentes à multidrogas (MDR) e ainda, proteínas presentes nas células do câncer de mama (BCRP). Estes transportadores são muito abundantes na porção apical da membrana de enterócitos de órgãos e de tecidos, onde formam uma barreira bioquímica à absorção de xenobióticos, fazendo com que os mesmos retornem para o lúmen da membrana intestinal (ZHOU *et al.*, 2015; ESTUDANTE *et. al.*, 2013).

A molécula de glicose é um exemplo de substância que utiliza esse mecanismo de transporte (SJÖGREN *et al.*, 2014; ZHOU; QIU, 2009; AULTON, 2005; ENGMAN, 2003; ZANINI; OGA, 1994).

iii. transporte facilitado

Esse tipo de transporte, também denominado como difusão mediada por carreador, ocorre quando certas substâncias entram na célula a favor do gradiente de concentração, porém uma velocidade maior do que é permitida pela difusão

simples. Assim, este tipo de transporte se diferencia dos demais em função da velocidade de difusão, a qual tende a atingir uma velocidade máxima constante à medida que se aumenta a concentração da substância a ser difundida. O mecanismo responsável por limitar a velocidade da difusão facilitada é baseada na interação da substância transportada com um sítio específico da proteína transportadora, a qual é denominada permease (**Figura 3.2b**) (SOBIOLOGIA, 2015; DIFUSAO FACILITADA, 2015; PRESCOTT; HARLEY; KLEIN, 2002).

O soluto consegue atravessar a membrana com a assistência da permease e caso haja o aumento da concentração do soluto, atinge-se o ponto de saturação de todas as permeases e a velocidade permanece constante. A existência de diferentes solutos que competem pelas mesmas permeases, faz com que a presença de um determinado soluto dificulte a passagem de outro soluto. Aminoácidos e vitaminas são exemplos desse tipo de mecanismo (DIFUSAO FACILITADA, 2015; PRESCOTT; HARLEY; KLEIN, 2002).

iv. endocitose

A endocitose consiste de um transporte transcelular em que macromoléculas em solução, induzem a uma invaginação da membrana celular e quando inteiramente envolvidas, formam uma vesícula, as quais são transportadas para o interior dos enterócitos. A endocitose pode ocorrer de três maneiras: pinocitose (envolvendo partículas líquidas), fagocitose (envolvendo partículas sólidas) e endocitose mediada por um receptor (consistindo em uma ligação de uma molécula extracelular com o receptor da membrana celular, muitas vezes o receptor é a proteína denominada clatrina) (**Figura 3.2c**). Nucleotídeos, peptídeos e pequenas proteínas são transportados por meio deste mecanismo (WIKIWAND, 2015; GONÇALVES, 2010; ZHOU; QIU, 2009; AULTON, 2005; SHARGEL; WU-PONG; YU, 2005; ENGMAN, 2003; ZANINI; OGA, 1994).

Figura 3.2a - Principais vias de absorção de fármacos: (a) transporte passivo transcelular; (b) transporte mediado por carreadores, (c) transporte passivo paracelular, (d) transporte ativo efluxo dependente de ATP (limitada por P-gp, limita a absorção do fármaco) e (e) transporte ativo mediado por enzimas metabólicas das células (Adaptado de BALIMANE; CHONG, 2005).

Figura 3.2b - Ilustração do mecanismo de transporte facilitado sob ação das proteínas carreadoras, também denominadas permeases (Adaptado de SOBIOLOGIA, 2015).

Figura 3.2c - A endocitose ilustrada em suas três maneiras: A. fagocitose (envolvendo partículas sólidas); B. pinocitose (envolvendo partículas líquidas) e C. endocitose mediada por um receptor (ligação de uma molécula extracelular com o receptor proteico da membrana celular) (Adaptado de WIKIWAND, 2015).

3.2.1. P-gp e CYP3A4

Na membrana intestinal encontram-se presentes várias classes de transportadores e enzimas metabolizadoras responsáveis por expulsarem xenobióticos que seriam possíveis causadores de intoxicações ao organismo (SHIROTANI *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2015; ESTUDANTE *et. al*, 2013; MARIN, 2012; QUEVEDO; NIETO; BRIÑÓN, 2011; SHUGARTS; BENET, 2009; ZHOU; QIU, 2009; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007; CHAN; LOWES; HIRST, 2004; ENGMAN, 2003; KATSURA; INUI, 2003; ZANINI; OGA, 1994).).

Conforme descrito anteriormente, dentre os principais transportadores de efluxo podem-se destacar aqueles que integram a família ABC; integrantes das proteínas resistentes à multidrogas (MDR) e ainda, proteínas presentes nas células do câncer de mama (BCRP). Estes transportadores são muito abundantes na porção apical da membrana de enterócitos de órgãos e de tecidos, onde formam uma barreira bioquímica à absorção de xenobióticos fazendo com que os mesmos retornem para o lúmen da membrana intestinal (ZHOU *et al.*, 2015; ESTUDANTE *et. al*, 2013).

Nesse sentido, os transportadores podem estar associados à baixa biodisponibilidade de alguns fármacos, já que limitam a absorção de muitos deles (ZHOU *et al.*, 2015; ESTUDANTE *et. al*, 2013; MARIN, 2012; QUEVEDO; NIETO; BRIÑÓN, 2011; SHUGARTS; BENET, 2009; ZHOU; QIU, 2009; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007; CHAN; LOWES; HIRST, 2004; ENGMAN, 2003; KATSURA; INUI, 2003; ZANINI; OGA, 1994).

Os níveis de expressão para estes transportadores no intestino humano foram recentemente quantificados e dentre os transportadores destacam-se as P-gp, as quais integram a família ABC e utilizam o ATP como fonte de energia para bombear os substratos contra o gradiente de concentração, devolvendo-o ao lúmen. Vários estudos apontam que, a P-gp é mais específica para fármacos hidrofílicos, moléculas anfipáticas e catiônicas e que fatores como a presença de pontes de hidrogênio e o coeficiente de partição possam influenciar na velocidade de interação entre a P-gp e seu determinado substrato. As P-gp aumentam sua expressão de modo progressivo a partir do estômago até o intestino grosso (ZHOU *et al.*, 2015; YU

et al., 2014; ESTUDANTE *et al.*, 2013; QUEVEDO; NIETO; BRIÑÓN, 2011; DAHAN *et al.*, 2010; SONG; LI; LIU, 2006; VARMA *et al.*, 2005; CORNAIRE *et al.*, 2004).

Os fármacos podem ser, simultaneamente, substratos de vários transportadores de efluxo, o que sugere que haja várias combinações entre os transportadores ABC com o intuito de exteriorizar determinado fármaco do intestino. Além do mais, esses mesmos substratos poderiam servir também como inibidores, servindo de estratégia para melhorar a absorção de outros fármacos e otimizando assim, a biodisponibilidade (ESTUDANTE *et al.*, 2013; VARMA *et al.*, 2005).

Nesse sentido, SAUNA e colaboradores (2001) elucidaram em seus estudos, o ciclo catalítico da P-gp e apontaram os possíveis inibidores de P-gp, os quais incluíam os bloqueadores do canal de cálcio como o verapamil; imunossupressores como a ciclosporina A e ainda, antiestrogênicos tais como tamoxifeno e toremifena (SILVA JUNIOR *et al.*, 2015; VARMA *et al.*, 2003; SAUNA *et al.*, 2001).

Quanto às enzimas metabolizadoras, destacam-se as enzimas do citocromo P450 e suas isoformas. Tratam-se de enzimas que também desempenham um papel crucial no metabolismo de xenobióticos e substâncias endógenas e portanto, tem uma influência significativa sobre a ocorrência de interações medicamentosas especialmente, metabólica (SUMSAKUL; CHAIJAROENKUL; NA-BANGCHANG, 2015; ESTUDANTE *et al.*, 2013; KAMEL; HARRIMAN, 2013; WATANBE *et al.*, 2013; TANG *et al.*, 2011; BARREIRO; FRAGA, 2008; CHAN; LOWES; HIRST, 2004).

Nesse contexto, destaca-se a CYP3A4, a qual é caracterizada por ser a mais proeminente de todas as isoenzimas e é responsável por metabolizar substratos lipofílicos, ou seja, praticamente 50% dos medicamentos atualmente comercializados (ZHOU *et al.*, 2015). A CYP3A4 é expressa em altos níveis nas microvilosidades dos enterócitos e sua expressão é maior na porção superior do intestino do que na região inferior do mesmo (SUMSAKUL; CHAIJAROENKUL; NA-BANGCHANG, 2015; ZHOU *et al.*, 2015; WATANABE *et al.*, 2013; MARIN, 2012; QUEVEDO; NIETO; BRIÑÓN, 2011; SHUGARTS; BENET, 2009; ZHOU; QIU, 2009; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007; CHAN; LOWES; HIRST, 2004; ENGMAN, 2003; KATSURA; INUI, 2003; MARTINEZ, AMIDON, 2002; WACHER; SALPHATI; BENET, 2001; ZANINI; OGA, 1994; KIVISTÖ *et al.*, 1996).

Fármacos que são pouco ou incompletamente absorvidos pela mucosa intestinal estão mais expostos à essas enzimas, favorecendo o metabolismo pré-

sistêmico e reduzindo a biodisponibilidade. A alta variabilidade interindividual dessas isoenzimas pode levar indivíduos à riscos potenciais após a administração de fármacos (SUMSAKUL; CHAIJAROENKUL; NA-BANGCHANG, 2015; DESBANS *et al.*, 2013).

Na literatura, considera-se o cetoconazol como um dos fármacos inibidores de CYP3A mais potentes enquanto que o verapamil é considerado como um inibidor moderado (PERDAEMS *et al.*, 2010; VARMA *et al.*, 2005).

Alguns estudos sugerem que exista uma possível sinergia entre a P-gp e a enzima CYP3A4 de modo que, essa sincronia poderia afetar a biodisponibilidade de um fármaco. Assim, inibindo essa sinergia, as moléculas do fármaco que não forem afetadas pela P-gp passariam pelos enterócitos e seriam prontamente absorvidas. Enquanto que, aquelas que sofressem com a atuação da P-gp teriam sua taxa de absorção retardada, aumentando o tempo de exposição dessas à enzima CYP3A4 e dando a possibilidade das moléculas serem absorvidas através da recirculação das mesmas no enterócito (ESTUDANTE *et al.*, 2013; GONÇALVES, 2010; BONAMICI, 2009; BENET *et al.*, 1999).

3.2.2. Métodos empregados na avaliação da permeabilidade de fármacos

Os métodos aplicados para a determinação da permeabilidade são bastante relevantes e existem diversos modelos que podem ser empregados para essa finalidade, tais como: (i) os métodos *in vitro*, baseados em sistemas celulares e em sistemas artificiais; (ii) métodos *in vivo*, os quais empregam estudos em animais e em seres humanos; (iii) métodos *ex vivo*, que utilizam segmentos de tecidos invertidos e não invertidos de animais ou de seres humanos (iv) métodos *in silico*, que utilizam modelos computacionais e ainda; (v) métodos *in situ* que consistem na perfusão de fármacos em determinados segmentos do trato gastrointestinal (DEZANI *et al.*, 2013; LUO *et al.*, 2013; VOLPE, 2010).

O trânsito gastrintestinal pode ser somente avaliado através da utilização de métodos *in vivo* enquanto que, para se avaliar a permeabilidade, todos os métodos acima mencionados são viáveis (MIRET; ABRAHAMSE; GROENE, 2004).

a) Métodos *in vitro*

Os estudos de permeabilidade que empregam métodos *in vitro* podem ser realizados tanto por meio de cultura celulares, como monocamadas de células (Caco-2 e MDCK) ou por meio de sistemas artificiais, como as membranas paralelas artificiais, através do modelo PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*) (LUO *et al.*, 2013; REIS, 2013; REIS *et al.*, 2013; DEZANI *et al.*, 2013; GONÇALVES; SOUZA; STORPIRTIS, 2009).

As células Caco-2 são derivadas de adenocarcinoma de cólon humano e devem ser devidamente cultivadas por um período de 21 dias para formar a devida monocamada de células cilíndricas e polarizadas. Esse procedimento é necessário para obter junções íntimas, polaridade celular e alta expressão de mecanismos de efluxo como por exemplo, a P-gp. Comumente, a cultura é realizada sobre uma membrana permeável (geralmente feita de policarbonato) (REIS, 2013; REIS *et al.*, 2013; GONÇALVES; SOUZA; STORPIRTIS, 2009; SAMBUY *et al.*, 2005; MIRET; ABRAHAMSE; GROENE, 2004; MENON; BARR, 2003).

Além das células Caco-2, também são desenvolvidas outras linhagens, como por exemplo as células MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*), células derivadas de rim canino. Essa técnica apresenta como vantagem o fato de serem cultivadas por um período significativamente menor em relação ao método de Caco-2, pois o cultivo ocorre entre três a cinco dias. Outra característica é que a resistência elétrica transepitelial é menor quando comparada ao método de Caco-2 aproximando-se ainda mais das condições *in vivo*. Porém, como desvantagem apresenta o fato de ser derivado de células caninas, obtendo pequenas concentrações de transportadores e baixa atividade metabólica e não mimetizando fielmente as condições humanas (DEZANI *et al.*, 2013; PARAÍSO, 2012; VOLPE, 2010; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008).

Os métodos que utilizam sistemas artificiais são representados principalmente pelo ensaio denominado PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeation Assay* - membrana artificial paralela), que permitem a avaliação da permeabilidade somente

da via passiva transcelular. Neste ensaio, um “sanduíche” é formado por duas placas ambas contendo 96 poços, sendo que uma é considerada o compartimento doador, onde os fármacos a serem testados estão diluídos e a outra é considerada o compartimento receptor e apresenta membranas sintéticas impregnadas em solução de composição lipídica, cuja constituição é fosfolipídeo e mais especificamente, fosfaditilcolina e fosfaditiletonolamina (REIS, 2013; REIS *et al.*, 2013; DEZANI *et al.*, 2013; PARAÍSO, 2012; REIS; SINKÓ; SERRA, 2010; VOLPE, 2010; TAILLADART-BERTSCHINGER *et al.*, 2002; DUDEJA *et al.*, 1991).

As membranas formam uma barreira através da qual os fármacos migram por difusão. Considerando-se que, a maioria dos fármacos é absorvida, principalmente ou parcialmente, por meio de difusão transcelular passiva, o PAMPA pode representar uma ferramenta útil na determinação da permeabilidade (REIS, 2013; REIS *et al.*, 2013; DEZANI *et al.*, 2013; PARAÍSO, 2012; REIS; SINKÓ; SERRA, 2010; VOLPE, 2010; TAILLADART-BERTSCHINGER *et al.*, 2002; DUDEJA *et al.*, 1991). Entretanto, a falta dos transportadores de fármacos e das junções oclusivas paracelulares no modelo PAMPA, torna o método inadequado para avaliar a permeabilidade daqueles fármacos que são absorvidos por meio de transportadores de membranas ou através da via paracelular.

b) Métodos *in vivo*

Tais métodos empregam estudos em animais (rato, cão, coelho, rã, macaco) e em seres humanos e nestes avalia-se a quantidade de fármaco absorvida, por meio de parâmetros farmacocinéticos obtidos a partir de estudos de biodisponibilidade. Nesses estudos, amostras biológicas (sangue, plasma, soro, urina) são empregadas para a quantificação de fármacos. Entretanto, para todo e qualquer estudo que envolva voluntários e animais, deve-se respeitar os aspectos éticos envolvidos no uso dos mesmos (SILVA, 2014; PEREIRA, 2011; DEZANI, 2010; PORTA; KANO, 2009; KUNES *et al.*, 2005; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

c) Métodos *ex vivo*

Baseiam-se na determinação do fluxo do fármaco através do segmento intestinal de animais, o qual é isolado e posteriormente posicionado em uma câmara de difusão, que pode ser horizontal (câmara de Ussing) ou vertical (células de

Franz). Os fármacos são avaliados de acordo com a permeabilidade aparente, a qual é definida como sendo a taxa de acúmulo do fármaco nas compartimentos ou câmaras de interesse (REIS *et al.*, 2013; VOLPE, 2010; MIRET; ABRAHAMSE; GROENE, 2004).

Os métodos *ex vivo* possuem como princípio, a utilização de segmentos intestinais excisados, geralmente obtidos de roedores, que posteriormente serão montados entre dois compartimentos ou câmaras de difusão, sendo um denominado como receptor e o outro como doador e, de tempos em tempos pré determinados, haverá a coleta das amostras que futuramente serão quantificadas para a avaliação da permeabilidade (LENNERNÄS; NYLANDER; UNGELL, 1997). A viabilidade da membrana nesse método é mantida através de tampão Krebs-Ringer bicarbonato, piruvato, fumarato, glicose e glutamato (DEFERME *et al.*, 2002). Durante todo o período do ensaio, há suprimento de oxigênio e gás carbônico à solução tampão, não permitindo que haja qualquer perda da viabilidade do tecido em estudo (DEZANI *et al.*, 2013; PARAÍSO, 2012; DEZANI, 2010; GINSK; POLLI, 1999).

Cabe mencionar que, no modelo de saco invertido ocorre a seleção de uma determinada porção intestinal que será submetida à inversão com o auxílio de bastão de vidro e exposição das extremidades, as quais serão amarradas formando assim, uma espécie de “saco”. Feito isso, esse mesmo será mergulhado em um determinado recipiente contendo uma solução de concentração conhecida do fármaco a ser estudado. Em seguida, a quantidade que foi permeada através da membrana é determinada no líquido contido no interior do “saco” formado. Como desvantagem, modificação morfológica do tecido pode ocorrer pela sua manipulação ao se fazer a inversão do segmento, acarretando na menor viabilidade do mesmo e levando até à resultados não confiáveis (LUO *et al.*, 2013; VOLPE, 2010; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008; BARTHE *et al.*, 1998a; BARTHE *et al.*, 1998b).

d) Métodos *in silico*

Tais modelos abrangem o desenvolvimento de técnicas para a utilização de programas computacionais para capturar, analisar e integrar os dados biológicos e clínicos obtidos a partir de variadas fontes. O modelo é capaz de prever a permeabilidade de um fármaco, sobretudo por meio de transporte passivo. Estes métodos apresentam grande aplicabilidade na triagem de novas moléculas, obtidas

no desenvolvimento de novos fármacos. Os parâmetros físico-químicos de um fármaco contemplados por esse método são: solubilidade, peso molecular, carga, coeficiente de partição; polaridade de superfície, dentre outras características. (GOSWAMI *et al.*, 2013; MUDRA; DESINO; DESAI, 2011; EKINS; MESTRES; TESTA, 2007; EKINS *et al.*, 2002; ROSE; STEVENS, 2003; AVDEEF, 2001).

O **método de perfusão *in situ*** será abordado separadamente no próximo item **(3.2.2.1.)** e com mais detalhamento, já que foi o método de escolha para este estudo.

3.2.2.1. Método de perfusão *in situ* utilizando os segmentos intestinais

No método de perfusão *in situ*, a permeabilidade é basicamente avaliada por meio do desaparecimento das substâncias do segmento intestinal selecionado. O modelo consiste na seleção de um determinado trecho de um segmento intestinal, o qual será isolado e minuciosamente canulado nas porções proximal e distal e então, lavado com solução tampão ou solução de perfusão. A porção proximal recebe a solução de perfusão já contendo o fármaco a ser avaliado e a partir da porção distal serão coletadas as amostras em intervalos de tempo pré-determinados (LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2015; PEREIRA, 2011; VOLPE, 2010; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; XIE *et al.*, 2008; HO *et al.*, 2008; KUNES *et al.*, 2005; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Quando comparado aos outros métodos (já mencionados no **item 3.2.2.**), o método de perfusão *in situ* apresenta características excelentes, pois permite durante todo o experimento, a preservação do suprimento sanguíneo, inervação intacta, não compromete ou altera os transportes passivos (paracelular e transcelular) e ainda, a camada de muco continua presente. Logo, além de avaliar a permeabilidade, possibilitando a caracterização da absorção intestinal de uma substância no segmento intestinal, o método permite elucidar os mecanismos de transportes envolvidos e ainda, avaliar o impacto das enzimas metabolizadoras presentes na superfície e no interior dos enterócitos (LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2015; PEREIRA, 2011; VOLPE, 2010; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; BERGGREN, 2006; SONG; LI; LIU, 2006; KUNES *et al.*, 2005; LINDENBERG; KOPP;

DRESSMAN, 2004; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; ROUGE; BURI; DOELKER, 1996; SCHURGERS *et al.*, 1986).

E por se tratar de um modelo com um sistema experimental tão próximo às condições *in vivo*, existem vários relatos na literatura demonstrando que o método de perfusão *in situ* também seja muito útil no desenvolvimento de novos fármacos (LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2015; PEREIRA, 2011; KUNES *et al.*, 2005; LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

FAGERHOLM e colaboradores (1996) relataram em seus estudos a existência de uma boa correlação entre a absorção de fármacos em intestino de rato e intestino de seres humanos, especificamente, o segmento do jejuno. O estudo se baseava no emprego de padrões de referências e comparava os valores obtidos de permeabilidade de segmentos de jejuno e sugeriram, ao final que, esses valores poderiam ser correlacionados e que os ratos poderiam ser utilizados para prever a absorção *in vivo* em seres humanos. E ainda que, poderiam servir como parâmetros para a predição quantitativa da absorção de fármacos em modelos *in vivo* em função de similaridades tanto fisiológicas quanto de mecanismos de absorção ali envolvidos (LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2015; REIS *et al.*, 2013; PEREIRA, 2011; VOLPE, 2010; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; CAO; YU; SUN, 2008; JAIN *et al.*, 2007; CAO *et al.*, 2006; LANE; LEVIS; CORRIGAN, 2006).

A perfusão *in situ* pode ser aplicada através de diferentes técnicas, podendo ser: técnica de circulação, técnica de oscilação, técnica de circuito fechado (também denominado método de ciclo fechado), técnica de perfusão de passagem única e ainda, técnica de perfusão de passagem tripla (LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2015; LUO *et al.*, 2013; PEREIRA, 2011; DAHAN, WEST; AMIDON, 2009; HO *et al.*, 2008; BERGGREN, 2006; KUNES *et al.*, 2005; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; ROUGE; BURI; DOELKER, 1996).

Em 2009, DAHAN e colaboradores propuseram que ao invés de utilizar somente um segmento por estudo, todos os outros fossem também utilizados, o que deu origem ao método de perfusão *in situ* de passagem tripla. O procedimento de canulação é o mesmo conforme já mencionado, porém com canulação de três segmentos, onde serão realizados os estudos. Ainda como vantagens em cima do método tradicional, o novo método proposto aumentaria a quantidade de resultados obtidos e haveria ainda, uma diminuição significativa na quantidade de animais

utilizados ao final de todo o estudo. A **Figura 3.2.2.1a** e **Figura 3.2.2.1b** ilustram respectivamente, o método de perfusão *in situ* em ratos de passagem única e de passagem tripla.

Antes de se iniciar as coletas, algumas propriedades peculiares à perfusão *in situ* devem estar bem estabelecidas, como é o caso da água. A água forma uma camada, denominada camada de água estacionária (CAE), que influencia nas características de absorção do fármaco, tais como: pH, osmolaridade intestinal e conteúdo do que está sendo perfundido e consequentemente, sobre a taxa de absorção do mesmo (PEREIRA, 2011; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2009b; SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; ROUGE; BURI; DOELKER, 1996). E, caso a CAE não seja monitorada de modo adequado durante todo o procedimento de perfusão, características como: equilíbrio do composto com a membrana intestinal, a concentração de entrada do fármaco solubilizado, a taxa de fluxo e o coeficiente de difusão do fármaco serão prejudicadas (VOLPE, 2010; HO *et al.*, 2008; XIE *et al.*, 2008; SONG; LI; LIU, 2006; KUNES *et al.*, 2005; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; ROUGE; BURI; DOELKER, 1996).

Para se garantir que o fármaco presente na solução de perfusão não tenha sido demasiadamente diluído levando à resultados de permeabilidade imprecisos, deve-se manter a água presente no TGI sob baixo e constante fluxos durante todo o processo de perfusão *in situ*, minimizando qualquer risco de influência na hidrodinâmica fisiológica (PEREIRA, 2011; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2007; SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001).

Dentre alguns métodos utilizados para essa finalidade, podem-se destacar tanto o emprego de um marcador não absorvível e não metabolizado (vermelho de fenol ou ¹⁴PEG-4000) quanto o método gravimétrico (PEREIRA, 2011; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2007; FAGERHOLM; JOHANSSON; LENNERNÄS, 1996).

O emprego de um marcador não absorvível como PEG 4000, vermelho de fenol ou inulina, muitas vezes é adicionado à solução de perfusão contendo o fármaco solubilizado para avaliar o transporte de líquidos no intestino. Porém, essas substâncias podem interferir na permeabilidade dos fármacos em estudo (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; ROUGE; BURI; DOELKER, 1996).

