

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

Padronização das condições para cultura de células Caco-2 visando
à obtenção de membranas viáveis ao estudo da permeabilidade
in vitro da rifampicina

José Eduardo Gonçalves

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Profa. Dra. Sílvia Storpirtis

São Paulo
2010

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

Gonçalves, José Eduardo

G635p Padronização das condições para cultura de células Caco-2 visando à obtenção de membranas viáveis ao estudo da permeabilidade *in vitro* da rifampicina / José Eduardo Gonçalves. -- São Paulo, 2010.

137p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.

Orientador: Storpirtis, Sílvia

1. Biofarmacotécnica 2. Biofarmácia 3. Antibiótico : Farmacologia
4. Quimioterapia : Tuberculose I. T. II. Storpirtis, Sílvia, orientador.

615.4b CDD

José Eduardo Gonçalves

Padronização das condições para cultura de células Caco-2 visando
à obtenção de membranas viáveis ao estudo da permeabilidade
in vitro da rifampicina

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Sílvia Storpirtis
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

**À minha família que foram
os sólidos alicerces para esta conquista!!!**

Agradecimentos

Especial agradecimento à profa Sílvia Storpirtis pela orientação, esforço, ética, profissionalismo e, sobretudo, pela formidável pessoa, o que a torna um exemplo a ser seguido.

A Profa Chang Chiann (IME- USP) pela grande colaboração na realização das análises estatísticas da tese.

Aos meus pais, José Catarina e Yolanda, sem os quais eu nada seria.

Aos meus irmãos, cunhados (a) e sobrinhos que sempre estão ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

Aos amigos Ricardo Alves, Prof. Jivaldo e Profa Jacqueline pelo companheirismo e grande colaboração oferecidos desde a elaboração do projeto.

Às Profas Valentina Porta e Eunice Kano pela acolhida no Biofar na fase inicial do projeto.

Aos amigos Eremita, Francinalva, Simone, Marina, Mariane e Valdilene pela agradável companhia no decorrer dessa caminhada.

Ao Prof. Marco Antonio Stephano e Dra Neusa Frasati por viabilizarem o estágio de aprendizado nas técnicas de cultura celulares no instituto Butantã.

Aos pós-graduandos Fabiana Gengivir, Álvaro Cerda e Profa Rosário Hirata pela grande colaboração na realização nos estudos com a técnica de PCR-RT.

Aos colegas Lucas e Carolina do Laboratório de Microbiologia pelo fornecimento das primeiras linhagens de células Caco-2.

Aos funcionários da pós-graduação da FCF- USP, Bete, Elaine e Jorge pelo excelente trabalho que realizam sempre com atenção e carisma.

A profa Silvia Santos pela disponibilização do espaço em seu laboratório para instalação dos equipamentos de cultivo celular.

Ao CNPq pela concessão dos recursos para implementação da linha de pesquisa na FCF-USP e pela bolsa de doutorado.

Sumário

Lista de figuras	v
Lista de tabelas	x
Lista de Quadros	xiv
Resumo	xv
Abstract	xvi
1-INTRODUÇÃO	1
2-REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 Absorção de fármacos pelo trato gastrointestinal e biodisponibilidade	6
2.2 Funções do TGI	7
2.3 Vias de absorção de fármacos.....	8
2.3.1 Transporte passivo transcelular	8
2.3.2 Transporte passivo paracelular.....	9
2.3.3 Transporte mediado por carreadores.....	10
2.3.4 Transporte Vesicular	12
2.4 Fatores que afetam a absorção de fármacos pelo TGI.....	13
2.5 Glicoproteína P	18
2.6 A teoria de reciclagem apical	19
2.7 Estudos de Permeabilidade	20
2.8 Células Caco-2	25
2.9 Avaliação da Permeabilidade da rifampicina	29
2.10 A rifampicina	29
2.11 A Biofarmacotécnica aplicada aos medicamentos para a tuberculose	33

3-OBJETIVOS	35
3.1 Objetivos Gerais	36
3.2 Objetivos Específicos.....	36
4-MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 Material	39
4.1.1 Substâncias Químicas de Referência.....	39
4.1.2 Equipamentos.....	40
4.1.3 Solventes, reagentes e materiais utilizados no desenvolvimento dos métodos analíticos.....	41
4.1.4 Reagentes empregados para cultivo celular, citotoxicidade, experimentos de permeabilidade e análise por PCR	42
4.1.5 Infra-estrutura	44
4.2 Métodos	45
4.2.1 Desenvolvimento de método analítico para quantificação de lamivudina, zidovudina, fluoresceína e rifampicina em meio empregado no experimento de permeabilidade	45
4.2.1.1 Procedimento de purificação das amostras para quantificação de lamivudina, zidovudina, fluoresceína e rifampicina	45
4.2.1.2 Preparo de soluções padrão para a construção da curva de calibração.....	46
4.2.1.3 Preparo de amostras de padrão de controle de qualidade	47
4.2.1.4 Condições cromatográficas	48
4.2.1.4.1 Método para lamivudina	48
4.2.1.4.2 Método para zidovudina	48
4.2.1.4.3 Método para fluoresceína.....	49
4.2.1.4.4 Método para rifampicina.....	49
4.2.2 Parâmetros de validação do método para quantificação de lamivudina, zidovudina, fluoresceína e rifampicina em solução tampão de Hanks.....	50
4.2.2.1 Especificidade.....	50
4.2.2.2 Recuperação	51

4.2.2.3	Limite de quantificação inferior e limite de detecção	52
4.2.2.4	Linearidade.....	52
4.2.2.5	Precisão.....	53
4.2.2.6	Exatidão.....	54
4.2.2.7	Estabilidade	54
4.2.2.7.1	Estabilidade de curta duração.....	55
4.2.2.7.2	Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento.....	55
4.2.3	Cultivo de células Caco-2	56
4.2.4	Monitoramento da integridade de membrana de células Caco-2 .	56
4.2.5	Determinação da viabilidade das células Caco-2 em presença da rifampicina pelo ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazoli)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT)	57
4.2.6	Realização dos experimentos de permeabilidade	58
4.2.7	Indução da expressão da P-gp em células Caco-2 pela rifampicina.....	59
4.2.8	Isolamento e avaliação do RNA total de células Caco-2	60
4.2.9	Análise da expressão gênica por RT-PCR em tempo real	60
4.2.10	Efeito da indução da expressão da Pgp em células Caco-2 na permeabilidade da rifampicina	62
4.2.11	Análise Estatística	62
5	RESULTADOS.....	64
5.1	Validação de métodos analíticos	65
5.1.2	Linearidade.....	67
5.1.3	Limite de quantificação inferior (LQ) e limite de detecção (LD) ...	72
5.1.4	Precisão e exatidão	72
5.1.5	Estabilidade	75
5.1.5.1	Estabilidade de curta duração	75
5.1.5.2	Estabilidade em um ciclo de congelamento/descongelamento	77
5.2	Avaliação da integridade de membranas de células Caco-2 por meio da resistência elétrica transepitelial (RET).....	80

5.3	Permeabilidade dos fármacos fluoresceína, lamivudina e zidovudina através das células Caco-2.....	81
5.4	Ensaio de citotoxicidade da rifampicina em células Caco-2.....	83
5.5	Permeabilidade da rifampicina através das monocamadas de células Caco-2	84
5.5.1	Influência da concentração da rifampicina nos dados de <i>Papp</i>	84
5.5.2	Influência do pH na permeabilidade da rifampicina	87
5.5.3	Influência do muco simulado na permeabilidade da rifampicina... 88	
5.5.4	Influência do soro fetal bovino na permeabilidade da rifampicina. 91	
5.5.5	Influência simultânea do soro fetal bovino e da mucina na permeabilidade da rifampicina	93
5.5.6	Transporte bidirecional da rifampicina através das monocamadas de células Caco-2	97
5.5.7	Transporte bidirecional da rifampicina através das monocamadas de células Caco-2 com associação de verapamil	99
5.5.8	Indução da expressão da Pgp em células Caco-2 pela rifampicina.....	101
5.5.9	Transporte bidirecional da rifampicina através das monocamadas de células Caco-2 cultivadas na presença da rifampicina.....	102
6-DISCUSSÃO	105
7-CONCLUSÕES	117
8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120

Lista de figuras

- Figura 1. Fatores que influenciam a biodisponibilidade oral de um fármaco contido num medicamento antes de atingir a circulação sistêmica. (WATEERBEMD, 2003, adaptado). 7
- Figura 2. Mecanismos de transporte através da membrana intestinal: a) permeabilidade passiva transcelular; b) transporte mediado por carreadores de membrana; c) permeabilidade passiva paracelular; d) transporte vesicular. Nas letras (e) e (f) estão representados dois mecanismos que impedem a absorção intestinal, sendo: e) transporte mediado por carreadores de excreção e em f) enzimas metabolizadoras (GONCALVES *et al.*, 2009). 8
- Figura 3. Esquema do suporte de cultivo de células Caco-2 empregado nos estudos de permeabilidade (GONÇALVES *et al.*, 2009) 26
- Figura 4. Esquema da reação entre rifampicina e isoniazida em meio ácido (SINGH *et al.*, 2001)..... 32
- Figura 5. Cromatograma de injeções de solução branco (solução tampão de Hanks) e de solução de lamivudina 100 ng/mL em solução tampão de Hanks no pH 7,4..... 65
- Figura 6. Cromatograma de injeções de solução branco (solução tampão de Hanks solução tampão de Hanks) e de solução de zidovudina 100 ng/mL em solução tampão de Hanks no pH 7,4. 66
- Figura 7. Cromatograma de injeções de solução branco (solução tampão de Hanks solução tampão de Hanks adicionado de soro fetal bovino, mucina e verapamil) e de solução de rifampicina 500 ng/mL em solução tampão de Hanks no pH 7,4..... 66
- Figura 8. Cromatogramas de injeções de solução branco (solução tampão de Hanks solução tampão de Hanks) e de solução de fluoresceína 50 ng/mL em solução tampão de Hanks no pH 7,4. 67

Figura 9. Curva de calibração referente ao método analítico desenvolvido para quantificação da lamivudina em solução proveniente de estudo de permeabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV).....	68
Figura 10. Curva de calibração referente ao método analítico desenvolvido para quantificação da zidovudina em solução proveniente de estudo de permeabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV). Cada ponto representa a média de seis determinações.....	69
Figura 11. Curva de calibração referente ao método analítico desenvolvido para quantificação da rifampicina em solução proveniente de estudo de permeabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV).....	70
Figura 12. Curva de calibração referente ao método analítico desenvolvido para quantificação da fluoresceína em solução proveniente de estudo de permeabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-FL).....	71
Figura 13. Valores de RET obtidos com as membranas de células Caco-2 aos 10,15 e 21 dias de cultivo em meio pH 7,4. Média de seis determinações – barras indicam desvio padrão.	80
Figura 14. Variação de RET obtidos com as membranas de células Caco-2 em 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos nas condições dos experimentos de permeabilidade. Média de três determinações – barras indicam desvio padrão.	81
Figura 15. Fração permeada de fluoresceína (em ng/mL) em função do tempo. Média de três determinações.	82
Figura 16. Fração permeada de lamivudina (em ng/mL) em função do tempo. Média de três determinações.	82
Figura 17. Fração permeada de zidovudina (em ng/mL) em função do tempo. Média de três determinações.	83
Figura 18. Viabilidade de células Caco-2 incubadas com rifampicina por 6 horas avaliadas pela técnica do MTT.....	84

Figura 19. Fração permeada de rifampicina (em ng/mL) através das monocamadas de células Caco-2 em função do tempo nas concentrações de 5,0; 1,0 e 25,0µg/mL em tampão Hanks com pH 7,4. Média de três determinações.....	85
Figura 20. Resultados de <i>Papp</i> para a rifampicina através das células Caco-2 obtidas com as concentrações de 5,0; 10 e 25 µg/mL de rifampicina em tampão Hanks com pH 7,4 na porção apical e basolateral do experimento. Média de três determinações (barras indicam desvio padrão).....	86
Figura 21. Fração permeada de rifampicina (em ng/mL) em função do tempo nos pHs de 5,8; 6,8 e 7,4. Média de três determinações.	87
Figura 22. Resultados de <i>Papp</i> para a rifampicina através das células Caco-2 obtidas nos valores de pH de 5,8; 6,8 e 7,4 do tampão Hanks na porção apical do experimento. Média de seis determinações (barras indicam desvio padrão)	88
Figura 23. Gráfico da fração permeada de rifampicina no pH 5,8 na porção apical em meio com e sem adição de mucina a 3,0%. Média de três determinações.....	89
Figura 24. Fração permeada de rifampicina no pH 6,8 na porção apical em meio com e sem adição de mucina a 3,0%. Média de três determinações.....	89
Figura 25. Fração permeada de rifampicina no pH 7,4 na porção apical em meio com e sem adição de mucina a 3,0%. Média de três determinações.....	90
Figura 26. Fração permeada de rifampicina no pH 5,8 na porção apical em meio com e sem adição de soro fetal bovino a 4%. Média de três determinações.....	91
Figura 27. Fração permeada de rifampicina no pH 6,8 na porção apical em meio com e sem adição de soro fetal bovino a 4%. Média de três determinações.....	92

Figura 28. Fração permeada de rifampicina no pH 7,4 na porção apical em meio com e sem adição de soro fetal bovino a 4%. Média de três determinações.....	92
Figura 29. Fração permeada de rifampicina no pH 5,8 na porção apical em meio com e sem adição de soro fetal bovino a 4% mais mucina a 3%. Média de três determinações.....	94
Figura 30. Fração permeada de rifampicina no pH 6,8 na porção apical em meio com e sem adição de soro fetal bovino a 4% mais mucina a 3%. Média de três determinações.....	94
Figura 31. Fração permeada de rifampicina no pH 7,4 na porção apical em meio com e sem adição de soro fetal bovino a 4% mais mucina a 3%. Média de três determinações.....	95
Figura 32. Fração permeada de rifampicina em função através das monocamadas de células Caco-2 nos sentidos A-B e B-A. Média de três determinações.....	97
Figura 33. Acúmulo intracelular de rifampicina em monocamadas de células Caco-2 nos sentidos A-B e B-A. Média de três determinações.....	98
Figura 34. Fração permeada de rifampicina em função do tempo através das monocamadas de células Caco-2 nos sentidos A-B e B-A na presença do verapamil. Média de três determinações.....	99
Figura 35. Comparação do acúmulo intracelular de rifampicina em monocamadas de células Caco-2 nos sentidos A-B e B-A na presença ou não de verapamil. Média de três determinações.....	100
Figura 36. Efeito do tratamento com rifampicina na expressão do RNAm da Pgp nas células Caco-2. Barras indicam desvio padrão.....	101
Figura 37. Fração permeada de rifampicina em função do tempo através das monocamadas de células Caco-2 cultivadas na presença de rifampicina nos	

sentidos A-B e B-A e na presença do verapamil. Média de três determinações.
..... 102

Figura 38. Comparação do acúmulo intracelular de rifampicina em monocamadas de células Caco-2 nos sentidos A-B e B-A na presença ou não de verapamil. Média de três determinações..... 103

Lista de tabelas

Tabela 1. Principais famílias de transportadores encontradas no epitélio intestinal.....	12
Tabela 2. Parâmetros relativos à curva de calibração do método analítico desenvolvido para quantificação de lamivudina em solução proveniente de estudo de permeabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV).....	68
Tabela 3. Parâmetros relativos à curva de calibração do método analítico desenvolvido para quantificação de zidovudina em solução proveniente de estudo de permeabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV).....	69
Tabela 4. Parâmetros relativos à curva de calibração do método analítico desenvolvido para quantificação de rifampicina em solução proveniente de estudo de permeabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV).....	70
Tabela 5. Parâmetros relativos à curva de calibração do método analítico desenvolvido para quantificação de fluoresceína em solução proveniente de estudo de permeabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-FL).....	71
Tabela 6. Limites de detecção e quantificação inferior obtidos na validação dos métodos para quantificação de lamivudina, zidovudina e rifampicina e fluoresceína.....	72
Tabela 7. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de 3 concentrações diferentes em um mesmo dia (intra dia) e em dias consecutivos para a lamivudina utilizando o método CLAE-UV desenvolvido.....	73
Tabela 8. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de 3 concentrações diferentes em um mesmo dia (intra dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para a zidovudina utilizando o método CLAE-UV desenvolvido.....	73

Tabela 9. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de 3 concentrações diferentes em um mesmo dia (intra dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para a rifampicina utilizando o método CLAE-UV desenvolvido.	74
Tabela 10. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de 3 concentrações diferentes em um mesmo dia (intra dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para a fluoresceína utilizando o método CLAE-FL desenvolvido....	74
Tabela 11. Estabilidade da lamivudina em solução tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente. Resultados representam a média de três determinações.....	75
Tabela 12. Estabilidade da zidovudina em solução tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente. Resultados representam a média de três determinações.....	76
Tabela 13. Estabilidade da rifampicina em solução tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente. Resultados representam a média de três determinações.....	76
Tabela 14. Estabilidade da fluoresceína em solução tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente. Resultados representam a média de três determinações.....	77
Tabela 15. Estabilidade da lamivudina em solução tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20°C e descongeladas. Resultados representam a média de três determinações.	78
Tabela 16. Estabilidade da zidovudina em solução tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20°C e descongeladas. Resultados representam a média de três determinações.	78
Tabela 17. Estabilidade da rifampicina em solução tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20°C e descongeladas. Resultados representam a média de três determinações.	79

Tabela 18. Estabilidade da fluoresceína em solução tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20°C e descongeladas. Resultados representam a média de três determinações.	79
Tabela 19. Resultados de <i>Papp</i> para a rifampicina através das células Caco-2 obtidas com as concentração de 5,0; 10 e 25 µg/mL de rifampicina em tampão Hanks com pH 7,4 na porção apical do experimento. Média de seis determinações.....	85
Tabela 20. Resultados de <i>Papp</i> para a rifampicina através das células Caco-2 nos pHs de 5,8; 6,8 e 7,4. Média de três determinações.....	87
Tabela 21. Resultados de <i>Papp</i> para a rifampicina através das células Caco-2 nos pHs de 5,8; 6,8 e 7,4 com e sem adição de mucina. Média de três determinações.....	90
Tabela 22. Permeabilidade aparente (<i>Papp</i>) para a rifampicina através das células Caco-2 nos pHs 5,8; 6,8 e 7,4 com e sem adição de soro fetal bovino. Média de três determinações.	93
Tabela 23. Permeabilidade aparente (<i>Papp</i>) para a rifampicina através das células Caco-2 nos pHs 5,8; 6,8 e 7,4 com e sem adição de soro fetal bovino. Média de três determinações.	95
Tabela 24. Permeabilidade aparente (<i>Papp</i>) para a rifampicina através das células Caco-2 nos sentidos A-B e B-A. Média de três determinações.	98
Tabela 25. Permeabilidade aparente (<i>Papp</i>) para a rifampicina através das membranas de células Caco-2 nos sentidos A-B e B-A na presença de verapamil. Média de três determinações.....	100
Tabela 26. Permeabilidade aparente (<i>Papp</i>) para a rifampicina através das membranas de células Caco-2 cultivadas na presença da rifampicina nos sentidos A-B e B-A Média de três determinações.....	103

Tabela 27. Permeabilidade aparente (P_{app}) para a rifampicina através das membranas de células Caco-2 cultivadas em meio normal e na presença da rifampicina nos sentidos A-B e B-A Média de três determinações..... 104

Lista de Quadros

Quadro 1. Concentrações (em ng/mL) das amostras padrão utilizadas na construção da curva de calibração e linearidade para quantificação de lamivudina, zidovudina, fluoresceína e rifampicina em solução tampão de Hanks.	47
Quadro 2. Concentrações (em ng/mL) das amostras de controle de qualidade utilizadas na quantificação de lamivudina, zidovudina, fluoresceína e rifampicina em solução tampão de Hanks.....	47
Quadro 3. Anova referente aos dados de permeabilidade nas diferentes concentrações de rifampicina ($\alpha = 0,05$)	86
Quadro 4. Análise de Variância de dois fatores (ANOVA) para os valores de permeabilidade da rifampicina em relação ao pH e composição do meio de permeabilidade. Valor de significância de $p = 0,05$	96
Quadro 5. Intervalo de confiança (IC 95%) dos valores de permeabilidade da rifampicina considerando o parâmetro pH.....	96

Resumo

A permeabilidade através do epitélio intestinal tem se tornado um importante aspecto a ser determinado nas avaliações biofarmacotécnicas envolvendo fármacos e medicamentos. A técnica mais empregada para essa determinação *in vitro* é aquela que utiliza a cultura de células Caco-2. Entretanto, ainda são discutíveis as condições para a realização desses experimentos, uma vez que a padronização das mesmas é fator fundamental para a confiabilidade dos resultados. Nesta tese, foram avaliadas as condições para realização dos estudos de permeabilidade através de membranas de células Caco-2 para a rifampicina, principal fármaco utilizado no tratamento da tuberculose. Para tanto, foram investigados fatores tais como a citotoxicidade da rifampicina em diferentes concentrações, a influência da concentração do fármaco sobre a permeabilidade, do pH de realização dos experimentos e da presença de proteínas do muco intestinal, além da influência de proteínas plasmáticas. Foi também investigado o potencial indutor da rifampicina sobre a expressão da glicoproteína-P (Pgp) e seu impacto na permeabilidade da própria rifampicina. Os estudos foram desenvolvidos utilizando membranas de células Caco-2 provenientes da *American Type Culture Collection (ATCC)* cultivadas em placas Transwel®, a quantificação da fração permeada foi por cromatografia líquida de alta eficiência com métodos validados. A análise da indução da expressão da Pgp foi realizada por PCR-RT. Demonstrou-se que as concentrações da rifampicina (10,0; 25,0 e 50,0 µg/mL) não ocasionaram danos às células Caco-2 no estudo de citotoxicidade pela técnica que emprega o sal do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazoli)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). As concentrações de rifampicina (5,0; 10,0 e 25,0 µg/mL) não resultaram em valores estatisticamente diferentes de permeabilidade aparente (*P_{app}*) em células Caco-2 nas condições do estudo. A rifampicina apresentou valor de *P_{app}* significativamente maior em pH 6,8 dentre os valores de pH avaliados (5,8 ; 6,8; 7,4). A presença de muco simulado e de soro fetal bovino não resultou em valores de permeabilidade significativamente distintos do resultado obtido sem a sua adição ao experimento. A expressão da Pgp em células Caco-2 é induzida pela adição da rifampicina (10µg/mL), ocasionando diminuição da sua permeabilidade por mecanismo de efluxo. Pelos resultados de permeabilidade obtidos em todas as condições avaliadas, a rifampicina pode ser considerada um fármaco de alta permeabilidade de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica.

Palavras chave: permeabilidade, células Caco-2, rifampicina, Sistema de Classificação Biofarmacêutica

Abstract

The permeability through the intestinal epithelium has become an important aspect to be determined in evaluations involving drugs and pharmaceutical products. The most common technique for this determination *in vitro* is one that uses the culture of Caco-2 cells. Nevertheless, the conditions for carrying out such experiments are still questionable, since the standardization of them is essential to the reliability of the results. In this thesis, we evaluate the conditions for the studies of permeability of rifampicin through membranes of Caco-2 cells, the main drug used in the treatment of tuberculosis. To this end, we examined factors such as cytotoxicity of rifampicin at different concentrations, the influence of drug concentration on the permeability, as well as the pH of the experiments, the presence of proteins of intestinal mucus, and the influence of plasma proteins. It was also investigated the potential of rifampicin on the expression of P-glycoprotein (Pgp) and its impact on the permeability of rifampicin itself. The studies were developed using membranes of Caco-2 cells from American Type Culture Collection (ATCC) grown on plates Transwel®, and the quantification of the fraction of drug permeated was obtained by high performance liquid chromatography with validated methods. The analysis of induction of expression of Pgp was performed by RT-PCR. It was demonstrated that the concentrations of rifampicin (10,0; 25,0 and 50,0 µg/mL) did not cause damage to Caco-2 cells in the study of the cytotoxicity technique that uses a bromide salt of 3 - (4,5-dimethyl-2 - thiazol) -2,5-diphenyl-2H-tetrazolium (MTT). The concentrations of rifampicin (5,0; 10,0 and 25,0 µg/mL) did not result in statistically different values of apparent permeability (Papp) in Caco-2 cells under the conditions of the study. Rifampicin showed a value of Papp significantly higher at pH 6.8 in comparison with other measured pH values (5,8 and 7,4). The presence of mucus simulated and fetal calf serum did not result in permeability values significantly different from the result obtained without its addition to the experiment. The expression of P-gp in Caco-2 cells is induced by the addition of rifampicin (10 µg/ml), decreasing its permeability by efflux mechanism. Taking into account the results of permeability obtained in all conditions, the rifampicin can be considered a high permeability drug according to the biopharmaceutical classification system.

Key words: permeability, Caco-2 cells, rifampicin, biopharmaceutical classification system

1- INTRODUÇÃO

A absorção de um fármaco, assim como de outra substância através das membranas do trato gastrointestinal (TGI), é um processo que envolve um complexo mecanismo, influenciado por variados fatores. Especificamente para os fármacos, podem-se destacar os principais deles, tais como as características de solubilidade, que podem ser afetadas pela composição e pH dos líquidos fisiológicos do trato gastrointestinal (suco gástrico, sais biliares e líquidos intestinais), precipitação no local de absorção, adsorção do fármaco aos compostos presentes no lúmen, concentração do fármaco que pode resultar em saturação dos mecanismos de transporte, degradação química ou bacteriana, degradação na própria parede do TGI e os múltiplos mecanismos de transporte que determinam suas rotas de absorção (LENNERNAS, 2000; TURNER, 2009).

Apesar dos grandes avanços ocorridos nas últimas décadas relacionados aos estudos Biofarmacotécnicos, principalmente aqueles voltados para avaliação dos fatores que influenciam a disposição de um fármaco após sua administração, a determinação da permeabilidade intestinal por técnicas *in vitro* ainda é um grande desafio. Como resultado, uma grande variedade de modelos está sendo desenvolvida e empregada para se obter dados sobre as características de permeação de fármacos. Entretanto, até o momento, nenhum deles, foi capaz de incorporar todos os mecanismos envolvidos no processo de absorção (BALIMANE, 2005).

Dentre os modelos desenvolvidos e utilizados na determinação da permeabilidade de um composto, destaca-se o que emprega as membranas de células Caco-2, que são células originárias de um adenocarcinoma de cólon humano e que se diferenciam espontaneamente em enterócitos, formando uma monocamada com características semelhantes ao epitélio intestinal humano (ARTURSON e KARLSSON, 1991). Este modelo está descrito entre os métodos *in vitro* aceitos oficialmente pela FDA para determinação da permeabilidade de um fármaco no guia para bioensaios (FDA, 2000).

Entretanto, para que os resultados provenientes dos estudos baseados em culturas de células Caco-2 possam ser considerados confiáveis, diversos

parâmetros devem ser avaliados. Tais parâmetros estão relacionados à capacidade de mimetizar *in vitro* as condições que ocorrem no organismo *in vivo*. Neste sentido, os impactos dos fatores fisiológicos, tais como os diferentes valores de pH, a composição do líquido luminal, a presença das proteínas do soro plasmático, assim como os fatores não fisiológicos, como a concentração do fármaco, potencial indutor dos sistemas de transporte de influxo e efluxo, tornam-se parâmetros importantes na condução e interpretação dos resultados dos estudos de permeabilidade conduzidos em membranas de células Caco-2 (NEUHOFF *et al.*, 2003; NEUHOFF *et al.*, 2005; BENET *et al.*, 1996).

A rifampicina, o principal fármaco empregado no tratamento da tuberculose, tem sido descrita na literatura como um fármaco que apresenta uma biodisponibilidade variável. Existem várias hipóteses para explicar esta variabilidade, dentre elas podem ser destacadas: a falta de adesão ao tratamento por parte do paciente, a quantidade do fármaco presente na formulação que pode não estar adequada, interação entre rifampicina e outros fármacos, liberação inadequada do fármaco a partir da forma farmacêutica, entre outros (SHISHOO, *et al.*, 2001, SINGH, *et al.*, 2001).