Já o método gravimétrico baseia-se na subtração do peso (em gramas) dos recipientes contendo as amostras coletadas com os recipientes vazios (tubos

cônicos) e mostra ser uma técnica tão eficaz quanto ao uso de uma substância marcadora não absorvível e não metabolizada. Além do mais, não causa interferência nos mecanismos de transporte dos fármacos em estudo ou ainda, no método analítico empregado para as análises das substâncias avaliadas (PEREIRA, 2011; SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKI, 2001; FAGERHOLM; JOHANSSON; LENNERNÄS, 1996).

Figura 3.2.2.1a - Modelo de perfusão *in situ* de passagem simples (Adaptado de ZHANG *et al.*, 2012).

Figura 3.2.2.1b - Modelo de perfusão *in situ* de tripla passagem (Adaptado de DAHAN; WEST; AMIDON, 2009).

3.3. Furosemida

A furosemida é um fármaco da família das sulfonamidas que atua como inibidor do transporte simultâneo de sódio, cloreto e potássio no ramo ascendente espesso da alça de Henle, corresponde quimicamente ao ácido 5-(aminosulfonil)-4-cloro-2-[(2-furanilmetil) amino]-benzóico, ou ácido 4-cloro-N-furfuril-5-sulfamoilantranílico. O fármaco é caracterizado como sendo de rápida ação diurética (AL-MOHIZEA, 2010; GRANERO *et al.*, 2010; DIAS; OLIVEIRA NETO; MARTINS, 2004).

A furosemida é amplamente utilizada tanto de modo isolada quanto associada a outros agentes em quadros de edemas como: insuficiência cardíaca congestiva, cirrose hepática e doença renal crônica e no tratamento de hipertensão (**Figura 3.3.**) (AL-MOHIZEA, 2010; ANDRADE, 2008; DIAS; OLIVEIRA NETO; MARTINS, 2004; CHUNGI; DITTERT; SMITH, 1979).

Figura 3.3. - Estrutura molecular da furosemida.

A furosemida possui log P de 2,56, com massa molar de 330,77 g/mol e ponto de fusão de 206 °C. É praticamente insolúvel em água (<1 mg/mL) e em meios ácidos, pouco solúvel em clorofórmio e em éter e livremente solúvel em soluções alcalinas, etanol, metanol, acetona e em dimetilformamida (SILVA, 2014; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010; GRANERO *et al.*, 2010; AVDEEF, 2003).

A furosemida apresenta sua solubilidade como dependente do pH do meio, em função disto, o fármaco é pouco solúvel em meios ácidos enquanto que, em pH mais alcalino observa-se, o aumento da solubilidade. Esse fator pode ser considerado como sendo limitante ao alcance de níveis terapêuticos adequados do

fármaco. O fármaco é preferencialmente absorvido no estômago e na porção superior do intestino devido à sua natureza ácida ($pK_a = 3,8$) (SILVA, 2014; AMBROGI *et al.*, 2012; PERIOLI *et al.*, 2011; AL-MOHIZEA, 2010; GRANERO *et al.*, 2010).

A absorção da furosemida exibe alta variabilidade intra e interindividual, a qual pode ser atribuída a muitos fatores, sendo que os principais são: pH do meio, problemas na sua solubilidade, ingestão de alimentos concomitante com sua administração e forma de dosagem administrada (SILVA, 2014; AMBROGI *et al.*, 2012; PERIOLI *et al.*, 2011; GRANERO *et al.*, 2010; AL-MOHIZEA, 2010; ANDRADE, 2008; DIAS; OLIVEIRA NETO; MARTINS, 2004; CHUNGI; DITTERT; SMITH, 1979).

De acordo com a literatura, a furosemida possui sete formas polimórficas, sendo quatro polimorfos verdadeiros (I, II, III e IV), dois solvatos (V - dioxano e VI - DMS) e uma forma amorfa. Entretanto, até o momento, não há relatos de que a biodisponibilidade do fármaco possa ser afetada pelo polimorfismo (SILVA, 2014; NIELSEN *et al.*, 2013; PERIOLI *et al.*, 2013; PERIOLI *et al.*, 2011; GRANERO *et al.*, 2010).

A furosemida tem sido classificada como pertencente às classes II (alta permeabilidade e baixa solubilidade) (WHO, 2006) ou ainda, classe IV (baixa permeabilidade e baixa solubilidade) do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (AL-MOHIZEA, 2010; GRANERO, 2010; DAVIS, 2005). Cabe ainda ressaltar que, a furosemida apresenta problemas importantes na liberação a partir de formas farmacêuticas sólidas orais (SILVA, 2014; PERIOLI *et al.*, 2013; DAVIS, 2005; VARMA *et al.*, 2005).

A permeabilidade da furosemida ocorre por transporte passivo paracelular, ou seja, os íons da furosemida são transportados de modo passivo através das junções intercelulares (junções íntimas ou oclusivas) da membrana e ainda, trata-se de um forte substrato da P-gp e com probabilidade de ser também substrato de isoenzimas, contribuindo ainda mais para que a absorção seja de maneira errática (PERIOLI *et al.*, 2013; WATANABE *et al.*, 2013; PERIOLI *et al.*, 2011; MUDRA; DESINO; DESAI, 2011; GRANERO *et al.*, 2010; TAKANO; YUMOTO; MURAKAMI, 2006; WHO, 2006; VARMA *et al.*, 2005; FLANAGAN; TAKAHASHI; BENET, 2002; EMA, 1999).

Alguns estudos foram realizados para avaliar a permeabilidade da furosemida na forma pura, utilizando-se métodos *in vitro* e *ex vivo*, onde obtiveram resultados que indicavam que a furosemida era um fármaco de baixa permeabilidade. Outros estudos empregando métodos de perfusão *in situ* também foram realizados, porém a maioria dos métodos utilizaram pequenas dosagens do fármaco e assim, os resultados foram bastante baixos, favorecendo a classificação da furosemida ainda como pertencente à classe IV do SBC (LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2015; LENNERNÄS, 2014; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2009a; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2007; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2006; VARMA; PANCHAGNULA, 2005; FAGERHOLM; JOHANSSON; LENNERNÄS, 1996).

Diante disso, várias técnicas foram então desenvolvidas com a finalidade de melhorar a solubilidade da furosemida, aumentando a velocidade e extensão de dissolução desse fármaco, em especial nos líquidos biológicos. Em 2008, SPRICIGO e colaboradores conseguiram aumentar a solubilidade aparente da furosemida em água utilizando o método de complexação com ciclodextrinas, utilizando a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) (SILVA, 2014; SPRICIGO *et al.*, 2008; STEGEMANN *et al.*, 2007; ODA *et al.*, 2004; SALTAO; VEIGA, 2001).

Além da HP- β -CD, inúmeros outros estudos empregaram o uso de excipientes que também possibilitaram o aumento de solubilidade de fármacos com baixa solubilidade. Dentre os excipientes mais citados, encontra-se o Tween 80 (PERIOLLI *et al.*, 2013; AL-MOHIZEA, 2010).

Em 2010, AL-MOHIZEA utilizou diferentes métodos para avaliar a permeabilidade (métodos *in vitro* e *ex vivo*) da furosemida associada ao Tween 80[®] ou complexada à HP- β -CD, e que apresentou solubilidade otimizada. Embora tenha havido a melhoria da permeabilidade para ambas condições (associação ao Tween 80[®] e complexação com ciclodextrina), o aumento foi mais expressivo quando a furosemida estava associada ao Tween 80[®]. Conforme sugestão do pesquisador, o resultado obtido foi justificado, pois além de promotor de solubilidade, o Tween 80[®] também teria efeito inibitório no transportador de efluxo, o que não seria atribuído à HP- β -CD (AL-MOHIZEA, 2010).

Não bastassem os métodos utilizados em segmentos intestinais, a furosemida também foi estudada na mucosa gástrica, onde é o local de preferencial absorção. Nesse estudo foi empregado a mucosa gástrica de suínos e observou-se que, houve o aumento da permeabilidade da furosemida quando associada à excipientes

(quitosana, carbonatos, fosfatos e derivados de sílica inorgânica), levando à hipótese de que a presença de excipientes provocaria um aumento do pH no meio, aumentando da velocidade de dissolução no meio gástrico e assim, favoreceria a permeação da furosemida (PERIOLLI *et al.*, 2013).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Substâncias de referência e marcadores utilizados

- ✓ Furosemida: substância química de referência (Fabricante: Sigma-Aldrich; Lote: 410128/02; Teor: 99,6%) e matéria-prima (Fabricante: HEM-DEEP Organisc; Lote: FRS 0100709; Teor: 97,4%);
- ✓ Hidroxipropil- β -Ciclodextrina (Cavazol[®] W7 HP Pharma, Wacker, Alemanha, gentilmente doado por ISP Brasil; Lote: 73B041);
- ✓ Marcadores de permeabilidade: metoprolol (Fabricante: Sigma-Aldrich; Lote: 018k0760; Teor: 99%) e fluoresceína (Fabricante: Sigma-Aldrich; Lote: 133951; Teor: 98%);
- ✓ Inibidores: verapamil (Fabricante: Teva Pharmaceutical Chemicals, Itália; Lote: 030082900108; Teor: 99,92%) e cetoconazol (Fabricante: Piramal Healthcare, Índia; Lote: KET/N-14812; Teor: 99,12%);
- ✓ Padrão interno: propranolol (Fabricante: Changzhou Yabang Pharmaceutical, China; Lote: M110311; Teor: 99,95%).

4.2. Solventes e reagentes

- ✓ Acetonitrila, metanol de purezas cromatográficas (grau HPLC Merk[®])
- ✓ Água purificada Milli-Q[®] (Millipore Corporation, EUA)
- ✓ Ácido clorídrico (HCl);
- ✓ Ácido o-fosfórico (H₃PO₄);
- ✓ Cloreto de sódio (NaCl);
- ✓ Cloreto de potássio (KCl);
- ✓ D-glicose;
- ✓ Fosfato de sódio bibásico (Na₂HPO₄);
- ✓ Fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄);
- ✓ Fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄);
- ✓ Hidróxido de sódio (NaOH),
- ✓ Manitol;
- ✓ Polietilenoglicol (PEG 4000).

4.3. Equipamentos e dispositivos diversos

- ✓ Agitador de tubo do tipo vórtex Phoenix[®], modelo AP 56;
- ✓ Balões volumétricos, béqueres, provetas com capacidades volumétricas diversas;
- ✓ Balança analítica Shimadzu[®] modelo AX200;
- ✓ Bastão de vidro;
- ✓ Bomba peristáltica Minipuls-3 Gilson[®] com 8 canais;
- ✓ Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) DSC 7020 (Exstar, SII Nano Technology Inc., Japão);
- ✓ Coluna C18 de fase reversa; 4,6 x 150 mm; 5 µm Phenomenex[®] Luna;
- ✓ Colchão térmico com controle de temperatura da marca Metalvet[®];
- ✓ Cronômetro;
- ✓ Equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) Shimadzu Scientific Instrumentation, com detector de fluorescência – Merck Hitachi[®], composto por bomba L-7100, injetor automático de amostras L-7200, detector de fluorescência L-7485, forno de coluna L-7300 e interface D-7000;
- ✓ Liofilizador, marca ThermoElectron[®], modelo Supermodulyo;
- ✓ Materiais descartáveis para procedimentos cirúrgicos (seringas, algodão, gazes, esparadrapo, cateteres, tesouras, pinças);
- ✓ Membranas filtrantes de acetato de celulose regenerado Sartorius[®] de 47 mm de diâmetro e poro de 0,22 µm;
- ✓ Micropipetas monocanais de capacidades variáveis 100 – 1000 µL e 500 – 5000 µL, marca Brand[®];
- ✓ Microscópio óptico;
- ✓ Parafilm;
- ✓ pHmetro Hanna[®];
- ✓ Sistema de purificação de água Milipore[®] (Millipore Corporation, EUA);
- ✓ Termobalança (TG) TG/DTA 7020 (Exstar, SII Nano Technology Inc., Japão);
- ✓ Termômetro digital;
- ✓ Tubos cônicos com capacidade de volume para 1 mL;
- ✓ Ultrassom Unique[®].

4.4. Métodos

4.4.1. Obtenção e caracterização da furosemida complexada com hidroxipropil- β -ciclodextrina

4.4.1.1. Preparação

O complexo furosemida-hidroxipropil- β -ciclodextrina (FURO CD) foi preparado conforme descrito por SILVA (2014). Para a preparação de 3 g de mistura binária equimolar (na proporção 1:1) de FURO CD, utilizaram-se 150 mL de tampão fosfato (pH 6,8), adicionaram-se 0,607 g (Massa molar = 330,77 g/mol; $1,84 \times 10^{-3}$ M) de furosemida (FURO) sob agitação constante até a completa dissolução em um balão volumétrico. Posteriormente, adicionaram-se à esta mistura 2,393 g (Massa molar = 1300 g/mol; $1,84 \times 10^{-3}$ M) de hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD). A mistura foi então, acondicionada em béquer e agitada a 900 rpm em agitador magnético por 24 horas. A solução final obtida foi congelada em frascos apropriados através da utilização de gelo seco e álcool e finalmente, submetida ao processo de liofilização.

Para o presente trabalho, preparou-se 20 g de mistura binária equimolar (na proporção 1:1) de FURO CD, utilizaram-se 1000 mL de tampão fosfato (pH 6,8), adicionaram-se 4,05 g de FURO sob agitação constante até a completa dissolução em um béquer com capacidade de 2 litros com posterior adição de 15,95 g de HP- β -CD. A mistura foi então, agitada a 900 rpm em agitador magnético por 24 horas e a solução final foi congelada utilizando-se gelo seco e álcool e finalmente, submetida ao processo de liofilização. A **Figura 4.4.1.1.** ilustra as etapas de preparação do complexo do presente trabalho.

Figura 4.4.1.1. - Etapas da preparação do complexo: (A) béquer com tampão fosfato contendo FURO e HP- β -CD sob agitação em agitador magnético (B) solução pronta (C) solução em processo de congelamento (D) solução submetida ao processo de liofilização.

4.4.1.2. Caracterização

4.4.1.2.1. Determinação do teor

A determinação do teor de FURO na matéria-prima e nos produtos obtidos por liofilização (FURO CD) foi baseada nos mesmos procedimentos descritos por SILVA (2014). Nesse sentido, com o auxílio da balança analítica, pesou-se o equivalente a 50 mg de FURO e, em seguida, transferiu-se a amostra para o balão volumétrico de 100 mL. Posteriormente, adicionou-se solução aquosa de hidróxido de sódio 1 M e com o auxílio de agitador magnético, agitou-se a mistura a 900 rpm por 30 min. Feito isso, diluiu-se a solução com tampão fosfato 0,05 M (pH 6,8) até a concentração de 5 μ g/mL. Nas mesmas condições da FURO, o padrão também foi preparado e finalmente, quantificou-se o fármaco por espectrofotometria UV/Visível a 280 nm (SILVA, 2014).

Após todos os procedimentos realizados, as amostras foram analisadas em triplicatas e o teor da FURO foi calculado a partir da seguinte equação (**Equação 1**) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

Equação 1

$$T(\%) = C \times F_d \times V_d \times \frac{100}{50}$$

Onde:

T (%) = teor em porcentagem;

C = concentração do fármaco na solução de leitura (mg/mL);

F_d = fator de diluição de alíquotas (igual a 1 caso sem diluição);

V_d = volume do meio de dissolução (mL).

4.4.1.2.2. Caracterização das amostras utilizando a técnica termoanalítica

Os métodos termoanalíticos foram importantes para a caracterização das diversas amostras a serem empregadas posteriormente, no estudo de perfusão *in situ*. As amostras analisadas foram as seguintes: FURO; HP-β-CD; FURO CD e mistura física FURO/HP-β-CD (proporção 1:1).

Para a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), 2 a 3 mg de cada amostra foram acondicionados e hermeticamente selados em cadinhos de alumínio e então, submetidos ao equipamento Calorímetro de Varredura DSC 7020, sob condições de atmosfera de nitrogênio de 50 mL/min, na razão de aquecimento de 10°C/min e na faixa de temperatura de 25 a 300°C.

Já para a avaliação da Termogravimetria (TG) utilizou-se o equipamento de Calorímetro de Varredura TG/DTA 7020, onde foram acondicionados os cadinhos de platina contendo de 2,5 a 4 mg de cada amostra, sob atmosfera de nitrogênio de 100 mL/min, na razão de aquecimento de 10°C/min e na faixa de temperatura de 25 a 800°C.

As análises citadas neste item foram realizadas no Laboratório de Desenvolvimento e Inovação Farmacotécnica (DEINFAR), na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e as curvas obtidas, foram tratadas no programa Oringin® 8.1.

4.4.2. Avaliação da permeabilidade da FURO e FURO CD em diferentes segmentos intestinais por meio do método de perfusão *in situ* de passagem tripla

4.4.2.1. Etapa cirúrgica

Inicialmente, o projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, obtendo aprovação conforme ofício anexo (OFÍCIO CEUA/FCF **98.2013-P437 - Anexo II**).

O método de perfusão *in situ* foi conduzido em ratos machos adultos (7 a 9 semanas) da linhagem *Wistar*, com peso entre 250 a 300 gramas, solicitados ao Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em jejum por 12 horas com livre acesso à água antes dos ensaios de perfusão. Os animais foram divididos em grupos que foram designados de: i) METO, destinados à avaliação da permeabilidade do marcador de alta permeabilidade, metoprolol (n = 6 animais); ii) FLUOR, destinados à avaliação da permeabilidade do marcador de baixa permeabilidade, fluoresceína (n = 6 animais); iii) FURO e FURO CD, destinados à avaliação da permeabilidade da furosemida na forma pura (n = 7 animais) e na forma complexada com ciclodextrina (n = 7 animais) contendo ou não inibidores de P-gp e de CYP3A4 (DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; MAHER *et al.*, 2009; SABABI; BORGHA; HULTKVIST-BENGTSSON, 2001).

Para a anestesia dos animais, empregou-se a solução de cetamina e xilazina associadas, nas concentrações de 0,1 g/kg e 0,02 g/kg, respectivamente. A solução de anestésico foi administrada por meio de injeção intramuscular na pata traseira, em volume de 0,3 mL por meio de agulhas com 20 mm x 0,55 mm (NEVES *et al.*, 2013; ESCRIBANO *et al.*, 2012; PEREIRA, 2011; KIM *et al.*, 2006; COOK; SHENOY, 2003).

Conforme os sinais de recuperação de reflexos do animal fossem constatados durante o ensaio, injeções da associação dos anestésicos (cetamina e xilazina) foram administradas na proporção de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ da dose inicial como dose de manutenção (PEREIRA, 2011; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2009a; RATHORE *et al.*, 2008; JAIN *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2006; BERGGREN

et al., 2004; SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001). A anestesia durante todo o procedimento visou minimizar a dor, o sofrimento e a angústia do animal (CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2012).

Após a constatação da condição anestésica ideal, por reflexo interdigital, o animal foi acomodado em um colchão termostático à temperatura de 37 °C (± 1 °C) em decúbito dorsal para uma melhor visualização do campo cirúrgico e facilidade de manuseio dos segmentos durante todo o procedimento de perfusão *in situ* (DAHAN *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2014; ESCRIBANO *et al.*, 2012; PEREIRA, 2011; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; HO *et al.*, 2008; SHENG *et al.*, 2006).

Com o auxílio de um bisturi, uma incisão de 3 a 4 cm foi feita no abdômen, expondo o intestino. Cuidadosamente, introduziu-se um cateter na porção proximal e outro cateter na porção distal de cada segmento intestinal de interesse (duodeno, jejuno e íleo) (LI *et al.*, 2014; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009). Segmentos de dez cm de cada trecho intestinal foram selecionados e isolados de modo a evitar que líquidos provenientes de outras regiões do TGI interferissem nos resultados dos estudos (DAHAN *et al.*, 2014; MILLER *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2012).

O piloro foi utilizado como parâmetro para demarcar os segmentos duodeno e jejuno. Uma distância de cerca de 13 cm, percorrendo o ligamento de Treitz, foi utilizada para o isolamento do duodeno. O jejuno, por sua vez, foi demarcado em uma distância de cerca de 44 cm a partir do piloro. Para o isolamento do íleo, utilizou-se a porção final do ceco como parâmetro (DAHAN *et al.*, 2014; BEIG; AGBARIA; DAHAN, 2013; MILLER *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2012; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009). Durante os experimentos de perfusão, os segmentos intestinais expostos foram cobertos com uma compressa de gaze que, foi frequentemente umedecida por aplicações de soro fisiológico a 37 °C (± 1 °C) (DAHAN *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2014; ESCRIBANO *et al.*, 2012; PEREIRA, 2011; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; HO *et al.*, 2008; SHENG *et al.*, 2006).

A **Figura 4.4.2.1a** ilustra as etapas de preparação para a realização do método de perfusão e a **Figura 4.4.2.1b** demonstra a canulação das porções selecionadas.

Figura 4.4.2.1a - Etapas da preparação para execução do processo cirúrgico: (A) rato com peso entre 250 a 300 gramas já anestesiado; (B) posicionamento adequado para iniciar processo cirúrgico; (C) demarcação do local onde haverá incisão; (D) abertura da cavidade abdominal.

Figura 4.4.2.1b - Etapa de inserção de cateteres (cor amarelo) nos segmentos intestinais. 1. duodeno; 2. jejuno e 3. íleo para posterior coleta de amostras (cateteres laranjas): 1a. duodeno; 2a. jejuno e 3a. íleo.

4.4.2.2. Estudo de permeabilidade por meio da perfusão *in situ* de passagem tripla

O estudo da permeabilidade da FURO e FURO CD nos três segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo) foi conduzido com o emprego do método de perfusão *in situ* de passagem tripla, conforme será descrito a seguir. Nesta etapa, avaliou-se também o impacto da P-gp (transportador de efluxo) e da CYP3A4 (metabolismo intestinal) na permeabilidade do referido fármaco na forma pura e na forma complexada.

Os segmentos intestinais selecionados (conforme apresentado na **Figura 4.4.2.1b**) foram inicialmente perfundidos, através da cânula introduzida durante o processo de cirurgia do animal, com solução de perfusão isenta do fármaco (pH 6,5, composição descrita a seguir), bombeada por uma bomba peristáltica a um fluxo contínuo de $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, sob temperatura de $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$) (DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; JAIN *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2006; BERGGREN *et al.*, 2004). Este procedimento foi realizado para eliminar possíveis resíduos presentes no interior de cada segmento isolado.

A solução de perfusão (pH 6,5) utilizada nos estudos de permeabilidade foi preparada com a seguinte composição: 48 mM de cloreto de sódio, 5,4 mM cloreto de potássio, 28 mM Na_2HPO_4 , 43 mM NaH_2PO_4 , 35 mM manitol, $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de polietilenoglicol (PEG 4000) e 10 mM D-glicose. Todos os componentes foram totalmente solubilizados em água purificada (obtida através do sistema Milli-Q®-Millipore Corporation, USA) e a solução foi envasada em um recipiente âmbar com a devida descrição no rótulo (solução de perfusão) e antes de se proceder a cada ensaio de perfusão, a solução de perfusão era sonicada por 15 minutos (PEREIRA, 2011; JAIN *et al.*, 2007).

Após a detecção da saída do líquido visualmente límpido, a solução de perfusão, ainda isenta de fármaco ou de marcadores, foi mantida no lúmen intestinal a um fluxo de $0,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ por um período de uma hora, com a finalidade de se manter o equilíbrio estacionário entre a mucosa (camada apical) e a solução de perfusão. Esse procedimento foi adotado para que quando o fármaco ou marcadores fossem perfundidos, os mesmos não sofressem diluição pela água existente no meio intestinal durante o procedimento (LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2015; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; JAIN *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2006; BERGGREN *et al.*, 2004).

Após o período de equilíbrio, perfundi-se uma outra solução de perfusão agora contendo o fármaco de estudo (FURO ou FURO CD) ou os marcadores de permeabilidade (METO ou FLUOR) sob o fluxo de $0,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2015; PEREIRA, 2011; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009). A preparação da solução de perfusão contendo cada substância, foi realizada da seguinte maneira: a substância foi devidamente pesada em balança analítica e totalmente solubilizada na própria solução de perfusão, utilizando o movimento de agitação. E ainda, antes de se proceder a cada ensaio de perfusão, todas as soluções eram sonicadas por 15 minutos.

Durante os primeiros ensaios de perfusão, a integridade da membrana intestinal foi verificada por meio dos marcadores de baixa e de alta permeabilidade, respectivamente FLUOR e METO (LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2015; PEREIRA, 2011; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2005; FAGERHOLM; JOHANSSON; LENNERNÄS, 1996).

A concentração dos marcadores de permeabilidade foram definidos em função de ensaios de perfusão *in situ* anteriormente descritos na literatura e a concentração da FURO adicionada à solução de perfusão, na forma pura ou na forma complexada à ciclodextrina foi definida em função da maior dose recomendada pelo guia do FDA para este produto farmacêutico e dividida pelo volume de 250 mL (LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2015; SILVA, 2014; PEREIRA, 2011; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009).

A **Tabela 1** apresenta as concentrações dos marcadores de alta e baixa permeabilidades utilizadas na solução de perfusão do presente trabalho.

Fonte: LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2015; PEREIRA, 2011; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009

Marcadores	Permeabilidade	Dose utilizada nos ensaios (mg)	Concentração da substância na solução de perfusão ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
METO	Alta	100	0,4
FLUOR	Baixa	25	0,1

Tabela 1 - Concentração dos marcadores na solução de perfusão para o estudo de permeabilidade utilizando o modelo de perfusão *in situ* sendo metoprolol (METO) e fluoresceína (FLUOR).

A **Tabela 2** apresenta as concentrações utilizadas de FURO para o preparo da solução de perfusão de acordo com a dose recomendada pelo guia do FDA.

*Fonte: FDA, 2012

Fármaco	Maior dose recomendada (mg)	Concentração da substância na solução de perfusão (mg.mL ⁻¹)
FURO*	80	0,32
FURO CD	80	0,32

Tabela 2 - Concentração de FURO e FURO CD na solução de perfusão para o estudo de permeabilidade utilizando o modelo de perfusão *in situ*.

Os mesmos procedimentos também foram adotados para as soluções de perfusão contendo inibidores. De modo que, para os estudos que envolveram a ação de inibidores de P-gp, preparou-se outra solução de perfusão onde adicionou-se a substância de interesse (FURO ou FURO CD) e verapamil (VERA), na concentração de 200 μ M (0,36 mg/mL), as quais foram devidamente pesadas em balança analítica e totalmente solubilizadas na própria solução de perfusão, utilizando o movimento de agitação. Para os estudos que envolviam a inibição da enzima CYP3A4, preparou-se outra solução de perfusão onde adicionou-se cetoconazol (CETO) na concentração de 10 μ M (0,02 mg/mL) juntamente com a substância de interesse. E ainda, antes de se proceder ao ensaio de perfusão, cada solução foi sonicada por 15 minutos (VARMA *et al.*, 2005; VARMA; PANCHAGNULA, 2005; VARMA *et al.*, 2003).

Cada experimento teve duração de 120 minutos e as amostras foram coletadas a cada 15 minutos (15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 minutos) em tubos cônicos (capacidade de 1,5 mL), previamente identificados e pesados. Após a coleta, os recipientes foram pesados para o cálculo do fluxo de água (conforme será descrito no **item 4.4.2.4.**) e, em seguida, congelados à temperatura de - 20 °C, para posteriormente serem analisadas por meio do método cromatográfico desenvolvido e previamente validado (conforme descrito no **item 4.5.**) (REIS *et al.*, 2013; ESCRIBANO *et al.*, 2012; PEREIRA, 2011; DAHAN, WEST; AMIDON, 2009; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2005; ISSAR *et al.*, 2003; SHAH, 1992).

Após a finalização dos procedimentos, o animal foi submetido ao aprofundamento anestésico com a solução de cetamina e xilazina associadas e em

seguida, eutanasiado com solução saturada de cloreto de potássio (KCl) por injeção intracárdica (AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, 2007). Após a constatação da morte do animal, o trecho intestinal do segmento estudado foi removido para a determinação do comprimento e do raio interno e posteriormente, selecionou-se de maneira cuidadosa, um pequeno fragmento para a preparação de lâminas para as análises histológicas (descrita no **item 4.4.2.5**) (ESCRIBANO *et al.*, 2012; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2005; ISSAR *et al.*, 2003; FAGERHOLM; JOHANSSON; LENNERNÄS, 1996).

4.4.2.3. Cálculos da permeabilidade intestinal efetiva

A permeabilidade intestinal efetiva (P_{ef}) foi calculada a partir da diferença entre a concentração inicial do fármaco na solução de entrada com a concentração final obtida após o ensaio de perfusão no segmento intestinal isolado (ERIKSSON *et al.*, 2010; VOLPE, 2010; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; XIE *et al.*, 2008; JAIN *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2006; COOK; SHENOY, 2003; FAGERHOLM; JOHANSSON; LENNERNÄS, 1996). A **Equação 2** demonstra o cálculo da permeabilidade efetiva.

Equação 2

$$P_{ef} = \frac{-Q_{in} \ln\left(\frac{C_{out}}{C_{in}}\right)}{2\pi rl}$$

Onde:

P_{ef} = permeabilidade efetiva do fármaco;

Q_{in} = fluxo de entrada da solução de perfusão;

$2\pi rl$ = é a área da transferência de massas avaliada pela absorção no cilindro intestinal;

C_{in} e C_{out} = são as concentrações no lado da injeção (lúmen) e no outro lado após o equilíbrio.

4.4.2.4. Cálculos do fluxo de água

Paralelamente ao cálculo de permeabilidade intestinal efetiva, procedeu-se ao cálculo da densidade (d) de cada amostra coletada. De modo que, a massa (m) foi obtida pela diferença de peso (em gramas) dos tubos cônicos, contendo as amostras

coletadas e dos mesmos vazios (previamente pesados). A **Equação 3** demonstra como foi calculada a densidade de cada amostra.

Equação 3

$$d = \frac{m}{V}$$

Onde:

d = densidade em g.mL⁻¹ (valor obtido pelo cálculo da massa da solução de perfusão contendo o fármaco no volume de 1mL);

m = massa do líquido coletado a partir da porção distal do intestino (diferença entre a massa do recipiente com líquido e a massa do recipiente vazio);

V = volume em mL pelo período de cinco minutos.

O valor de V (volume) calculado pela equação anterior (**Equação 3**) é referente ao volume de amostra obtido durante o período de cinco minutos. Então, dividindo-se esse valor por cinco, obtem-se o quanto de amostra é obtido a cada minuto, que corresponde ao fluxo de saída da solução de perfusão Q_{out} (mL.min⁻¹) (PEREIRA, 2011; FAGERHOLM; JOHANSSON; LENNERNÄS, 1996):

A partir do valor obtido de permeabilidade efetiva e a partir da obtenção do Q_{out} (mL.min⁻¹), procedeu-se ao cálculo do fluxo de água (**Equação 4**), o qual foi realizado por meio do método gravimétrico (conforme já mencionado no **item 3.2.2.1.**).

Equação 4

$$TFA = \left[1 - \left(\frac{Q_{out}}{Q_{in}} \right) \right] \frac{Q_{in}}{l}$$

Onde:

Q_{in} = fluxo de entrada da solução de perfusão (mL/min);

Q_{out} = fluxo de saída da solução de perfusão (mL/min) em um intervalo específico, calculado a partir da densidade da solução de perfusão (g/mL) através do método gravimétrico;

l = comprimento do segmento intestinal selecionado.

4.4.2.5. Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos de permeabilidade intestinal efetiva (P_{ef}) provenientes dos ensaios realizados foram então, analisados estatisticamente utilizando a ferramenta de análise de variância (ANOVA), seguida de teste de *Tukey* por meio do programa computacional Minitab 17[®]. Os dados utilizados na comparação foram: *valores médios* (X) $\pm$ *desvio padrão* (DP), a partir dos valores obtidos para cada grupo de estudo.

Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p se mantivesse abaixo de 0,05 ($p < 0,05$) (EL-KORDY; ALSHAHRANI, 2015; PEREIRA, 2011; JAIN *et al.*, 2007).

4.4.2.6. Preparação do material para análise histológica

Após o término dos experimentos, os segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo) removidos dos ratos anteriormente eutanasiados para a determinação do comprimento e do raio interno, também foram reutilizados para a realização da análise histológica (conforme mencionado no **item 4.4.2.2.**). Assim sendo, foram selecionados segmentos intestinais de animais que não tiveram contato com o fármaco do estudo, somente com a solução de perfusão (designado *controle*) e de animais que foram empregados no estudo de perfusão com FURO CD.

Tanto os segmentos do *controle* quanto os segmentos de estudo foram conservados em solução de formol a 10 % por duas horas para a desidratação dos respectivos tecidos (duodeno, jejuno e íleo). Após esse período, os tecidos foram transferidos para outros recipientes contendo uma nova solução de formol a 10 % com a finalidade de conservação dos mesmos (HEWITSON; WIGG; BECKER, 2010).

Todo o material foi encaminhado ao Departamento de Patologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, onde as lâminas foram adequadamente preparadas e coradas com hematoxilina-eosina (HE) para posterior análise histológica dos segmentos de estudo (duodeno, jejuno e íleo) em microscópio óptico.

4.5. Desenvolvimento e validação do método bioanalítico de cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação de FURO, METO e FLUOR nas amostras dos estudos de permeabilidade

4.5.1. Preparo das amostras

Após o descongelamento sob temperatura ambiente, as amostras provenientes dos ensaios de permeabilidade foram preparadas de acordo com os seguintes procedimentos:

(1) para a determinação do METO, cada amostra foi submetida à diluição em solução composta por água e metanol (90:10), na proporção de $1:10^6$ e posteriormente, 75 μL desta mistura foram transferidos para tubo de ensaio juntamente com 30 μL de padrão interno (propranolol $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e 895 μL de fase móvel (tampão fosfato de potássio monobásico 20 mM);

(2) para a determinação da FLUOR, 75 μL de cada amostra foram transferidos para tubo de ensaio com 10 μL de padrão interno (propranolol $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e 915 μL de fase móvel e;

(3) para a determinação da FURO, as amostras foram diluídas em solução composta por água e metanol (90:10), na proporção de $1:10^3$ e em seguida, 75 μL desta mistura foram transferidos para tubo de ensaio com 30 μL de padrão interno (propranolol $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e 895 μL de fase móvel.

Todas as amostras preparadas foram agitadas em agitador tipo *vórtex* e então, transferidas para recipientes adequados (*microvials*) para posterior análise por meio do método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.5.2. Preparo das soluções padrões e soluções de trabalho para a construção da curva analítica

Para o preparo da solução padrão de FURO (1 mg/mL), pesaram-se analiticamente 100 mg de FURO (padrão secundário 99,6%) e utilizou-se o metanol P.A. para a solubilização do fármaco. Todo o conteúdo dissolvido foi transferido para

um balão volumétrico com capacidade de 100 mL, onde houve a agitação até a completa dissolução da FURO e a solução final foi avolumada até o menisco com o uso do metanol P.A. Feito isso, procedeu-se para a preparação da solução estoque.

Para o preparo das concentrações da curva analítica da FURO foram utilizados valores de concentrações que estiveram dentro do intervalo de 400 a 10 µg/mL. Para isso, nove balões volumétricos de 50 mL foram separados e em cada um deles, pipetou-se a solução padrão de FURO e posteriormente, cada balão volumétrico foi avolumado até o menisco com a solução de mistura de água e metanol na proporção de 90:10, respectivamente (conforme detalhado na **Tabela 3**). Os mesmos procedimentos foram adotados para a obtenção das soluções padrões de METO (1 mg/mL) (padrão secundário 99%), porém com diferente intervalo de concentração, sendo de 500 a 10 µg/mL.

Para FLUOR (1 mg/mL) (padrão secundário 98%), a quantidade pesada analiticamente para a obtenção da solução padrão foi de 50 mg e também utilizou-se o metanol P.A. para a dissolução do fármaco em um balão volumétrico de 50 mL. Para preparar a solução estoque, nove balões volumétricos com capacidade de 25 mL foram separados e em cada um deles, pipetou-se a solução padrão de FLUOR e em seguida, avolumou-se todos os balões volumétricos até o menisco com soluções de mistura de água e metanol (proporção de 90:10, respectivamente), preparando-se assim, concentrações abrangendo o intervalo de 200 a 10 µg/mL.

A **Tabela 3** demonstra em detalhes das concentrações utilizadas para cada substância de interesse citada acima.

Substâncias	Concentrações utilizadas (µg.mL ⁻¹)
FURO	400; 300; 200; 100; 75; 25; 12,5; 10
METO	500; 300; 200; 100; 75; 50; 25; 12,5; 10
FLUOR	200; 150; 125; 100; 75; 50; 25; 12,5; 10

Tabela 3 - Concentrações das soluções utilizadas de cada uma das substâncias empregadas no estudo, para a construção das curvas analíticas para as análises da FURO (furosemida), METO (metoprolol) e FLUOR (fluoresceína).

4.5.3. Condições cromatográficas adotadas

Para a quantificação da FURO e dos marcadores de alta e baixa permeabilidade sendo respectivamente METO e FLUOR, foi desenvolvido o método de CLAE, cujo equipamento é caracterizado por possuir bomba, detector de fluorescência e um sistema de amostragem automático (auto sampler). Para as análises de FURO, METO e FLUOR, empregou-se coluna cromatográfica da marca Phenomenex®, modelo Luna C18, de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, contendo partículas do tamanho de 5 µm. Cabe mencionar que, todos os parâmetros de CLAE foram monitorados por software D 7000 Multi HSM Manager® (SILVA, 2014; ESCRIBANO *et al.*, 2012; MEDEIROS, 2012; PARAÍSO, 2012; PEREIRA, 2011; AL-MOHIZEA, 2010).

A fase móvel foi composta por tampão fosfato de potássio monobásico (20 mM), pH 3,0. O ajuste do pH foi realizado com o auxílio de solução de hidróxido de sódio (NaOH) ou de solução de ácido orto-fosfórico (20 % v/v). A fase móvel foi filtrada em membrana de acetato de celulose de 47 mm de diâmetro e poro de 0,22 µm e, posteriormente foi sonicada por 15 minutos antes de se proceder com as análises. As condições cromatográficas adotadas foram: fluxo da fase móvel de 1,0 mL/min; temperatura do forno de 40 °C e injeção de 20 µL de cada amostra a ser quantificada (SILVA, 2014; DEZANI *et al.*, 2013; BRASIL, 2012; MEDEIROS, 2012; PARAÍSO, 2012; DEZANI, 2010).

A **Tabela 4** resume todas as condições cromatográficas utilizadas para a quantificação de FURO, METO e FLUOR.

ex* comprimento de onda de excitação

em** comprimento de onda de emissão

Condições Cromatográficas		Fármaco	Marcadores	
		FURO	METO	FLUOR
Detector		Fluorescência		
Comprimento de onda (nm)	ex*	268	230	485
	em**	410	305	515
Fase móvel		tampão fosfato (20 mM) e acetonitrila (70:30)	tampão fosfato (20 mM) e metanol (60:40)	tampão fosfato (20 mM) e acetonitrila (70:30)
Fase estacionária		Coluna de marca Phenomenex® modelo Luna C18, 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, contendo partículas do tamanho de 5 µm		
Fluxo (ml.min⁻¹)		1,0		
pH		3,0		
Temperatura (°C)		40		
Volume de injeção (µL)		20		

Tabela 4 - Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação FURO (furosemida), METO (metoprolol) e FLUOR (fluoresceína) nas amostras obtidas dos estudos de permeabilidade (SILVA, 2014; MEDEIROS, 2012; PARAÍSO, 2012).

4.5.4. Validação do método bioanalítico de CLAE para a quantificação dos fármacos utilizados nos estudos de permeabilidade

O método cromatográfico foi validado de acordo com a *RDC n.27, de 17 de maio de 2012* da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a qual institui os requisitos mínimos para os ensaios destinados a quantificar fármacos em produtos farmacêuticos ou matérias-primas. Logo, os parâmetros contemplados no presente trabalho foram os seguintes: exatidão, precisão, sensibilidade, linearidade e estabilidade (BRASIL, 2012; UNITED, 2012; GIL, 2010; ICH, 2005).

4.5.1.4.1. Exatidão

A exatidão do método de análise foi determinada a partir das análises cromatográficas de soluções contendo as substâncias de interesse (METO, FLUOR, FURO) em três concentrações diferentes (alta, média e baixa), em triplicatas, em um mesmo dia (intradia) e em dias diferentes (interdia). Estas soluções foram designadas de controle de qualidade (CQ) (BRASIL, 2012; GIL, 2010). O cálculo da exatidão foi desenvolvido a partir da **Equação 5**. A **Tabela 5** resume as concentrações (alta, média e baixa) das soluções de controle de qualidade (CQ), para cada uma das substâncias empregadas no estudo.

Equação 5

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{CME \times 100}{CT}$$

Onde:

CME = concentração média experimental;

CT = concentração teórica.

Substâncias	Concentrações utilizadas ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		
<i>FURO</i>	CQA: 400	CQM: 100	CQB: 12,5
<i>METO</i>	CQA: 500	CQM: 100	CQB: 12,5
<i>FLUOR</i>	CQA: 200	CQM: 75	CQB: 25

Tabela 5 - Concentrações utilizadas para o preparo das soluções de controle de qualidade (CQ) de FURO (furosemida), METO (metoprolol) e FLUOR (fluoresceína) (CQA -CQ alto; CQM - CQ médio; CQB -CQ baixo).

4.5.1.4.2. Precisão

A precisão do método de análise foi determinada a partir das análises cromatográficas de soluções contendo as substâncias de interesse (METO, FLUOR, FURO) em triplicatas para a obtenção da precisão intra-corrída (repetibilidade) e da precisão inter-corrída (precisão intermediária), assegurando o grau de repetibilidade e de reprodutividade entre valores obtidos nas análises realizadas (BRASIL, 2012; GIL, 2010). A precisão foi calculada a partir da **Equação 6** (BRASIL, 2012; GIL, 2010), empregando-se as concentrações de cada uma das substâncias já demonstradas pela **Tabela 3**.

Equação 6

$$DPR (\%) = \frac{DP \times 100}{C_{m\acute{e}dia}}$$

Onde:

DPR (%) = desvio padrão relativo em porcentagem;

DP = desvio padrão;

$C_{m\acute{e}dia}$ = concentração média determinada.

4.5.1.4.3. Linearidade

A partir das concentrações das soluções de cada substância de interesse (METO, FLUOR, FURO) (**Tabela 3**) realizou-se a correlação linear e conseguiu-se definir a curva analítica e a partir da utilização do método dos mínimos quadrados, os parâmetros foram então, estabelecidos (BRASIL, 2012; GIL, 2010).

4.5.1.4.4. Sensibilidade

A sensibilidade foi estabelecida à partir da equação do limite de detecção e da equação do limite de quantificação para cada substância de estudo (METO, FLUOR, FURO).

- ✓ Limite de Detecção (LD): determinado com o intuito de se estabelecer a mais baixa concentração que o método poderia detectar. Nesse sentido, foram utilizadas concentrações em ordem decrescente de cada substância de interesse e posterior aplicação da seguinte equação (**Equação 7**) (BRASIL, 2012; GIL, 2010):

Equação 7

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC}$$

Onde:

LD = limite de detecção;

DP_a = desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, três curvas analíticas;

IC = inclinação da curva analítica.

- ✓ Limite de Quantificação (LQ): foi realizado com o objetivo de se definir a menor concentração que o método fosse capaz de quantificar e para isso, foram utilizadas concentrações em ordem decrescente, em seis repetições, das amostras de cada substância de interesse e posterior aplicação da **Equação 8** (BRASIL, 2012; GIL, 2010):

Equação 8

$$LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC}$$

Onde:

LQ = limite de quantificação;

DP_a = desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, três curvas analíticas;

IC = inclinação da curva analítica.

4.5.1.4.5. Estabilidade**a) Estabilidade de curta duração**

Para estabelecer a estabilidade de curta duração, utilizou-se três amostras da solução padrão do controle de qualidade em três concentrações diferentes (CQA; CQM; CQB) previamente congeladas. Em seguida, submeteu-se as amostras ao descongelamento natural e mantidas sob temperatura ambiente e após esse período, as amostras foram submetidas às análises e comparadas com àquelas recém preparadas e imediatamente analisadas (BRASIL, 2012).

b) Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento

Para esse procedimento também utilizou-se três amostras em três concentrações diferentes da solução padrão do controle de qualidade (CQA; CQM; CQB) (**Tabela 5**) as quais foram submetidas à três ciclos sucessivos de congelamento à - 20 °C e descongelamento sob temperatura ambiente. As amostras obtidas de cada ciclo foram analisadas e as concentrações dos fármacos foram comparadas com concentrações obtidas de amostras recém preparadas (BRASIL, 2012).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção e caracterização das substâncias de interesse

A furosemida complexada com hidroxipropil- β -ciclodextrina foi preparada segundo o método descrito por SILVA (2014), conforme o **item 4.4.1.1.** e os resultados serão apresentados e discutidos nos subitens a seguir. A **Tabela 6** apresenta um resumo das abreviaturas empregadas, que estão também descritas no início deste trabalho, para cada substância empregada no presente trabalho.

Substâncias empregadas	Abreviaturas
Furosemida	FURO
Hidroxipropil- β -ciclodextrina	HP- β -CD
Furosemida complexada com Hidroxipropil- β -ciclodextrina	FURO CD
Ciclodextrina	CD
Metoprolol	METO
Fluoresceína	FLUOR
Verapamil	VERA
Cetoconazol	CETO
Propranolol	PROP

Tabela 6 - Termos utilizados para descrever as substâncias empregadas no presente trabalho.

5.1.1. Análise do teor de FURO no complexo de inclusão

A **Tabela 7** apresenta os resultados obtidos (média de três determinações) a partir da análise por espectrofotometria UV/Visível, conforme descrito no **item 4.4.1.2.1**, para FURO (matéria-prima empregada) e FURO CD. Os resultados indicaram que os valores médios ficaram dentro dos intervalos de 98 a 101% e a precisão para cada uma das médias ficou abaixo do valor de 5,0% conforme a literatura preconiza (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Nesse sentido, observou-se que o teor de FURO quando complexada manteve-se próximo à FURO (matéria-

prima) demonstrando que, a técnica além de ter sido de fácil reprodução também demonstrou boa recuperação no teor do fármaco após o processo de complexação.

*Análises realizadas em triplicatas

Fármaco	Teor médio (%)	Desvio Padrão (n=3)	Precisão (%)
FURO*	101	0,54	1,06
FURO CD*	100	0,23	0,11

Tabela 7 - Teor de FURO na matéria-prima empregada na obtenção do complexo e FURO CD conforme descrito no item 4.4.1.2.1.

5.1.2. Caracterização das substâncias utilizando a técnica termoanalítica (DSC e TG)

A **Figura 5.1.2a** apresenta os resultados obtidos para as amostras de FURO; HP- β -CD; FURO CD e mistura física FURO/HP- β -CD (na proporção 1:1) quando submetidas às análises térmicas de DSC e TG (já descrito no **item 4.4.1.2.2**).

Os resultados obtidos para FURO indicaram dois eventos endotérmicos bastante característicos: o primeiro ocorreu em torno de 225 °C sugerindo a fusão da substância pura, e no segundo evento ocorreu a decomposição total da FURO, após a temperatura ter atingido 300 °C. Na curva de DSC para FURO CD notou-se que, a entalpia do pico de fusão da FURO foi alterada pela HP- β -CD, evidenciando que de fato houve a formação do complexo e que o mesmo protegeu a FURO do abrupto processo de fusão. Em relação à curva observada pela mistura física FURO/HP- β -CD (na proporção 1:1) observou-se que, não houve interação química entre as substâncias, pois o comportamento térmico da FURO, embora com ponto de fusão menos expressivo, manteve-se próximo de quando a mesma foi analisada na forma de substância pura (SILVA, 2014; GARNERO; CHATTAH; LONGHI, 2013; RUZ *et al.*, 2012; SPRICIGO *et al.*, 2008; SPRICIGO, 2006).

Quanto ao DSC da HP- β -CD observou-se um pico exotérmico no intervalo de 180 e 200 °C, podendo ser atribuído à evaporação de água. O desaparecimento ou mudança de um pico de endo ou exotérmico, quando substâncias são submetidas às análises térmicas, é uma expressiva indicação da formação de complexos de

inclusão (SILVA, 2014; GARNERO; CHATTAH; LONGHI, 2013; RUZ *et al.*, 2012; SPRICIGO *et al.*, 2008; SPRICIGO, 2006).

Nesse sentido, observou-se que as características das substâncias analisadas mantiveram-se bastante próximas daquelas já descritas por outros pesquisadores demonstrando que, as matérias primas utilizadas tinham procedência de qualidade e que o emprego das mesmas, não iriam afetar e/ou interferir nos futuros resultados (SILVA, 2014; GARNERO; CHATTAH; LONGHI, 2013; RUZ *et al.*, 2012; SPRICIGO *et al.*, 2008; SPRICIGO, 2006).

Figura 5.1.2a - Curva DSC obtida sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min de FURO (pura); da HP- β -CD (pura); FURO CD e; mistura física FURO/HP- β -CD (na proporção 1:1).

Em relação aos ensaios de TG/DTG, conforme apresentado pela **Figura 5.1.2b**, o perfil obtido para FURO indicou que não houve a perda de massa, porém houve a fusão do fármaco na temperatura acima de 220 °C e posterior decomposição do mesmo, o que corroborou com os resultados obtidos nas análises realizadas por DSC (SILVA, 2014; GARNERO; CHATTAH; LONGHI, 2013; GRANERO *et al.*, 2010). Para HP- β -CD, a curva indicou que houve a perda de

massa de modo considerável no intervalo entre 350 a 400 °C, por conta da evaporação da água presente na composição da substância (SILVA, 2014).