A variabilidade das concentrações plasmáticas é o fator que ocasiona o fenômeno de resistência bacteriana, o que ocasiona os casos de tuberculose multirresistente (SHISHOO *et al.*, 1999). Por esta razão, associada ao aumento dos índices de novos casos de tuberculose no mundo, principalmente nos países em desenvolvimento, a OMS preconiza que se intensifiquem os estudos e pesquisas voltados para o desenvolvimento e melhoria do diagnóstico e da terapêutica da tuberculose. Neste contexto, o presente trabalho está em concordância com a recomendação da OMS referente à pesquisa relacionada ao principal fármaco empregado na terapêutica da tuberculose, a rifampicina, com destaque à avaliação de sua permeabilidade e dos fatores que podem interferir, tais como a concentração do fármaco no local da absorção, o pH, a presença de muco e proteínas plasmáticas e seu potencial indutor sobre os mecanismos de transporte. Tais informações serão úteis para o desenvolvimento e a otimização de formulações contendo este fármaco,

colaborando com o desenvolvimento da pesquisa na área de Biofarmacotécnica no Brasil.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Absorção de fármacos pelo trato gastrointestinal e biodisponibilidade

A administração oral é considerada a via mais conveniente e segura para a administração de fármacos. Entretanto, um fármaco administrado oralmente necessita chegar à circulação sistêmica a fim de que atinja o local de ação na quantidade e velocidades adequadas de modo a assegurar sua eficácia (SHARGEL, 2005; STORPIRTIS e GAI, 2009).

A fração de uma dose oral que alcança a circulação sistêmica é originalmente denominada de **biodisponibilidade oral**, representada pela letra F , que pode ser descrita pela seguinte equação (WATEERBEMD, 2003):

$$F = f_a \times f_G \times f_H = f_a \times (1 - E_G) \times (1 - E_H) \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que:

f_a = a fração da dose administrada que é absorvida através da membrana apical dos enterócitos;

f_G = a fração da dose absorvida que não é metabolizada pela parede do trato gastrointestinal ($f_G = 1 - E_G$);

E_G = a fração da dose extraída por metabolização intestinal;

f_H = a fração da dose absorvida que escapa do metabolismo e excreção hepática e biliar ($f_H = 1 - E_H$);

E_H = fração da dose absorvida extraída por depuração hepática/biliar

Muitos são os fatores que influenciam a biodisponibilidade oral de fármacos, e alguns deles ocorrem mesmo antes que o fármaco atravesse as membranas do trato gastrointestinal (TGI), ou seja, quando o fármaco ainda se encontra no próprio lúmen intestinal. Por exemplo, o pH do lúmen pode afetar a desintegração, dissolução e a estabilidade do medicamento e do fármaco. Além disso, a permeabilidade intestinal varia conforme os locais específicos do

TGI. Apesar do metabolismo de primeira passagem ocorrer principalmente no fígado, tem-se considerado que o metabolismo também pode ocorrer nos enterócitos durante o processo de absorção (FISHER *et al.*, 1999; WU *et al.*, 1995). Na Figura 1 estão esquematizados os fatores potenciais que afetam a biodisponibilidade oral de um fármaco.

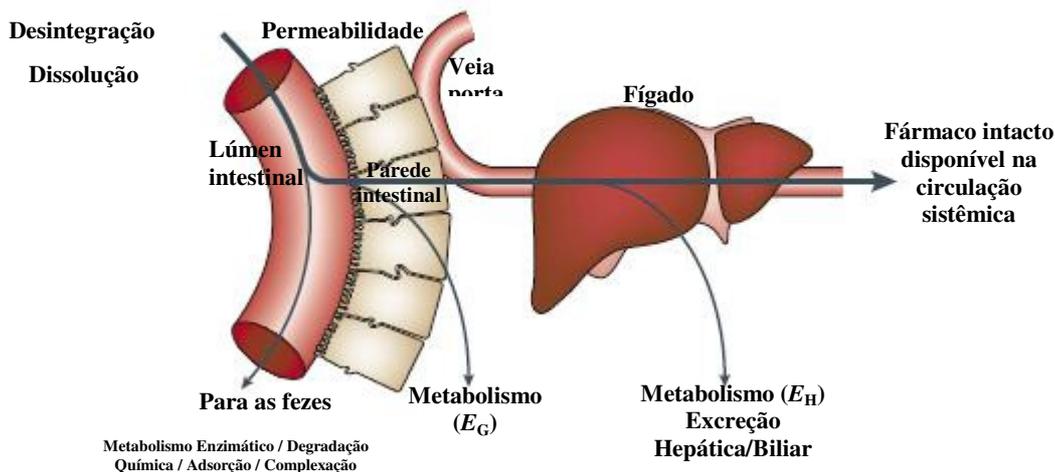


Figura 1. Fatores que influenciam a biodisponibilidade oral de um fármaco contido em um medicamento antes de atingir a circulação sistêmica (WATEERBEMD, 2003, adaptado).

2.2 Funções do TGI

O intestino delgado se constitui como a maior porção de todo o TGI (sendo formado por duodeno, jejuno e íleo) e é responsável por absorver a maior quantidade de compostos ingeridos pelo homem, incluindo água, eletrólitos, nutrientes, carboidratos, gorduras, aminoácidos, di e tri-peptídeos e vitaminas. Já o intestino grosso e cólon apresentam, como principal função, absorver água e eletrólitos para concentração do bolo fecal. Apesar de estar isenta de enzimas digestivas, a porção final do TGI apresenta uma flora bacteriana bastante intensa que pode conter centenas de diferentes espécies de microrganismos, muitos dos quais são responsáveis por realizar reações de redução ou pela produção de enzimas responsáveis pela metabolização de alimentos e alguns fármacos (WU *et al.*, 1995; BEAUMOUNT, 2003).

O TGI está constantemente exposto a compostos químicos diversos provenientes da ingestão. Tais compostos, tanto de origem natural ou sintética podem ser necessários para manutenção das funções vitais do indivíduo (água, nutrientes, vitaminas, etc), mas, por outro lado, podem ser nocivos (toxinas alimentares, pesticidas, poluentes, etc). Desta forma, o TGI necessita absorver os compostos essenciais e, ao mesmo tempo, ele deve atuar como uma barreira para impedir a entrada dos compostos indesejados potencialmente tóxicos ao organismo. Essa dualidade requer que o TGI crie mecanismos complexos que funcionem como uma barreira seletiva de permeabilidade para o transporte através do epitélio intestinal (NELSON e COX, 2006).

2.3 Vias de absorção de fármacos

O transporte de fármacos através do epitélio intestinal pode ocorrer por um ou mais dos seguintes mecanismos: a) transporte passivo paracelular; b) transporte passivo transcelular; c) transporte mediado por carreadores no sentido absorptivo ou secretório e d) transporte por vesículas (Figura 2).

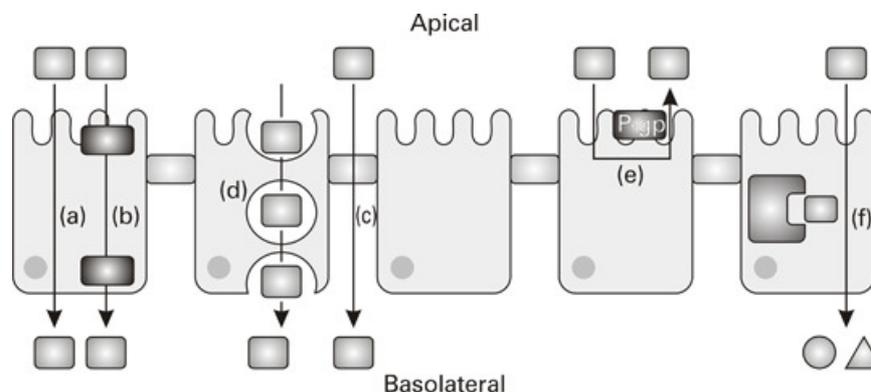


Figura 2. Mecanismos de transporte através da membrana intestinal: a) permeabilidade passiva transcelular; b) transporte mediado por carreadores de membrana; c) permeabilidade passiva paracelular; d) transporte vesicular. Nas letras (e) e (f) estão representados dois mecanismos que impedem a absorção intestinal, sendo: e) transporte mediado por carreadores de excreção e em f) enzimas metabolizadoras (GONÇALVES *et al.*, 2009).

Transporte passivo transcelular

O transporte transcelular passivo é caracterizado pela passagem do fármaco através da membrana celular, sem que ocorra gasto energético. Este transporte é determinado pelas propriedades biofísicas da membrana. A membrana celular é composta de lipídeos e proteínas em proporções variadas, dependendo de cada espécie, tipo celular e organela. O modelo de mosaico fluido descreve a estrutura comum de todas as membranas biológicas, a bicamada lipídica é a unidade estrutural básica onde estão, ainda, incorporadas proteínas periféricas. O tipo e a quantidade relativa dos lipídios e proteínas diferem entre os diferentes tipos celulares (NELSON e COX, 2006).

Os enterócitos, como outras células epiteliais, são polarizados, isto é, apresentam diferenças significativas na composição da membrana apical e basolateral. Tais diferenças são as responsáveis pela diversidade na expressão de transportadores, o que direciona o sentido da absorção de muitas substâncias (MANDARA *et al.*, 1994).

O primeiro passo para o transporte passivo transcelular é a penetração do fármaco pela membrana apical, seguido pela sua difusão através do citoplasma e subsequente permeação pela membrana basolateral.

A difusão de moléculas pequenas pelo citoplasma é um processo normalmente rápido, sendo a passagem pela membrana o fator limitante para o transporte transcelular. Para que a difusão na membrana seja eficiente, o fármaco deve ser suficientemente lipofílico e com moderado peso molecular. Muitos estudos sugerem que a maioria dos fármacos absorvidos completamente é transportada pela via transcelular (STENBERG *et al.*, 2000).

Transporte passivo paracelular

O transporte paracelular ocorre pela passagem de um soluto através dos espaços intercelulares. É considerado como um transporte passivo, geralmente empregado por fármacos catiônicos (KARLSSON *et al.*, 1999).

Fármacos hidrofílicos e de pequeno a moderado tamanho (ex: atenolol e furosemida) podem permear o epitélio intestinal por esta via em quantidade significativa, principalmente na porção superior do intestino delgado, onde o transporte via paracelular é mais intenso do que nas porções inferiores do intestino e cólon (ARTURSSON *et al.*, 1993).

Fármacos que utilizam exclusivamente a via paracelular para sua permeação podem ser considerados como de incompleta absorção, uma vez que os poros intercelulares representam apenas 0,01 a 0,1% da área absorptiva total do intestino. Além desse fator, as regiões apicais e basolaterais dos espaços intercelulares são separadas pelas junções oclusivas (*tight junctions*), as quais constituem uma barreira contra a passagem de substâncias indesejadas pelos poros entre células justapostas (ENGMAN *et al.*, 2003).

Transporte mediado por carreadores

Apesar de uma grande variedade de fármacos serem transportados pelos mecanismos passivos de difusão (transcelular ou paracelular), estudos recentes sugerem que o transporte mediado por carreadores possui grande impacto para a absorção oral de fármacos. Atualmente, um crescente número de transportadores tem sido identificado.

O mapeamento do genoma humano identificou cerca de 1300 genes que codificam a expressão dos canais iônicos e transportadores que possam estar diretamente ou indiretamente envolvidos no processo de absorção (VENTER *et al.*, 2001).

O transporte mediado por carreadores é saturável, podendo resultar em uma farmacocinética não linear para fármacos permeados exclusivamente por um único tipo de transportador.

Com o propósito de prevenir a entrada de compostos indesejáveis, os transportadores apresentam determinada especificidade ao substrato.

Entretanto, esta pode não ser absoluta e estar disponível para um limitado número de fármacos e nutrientes com estruturas semelhantes (GANAPATHY *et al.*, 1998). Dentre os transportadores com moderada especificidade, pode ser destacado o transportador de oligopeptídeos acoplados ao canal de hidrogênio (PepT1), que é abundantemente encontrado no intestino delgado e participa da absorção de antibióticos β -lactâmicos, inibidores de renina e inibidores da enzima conversora da angiotensina (TSUJI e TAMAI, 1996).

Outros transportadores de interesse na absorção de fármacos são os transportadores de cátions orgânicos (OCTN2) e os membros da família de transportadores de ácidos orgânicos e peptídeos (OATP). Os OCTN2 são os principais responsáveis pela absorção de cátions como tetrametilamônio e os fármacos valproato e verapamil (WU *et al.*, 1999).

Os membros da família dos OATP estão envolvidos no transporte de vários compostos endógenos e xenobióticos, como metabólitos conjugados de hormônio esteróides, hormônios tireoidianos, ácidos biliares, bilirrubina, pravastatina, benzilpenicilina e digoxina (HANGEBUCH e MEIER, 2003). Em humanos foram identificados nove membros dos transportadores OATP, o primeiro a ser caracterizado na membrana apical de enterócitos, sendo o responsável pela absorção de fármacos aniônicos pH dependente (KOBAYASHI *et al.*, 2003).

A absorção de fármacos pode, por outro lado, ser dificultada por um tipo de transporte especializado e responsável pela secreção ativa, onde ocorre o transporte de substâncias da mucosa para o lúmen intestinal. Tal mecanismo é denominado de múltipla resistência aos fármacos, do inglês, *multidrug resistance* (MDR) (BENET *et al.*, 2004). Esta secreção ativa ocorre, principalmente, pela ação dos transportadores pertencentes à super família de transportadores ABC (ATP *Binding Cassete*). O mecanismo melhor estudado das MDR é o que envolve a super-expressão de uma bomba de efluxo dependente de energia, que atua sobre múltiplos fármacos, conhecida como Glicoproteína-P (Pgp). A Pgp é uma proteína da membrana plasmática de 170 kDa e é codificada pelo gene MDR1 localizada no cromossomo humano 7 (Di

PIETRO *et al.*, 1999). O gene MDR1 desempenha importante papel na absorção e excreção de muitos agentes farmacológicos usados normalmente e xenobióticos, apresentando função chave na regulação dos níveis celulares e teciduais desses agentes.

Elevados níveis de Pgp podem limitar diretamente a absorção oral, além de ocasionar variabilidade e não linearidade dos parâmetros farmacocinéticos. Uma grande variedade de fármacos tem sido confirmada, em maior ou menor grau, como substratos para as Pgp (vincristina, viblastina, lamivudina, zidovudina, pactaxel) (COLLETT *et al.*, 2004).

Na Tabela 1 apresentam-se os principais transportadores de membranas do epitélio intestinal.

Tabela 1. Principais famílias de transportadores encontradas no epitélio intestinal

<i>Família de transportador</i>	<i>Gene decodificador</i>	<i>Substratos</i>
Transportador ABC Família MDR (MDR1) Família MRP (MRP2, MRP3)	ABCB ABCC	Compostos hidrofóbicos, fármacos antineoplásicos, digoxina, imunossuppressores Conjugados aniônicos, agentes antineoplásicos, bestatina, valaciclovir
Transportador de ácidos monocarboxílico Família MCT (MCT1)	SCL16	Ácido láctico, ácido salicílico
Transportador de ânions orgânicos Família dos OATP (OATP-C, etc)	SCL21	Ácido taurocólico, estradiol 17 β -glucoronídeo, tiroxina, pravastatina
Transportador de íons orgânicos Família OAT (OAT1, OAT3) Família OCT (OCT1, ACT2) Família OCTN (OCTN1, OCTN2)	SCL22	Ácido p-aminohipúrico, antibióticos β -lactâmicos, metotrexato, cimetidina tetrametilamônio, colina, dopamina, 1-metil-4-fenilpiridina, cimetidina L-carnitina, tetrametiamônio, valproato, verapamil
Transportador de Nucleosídeos Família dos CNT (CNT1, CNT2) Família dos ENT (ENT1, ENT2)	SCL28 SCLE29	Purina, nucleosídeos piridínicos e derivados nucleosídeos

(Ref. TSUJI e TAMAI, 1996, modificado)

Transporte Vesicular

O transporte vesicular ou endocitose é o processo pelo qual as células vivas absorvem ativamente materiais através das membranas celulares, por

meio de formação de vesículas (MANDARA e TRIER, 1994). Existem três formas principais de endocitose:

- *Fagocitose* - Consiste na ingestão de partículas grandes ou células através de expansões citoplasmáticas chamadas pseudópodos;

- *Pinocitose* - Processo contínuo de ingestão de fluídos e moléculas por meio da formação de pequenas vesículas na membrana celular;

- *Endocitose-mediada por um receptor* - Consiste na ligação de uma molécula extracelular a um receptor na membrana celular. Estes receptores, igualmente constituintes da membrana, estão muitas vezes associados à proteína do citoplasma denominada clatrina que forma uma depressão na membrana; quando um receptor se liga a uma molécula, a depressão aumenta até se transformar em um vacúolo rodeado de clatrina, que entra na célula.

A endocitose mediada por receptor é geralmente relevante para permeação de macromoléculas pela mucosa (MANDARA e TRIER, 1994).

2.4 Fatores que afetam a absorção de fármacos pelo TGI

Os fatores que afetam a absorção de fármacos administrados por via oral podem ser divididos em duas categorias: as físico-químicas e as fisiológicas.

As propriedades físico-químicas do composto, tais como tamanho molecular ou de partícula, pontes de hidrogênio, coeficiente de partição octanol/água (*Log P*) direcionam por qual via o composto atravessará o epitélio intestinal, por exemplo, se o composto sofrerá um transporte paracelular ou transcelular, mediado ou não por carreadores (HORTER e DRESSMAN, 2001; STORPIRTIS *et al.*, 1999). As propriedades de hidrofiliabilidade ou lipofiliabilidade, potencial eletrostático e polarizabilidade podem influenciar as afinidades aos transportadores e enzimas, atuando, desta forma, diretamente no grau de

transporte e metabolismo para determinada substância. Adicionalmente, a susceptibilidade à degradação química de um fármaco, ou seja, sua estabilidade determinará se o composto permanecerá intacto no decurso do processo de absorção (KERNS, 2001).

Dentre os fatores fisiológicos, a composição do conteúdo intestinal, incluindo a presença ou não de alimentos, as mudanças no tempo de esvaziamento gástrico e no trânsito intestinal alteram significativamente o tempo de permanência do fármaco no sítio favorável para sua absorção. Além disso, a composição do conteúdo intestinal pode promover uma significativa complexação ou ligação aos fármacos, alterando, dessa forma, a quantidade de fármaco livre disponível para a absorção (GAI, 2009).

A camada mucosa que envolve todo o lúmen intestinal apresenta característica de hidrogel e é composta principalmente de mucina (glicoproteína de alto peso molecular, com carga negativa que dá a estrutura de gel ao muco). Esse muco é secretado pelas células de cálice e formam um grande complexo polimérico por ligações de dissulfeto. Adicionalmente, o muco é constituído por lipídeos e outras proteínas celulares (LARHGED *et al.*, 1998; TURNER, 2009).

A permeabilidade através da parede intestinal é um fator de extrema importância que limita a absorção de fármacos administrados pela via oral. As células absortivas constituem cerca de 90% da população celular do epitélio que delimita o lúmen intestinal. Elas são formadas nas criptas e sofrem a diferenciação durante a migração para o topo das vilosidades intestinais. A característica mais marcante dos enterócitos é a presença da borda em escova devido à presença das microvilosidades na membrana apical. A função primordial das microvilosidades é aumentar significativamente a área superficial do tecido, favorecendo, dessa forma, a capacidade absortiva do epitélio intestinal (MANDARA e TRIER, 1994). Mesmo apresentando as microvilosidades nos enterócitos, a região do cólon intestinal possui área superficial absortiva menor que a área do intestino delgado. Tal fato é atribuído à ausência dos vilos na porção final do intestino. Comparado com o cólon, o

significativo acréscimo na área superficial, promovido pelas vilosidades, juntamente com a menor coesão entre os enterócitos do epitélio, fazem com que o intestino delgado seja a principal região para absorção de fármacos (MACKAY *et al.*, 1991).

Em geral, a absorção de um composto pelo TGI é predominantemente limitada pela taxa de dissolução / solubilidade e permeabilidade do fármaco pela membrana do enterócito. O Sistema de Classificação Farmacêutica (SCB), que relaciona estes dois parâmetros, estabelece a base científica para a predição da absorção oral de fármacos e para a possível correlação *in vitro/in vivo* (AMIDON *et al.*, 1995; FDA, 2000).

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica por Disposição de Fármacos (SCBDF) é uma versão modificada do SCB e considera todos os fatores que afetam a disposição biológica do fármaco no organismo. Nesse sistema, estão incluídos os parâmetros da principal via de metabolização e eliminação, os principais metabólitos e o efeito dos transportadores responsáveis pela absorção dos fármacos (WU e BENET, 2005). A necessidade de compreensão aprofundada dos mecanismos que determinam a disposição geral de um fármaco no organismo tem despertado grande interesse da comunidade científica, incentivando as pesquisas no sentido de melhor caracterizar, a nível intestinal, os mecanismos de transporte, metabolização e, ainda, a interação entre estes dois processos.

A metabolização intestinal constitui outro importante fator de impacto na biodisponibilidade oral de fármacos.

Compostos após serem absorvidos pelo organismo podem ser modificados por oxidação, por meio da ação de enzimas de metabolização de fase I (por exemplo, as enzimas do sistema CYP450), e/ou tornarem-se mais solúveis por conjugação mediada pelos processos de metabolismo de fase II (glucotransferase, sulfotransferase e esterases). Entretanto, essa metabolização pode ocorrer antes mesmo que ocorra o processo de absorção, já no lúmen intestinal, por ação das enzimas produzidas pelos enterócitos e

pela flora microbiana, como já descrito anteriormente (WU e BENET, 2005; KRISHNA e KLOTZ, 1994).

Entre as enzimas produzidas pelo epitélio do intestino delgado, a isoforma CYP3A4 é a mais predominante (KOLARS *et al.*, 1992).

Muitos fármacos apresentam substancial metabolização pela CYP3A na mucosa do intestino delgado, por exemplo, midazolan, felodipina, verapamil, nifedipino, tacrolimus, saquinavir, ciclosporina, etc (PAINÉ *et al.*, 1996; REGARDH, *et al.*, 1989; FROMM, *et al.*, 1996; HOLTEBECKER, *et al.*, 1996; LAMPEM, *et al.*, 1995; WACHER, *et al.*, 1998; WU, *et al.*, 1995). A CYP3A constitui apenas 30% da quantidade total das CYP nos humanos, mas representa cerca de 70% das CYP presentes no intestino. A existência das CYP3A nos enterócitos presentes nas vilosidades intestinais confere grande capacidade metabolizadora a este tecido, devido a sua extensa área na qual as enzimas podem entrar em contato com o seu substrato (SHIMADA, *et al.*, 1999).

As variações interindividuais na biodisponibilidade oral e no clearance sistêmico dos fármacos substratos da CYP3A podem ser atribuídas, em grande parte, à variável expressão desta enzima no epitélio da mucosa do intestino delgado (PAINÉ, *et al.*, 1996). Essa variação é manifestada pelas diferenças variando em cerca de 10 vezes no metabolismo *in vivo* de fármacos substratos da CYP3A, que pode ocorrer por inibição ou indução, podendo resultar em diferenças importantes quanto à toxicidade e resposta farmacológica (TUMMEL *et al.*, 1994).

Os fatores genéticos têm demonstrado ser de grande importância na variabilidade, expressão e atividade da CYP3A, mas os mecanismos detalhados dessa influência ainda não são totalmente conhecidos (OZDEMIR *et al.*, 2000). O polimorfismo genético funcional da CYP3A4 tem sido estudado, caracterizando-se diferentes alelos para esta enzima (KUEHL *et al.*, 2001).

No tecido intestinal também estão presentes os sistemas enzimáticos de fase II como as glucoroniltransferases, sulfotransferases e esterases.

As glucoroniltransferases catalizam a adição de ácido glicurônico em grupamentos fenol, hidroxil e carboxil de fármacos, tornando-os, desta forma, mais hidrofílicos. De modo geral, o intestino humano é capaz de metabolizar os substratos para a glucoroniltransferase, entretanto, essa capacidade é cerca de 5 a 10 vezes menor que a apresentada pelo sistema hepático (PRUEKSARITONONT *et al.*, 1996).

As sulfotransferases são enzimas citoplasmáticas que adicionam sulfato aos grupamentos fenólico, hidroxila e em algumas aminas. Ao contrário do que ocorre com a glucoroniltransferase, a sulfotransferase apresenta taxa de metabolização significativamente maior no intestino em comparação ao fígado (cerca de 10 vezes). Tal fato faz com que o intestino represente uma considerável barreira para a biodisponibilidade oral de fármacos substratos desse sistema enzimático. Em relação à diferença de expressão das sulfotransferases, PACIFIC e colaboradores (1993) demonstraram que a taxa de metabolismo para a terbutalina (substrato para as sulfotransferases) foi reduzida ao longo do TGI, sendo que os valores de atividade variaram de 1195 no duodeno para 415 no íleo e 268 no cólon, o que pode ser uma informação importante do ponto de vista biofarmacotécnico, no caso de desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos substratos da sulfotransferase.

Outro sistema enzimático presente no epitélio intestinal é a esterase. As esterases formam uma grande família de enzimas que catalizam a hidrólise de pontes de éster de moléculas. Estão presentes em grande parte dos tecidos humanos, mas principalmente no tecido hepático e intestinal em quantidades similares (PRUEKSARITONONT *et al.*, 1996).

A alta atividade das esterases no intestino humano é informação importante a ser considerada para a absorção de pró-fármacos. Pró fármacos são frequentemente empregados para melhorar a característica de permeabilidade de fármacos pouco permeáveis através das membranas

celulares. O mecanismo racional de melhora da permeabilidade é decorrente do recobrimento de grupamentos polares (geralmente terminações carboxílicas ou alcoóis) da molécula do fármaco pelo radical éster, tornando este pró-fármaco mais lipossolúvel. Como os grupamentos ésteres são rapidamente metabolizados pelas esterases após o processo de absorção, ocorrerá a liberação do fármaco na sua forma original. Entretanto, com a significativa atividade da esterase já nos enterócitos, é possível que ocorra a hidrólise durante o processo de absorção. O fármaco na sua forma original pode ser então transportado de volta ao lúmen intestinal. Desta forma, a atividade da esterase no intestino humano atua como importante barreira de impedimento da absorção de pró-farmacos na forma de ésteres (LIN e LU, 1997).

Adicionalmente à capacidade metabólica do enterócito, o epitélio intestinal também representa uma barreira não metabólica à absorção de fármacos. Como citado anteriormente, os enterócitos expressam um número significativo de transportadores de membranas que realizam um transporte em sentido oposto ao da absorção para alguns fármacos. Este mecanismo contra a absorção é denominado de efluxo. O transportador de efluxo melhor caracterizado até o presente momento é a Glicoproteína-P (Pgp).

2.5 Glicoproteína P

A P-gp foi primeiramente descoberta em 1976 por Juliano e Ling que sugeriram seu importante papel na modulação da permeabilidade celular. A P-gp é uma fosfoglicoproteína pertencente à super família ABC de transportadores ATP dependentes. Mais de 200 outros transportadores da família ABC são conhecidos e existem em variadas espécie de animais. Este transportador está relacionado com o transporte de vários nutrientes tais como, aminoácidos, açúcares, peptídeos e substâncias hidrofóbicas (LEVEILLE e ARIAS, 1995). O interesse nesse transportador foi crescendo quando se descobriu o seu impacto na resistência à absorção de múltiplos fármacos contra o câncer.

Os níveis de expressão da P-gp são distintos nas diferentes porções do intestino. Níveis mais baixos são encontrados nas porções iniciais (duodeno e jejuno), enquanto que nas porções finais (cólon) aumentam consideravelmente (WACHER *et al.*, 1998). LOWN e colaboradores (1995), por meio de exames de biópsias, demonstraram *in vivo* uma variação de cerca de 10 vezes no nível de mRNA da P-gp, sugerindo que esta expressão no intestino tem grande potencial de gerar variabilidade na biodisponibilidade oral de fármacos que são substratos desse transportador.

Os estudos relacionados à elucidação do processo de limitação da absorção oral foram intensificados com o emprego da cultura de células Caco-2 (células de adenocarcinoma humano, empregadas como modelo *in vitro* para avaliar a permeabilidade de fármacos), com as quais, estão sendo estudadas possíveis interações entre fármacos, fármacos e excipientes e fármacos e nutrientes, promovidas pela inibição ou indução dos níveis de expressão da P-gp (BOGMAN *et al.*, 2005; CHIOU *et al.*, 2001)

2.6 A teoria de reciclagem apical

A CYP3A4 e P-gp são comumente localizadas na membrana apical do enterócito e um grande número de compostos são substratos para ambos sistemas (WACHER *et al.*, 1995; WATKINS 1997; CUMMINS *et al.*, 2001). Por esta razão, tem-se sugerido que ocorre um importante sinergismo pela cooperação entre a CYP3A4 e a Pgp, no sentido de dificultar a absorção de fármacos pelo mecanismos de efluxo e metabolismo, resultando na criação da hipótese de reciclagem apical. Segundo esta teoria, a Pgp retarda a taxa de absorção de um fármaco e aumenta o tempo e as chances de sua exposição à enzima CYP3A4 pela recirculação do fármaco no enterócito (BENET *et al.*, 1996; WATKINS 1997; ITO *et al.*, 1999; JOHNSON *et al.*, 2001). Também foi demonstrado que a reciclagem apical tem afetado a biodisponibilidade de metabólitos ativos de alguns fármacos, como exemplo do antiretroviral indinavir (HOCHMAN *et al.*, 2001).