Já a TG da FURO CD evidenciou que a macromolécula da HP- β -CD fez com que as características da FURO fossem alteradas pois, a fusão da FURO ocorreu por volta de 350 °C indicando que, o complexo de inclusão entre a FURO e a HP- β -CD promoveu uma maior estabilidade térmica para FURO (SILVA, 2014; RUZ *et al.*, 2012).

Figura 5.1.2b - Curva TG/DTG obtida sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min de FURO (pura); HP- β -CD (pura); FURO CD e; mistura física FURO/HP- β -CD (na proporção 1:1).

5.2. Estudo de permeabilidade efetiva das substâncias de interesse nos segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo)

Nessa etapa do presente trabalho foram avaliadas a permeabilidade efetiva (P_{ef}) da FURO, da FURO CD, dos marcadores de alta e baixa permeabilidade (METO e FLUOR, respectivamente). E, ainda foram avaliados os impactos dos inibidores de P-gp e de CYP3A4 na permeabilidade da FURO e da FURO CD. Os ensaios foram realizados por meio do método de perfusão *in situ* de passagem tripla nos três segmentos intestinais selecionados (duodeno, jejuno e íleo) conforme descrito no **item 4.4.2.2**.

A **Tabela 8** apresenta os valores médios (de seis determinações) de permeabilidade efetiva ($P_{ef} \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$) e os respectivos desvios para os marcadores METO e FLUOR. Os valores de P_{ef} obtidos nos três segmentos intestinais indicaram que FLUOR (substância marcadora de baixa permeabilidade) apresentou valores extremamente baixos em relação à METO (substância marcadora de alta permeabilidade), cujos valores foram significativamente maiores do que de FLUOR ($p < 0,05$). A análise estatística dos valores obtidos de P_{ef} para os marcadores de baixa e de alta permeabilidade, respectivamente FLUOR e METO, indicou grandes diferenças entre as médias obtidas ($p < 0,05$), em todos os segmentos de estudo (duodeno, jejuno e íleo). Quanto às análises estatísticas contemplando os três segmentos de estudo (duodeno, jejuno e íleo) observou-se que, os resultados apresentaram-se bastante próximos uns dos outros sem diferenças significativas entre si (**Figura 5.2a**).

Ao analisar-se estatisticamente a média dos resultados de FLUOR observou-se que, a mesma foi expressa com baixa intensidade e com um grande DPR em todos os segmentos de estudo (duodeno, jejuno e íleo), confirmando que trata-se de uma substância de baixa permeabilidade em relação à todas as outras substâncias (PEREIRA, 2011; BREDA *et al.*, 2009; MASUNGI *et al.*, 2008; MOTZ *et al.*, 2007; KOLJONEN *et al.*, 2006). Por outro lado, a análise estatística dos valores obtidos de P_{ef} de METO, demonstrou que apresentam alta intensidade e com baixo DPR, confirmando que tratava-se de uma substância de alta permeabilidade que poderia ser empregada como marcador (PEREIRA, 2011; BREDA *et al.*, 2009; MASUNGI *et al.*, 2008). As **Figura 5.2a**, **5.2.1c** e **5.2.1d** e a **Tabela 17** exibem estas informações.

Os dados de FLUOR foram fundamentais para confirmar a integridade dos segmentos intestinais selecionados, pois mantendo-os sem danos morfológicos, haveria o indicativo de que a viabilidade de cada segmento estava adequada para que o estudo fosse realizado e que as condições fisiológicas foram preservadas durante todo o ensaio. Estes resultados permitiram demonstrar que o manuseio de cada segmento foi realizado de modo adequado e com os devidos cuidados e como consequência, foi possível a mimetização de condições bastante próximas às condições *in vivo*. Caso os resultados fossem contrários aos valores obtidos seria então, um indicativo de que houve danos morfológicos, com perda da viabilidade das membranas dos segmentos selecionados e consequentemente, os dados deveriam ser descartados (PEREIRA, 2011; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2005; FAGERHOLM; JOHANSSON; LENNERNÄS, 1996). Os resultados sugeriram ainda que, o modelo de estudo (perfusão *in situ* de passagem tripla) aqui apresentado, foi capaz de diferenciar a característica de permeabilidade dos dois marcadores empregados, de alta e de baixa permeabilidade.

* marcador de alta permeabilidade

** marcador de baixa permeabilidade

Marcadores de permeabilidade			
Segmentos		METO*	FLUOR**
Duodeno	P _{ef}	3,32	0,003
	DP	0,01	0,003
	DPR	10,07	19,99
Jejuno	P _{ef}	5,05	0,004
	DP	0,01	0,001
	DPR	7,7	21,77
Íleo	P _{ef}	3,74	0,003
	DP	0,01	0,005
	DPR	5,69	23,28

Tabela 8 - Valores médios ($n = 6$) de permeabilidade efetiva ($P_{ef} \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$); os desvios padrões ($DP \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$) e desvios padrões relativos (DPR %) para os grupos de marcadores de permeabilidade (METO e FLUOR) obtidos a partir do modelo de perfusão *in situ* de passagem tripla.

As **Tabelas 9 e 10** apresentam de forma comparativa os valores de permeabilidade efetiva ($P_{ef} \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$) nos três segmentos de estudo (duodeno, jejuno e íleo) obtidos no presente trabalho para FLUOR (marcador de baixa permeabilidade) e para METO (marcador de alta permeabilidade) e os resultados relatados na literatura para as mesmas substâncias determinados com emprego de diferentes modelos para estudo de permeabilidade.

A permeabilidade da FLUOR ocorre principalmente por via paracelular da membrana intestinal e em função disso, é amplamente utilizada como marcador de integridade da membrana em diferentes modelos para estudos de permeabilidade (FU *et al.*, 2015; PEREIRA, 2011; MUENDOERFER *et al.*, 2010; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008; ITAGAKI *et al.*, 2005). Entretanto, há poucos artigos na literatura que relatam dados de permeabilidade da FLUOR obtidos a partir de ensaio de perfusão *in situ*, sobretudo contemplando os três segmentos intestinais. Nesse sentido, o jejuno serviu de parâmetro para os outros segmentos (duodeno e íleo).

O resultado de P_{ef} obtido neste trabalho para o jejuno ($0,004 \pm 0,001 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$; DPR = 21,77 %), com emprego do modelo de perfusão *in situ* de passagem tripla, foi próximo daquele descrito ($0,005 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$) por PEREIRA (2011), que empregou o modelo de perfusão *in situ* de passagem única (**Tabela 9**).

Em relação à METO (marcador de alta permeabilidade), a literatura descreve valores referentes à permeabilidade no jejuno que variam desde $1,44 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ (DAHAN; WEST; AMIDON, 2009) à $75,40 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ (DEZANI, 2010), valores estes que podem ser considerados bastante divergentes entre si. Outros resultados advindos de outros trabalhos também são demonstrados de modo detalhado na **Tabela 10**.

No presente trabalho, o valor de permeabilidade efetiva (P_{ef}) obtido para METO no jejuno ($5,05 \pm 0,01 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$; DPR = 7,7 %) foi próximo daqueles descritos por SALPHATI e colaboradores (2001) ($5,90 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$) e por PEREIRA (2011) ($5,32 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$), onde ambos empregaram o método de perfusão *in situ* passagem única em segmentos intestinais de ratos. A literatura descreve ainda outros valores que se apresentaram abaixo dos obtidos neste trabalho, utilizando o modelo de perfusão *in situ*, como: $3,30 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ (ZAKERI-MILANI *et al.*, 2009), $3,40 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ (UCHIDA *et al.*, 2009), $4,10 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ (THIEL-DEMBY *et al.*, 2009) e $3,50 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ (LENNERNÄS; NYLANDER; UNGELL, 1997).

Tais diferenças são comuns na literatura, provavelmente em função das peculiaridades da técnica utilizada em cada estudo como: a linhagem dos ratos utilizados (ora *Wistar* ora *Sprague-Dawley*); do tipo de material utilizado para isolar o segmento de interesse; do equipamento utilizado para bombear a solução de perfusão contendo o fármaco de interesse; do tempo pré-determinado de intervalo para realizar as coletas; do tempo de duração de cada ensaio, dentre outras variações (**Tabela 10**) (LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2015; PEREIRA, 2011; DAHAN; AMIDON, 2009; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2009a; MASAOKA *et al.*, 2006; SALPHATI *et al.*, 2001).

Dentre as escassas referências que contemplam estudos de perfusão *in situ* realizados nos segmentos do duodeno e do íleo utilizando METO como marcador de permeabilidade, pode-se mencionar DAHAN e colaboradores (2009), os quais relataram a permeabilidade de METO de $1,47 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ no segmento do duodeno e de $1,46 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$, no íleo. No presente trabalho, obteve-se o valor de $3,32 \pm 0,01 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ (DPR = 10,07 %) e $3,74 \pm 0,01 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ (DPR = 5,69 %), respectivamente para duodeno e íleo.

Os dados obtidos de P_{ef} para METO diferiram dos valores de permeabilidade aparente (P_{ap}) descritos na literatura, porém apesar das diferenças dos resultados numéricos entre os estudos aqui citados, houve a conclusão da tendência de alta permeabilidade para METO.

Nesse sentido, a análise comparativa dos valores de P_{ef} para METO obtidos no presente estudo confirmam a alta capacidade de permeação de METO, cujo mecanismo de transporte ocorre via passiva transcelular. Enquanto que FLUOR, utilizado nesse trabalho como marcador de baixa permeabilidade, possui um mecanismo de permeação que ocorre por via passiva paracelular (FU *et al.*, 2015; MUENDOERFER *et al.*, 2010; ZAMBITO *et al.*, 2008; BERGINC *et al.*, 2007; ITAGAKI *et al.*, 2005; KONISHI; HAGIWARA; SHIMIZU, 2002; KUWAYAMA *et al.*, 2002).

Assim sendo, o modelo de perfusão *in situ* desenvolvido nesse trabalho foi eficaz para diferenciar a característica de permeação de dois marcadores, de alta e de baixa permeabilidade, amplamente utilizados nos estudos de permeabilidade (PEREIRA, 2011; MUENDOERFER *et al.*, 2010; ZAMBITO *et al.*, 2008; BERGINC *et al.*, 2007; ITAGAKI *et al.*, 2005; KONISHI; HAGIWARA; SHIMIZU, 2002; KUWAYAMA *et al.*, 2002).

⁽¹⁾ PEREIRA, 2011; ⁽²⁾ DEZANI, 2010; ⁽³⁾ FLATEN *et al.*, 2006; ⁽⁴⁾ BERGINC *et al.*, 2007; ⁽⁵⁾ ZVONAR *et al.*, 2010; ⁽⁶⁾ ZAMBITO *et al.*, 2008; ⁽⁷⁾ MUENDOERFER *et al.*, 2010; ***não encontrado na literatura.

Resultados obtidos	Modelo	Método	Segmento intestinal	Permeabilidade FLUOR
No presente trabalho ($P_{ef} \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$)	<i>In situ</i>	Perfusão intestinal em ratos	Duodeno	0,003
			Jejuno	0,004
			Íleo	0,003
A partir da literatura ($P_{ef} \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$)	<i>In situ</i>	Perfusão intestinal em ratos	Duodeno	***
			Jejuno	0,005 ⁽¹⁾
			Íleo	***
A partir da literatura ($P_{ap} \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$)	<i>In vitro</i>	Células Caco-2		0,02 ⁽³⁾
				0,53 ⁽⁴⁾
				0,04 ⁽⁷⁾
	<i>Ex vivo</i>	Câmaras de difusão		4,30 ⁽²⁾
				0,86 ⁽⁴⁾
				0,95 ⁽⁵⁾
				1,57 ⁽⁶⁾

Tabela 9 - Valores médios ($n = 6$) de permeabilidade efetiva (P_{ef}) obtidos no presente trabalho para os três segmentos de estudo (duodeno, jejuno e íleo) para FLUOR e resultados obtidos a partir da literatura com emprego de diversos métodos para a avaliação da permeabilidade de FLUOR.

Onde: P_{ef} = Permeabilidade efetiva P_{ap} = Permeabilidade aparente

⁽¹⁾ PEREIRA, 2011; ⁽²⁾ DAHAN; AMIDON, 2009; ⁽³⁾ ZAKERI-MILANI *et al.*, 2009a; ⁽⁴⁾ DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; ⁽⁵⁾ MASAOKA *et al.*, 2006; ⁽⁶⁾ SALPHATI *et al.*, 2001; ⁽⁷⁾ UCHIDA *et al.*, 2009; ⁽⁸⁾ THIEL-DEMBY *et al.*, 2009; ⁽⁹⁾ DEZANI, 2010; ⁽¹⁰⁾ LENNERNÄS; NYLANDER; UNGELL, 1997; ⁽¹¹⁾ WATANABE; TAKAHASHI; HAYASHY, 2004; ⁽¹²⁾ LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2015.

Resultados obtidos	Modelo	Método	Segmento intestinal	Permeabilidade METO
No presente trabalho ($P_{ef} \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$)	<i>In situ</i>	Perfusão intestinal em ratos	Duodeno	3,32
			Jejuno	5,05
			Íleo	3,74
A partir da literatura ($P_{ef} \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$)	<i>In situ</i>	Perfusão intestinal em ratos	Duodeno	1,47 ⁽⁴⁾
			Jejuno	5,32 ⁽¹⁾
				1,70 ⁽²⁾
				3,30 ⁽³⁾
				1,44 ⁽⁴⁾
				15,21 ⁽⁵⁾
A partir da literatura ($P_{ap} \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$)	<i>In vitro</i>	Células Caco-2		5,90 ⁽⁶⁾
				3,6 ⁽¹²⁾
	<i>Ex vivo</i>	Câmaras de difusão	Íleo	1,46 ⁽⁴⁾
				75,40 ⁽⁹⁾
				3,50 ⁽¹⁰⁾

Tabela 10 - Valores médios (n = 6) de permeabilidade efetiva (P_{ef}) obtidos no presente trabalho para os três segmentos de estudo (duodeno, jejuno e íleo) para METO e resultados obtidos a partir da literatura com emprego de diversos métodos para avaliação da permeabilidade de METO.

Onde: P_{ef} = Permeabilidade efetiva

P_{ap} = Permeabilidade aparente

Uma vez definidas as condições do ensaio de permeabilidade por meio do modelo de perfusão *in situ* de passagem tripla, nos três segmentos intestinais selecionados (duodeno, jejuno e íleo), a partir dos resultados obtidos para os marcadores, foram desenvolvidos os ensaios de permeabilidade da FURO, na forma pura e na forma complexada à ciclodextrina.

Os resultados referentes à permeabilidade (P_{ef}) da FURO e FURO CD estão apresentados nas **Tabelas 11** e os resultados obtidos a partir da literatura com

emprego outros métodos para avaliação da permeabilidade de FURO e FURO CD estão, respectivamente, demonstrados nas **Tabelas 12 e 13**.

Os valores de permeabilidade (P_{ef}) obtidos para FURO, nos três segmentos avaliados (duodeno, jejuno e íleo) no presente trabalho, foram próximos daqueles obtidos para o marcador de alta permeabilidade (METO), sugerindo que FURO não seja um fármaco de baixa permeabilidade, conforme relatos descritos na literatura entre os períodos de 1998 à 2013 (**Tabelas 11 e 12; Figura 5.2a**) (SCHÖNBICHLER *et al.*, 2013; PERIOLI *et al.*, 2011; LAULICHT; TRIPATHI; MATHIOWITZ, 2011; ADRJANOWICZ *et al.*, 2011; GRANERO *et al.*, 2010; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2009a; WHO, 2006; KAUKONEN *et al.*, 2007; EMEA, 2000; FLASH; DALLA COSTA, 1998; STAVCHANSKY; PADE, 1998).

Não foram localizados trabalhos que descrevessem dados de permeabilidade de FURO no segmento do duodeno por meio de estudos obtidos em modelos de perfusão *in situ* em ratos. Assim sendo, no presente estudo utilizou-se como parâmetro, os valores dos marcadores para fins comparativos. A permeabilidade da FURO no duodeno foi de $3,42 \pm 0,08 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ (DPR = 1,50 %) próximo à permeabilidade de METO no mesmo segmento $3,32 \pm 0,01 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ (DPR = 10,07 %).

Quanto à permeabilidade da FURO no jejuno, por meio do método de perfusão *in situ*, os dados descritos na literatura são muito divergentes, pois variam desde $0,9 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ (LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2015) à $5,0 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ (LENNERNÄS, 2014). O valor encontrado no presente estudo foi de $3,87 \pm 0,11 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ (DPR = 1,29 %), o qual aproximou-se do valor relatado por ZAKERI-MILANI e colaboradores (2009a), cujo valor descrito foi de $3,3 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ (para o jejuno) com emprego de dose de 80 mg de furosemida, ou seja, mesma dosagem utilizada no presente estudo, conforme descrito no **item 4.4.2.2**.

Conforme apresentado nas **Tabelas 11 e 12**, também pôde-se observar que, até o presente momento, não há relatos na literatura quanto à permeabilidade da FURO no íleo. Logo, os valores aqui descritos são de: $3,08 \pm 0,001 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ (DPR = 1,11 %),

Nesse sentido, em todos os segmentos (duodeno, jejuno e íleo) onde foram avaliados a permeabilidade de FURO, observou-se que não houve diferença estatística nos valores obtidos para FURO em relação aos valores obtidos para o marcador METO porém, houve diferença estatística de modo significativo, quando

esses mesmos valores foram comparados aos valores obtidos para FLUOR ($p < 0,05$) (**Tabela 8 e Figura 5.2a**). Embora os valores obtidos sejam contrários daqueles descritos na literatura, neste trabalho, diante das condições experimentais aqui adotadas, pode sugerir que a FURO por ter uma boa permeabilidade, poderia ser classificada como pertencente à classe II do SCB, ou seja, alta permeabilidade e baixa solubilidade (**Tabelas 11, 12 e 18; Figuras 5.2a; 5.2.1c e 5.2.1d.**)

Conforme relatos da literatura, a permeabilidade da furosemida se dá principalmente por transporte passivo paracelular, através das junções íntimas. Uma vez que, apresenta as características requeridas para esse tipo de transporte como: hidrossolubilidade e tamanho de íons dos fármacos menores do que essas junções. Além do mais, a carga elétrica gerada pelos íons do meio e o equilíbrio elétrico da membrana podem tanto facilitar como também dificultar a passagem de íons pelas junções íntimas. Assim, a furosemida é um exemplo de fármaco que utiliza esse mecanismo de transporte (SJÖGREN *et al.*, 2014; ZHOU; QIU, 2009; SHARGEL; WU-PONG; YU, 2005; AULTON, 2005; ENGMAN, 2003; ZANINI; OGA, 1994).

De acordo com a literatura e conforme descrito na revisão da literatura do presente trabalho, as junções íntimas são compostas por várias proteínas (claudinas, ocludinas, proteínas da família Marvel e proteínas citoplasmáticas) que controlam, de modo limitado através da via paracelular, o fluxo de íons e solutos. E ainda, as junções íntimas são caracterizadas por não serem estáticas com estruturas altamente dinâmicas que podem ser moduladas dependendo da substância a ser permeada (FU *et al.*, 2015; STAAT *et al.*, 2015; MATTER; BALDA, 2014; BALDA; MATTER, 2014; GONZÁLEZ-MARISCAL *et al.*, 2014; ITALLIE; ANDERSON, 2014; GONÇALVES, 2010).

Nesse sentido, os métodos selecionados para avaliação da permeabilidade que ocorre pela via paracelular devem permitir a existência e a manutenção destas estruturas intercelulares, da forma mais viável possível e mais próximas daquelas observadas *in vivo*. Conforme apresentado na **Tabela 12**, os resultados de permeabilidade da FURO obtidos por meio de outros modelos como: métodos *in vitro* (células Caco-2; células MDCK; PAMPA) e *ex vivo* (segmentos de tecidos) são menores do que aqueles observados no presente estudo, que utilizou um modelo mais próximo das condições *in vivo*. Uma vez que, o método de perfusão *in situ* apresenta características excelentes, pois permite durante todo o experimento, a preservação do suprimento sanguíneo, inervação intacta, não compromete ou altera

os transportes passivos (paracelular e transcelular) e ainda, a camada de muco continua presente (LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2015; PEREIRA, 2011; VOLPE, 2010; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; BERGGREN, 2006; SONG; LI; LIU, 2006; KUNES *et al.*, 2005; LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; ROUGE; BURI; DOELKER, 1996; SCHURGERS *et al.*, 1986).

Substâncias de estudo			
Segmentos		FURO	FURO CD
Duodeno	P_{ef}	3,42	8,58
	DP	0,08	0,002
	DPR	1,50	0,20
Jejuno	P_{ef}	3,87	9,15
	DP	0,11	0,003
	DPR	1,29	0,31
Íleo	P_{ef}	3,08	8,06
	DP	0,001	0,002
	DPR	1,11	0,24

Tabela 11 - Valores médios ($n = 7$) de permeabilidade efetiva ($P_{ef} \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$); os desvios padrões ($DP \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$) e desvios padrões relativos (DPR %) para os grupos de estudo (FURO e FURO CD) obtidos a partir do modelo de perfusão *in situ* de passagem tripla.

⁽¹⁾ UCHIDA *et al.*, 2009; ⁽²⁾ FOSSATI *et al.*, 2008; ⁽³⁾ JUNG *et al.*, 2006; ⁽⁴⁾ FUJIKAWA *et al.*, 2005; ⁽⁵⁾ SUGANO *et al.*, 2002; ⁽⁶⁾ SUGANO *et al.*, 2003; ⁽⁷⁾ WATANABE; TAKAHASHI; HAYASHI, 2004; ⁽⁸⁾ INGELS *et al.*, 2004; ⁽⁹⁾ JIN *et al.*, 2014; ⁽¹⁰⁾ KIM *et al.*, 2006; ⁽¹¹⁾ ZAKERI-MILANI *et al.*, 2009a; ⁽¹²⁾ ZAKERI-MILANI *et al.*, 2006; ⁽¹³⁾ LENNERNÄS, 2014; ⁽¹⁴⁾ ZAKERI-MILANI *et al.*, 2007; ⁽¹⁵⁾ FAGERHOLM; JOHANSSON; LENNERNÄS, 1996; ⁽¹⁶⁾ VARMA; PANCHAGNULA, 2005; ⁽¹⁷⁾ LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2015; ⁽¹⁸⁾ SILVA, 2014; ***não encontrado na literatura.

Resultados obtidos	Modelo	Método	Segmento intestinal	Permeabilidade FURO
No presente trabalho ($P_{ef} \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$)	<i>In situ</i>	Perfusão intestinal em ratos	Duodeno	3,42
			Jejuno	3,87
			Íleo	3,08
A partir da literatura ($P_{ef} \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$)	<i>In situ</i>	Perfusão intestinal em ratos	Duodeno	***
			Jejuno	1,17 ⁽¹¹⁾
				3,3 ^(12;13)
				2,5 ⁽¹⁴⁾
				1,3 ⁽¹⁵⁾
				1,0 ⁽¹⁶⁾
				0,9 ⁽¹⁷⁾
			Íleo	***
A partir da literatura ($P_{ap} \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$)	<i>In vitro</i>	Células Caco-2		0,049 ⁽¹⁾
				0,050 ⁽²⁾
				0,020 ⁽³⁾
				0,027 ⁽⁸⁾
				0,129 ⁽⁹⁾
		PAMPA		0,034 ⁽⁴⁾
				0,360 ^(5; 6)
				0,030 ⁽¹⁸⁾
		MDCK		0,197 ⁽⁹⁾
	<i>Ex vivo</i>	Câmaras de difusão		0,660 ⁽⁷⁾

Tabela 12 - Valores médios ($n = 7$) de permeabilidade efetiva (P_{ef}) obtidos no presente trabalho para os três segmentos de estudo (duodeno, jejuno e íleo) para FURO e resultados obtidos a partir da literatura com emprego de diversos métodos para avaliação da permeabilidade de FURO.

Onde: P_{ef} = Permeabilidade efetiva P_{ap} = Permeabilidade aparente

Em relação à FURO CD, os valores obtidos de permeabilidades efetivas (P_{ef}) nos três segmentos de estudo (duodeno, jejuno e íleo) (**Tabela 11**) apresentaram-se estatisticamente significativos em relação aos valores obtidos para o marcador de alta permeabilidade (METO) e para a FURO (fármaco na forma pura) com valores significativamente superiores ($p < 0,05$). A análise estatística e comparativa dos valores de P_{ef} obtidos para FURO e FURO CD, indicaram que a complexação favoreceu de modo significativo o processo de permeação do fármaco (**Tabelas 11; 13 e 18; Figuras 5.2a, 5.2.1c e 5.2.1d**).

Embora a complexação tenha favorecido a permeabilidade, resultado evidenciado pelo método de perfusão *in situ* aqui descrito, o mesmo não foi observado quando os estudos de permeabilidade foram conduzidos em modelo *in vitro*, como o PAMPA (SILVA, 2014) para FURO CD. Neste, o pesquisador descreveu valor de permeabilidade para FURO praticamente inexpressivo ($P_{ef} = 0,0287 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$). Valor próximo ao de SILVA (2014) foi encontrado por SADIGHI e colaboradores (2012) ao utilizarem células Caco-2 para avaliarem a permeabilidade da furosemida igualmente complexada com hidroxipropil- β -ciclodextrina, obtendo o valor de $0,34 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$.

Estas diferenças podem ser justificadas, conforme exposto anteriormente, em função das condições experimentais peculiares para cada método ou modelo de estudo. Estudos conduzidos em PAMPA ou em células não mimetizam as condições *in vivo* em relação às junções. Quanto às células Caco-2, embora tenham apresentado um valor um pouco mais alto do que aquele observado para PAMPA, os resultados de permeabilidade da FURO CD, não se mostrou tão expressivo quanto deveria, provavelmente em função da reprodução deficiente das junções íntimas das células intestinais (SADIGHI *et al.*, 2012; GONÇALVES; SOUZA; STORPIRTIS, 2009; MIRET; ABRAHAMSE; GROENE, 2004).

Sugerindo assim que, o método de perfusão *in situ* tenha sido capaz de reproduzir valores de permeabilidades próximas daqueles valores obtidos de quando as substâncias são avaliadas em condições *in vivo*. A **Tabela 13** demonstra os valores obtidos da permeabilidade da FURO CD a partir da literatura quando determinada com emprego de diferentes modelos para estudo de permeabilidade.

Os resultados de permeabilidade obtidos para a FURO CD, significativamente superiores aos obtidos para a FURO, sugeriram que a CD utilizada na obtenção do complexo, proporcionou a dilatação das junções íntimas favorecendo um

aumentando do gradiente de concentração dos íons da furosemida pelas microvilosidades da mucosa gastrintestinal. Essa dilatação ocorreu por conta da alteração da expressão das proteínas presentes nas estruturas dos enterócitos (claudinas, ocludinas, proteínas da família Marvel e as proteínas citoplasmáticas) e como consequência, houve uma maior absorção do fármaco em direção aos enterócitos (FU *et al.*, 2015; STAAT *et al.*, 2015; MORA *et al.*, 2015; MATTER; BALDA, 2014; STELLA *et al.*, 1999; IRIE *et al.*, 1988).

⁽¹⁾ SILVA, 2014; ⁽²⁾ SADIGHI *et al.*, 2012; ***não encontrado na literatura.

Resultados obtidos	Modelo	Método	Segmento intestinal	Permeabilidade FURO CD
No presente trabalho ($P_{ef} \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$)	<i>In situ</i>	Perfusão intestinal em ratos	Duodeno	8,58
			Jejuno	9,15
			Íleo	8,06
A partir da literatura ($P_{ef} \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$)	<i>In situ</i>	Perfusão intestinal em ratos	Duodeno	***
			Jejuno	***
			Íleo	***
A partir da literatura ($P_{ap} \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$)	<i>In vitro</i>	Células Caco-2		0,34 ⁽²⁾
		PAMPA		0,0287 ⁽¹⁾

Tabela 13 - Valores médios (n = 7) de permeabilidade efetiva (P_{ef}) obtidos no presente trabalho para os três segmentos de estudo (duodeno, jejuno e íleo) para FURO CD e resultados obtidos a partir da literatura com emprego de diversos métodos para avaliação da permeabilidade de FURO CD.

Onde: P_{ef} = Permeabilidade efetiva P_{ap} = Permeabilidade aparente

Figura 5.2a - Representação gráfica dos resultados de P_{ef} para os marcadores de alta e baixa permeabilidades sendo respectivamente, METO e FLUOR e para os fármacos: FURO e FURO CD por meio do modelo de perfusão *in situ*. Os resultados representam a média de seis determinações para os marcadores e de sete determinações para os demais grupos. As barras de erros representam os desvios padrão para cada substância e as médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

5.2.1. Estudo de permeabilidade efetiva das substâncias de interesse nos segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo) sob a influência de inibidores de P-gp e de CYP3A4

Os valores obtidos de P_{ef} nos três segmentos de estudo (duodeno, jejuno e íleo) obtidos no presente trabalho para FURO na forma pura e na forma complexada à ciclodextrina na presença de inibidores de P-gp (VERA) e de CYP3A4 (CETO) são demonstrados na **Tabela 14**.

Ao associar-se a FURO com inibidor de P-gp (VERA) para se proceder aos ensaios de perfusão *in situ* nos três segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo) observou-se que, os valores de permeabilidade obtidos foram ligeiramente maiores do que daqueles encontrados nos ensaios para FURO, na sua forma pura (**Tabela 11**). Assim, observou-se que houve influência do inibidor de P-gp no processo de absorção da FURO e conforme descrito na literatura, sugere-se que a P-gp esteja envolvida no mecanismo de permeação da FURO nas microvilosidades intestinais (PERIOLI *et al.*, 2013; WATANABE *et al.*, 2013; PERIOLI *et al.*, 2011; MUDRA; DESINO; DESAI, 2011; GRANERO *et al.*, 2010; TAKANO; YUMOTO; MURAKAMI,

2006; WHO, 2006; VARMA *et al.*, 2005). Os valores destes resultados foram reforçados pela análise estatística, a qual demonstrou que houve diferença entre os dados obtidos de permeabilidade da FURO isolada comparando aos valores obtidos para FURO na presença de inibidor de P-gp, considerando-se $p < 0,05$ (**Tabela 17** e **Figuras 5.2.1a; 5.2.1b; 5.2.1d.**). A **Tabela 14** demonstra os valores obtidos da permeabilidade da FURO com inibidor de P-gp no presente trabalho e a **Tabela 15** compara os valores com aqueles descritos na literatura.

Quando FURO foi associada ao inibidor de CYP3A4 (CETO), observou-se que os valores de permeabilidade obtidos foram ligeiramente superiores daqueles encontrados nos ensaios que continham somente FURO na sua forma pura (**Tabela 11**). Entretanto, a análise estatística indicou que não houve diferença estatística entre FURO e FURO na presença de inibidor de CYP3A4, considerando-se $p < 0,05$. Nesse sentido sugere-se que, FURO não seja um fármaco metabolizado pela CYP3A4 intestinal.

Em 2009, YANG e colaboradores relataram por meio de estudos *in vivo* utilizando amostras de plasma e urina de ratos machos que FURO não seria um fármaco metabolizado pela CYP3A4 intestinal, mas sim, metabolizado pelas isoenzimas da CYP hepática. Já em 2010, AL-MOHIZEA, mesmo utilizando um modelo *ex vivo* (modelo de saco invertido), também observou que a CYP3A4 não impactou na absorção final da FURO (AL-MOHIZEA, 2010; YANG *et al.*, 2009). A **Tabela 16** demonstra os valores obtidos da permeabilidade da FURO com inibidor de CYP3A4 no presente trabalho e comparados com dados da literatura.

Em outro ensaio de perfusão *in situ* para os três segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo), utilizando FURO CD na presença de inibidores de P-gp e de CYP3A4 foi possível observar que, os valores foram ligeiramente inferiores quando comparados aos valores obtidos de permeabilidades para FURO CD. Entretanto, não houve diferença estatística em relação à ação dos inibidores quando comparados aos valores obtidos para FURO CD ($p < 0,05$). Nesse sentido, a presença do inibidor VERA na solução de perfusão contendo a FURO CD não exerceu influência na permeação da FURO nas células intestinais. Até o presente momento, não existem dados na literatura de ensaios realizados com FURO CD sob ação de inibidores de P-gp.

Relatos na literatura em relação aos ensaios que contemplem FURO CD na presença de inibidor de CYP3A4 (CETO) não foram encontrados, logo os únicos

valores obtidos até o momento são do presente trabalho. Os valores de permeabilidades obtidos para esses ensaios mostraram-se inferiores aos valores obtidos para FURO CD, porém próximos aos valores obtidos para FURO na forma pura, sugerindo que mesmo complexada, a FURO não seja um fármaco metabolizado pela CYP3A4 intestinal, corroborando com as sugestões realizadas por YANG e colaboradores (2009) em relação à FURO ser metabolizada somente pelas isoenzimas da CYP hepática.

Em relação à análise estatística dos dados de permeabilidade obtidos para a presença dos inibidores observou-se que, houve diferença estatística quando os valores obtidos de FURO quando associada ao inibidor de P-gp foram comparados aos valores obtidos para FURO na forma pura. Os valores de permeabilidade obtidos para FURO quando associada ao inibidor de CYP3A4 demonstraram que não houve diferença estatística significativa em relação aos valores obtidos para FURO na forma pura (**Tabela 17 e Figuras 5.2.1a; 5.2.1d.**).

Os valores obtidos de FURO CD quando associada ao inibidor de P-gp não foram estatisticamente diferentes dos valores obtidos para FURO CD e quanto à associação do inibidor de CYP3A4 com FURO CD, os dados demonstraram que houve diferença significativa em relação aos valores obtidos para FURO CD (**Tabela 17 e Figuras 5.2.1b; 5.2.1d.**).

Substâncias de estudo contendo inibidores de P-gp e de CYP3A4					
Segmentos		FURO com Inibidor P-gp	Furo CD com inibidor P-gp	FURO com inibidor CYP3A4	Furo CD com inibidor CYP3A4
Duodeno	P _{ef}	4,01	6,01	4,43	6,53
	DP	0,001	0,003	0,001	0,004
	DPR	0,20	0,29	0,17	0,85
Jejuno	P _{ef}	4,71	6,96	3,83	6,32
	DP	0,003	0,002	0,001	0,003
	DPR	0,32	0,24	0,18	0,83
Íleo	P _{ef}	5,38	8,55	3,52	5,12
	DP	0,003	0,005	0,001	0,003
	DPR	0,25	0,58	0,22	0,78

Tabela 14 - Valores médios ($n = 7$) de permeabilidade efetiva ($P_{ef} \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$); os desvios padrões ($DP \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$) e desvios padrões relativos (DPR %) para os grupos de estudo (FURO; FURO CD) sob influência dos inibidores de P-gp (VERA) e de CYP3A4 (CETO) obtidos a partir do modelo de perfusão *in situ* de passagem tripla.

⁽¹⁾ VARMA *et al.*, 2005; ⁽²⁾ DERA KHSHANDEH; HOSSEINALIZADEH; NIKMOHAMMADI, 2011; ***não encontrado na literatura.

Resultados obtidos	Modelo	Método	Segmento intestinal	Permeabilidade FURO com inibidor P-gp
No presente trabalho ($P_{ef} \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$)	<i>In situ</i>	Perfusão intestinal em ratos	Duodeno	4,01
			Jejuno	4,71
			Íleo	5,38
A partir da literatura ($P_{ef} \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$)	<i>In situ</i>	Perfusão intestinal Em ratos	Duodeno	***
			Jejuno	0,69 ⁽¹⁾
			Íleo	***
A partir da literatura ($P_{ap} \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$)	<i>Ex vivo</i>	Saco invertido		0,35 ⁽²⁾

Tabela 15 - Valores médios ($n = 7$) de permeabilidade efetiva (P_{ef}) obtidos no presente trabalho para os três segmentos de estudo (duodeno, jejuno e íleo) para FURO sob ação do inibidor de P-gp e resultados obtidos a partir da literatura com emprego de diversos métodos para avaliação da permeabilidade de FURO com inibidor de P-gp.

⁽¹⁾ AL-MOHIZEA, 2010; ***não encontrado na literatura.

Resultados obtidos	Modelo	Método	Segmento intestinal	Permeabilidade FURO com inibidor CYP3A4
No presente trabalho ($P_{ef} \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$)	<i>In situ</i>	Perfusão intestinal em ratos	Duodeno	4,43
			Jejuno	3,83
			Íleo	3,52
A partir da literatura ($P_{ef} \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$)	<i>In situ</i>	Perfusão intestinal em ratos	Duodeno	***
			Jejuno	***
			Íleo	***
A partir da literatura ($P_{ap} \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$)	<i>Ex vivo</i>	Saco invertido		0,617 ⁽¹⁾

Tabela 16 - Valores médios ($n = 7$) de permeabilidade efetiva (P_{ef}) obtidos no presente trabalho para os três segmentos de estudo (duodeno, jejuno e íleo) para FURO sob ação de inibidores de CYP3A4 e resultados obtidos a partir da literatura com emprego de diversos métodos para avaliação da permeabilidade de FURO com inibidor de CYP3A4.

Onde: P_{ef} = Permeabilidade efetiva P_{ap} = Permeabilidade aparente

A **Figura 5.2.1a** ilustra graficamente os valores médios de permeabilidade efetiva da FURO (forma pura) com os valores comparados de permeabilidade efetiva da FURO sob influência dos inibidores de P-gp e de CYP3A4 por meio do modelo de perfusão *in situ*. Enquanto que, a **Figura 5.2.1b** ilustra graficamente a comparação realizada entre os valores médios de permeabilidade efetiva da FURO CD com os valores de permeabilidade efetiva da FURO CD sob influência dos inibidores de P-gp e de CYP3A4.

Já a **Figura 5.2.1c** representa graficamente o comportamento de todos os fármacos acima discutidos em todos os seguimentos de estudo e na presença de inibidores de P-gp e CYP3A4 por meio do modelo de perfusão *in situ*.

Finalmente, a **Tabela 17** demonstra os valores de p e de T obtidos pela comparação e análise estatística dos resultados e a **Figura 5.2.1d** expressa visualmente todos esses valores numéricos facilitando assim, a compreensão dos valores de t e de F aqui obtidos.

Figura 5.2.1a - Representação gráfica dos resultados de Pef para FURO com seus respectivos inibidores de P-gp e CYP3A4 por meio do modelo de perfusão *in situ*. Os resultados representam a média de sete determinações para esses grupos. As barras de erros representam os desvios padrão para cada substância e as médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Figura 5.2.1b - Representação gráfica dos resultados de Pef para a FURO CD com seus respectivos inibidores de P-gp e CYP3A4 por meio do modelo de perfusão *in situ*. Os resultados representam a média de sete determinações para esses grupos. As barras de erros representam os desvios padrão para cada substância e as médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Figura 5.2.1c. - Representação gráfica dos resultados obtidos para todas as substâncias utilizadas para os estudos empregando o modelo de perfusão *in situ* nos diferentes segmentos intestinais. Em **A**, observa-se o comportamento de cada substância em cada segmento intestinal de estudo e ainda, que não houve diferença estatística entre os segmentos de estudo (duodeno, jejuno e íleo). Em **B**, observa-se a intensidade de permeação de cada substância avaliada nos diferentes segmentos intestinais. Em **C**, observa-se detalhadamente que, não houve diferença estatística quanto à permeação nos segmentos de estudo (duodeno, jejuno e íleo). Em **D**, observa-se o impacto dos inibidores de P-gp e de CYP3A4 nos segmentos intestinais tanto para FURO quanto para FURO CD.

Substâncias de interesse	Fluoresceína		Metoprolol		FURO		FURO CD		FURO - P-gp		FURO - CYP3A4		FURO CD - P-gp		FURO CD - CYP3A4	
	P	T	p	T	p	T	p	T	p	T	P	T	p	T	p	T
Fluoresceína	—	—	0,003	5,11	0,004	4,95	0,000	12,15	0,000	6,62	0,001	5,53	0,000	10,13	0,000	8,45
Metoprolol	0,003	5,11	—	—	1,000	0,16	0,000	-7,04	0,791	-1,51	1,000	-0,41	0,003	-5,02	0,070	-3,34
FURO	0,004	4,95	1,000	0,16	—	—	0,000	7,20	0,705	1,67	0,999	0,57	0,003	5,18	0,053	3,50
FURO CD	0,000	12,15	0,000	-7,04	0,000	7,20	—	—	0,001	5,53	0,000	6,63	0,503	-2,02	0,037	-3,70
FURO - P-gp	0,000	6,62	0,791	-1,51	0,705	1,67	0,001	5,53	—	—	0,947	1,10	0,052	3,51	0,612	1,83
FURO - CYP3A4	0,001	5,53	1,000	-0,41	0,999	0,57	0,000	6,63	0,947	1,10	—	—	0,007	4,61	0,140	2,93
FURO CD - P-gp	0,000	10,13	0,003	-5,02	0,003	5,18	0,503	-2,02	0,052	3,51	0,007	4,61	—	—	0,700	1,68
FURO CD - CYP3A4	0,000	8,45	0,070	-3,34	0,053	3,50	0,037	-3,70	0,612	1,83	0,140	2,93	0,700	1,68	—	—

Tabela 17 - Valores de p e T resultantes da comparação estatística dos resultados de P_{ef} para as substâncias de estudo FURO e FURO CD, contendo ou não os inibidores de P-gp e de CYP3A4 e ainda, os marcadores de alta e baixa permeabilidades, sendo respectivamente, METO e FLUOR, considerando $p < 0,05$.

Figura 5.2.1d. - Ilustração dos resultados obtidos para os valores de p e de T de todas as substâncias utilizadas para os estudos empregando o modelo de perfusão *in situ* de passagem tripla. Os valores que não compreendem zero em seus intervalos são considerados significativamente diferentes de modo que, quando contemplam zero nos intervalos, pode-se afirmar que não houve diferença significativa entre as substâncias comparadas.

5.2.2. Taxa de fluxo de água das substâncias de interesse nos segmentos intestinais

As **Tabelas 18; 19; 20 e 21** demonstram os valores médios encontrados para a taxa de fluxo de água (TFA) utilizando o método gravimétrico para cada grupo de animal utilizado no presente trabalho. Por se tratar de uma ocorrência fisiologicamente dinâmica que é alterada dependendo do tipo de fármaco avaliado, conteúdo luminal, composição, pH e osmolaridade da solução de perfusão, os valores demonstrados nas tabelas foram variados. Entretanto, em estudos de perfusão *in situ* realizados por ZAKERI-MILANI e colaboradores (2007) na porção proximal de jejuno de ratos, com o uso o método gravimétrico, os valores de taxa de TFA descritos por eles variaram de acordo com o fármaco de estudo e relataram que, por se tratar de um fenômeno fisiológico constante, os resultados poderiam variar entre -318,40 a 90,0 $\mu\text{L/h/cm}$, onde valores negativos representariam a ocorrência de secreção de água para o lúmen intestinal enquanto que, valores

positivos demonstrariam que haveria a absorção de água a partir do lúmen intestinal (PEREIRA, 2011; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2007).

Outros pesquisadores simplificaram essas informações enfatizando que, se o fluxo for maior do que zero ($> 0,00$), ou seja, fluxo positivo significaria que houve absorção de água a partir do lúmen intestinal e o conteúdo ou o fármaco de estudo encontra-se concentrado, caso contrário, ocorreria a secreção de água e o fármaco ou o conteúdo sofreu diluição (PEREIRA, 2011; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2007; SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001).

As faixas de valores empregadas para TFA para os segmentos da porção proximal de duodeno e íleo de ratos não foram encontradas na literatura e portanto, como parâmetro, empregou-se o mesmo intervalo obtido para a porção proximal de jejuno.

Ratos	METO			FLUOR		
	D	J	I	D	J	I
1	0,10	0,21	0,28	0,22	0,12	0,12
2	0,15	0,15	0,17	0,12	0,22	0,26
3	0,25	0,24	0,13	0,10	0,13	0,12
4	0,14	0,13	0,21	0,14	0,34	0,24
5	0,11	0,13	0,11	0,24	0,14	0,04
6	0,17	0,22	0,24	0,14	0,24	0,14

Tabela 18 - Valores médios referentes à TFA ($\mu\text{L/h/cm}$) obtidos a partir do método gravimétrico para a avaliação da permeabilidade intestinal nos três segmentos selecionados em animais pertencentes ao grupo controle METO e FLUOR.

Ratos	FURO			FURO CD		
	D	J	I	D	J	I
1	0,15	0,38	0,29	0,14	0,12	0,10
2	0,24	0,15	0,18	0,29	0,19	0,18
3	0,14	0,15	0,16	0,28	0,17	0,36
4	0,23	0,14	0,15	0,27	0,16	0,15
5	0,13	0,13	0,15	0,16	0,25	0,15
6	0,12	0,22	0,14	0,14	0,24	1,04
7	0,22	0,21	0,11	0,14	0,13	0,03

Tabela 19 - Valores médios referentes à TFA ($\mu\text{L/h/cm}$) obtidos a partir do método gravimétrico para a avaliação da permeabilidade intestinal nos três segmentos selecionados em animais pertencentes ao grupo de estudo contendo FURO e FURO CD.

Ratos	FURO e VERA (inibição da P-gp)			FURO CD e VERA (inibição da P-gp)		
	D	J	I	D	J	I
1	0,15	0,10	0,17	1,07	0,02	-0,04
2	0,11	1,08	0,12	0,16	0,01	0,10
3	0,09	0,07	0,31	0,13	0,01	0,02
4	1,07	0,06	0,30	0,12	0,03	0,32
5	0,06	0,06	0,19	0,22	0,01	0,12
6	0,13	1,04	0,18	0,10	0,01	0,23
7	0,12	0,01	0,17	0,10	0,08	0,13

Tabela 20 - Valores médios referentes à TFA ($\mu\text{L/h/cm}$) obtidos a partir do método gravimétrico para a avaliação da permeabilidade intestinal nos três segmentos selecionados em animais pertencentes ao grupo de estudo sob ação do inibidor de P-gp, VERA, nos fármacos FURO e FURO CD.

Ratos	FURO e CETO (inibição da CYP3A4)			FURO CD e CETO (inibição da CYP3A4)		
	D	J	I	D	J	I
1	0,10	0,12	0,09	1,20	0,37	0,12
2	0,06	1,09	0,07	0,18	0,41	0,10
3	0,04	0,07	0,06	-0,14	0,27	0,08
4	0,03	0,06	0,04	0,40	0,23	0,18
5	0,03	1,06	0,04	0,14	0,37	0,06
6	0,02	1,05	0,03	-0,37	0,30	1,80
7	0,21	0,34	0,02	1,16	0,24	0,32

Tabela 21 - Valores médios referentes à TFA ($\mu\text{L/h/cm}$) obtidos a partir do método gravimétrico para a avaliação da permeabilidade intestinal nos três segmentos selecionados em animais pertencentes ao grupo de estudo sob ação do inibidor da CYP3A4, CETO, nos fármacos FURO e FURO CD.

5.2.3. Análise histológica dos segmentos contendo a FURO CD

As lâminas contendo amostras dos segmentos intestinais foram observadas em microscópio óptico com aumento de 10 e 40 vezes e as estruturas das microvilosidades intestinais foram morfolologicamente analisadas. As lâminas reproduziram o corte longitudinal de cada segmento de estudo, ou seja, duodeno, jejuno e íleo (OVALLE; NAHIRNEY, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995; STERNBERG, 1992).

A **Figura 5.2.3.** ilustra as imagens de amostras obtidas após o ensaio de perfusão *in situ* da FURO CD e comparadas com os segmentos de controle (isentas do ensaio de perfusão *in situ*) sob aumento de 10x e de 40x em microscópio óptico.

Os segmentos intestinais ao serem visualizados sob aumento de 10x em microscópio óptico sugeriram que, após a realização do ensaio de perfusão *in situ* com o uso de CDs, não tiveram suas estruturas alteradas. Portanto, as CDs podem ser utilizadas com segurança nas formulações farmacêuticas (ZHENG; ZUO; CHOW, 2006).

Quando os segmentos de estudo foram visualizados em microscópio óptico sob o aumento de 40x, observou-se que não houve danos morfológicos significativos, ou seja, os segmentos de estudo (duodeno, jejuno e íleo) mantiveram-se íntegros consolidando ainda mais que, o método foi realizado de maneira cuidadosa e que os resultados obtidos foram confiáveis.

Figura 5.2.3. - Fotomicrografias das vilosidades intestinais obtidas antes (isentas de fármacos) e após o ensaio de perfusão *in situ* com FURO CD. Nos grupos controle (A; B; C) observa-se a arquitetura vilositária preservada (HE) e nos grupos de estudo também observa-se a estrutura conservada para os três segmentos de estudo. Em 1 observa-se a presença de Glândulas de Brunner característica do duodeno; em 2 observa-se vilosidades alongadas características do jejuno e em 3, observa-se as Células de Paneth características do íleo.

5.3. Validação do método cromatográfico para a quantificação de FURO e dos marcadores METO e FLUOR

Para a determinação das concentrações de FURO e dos marcadores empregados (METO e FLUOR) nas amostras obtidas a partir dos ensaios de perfusão *in situ*, foram desenvolvidos métodos cromatográficos empregando-se a CLAE com detecção de fluorescência (já descritos no **item 4.5.1.3.**) e de acordo com o **item 4.5.1.4.** já descrito no presente trabalho, estes métodos foram validados conforme preconizado na literatura e os seguintes parâmetros foram determinados: exatidão; precisão; sensibilidade (LD e LQ); linearidade e estabilidade (BRASIL, 2012; UNITED, 2012; ICH, 2005).