2.7 Estudos de Permeabilidade

O emprego da análise combinatória nos estágios iniciais da fase de desenvolvimento e a otimização molecular de fármacos já existentes na terapêutica tem levado a um aumento significativo do número de compostos candidatos a fármacos. Tal fato, associado ao desenvolvimento farmacotécnico de novos medicamentos, tem despertado o meio científico para o desenvolvimento de novas técnicas para caracterização dos perfis de absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade (ADMET) (KIM *et al.*, 2006; LENNERNÄS, 2000).

O primeiro parâmetro de grande importância para previsão da absorção de um fármaco é a caracterização da sua permeabilidade através das membranas do TGI, o que contribui para prever sua biodisponibilidade (SOUZA *et al.*, 2007).

Desde a década de 1950, as diversas técnicas de determinação da permeabilidade vem sendo aprimoradas com o objetivo de se obter resultados mais correlacionáveis ao que ocorre no complexo processo de absorção *in vivo*.

O método mais preciso para a determinação da absorção intestinal de fármacos é aquele em que se determina o seu desaparecimento a partir do trato gastrintestinal e, posteriormente, o seu aparecimento no sangue do sistema hepático-portal. Estes métodos oferecem informações sobre a fração do fármaco absorvida através da parede intestinal e, eventualmente, sobre a quantidade dessa fração que é metabolizada no decurso do processo de absorção. Técnicas que empregam modelos animais *in vitro*, *in situ* e *in vivo*, estão disponíveis para estes tipos de estudos (AMIDON *et al.*, 1988, STEWART *et al.*, 1995).

Os estudos *in situ* em humanos (técnicas de Loc-I-Gut® e Loc-I-Col) são empregados nos casos em que a absorção de fármacos em seres humanos necessita ser avaliada (LENNERNAS *et al.*, 1992). As técnicas Loc-I-

Gut® e Loc-I-Col® podem ser realizadas de modo aberto ou semi-aberto, que consiste em isolar a porção onde se pretende avaliar o processo de absorção com balões infláveis por meio de sondas. Estes ensaios possibilitam maior controle das condições experimentais, como por exemplo, a padronização das extensões dos segmentos intestinais e uma completa recuperação da fração não absorvida de algum fármaco ou marcador molecular (LENNERNAS *et al.*, 2000). Por razões éticas relacionadas à exposição de animais e seres humanos e pela alta complexidade na sua condução, esses tipos de estudos são utilizados em menor frequência.

Apesar dos experimentos *in vivo* mencionados anteriormente serem capazes de fornecer resultados da absorção de modo mais abrangente, algumas técnicas mais simples *in vitro* e *in situ* também são importantes e tornaram-se uma importante ferramenta para a previsão da absorção intestinal de um candidato a novo fármaco (MAKHEY *et al.*, 1998; MARIAPPAN *et al.*, 2004).

Como alternativa aos estudos *in vivo*, diferentes técnicas *in vitro* são empregadas para determinação das características e mecanismos de permeabilidade epitelial de um composto. Estas devem ser suficientemente simples na execução, com resultados de fácil interpretação, apresentando limites bem estabelecidos. Ao mesmo tempo, a técnica deve representar o mais fielmente possível as condições encontradas *in vivo*, sendo fundamental mimetizar as potenciais barreiras para a absorção relacionadas às condições fisiológicas, tais como o gradiente de pH e ligação às proteínas, entre outros. Adicionalmente, em sua execução, os métodos devem requerer quantidades reduzidas do composto a ser avaliado, uma vez que nos estágios iniciais de desenvolvimento, esses são obtidos em pequenas quantidades. Além disso, os métodos devem ser reproduzíveis, rápidos e de baixo custo (HIDALGO, 2001).

As principais técnicas *in vitro* para estudo da permeabilidade de compostos são as seguintes:

1- **Métodos biofísicos *in vitro*** (livre de células) – Como alguns fármacos são absorvidos por difusão passiva, informações relevantes a respeito da permeabilidade através do epitélio do TGI podem ser obtidas a partir de experimentos realizados sem o emprego de materiais vivos. Estes métodos baseiam-se nos parâmetros físicos- químicos de um fármaco, como sua solubilidade, peso molecular, carga e polaridade de superfície e flexibilidade conformacional, assim como os coeficientes de partição (log P) ou o coeficiente de distribuição (log D), que se referem à partição da substância a partir de uma fase aquosa para a fase lipídica (BURTON *et al.*, 1996, WILS *et al.*, 1994, PALM *et al.*, 1997, CAMENISCH *et al.*, 1998, AVDEEF, 2001). O método mais simples que se enquadra nessa categoria é aquele que emprega membranas sintéticas constituída de fosfolipídeos, principalmente a fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina (DUDEJA *et al.*, 1991; TAILLARDAT-BERTSCHINGER *et al.*, 2002). Por esta técnica, é possível determinar a interação do fármaco com a bicamada lipídica por meio da sua transição de um meio aquoso para um lipídico, o que simula as características de uma membrana celular. Um aperfeiçoamento dessa técnica consiste em imobilizar as membranas de fosfolipídeos em colunas cromatográficas. Dessa forma, ao serem injetadas amostras contendo o fármaco em estudo, sua eluição por esta fase estacionária será dependente de sua lipofilicidade (OLLILA *et al.*, 2002, YEN *et al.*, 2001, LIU *et al.*, 2002).

A membrana artificial que pode ser considerada a mais conhecida e utilizada nos experimentos dessa natureza é a PAMPA, do inglês *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*, que foi inicialmente introduzida por KANSY e colaboradores (1998). Esta técnica é baseada na formação de uma bicamada de fosfolipídeos em solução de dodecano impregnada entre duas membranas semipermeáveis com espessura e dimensões de poros bem estabelecidas, formando, desta forma, dois compartimentos: o doador, onde se adiciona o fármaco em solução e o receptor, onde se quantifica a fração do fármaco que foi capaz de atravessar a bicamada lipídica formada (AVDEEF, 2001). Este método é muito utilizado para avaliar a permeabilidade transcelular passiva, principalmente nos estágios iniciais de desenvolvimento de um novo fármaco.

2- **Métodos biológicos *in vitro*** – A absorção de um fármaco pode ser investigada empregando-se diferentes métodos biológicos *in vitro*. Comparando-se os métodos biofísicos com os biológicos *in vitro*, percebe-se que, com estes últimos, é possível manter as condições mais próximas possíveis do que ocorre *in vivo*, possibilitando a avaliação dos diferentes mecanismos de absorção (difusão passiva ou transporte ativo).

O método biológico *in vitro* mais simples é aquele que emprega frações sub-celulares, como, por exemplo, as vesículas de membranas de tecido intestinal, que são obtidas por isolamento dos constituintes teciduais do epitélio intestinal. Esta técnica é utilizada em estudos mecanísticos da interação de enzimas ou acoplamento a elementos durante o processo de transporte (UNGELL, 1997).

Outras técnicas biológicas *in vitro* amplamente empregadas nos estudos de permeabilidade são aquelas que empregam fragmentos de tecidos intestinais, como os anéis intestinais, sacos intestinais invertidos ou perfusão em segmentos intestinais (SOUZA *et al.*, 2007).

As técnicas que empregam os anéis intestinais consistem em se retirar uma porção de certa região do intestino animal (normalmente rato ou coelho) e proceder ao experimento pela adição da solução do fármaco a um dos lados, ou seja, do lado mucoso ou seroso. A taxa da absorção é obtida pela determinação da concentração do fármaco que foi transferida do compartimento doador para o receptor. Apesar de essas técnicas variarem em complexidade e versatilidade, elas apresentam duas importantes vantagens: a) possibilitam a preservação da arquitetura e integridade do tecido; b) possibilitam a determinação da permeabilidade nos diferentes segmentos intestinais. Entretanto, como principal desvantagem, a limitada viabilidade do tecido extraído do animal (HIDALGO, 2001).

Outra técnica biológica *in vitro* é a que utiliza os seguimentos intestinais perfundidos. O método consiste na determinação do fluxo de fármaco através de segmento intestinal animal de tamanho apropriado, isolado de região

específica e adaptado em equipamento dotado de um sistema de bombeamento do fluido de perfusão. A permeabilidade é baseada no aparecimento do fármaco no lado seroso e desaparecimento do lado mucoso (GRASS, SWEETANA, 1989; MENON, BARR, 2003). Essa técnica é ideal para estudar a diferença na absorção de fármacos em várias regiões intestinais. Como outros métodos que empregam tecidos, eles apresentam como desvantagens a falta de sangue e nervos, a restrita viabilidade dos tecidos, além da dificuldade de preparação, que pode ocasionar danos morfológicos (BALIMANE *et al.*, 2000; COOK e SHENOY, 2003, SOUZA *et al.*, 2007).

O emprego de tecido intestinal invertido é uma alternativa utilizada nos estudos de permeabilidade. Tal método consiste em extrair um segmento intestinal animal e invertê-lo cuidadosamente com auxílio de um bastão de vidro. Os seguimentos geralmente são do intestino delgado de ratos e é necessária muita cautela no procedimento de inversão para evitar danos morfológicos ao tecido. As duas extremidades desse segmento são, então, fechadas por estrangulamento com uma linha, formando uma espécie de saco, que será preenchido com solução tampão oxigenada contendo os nutrientes e sais necessários para manutenção da viabilidade tecidual. Este saco é mergulhado em um recipiente contendo o fármaco a ser estudado. A permeabilidade é obtida por meio da quantificação de amostras coletadas do recipiente externo e do compartimento interno do saco. Devido à ausência de sangue e nervos, estes tecidos apresentam reduzida viabilidade. Quando mantidos a 37°C, em meios de cultura adequados, podem permanecer morfológica e metabolicamente ativos por cerca de 2 horas (SOUZA *et al.*, 2007; BALIMANE, 2000).

Vários modelos baseados em cultura celulares para determinação da permeabilidade efetiva *in vitro* tem sido desenvolvidos. Dentre eles, destacam-se aqueles que empregam as células Caco-2, anteriormente mencionadas, e MDCK, (células Mardin-Darby de rim canino) as quais tem sido amplamente empregadas como ferramentas de triagem nos estágios iniciais de desenvolvimento de novos fármacos (ARTURSSON, 1991; BALIMANE e

CHONG, 2005; IRVINE *et al.*, 1999; LENTZ *et al.*, 2000). Métodos baseados em cultura celulares podem ajudar não somente na seleção de um fármaco com uma propriedade particular dentre uma série de compostos, mas também, na obtenção de informações sobre os mecanismos de absorção para compostos estruturalmente semelhantes (QUARONI e HOCHMAN, 1996).

Outras culturas celulares estão sendo utilizadas nos estudos de permeabilidade, tais como as células CHO (células ovarianas de ramster); 2/4/A1 (células intestinais de feto de rato); HT29 (células de adenocarcinoma de cólon humano tipo II). Há, ainda, as linhagens celulares transfectadas com gene humano para que expressem determinados tipos de transportadores, tal como a MDCK-MDR1 (SURENDRAN *et al.*, 1999; TAVELIN *et al.*, 1999; TAVELIN *et al.*, 2003; KARLSSON *et al.*, 1993; SOUZA *et al.*, 2009).

2.8 Células Caco-2

As células Caco-2 são oriundas de um adenocarcinoma de cólon humano e foram primeiramente isoladas e cultivadas *in vitro* em 1977 por FOGH e colaboradores. Inicialmente elas eram utilizadas na investigação dos mecanismos tumorais das células cancerígenas e nos estudos sobre a terapia anti-neoplásica (PINTO *et al.*, 1983).

As células Caco-2 tornaram-se, a partir da década de 1980, uma promissora ferramenta nos estudos de avaliação das funções das células intestinais por apresentarem peculiaridades interessantes em relação aos outros tipos celulares até então disponíveis. É atualmente o modelo celular mais empregado para investigar os processos de absorção intestinal *in vitro* (BALIMANE e CHONG, 2005).

A célula Caco-2 foi bem caracterizada em relação às suas propriedades morfológicas e bioquímicas (LUO *et al.*, 2002; WILSON *et al.*, 1990). Apresenta a capacidade de diferenciação espontânea em cultivo *in vitro*

expressando muitas características morfológicas e bioquímicas presentes no intestino delgado humano (ARTURSON, 1997).

Mantidas as condições adequadas de cultivo, as células Caco-2 crescem formando uma monocamada de células cilíndricas polarizadas, com microvilosidades na borda apical, apresentando, ainda, as junções oclusivas entre células adjacentes e expressando atividade enzimática de hidrolases comuns do intestino delgado (PINTO *et al.*, 1983). Para se manter as condições mais próximas possíveis das encontradas no intestino *in vivo*, as células Caco-2 são cultivadas em suporte de filtros permeáveis que mantêm o livre acesso de íons e nutrientes, constituintes do meio de cultivo, em ambos os lados da membrana formada. A figura 3 representa o cultivo das células Caco-2 em suporte permeável para realização dos experimentos de permeabilidade.

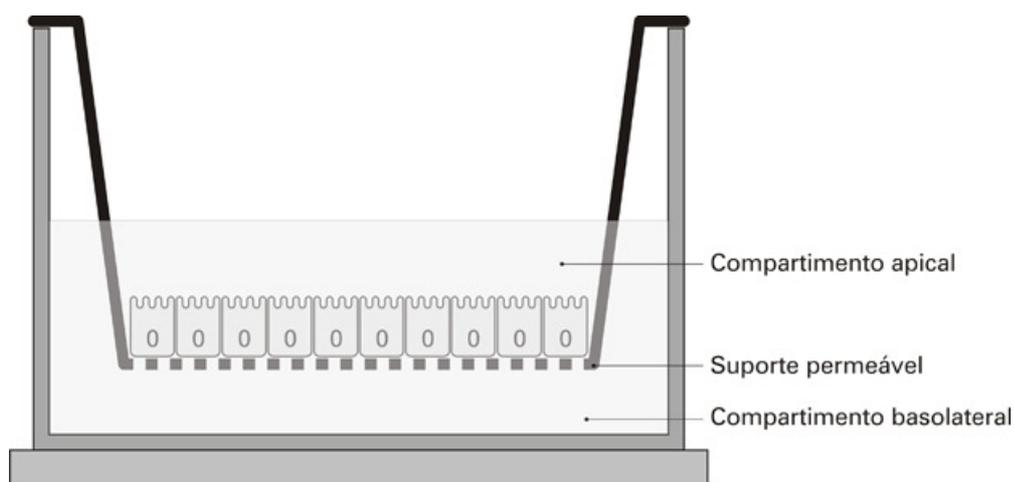


Figura 3. Esquema do suporte de cultivo de células Caco-2 empregado nos estudos de permeabilidade (GONÇALVES *et al.*, 2009).

Os ensaios de permeabilidade e absorção de fármacos pelo emprego das células Caco-2, tem sido amplamente utilizados como ferramenta pela indústria farmacêutica, na descoberta de novos fármacos e como sistema integrado a métodos de dissolução para predizer a relação dissolução-absorção (ARTURSSON & MAGNUSSON, 1990; RUBAS *et al.*, 1993; ARTURSSON & BORCHARDT, 1997; GINSK & POLLI, 1999; LENTZ *et al.*, 2000; GERSHANIK *et al.*, 2000; KOBAYASHI *et al.*, 2001, SOUZA *et al.*, 2007). As células Caco-2 CYP 3A4 representam uma variação das células Caco-2,

transfectadas com o gene que expressa as enzimas do citocromo P 450, responsáveis pelo metabolismo de diversos fármacos. Estudos recentes visam avaliar a permeabilidade e a eliminação de metabólitos e, assim, correlacioná-los com a biodisponibilidade dos fármacos (CUMMINS *et al.*, 2004).

Outras aplicações para utilização de técnicas que empregam as membranas Caco-2 vêm crescendo vertiginosamente, pois a partir destes estudos pode-se: obter informação rápida sobre a permeação de drogas em desenvolvimento, direcionando as alterações das características físico-químicas responsáveis pela absorção; estudar as funções das células epiteliais do intestino; investigar estratégias de formulações com intuito de melhorar a permeabilidade do fármaco através da membrana; investigar o potencial efeito tóxico de determinados compostos; avaliar o metabolismo pré-sistêmico de fármacos e caracterizar possíveis interações entre fármacos envolvendo o processo de absorção (ARTURSSON & MAGNUSSON, 1990; RUBAS *et al.*, 1993; ARTURSSON & BORCHARDT, 1997; GINSK & POLLI, 1999; LENTZ *et al.*, 2000).

As principais limitações ao emprego de células Caco-2 para avaliar a permeabilidade podem ser assim descritas: 1) O reduzido número de transportadores (como peptídeos); o que pode explicar por que antibióticos beta-lactâmicos (cefalexina, amoxicilina) apresentam baixa permeabilidade através da monocamada de células de Caco-2, mas são completamente absorvidos *in vivo* (CHONG *et al.*, 1996). 2) A baixa permeabilidade de compostos hidrofílicos com baixo peso molecular (ranitidina, atenolol, furosemida, hidroclorotiazida, etc.) que apresentam fraca permeabilidade (igual ou menor à do manitol) através de células Caco-2, embora em humanos a absorção seja maior que 50% (BALIMANE *et al.*, 2000). 3) A presença de co-solventes (metanol, etanol, propilenoglicol e polietilenoglicol em concentrações maiores que 1-2% (v/v) que podem danificar a membrana. 4) A aderência física do fármaco ao filtro de policarbonato, apresentando reduzida permeação, principalmente, para aqueles que apresentam alta lipofilicidade. 5) O elevado tempo de crescimento das células Caco-2.

As células Caco-2 são empregadas mais eficientemente na caracterização da permeabilidade de compostos absorvidos passivamente pela via transcelular, uma vez que apresentam variações bastante discutidas quanto à expressão de carreadores de transporte de membranas (BALIMANE, 2005).

A preparação das células da monocamada requer um período de cultura de até três semanas e condições adequadas. Fatores como temperatura, nutrientes, tempo e intervalo entre os repiques podem influenciar as características da membrana formada. Durante os estudos de transporte transepitelial de fármacos algumas condições devem ser definidas previamente, como a concentração do fármaco a ser empregada, a duração do estudo e intervalo de coleta de amostras, o pH e composição do meio e a velocidade de agitação do sistema, entre outros. Estas variáveis podem influenciar consideravelmente nas características da membrana formada, bem como nos resultados de permeabilidade obtidos. A dificuldade em reproduzir esses resultados tem sido discutida por diferentes pesquisadores (BEHERNS *et al*, 2003).

Recentes estudos utilizando a técnica de avaliação da permeabilidade através das células Caco-2 têm sido direcionados para avaliar o potencial de interação entre fármacos envolvendo os mecanismos de indução da expressão dos mediadores de efluxo (glicoproteína P) e de enzimas de metabolização da família do citocromo P450. Neste contexto, alterações no meio de cultivo das células estão sendo utilizadas na indução da expressão das moléculas responsáveis por estes mecanismos. A adição de 1- α -25-dihidroxi-vitamina-D3 no meio de cultivo de Caco-2 levou à expressão de enzimas da família do citocromo P450 (CYP3A4) (EMGMAN *et al.*, 2003). Neste sentido, a técnica de avaliação da permeabilidade através das membranas formadas por células Caco-2, depois de padronizadas as condições experimentais, torna-se uma ferramenta bastante promissora nos estudos de permeação e interação do principal fármaco utilizado na terapêutica da tuberculose, a rifampicina.

Os aspectos relacionados à solubilidade e à permeabilidade de fármacos têm sido estudados visando ao desenvolvimento farmacotécnico de

novas formulações de uso oral, assim como há discussões sobre sua aplicação na isenção de testes de bioequivalência para o registro de medicamentos genéricos, tendo como base o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), proposto por Amidon e colaboradores em 1995.

Nesse sentido, a determinação das características de permeabilidade de fármacos por técnicas *in vitro*, especialmente aquelas que utilizam as membranas de células Caco-2, têm sido uma ferramenta bastante promissora, intensamente utilizada por diversos grupos de pesquisa. Entretanto, a dificuldade em reproduzir os resultados desses estudos tem sido discutida por diferentes pesquisadores, demonstrando a necessidade de harmonização e padronização da técnica (SOUZA *et al.*, 2007).

2.9 Avaliação da Permeabilidade da rifampicina

A determinação das características de permeabilidade da rifampicina, o principal fármaco empregado no tratamento da tuberculose trará informações de grande relevância para desenvolvimento de medicamentos com maior eficácia terapêutica. O Brasil está entre os países para os quais a OMS recomenda a intensificação das pesquisas relacionadas ao tratamento e diagnóstico utilizados na tuberculose.

2.10 A rifampicina

A rifampicina é um fármaco relativamente antigo, tendo sido sintetizado em meados da década de 1960. É considerada como sendo de primeira escolha no tratamento da tuberculose. A sua atividade antimicrobiana começou a ser estudada em 1966 por MAGGI e colaboradores. Em 1977, a rifampicina passou a fazer parte da primeira lista de medicamentos essenciais da OMS.

A rifampicina é um potente antibiótico de origem semi-sintética da família das rifamicinas, derivado da rifamicina B e produzida por cepas de *Nocardia (Streptomyces) mediterranei*. Possui ação bactericida de amplo espectro, ativa contra certos microrganismos gram positivos, gram negativos, todos os bacilos da tuberculose, incluindo atividade contra várias cepas de micobactérias. Atua na inibição da atividade da enzima RNA polimerase DNA-dependente através da formação de um complexo estável com a enzima. Isto suprime a iniciação da síntese de RNA bacteriano. Age em microrganismos intra e extracelulares e em bacilos em processo de divisão ou em estado latente (ZHANG, 2005; BACCHI *et al.*, 1998; GOODMAN *et al.*, 1996).

A rifampicina tem características anfóteras (“zwitterion”) com pKa de 1,7 relacionado ao grupamento 4-hidroxila e pKa de 7,9 relacionado ao nitrogênio do grupo piperazina. Em solução aquosa, o seu ponto isoelétrico é igual a 4,8 (MAGGI *et al.*, 1973). É levemente solúvel em água e sua solubilidade e estabilidade varia de acordo com o pH devido à sua natureza anfótera. Em pH 2, a solubilidade é igual a 100 mg/mL, em pH 5,3 é reduzida para 4,0 mg/mL e em pH 7,5 é igual a 2,8 mg/mL (GALLO e RADAELLI, 1976).

Em soluções ácidas, a rifampicina sofre hidrólise gerando 3-formilrifamicina e 1-amino 4-metil piperazina. Sob condições alcalinas (pH de 7,5 a 9,0), a rifampicina sofre oxidação na presença de oxigênio gerando rifampicina-quinona (GALLO e RADAELLI, 1976; SINGH, *et al.*, 2001).

A máxima estabilidade da rifampicina é verificada em soluções com pH próximo da neutralidade. A adição de ácido ascórbico à solução aumenta a solubilidade da rifampicina e diminui a sua oxidação (GALLO e RADAELLI, 1976).

Estudos recentes têm demonstrado que a rifampicina apresenta o fenômeno de polimorfismo, com duas formas polimórficas denominadas I e II. Estes polimorfos apresentam diferentes solubilidades em meio aquoso (HENWOOD *et al.*, 2001, AGRAWAL *et al.*, 2004). Estas diferenças de solubilidade em meio aquoso podem afetar a absorção e a biodisponibilidade

do fármaco a partir de formas farmacêuticas sólidas de administração oral (SINGH *et al.*, 2001; AGRAWAL *et al.*, 2004; PANCHAGNULA e AGRAWAL, 2004, PANCHAGNULA *et al.*, 2006).

Trata-se de um fármaco potente, bastante conhecido na clínica e geralmente bem tolerado. Apresenta biodisponibilidade variável, devendo ser administrado em jejum, pois é inativada pelo suco gástrico. Há vários trabalhos que relacionam a biodisponibilidade variável da rifampicina com a sua inativação pelo suco gástrico, o que pode dar origem ao fenômeno da resistência bacteriana (SHISHOO, *et al.*, 1999, SINGH, *et al.*, 2001).

A OMS recomenda que a rifampicina seja administrada em associação com outros fármacos (isoniazida, pirazinamida e etambutol), para evitar o surgimento do fenômeno de resistência bacteriana. Tais formulações com estes fármacos associados são conhecidas como FDC (*fixed dose combination*) (WHO, 2005). O uso das FDC aumenta a adesão e a eficiência ao tratamento. Vários artigos relatam problemas na biodisponibilidade da rifampicina a partir das FDC, o que ocorre por fatores não totalmente esclarecidos (SHISHOO, *et al.*, 2001, SINGH, *et al.*, 2001).

Países como o Brasil, possuem baixos índices de resistência e utilizam as FDC como protocolo de tratamento há algum tempo (PANCHAGNULA *et al.*, 2004). A OMS e a *International Union Against Tuberculosis and Lung Diseases* (IUATLD) exigem que a biodisponibilidade da rifampicina nas FDC seja equivalente à biodisponibilidade da mesma nas formas farmacêuticas individuais (SINGH *et al.*, 2001). Os problemas associados à qualidade das FDC estão atualmente em foco, principalmente aqueles relacionados à baixa biodisponibilidade da rifampicina e à sua instabilidade na formulação (BHUTANI *et al.*, 2005). Existem várias justificativas para estes problemas: alteração da forma cristalina da rifampicina, adsorção do fármaco pelos excipientes, ordem de adição dos fármacos, decomposição na formulação e decomposição no estômago (SINGH *et al.*, 2001). A decomposição na formulação já é bem conhecida: a rifampicina em pH ácido é hidrolisada a 3-

formilrifamicina, hidrólise que é duas vezes mais rápida na presença de isoniazida (SHISHOO *et al.*, 1999).

Como demonstrado na Figura 4, a 3-formilrifamicina reage com isoniazida para formar isonicotinil hidrazona (HYD); estudos recentes mostram que esta reação pode ocorrer na formulação mesmo em se tratando da forma sólida (SINGH *et al.*, 2001). A pirazinamida e o cloridrato de etambutol atuam como catalisadores desta reação, mediante a transferência intramolecular de um próton, por um mecanismo tetraédrico (BHUTANI *et al.*, 2005).

Seja qual for a razão, a baixa biodisponibilidade da rifampicina nas formulações leva ao fracasso do tratamento e ao aparecimento da resistência, agravando o quadro clínico do paciente (SHISHOO *et al.*, 1999).

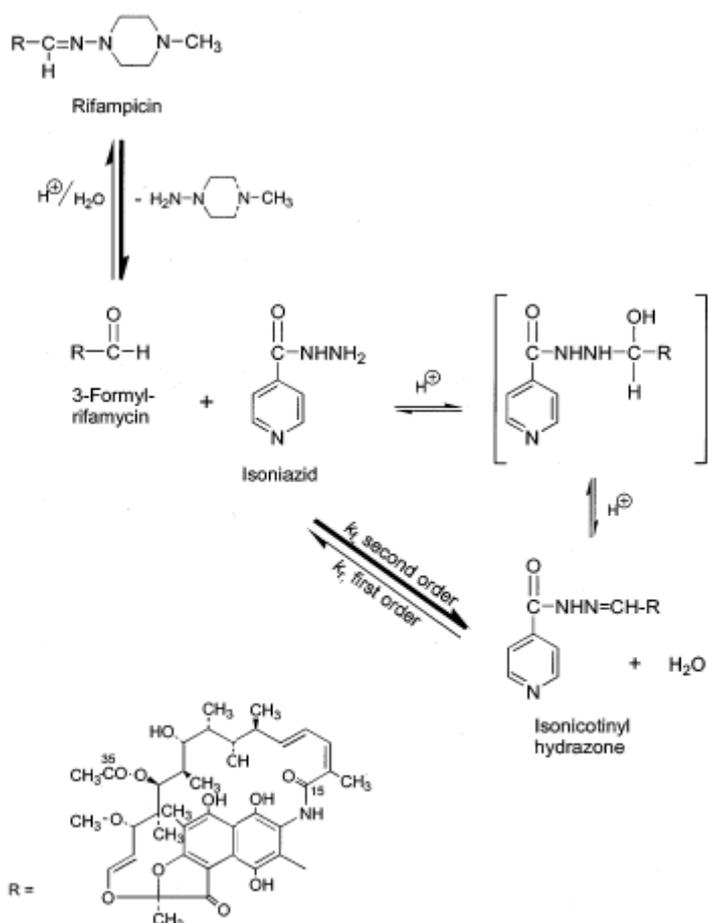


Figura 4. Esquema da reação entre rifampicina e isoniazida em meio ácido (SINGH *et al.*, 2001).

A OMS, em 1999, estabeleceu um protocolo-modelo para avaliação da biodisponibilidade da rifampicina em formulações de dosagens fixas combinadas (FDC) (WHO, 1999).