5.3.1. Linearidade

Os métodos mostraram linearidade entre as faixas: (i) de 0,01 µg a 0,5 µg para METO; (ii) de 0,01 µg a 0,2 µg para FLUOR e; (iii) de 0,01 µg a 0,4 µg para FURO. A **Figura 5.3.1a** demonstra as curvas analíticas obtidas para as referidas substâncias de interesse.

Figura 5.3.1a - Curvas analíticas obtidas para (A) METO; (B) FLUOR e; (C) FURO utilizando o método CLAE com detector de fluorescência.

Os parâmetros coeficiente angular; coeficiente linear e coeficiente de determinação (r^2) obtidos por regressão linear das curvas analíticas definidas para METO, FLUOR e FURO seguem descritos na **Tabela 22**.

Parâmetro	METO	FLUOR	FURO
Coeficiente angular (a)	1,2796	9,5514	5,6479
Coeficiente linear (b)	0,02	- 0,0842	- 0,0117
Coeficiente de determinação (r^2)	0,9958	0,9945	0,9918

Tabela 22 - Parâmetros relacionados à regressão linear das curvas analíticas obtidas para a quantificação de METO, FLUOR e FURO por CLAE e detecção por fluorescência.

Os cromatogramas obtidos a partir das análises da FURO, METO e FLUOR estão apresentados na **Figura 5.3.1b**. Por meio destes, observou-se que os métodos desenvolvidos demonstraram lineares de acordo com o que a *RDC n.27, de 17 de maio de 2012* da Agência Nacional de Vigilância Sanitária preconiza (BRASIL, 2012).

Quanto aos cromatogramas obtidos, observou-se que a solução de perfusão isenta de substâncias (branco) não apresentou interferentes no tempo de corrida dos fármacos de interesse, ou seja, FURO; METO e FLUOR.

Em relação ao tempo de retenção de cada fármaco estudado, observou-se que, todos foram bem distribuídos ao longo da corrida. Sendo que, para METO o tempo de retenção foi em torno de 3,0 a 4,0 minutos com 12 minutos de corrida; para FLUOR, entre 14,0 a 15,0 minutos com 20 minutos de corrida cromatográfica e finalmente, para FURO, o tempo foi de 4,0 a 5,0 minutos totalizando uma corrida de 15 minutos. Quanto ao PROP (padrão interno), o tempo de retenção foi entre 8,0 a 10,0 minutos, mostrando que o método foi seletivo e portanto, adequado para ser aplicado.

Figura 5.3.1b - Cromatogramas obtidos para: (1) solução de perfusão isenta de substância de estudo (branco); (2) METO (marcador de alta permeabilidade) e PROP (padrão interno); (3) FLUOR (marcador de baixa permeabilidade) e PROP (padrão interno) e; (4) FURO e PROP (padrão interno) utilizando o método CLAE com detector de fluorescência.

5.3.2. Precisão, Exatidão, LD e LQ

A **Tabela 23** demonstra os valores obtidos para os parâmetros de precisão (inter e intra ensaios), sensibilidade (LD e LQ) e ainda, para exatidão. Observou-se que, os resultados para precisão e sensibilidade estiveram dentro da inferioridade de 15% e que, o parâmetro de exatidão limitou-se dentro da faixa de 85 a 115%, conforme preconizado pela *RDC n.27, de 17 de maio de 2012* (BRASIL, 2012).

Substância	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Precisão (%)		Exatidão (%)
				Intra ensaio	Inter ensaio	
METO	500	0,23	0,77	7,47	4,94	94,52
	300	0,12	0,40	1,59	7,48	99,59
	200	0,11	0,37	3,03	7,00	96,77
	100	0,08	0,26	1,61	7,34	107,31
	75	0,11	0,38	11,91	13,68	95,90
	50	0,09	0,31	9,23	10,15	97,02
	25	0,03	0,09	6,86	5,63	105,50
	12,5	0,03	0,08	6,69	2,46	97,41
	10	0,02	0,05	12,04	14,51	96,39
FLUOR	200	0,51	1,70	14,16	14,37	99,35
	150	0,21	0,69	4,56	14,73	98,87
	125	0,13	0,42	1,56	9,62	96,11
	100	0,07	0,23	3,83	10,00	96,02
	75	0,10	0,34	9,62	13,87	96,98
	50	0,07	0,24	4,98	9,42	96,76
	25	0,05	0,18	13,55	12,00	96,18
	12,5	0,01	0,04	14,72	14,03	107,69
	10	0,02	0,06	14,51	14,63	94,44
FURO	400	0,75	2,52	2,56	6,80	95,76
	300	1,43	4,77	10,32	7,11	94,63
	200	1,32	4,40	8,14	10,19	96,59
	100	2,44	8,13	7,07	7,16	96,14
	75	0,06	0,19	1,84	9,42	99,70
	50	0,08	0,28	5,30	14,43	85,07
	25	0,08	0,25	7,22	12,82	95,49
	12,5	0,01	0,03	2,98	10,94	95,14
	10	0,02	0,07	1,68	6,58	87,66

Tabela 23 - Parâmetros obtidos a partir da média de três leituras em três dias distintos para a obtenção de LD; LQ; Precisão e Exatidão para a quantificação de METO, FLUOR e FURO.

5.3.3. Estabilidade

5.3.3.1. Estabilidade de curta duração e de ciclos de congelamento e descongelamento

Os resultados obtidos tanto para análises de curta duração, conforme descrito na **Tabela 24**, quanto para análises de ciclos de congelamento e descongelamento, conforme apresentado na **Tabela 25**, mostram que a mudança de temperatura não interferiu na estabilidade das amostras. Logo, os parâmetros analisados mantiveram-se dentro dos intervalos de aceitação conforme preconizado pela *RDC n.27, de 17 de maio de 2012* da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, com precisão dentro da inferioridade de 15%; exatidão dentro do intervalo de $\pm 15 \%$ e; desvio padrão igual ou inferior à 5 % (BRASIL, 2012).

Amostras recém preparadas e imediatamente analisadas				Amostras descongeladas após seis horas sob temperatura ambiente e analisadas posteriormente		
Substância	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Desvio Padrão (%)
METO	CQA (500)	12,16	101,65	11,09	96,77	4,88
	CQM (100)	6,28	99,31	4,87	94,39	4,92
	CQB (12,5)	10,21	97,41	10,03	95,88	1,53
FLUOR	CQA (200)	3,90	99,35	8,57	97,69	1,66
	CQM (75)	14,44	94,98	14,51	90,27	4,71
	CQB (25)	1,96	96,18	1,83	92,54	3,64
FURO	CQA (400)	9,85	95,76	10,44	92,07	3,69
	CQM (100)	4,59	97,14	2,38	94,79	2,35
	CQB (12,5)	11,11	100,49	12,03	95,51	4,98

Tabela 24 - Resultados referentes ao estudo de estabilidade do metoprolol, fluoresceína e furosemda em amostras de perfusatos comparando análises imediatas de amostras recém preparadas com amostras descongeladas e mantidas por seis horas sob temperatura ambiente.

Amostras recém preparadas e imediatamente analisadas				CICLO 1 de descongelamento			CICLO 2 de descongelamento			CICLO 3 de descongelamento		
Substância	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Desvio Padrão	Precisão (%)	Exatidão (%)	Desvio padrão	Precisão (%)	Exatidão (%)	Desvio Padrão (%)
METO	CQA (500)	12,16	94,52	9,55	93,97	0,55	7,85	94,01	0,51	5,25	92,54	1,54
	CQM (100)	6,28	99,31	3,47	97,65	1,66	7,18	97,98	1,33	4,16	97,75	2,82
	CQB (12,5)	10,21	97,41	12,96	96,64	0,77	3,79	92,45	4,96	8,66	91,41	2,39
FLUOR	CQA (200)	3,90	99,35	10,63	95,04	4,31	3,49	96,13	3,22	6,52	95,11	4,37
	CQM (75)	14,44	96,98	4,18	92,50	4,48	10,27	94,86	2,12	7,09	94,34	3,02
	CQB (25)	1,96	96,18	1,11	92,92	3,26	2,64	92,20	3,98	3,03	98,20	2,05
FURO	CQA (400)	9,85	95,76	3,32	91,81	3,95	2,52	92,76	3,01	2,45	91,87	1,25
	CQM (100)	4,59	96,14	4,53	93,08	3,06	2,18	93,49	2,65	3,28	92,59	4,13
	CQB (12,5)	11,11	95,49	4,63	91,33	4,16	2,24	93,95	1,54	3,14	93,01	3,48

Tabela 25 - Resultados referentes ao estudo de estabilidade do METO; FLUOR e FURO em amostras de perfusatos, comparando análises imediatas de amostras recém preparadas com amostras mantidas à temperatura de - 20 °C e posteriormente submetidas à sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento.

6. CONCLUSÕES

✓ A técnica de liofilização utilizada, seguindo procedimentos previamente desenvolvidos e descritos na literatura, permitiu a obtenção do complexo furosemida-ciclodextrina (HP- β -CD), conforme os resultados das análises termoanalíticas;

✓ O modelo de perfusão *in situ* desenvolvido nesse trabalho foi eficaz para diferenciar as características de permeação dos marcadores de alta (metoprolol) e de baixa permeabilidade (fluoresceína) em todos os segmentos avaliados (duodeno, jejuno e íleo);

✓ Os valores de permeabilidade obtidos para furosemida mostraram-se próximos aos valores obtidos para o marcador de alta permeabilidade (metoprolol) e distintos daqueles observados para o marcador de baixa permeabilidade (fluoresceína), sugerindo que a furosemida apresenta alta permeabilidade, o que a classificaria na classe II do SCB, nas condições experimentais adotadas;

✓ Os resultados de permeabilidade obtidos para a furosemida complexada com ciclodextrina (FURO CD) foram significativamente superiores aos obtidos para a furosemida (forma pura) sugerindo que a ciclodextrina (na forma de complexo) proporcionou a alteração das estruturas das junções íntimas favorecendo o aumento da permeabilidade do fármaco;

✓ O inibidor de P-gp influenciou positivamente na permeabilidade da furosemida (FURO) na forma pura mas não houve influência do mesmo com relação à permeabilidade de furosemida na forma complexada (FURO CD), nas condições experimentais adotadas no presente trabalho;

✓ A inibição de CYP3A4 não influenciou de forma significativa na permeabilidade de FURO e FURO CD;

✓ O complexo furosemida-ciclodextrina (HP- β -CD), conforme os resultados das análises histológicas, não alterou a morfologia do epitélio intestinal dos ratos após a realização do ensaio de perfusão *in situ*, nas condições experimentais adotadas no presente trabalho. Sugerindo assim que, a formulação farmacêutica (complexo furosemida-HP- β -CD) possa ser segura para ser empregada em diversos tratamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADRJANOWICZ, K.; KAMINSKI, K.; GRZYBOWSKA, K.; HAWELEK, L.; PALUCH, M.; GRUSZKA, I.; ZAKOWIECKI, D.; SAWICKI, W.; LEPEK, P.; KAMYSZ, W.; GUZIK, L. Effect of cryogrinding on chemical stability of the sparingly water-soluble drug furosemide. *Pharm Res*, v.28, 2011. p.3220-3236.
2. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Resolução RDC n.27, de 17 de maio de 2012*. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/564310004b60537e891f9baf8fde4db/RDC+27+12+-Valida%C3%A7%C3%A3o+de+M%C3%A9todos+Bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 13 ago. 2014.
3. AL-MOHIZEA, A.M. Influence of intestinal efflux pumps on the absorption and transport of furosemide. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v.18, n.2, p.97-101, 2010.
4. AMBROGI, V.; PERIOLI, L.; PAGANO, C.; LATTERINI, L.; MARMOTTINI, F.; RICCI, M.; ROSSI, C. MCM-41 for furosemide dissolution improvement. *Microporous and Mesoporous Materials*, v.147, n.1, p.343-349, 2012.
5. AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. Guidelines on Euthanasia: formerly report of the AVMA Panel on Euthanasia. Report of the AVMA Panel on euthanasia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.218, n.5, 2007.
6. AMIDON, G.L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharmaceutical Research*, v.12, n.3, p.413-420, 1995.
7. ANDRADE, S.F. *Manual de terapêutica veterinária*. 3.ed. São Paulo. ROCA, 2008. p.313-318.
8. AULTON, M.E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 677p.

9. AVDEEF, A. Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state). *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v.1, n.4, p.277-351, 2001.
10. AVDEEF, A. *Absorption and drug development: solubility, permeability and charge state*. Hoboken: Wiley Interscience, 2003. 287p.
11. BALDA, M.S.; MATTER, K. Transmembrane proteins of tight junctions. *Cell & Developmental Biology*, v. 11, p. 281-289, 2000.
12. BALDA, M.S.; MATTER, K. Tight junctions in health and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology* v.36, p.147-148, 2014.
13. BALIMANE, P.V.; CHONG, S.; MORRISON, R.A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v.44, n.1, p.301-312, 2000.
14. BALIMANE, P.V.; CHONG, S. Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. *Drug Discovery Today*, v.10, n.5, p.301-312, 2005.
15. BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. *Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos*. 2.ed. São Paulo: Artmed, 2008. 536p.
16. BARTHE, L.; WOODLEY, J.F.; KENWORTHY, S.; HOUIN, G. An improved everted gut sac as a simple and accurate technique to measure paracellular transport across the small intestine. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, v.23, n.2, p.313-323, 1998a.
17. BARTHE, L.; BESSOUET, M.; WOODLEY, J.F.; HOUIN, G. The improved everted gut sac: a simple method to study intestinal P-glycoprotein. *International Journal of Pharmaceutics*, v.173, n.1/2, p.255-258, 1998b.
18. BENET, L.; IZUMI, T.; ZHANG, Y.; SILVERMAN, J.A.; WACHER, V.J. Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery. *Journal of Controlled Release*, v.62, p.25-31, 1999.
19. BERGGREN, S. *Drug transport and metabolism in rat and human intestine*. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis, 2006. 53p. (Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy, 41).

20. BERGGREN, S.; HOOGSTRAATE, J.; FAGERHOLM, U.; LANNERNAS, H. Characterization of jejunal absorption and apical efflux of ropivacaine, lidocaine and bupivacaine in the rat using *in situ* and *in vitro* absorption models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.21, p.553-560, 2004.
21. BERGINC, K.; ZAKELJ, S.; LEVISTK, L.; URSIC, D.; KRISTL, A. Fluorescein transport properties across artificial lipid membranes, Caco-2 cell monolayers and rat jejunum. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.66, p.281-285, 2007.
22. BONAMICI, D. *Sistema de classificação biofarmacêutica e bioisemções*. São Paulo, 2009. 159p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
23. BREDÁ, S.A.; JIMENEZ-KAIRUZ, A.F.; MANZO, R.H.; OLIVEIRA, M.E. Solubility behavior and biopharmaceutical classification of novel high-solubility ciprofloxacin and norfloxacin pharmaceutical derivatives. *International Journal of Pharmaceutics*, v.371, p.106-113, 2009.
24. CAO, X.; GIBBS, S.T.; FANG, L.; MILLER, H.A.; LANDOWSKI, C.; SHIN, H.C.; LANNERNÄS, H.; ZHONG, Y.; AMIDON, G.L.; YU, L.X.; SUN, D. Why is it challenging to predict intestinal drug absorption and oral bioavailability in human using rat model. *Pharmaceutical Research*, v.23, n. 8, 2006.
25. CAO, X.; YU, L.X.; SUN, D. Drug absorption principles. In: KRISHNA, R.; YU, L., eds. *Biopharmaceutics applications in drug development*. New York, London: Springer, p.75-100, 2008.
26. CAPALDO, C.T.; NUSRAT, A. Claudin switching: physiological plasticity of the tight junction. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v.42, p. 22-29, 2015.
27. CHAN, L.M.S.; LOWES, S.; HIRST, B.H. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.21, n.1, p.25-51, 2004.
28. CHARMAN, W.N.; PORTER, C.J.H.; MITHANI, S.; DRESSMAN, J.B. Physicochemical and physiological mechanisms for the effects of food on drug

- absorption: the role of lipids and pH. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.86, n.3, p.269-282, 1997.
29. CHUNGI, V.S.; DITTERT, L.W.; SMITH, R.B. Gastrintestinal sites of furosemide absorption in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, v.4, n.1, p.27-38, 1979.
 30. CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. Resolução RE n.1000, de 11 de maio de 2012. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências. Disponível em: http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao_1000.pdf. Acesso em: 10 out. 2013.
 31. COOK, T.J.; SHENOY, S.S. Intestinal permeability of chlorpyrifos using the single-pass intestinal perfusion method in the rat. *Toxicology*, v.184, n.2/3, p.125-133, 2003.
 32. CORÁ, L.A.; AMÉRICO, M.F.; OLIVEIRA, R.B.; SERRA, C.H.R.; BAFFA, O.; EVANGESLITA, R.C.; OLIVEIRA, G.F.; MIRANDA, J.R.A. Biomagnetic methods: technologies applied to pharmaceutical research. *Pharmaceutical Research*, v.28, n.3, p.438-455, 2011.
 33. DAHAN, A.; AMIDON, G.L. Segmental dependent transport of low permeability compounds along the small intestine due to P-Glycoprotein: the role of efflux transport in the oral absorption of BCS class III drugs. *Molecular Pharmaceutics*, v.6, n.1, p.19-28, 2009.
 34. DAHAN, A.; WEST, B.T.; AMIDON, G.L. Segmental-dependent membrane permeability along the intestine following oral drug administration: evaluation of a triple single-pass intestinal perfusion (TSPiP) approach in the rat. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.36, p.320-329, 2009.
 35. DAHAN, A.; MILLER, J.M.; HILFINGER, J.M.; YAMASHITA, S.; YU, L.X.; LENNERNÄS, H.; AMIDON, G.L. High permeability criterion for BCS classification: segmental/pH dependent permeability considerations. *Molecular Pharmaceutics*, v.7, n.5, p.1827-1834, 2010.
 36. DAHAN, A.; WOLK, O.; ZUR, M.; AMIDON, G.L.; ABRAHAMSSON, B.; CRISTOFOLETTI, R.; GROOT, D.W.; KOPP, S.; LANGGUTH, P.; POLLI, J.E.;

- SHAH, V.P.; DRESSMAN, J.B. Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: codeine phosphate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.103, p.1592-1600, 2014.
37. DEFERME, S.; ANNAERT, P.; AUGUSTIJNS, P. *In vitro* screening models to assess intestinal drug absorption and metabolism. In: EHRHARDT, C.; KIM, K.-J., eds. *Drug absorption studies: in situ, in vitro and in silico* models. New York: Springer, 2008. p.182-215. (Biotechnology: Pharmaceuticas Aspects, v.7).
38. DERA KHSHANDEH, K.; HOSSEINALIZADEH, A.; NIKMOHAMMADI, M. The Effects of PLGA microparticles on intestinal absorption of P-glycoprotein substrate using the everted rat intestinal sac model. *Arch Pharm Res*, v. 34, n.11, p.1989-1997, 2011.
39. DESBANS, C.; HILGENDORF, C.; LUTZ, M.; BACHELLIER, P.; ZACHARIAS, T.; WEBER, J.C.; DOLGOS, H.; RICHERT, L.; UNGELL, A.L. Prediction of fraction metabolized via CYP3A in humans utilizing cryopreserved human hepatocytes from a set of 12 single donors. *Xenobiotica*, v.44, n.1, p.17-27, 2013.
40. DEZANI, A.B. *Avaliação in vitro da solubilidade e da permeabilidade da lamidivina e da zidovudina: aplicações na classificação biofarmacêutica*. São Paulo, 2010. 141p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
41. 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.
42. DEVARAKONDA, B.; OTTO, D.P.; JUDEFEIND, A.; HILL, R.A.; VILLIERS, M.M. Effect of pH on the solubility and release of furosemide from polyamidoamine (PAMAM) dendrimer complexes. *International Journal of Pharmaceutics*, v.345, p.142-153, 2007.
43. DI FIORE, M.S.H. *Atlas de histologia*. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. p.106-111.

44. DIAS, I.L.T.; OLIVEIRA NETO, G.; MARTINS, J.L.S. Metodologias analíticas para a determinação da furosemda. *Lecta-USF*, v.22, n.1/2, p.19-26, 2004.
45. DIFUSAO FACILITADA. Disponível em: https://pt.wikipedia.org/wiki/Difus%C3%A3o_facilitada. Acesso em: 22 nov. 2015.
46. DUDEJA, P.K.; HARIG, J.M.; WALI, R.K.; KNAUP, S.M.; RAMASWAMY, K.; BRASITUS, T.A. Differential modulation of human small intestinal brush-border membrane hemileaflet fluidity affects leucine aminopeptidase activity and transport of D-glucose and L-glutamate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.284, n.2, p.338-345, 1991.
47. EKINS, S.; BOULANGER, B.; SWAN, P.W.; HUPCEY, M.A.Z. Towards a new age of virtual ADME/Tox and multidimensional drug discovery. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v.16, n.5/6, p.381-401, 2002.
48. EKINS, S.; MESTRES, J.; TESTA, B. *In silico* pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. *British Journal of Pharmacology*, v.152, p.9-20, 2007.
49. EL-KORDY, E.A.; ALSHAHRANI, A.M. Effect of genistein, a natural soy isoflavone, on pancreatic β -cells of streptozotocin-induced diabetic rats: histological and immunohistochemical study. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmau.2015.03.005> . Acesso em: 15 jul. 2015.
50. EMEA. EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICAL PRODUCTS VETERINARY MEDICINES EVALUTION UNIT. *Committee for veterinary products: furosemide*, 2000. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500014333.pdf. Acesso em: 05 mai. 2013.
51. ENGMAN, H. *Intestinal barrier to oral drug absorption: cytochrome P450 3A and ABC - transport proteins*. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis, 2003. 61p. (Comprehensive Sumaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy, 296).

52. ERIKSSON, A.H.; VARMA, M.V.S.; PERKINS, E.J.; ZIMMERMAN, C.L. The intestinal absorption of a prodrug of the mGlu2/3 receptor agonist LY354740 is mediated by PEPT1: *in situ* rat intestinal perfusion studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.99, n.3, p.1574-1581, 2010.
53. ESCRIBANO, E.; SALA, X.G.; SALAMANCA, J.; NAVARRO, C.R.; REGUÉ, J.Q. Single-pass intestinal perfusion to establish the intestinal permeability of model drugs in mouse. *International Journal of Pharmaceutics*, v.436, p.472-477, 2012.
54. ESTUDANTE, M.; MORAIS, J.G.; SOVERAL, G.; BENET, L.Z. Intestinal drug transporters: an overview. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.65, p.1340–1356, 2013.
55. FAGERHOLM, U.; JOHANSSON, M.; LENNERNÄS, H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum. *Pharmaceutical Research*, v.13, p.1336-1342, 1996.
56. FAGERHOLM, U.; LINDAHL, A.; LENNERNÄS, H. Regional intestinal permeability in rats of compounds with different physicochemical properties and transport mechanisms. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.49, n.7, p.687-690, 2007.
57. FAGERHOLM, U.; NILSSON, D.; KNUSTSON, L.; LENNERNÄS, H. Jejunal permeability in humans *in vivo* and rats *in situ*: investigation of molecular size selectivity and solvent drag. *Acta Physiologica Scandinavica*, v.165, n.5, p.315-324, 1999.
58. FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5.ed. São Paulo: ANVISA, 2010. p. 989-992.
59. FISILOGIA HUMANA. *A digestão no ser humano*. Disponível em: <http://fisiologiahumanabio.blogspot.com.br/2008/11/digesto-no-ser-humano.html>. Acesso em: 15 out. 2014.
60. FANGUEIRO, J.F.; MARQUES, I.R.; SEVERINO, P.; SANTANA, M.H.A.; SOUTO, E. B. Desenvolvimento, produção e caracterização de nanocristais de fármacos pouco solúveis. *Química Nova*, v.35, n. 9, p.1848-1853, 2012.
61. FLATEN, G.E.; DHANIKULA, A.B.; LUTHMAN, K.; BRANDL, M. Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier: a novel approach for

- studying passive diffusion. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.27, p.80-90, 2006.
62. FLANAGAN, S.D.; TAKAHASHI, L.H.; BENET, L. Contributions of saturable active secretion, passive transcellular and paracellular diffusion to the overall transport of furosemide across adenocarcinoma (Caco-2) cell. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.91, n. 4, p. 1169-1177, 2002.
63. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA. Department of Health & Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. *Guidance for industry: waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system*. Rockville: FDA, 2000. p.1-13. Disponível em:
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070246.pdf>. Acesso em: 18 jul. 2013.
64. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. LASIX[®]. FDA, 2012. Disponível em:
http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/016273s066lbl.pdf. Acesso em: 14 jan. 2013.
65. FOSSATI, L.; DECHAUME, R.; HARDILLIER, E.; CHEVILLON, D.; PREVOST, C.; BOLZE, S.; MAUBON, N. Use of simulated intestinal fluid for Caco-2 permeability assay of lipophilic drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v.360, p.148–155, 2008.
66. FU, Q.; WANG, H.; XIA, M.; DENG, B.; SHEN, H.; JI, G.; LI, G.; XIE. The effect of phytic acid on tight junctions in the human intestinal Caco-2 cell line and its mechanism. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* v.80, p1-8, 2015.
67. FURUSE, M.; HIRASE, T.; ITOH, M.; NAGAFUCHI, A.; YONEMURA, S.; TSUKITA, S.; TSUKITA, S.; Occludin: a novel integral membrane-protein localizing at tight junctions. *The Journal of Cell Biology*, v.123, n.6, p.1777-1778, 1993.
68. FURUSE, M.; FUJITA, K.; HIIRAGI, T.; FUJIMOTO, K.; TSUKITA, S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no

- sequence similarity to occludin. *The Journal of Cell Biology*, v.141, n.7, p.1539-1550, 1998.
69. FUJIKAWA, M.; ANO, R.; NAKAO, K.; SHIMIZU, R.; AKAMATSU, M. Relationships between structure and high-throughput screening permeability of diverse drugs with artificial membranes: application to prediction of Caco-2 cell permeability. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.13, p.4721–4732, 2005.
70. GABRIELRBRUNOABIOIFES. *Intestino delgado a divisão, funções e a vilosidades intestinais...* Disponível em: <http://gabrielrbrunoabioifes.wordpress.com/2011/02/13/intestino-delgado-a-divisao-funcoes-e-a-vilosidades-intestinais/>. Acesso em: 24 mai. 2014.
71. GARNERO, C.; CHATTAH, A.K.; LONGHI, M. Supramolecular complexes of maltodextrin and furosemide polymorphs: a new approach for delivery systems. *Carbohydrate Polymers*, v.94, p.292-300, 2013.
72. GIL, E.S. *Controle físico-químico de qualidade de medicamentos*. 3.ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010. p. 51-58.
73. GINSKI, J.M.; POLLI, J.E. Prediction of dissolution-absorption relationships from a dissolution/ Caco-2 system. *International Journal of Pharmaceutics*, v.177, p.117-125, 1999.
74. GONÇALVES, J.E. *Padronização das condições para cultura de células Caco-2 visando à 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.
75. GONÇALVES, J.E.; SOUZA, J.; STORPIRTIS, S. Avaliação da permeabilidade de fármacos empregando culturas celulares. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N., orgs. *Biofarmacotécnica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 204-211. (Ciências farmacêuticas).
76. GONÇALVES, P.V.B.; BONATO, P.S.; ZAINAGHI, I.A. Validação de métodos bioanalíticos para estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N., orgs.