2.11 A Biofarmacotécnica aplicada aos medicamentos para a tuberculose

Os estudos relativos à tuberculose tem se voltado para os seguintes temas: - a busca de novas formas de diagnósticos mais eficientes; - a pesquisa de vacinas; - a pesquisa de novos fármacos; - o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas para os fármacos já existentes (BOLLELA *et al.*, 1999; O'BRIEN, NUNN, 2005; BRENNAN, 2005; CASENGHI, 2006; GUILLERM *et al.*, 2006; DU TOIT *et al.*, 2006).

Embora essas pesquisas sejam de fundamental importância, talvez a contribuição mais imediata e de menor custo para o melhoramento da atividade farmacológica e, conseqüentemente, da terapêutica da tuberculose possa ser encontrada através de estudos biofarmacotécnicos para o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas capazes de melhorar a biodisponibilidade dos fármacos já utilizados em seu tratamento (CASENGHI, 2006; DU TOIT *et al.*, 2006).

Com o avanço das pesquisas na Área de Biofarmacotécnica (Biofarmácia), tem-se dado grande importância às propriedades físico-químicas do fármaco, as características da forma farmacêutica e os fatores fisiológicos. Tais características devem ser consideradas durante todo processo de desenvolvimento de um medicamento, ou seja, as etapas que se estendem desde a pré-formulação, passando pela produção e até a padronização de métodos e processos para a garantia da qualidade (VELAGALETI *et al.*, 2003; ICH, 2005). Nesse sentido, os estudos de permeabilidade de fármacos, os estudos das interações fármaco-excipientes e das interações excipientes-

transportadores celulares, entre outros, demonstram ser de importância fundamental no desenvolvimento de formulações farmacêuticas.

3- OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Produzir conhecimento científico relativo à padronização das condições para condução dos experimentos de caracterização das propriedades de permeabilidade da rifampicina por meio da técnica que emprega a cultura de células Caco-2.

3.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar métodos analíticos para quantificação dos fármacos: rifampicina, zidovudina, lamivudina, e fluoresceína contidos nos meios utilizados nos estudos de permeabilidade;
- Avaliar se as condições de cultivo adotadas possibilitam a obtenção de membranas de células Caco-2 adequadas para condução dos estudos de permeabilidade, empregando-se a determinação da permeabilidade de fármacos considerados modelo de baixa permeabilidade (fluoresceína) e de alta permeabilidade (zidovudina e lamivudina);
- Avaliar a permeabilidade e a citotoxicidade de diferentes concentrações de rifampicina em células Caco-2;
- Avaliar a influência do pH na permeabilidade da rifampicina através das células Caco-2;
- Avaliar a influência de proteínas do muco intestinal presentes no compartimento luminal (apical) sobre a permeabilidade da rifampicina;
- Avaliar a influência de proteínas plasmáticas (soro sanguíneo) presentes no compartimento seroso (basolateral) sobre a permeabilidade da rifampicina;

- Investigar o potencial indutor da rifampicina sobre a expressão da glicoproteína-P em membranas celulares Caco-2 por análise da expressão gênica por PCR;
- Avaliar a permeabilidade da rifampicina em membranas de células Caco-2 tratadas com a própria rifampicina no momento do cultivo celular;
- Confirmar a classificação da rifampicina segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica em relação às suas características de permeabilidade, empregando-se o modelo *in vitro* de células Caco-2.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Substâncias Químicas de Referência

- Rifampicina

Fornecedor: Fundação para o Remédio Popular (FURP)

Lote: RPS 176/07

Potência: 100%

Fab: 02/2007 - Validade:02/2010

- Lamivudina

Fornecedor: Fundação para o Remédio Popular (FURP)

Lote: RPS 164/07

Potência: 99,33%

Fab: 07/2007 - Validade:07/2009

- Zidovudina

Fornecedor: Fundação para o Remédio Popular (FURP)

Lote: RPS 061/07

Potência: 99,67%

Fab: 03/2007 - Validade:03/2009

- Fluoresceína Sódica

Fornecedor: Laboratórios Allegan Ltda.

Lote: 200710041

Potência: 84,40%

Fab: 02/2007- Validade:02/2011

- Verapamil Cloridrato

Fornecedor: Ariston Ltda

Lote:5216

Pot: 100%

Fab: 02/2008 - Validade:02/2011

Equipamentos

Os equipamentos utilizados no presente trabalho foram:

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu composto por uma bomba LC-10ADVP, degaseificador DGU-14A, injetor automático de amostras SIL-10ADVP, detector DAD SPD-M10AVVP, forno de coluna CTO10AVP; Certificado de Qualificação Operacional e de Performance N^o 503/09 – HPLC Instrumentação Analítica;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Lachrom Merck Hitach; composto por uma bomba quaternária L7100, degaseificador L7612, injetor automático de amostras L7200 , detector UV/VISÍVEL L7400 e forno de coluna 7300; Certificado de Qualificação Operacional e de Performance 243/07 - HPLC Instrumentação Analítica;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu composto por uma bomba LC-10ADVP, degaseificador DGU-14A, injetor automático de amostras SIL-10ADVP, detector fluorescência FL 10AVVP, forno de coluna CL10ADVP; Certificado de Qualificação Operacional e de Performance 071/07 - HPLC Instrumentação Analítica;
- Balança analítica Mettler Toledo, modelo AB 204-S;
- Banho ultrassônico Odontobrás, modelo 2840D;
- pHmetro Micronal, modelo B 474;
- Sistema de filtração a vácuo Phenomenex;
- Pipetas automáticas de volume fixo de 500 µL Brand Transferpette.
- Agitador magnético;
- Agitador tipo vórtex;

- Agitador termostaticado Tecnal;
- Balança analítica;
- Banho ultrassônico;
- Fluxo laminar Veco SVL 12;
- Incubadora de CO₂ Thermo Forma;
- Minivoltímetro Millicell ERS[®] Millipore;
- Microscópio Invertido Olympus S210;
- PCR – RT Taq Man ABI Prism 7500 FAST – Applied Biosystems;
- Ultra-centrífuga MS 4500 – Applied Biosystems;
- Espectrofotômetro Nano Drop – NanoDrop Technology;
- Termociclador PTC 200 - MJ Research;
- Micropipetas de volume variável;

Solventes, reagentes e materiais utilizados no desenvolvimento dos métodos analíticos

Foram utilizados os seguintes solventes, reagentes e materiais:

- Metanol grau cromatográfico Merck;
- Acetonitrila grau cromatográfico JT Baker;

- Hidróxido de sódio p.a. Merck;
- Acetato de amônio p.a. Merck;
- Água ultra-pura obtida em equipamento Millipore, modelo MilliQ Academic;
- Fosfato monobásico de potássio p.a., Merck;
- Membranas filtrantes Sartorius de acetato de celulose com 47 mm de diâmetro e poro de 0,22 μm ;
- Unidades filtrantes Millipore, tipo HV Millex em polietileno com membrana Durapore com 13 mm de diâmetro e poros de 0,45 μm ;
- Balão volumétrico Pirex[®] de 5, 10, 50, 100, 1.000 e 2.000 mL;
- Tubos de ensaio de 10 mL;
- Ponteiros descartáveis Brand[®];
- Coluna cromatográfica Phenomenex[®], modelo Gemini 5 μ C18(2), de 150 mm de comprimento e 4,60 mm de diâmetro interno, contendo partículas de 5 μm ;
- Pré-coluna de marca Phenomenex [®], modelo AJ0-4287 C18, de 0,5 cm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, contendo partículas de 5 μm .

Reagentes empregados para cultivo celular, citotoxicidade, experimentos de permeabilidade e análise por PCR

Foram utilizados os seguintes solventes, reagentes e materiais:

- Meio DMEM- Cultilab;
- Kit MTT para citotoxicidade - Sigma-Aldrich (MTT em pó 15 mg/frasco, solução de solubilização de MTT - 10% de Triton X-100 plus e 0,1 N HCl em isopropanol anidro);
- Meio DMEM sem fenol;
- Solução tampão Hanks – Cultilab;
- Solução de aminoácidos não essenciais – Sigma Aldrich;
- Solução de glutamina 200mM – Sigma Aldrich;
- Solução de antibióticos estreptomicina 100µg/mL / penicilina 100UI – Cultilab;
- Solução de Tripsina 0,25% e EDTA 1 mM;
- Glicose – Sigma Aldrich;
- Sais de ácido N-2, hidroxietilpiperazina-N-etanosulfônico (HEPES) – Sigma Aldrich;
- Soro fetal bovino – Sigma Aldrich;
- Mucina suína – Sigma Aldrich;
- Garrafas de cultivo celular 25 e 75 cm²;
- Filtros esterilizantes TPP;
- Trizol – Invitrogen;
- Clorofórmo PA ACS – Merck;

- Isopropanol PA ACS – Merck;
- Etanol PA ACS – Merck;
- Dietilpirocarbonato (DEPC) – Invitrogen;
- Randon Primers – Invitrogen;
- DTT – Invitrogen;
- DNTPs – GE Health Care;
- Transcriptase Reversa - Super Script;
- Tampão TRIS HCl - Invitrogen;
- Cloreto de potássio – Invitrogen
- Cloreto de magnésio – Invitrogen;
- Pipetas sorológicas estéreis e descartáveis de volumes variados;
- Placas Transwell de 6 e 12 poços com inserts de policarbonato com 4 μ m de poro;

Infra-estrutura

As etapas de desenvolvimento, validação e a quantificação das frações dos fármacos permeadas foram realizadas no Laboratório de Biofarmacotécnica (BIOFAR) do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF-USP).

O cultivo celular e experimentos de permeabilidade foram conduzidos no Laboratório de Cultura Celular para Estudos de Permeabilidade de fármacos do Departamento de Farmácia da FCF - USP.

A análise de PCR foi realizada no laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP.

4.2 Métodos

Desenvolvimento de método analítico para quantificação de lamivudina, zidovudina, fluoresceína e rifampicina em meio empregado no experimento de permeabilidade

A literatura apresenta diversos métodos para quantificação de lamivudina, zidovudina, fluoresceína e rifampicina nas mais variadas matrizes, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (LIU *et al.* 2008; KANO *et al.*, 2005; MAINARDES *et al.*, 2009; AUGUSTIJNS *et al.*, 2004).

No presente trabalho, desenvolveu-se e validou-se método exato, preciso, sensível e reprodutível para quantificação de lamivudina, zidovudina, fluoresceína e rifampicina contidas em solução empregada nos experimentos de permeabilidade por meio de CLAE, conforme descrito a seguir.

Procedimento de purificação das amostras para quantificação de lamivudina, zidovudina, fluoresceína e rifampicina

Para a análise das amostras provenientes dos estudos de permeabilidade, optou-se pela injeção direta no sistema cromatográfico sem a necessidade de procedimentos de extração e purificação, uma vez que as concentrações esperadas para os fármacos seriam consideravelmente

reduzidas, o que demandaria um procedimento de extração com alta poder de recuperação.

No entanto, para proceder a quantificação dos fármacos que ficaram retidos no interior das células, foi realizado um simples procedimento de extração por lise das células empregando o metanol, que será detalhado posteriormente.

Preparo de soluções padrão para a construção da curva de calibração

As soluções padrão da curva de calibração foram preparadas a cada dia de análise, a partir de uma solução estoque na concentração de 1mg/mL recentemente preparada. Todas as soluções estoques foram preparadas a partir da pesagem de 25 mg dos fármacos, seguida de sua solubilização em balão volumétrico calibrado de 25 mL utilizando-se água ultrapurificada como solvente. Para a rifampicina, foi adicionado ácido ascórbico na concentração final de 0,1mg/mL em cada solução preparada para evitar a degradação por oxidação.

Excepcionalmente para a rifampicina, devido à sua baixa solubilidade em água, foi necessário utilizar 2 mL de etanol como co-solvente para ajudar no processo de solubilização. A partir dessas soluções-estoque foram preparadas as soluções de trabalho por diluições sucessivas até se atingir as concentrações de uso para confecção da curva de calibração. As soluções de trabalho foram preparadas em solução tampão de Hanks, que é o meio utilizado nos experimentos de permeabilidade. As concentrações empregadas, em ng/mL, das soluções estão apresentadas no Quadro 1, a seguir.

Quadro 1. Concentrações (em ng/mL) das soluções padrão utilizadas na construção da curva de calibração e linearidade para quantificação de lamivudina, zidovudina, fluoresceína e rifampicina em solução tampão de Hanks.

Fármaco	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Lamivudina	25	50	75	100	150	250	500	800	1000
Zidovudina	25	50	75	100	150	250	500	800	1000
Fluoresceína	2	5	25	50	100	250	500		
Rifampicina	25	50	75	100	150	250	500	800	1000

Preparo de amostras de padrão de controle de qualidade

As amostras de plasma de controle de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA) foram preparadas a partir de soluções-padrão de lamivudina, zidovudina, fluoresceína e rifampicina, conforme apresentado no Quadro 2.

Quadro 2. Concentrações (em ng/mL) das amostras de controle de qualidade utilizadas na quantificação de lamivudina, zidovudina, fluoresceína e rifampicina em solução tampão de Hanks

Controle de Qualidade	lamivudina ng/mL	zidovudina ng/mL	rifampicina ng/mL	fluoresceína ng/mL
CQB	75	75	75	25
CQM	400	375	375	200
CQA	800	800	800	400

Após o preparo, estas amostras de padrão de controle de qualidade foram aliquotadas em frascos criogênicos de polipropileno de 2 mL, e armazenadas em freezer a -20°C.

Condições cromatográficas

Método para lamivudina

Empregou-se para separação coluna de marca Waters®, modelo Shin Pack ODS C18, de 250 mm de comprimento e 4,60 mm de diâmetro interno, contendo partículas de 10 µm.

A fase móvel foi constituída por mistura de água ultra-purificada e metanol na proporção de 95:5 (v/v). Filtrou-se a solução em membrana de acetato de celulose, com 47 mm de diâmetro e poro de 0,22 µm. Para degaseificar, levou-se a solução ao banho ultrassônico por quinze minutos.

O fluxo e temperatura utilizados foram de 1,0 mL/min e 40°C, respectivamente. Para análise foram injetados 50 µL e o comprimento de onda empregado no detector DAD foi de 265 nm.

Método para zidovudina

Empregou-se para separação coluna de marca Waters®, modelo Shin Pack ODS C18, de 250 mm de comprimento e 4,60 mm de diâmetro interno, contendo partículas de 10 µm.

A fase móvel foi constituída por mistura de água ultra-purificada e metanol na proporção de 70:30 (v/v). Filtrou-se a solução em membrana de acetato de celulose, com 47 mm de diâmetro e poro de 0,22 µm. Para degaseificar, levou-se a solução ao banho ultrassônico por quinze minutos.

O fluxo e temperatura utilizados foram de 1,0 mL/min e 40°C, respectivamente. Para análise foram injetados 50 µL e o comprimento de onda empregado no detector DAD foi de 265 nm.

Método para fluoresceína

Empregou-se para separação coluna de marca Waters®, modelo Shin Pack ODS C18, de 250 mm de comprimento e 4,60 mm de diâmetro interno, contendo partículas de 10 µm.

A fase móvel foi constituída por mistura de solução de acetato de amônia pH 4,0 e acetonitrila grau cromatográfico proporção de 60:40 (v/v). Filtrou-se a solução em membrana de acetato de celulose, com 47 mm de diâmetro e poro de 0,22 µm. Para degaseificar, levou-se a solução ao banho ultrassônico por quinze minutos.

O fluxo e temperatura utilizados foram de 1,0 mL/min e 40°C, respectivamente. Para análise foram injetados 50 µL e o comprimento de onda em detector de fluorescência foram 485 nm de Excitação e 515 nm de Emissão.

Método para rifampicina

Empregou-se para separação coluna de marca Phenomenex®, modelo Synergil C18, de 150 mm de comprimento e 4,60 mm de diâmetro interno, contendo partículas de 4 µm.

A fase móvel foi constituída por mistura de tampão fosfato de potássio monobásico 20mM pH 4,0 e acetonitrila grau cromatográfico na proporção de 65:35 (v/v). Filtrou-se a solução em membrana de acetato de celulose, com 47 mm de diâmetro e poro de 0,22 µm. Para degaseificar, levou-se a solução ao banho ultrassônico por quinze minutos.

O fluxo e temperatura utilizados foram de 1,0 mL/min e 40°C, respectivamente. Para análise foram injetados 50 µL e o comprimento de onda empregado no detector DAD foi de 254 nm.

Parâmetros de validação do método para quantificação de lamivudina, zidovudina, fluoresceína e rifampicina em solução tampão de Hanks

A validação do método foi realizada por meio da determinação dos parâmetros de especificidade, recuperação, curva de calibração, limite de quantificação, precisão, exatidão e estabilidade conforme a Resolução 899 (Brasil, 2003).

Especificidade

A especificidade é definida como a capacidade do método em distinguir a substância analisada de todas as outras presentes na amostra (CAUSON,1997). Na análise de amostras provenientes dos estudos de permeabilidade, interferentes potenciais incluem componentes endógenos, metabólitos, produtos de decomposição, além dos adjuvantes como soro fetal ou muco simulado, quando utilizados.

Tal parâmetro foi investigado pela análise de três amostras de solução tampão de Hanks para os métodos da lamivudina, zidovudina e fluoresceína. Para o método da rifampicina, foram analisadas seis amostras de solução de Hanks. Estas soluções foram preparadas para avaliação das possíveis interferências dos adjuvantes empregados nos ensaios de permeabilidade. Em uma solução foi adicionado soro fetal bovino (concentração de 4%) e em outra adicionou-se mucina suína (concentração de 3%) e, na terceira solução, verapamil (10 µg/mL). Uma quarta solução foi preparada com todos os compostos foram adicionados conjuntamente. Desta forma, verificou-se a interferência de todos os componentes que foram adicionados nos compartimentos apical e basolateral na execução do experimento. Também foi avaliada a solução tampão de Hanks adicionada de ácido ascórbico na concentração de 0,1mg/mL.

O critério de aceitação da especificidade do método é que não podem surgir picos de nenhum contaminante no mesmo tempo de retenção dos analitos em análise.

Recuperação

A recuperação indica a eficiência do procedimento de purificação das amostras estabelecido para o método analítico e indica a quantidade do fármaco obtida após a amostra de plasma ser processada, ou seja, avalia se as condições empregadas no método são adequadas para purificar a amostra.

Assim, a recuperação corresponde ao resultado obtido após análise de amostra de plasma “branco” acrescida de padrão, submetida a pré-tratamento, sendo que o resultado é expresso como porcentagem do resultado obtido após análise de padrão puro, não submetido ao pré-tratamento (CAUSON, 1997).

Esse parâmetro foi determinado na validação dos métodos em questão, uma vez que não se realizou nenhum procedimento de extração com as amostras provenientes do experimento de permeabilidade, sendo realizada a injeção direta das amostras sem tratamento prévio.

Para a análise da fração do fármaco que ficou retida no interior da célula foi realizado o procedimento de extração por simples adição de metanol aos suportes porosos contendo a membrana de células, após o término do experimento de permeabilidade. Cada suporte poroso foi lavado com solução salina, sendo posteriormente mergulhado em Becker contendo 2 mL de metanol. Este conjunto foi então levado ao banho de ultrassom por 10 minutos. Passado este tempo, os suportes foram retirados do Becker e o metanol foi transferido para tubo de centrifuga. Procedeu-se, então, à centrifugação da amostra a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi recolhido em outro tubo de centrifuga e levado para evaporação em fluxo de nitrogênio. O resíduo foi ressuscitado em 50 μ L de etanol e, a seguir, foram adicionados 450 μ L de

solução tampão de Hanks. O tubo foi agitado em agitador tipo vórtex por 1 minuto e a solução resultante foi levada para injeção no cromatógrafo, realizando-se a sua quantificação.

Limite de quantificação inferior e limite de detecção

O limite de quantificação inferior deve representar a menor concentração que pode ser determinada com exatidão e precisão aceitáveis (Brasil, 2003). A exatidão deve estar entre $\pm 20\%$ do valor nominal da concentração, com coeficiente de variação de, no máximo, 20% (BRESSOLLE *et al.*, 1996).

Na determinação do LD do instrumento, foram feitas injeções em ordem decrescente de concentração até que o sinal cromatográfico atingisse uma área referente a três vezes o ruído da linha base, no tempo de retenção do pico de interesse. Para a determinação do LIQ, as injeções foram feitas até que a área do pico fosse dez vezes superior ao ruído da linha base no tempo de retenção do pico de interesse.

Linearidade

A linearidade indica a relação entre concentração de analito e resposta do método (BRESSOLLE *et al.*, 1996), representada, neste estudo, pela área do sinal cromatográfico.

A linearidade é obtida por meio da construção da curva de calibração, que representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito (BRASIL, 2003).

Na construção da curva de calibração utilizaram-se soluções dos fármacos dissolvidos na solução tampão de Hanks nas concentrações

descritas no Quadro 2 em sextuplicatas. Estabeleceu-se correlação linear entre concentração, considerada variável independente (x), e razão entre as áreas dos sinais cromatográficos do padrão e padrão interno, considerada variável dependente (y). Os parâmetros de correlação foram estimados empregando-se o método dos mínimos quadrados (BRASIL, 2003).

Juntamente com a curva de calibração, realizou-se a análise da amostra de “branco” constituída de solução tampão de Hanks contendo os adjuvantes utilizados nos experimentos de permeabilidade (soro fetal bovino e mucina suína) com a finalidade de garantir a ausência de picos interferentes (BRASIL, 2003).

Precisão

A precisão de um método analítico representa o grau de concordância dos resultados obtidos quando um procedimento analítico é aplicado repetidamente, sendo expressa como coeficiente de variação (CV %). A precisão intra-dia refere-se ao CV obtido por repetição do método com o mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento e os mesmos reagentes, em curto intervalo de tempo (no mesmo dia). A precisão inter-dias é obtida por meio de alteração de condições, como mudança de analista ou reagentes e utilização do método durante várias semanas ou meses (CAUSON, 1997).

Esse parâmetro foi determinado analisando-se amostras de controle de qualidade em três concentrações diferentes para cada fármaco e em seis réplicas no mesmo dia (precisão intra-dia) e em dois dias consecutivos (precisão inter-dias), e foi calculado segundo a equação a seguir:

$$CV(\%) = \frac{DP}{C_{média}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Em que:

CV(%) = coeficiente de variação em porcentagem

DP = desvio-padrão

Cmédia = concentração média determinada

Exatidão

A exatidão de métodos analíticos é uma medida de erro sistemático e é definida como concordância entre o valor determinado e o valor real (CAUSON, 1997).

O referido parâmetro foi determinado pela análise de amostras de controle de qualidade em três diferentes concentrações e em seis réplicas em um mesmo dia (exatidão intra-dia) e em dois dias diferentes (exatidão inter-dias), e foi calculado segundo a equação:

$$Exatidão = \frac{C_{média}}{C_{teórica}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Em que:

Cmédia = concentração média determinada

Cteórica = concentração teórica, nominal

Estabilidade

A determinação da estabilidade de um fármaco em uma matriz biológica depende de vários fatores, tais como propriedades químicas do fármaco, condições de armazenamento da amostra, tipo de matriz biológica e material de acondicionamento (UNITED STATES, 2001).

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

Assim, é importante que se determine a estabilidade das amostras em temperatura ambiente, em ciclos de congelamento e descongelamento.

Conforme recomendado pela Resolução no. 899 (BRASIL, 2003) foram determinadas as estabilidades descritas a seguir.

Estabilidade de curta duração

Foram utilizadas três amostras de padrão de controle de qualidade em três concentrações (baixa, média e alta), submetidas a descongelamento natural e mantidas à temperatura ambiente durante 4 horas. Os resultados foram comparados com amostras recém preparadas e imediatamente analisadas.

Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento

Foram utilizadas três amostras de solução padrão de controle de qualidade em três concentrações (baixa, média e alta), submetidas às seguintes condições: congelamento a -20°C por, no mínimo, 48 horas, seguida de descongelamento. A concentração do fármaco nas amostras de padrão de controle de qualidade foi determinada após seu descongelamento e comparada aos resultados de amostras recém preparadas.

Cultivo de células Caco-2

As células Caco-2 foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC; Rockville, MD, USA) e cultivadas em meio DMEM com alta concentração de glicose (4,5 g/L) suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 1% de solução de aminoácidos não essenciais, 1% de solução de Glutamina 200 mM e antimicrobianos (penicilina 100UI/mL e estreptomicina 100µg/mL). As células foram utilizadas entre os repiques de passagem 20 a 60. O banco celular foi mantido em cultivo em garrafas de 75cm², sendo que o meio foi substituído a cada dois dias. O subcultivo foi realizado quando a cultura atingia, no mínimo, 80% de cobertura da garrafa, cerca de 3 a 4 dias, da seguinte maneira: o meio de cultivo foi aspirado e descartado, as células que formavam a membrana aderida à parede da garrafa foram isoladas com utilização de 2 mL de solução de Tripsina (0,25%) e EDTA (1mM) e incubadas a 37°C por 5 minutos. As células foram, então, ressuspensas em meio DMEM e divididas na proporção 1:4 em novas garrafas contendo 20 mL do meio DMEM. Para os experimentos de permeabilidade, as células foram transferidas para placas Transwell® contendo seis ou doze poços com suporte de policarbonato de 0,4 µm de poro, e área de 4,72 ou 1,12 cm², respectivamente, numa densidade de 5x10⁴ cel/cm². As culturas foram mantidas em incubadora sob temperatura de 37° C, atmosfera constituída de 5% de CO₂ e 90% de umidade relativa.

Monitoramento da integridade de membrana de células Caco-2

As membranas formadas com as células em cultivo sobre as placas do experimento de permeabilidade foram monitoradas quanto ao valor da resistividade elétrica utilizando o minivoltímetro Millicell ERS® - Millipore. A determinação do valor da resistência elétrica transepitelial ($\Omega \times \text{cm}^2$) foi realizada aos 10, 15 e 21 dias de cultivo e aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180

minutos durante a realização do experimento de permeabilidade. Os meios utilizados apresentaram valores de pH de 5,8; 6,8 e 7,4.

Determinação da viabilidade das células Caco-2 em presença da rifampicina pelo ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazoli)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT)

O método originalmente descrito por Mosmann (1983) baseia-se na conversão do sal tetrazólio (MTT) para o produto colorido formazan, cuja concentração pode ser determinada espectrofotometricamente. Essa conversão ocorre principalmente em mitocôndrias intactas e, portanto, células viáveis (HANSEN *et al.*, 1989).

As células Caco-2 foram semeadas com meio DMEM em microplacas com 96 poços, na densidade de 2×10^4 células/poço, incubadas por 24h a 37°C com 5% de CO₂ e 90% de umidade. Após 24h, o meio de cultura foi retirado, e foram adicionados 100 µL de meio DMEM sem fenol contendo a rifampicina nas concentrações 10, 25 e 50µg/mL (em sextuplicatas). Também foram adicionados meio DMEM contendo dimetilsulfóxido (DMSO) a 50% (controle positivo) e meio contendo DMEM puro (controle negativo). A placa foi incubada a 37°C por 24h. Após este tempo, as soluções dos poços foram retiradas por aspiração e foram adicionados 30 µL da solução MTT (solução 5 mg/mL diluída no próprio de DMEM sem fenol). Após 2h de incubação a 37°C foram adicionados 70 µL da solução de solubilização de MTT (10% de Triton X-100 plus e 0,1 N HCl em isopropanol anidro). A placa foi então levada ao agitador orbital, com agitação de 100rpm por 15 minutos para favorecer a solubilização dos cristais de formazan. Após a solubilização foram determinadas as absorvâncias em espectrofotômetro em comprimento de onda de 570 nm e 690 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de sobrevivência relativa das células ao grupo controle negativo.

Realização dos experimentos de permeabilidade

Previamente ao estudo de permeabilidade, as células foram lavadas com tampão Hank's contendo 200 mM de sais de HEPES (tampão de permeabilidade) com pH ajustado para 7,4. As células foram mantidas com este tampão por 20 minutos a 37°C. A resistência elétrica transepitelial (RET) foi medida em cada membrana. Foram consideradas aptas para o início do experimento as membranas que apresentaram valor de RET acima de 350 mΩ x cm².

Os experimentos foram iniciados com a adição de solução dos fármacos em tampão de permeabilidade na concentração de 10 µg/mL para a fluoresceína, lamivudina e zidovudina com pH 7,4 e 5 µg/mL para a rifampicina com o pH 5,8; 6,8 e 7,4 nos compartimentos apicais das placas Transwell®, sendo que o pH do compartimento basolateral foi mantido a 7,4. As placas foram mantidas sob agitação em agitador orbital a 37°C (25 rpm). Foram realizadas as coletas de 200 µL das amostras a partir do compartimento basolateral ou apical, dependendo do sentido do transporte que se pretendia avaliar aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos. Após cada amostragem, procedeu-se à reposição de 200 µL de tampão de permeabilidade fresco, mantido a 37°C, com a finalidade de manutenção do volume do meio no compartimento. Às amostras de rifampicina foram adicionados 25 µL solução de ácido ascórbico 0,9 mg/mL para evitar a oxidação deste fármaco.

Na avaliação da influência de muco simulado na permeabilidade da rifampicina foi utilizado o tampão de permeabilidade adicionado de mucina natural extraída de estômago suíno (Sigma®) na concentração de 3,0%.

A avaliação da influência de soro fetal bovino na permeabilidade da rifampicina foi realizada pela adição deste suplemento em concentração de 4% na solução tampão do compartimento basolateral para realização do experimento.

A influência do verapamil nos experimentos de permeabilidade foi realizada pela adição de solução deste fármaco no compartimento apical na concentração de 10µg/mL em tampão Hanks.

Os valores de Permeabilidade Aparente (P_{app}) em cm/s foram determinados segundo a equação 4:

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

Equação 4

Em que:

P_{app} = Permeabilidade Aparente

VR = Volume do compartimento receptor (basolateral) em cm³

A = Área do suporte permeável de cultivo celular

C_0 = Concentração inicial adicionada no compartimento doador (apical)

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

Indução da expressão da P-gp em células Caco-2 pela rifampicina

A possível indução da expressão da Pgp pela rifampicina nas células Caco-2 foi conduzido pela realização do cultivo das células na presença de rifampicina.

Foi preparado meio DMEM contendo rifampicina na concentração de 10µg/mL. Este meio foi utilizado nas células Caco-2 do 11° ao 21° dias de cultivo, mantendo-se todas as outras condições. As células foram mantidas em garrafas de cultivo celular de 75 cm². Garrafas tratadas e não tratadas (controle) foram preparadas em triplicata para a realização da determinação da expressão gênica da Pgp por PCR- RT .

Isolamento e avaliação do RNA total de células Caco-2

O RNA das células Caco-2 foi extraído a partir de uma suspensão de células contendo entre 5 a 10 x 10⁶ células/mL, lisadas utilizando-se 1 mL do reagente TRIZOL^R (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad/CA, EUA). Em resumo, 200 µL de clorofórmio foram adicionados aos lisados e os extratos foram homogeneizados e centrifugados a 12.000 g por 15 min., a 4°C. O RNA total presente na fase aquosa, foi precipitado com isopropanol gelado, centrifugado a 10.000 g por 10 min., a 4°C, e lavado com etanol a 75% (v/v). Posteriormente, o RNA foi evaporado até *secura* à temperatura ambiente e diluído em 100 µL de água esterilizada tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e armazenado a -70°C para posterior análise.

O rendimento do RNA total foi avaliado por espectrofotometria no ultravioleta (UV) (Sambrook *et al.*, 2001) utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop[®] (NanoDrop Technologies INC., Wilmington, DE, EUA) e o grau de pureza do RNA determinado pela relação A260nm/A280nm (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Análise da expressão gênica por RT-PCR em tempo real

A expressão do RNAm dos genes MDR1 nas células Caco-2 foi realizada por reação de transcrição reversa seguida de amplificação por PCR em tempo real.

O cDNA foi gerado a partir de 1 µg do RNA extraído, utilizando-se 200 ng de iniciadores aleatórios (*random primers*) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), DTT 10 mmol/L (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), 500 µmol/L dNTPs (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP), 200 U de transcriptase reversa (RT) (SuperScript™ II RT RNase H-) e tampão de RT [Tris-HCl 250 mM (pH 8,3), KCl 375 mM, MgCl₂ 15mM] (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA). O ensaio de RT foi realizado em termociclador PTC-200 (MJ Research Inc., Waltham, MA, EUA) com as seguintes etapas: 25°C por 10min, 42°C por 50min e 70°C por 15min. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até a realização da análise por PCR.

A medida quantitativa da expressão do RNAm dos genes estudados foi realizada por RT-PCR em tempo real utilizando o sistema de amplificação *TaqMan® RT-PCR* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O sinal de fluorescência emitido pelo fluoróforo da sonda *TaqMan®* foi detectado em tempo real no equipamento ABI Prism 7500 FAST (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A análise da expressão gênica foi realizada por método de quantificação relativa. Com a finalidade de escolher o gene endógeno mais adequado para o modelo, vários genes foram testados e analisados empregando-se o programa geNorm (VANDESOMPELE *et al.*, 2002).

Os iniciadores e as sondas marcadas com fluoróforo foram fornecidos em solução 20 vezes concentrada pelo “*Assay by design*” e/ou “*Assay on demand*” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As análises de quantificação relativa da expressão de RNAm dos genes estudados foram realizadas utilizando-se o método do ΔCt , com base na fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (LIVAK *et al.*, 2001). Previamente, foram calculadas as eficiências de todos os ensaios, sendo considerados adequados valores de slope próximos a -3,3 com eficiência entre 90% e 110%, para a validação do método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (LIVAK *et al.*, 2001).

Com a finalidade de monitorar a precisão dos resultados das reações de amplificação realizadas por RT-PCR, as amostras foram analisadas em triplicata. Foram realizados controles dos reagentes em cada conjunto de reações para avaliar possíveis contaminações.

Efeito da indução da expressão da Pgp em células Caco-2 na permeabilidade da rifampicina

O efeito da indução da expressão da Pgp nas células Caco-2 pela rifampicina foi estudado também pela avaliação da permeabilidade da própria rifampicina nos experimentos de permeabilidade.

O mesmo meio DMEM contendo rifampicina (10µg/mL) descrito no item 3.2.9 foi utilizado para cultivo das células Caco-2 do 11° ao 21° dia de cultivo sobre suporte de membranas das placas Transwell®.

Com essas placas foram conduzidos os experimentos de permeabilidade da rifampicina nos sentidos apical – basolateral e basolateral – apical. Paralelamente, foram realizados os mesmos experimentos com adição de verapamil a 10µg/mL no meio de Hanks puro. Verapamil é um inibidor da atividade da Pgp.

A determinação da Papp da rifampicina foi realizada conforme apresentado no item 4.2.8.

Análise Estatística

Os resultados obtidos foram avaliados por meio do teste t pareado e da análise da variância (ANOVA) de um único ou múltiplos fatores utilizando o software Minitab v. 15.0. Os valores foram expressos como média ± desvio

padrão, representados por barras de dispersão nas figuras. O nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

Na determinação da linearidade dos métodos de quantificação foi adotado o método dos mínimos quadrados para determinação da correlação.

5- RESULTADOS

5.1 Validação de métodos analíticos

Especificidade

Os métodos desenvolvidos demonstraram ser específicos para os analitos em estudo, não ocorrendo interferências perceptíveis em relação aos picos da lamivudina, zidovudina e rifampicina nos tempos de retenção obtidos (18,6 min para a lamivudina; 7,9 min para a zidovudina; 7,8 min para a rifampicina e 10,0 min para a fluoresceína).

As figuras 5, 6, 7 e 8 representam os cromatogramas de injeções de soluções branco, lamivudina, zidovudina, rifampicina e fluoresceína, respectivamente.

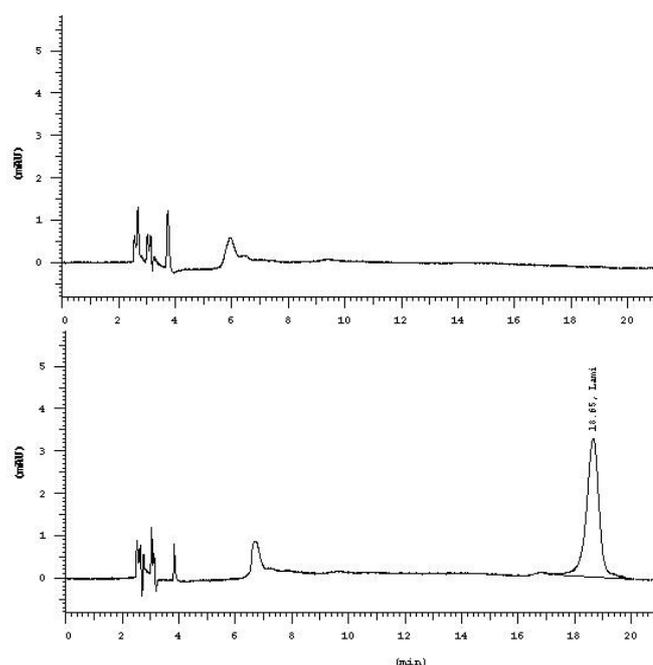


Figura 5. Cromatogramas de injeções de solução branco (solução tampão de Hanks) e de solução de lamivudina 100 ng/mL em solução tampão de Hanks no pH 7,4.

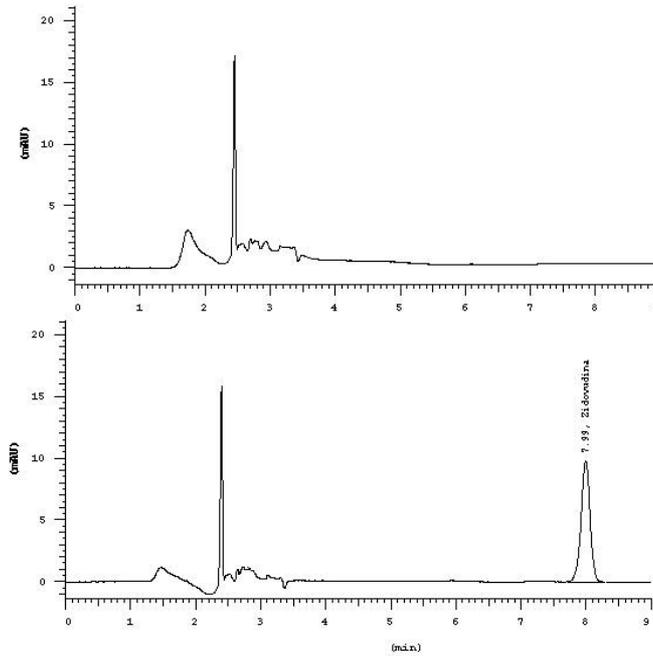


Figura 6. Cromatogramas de injeções de solução branco (solução tampão de Hanks) e de solução de zidovudina 100 ng/mL em solução tampão de Hanks no pH 7,4.

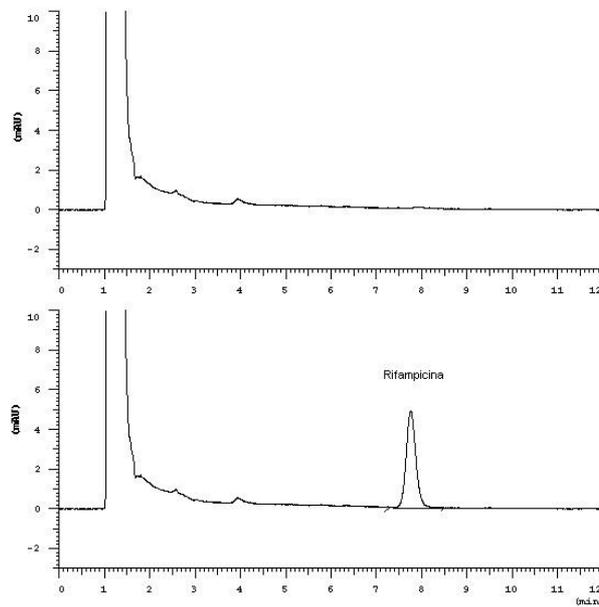


Figura 7. Cromatogramas de injeções de solução branco (solução tampão de Hanks adicionada de soro fetal bovino, mucina e verapamil) e de solução de rifampicina 500 ng/mL em solução tampão de Hanks no pH 7,4.

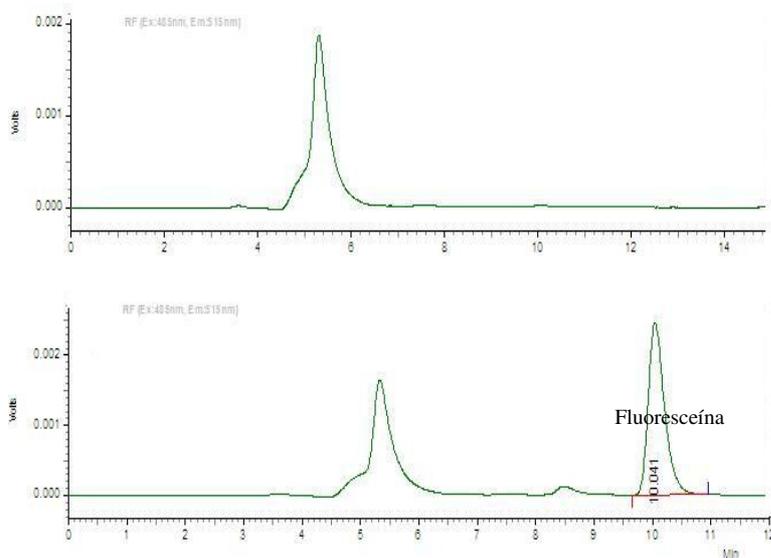


Figura 8. Cromatogramas de injeções de solução branco (solução tampão de Hanks solução tampão de Hanks) e de solução de fluoresceína 50 ng/mL em solução tampão de Hanks no pH 7,4.

Linearidade

A linearidade foi avaliada pela injeção em sextuplicata de soluções padrão dos fármacos lamivudina, zidovudina e rifampicina em solução de Hanks nas concentrações de 25, 50, 75, 100, 150, 250, 500, 800 e 1000 ng/mL e para a fluoresceína no mesmo meio, nas concentrações de 2, 5, 25, 50, 100, 250 e 500 ng/mL.

As curvas que representam a linearidade para os métodos validados estão representadas nas figuras 9, 10, 11 e 12 correspondendo aos fármacos lamivudina, zidovudina, rifampicina e fluoresceína, respectivamente. Os parâmetros relacionados à linearidade (coeficientes angular, linear e de determinação) estão apresentados nas tabelas 2 a 5 para os fármacos citados.

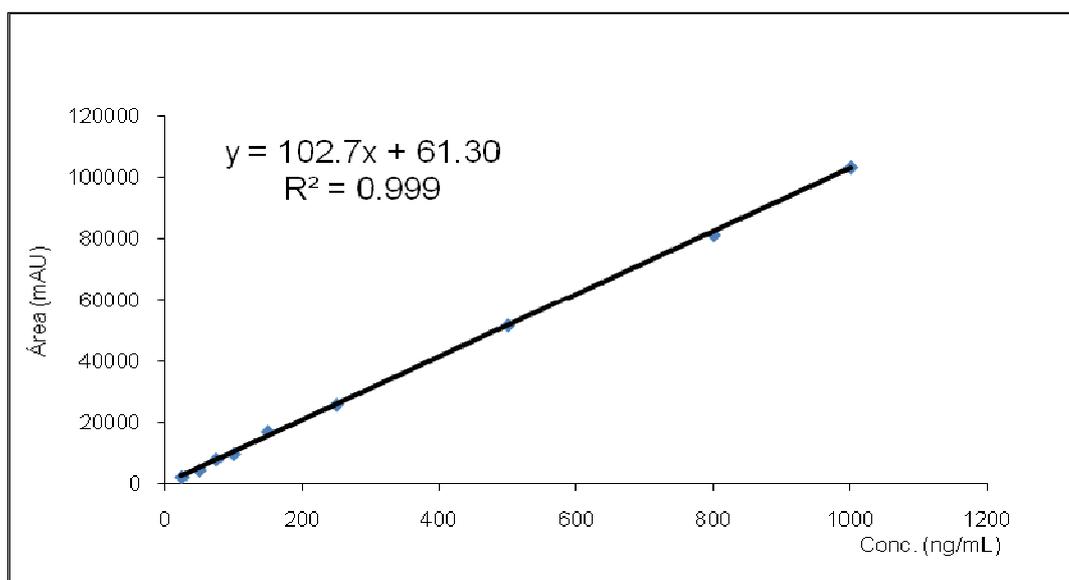


Figura 9. Curva de calibração referente ao método analítico desenvolvido para quantificação da lamivudina em solução proveniente de estudo de permeabilidade empregando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV). Cada ponto representa a média de três determinações.

Tabela 2. Parâmetros relativos à curva de calibração do método analítico desenvolvido para quantificação de lamivudina em solução proveniente de estudo de permeabilidade empregando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV).

Parâmetro	Valor
Coeficiente angular (a)	102,79
Coeficiente linear (b)	61,30
Coeficiente de determinação (r^2)	0,9996

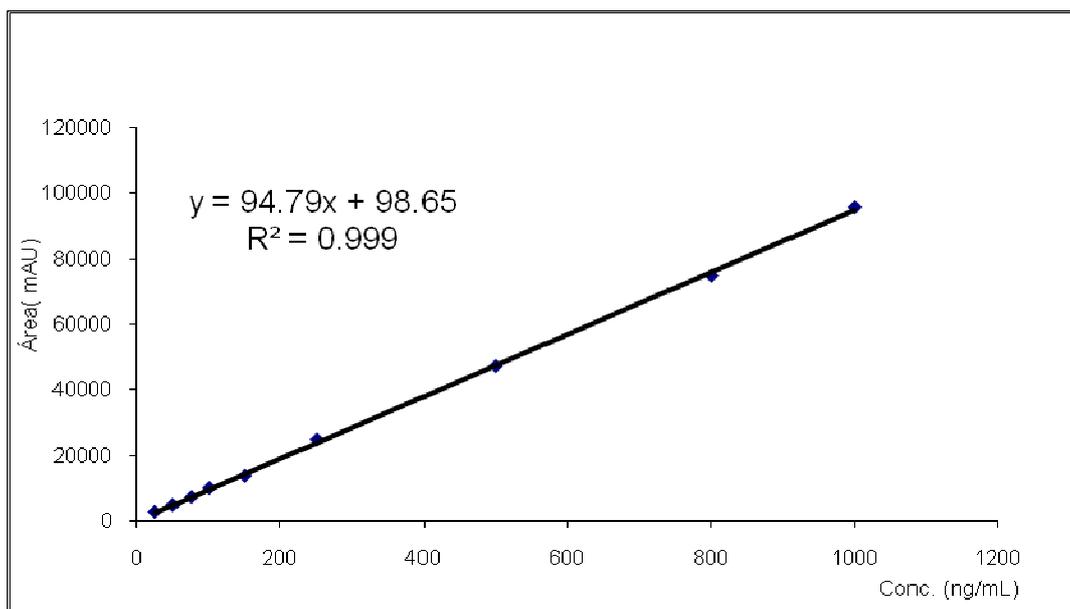


Figura 10. Curva de calibração referente ao método analítico desenvolvido para quantificação da zidovudina em solução proveniente de estudo de permeabilidade empregando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV).

Tabela 3. Parâmetros relativos à curva de calibração do método analítico desenvolvido para quantificação de zidovudina em solução proveniente de estudo de permeabilidade empregando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV).

Parâmetro	Valor
Coeficiente angular (a)	94,79
Coeficiente linear (b)	98,65
Coeficiente de determinação (r^2)	0,9996

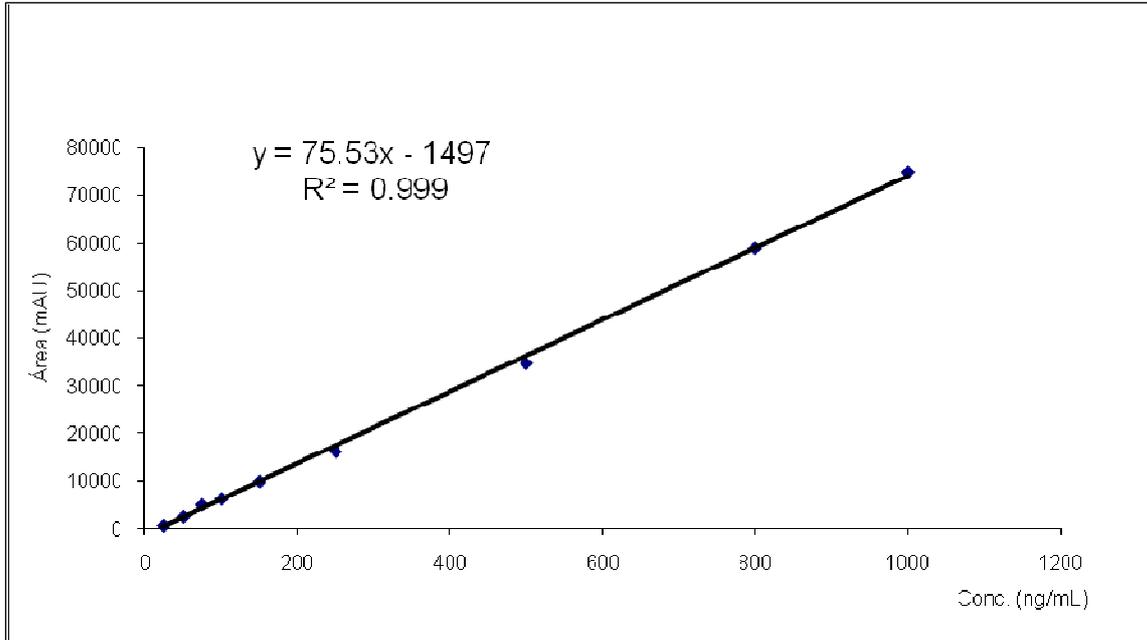


Figura 11. Curva de calibração referente ao método analítico desenvolvido para quantificação da rifampicina em solução proveniente de estudo de permeabilidade empregando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV).

Tabela 4. Parâmetros relativos à curva de calibração do método analítico desenvolvido para quantificação de rifampicina em solução proveniente de estudo de permeabilidade empregando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV).

Parâmetro	Valor
Coeficiente angular (a)	75,53
Coeficiente linear (b)	1497,50
Coeficiente de correlação (r^2)	0,9991

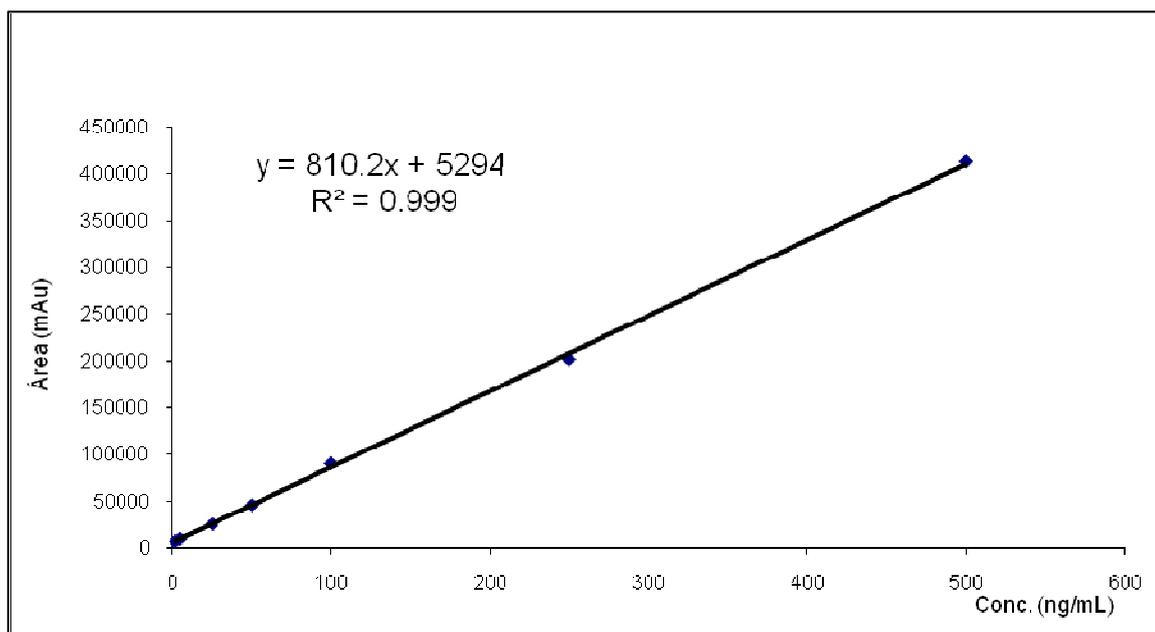


Figura 12. Curva de calibração referente ao método analítico desenvolvido para quantificação da fluoresceína em solução proveniente de estudo de permeabilidade empregando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-FL).

Tabela 5. Parâmetros relativos à curva de calibração do método analítico desenvolvido para quantificação de fluoresceína em solução proveniente de estudo de permeabilidade empregando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-FL).

Parâmetro	Valor
Coeficiente angular (a)	810,27
Coeficiente linear (b)	5294,60
Coeficiente de determinação (r^2)	0,9995

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

Os limites de detecção e DE quantificação inferior determinados neste estudo estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Limites de detecção e quantificação inferior obtidos na validação dos métodos para quantificação de lamivudina, zidovudina e rifampicina e fluoresceína empregando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Fármaco	LD	LQ	Precisão de LQ	Exatidão de LQ
			CV (%)	(%)
Lamivudina	5ng/mL	25 ng/mL	6,81%	92,7%
Zidovudina	5ng/mL	25ng/mL	3,7%	102,4%
Rifampicina	10ng/mL	25ng/mL	4,2%	103,8%
Fluoresceína	0,5 ng/mL	2 ng/mL	5,7%	103,7%

Precisão e exatidão

A precisão e exatidão foram avaliadas em dois níveis: intra-dia e inter-dias (2 dias consecutivos).

Os resultados para precisão e exatidão estão apresentados nas tabelas 7, 8, 9 e 10 para os fármacos lamivudina, zidovudina, rifampicina e fluoresceína, respectivamente.

Tabela 7. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de 3 concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para a lamivudina utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV).

Concentração ng/mL	Precisão CV (%)		Exatidão (%)	
	Intra-dia	Inter-dias	Intra-dia	Inter-dias
	(n=3)	(n=6)	(n=3)	(n=6)
75	3,62	5,80	104,12	99,87
400	0,79	3,78	101,83	98,21
800	1,38	2,98	98,51	101,23

Tabela 8. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de 3 concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para a zidovudina utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV).

Concentração ng/mL	Precisão CV (%)		Exatidão (%)	
	Intra-dia	Inter-dias	Intra-dia	Inter-dias
	(n=3)	(n=6)	(n=3)	(n=6)
75	1,80	3,52	101,93	97,12
375	0,84	3,12	102,38	101,44
800	0,59	1,25	98,22	96,32

Tabela 9. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de 3 concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para a rifampicina utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV).

Concentração (ng/mL)	Precisão CV (%)		Exatidão (%)	
	Intra-dia	Inter-dias	Intra-dia	Inter-dias
	(n=3)	(n=6)	(n=3)	(n=6)
75	4,81	6,98	97,44	101,37
375	1,21	2,95	96,12	98,57
800	0,41	1,59	100,85	102,05

Tabela 10. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de 3 concentrações diferentes em um mesmo dia (intra dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para a fluoresceína utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV).

Concentração (ng/mL)	Precisão (%)		Exatidão (%)	
	Intra-dia	Inter-dias	Intra-dia	Inter-dias
	(n=3)	(n=6)	(n=3)	(n=6)
25	5,52	6,11	96,44	100,37
200	2,76	3,95	97,40	97,76
400	1,42	1,13	100,34	101,78

Estabilidade

Estabilidade de curta duração

Os resultados da avaliação da estabilidade de curta duração das amostras de controle padrão (CQB, CQM e CQA) em solução de Hanks mantidas a temperatura ambiente por 6 horas estão apresentados nas tabelas 11, 12, 13 e 14 para os fármacos lamivudina, zidovudina, rifampicina e fluoresceína, respectivamente.

Tabela 11. Estabilidade da lamivudina em solução tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente. Resultados representam a média de três determinações.

Concentração (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras em temp. ambiente por 6 horas			
	Conc deter.	Precisão CV%	Exatidão %	Conc. Deter.	Precisão CV %	Exatidão %	Desvio
75	78,90	5,10	105,20	75,52	3,89	100,69	-4,28
400	404,14	2,89	101,04	397,06	3,23	99,27	-1,75
800	792,81	2,56	99,10	801,78	2,15	100,22	1,13

Desvio = desvio em relação à amostra recém preparada.

Tabela 12. Estabilidade da zidovudina em solução tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente. Resultados representam a média de três determinações.

Concentração (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras em temp. ambiente por 6 horas			
	Conc	Precisão	Exatidão	Conc.	Precisão	Exatidão	Desvio
	deter.	CV%	%	Deter.	CV %	%	
75	76,93	4,21	102,57	75,87	4,76	101,16	-1,38
375	369,21	3,71	98,46	371,98	2,98	99,19	0,75
800	803,43	2,37	100,43	804,42	1,85	100,55	0,12

Desvio = desvio em relação à amostra recém preparada.