- Biofarmacotécnica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p.277-282. (Ciências farmacêuticas).
77. GONZÁLEZ-MARISCAL, L.; DOMINGUEZ-CALDERÓN, A.; RAYA-SANDINO, A.; ORTEGA-OLVERA, J.M.; VARGAS-SIERRA, O.; MARTÍNEZ-REVOLLAR, G. Tight junctions and the regulation of gene expression. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v.36, p. 213-223, 2014.
 78. GOSWAMI, T.; KOKATE, A.; JASTI, B. R.; LI, X. *In silico* model of drug permeability across sublingual mucosa. *Archives of oral biology*, v.58, p.545-551, 2013.
 79. GRANERO, G.E.; LONGHI, M.R.; MORA, M.J.; JUNGINGER, H.E.; MIDHA, K.K.; SHAH, V.P.; STAVCHANSKY, S.; DRESSMAN, J.B.; BARENDTS, D.M. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: furosemide. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.99, n.6, p.2544-2556, 2010.
 80. GRASS, G.M. Simulation models to predict oral drug absorption from *in vitro* data. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.23, p.199-219, 1997.
 81. HARTSOCK, A.; NELSON, W.J. Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1778, p.660-669, 2008.
 82. HEWITSON, T.D.; WIGG, B.; BECKER, G.J. Tissue preparation for histochemistry: fixation, embedding and antigen retrieval for light microscopy. In: HEWITSON, T.D.; DARBY, I.A., eds. *Histology protocols*. New York: Springer, 2010. p.3-18.
 83. HILLGREN, K.M.; KATO, A.; BORCHARDT, R.T. *In vitro* systems for studying intestinal drug absorption. *Medicinal Research Reviews*, v. 15, n. 2, p. 83-109, 1995.
 84. HO, Y.F.; LAI, M.Y.; YU, H.Y.; HUANG, D.K.; HSUEH, W.; TSAI, T.H.; LIN, C.C. Application of rat *in situ* single-pass intestinal perfusion in the evaluation of presystemic extraction of indinavir under different perfusion rates. *Journal of the Formosan Medical Association*, v.107, n.1, p.37-45, 2008.

85. ICH. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Quality Guidelines. Analytical Validation Q2. *Validation of analytical procedures: text and methodology: Q2 (R1)*. S.I.: ICH, 2005. 13p. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf. Acesso em: 25 set. 2012.
86. INGELS, F.; BECK, B.; OTH, M.; AUGUSTIJNS, P. Effect of simulated intestinal fluid on drug permeability estimation across Caco-2 monolayers. *International Journal of Pharmaceutics*, v.274, p.221–232, 2004.
87. IRIE, T.; TSUNENARI, Y.; UEKAMA, K.; PITHA, J. Effect of bile on the intestinal absorption of α -cyclodextrin in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, v.43, p.41-44, 1988.
88. ISSAR, M.; SINGH, S.H.; MISHRA, B.; GUPTA, R. Pharmacokinetics, in situ absorption and protein binding studies of a new neuroleptic agent centutindole in rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.19, p.105-113, 2003.
89. ITAGAKI, S.; OTSUKA, Y.; KUBO, S.; OKUMURA, H.; SAITO, Y.; KOBAYASHI, M.; HIRANO, T.; ISEKI, K. Intestinal uptake of nateglinide by an intestinal fluorescein transporter. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1668, n.2, p.190-194, 2005.
90. ITALLIE, C.M.; ANDRESON, J.M. Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v.36, p. 157-165, 2014.
91. JAIN, R.; DUVVURI, S.; KANSARA, V.; MANDAVA, N.K.; MITRA, A.K. Intestinal absorption of novel-dipeptide prodrugs of saquinavir in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, v.336, p.233-240, 2007.
92. JIN, X.; LUONG, T.L.; REESE, N.; GAONA, H. COLLAZO-VELEZ, V.; VUONG, C.; POTTER, B.; SOUSA, J.C.; OLMEDA, R.; LI, Q.; XIE, L.; ZHANG, J.; ZHANG, P.; REICHARD, G.; MELENDEZ, V.; MARCSISIN, S.R.; PYBUS, B.S. Comparison of MDCK-MDR1 and Caco-2 cell based permeability assays for anti-malarial drug screening and drug investigations. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v.70, p.188–194, 2014.

93. JOHNSON, L.G. Applications of imaging techniques to studies of epithelial tight junctions. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.57, p. 111-121, 2005.
94. JUNG, S.J.; CHOI, S.O.; UM, S.Y.; KIM, J.I.; CHOO, H.Y.P.; CHOI, S.Y.; CHUNG, S.Y. Prediction of the permeability of drugs through study on quantitative structure–permeability relationship. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.41, p. 469–475, 2006.
95. JUNQUEIRA, L.C. CARNEIRO, J. *Histologia basica*. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.
96. KAMEL, A.; HARRIMAN, S. Inhibition of cytochrome P450 enzymes and biochemical aspects of mechanism-based inactivation (MBI). *Drug Discovery Today: Technologies*, v.10, n.1, p.E177-E189, 2013.
97. KARARLI, T.T. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, v.16, p.351-380, 1995.
98. KATSURA, T.; INUI, K. Intestinal absorption of drugs mediated by drug transporters: mechanisms and regulation. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, v.18, n.1, p.1-15, 2003.
99. KAUKONEN, A.M.; LAITINEN, L.; SALONEN, J.; TUURA, J.; KEIKKILA, T.; LIMNELL, T.; HIRVONEN, J.; LEHTO, V.P. Enhanced in vitro permeation of furosemide loaded into thermally carbonized mesoporous silicon (TCPSi) microparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v. 66, 2007. p. 348–356.
100. KIM, J.S.; MITCHELL, S.; KIJEK, P.; TSUME, Y.; HILFINGER, J.; AMIDON, G.L. The suitability of an in situ perfusion model for permeability determinations: utility for BCS class I. Biowaiver requests. *Molecular Pharmaceutics*, v.3, n.6, p.686-694, 2006.
101. KIVISTÖ, K.T.; BOOKJANS, G.; FROMM, M.F.; GRIESE, E.-U.; MÜNZEL, P.; KROEMER, H.K. Expression of CYP 3A4, CYP 3A5 and CYP 3A7 in human duodenal tissue. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v.42, p.387-389, 1996.

102. KÖNIG, J.; MÜLLER, F.; FROMM, M.F. Transporters and drug-drug interactions: important determinants of drug disposition and effects. *Pharmacological Reviews*, v.65, n.3., p.944-966, 2013.
103. KONISHI, Y.; HAGIWARA, K.; SHIMIZU, M. Transepithelial transport of fluorescein in Caco-2 cell monolayers and use of such transport in *in vitro* evaluation of phenolic acid availability. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v.66, n.11, p.2449-2457, 2002.
104. KOLJONEN, M.; HAKALA, K.S.; AHTOLA-SÄTILÄ, T.; LAITINEN, L.; KORSTIANEN, R.; KOTIAHO, T.; KAUKONEN, A.M.; HIRVONEN, J. Evaluation of cocktail approach to standardise Caco-2 permeability experiments. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.64, p.379-387, 2006.
105. KUWAYAMA, K.; MIYAUCHI, S.; TATEOKA, R.; ABE, H.; KAMO, N. Fluorescein uptake by amonocarboxylic acid transporter in human intestinal Caco-2 cells. *Biochemical Pharmacology*, v.63, p.81-88, 2002.
106. KUNES, M.; SVOBODA, Z.; KVETINA, J.; HEROUT, V.; HERINK, J.; BAJGAR, J. Intestinal single-pass *in situ* perfusion technique in rat: the influence of l-carnitine on absorption of 7-methoxytacrine. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of University of Palacky, Olomouc, Czechoslovakia Republic*, v.149, n.2, p.433-435, 2005.
107. LANE, M.E.; LEVIS, K.A.; CORRIGAN, O.I. Effect of intestinal fluid flux on ibuprofen absorption in the rat intestine. *International Journal of Pharmaceutics*, v.309, p.60-66, 2006.
108. LAULICHT, B.; TRIPATHI, A.; MATHIOWITZ, E. Diuretic bioactivity optimization of furosemide in rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.79, p. 314-319, 2011.
109. LENNERNÄS, H.; NYLANDER, S.; UNGELL, A.L. Jejunal permeability: a comparison between the using chamber technique and the single-pas perfusion in humans. *Pharmaceutical Research*, v.14, n.5, p.667-671, 1997.

110. LENNERNÄS, H. Regional intestinal drug permeation: Biopharmaceutics and drug development. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.57, p.333–341, 2014.
111. LI, C.; NAIR, L.; LIU, T.; LI, F.; PICHARDO, J.; AGRAWAL, S.; CHASE, R.; TONG, X.; USS, A.S.; BOGEN, S.; NJOROGGE, F.G.; MORRISON, R.A.; CHENG, K.-C. Correlation between PAMPA permeability and cellular activities of hepatitis C virus protease inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, v.75, p.1186-1197, 2008.
112. LI, H.; DONG, L.; LIU, Y.; WANG, GU.; WANG, GA.; QIAO, Y. Biopharmaceutics classification of puerarin and comparison of perfusion approaches in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, v.466, p.133-138, 2014.
113. LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J.B. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.58, p.265-278, 2004.
114. LOZOYA-AGULLO, I.; ZUR, M.; WOLK, O.; BEIG, A.; GONZÁLEZ-ÀLVAREZ, I.; GONZÁLEZ-ÀLVAREZ, M.; MERINO-SANJUÁN, M.; BERMEJO, M.; DAHAN, A. In-situ intestinal rat perfusions for human F_{abs} prediction and BCS permeability class determination: investigation of the single-pass vs. the Doluisio experimental approaches. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 480, p.1-7, 2015.
115. LUO, Z.; LIU, Y.; ZHAO, B.; TANG, M.; DONG, H.; ZHANG, L.; LV, B.; WEI, L. *Ex vivo* and *in situ* approaches used to study intestinal absorption: review. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v.68, p.208-216, 2013.
116. MACHERAS, P.; ARGYRAKIS, P. Gastrointestinal drug absorption: is it time to consider heterogeneity as well as homogeneity? *Pharmaceutical Research*, v. 14, n.7, p. 842-847, 1997.
117. MAHER, S.; WANG, X.; BZIK, V.; McCLEAN, S., BRAYDEN, D.J. Evaluation of intestinal absorption and mucosal toxicity using two promoters.II. Rat instillation and perfusion studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.38, p.301-311, 2009.

118. MARIN, J.J.G. Plasma membrane transporters in modern liver pharmacology. *Scientifica*, v.2012, art.428139, p.1-15, 2012. [Review].
119. MARTINEZ, M.N.; AMIDON, G.L. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. *Journal of Clinical Pharmacology*, v.42, n.6, p.620-643, 2002.
120. MASAOKA, Y.; TANAKA, Y.; KATAOKA, M.; SAKUMA, S.; YAMASHITA, S. Site of drug absorption after oral administration: assessment of membrane permeability and luminal concentration of drugs in each segment of gastrointestinal tract. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.29, p.240-250, 2006.
121. MASUNGI, C.; MENSCH, J.; VAN DIJCK, A.; BORREMANS, B.; WILLEMS, B.; MACKIE, C.; NOPPE, M.; BREWSTER, M.E. Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) combined with a 10-day multiscreen Caco-2 cell culture as a tool for assessing new drug candidates. *Pharmazie*, n.63, p.194-199, 2008.
122. MATTER, K.; BALDA, S.M. SnapShot: epithelial tight junctions. *Cell*, v.157, 2014. Disponível em: DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.027>.
123. MATOS, J.R.; MERCURI, L.; BARROS, G. Análise térmica aplicada a fármacos e medicamentos. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N., orgs. *Biofarmacotécnica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p.32-65. (Ciências farmacêuticas).
124. MEDEIROS, F.D. *Investigação da influência da velocidade de liberação do fármaco metoprolol a partir da forma farmacêutica sobre seu processo de absorção e de seus enantiômeros*. São Paulo, 2012. 143p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
125. MENON, R.M.; BARR, W.H. Comparison of ceftibuten transport across Caco-2 cells and rat jejunum mounted on modified Ussing chambers. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, v.24, n.7, p.299-308, 2003.
126. MILLER, J.M.; BEIG, A.; CARR, R.A.; SPENCE, J.K.; DAHAN, A. A win-win solution in oral delivery of lipophilic drugs: supersaturation via amorphous solid dispersions increases apparent solubility without sacrifice of

- intestinal membrane permeability. *Molecular Pharmaceutics*, v.9, p.2009-2016, 2012.
127. MIRET, S.; ABRAHAMSE, L.; GROENE, E.M. Comparison of *in vitro* models for the prediction of compound absorption across the human intestinal mucosa. *Journal of Biomolecular Screening*, v.9, n.7, p.598-606, 2004.
 128. MORA, M.J.; PETITI, J.P.; LONGHI, M.R.; TORRES, A.I.; GRANERO, G.E. Intestinal uptake and toxicity evaluation of acetazolamide and its multicomponent complexes with hidroxypopyl-b-cyclodextrin in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, v.478, p.258–267, 2015.
 129. MOTZ, S.A.; SCHAEFER, U.F.; BALBACH, S.; EICHINGER, T.; LEHR, C.-M. Permeability assessment for solid oral drug formulations based on Caco-2 monolayer in combination with a flow through dissolution cell. *European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.66, p.286-295, 2007.
 130. MUDRA, D.R.; DESINO, K.E.; DESAI, P.V. *In silico*, *in vitro* and *in situ* models to assess interplay between CYP 3A and P-gp. *Current Drug Metabolism*, v.12, p.750-773, 2011.
 131. MUENDOERFER, M.; SCHAEFER, U.F.; KOENIG, P.; WALK, J.S.; LOOS, P.; BALBACH, S.; EICHINGER, T.; LEHR, C.-M. On line monitoring of transepithelial electrical resistance (TEER) in an apparatus for combined dissolution and permeation testing. *International Journal of Pharmaceutics*, v.392, p.134-140, 2010.
 132. NEVES, S.M.P.; ONG, F.M.P.; RODRIGUES, L.D.; SANTOS, R.A.; FONTES, R.S.; SANTANA, R.O. *Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do biotério de produção e experimentação da FCF-IQ/USP*. São Paulo, 2013. Disponível em: <http://www.interactivepdf.uniflip.com/2/81637/296210/pub/document.pdf>. Acesso em: 21 out. 2013.
 133. NIELSEN, L.H.; GORDON, S.; PAJANDER, J.P.; ØSTERGAARD, J.; RADES, T.; MÜLLERTZ, A. Biorelevant characterisation of amorphous furosemide salt exhibits conversion to a furosemide hydrate during dissolution. *International Journal of Pharmaceutics*, v.457, p.14-24, 2013.

134. ODA, M.; SAITOH, H.; KOBAYASHI, M.; AUNGST, B. J. β -Cyclodextrin as a suitable solubilizing agent for in situ absorption study of poorly water-soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 280, p. 95 -102, 2004.
135. OVALLE, W.K.; NAHIRNEY, P.C. *Netter's essential histology*. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2008. p. 296-303.
136. PARAÍSO, R.L.M. *Determinação da solubilidade e permeabilidade de fármacos conforme o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB)*. São Paulo, 2012. 141p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
137. PAPADOPOULOU, V.; VALSAMI, G.; DOKOMETZIDIS, A.; MACHERAS, P. Biopharmaceutics classification systems for new molecular entities (BCS-NMEs) and marketed drugs (BCS-MD): theoretical basis and practical examples. *International Journal of Pharmaceutics*, v.361, p.70-77, 2008.
138. PERDAEMS, N.; BLASCO, H.; VINSON, C.; CHENEL, M.; WHALLEY, S.; CAZADE, F.; BOUZOM, F. Predictions of metabolic drug-drug interactions using physiologically based modeling two cytochrome P450 3A4 substrates coadministered with ketoconazole or verapamil. *Clinical Pharmacokinetics*, v.49, n.4, p.239-258, 2010.
139. PEREIRA, T.M. *Estudo de permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio do modelo de perfusão in situ: aplicações na classificação biofarmacêutica*. São Paulo, 2011. 137p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
140. PERIOLI, L.; AMBROGI, V.; NOCCHETTI, M.; SISANI, M.; PAGANO, C. Preformulation studies on host–guest composites for oral administration of BCS class IV drugs: HTlc and furosemide. *Applied Clay Science*, v.53, p.696-703, 2011.
141. PERIOLI, L.; MUTASCIO, P.; PAGANO, C. Influence of the Nanocomposite MgAl-HTlc on gastric absorption of drugs: *in vitro* and *ex vivo* studies. *Pharmaceutical Research*, v.30, p. 156-166, 2013.

142. PINTO, J.F. Site-specific drug delivery systems within the gastro-intestinal tract: from the mouth to the colon. *International Journal of Pharmaceutics*, v.395, p.44-52, 2010.
143. PORTA, V.; KANO, E. Etapa analítica dos estudos de biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N., orgs. *Biofarmacotécnica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p.143-150. (Ciências farmacêuticas).
144. PRESCOTT, L.M.; HARLEY, J.P.; KLEIN, D.A. *Microbiology*. McGraw-Hill, 2002. 1026p.
145. QUEVEDO, M.A.; NIETO, L.E.; BRIÑÓN, 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.
146. RATHORE, R.; JAIN, J.P.; SRIVASTAVA, A.; JACHAK, S.M.; KUMAR, N. Simultaneous determination of hydrazinocurcumin and phenol red in samples from rat intestinal permeability studies: HPLC method development and validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.46, n.2, p.374-380, 2008.
147. REIS, J.M. *Ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA): investigação das variáveis do ensaio para o estudo da permeabilidade de fármacos*. São Paulo, 2013. 181p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
148. REIS, J.M.; SINKÓ, B.; SERRA, C.H.R. Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) - is it better than Caco-2 for human passive permeability prediction? *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v.10, n.11, p.1071-1076, 2010.
149. REIS, J.M.; DEZANI, A.B.; PEREIRA, T.M.; AVDEEF, A.; SERRA, C.H.R. Lamivudine permeability study: a comparison between PAMPA, *ex vivo* and *in situ* Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.48, n.4/5, p.781-789, 2013.

150. ROSE, S.; STEVENS, A. Computational design strategies for combinatorial libraries. *Current Opinion in Chemical Biology*, v.7, n.3, p.331-339, 2003.
151. ROUGE, N.; BURI, P.; DOELKER, E. Drug absorption sites in the gastrointestinal tract and dosage forms for site-specific delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v.136, n.1/2, p.117-139, 1996.
152. RUAN, L.P.; CHEN, S.; YU, B.Y.; ZHU, D.N.; CORDELL, G.A.; QIU, S.X. Prediction of human absorption of natural compounds by the non-everted rat intestinal sac model. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.41, n.5, p.605-610, 2006.
153. RUSSELL, T.L.; BERARDI, R.R.; BARNETT, J.L.; DERMENTZOGLOU, L.C.; JARVENPAA, K.M.; SCHMALTZ, S.P. Upper gastrointestinal pH in seventy-nine healthy, elderly, North American men and women. *Pharmaceutical Research*, v.10, n.2, p.187-196, 1993.
154. RUZ, V.; FROEYEN, M.; BUSSON, R.; GONZÁLEZ, M.M.; BAUDEMPREZ, L.; VAN DEN MOOTER, G. Characterization and molecular modeling of the inclusion complexes of 2-(2-nitrovinyl) furan (G-0) with cyclodextrines. *International Journal of Pharmaceutics*, v.439, n.1/2, p.275-285, 2012.
155. SABABI, M.; BORGA, O.; HULTKVIST-BENGTSSON, U. The role of P-glycoprotein in limiting intestinal regional absorption of digoxin in rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.14, n.1, p.21-27, 2001.
156. SADIGHI, A.; OSTAD, S. N.; REZAYAT, S. M.; FOROUNTAN, M.; FARAMARZI, M. A.; DORKOOSH, F. A. Mathematical modelling of the transport of hydroxypropyl--cyclodextrin inclusion complexes of ranitidine hydrochloride and furosemide loaded chitosan nanoparticles across a Caco-2 cell monolayer. *International Journal of Pharmaceutics*, v.422, p.479-488, 2012.
157. SALANA, N.N.; EDDINGTON, N.D.; FASANO, A. Tight junction modulation and its relationship to drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.58, n.1, p.15-28, 2006.

158. SALPHATI, L.; CHILDERS, K.; PAN, L.; TSUSUI, K.; TAKAHASHI, L. Evaluation of a single-pass intestinal perfusion method in rat for the prediction of absorption in man. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 53, p.1007-1013, 2001.
159. SALTÃO, R.; VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v. 37, n. 1, 2001.
160. SAMBUY, Y.; DE ANGELIS, I.; RANALDI, G.; SCARINO, M.L.; STAMMATI, A.; ZUCCO, F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology*, v.21, n.1, p.1-26, 2005.
161. SAUNA, Z.E.; SMITH, M.M.; MULLER, M.; KERR, K.M.; AMBUDKAR, S.V. The mechanism of action of multidrug-resistance-linked P-glycoprotein. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v.33, n.6, p.481-491, 2001.
162. SCHÖNBICHLER, S. A.; BITTNER, L.K.H.; WEISS, A.K.H.; GRIESSER, U.J.; PALLUA, J.D.; HUCK, C.W. Comparison of NIR chemical imaging with conventional NIR, Raman and ATR-IR spectroscopy for quantification of furosemide crystal polymorphs in ternary powder mixtures. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.84, p. 616-625, 2013.
163. SCHURGERS, N.; BIJDENDIJK, J.; TUKKER, J.J.; CROMMELIN, D.J.A. Comparison of four experimental techniques for studying drug absorption kinetics in the anesthetized rat in situ. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.75, n.2, p.117-119, 1986.
164. SHAH, J.C.; CHEN, J.R.; CHOW, D. Oral bioavailability and *in situ* absorption of etoposide in rat. *International Journal of Pharmaceutics*, v.84, n.3, p.223-232, 1992.
165. SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A.B.C. Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics. 5 ed. New York: McGraw-Hill, 2005. cap.13, p.375-391.
166. SHENG, J.J.; KASIM, N.A.; CHANDRASEKHARAN, R.; AMIDON, G.L. Solubilization and dissolution of insoluble weak acid, ketoprofen: effects of pH

- combined with surfactant. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.29, n.3/4, p.306-314, 2006.
167. SHIROTANI, N.; TOGAWA, M.; IKUSHIRO, S.; SAKAKI, T.; HARADA, T.; MIYAGAWA, H.; MATSUI, M.; NAGAHORI, H.; MIKATA, K.; NISHIOKA, K.; HIRAI, N.; AKAMATSU, M. Identification and *in silico* prediction of metabolites of the model compound, tebufenozide by human CYP3A4 and CYP2C19. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 23, p.6594-6601, 2015.
 168. SHUGARTS, S.; BENET, L.Z. The role of transporters in the pharmacokinetics of orally administered drugs. *Pharmaceutical Research*, v.26, n.9, p.2039-2054, 2009.
 169. SILVA, M.F. Correlação *in vitro* - *in vivo* de comprimidos matriciais de furosemida complexada à Hidroxipropil- β -Ciclodextrina: métodos *in vitro*, *in vivo* e *in silico*. São Paulo, 2014. 235p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
 170. SILVA JUNIOR, J. B.; DEZANI, T. M.; DEZANI, A. B.; DOS REIS SERRA, C.H. Evaluating Potential P-gp Substrates: Main Aspects to Choose the Adequate Permeability Model for Assessing Gastrointestinal Drug Absorption. *Mini-Reviews in Medical Chemistry*, v. 15, p. 858-871, 2015.
 171. SOBIOLOGIA. *Transporte passivo*. Disponível em: <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Citologia/cito9.php>. Acesso em: 22 nov. 2015.
 172. SJÖGREN, E.; ABRAHAMSSON, B.; AUGUSTIJNS, P.; BECKER, D.; BOLGER, M.B.; BREWSTER, M.; BROUWERS, J.; FLANAGAN, T.; HARWOOD, M.; HEINEN, C.; HOLM, R.; JURETSCHKE, H.P.; KUBBINGA, M.; LINDAHL, A.; LUKACOVA, V.; MÜNSTER, U.; NEUHOFF, S.; NGUYEN, M.A.; PEER, A.V.; REPPAS, C.; HODJEGAN, A.R.; TANNERGREN, C.; WEITSCHIES, W.; WILSON, C.; ZANE, P.; LENNERNÄS, H.; LANGGUTH, P. *In vivo* methods for drug absorption – comparative physiologies, model selection, correlations with *in vitro* methods (IVIVC), and applications for formulation/API/excipient characterization including food effects. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.57, p.99-151, 2014.