Tabela 13. Estabilidade da rifampicina em solução tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente. Resultados representam a média de três determinações.

Concentração (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras em temp. ambiente por 6 horas			
	Conc	Precisão	Exatidão	Conc.	Precisão	Exatidão	Desvio
	deter.	CV%	%	Deter.	CV %	%	
75	76,21	6,06	101,61	73,23	5,21	97,64	-3,91
375	371,12	4,59	98,97	368,06	3,53	98,15	-0,82
800	806,81	3,72	100,85	791,78	3,62	98,97	-1,86

Desvio = desvio em relação à amostra recém preparada.

Tabela 14. Estabilidade da fluoresceína em solução tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente. Resultados representam a média de três determinações.

Concentração (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras em temp. ambiente por 6 horas			
	Conc	Precisão	Exatidão	Conc.	Precisão	Exatidão	Desvio
	deter.	CV%	%	Deter.	CV %	%	
25	24,87	4,03	99,48	24.01	5,30	96,04	-3,44
200	208,12	3,97	104,10	197,20	3,43	98,60	-5,46
400	411,81	2,78	103,00	389.98	3,21	97,50	-5,47

Desvio = desvio em relação à amostra recém preparada.

Estabilidade em um ciclo de congelamento/descongelamento

Os resultados sobre a avaliação da estabilidade das amostras de controle de qualidade após um ciclo de congelamento e descongelamento foram obtidos pela comparação dos resultados das soluções congeladas a -20°C por 48 horas estão apresentados nas tabelas 15, 16, 17 e 18.

Tabela 15. Estabilidade da lamivudina em solução tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20°C e descongeladas. Resultados representam a média de três determinações.

Concentração (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras congeladas por 48 horas a -20°C			
	Conc. deter.	Precisão CV%	Exatidão %	Conc. Deter.	Precisão CV %	Exatidão %	Desvio
75	78,90	5,10	105,20	74,65	4,67	99,53	-5,39
400	404,14	2,89	101,04	395,87	2,75	98,97	-2,05
800	792,81	2,56	99,10	794,32	3,12	99,29	0,19

Desvio = desvio em relação à amostra recém preparada.

Tabela 16. Estabilidade da zidovudina em solução tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20°C e descongeladas. Resultados representam a média de três determinações.

Concentração (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras congeladas por 48 horas a -20°C			
	Conc. deter.	Precisão CV%	Exatidão %	Conc. Deter.	Precisão CV %	Exatidão %	Desvio
75	76,93	4,21	102,57	74,39	4,24	99,19	-3,30
375	369,21	3,71	98,46	378,43	3,65	100,91	2,50
800	803,43	2,37	100,43	799,67	2,67	99,96	-0,47

Desvio = desvio em relação à amostra recém preparada.

Tabela 17. Estabilidade da rifampicina em solução tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20°C e descongeladas. Resultados representam a média de três determinações.

Concentração (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras congeladas por 48 horas a -20°C			
	Conc	Precisão	Exatidão	Conc.	Precisão	Exatidão	Desvio
	deter.	CV%	%	Deter.	CV %	%	
75	76,21	6,06	101,61	73,48	5,26	97,97	-3,58
375	371,12	4,59	98,97	370,37	4,87	98,77	-0,20
800	806,81	3,72	100,85	793,87	1,36	99,23	-1,60

Desvio = desvio em relação à amostra recém preparada.

Tabela 18. Estabilidade da fluoresceína em solução tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20°C e descongeladas. Resultados representam a média de três determinações.

Concentração (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras congeladas por 48 horas a -20°C			
	Conc	Precisão	Exatidão	Conc.	Precisão	Exatidão	Desvio
	deter.	CV%	%	Deter.	CV %	%	
25	24,87	4,03	99,48	23,89	6,24	96,56	-3,92
200	208,12	3,97	104,10	195,45	3,89	97,73	-6,33
400	411,81	2,78	103,00	387,89	4,67	96,97	-5,98

Desvio = desvio em relação à amostra recém preparada.

5.2 Avaliação da integridade de membranas de células Caco-2 por meio da resistência elétrica transepitelial (RET)

A integridade das membranas formadas pelas células Caco-2 cultivadas no suporte de realização dos estudos de permeabilidade foi avaliada por meio da determinação dos valores RET. Foram utilizados eletrodos que foram colocados na câmara apical e na câmara basolateral.

Os resultados de RET obtidos aos 10, 15 e 21 dias de cultivo das células nas placas de permeabilidade com meio DMEM em pH 7,4 e os resultados da avaliação nos tempos de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos (no decurso de um experimento), utilizando o tampão Hanks de permeabilidade com pH ajustado para pH 5,8; 6,8 e 7,4 estão apresentados nas figuras 13 e 14, respectivamente.

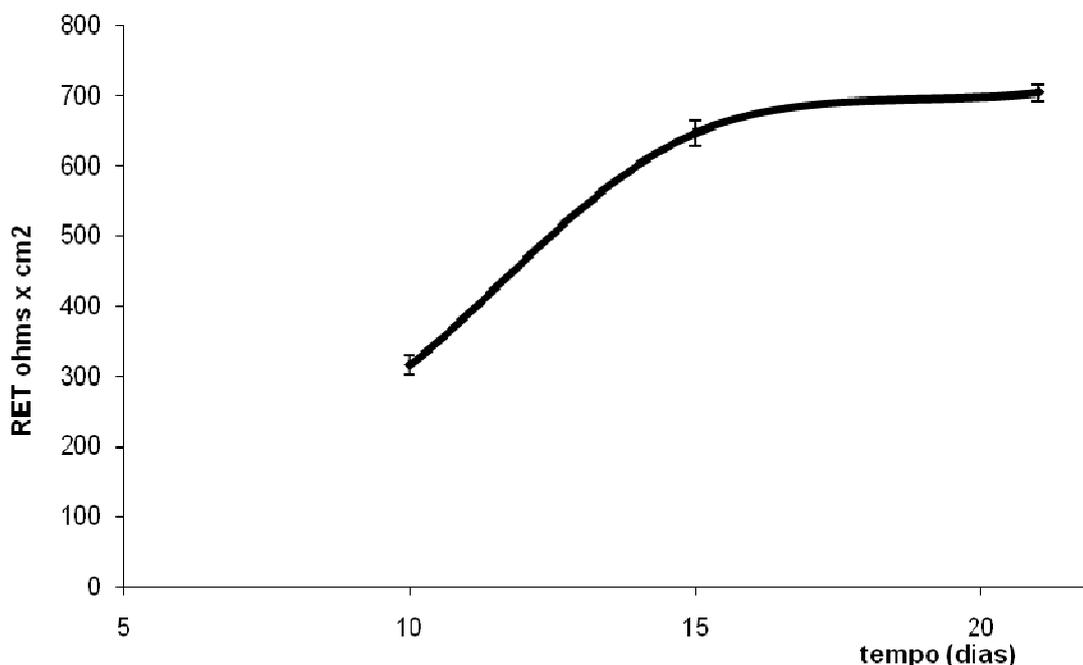


Figura 13. Valores de resistência elétrica transepitelial (RET) obtidos com as membranas de células Caco-2 aos 10,15 e 21 dias de cultivo em meio pH 7,4. Média de seis determinações – barras indicam desvio padrão.

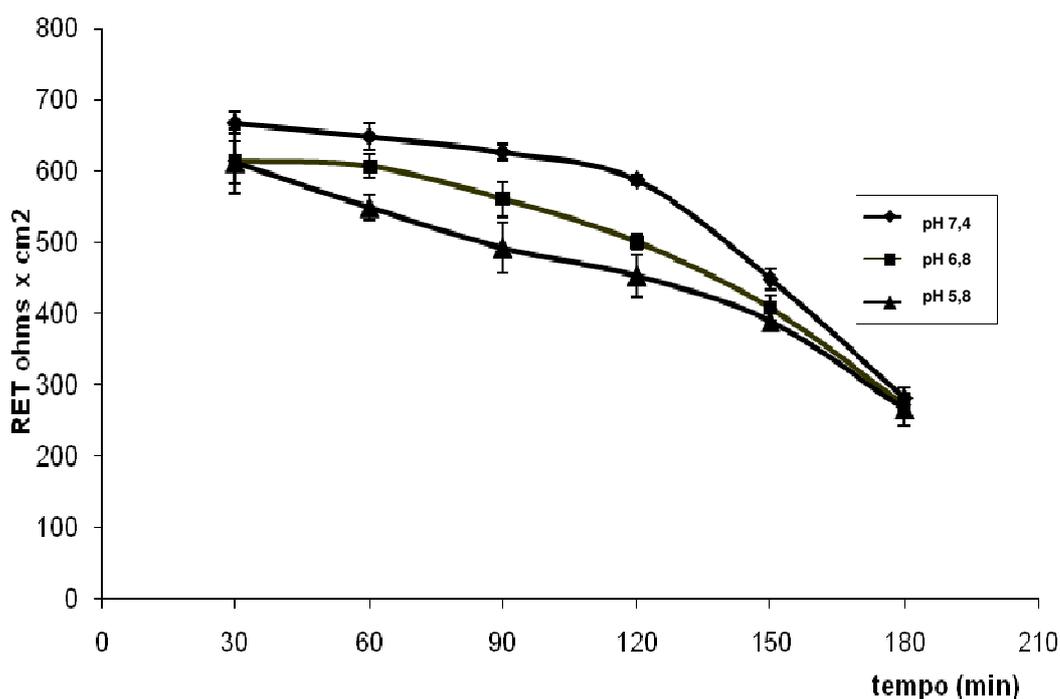


Figura 14. Variação de resistência elétrica transepitelial (RET) obtidos com as membranas de células Caco-2 em 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos nas condições dos experimentos de permeabilidade. Média de três determinações – barras indicam desvio padrão.

Os valores de RET obtidos (em $\Omega \times \text{cm}^2$) variaram de 668 para 282 nas membranas incubadas com o meio pH 7,4; de 614 para 273 nas membranas incubadas com meio pH 6,8 e de 612 para 266 no pH 5,8. Apesar da redução dos valores de RET obtidas, estes não atingiram valores inferiores a $200 \Omega \times \text{cm}^2$.

5.3 Permeabilidade dos fármacos fluoresceína, lamivudina e zidovudina através das células Caco-2

Os valores de permeabilidade aparente (P_{app}) da fluoresceína, lamivudina e zidovudina foram determinados a partir da fração permeada no sentido apical - basolateral empregando membranas de células Caco-2.

Nas figuras 15, 16 e 17 estão representados os gráficos da fração permeada da fluoresceína, lamivudina e zidovudina em função do tempo, respectivamente, através das membranas de células Caco-2 mantidas em cultivo por 21 dias.

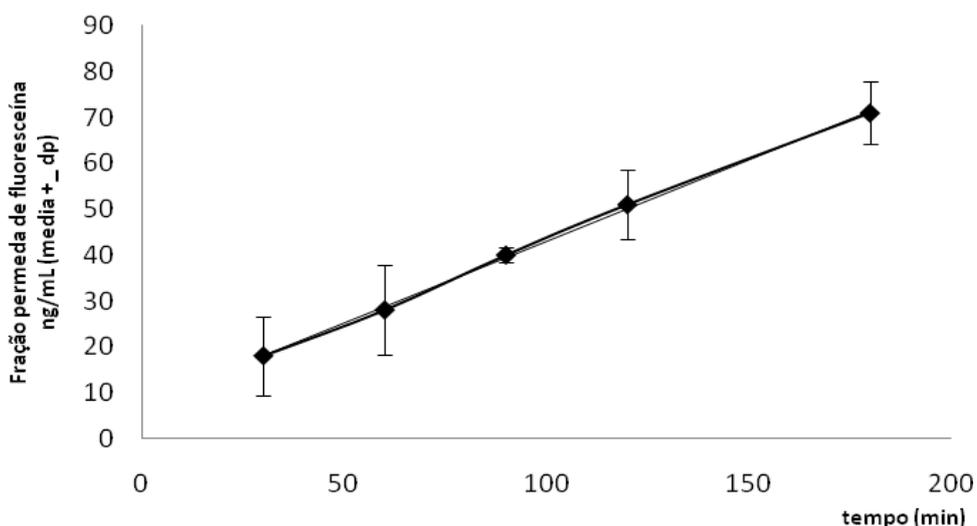


Figura 15. Fração permeada de fluoresceína (em ng/mL) através das membranas de célula Caco-2 em função do tempo. Média de três determinações.

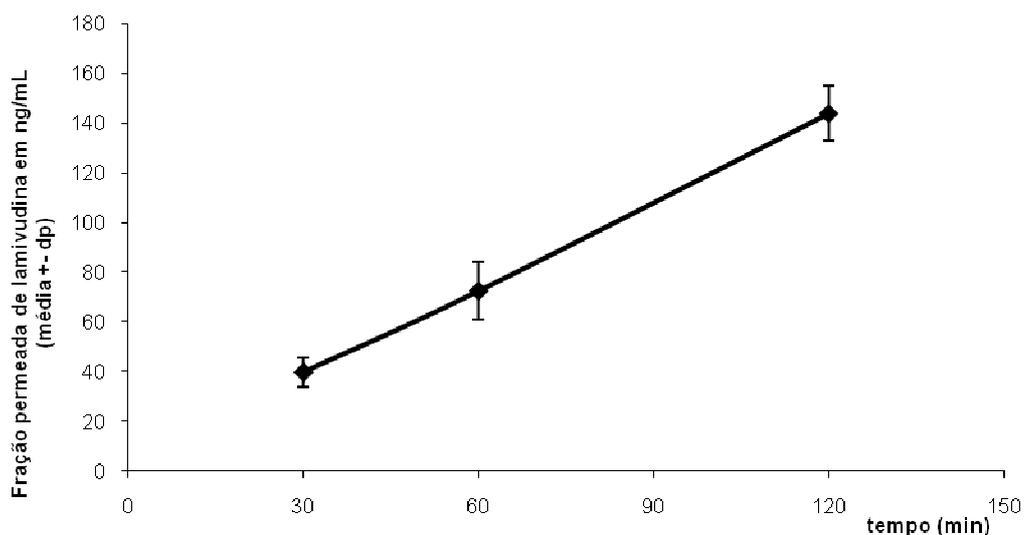


Figura 16. Fração permeada de lamivudina (em ng/mL) através das membranas de célula Caco-2 em função do tempo. Média de três determinações.

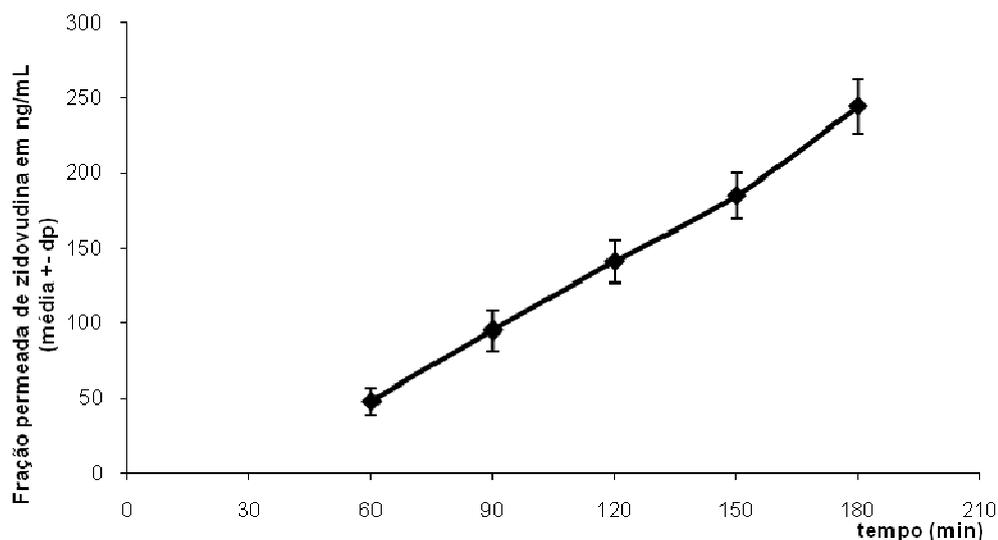


Figura 17. Fração permeada de zidovudina (em ng/mL) através das membranas de célula Caco-2 em função do tempo. Média de três determinações.

A partir dos dados da fração permeada foram obtidos os seguintes valores de P_{app} :

$$P_{app} \text{ fluoresceína} = 0,65 \pm 0,03 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$$

$$P_{app} \text{ lamivudina} = 10,31 \pm 0,86 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$$

$$P_{app} \text{ zidovudina} = 12,64 \pm 1,72 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$$

5.4 Ensaio de citotoxicidade da rifampicina em células Caco-2

Os resultados da citotoxicidade das células Caco-2 incubadas com rifampicina (25µg/mL) por 24 horas estão apresentados em % de viabilidade celular comparadas ao controle negativo e positivo pela técnica do MTT conforme Figura 18.

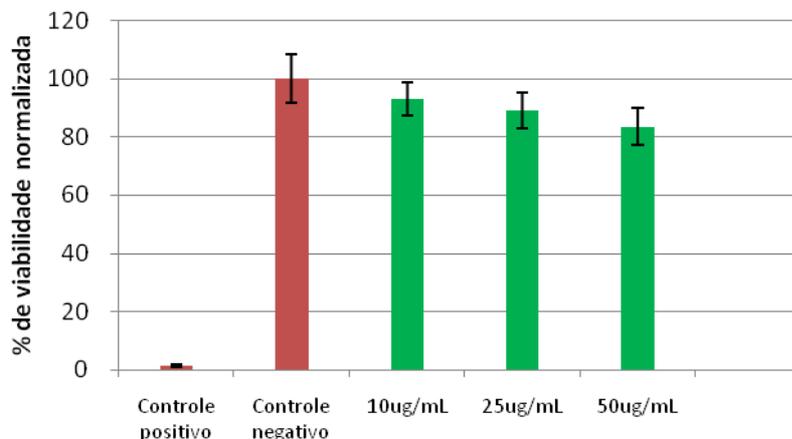


Figura 18. Viabilidade de células Caco-2 incubadas com rifampicina por 6 horas avaliada pela técnica do MTT.

As células Caco-2 apresentaram viabilidade celular superior a 70% em todas as concentrações avaliadas.

5.5 Permeabilidade da rifampicina através das monocamadas de células Caco-2

Influência da concentração da rifampicina nos dados de *Papp*

Os estudos de permeabilidade da rifampicina foram conduzidos com amostras do polimorfo II.

Para se estabelecer as concentrações de rifampicina a serem empregadas nos experimentos de permeabilidade foram avaliadas três concentrações diferentes (5,0; 10,0; 25,0; $\mu\text{g/mL}$) em experimentos piloto.

Os experimentos foram conduzidos mantendo-se o valor do pH em 7,4 em ambos os compartimentos, apical e basolateral.

Na Figura 19 estão representados os gráficos da fração permeada da rifampicina (nas três concentrações de estudadas) através das membranas de células Caco-2 mantidas em cultivo por 21 dias.

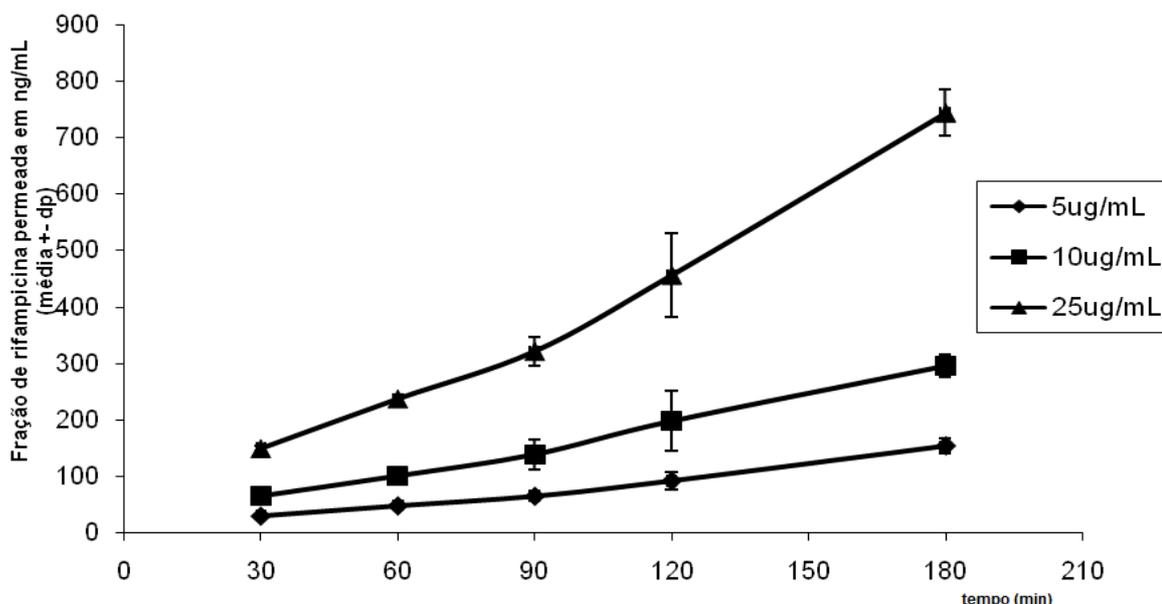


Figura 19. Fração permeada de rifampicina (em ng/mL) através das monocamadas de células Caco-2 em função do tempo nas concentrações de 5,0; 1,0 e 25,0 µg/mL em tampão Hanks com pH 7,4. Média de três determinações.

A partir da fração permeada foram obtidos os valores de P_{app} apresentados na Tabela 19 e Figura 20.

Tabela 19. Resultados de permeabilidade aparente (P_{app}) para a rifampicina permeada através das células Caco-2 obtidos com as concentrações de 5,0; 10 e 25 µg/mL de rifampicina em tampão Hanks com pH 7,4 na porção apical. Média de seis determinações.

Concentração (µg/mL)	5,0	10,0	25,0
P_{app} ($\times 10^{-6}$ cm/s) \pm dp	3,66 \pm 0,37	3,44 \pm 0,42	3,55 \pm 0,23

A análise estatística dos resultados individuais por meio da análise de variância (Anova) de fator único está apresentada no Quadro 3.

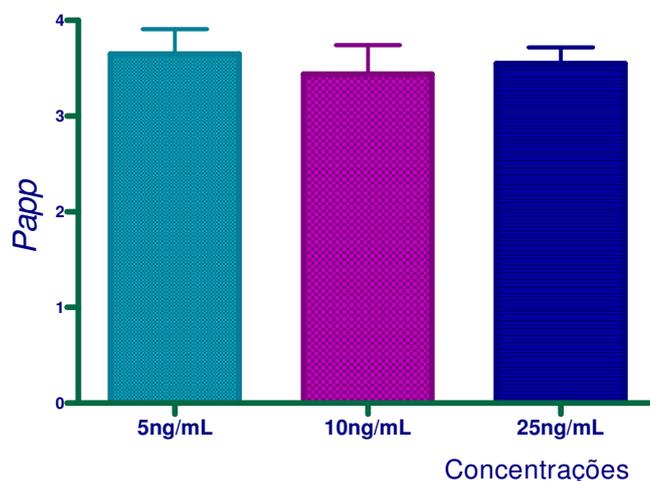


Figura 20. Resultados de permeabilidade aparente (P_{app}) para a rifampicina permeada através das células Caco-2 obtidos com as concentrações de 5,0; 10 e 25 $\mu\text{g/mL}$ de rifampicina em tampão Hanks com pH 7,4 na porção apical e basolatera. Média de três determinações (barras indicam desvio padrão).

Quadro 3. Resultados relativos à análise de variância (Anova) referente aos dados de permeabilidade nas diferentes concentrações de rifampicina ($\alpha = 0,05$)

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P
Tratamentos	2	0,064	0,032	0,1698	0,8476
Erro	6	1,132	0,189		

A análise dos dados obtidos demonstrou que não há diferenças significativas ($p > 0,05$) nos valores de P_{app} para as três concentrações de rifampicina empregadas.

Influência do pH na permeabilidade da rifampicina

Na figura 21 estão apresentados os gráficos da fração permeada da rifampicina versus tempo dos experimentos nas três condições de pH avaliadas: pH 5,8 ; pH 6,8 e pH 7,4.

Os resultados de *Papp* obtidos para a rifampicina nos três valores de pH do tampão empregado no experimento de permeabilidade, no compartimento apical, estão apresentados na tabela 20 e Figura 22.

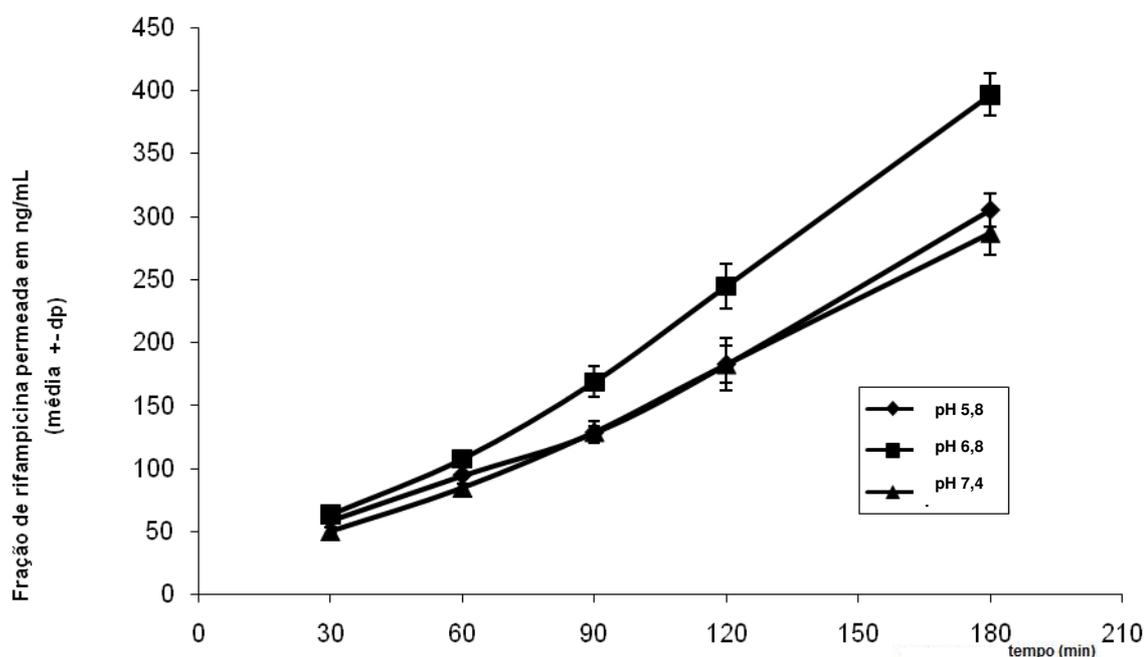


Figura 21. Fração permeada de rifampicina (em ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo nos pHs de 5,8; 6,8 e 7,4. Média de três determinações.

Tabela 20. Resultados de *Papp* para a rifampicina permeada através das células Caco-2 nos pHs de 5,8; 6,8 e 7,4. Média de três determinações.

pH	5,8	6,8	7,4
<i>Papp</i> ($\times 10^{-6}$ cm/s) \pm dp	$3,66 \pm 0,37$	$4,95 \pm 0,50$	$3,48 \pm 0,46$

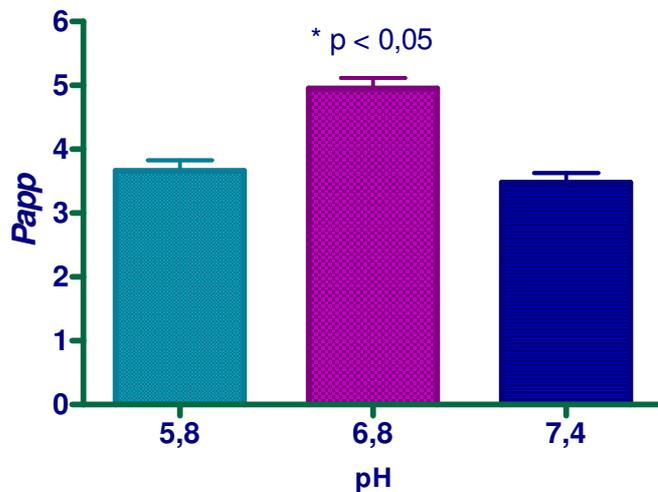


Figura 22. Resultados de *Papp* para a rifampicina permeada através das células Caco-2 obtidos nos valores de pH de 5,8; 6,8 e 7,4 do tampão Hanks na porção apical. Média de seis determinações (barras indicam desvio padrão).

Influência do muco simulado na permeabilidade da rifampicina

A influência da adição de mucina suína ao meio da porção apical para realização dos experimentos de permeabilidade da rifampicina foi avaliada pela comparação dos dados obtidos com o meio com e sem a mucina nos três pHs: 5,8; 6,8 e 7,4.