173. SONG, N.N.; LI, Q.S.; LIU, C.X. Intestinal permeability of metformin using single-pass intestinal perfusion in rats. *World Journal of Gastroenterology*, v.12, n.25, p.4064-4070, 2006.
174. SOUZA, J.; FREITAS, Z.M.; STORPIRTIS, S. Modelos *in vitro* para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.43, n.4, p.515-527, 2007.
175. SPINOSA, H.S., GÒRNIK, S.L., BERNARDI, M.M. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1996.
176. SPRICIGO, R. *Desenvolvimento de comprimidos de liberação prolongada de furosemida: influência das ciclodextrinas*. São Paulo, 2006. 138p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
177. SPRICIGO, R.; BOTELHO, K.C.A.; CONSIGLIERI, V.O.; SERRA, C.H.R. Obtenção e avaliação de complexos de inclusão de furosemida com β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina: efeitos sobre as propriedades de dissolução do fármaco. *Latin American Journal of Pharmacy*, v.27, n.5, p.645-653, 2008.
178. STAAT, C.; COISNE, C.; DABROWSKI, S.; STAMATOVIC, S.M.; ANDJELKOVIC, A.V.; WOLBURG, H.; ENGELHARDT, B.; BLASIG, I.E. Mode of action of claudin peptidomimetics in the transient opening of cellular tight junction barriers. *Biomaterials*, v.54, p.9-20, 2015.
179. STAVCHANSKY, S.; PADE, V. Link between drug absorption solubility and permeability measurements in Caco-2 cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 87, n. 12, 1998. p.1604-1607.
180. STERNBERG, S.S. *Histology for pathologists*. New York: Raven Press, 1992. p.550-571.
181. STORPIRTIS, S.; GAI, M.N. Biofarmacotécnica: princípios de biodisponibilidade, bioequivalência, equivalência farmacêutica, equivalência terapêutica e intercambiabilidade de medicamentos sistema de classificação

- biofarmacêutica e suas bioisenções. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N., orgs. *Biofarmacotécnica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 4. (Ciências farmacêuticas).
182. STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. *Biofarmacotécnica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 321p.
 183. STELLA, V.J.; RAO, V.M.; ZANNOU, E.A.; ZIA, V. Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.36, p.3–16, 1999.
 184. SUGANO, K.; TAKATA, N.; MACHIDA, M.; SAITOH, K.; TERADA, K. Prediction of passive intestinal absorption using bio-mimetic artificial membrane permeation assay and the paracellular pathway model. *International Journal of Pharmaceutics*, v.241, p.241–251, 2002.
 185. SUGANO, K.; NABUCHI, Y.; MACHIDA, M.; ASO, Y. Prediction of human intestinal permeability using artificial membrane permeability. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 257, p.245–251, 2003.
 186. SUMSAKUL, W.; CHAIJAROENKUL, W.; NA-BANGCHANG, K. *In vitro* inhibitory effects of plumbagin, the promising antimalarial candidate, on human cytochrome P450 enzymes. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* p.1-5, 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S199576451500173X>. Acesso em: 22 nov. 2015.
 187. SUTTON, S.C.; RINALDI, M.T.S.; VUKOVINSKY, K.E. Comparison of the gravimetric, phenol red, and 14C-PEG-3350 methods to determine water absorption in the rat single-pass intestinal perfusion model. *AAPS Journal*, v.3, n.3, p.1-5, 2001.
 188. SUZUKI, H.; TANI, K.; TAMURA, A.; TSUKITA, S.; FUJIYOSHI, Y. Model for the architecture of claudin based paracellular ion channels through tight junctions. *Journal of Molecular Biology*. v. 427, p 291-297, 2015.
 189. SVENSSON, U.S.H.; SANDSTRÖM, R.; CARLBORG, Ö.; LENNERNÄS, H.; ASHTON, M. High *in situ* rat intestinal permeability of artemisinin unaffected

- by multiple dosing and with no evidence of P-glycoprotein involvement. *Drug Metabolism and Disposition*, v.27, n.2, p.227-232, 1999.
190. TANG, L.; YE, L.; LV, C.; ZHENG, Z.; GONG, Y.; LIU, Z. Involvement of CYP 3A4/5 and CYP2D6 in the metabolism of aconitine using human liver microsomes and recombinant CYP450 enzymes. *Toxicology Letters*, v.202, n.1, p.47-54, 2011.
 191. TAKANO, M.; YUMOTO, R.; MURAKAMI, T. Expression and function of efflux drug transporters in the intestine. *Pharmacology & Therapeutics*, v.109, n.1/2, p.137-161, 2006.
 192. TALENS, D. *El intestino delgado*. Disponível em: <http://biogenmol.blogspot.com.br/2008/07/el-intestino-delgado.html>. Acesso em: 24 mai. 2014.
 193. THIEL-DEMBY, V.E.; HUMPHREYS, J.E.; JOHN WILLIAMS, L.A.ST.; ELLENS, H.M.; SHAH, N.; AYRTON, A.D.; POLLI, J.W. Biopharmaceutics Classification System: validation learnings of an *in vitro* permeability assay. *Molecular Pharmaceutics*, v.6, n.1, p.11-18, 2009.
 194. UCHIDA, M.; FUKAZAWA, T.; YAMAZAKI, Y.; HASHIMOTO, H.; MIYAMOTO, Y. A modified fast (4 day) 96-well plate Caco-2 permeability assay. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v.59, p.39–43, 2009.
 195. UNITED States Pharmacopeia: USP34; National Formulary: NF29. Rockville. United States Pharmacopeial, 2012.
 196. VARMA, M.V.S.; ASHOKRAJ, Y.; DEY, C.S.; PANCHAGNULA, R. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacological Research*, v.48, n.4, p.347-359, 2003.
 197. VARMA, M.V.S.; SARKAR, M.; KAPOOR, N.; PANCHAGNULA, R. pH-dependent functional activity of P-glycoprotein in limiting intestinal absorption of protic drugs. 1. Simultaneous determination of quinidine and permeability markers in rat in situ perfusion samples. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.816, n.1/2, p.243-249, 2005.

198. VARMA, M.V.S.; PANCHAGNULA, R. Prediction of *in vivo* intestinal absorption enhancement on P-glycoprotein inhibition from rat *in situ* permeability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.94, n.8, 2005.
199. VOLPE, D.A. Application of method suitability for drug permeability classification: review. *AAPS Journal*, v.12, n.4, p.670-678, 2010.
200. XIE, Y.S.; REN, X.L.; PAN, G.X.; GAO, X.M.; LIU, C.X. The assessment of absorption of periplocin *in situ* via intestinal perfusion of rats by HPLC. *Biomedical Chromatography*, v.22, p.196-201, 2008.
201. ZANINI, A.C.; OGA, S. Absorção e distribuição de fármacos. In: _____. *Farmacologia aplicada*. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 1994. cap.13, p.25-27.
202. ZAKERI-MILANI, P.; BARZEGAR-JALALI, M.; TAJERZADEH, H.; AZARMI, Y.; VALIZADEH, H. Simultaneous determination of naproxen, ketoprofen and phenol red in samples from rat intestinal permeability studies: HPLC method development and validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.39, n.3/4, p.624-630, 2005.
203. ZAKERI-MILANI, P.; TAJERZADEH, H.; ISLAMBOLECHILAR, Z.; BARZEGAR, S.; VALIZADEH, H.. The relation between molecular properties of drugs and their transport across the intestinal membrane. *Daru*, v.14, n.4, p.164-171, 2006.
204. ZAKERI-MILANI, P.; VALIZADEH, H.; TAJERZADEH, H.; AZARMI, Y.; ISLAMBOLECHILAR, Z.; BARZEGAR, S.; BARZEGAR-JALALI, M. Predicting human intestinal permeability using single-pass intestinal perfusion in rat. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 10, n. 3, p. 368-379, 2007.
205. ZAKERI-MILANI, P.; BARZEGAR-JALALI, M.; AZIMI, M.; VALIZADEH, H. Biopharmaceutical classification of drugs using intrinsic dissolution rate (IDR) and rat intestinal permeability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 73, p. 102-106, 2009a.
206. ZAKERI-MILANI, P.; VALIZADEH, H.; TAJERZADEH, H.; ISLAMBOLECHILAR, Z. The utility of rat jejunal permeability for biopharmaceutics

- classification system. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 35, n.12, p.1496–1502, 2009b.
207. ZAKERI-MILANI, P.; LOVEYMI, B.D.; JELVEHGARI, M.; VALIZADEH, H. The characteristics and improved intestinal permeability of vancomycin PLGA-nanoparticles as colloidal drug delivery system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.103, p.174-181, 2013.
 208. ZAMBITO, Y.; ZAINO, C.; UCCELLO-BARRETTA, G.; BALZANO, F.; DI COLO, G. Improved synthesis of quaternary ammonium-chitosan conjugates (N⁺-Ch) for enhanced intestinal drug permeation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.33, p.343-350, 2008.
 209. ZHANG, Y.; WANG, Q.S.; CUI, Y.L.; MENG, F.C.; LIN, K.M. Changes in the intestinal absorption mechanism of icariin in the nanocavities of cyclodextrins. *International Journal of Nanomedicine*, v.7, p.4239-4249, 2012.
 210. ZHENG, Y.; ZUO, Z.; CHOW, A.H.L. Lack of effect of β -cyclodextrin and its water-soluble derivatives on in vitro drug transport across rat intestinal epithelium. *International Journal of Pharmaceutics*, v.309, p. 123-128, 2006.
 211. ZHOU, D.; QIU, Y. Oral absorption and the Biopharmaceutics Classification System. *Journal of Validation Technology*, p.62-72, 2009. Disponível em: http://www.ivtnetwork.com/sites/default/files/OralAbsorption_01.pdf. Acesso em: 12 jul. 2013.
 212. ZHOU, C.J.; QIAO, L.M.; ZHAO, L.H.; LI, Z.Y. Evaluation of the impact of cantharidin on rat CYP enzymes by using a cocktail of probe drugs. *Fitoterapia*, v.107, p.49–53, 2015.
 213. ZHOU, W.; QIN, K.M.; SHAN, J.J.; JU, W.Z.; LIU, S.J.; CAI, B.C.; DI, L.Q. Improvement of intestinal absorption of forsythoside A in weeping forsythia extract by various absorption enhancers based on tight junctions. *Phytomedicine*, v.20, n.1, p.47-58, 2012.

214. WACHER, V.J.; SALPHATI, L.; BENET, L.Z. Active secretion and enterocytic drug metabolism barriers to drug absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.46, n.1/3, p.89-102, 2001.
215. WARD, N. The impact of intestinal failure on oral drug absorption: a review. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, v.14, n.6, p.1045-1051, 2010.
216. WATANABE, E.; TAKAHASHI, M.; HAYASHI, M. A possibility to predict the absorbability of poorly water-soluble drugs in humans based on rat intestinal permeability assessed by an in vitro chamber method. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.58, p.659–665, 2004.
217. WATANABE, T.; MAEDA, K.; NAKAI, C.; SUGIYAMA, Y. Investigation of the effect of the uneven distribution of CYP 3A4 and P-glycoprotein in the intestine on the barrier function against xenobiotics: a simulation study. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.102, n.9, p.3196–3204, 2013.
218. WATERBEEMD, H.V. Intestinal permeability: prediction from theory. In: DRESSMAN, J.B.; LENNERNÄS, H. orgs. *Oral Drug Absorption: prediction and assessment*. New York: Marcel Dekker, 2000. p. 31-31. (Drugs and the pharmaceutical sciences, v.106).
219. WIKIWAND. *Transporte celular*. Disponível em: [http://www.wikiwand.com/es/Transporte celular](http://www.wikiwand.com/es/Transporte_celular). Acesso em: 22 nov. 2015.
220. WHO. *Expert Committee on Specification for Pharmaceutical Preparation*. 40 Report. Geneva: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006. 478p. (WHO Technical Report Series, 937). Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/who_trs_937_eng.pdf. Acesso em: 09 jul. 2013.
221. WILSON, C.G. Gastrointestinal transit and drug absorption. In: DRESSMAN, J.B.; LENNERNÄS, H., eds. *Oral drug absorption: prediction and assessment*. New York: Marcel Dekker, 2000. p.1-10. (Drugs and the pharmaceutical sciences, v.106).
222. YANG, K. H.; CHOI, Y. H.; LEE, U.; LEE, J. H.; LEE, M. G. Effects of cytochrome P450 inducers and inhibitors on the pharmacokinetics of intravenous

- furosemide in rats: involvement of CYP2C11, 2E1, 3A1 and 3A2 in furosemide metabolism. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.61, p.47–54, 2009.
223. YU, L.; SHEN, Q.; ZHOU, Q.; JIANG, H.; BI, H.; HUANG, M.; ZHOU, H.; ZENG, S. *In vitro* characterization of ABC transporters involved in the absorption and distribution of liensinine and its analogs. *Journal of Ethnopharmacology*, v.150, n.2, p.485-491, 2013.
224. YU, Q.H.; YANG, Q. Diversity of tight junctions (TJs) between gastrointestinal epithelial cells and their function in maintaining the mucosal barrier. *Cell Biology International*, v. 33, p. 78-82, 2009.

ANEXO I

**INFORMAÇÕES PARA OS MEMBROS DA BANCA
JULGADORA DE MESTRADO/DOUTORADO**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Secretaria de Pós-Graduação

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

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

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

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

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

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

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

São Paulo, 23 de maio de 2014.

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

ANEXO II

**APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA
DA FCF/USP**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Ofício CEUA/FCF 124.2013-P437

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, CERTIFICA que o Projeto de Pesquisa **“Estudo da permeabilidade da furosemida e furosemida complexada com hidroxipropil- β -ciclodextrina por meio do modelo de perfusão in situ”** (Protocolo CEUA/FCF/437), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Juliana Pereira Maura Rossato**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO em reunião de 14 de outubro de 2013.

São Paulo, 11 de dezembro de 2013.

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

ANEXO III

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 - 7911110/1 - Juliana Pereira Maura Rossato

Email: juliana_rossato@usp.br
Data de Nascimento: 03/07/1984
Cédula de Identidade: RG - 35.274.154-5 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutica - Universidade de Franca - Brasil - 2007

Curso: Mestrado
Programa: Fármaco e Medicamentos
Área: Produção e Controle Farmacêuticos
Data de Matrícula: 17/06/2013
Início da Contagem de Prazo: 17/06/2013
Data Limite para o Depósito: 17/12/2015
Orientador: Prof(a). Dr(a). Cristina Helena dos Reis Serra - 17/06/2013 até o presente.
Email: chserra@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 17/06/2013
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 22/08/2014
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 17/06/2013

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

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

Impresso em: 03/11/2015 15:48:22

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

FICHA DO ALUNO

9139 - 7911110/1 - Juliana Pereira Maura Rossato

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Disp.	Situação
EDM5791-5/11	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	13/08/2013	29/11/2013	120	8	100	A	N	Concluída
FBF5805-1/2	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	14/08/2013	17/09/2013	45	3	100	A	N	Concluída
EDM5102-3/5	Preparação Pedagógica PAE (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	20/08/2013	30/09/2013	60	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
QBQ5747-6/5	Animais de Laboratório (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	26/08/2013	02/09/2013	15	1	100	A	N	Concluída
ICB5711-2/2	Redação de Trabalhos Científicos (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	29/10/2013	03/12/2013	45	3	100	A	N	Concluída
FBF5777-3/2	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	13/02/2014	28/05/2014	45	3	100	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBF0342 - Desenvolvimento Farmacotécnico, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1)	01/07/2014	30/11/2014	-	1	-	-	-	-
FBF5766-3/2	Biodisponibilidade e Bioequivalência de Medicamentos	30/09/2014	01/12/2014	90	6	100	B	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBF0341 Farmacotécnica, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (2)	01/02/2015	30/06/2015	-	1	100	A	-	-

	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

Observações:

- 1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 31/03/2015.
- 2) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão Coordenadora de Programa, em Sessão de 08/09/2015.

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

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

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

Impresso em: 03/11/2015 15:48:22

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 7911110/1 - Juliana Pereira Maura Rossato

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

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

Impresso em: 03/11/2015 15:48:22

ANEXO IV

Curriculum lattes

Juliana Pereira Maura Rossato

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2996010710552111>
Última atualização do currículo em 03/11/2015

Graduação em Farmácia (2007) pela Universidade de Franca (UNIFRAN). Em 2009, concluiu o curso de especialização em Farmácia Magistral pela Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). Mestrado em andamento pela Universidade de São Paulo (USP) trabalhando com permeabilidade e biodisponibilidade de fármacos. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Juliana Pereira Maura Rossato
Nome em citações bibliográficas	ROSSATO, J. P. M.

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Avenida Professor Lineu Prestes Butantã 05508000 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (011) 30913623 URL da Homepage: www.fcf.usp.br
-----------------------	---

Formação acadêmica/titulação

2013	Mestrado em andamento em Fármacos e Medicamentos (Conceito CAPES 4). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Estudo da permeabilidade da furosemida e furosemida complexada com hidroxipropil-β-ciclodextrina por meio do modelo de perfusão in situ, Orientador: Dra. Cristina Helena dos Reis Serra. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
2008 - 2009	Especialização em Farmácia Magistral. Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP, Brasil. Título: As práticas farmacêuticas adequadas na manipulação de soluções oftálmicas e na orientação ao usuário. Orientador: Dr. João Carlos Nunes de Oliveira.
2006 - 2007	Graduação em Farmácia. Universidade de Franca, UNIFRAN, Brasil. Título: Análise Fitoquímica do Extrato Hidroalcoólico de Carqueja (Baccharis genistelloides). Orientador: Dr. Rodrigo Cássio Sola Veneziani.
2002 - 2005	Graduação em Biomedicina. Universidade de Franca, UNIFRAN, Brasil. Título: Estudo de caso: Aférese Terapêutica. Orientador: Ms. Maria Paula Zanetti Rézio.

Formação Complementar

2015 - 2015	Farmacotécnica. Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2014 - 2014	Perícia Criminal. (Carga horária: 4h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2014 - 2014	Workshop Análise Térmica. (Carga horária: 8h). Mettler - Toledo.Ag, MT, Suíça.
2014 - 2014	Manipulação farmacotécnica. Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2013 - 2013	HPLC. (Carga horária: 8h). Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil.
2012 - 2012	Conceitos gerais da Cromatografia Líquida de Alta. (Carga horária: 3h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2011 - 2011	Curso de Farmácia industrial. (Carga horária: 60h). Associação Brasileira de Educação a Distância, ABED, Brasil.
2009 - 2009	Curso de Nutrição parenteral. (Carga horária: 80h). Associação Brasileira de Educação a Distância, ABED, Brasil.
2009 - 2009	Curso de Farmácia hospitalar. (Carga horária: 60h). Associação Brasileira de Educação a Distância, ABED, Brasil.
2008 - 2008	Técnica de aplicação de injetáveis e Diabetes. (Carga horária: 8h). Conselho Regional de Farmácia do Estado de São paulo, CRF-SP, Brasil.
2007 - 2007	Extensão universitária em Jornada de Biomedicina. (Carga horária: 30h). Universidade de Franca, UNIFRAN, Brasil.
2007 - 2007	Extensão universitária em Manipuladores de alimentos. (Carga horária: 4h). Universidade de Franca, UNIFRAN, Brasil.
2007 - 2007	Extensão universitária em Jornada farmacêutica. (Carga horária: 25h). Universidade de Franca, UNIFRAN, Brasil.
2007 - 2007	Extensão universitária em Meios de cultura- Conceitos e preparo. (Carga horária: 10h). Universidade de Franca, UNIFRAN, Brasil.
2007 - 2007	Sistema nacional de ger. de produtos controlados. (Carga horária: 2h). Conselho Regional de Farmácia do Estado de São paulo, CRF-SP, Brasil.
2006 - 2006	Extensão universitária em Jornada de Farmácia. (Carga horária: 36h). Universidade de Franca, UNIFRAN, Brasil.
2005 - 2005	Extensão universitária em IV Fepro- Feira de Profissões. (Carga horária: 16h). Universidade de Franca, UNIFRAN, Brasil.
2005 - 2005	Extensão universitária em Jornada de Biomedicina. (Carga horária: 36h). Universidade de Franca, UNIFRAN, Brasil.
2004 - 2004	Extensão universitária em Metodos de análise e controle de qualidade de água. (Carga horária: 8h). Universidade de Franca, UNIFRAN, Brasil.
2004 - 2004	Extensão universitária em Simposio de Citopatologia. (Carga horária: 20h). Universidade de Franca, UNIFRAN, Brasil.
2004 - 2004	Extensão universitária em Jornada de Biomedicina. (Carga horária: 32h). Universidade de Franca, UNIFRAN, Brasil.
2003 - 2003	Extensão universitária em I Workshop de imunologia e biologia molecular. (Carga horária: 20h). Universidade de Franca, UNIFRAN, Brasil.
2002 - 2002	Extensão universitária em Semana de Biomedicina Comunitária. (Carga horária: 8h). Universidade de Franca, UNIFRAN, Brasil.
2002 - 2002	Extensão universitária em Jornada de Biomedicina. (Carga horária: 40h). Universidade de Franca, UNIFRAN, Brasil.
2002 - 2002	Extensão universitária em Técnicas espec. para pesquisa com animais de lab.. (Carga horária: 4h). Universidade de Franca, UNIFRAN, Brasil.
2002 - 2002	Extensão universitária em II Curso de imunohistoquímica. (Carga horária: 16h). Universidade de Franca, UNIFRAN, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade de Franca, UNIFRAN, Brasil.

Atividades

06/2006 - 04/2007

Estágios , Reitoria, Conselho de Ensino, Pesquisa e Extensão.

Estágio realizado

Drogarias e Farmacias com manipulação.

03/2002 - 03/2005

Estágios , Reitoria, Conselho de Ensino, Pesquisa e Extensão.

Estágio realizado

Medicina do Trabalho.

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Biofarmacotécnica.
2. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Farmacotécnica.
3. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Análises Clínicas.

Idiomas

Inglês

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

Espanhol

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

Produções

Produção bibliográfica

Apresentações de Trabalho

1. ★ **ROSSATO, J. P. M.** ; SILVA, M. F. ; SERRA, C. H. R. . Assesment of intestinal permeability of furosemide by means of in situ perfusion model in rats. 2015. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
2. ★ **ROSSATO, J. P. M.** ; SILVA, M. F. ; SERRA, C. H. R. . A developmentof a bioanalytical HPLC method to quantify furosemide in in situ perfusion solutions. 2014. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. Métodos alternativos de ensino. 2015. (Outra).
2. Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE).Desenvolvimento Farmacotécnico. 2014. (Outra).
3. XIX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia."A Development and Validation of a Bioanalytical HPLC Method to Quantify Furosemide at Perfusion in situ Solutions". 2014. (Outra).
4. Boas práticas na produção de alimentos. 2007. (Simpósio).
5. VII Encontro paulista de farmacêuticos. 2007. (Encontro).
6. I Simpósio Cancer de próstata. 2004. (Simpósio).