Os gráficos da fração permeada de rifampicina através das membranas de células Caco-2 em função do tempo nos diferentes valores d pH e na presença e ausência da mucina estão apresentados nas figuras 23, 24 e 25.

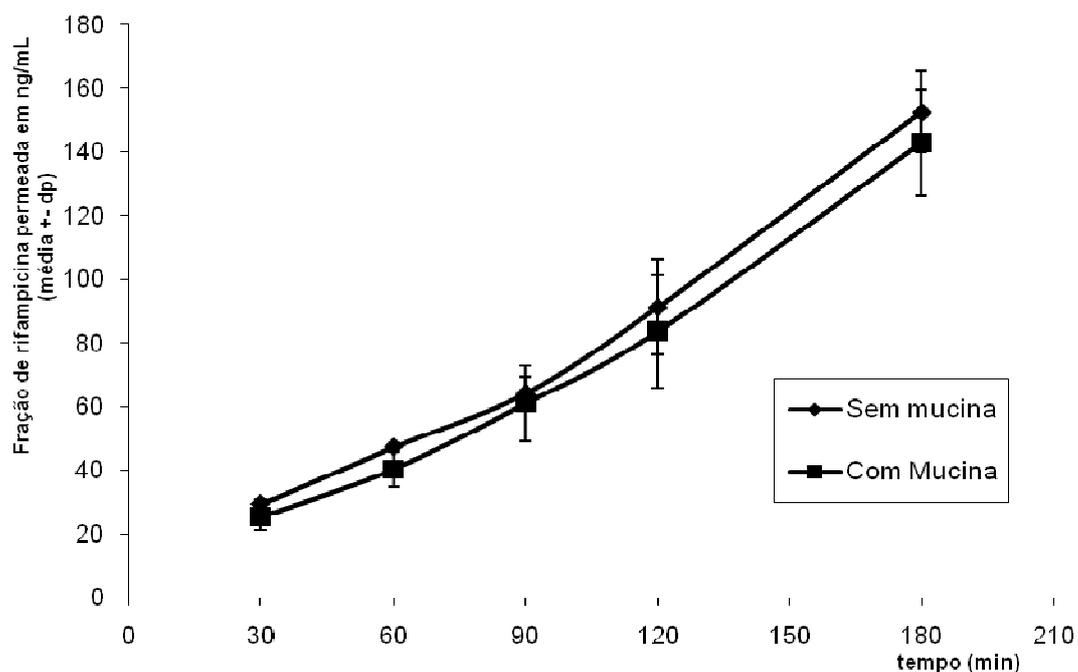


Figura 23. Fração permeada de rifampicina através das membranas de células Caco-2, no pH 5,8 na porção apical, em meio com e sem adição de mucina a 3,0%. Média de três determinações.

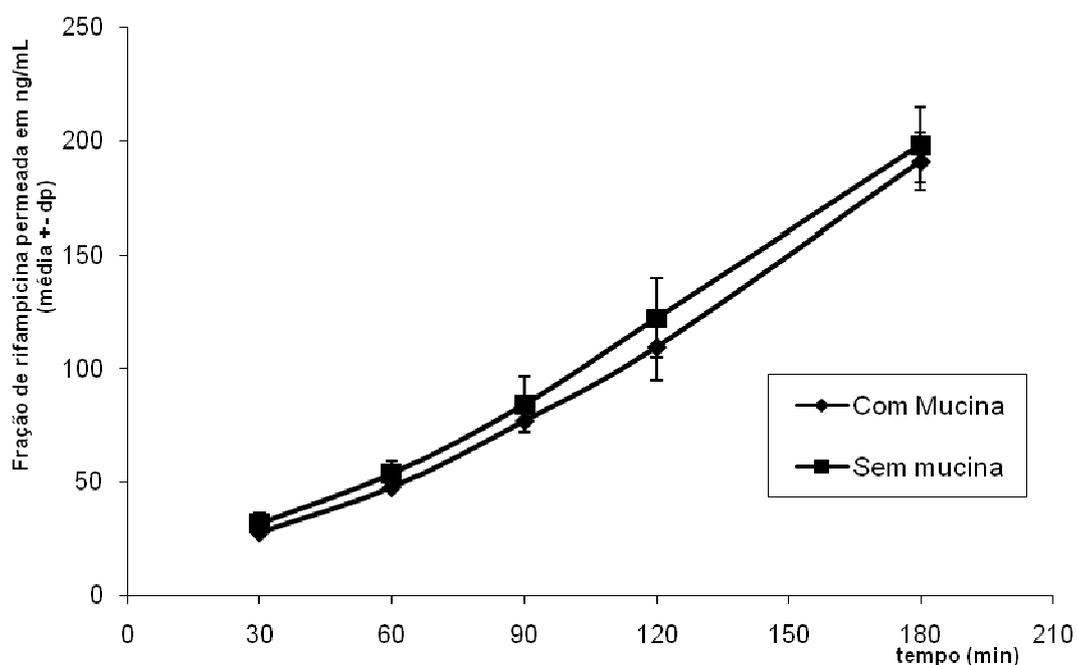


Figura 24. Fração permeada de rifampicina através das membranas de células Caco-2, no pH 6,8 na porção apical, em meio com e sem adição de mucina a 3,0%. Média de três determinações.

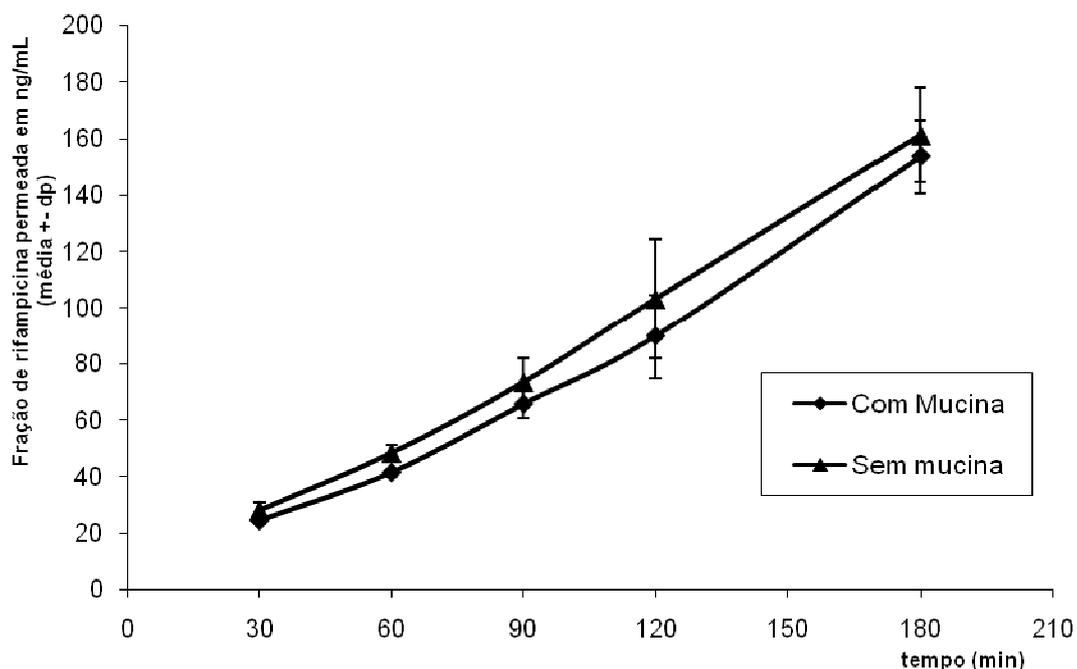


Figura 25. Fração permeada de rifampicina através das membranas de células Caco-2, no pH 7,4 na porção apical, em meio com e sem adição de mucina a 3,0%. Média de três determinações.

A partir da fração permeada da rifampicina foram obtidos os dados de P_{app} apresentados na tabela 21.

Tabela 21. Resultados de P_{app} para a rifampicina permeada através das células Caco-2, nos pHs de 5,8; 6,8 e 7,4 com e sem adição de mucina. Média de três determinações.

pH	5,8	6,8	7,4
P_{app} ($\times 10^{-6}$ cm/s) \pm dp			
Sem mucina	3,66 \pm 0,37	4,95 \pm 0,50	3,48 \pm 0,46
P_{app} ($\times 10^{-6}$ cm/s) \pm dp			
Com mucina	3,50 \pm 0,91	4,86 \pm 0,55	3,63 \pm 0,39

Influência do soro fetal bovino na permeabilidade da rifampicina

A influência da adição de soro fetal bovino (4%) ao meio da porção basolateral para realização dos experimentos de permeabilidade da rifampicina foi avaliada pela comparação dos dados obtidos com o meio com e sem o soro nos três pHs: 5,8; 6,8 e 7,4.

Os gráficos dos dados da fração permeada da rifampicina em função do tempo, nos diferentes pH estudados, estão apresentados nas figuras 26, 27 e 28.

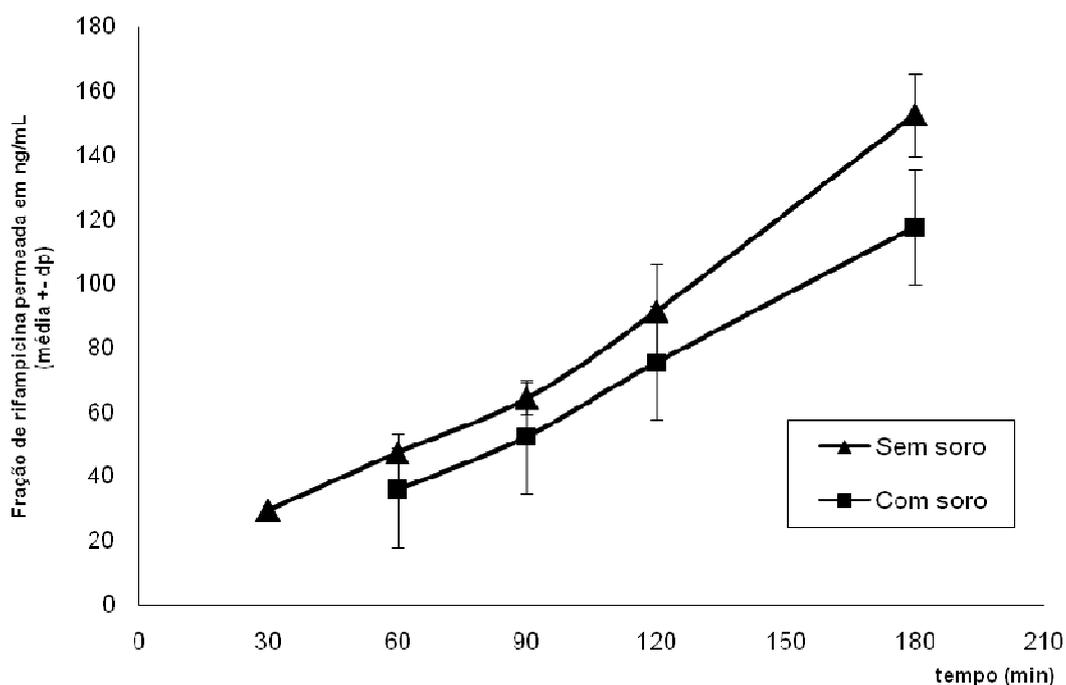


Figura 26. Fração permeada de rifampicina através das membranas de células Caco-2, no pH 5,8 na porção apical, em meio com e sem adição de soro fetal bovino a 4%. Média de três determinações.

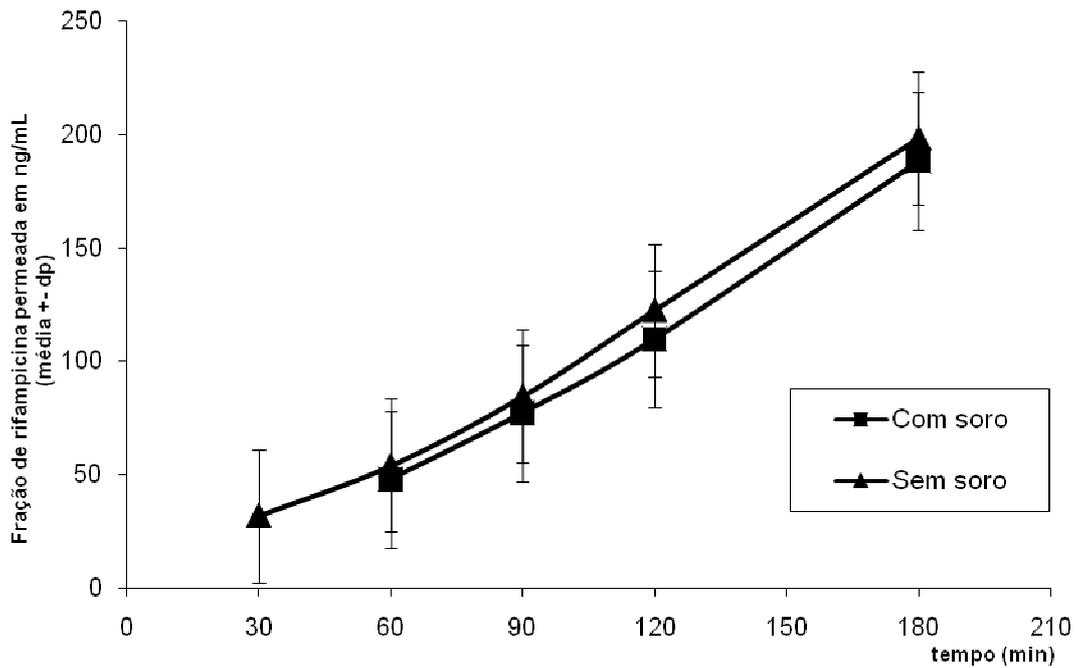


Figura 27. Fração permeada de rifampicina através das membranas de células Caco-2, no pH 6,8 na porção apical, em meio com e sem adição de soro fetal bovino a 4%. Média de três determinações.

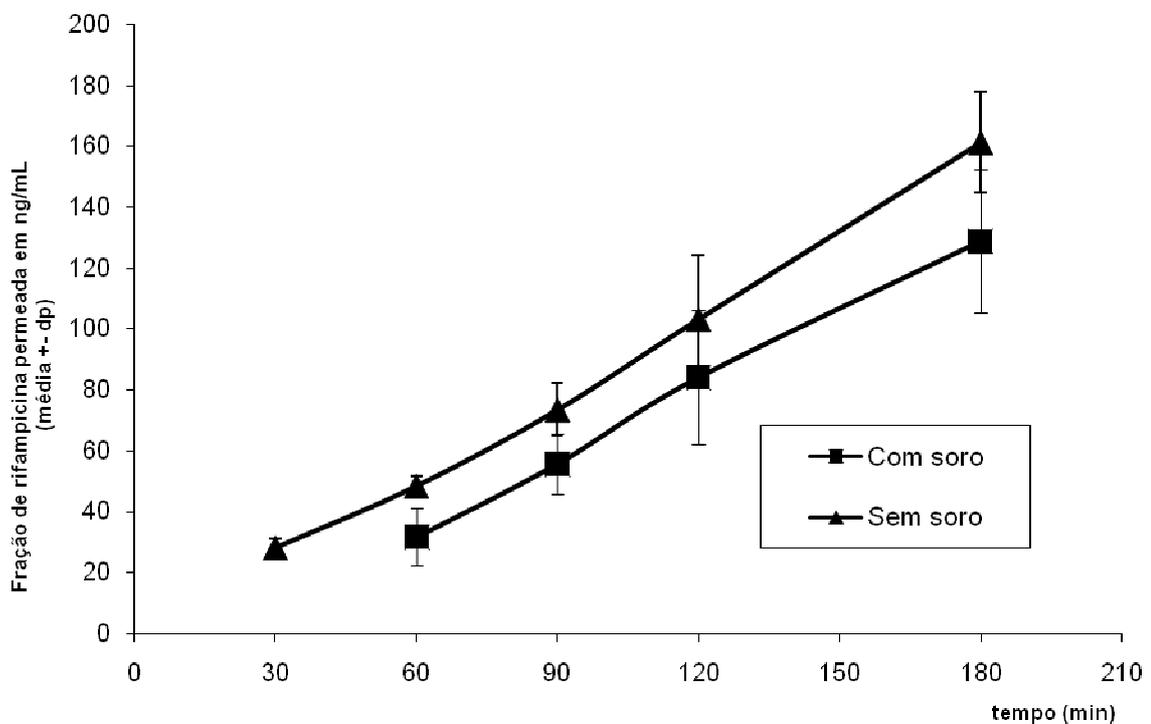


Figura 28. Fração permeada de rifampicina através das membranas de células Caco-2, no pH 7,4 na porção apical, em meio com e sem adição de soro fetal bovino a 4%. Média de três determinações.

Para determinação da *Papp* foram desconsiderados os valores da fração permeada de rifampicina obtidos no tempo de 30 minutos nos três experimentos realizados. Nestes tempos, os valores da fração permeada apresentaram-se abaixo do limite de quantificação estabelecido na validação do método analítico para quantificação da rifampicina.

A partir da fração permeada foram obtidos os dados de *Papp* apresentados na tabela 22.

Tabela 22. Permeabilidade aparente (*Papp*) para a rifampicina permeada através das células Caco-2, nos pHs 5,8; 6,8 e 7,4, com e sem adição de soro fetal bovino. Média de três determinações.

pH	5,8	6,8	7,4
<i>Papp</i> ($\times 10^{-6}$ cm/s) \pm dp			
Sem soro	3,66 \pm 0,37	4,95 \pm 0,50	3,48 \pm 0,46
<i>Papp</i> ($\times 10^{-6}$ cm/s) \pm dp			
Com soro	3,05 \pm 0,28	5,23 \pm 0,62	3,82 \pm 0,39

Influência simultânea do soro fetal bovino e da mucina na permeabilidade da rifampicina

A influência da adição simultânea de mucina suína a 3% no compartimento apical e a adição de soro fetal bovino (4%) ao meio da porção basolateral para realização dos experimentos de permeabilidade da rifampicina foi avaliada pela comparação dos dados obtidos com o meio com e sem estes adjuvantes nos três pHs: 5,8; 6,8 e 7,4.

Os gráficos dos dados da fração permeada em função do tempo nas diferentes condições avaliadas estão apresentados nas figuras 29, 30 e 31.

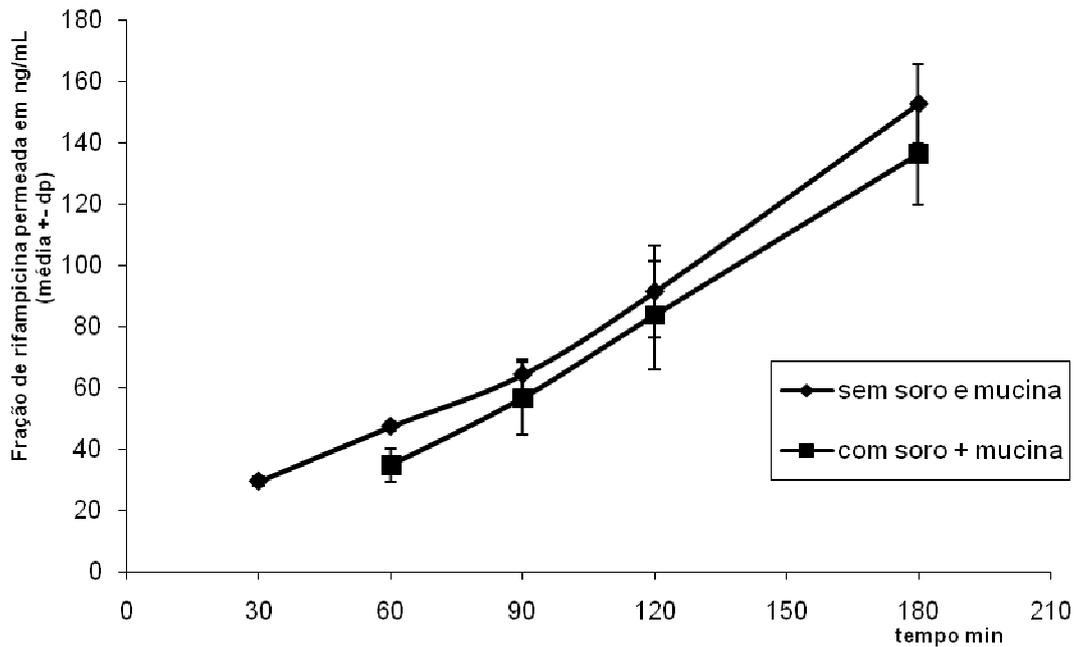


Figura 29. Fração permeada de rifampicina através das membranas de células Caco-2, no pH 5,8 na porção apical, em meio com e sem adição de soro fetal bovino a 4% mais mucina a 3%. Média de três determinações.

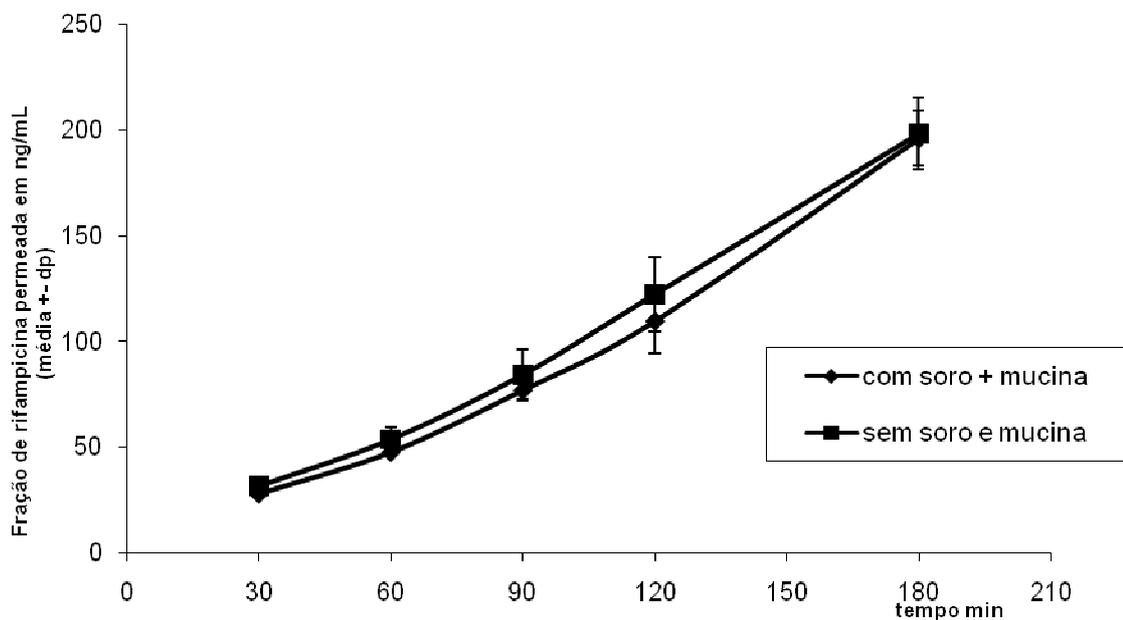


Figura 30. Fração permeada de rifampicina através das membranas de células Caco-2, no pH 6,8 na porção apical, em meio com e sem adição de soro fetal bovino a 4% mais mucina a 3%. Média de três determinações.

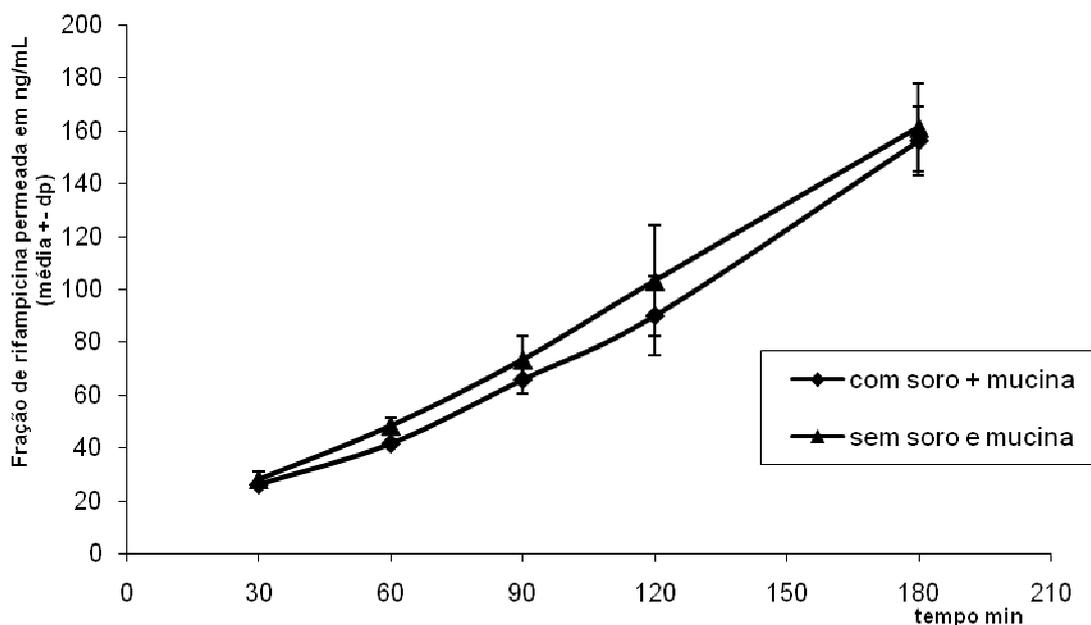


Figura 31. Fração permeada de rifampicina através das membranas de células Caco-2, no pH 7,4 na porção apical, em meio com e sem adição de soro fetal bovino a 4% mais mucina a 3%. Média de três determinações.

Tabela 23. Permeabilidade aparente (P_{app}) para a rifampicina permeada através das células Caco-2 nos pHs 5,8; 6,8 e 7,4, com e sem adição de soro fetal bovino. Média de três determinações.

pH	5,8	6,8	7,4
P_{app} ($\times 10^{-6}$ cm/s) \pm dp			
Sem soro e mucina	3,66 \pm 0,37	4,95 \pm 0,50	3,48 \pm 0,46
P_{app} ($\times 10^{-6}$ cm/s) \pm dp			
Com soro mais mucina	3,79 \pm 0,28	5,00 \pm 0,62	3,38 \pm 0,39

A análise de variância por (ANOVA - two-way) considerando dois fatores (composição do meio e pH), seguida da análise dos fatores que resultaram em diferenças pela determinação dos intervalos de confiança (IC 95%) estão apresentadas nos Quadros 4 e 5.

Quadro 4. Análise de Variância de dois fatores (ANOVA) para os valores de permeabilidade da rifampicina em relação ao pH e composição do meio de permeabilidade. Valor de significância de $p = 0,05$.

Fonte	G. L	S Q	M Q	F	p
Fator 1 (f1) Composição meio	3	0.0496	0.0165	0.05	0.984
Fator 2 (f2) pH	2	20.5406	10.2703	32.03	0.000*
f1 x f2	6	1.3137	0.2190	0.68	0.665
Erro	33	10.5823	0.3207		
total	44				

* $p < 0,05$

Quadro 5. Intervalo de confiança (IC 95%) dos valores de permeabilidade da rifampicina considerando o parâmetro pH.

pH	Diferenças (%)	IC
6-8 - 5,8	+ 26,1*	0,9923 a 1,9397
7,4 - 5,8	- 4,0	-0,493 a 0.4544
7,4 - 6,8	- 29,1*	-1.9590 a -1.0116

*Diferenças significativas $p < 0,05$

Os resultados da ANOVA apresentados demonstraram que a composição do meio não levou a diferenças significativas nos valores da permeabilidade aparente da rifampicina. O pH é um fator que originou valores de permeabilidade estatisticamente distintos. Os resultados obtidos com combinação dos dois fatores, composição do meio e pH, demonstraram que não há interação entre eles que possam causar alterações nos resultados da permeabilidade da rifampicina.

Transporte bidirecional da rifampicina através das monocamadas de células Caco-2

A verificação da polarização do transporte da rifampicina através das células Caco-2 foi realizada medindo-se o fluxo transepitelial em ambas as direções: Apical → Basolateral (A → B) e Basolateral → Apical (B → A).

Nas Figuras 32 e 33 estão representados os gráficos de transporte de rifampicina através das monocamadas de células Caco-2 em função do tempo nos sentidos A → B e B → A e a determinação do acúmulo intracelular.

Neste estudo, a rifampicina foi dissolvida em tampão de Hanks e a concentração da rifampicina utilizada foi de 5µg/mL, com valores do pH mantidos em 6,8 na porção apical e 7,4 na porção basolateral.

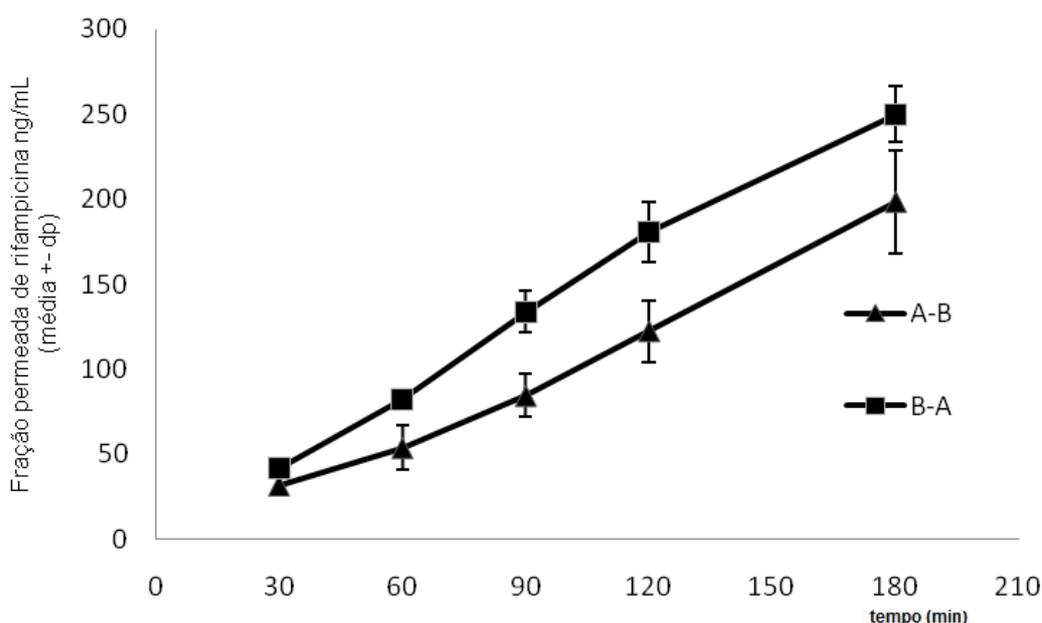


Figura 32. Fração permeada de rifampicina através das monocamadas de células Caco-2 em função do tempo nos sentidos A-B e B-A. Média de três determinações.

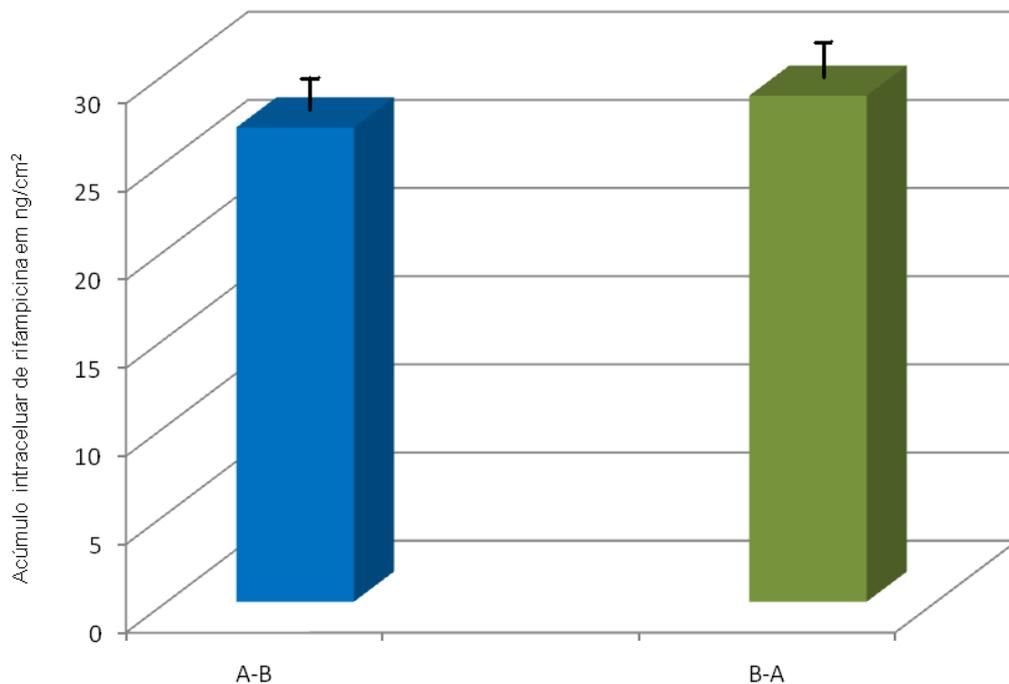


Figura 33. Acúmulo intracelular de rifampicina em monocamadas de células Caco-2 nos sentidos A-B e B-A. Média de três determinações.

Nota-se que o transporte transcelular da rifampicina é maior no sentido B-A em relação ao A-B.

O acúmulo intracelular não mostrou o mesmo comportamento, apresentando valores semelhantes para ambas as direções do estudo.

A partir dos dados da fração permeada calculou-se os valores de P_{app} apresentados na Tabela 24.

Tabela 24. Permeabilidade aparente (P_{app}) para a rifampicina através das células Caco-2 nos sentidos A-B e B-A. Média de três determinações.

	A-B	B-A
P_{app} ($\times 10^{-6}$ cm/s) \pm dp	4,95 \pm 0,50	6,19 \pm 0,85

Os valores de P_{app} foram significativamente distintos nas diferentes direções de realização do estudo.

Transporte bidirecional da rifampicina através das monocamadas de células Caco-2 com associação de verapamil

O transporte bidirecional da rifampicina foi também avaliado com a presença do verapamil, visando à inibição do efluxo promovido pela ação das glicoproteínas -P (Pgp).

Os experimentos foram realizados nas mesmas condições do estudo anterior, com a adição de verapamil na concentração de 10 μ g/mL nos compartimentos apical e basolateral.

Os resultados da fração permeada e acúmulo intracelular estão apresentados nas figuras 34 e 35, respectivamente.

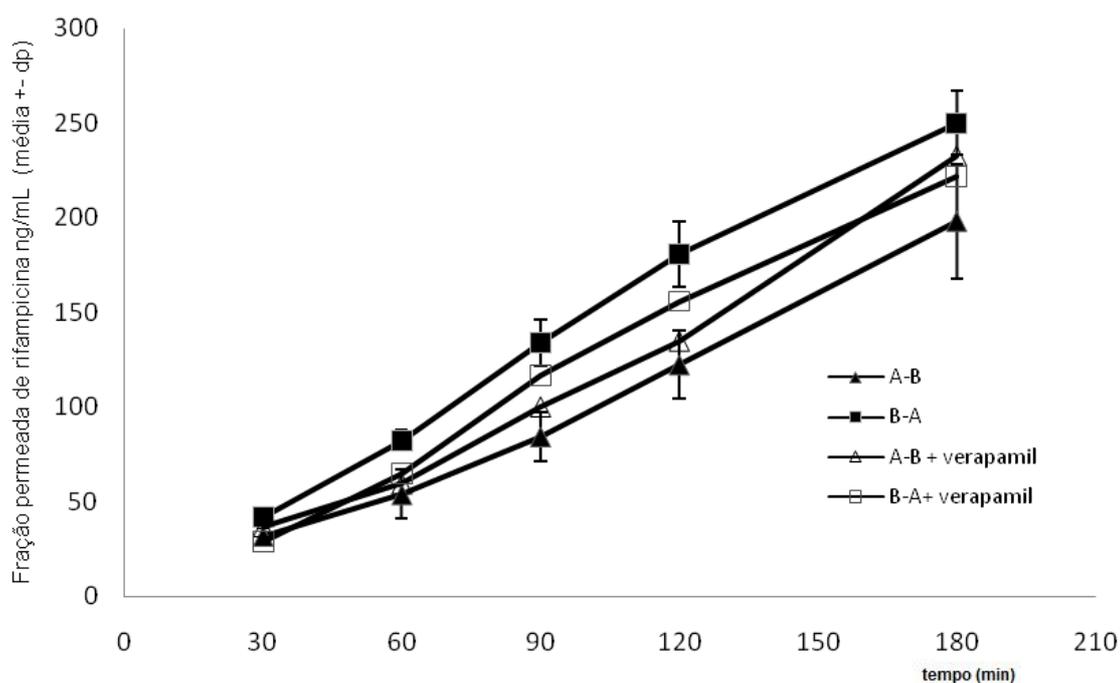


Figura 34. Fração permeada de rifampicina em função do tempo através das monocamadas de células Caco-2, nos sentidos A-B e B-A, na presença do verapamil. Média de três determinações.

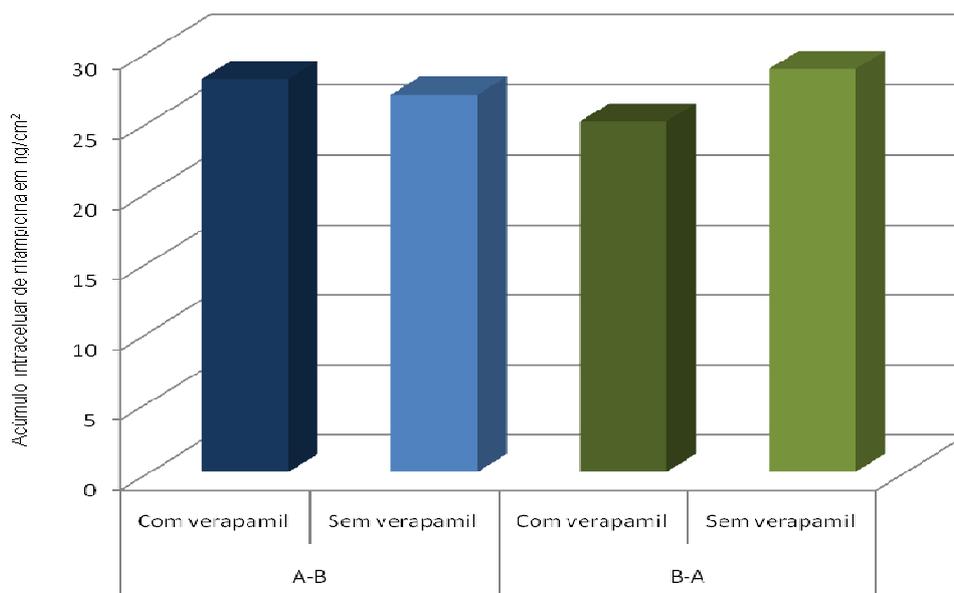


Figura 35. Comparação do acúmulo intracelular de rifampicina em monocamadas de células Caco-2 nos sentidos apical – basolateral (A-B) e basolateral – apical (B-A) na presença ou não de verapamil. Média de três determinações.

A partir dos dados da fração permeada foram obtidos os valores de P_{app} apresentados na Tabela 25.

Tabela 25. Permeabilidade aparente (P_{app}) para a rifampicina através das membranas de células Caco-2 nos sentidos apical – basolateral (A-B) e basolateral – apical (B-A) na presença de verapamil. Média de três determinações.

	A-B	B-A
	P_{app} ($\times 10^{-6}$ cm/s) \pm dp	P_{app} ($\times 10^{-6}$ cm/s) \pm dp
Sem verapamil	4,95 \pm 0,50* (n=6)	6,19 \pm 0,85 (n=3)
Com verapamil	5,82 \pm 0,42* (n=3)	5,74 \pm 0,62 (n=3)

*Diferença significativa $p < 0,05$

Os resultados demonstram aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) dos valores da P_{app} da rifampicina no sentido apical - basolateral (A-B) com o uso do verapamil como inibidor do efluxo causado pela Pgp. Entretanto, não houve redução no sentido de efluxo basolateral – apical (B-A) com a utilização do inibidor da P-gp.

Indução da expressão da Pgp em células Caco-2 pela rifampicina

Os níveis de RNAm da expressão da Pgp em células Caco-2 cultivadas em garrafas de 75cm² na presença de rifampicina adicionada ao meio DMEM na concentração de 25 µg/mL do 11^o ao 21^o dias foram determinados por análise de PCR – RT. As análises foram realizadas em triplicatas.

Os resultados demonstraram aumento estatisticamente significativo de cerca de 40% ($p < 0,05$, $n=3$) para a expressão da Pgp pelas células Caco-2 tratadas com a rifampicina nas condições descritas (Figura 36).

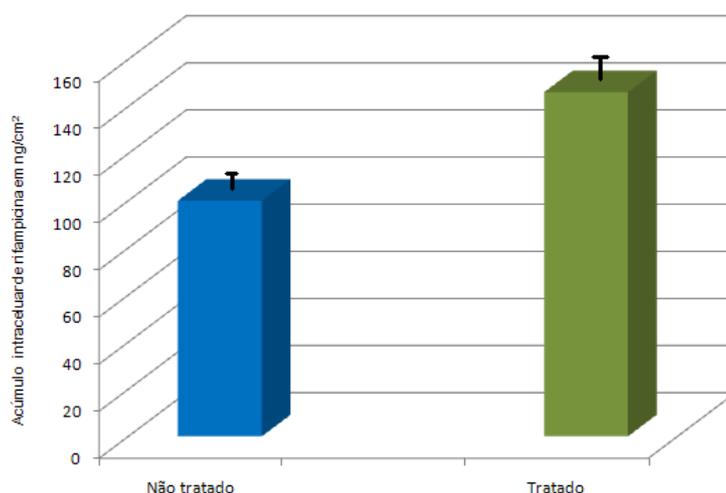


Figura 36. Efeito do tratamento com rifampicina na expressão do RNAm da Pgp nas células Caco-2. Barras indicam desvio padrão.

Transporte bidirecional da rifampicina através das monocamadas de células Caco-2 cultivadas na presença da rifampicina

O transporte bidirecional da rifampicina foi também estudado visando à avaliação da influência da rifampicina empregada no momento do cultivo das células Caco-2 sobre a permeabilidade da própria rifampicina.

Os experimentos foram realizados nos sentidos apical – basolateral (A-B) e basolateral – apical (B-A). Os ensaios foram realizados em paralelo com a adição do verapamil na concentração de 10 μ g/mL nos compartimentos apical e basolateral.

Os resultados da fração permeada e acúmulo intracelular estão apresentados nas figuras 37 e 38, respectivamente.

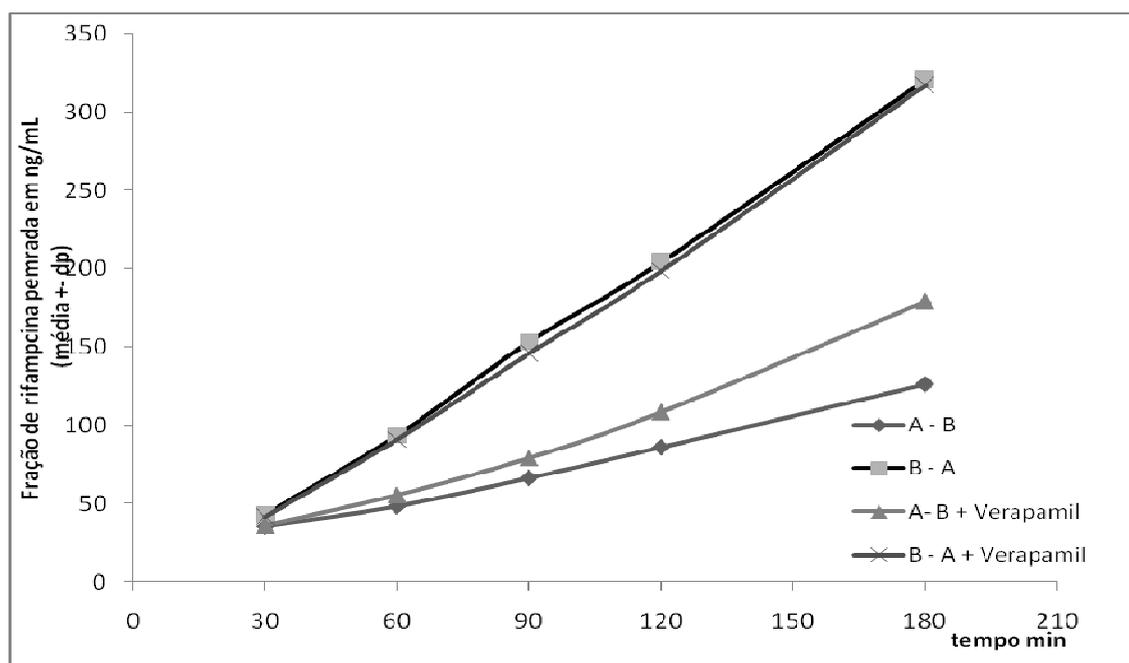


Figura 37. Fração permeada de rifampicina em função do tempo através das monocamadas de células Caco-2 cultivadas na presença de rifampicina, nos sentidos apical – basolateral (A-B) e basolateral – apical (B-A), e na presença do verapamil. Média de três determinações.

A partir da fração permeada foram obtidos os valores da permeabilidade aparente apresentados na tabela 26.

Tabela 26. Permeabilidade aparente (P_{app}) para a rifampicina permeada através das membranas de células Caco-2 cultivadas na presença da rifampicina nos sentidos apical – basolateral (A-B) e basolateral – apical (B-A). Média de três determinações.

	A-B	B-A
	P_{app} ($\times 10^{-6}$ cm/s) \pm dp	P_{app} ($\times 10^{-6}$ cm/s) \pm dp
Sem verapamil	2,70 \pm 0,49* (n=3)	8,93 \pm 0,10** (n=3)
Com verapamil	4,24 \pm 0,23* (n=3)	6,86 \pm 0,86** (n=3)

* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$

Diferenças significativas foram observadas nos valores de permeabilidade, em ambos os sentidos, da rifampicina através das células tratadas com rifampicina durante a fase de cultivo.

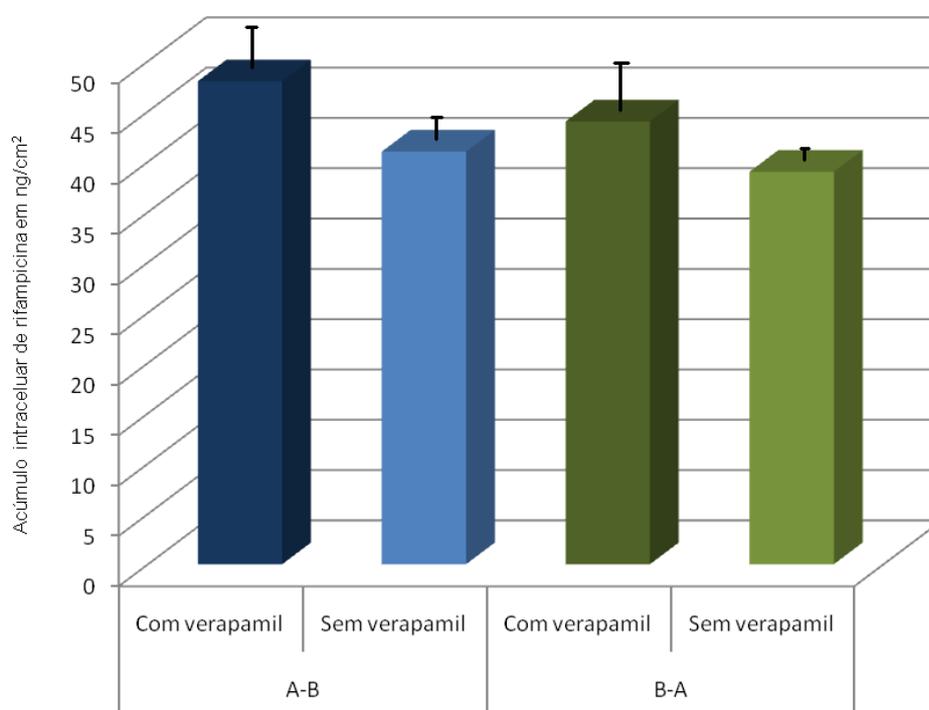


Figura 38. Comparação do acúmulo intracelular de rifampicina em monocamadas de células Caco-2 nos sentidos apical – basolateral (A-B) e basolateral – apical (B-A) na presença ou não de verapamil. Média de três determinações.

A comparação entre os valores de permeabilidade obtidos com as células em condições normais de cultivo e com a adição da rifampicina estão apresentadas na Tabela 27.

Tabela 27. Permeabilidade aparente (*Papp*) para a rifampicina permeada através das membranas de células Caco-2 cultivadas em meio normal e na presença da rifampicina nos sentidos apical – basolateral (A-B) e basolateral – apical (B-A). Média de três determinações

		A-B	B-A
		<i>Papp</i> (x 10 ⁻⁶ cm/s) ±	<i>Papp</i> (x 10 ⁻⁶ cm/s) ±
		dp	dp
Meio normal	Sem verapamil	4,95 ± 0,50* (n=6)	6,19 ± 0,85*** (n=3)
	Com verapamil	5,82 ± 0,42** (n=3)	5,74 ± 0,62 (n=3)
Meio com rifampicina	Sem verapamil	2,70 ± 0,49* (n=3)	8,93 ± 0,10*** (n=3)
	Com verapamil	4,24 ± 0,23** (n=3)	6,86 ± 0,86 (n=3)

*p<0,05 (p=0,027); **p<0,05 (p=0,018); *** p< 0,05 (p=0,024)

6- DISCUSSÃO

As etapas de desenvolvimento e validação dos métodos para a quantificação das amostras provenientes dos estudos de permeabilidade são consideradas grandes desafios para o emprego dessa técnica.

Devido às reduzidas concentrações obtidas da fração permeada dos fármacos avaliados, o método analítico deve apresentar grande sensibilidade, sendo capaz de detectar e quantificar estes baixos níveis, com precisão e exatidão adequadas. Outro parâmetro bastante importante a ser considerado relaciona-se à especificidade do método, que deve ser suficientemente específico para se evitar a interferência dos diversos compostos constituintes dos meios empregados nos estudos (grande variedade de sais e suplementos, tais como aminoácidos, fontes de carboidratos, além soro fetal bovino para se manter a viabilidade celular). Compostos oriundos do metabolismo celular também podem representar potenciais interferentes, o que torna complexa a matriz em análise.

Na literatura e em compêndios oficiais são descritos métodos para quantificação da rifampicina em produtos farmacêuticos e em fluidos biológicos. Dentre os métodos mais recentemente publicados, podem ser citados os que utilizam a técnica cromatográfica acoplada aos detectores UV/VIS e de massas (UNITED STATES PHARMACOPEIA 2005; HARTKOORN *et al* 2007; BAO *et al* 2008). Entretanto, neste trabalho optou-se pela quantificação por detecção em UV devido à presença de sais constituintes da solução tampão de Hanks. Testes realizados por detecção utilizando espectrômetro de massas apresentaram significativas variações das áreas dos picos da rifampicina, supostamente pela instabilidade desse fármaco e por supressão do sinal analítico devido à presença de sais. Na literatura existem trabalhos que demonstram que a instabilidade da rifampicina pode ser contornada pela adição de ácido ascórbico, um agente antioxidante. A adição do ácido ascórbico em concentração de 0,1mg/mL é mais um fator que inviabiliza a utilização da quantificação da rifampicina por espectrometria de massas, pois trata-se de um composto não volátil, o que ocasionaria a precipitação de sais na fonte do equipamento.

Portanto, nesse estudo, alterou-se a metodologia anteriormente proposta por CLAE-MS/MS para a quantificação dos fármacos por CLAE-UV.

Os métodos desenvolvidos e validados para quantificação de rifampicina, lamivudina, zidovudina e fluoresceína nos experimentos de permeabilidade foram precisos, exatos e lineares, justificando sua utilização na quantificação dos fármacos nos estudos.

Os resultados das amostras analisadas em um ciclo de congelamento e descongelamento mostraram que estas se mantiveram estáveis, apresentando precisão e exatidão aceitáveis.

Os resultados de precisão e exatidão atendem aos limites estabelecidos pela resolução vigente no Brasil sobre o tema, pois todos os valores obtidos apresentaram desvio menor que 15% na precisão e, na exatidão, as diferenças entre os valores nominais e obtidos encontram-se na faixa de 85 a 115%.

A quantificação por injeção direta das amostras provenientes do estudo de permeabilidade, além de facilitar o procedimento, torna o método de baixo custo, não sendo necessários investimentos no preparo e extração das amostras.

A estabilidade da rifampicina foi mantida ao se utilizar o ácido ascórbico como agente antioxidante, o que permitiu sua quantificação dentro dos critérios exigidos para a validação analítica. Na literatura muitos trabalhos comprovam a eficácia do emprego do ácido ascórbico como estabilizante da rifampicina (LE GUELLEC C *et al.*, 1997; BAO *et al.*, 2008; HARTKOORN *et al.* 2007; ALLANSON *et al.*, 2007).

O emprego da resistência elétrica transepitelial (RET) como indicativo da integridade da membrana formada pelas células Caco-2 tem sido bastante difundido nesta técnica. Adequadas correlações entre os valores da resistência elétrica e a permeabilidade de compostos que são absorvidos pela via

paracelular foram obtidos. Destaca-se, entre estes compostos, o manitol, que é o mais utilizado para avaliação da integridade da membrana por apresentar sua permeabilidade limitada apenas pela via paracelular. Hidalgo e colaboradores (1996) estabeleceram uma correlação inversa entre os valores de permeabilidade do manitol e a resistência elétrica transepitelial em função do tempo de cultivo das células Caco-2, observando que com o passar dos dias, a membrana adquiria a formação das estruturas que compõem as junções intercelulares, tornando os espaços entre as células mais restritos, o que, por consequência, restringe a passagem dos eletrólitos, tornando alto o valor da resistência. O mesmo ocorre com o manitol, que passa a apresentar redução do seu valor de permeabilidade.

No presente estudo, a medida da resistência elétrica transepitelial associada ao uso da fluoresceína foram as ferramentas principais para avaliação da integridade das membranas de células Caco-2 obtidas. O manitol não foi utilizado devido às limitações analíticas de quantificação deste composto. Por se tratar de um açúcar, e apresentar baixa permeabilidade, o método difundido nos trabalhos encontrados na literatura utiliza o manitol rádio marcado. Tal artifício permite uma rápida e sensível quantificação. Entretanto, a infra-estrutura necessária para se manter esta técnica, utilizando compostos rádio-marcados, torna inviável o seu emprego.

A avaliação da RET durante os dias de cultivo das membranas demonstrou que os valores vão aumentando em função dos dias de cultivo até atingirem um valor estável por volta de 650 a 700 $\Omega \times \text{cm}^2$ entre o 15º e o 21º dia. Tais resultados estão de acordo com o encontrado na literatura para esta cultura celular (RUTISHAUSER *et al* , 2000).

Os valores da RET obtidos demonstraram que as membranas formadas apresentaram adequada integridade, ocorrendo a formação do complexo juncional intercelular. Valores similares aos obtidos no presente estudo estão publicados na literatura (BEHRENS E KISSEL, 2003; SCHMIDT *et al.*, 2007).

Os resultados da RET nos três pHs utilizados demonstraram que as membranas de células Caco-2, após 21 dias de cultivo nas placas do experimento de permeabilidade, mantiveram-se viáveis para a realização dos experimentos por até 180 minutos. Tais resultados são indicativos da integridade da membrana estando, portanto, aptas para avaliação da permeabilidade de compostos.

Outra maneira de se determinar a integridade e viabilidade das membranas para a realização dos experimentos de permeabilidade é a utilização da determinação da permeabilidade de compostos que apresentam esses dados já conhecidos. Muitos fármacos são utilizados para essa finalidade. Podem ser destacados o manitol, a digoxina, o metoprolol, a cimetidina e a fluoresceína (AUGUSTIJNS e MOLS, 2004; KOLJONEN *et al.*, 2006).

A fluoresceína foi empregada no presente estudo por ser um composto de fácil quantificação, não sendo necessária, portanto, a utilização de compostos radiomarcados.

A fluoresceína foi o composto eleito para avaliação da integridade da membrana devido às facilidades que apresenta em relação ao emprego do manitol, destacando-se que sua utilização permite a obtenção das mesmas informações relacionadas à integridade da membrana. Sua estabilidade no meio de realização do estudo, sua fácil quantificação por método sensível (cromatografia líquida com detecção de fluorescência) e característica de permeabilidade bem estabelecida, a tornam um dos compostos empregados na padronização da técnica de avaliação da permeabilidade de compostos (KOLJONEN *et al.*, 2006; BERGINC *et al.*, 2006).

Um fármaco pode ser considerado pouco absorvido (0 - 20%) quando P_{app} for menor que 1×10^{-6} , moderadamente absorvido (20 - 70%) quando P_{app} está compreendida entre 1 a 10×10^{-6} e bem absorvido (70 - 100%) quando P_{app} for maior que 10×10^{-6} (YEE, 1997). Portanto, os dados de permeabilidade obtidos para lamivudina e zidovudina (P_{app} lamivudina = 10,31

$\pm 0,86 \times 10^{-6}$ cm/s e P_{app} zidovudina = $12,64 \pm 1,72 \times 10^{-6}$ cm/s) sugerem que estes fármacos podem ser classificados como de alta permeabilidade, o que está de acordo com a classificação dada pela OMS a estes dois fármacos, ou seja, Classe I, segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (WHO, 2006).

Baseando-se nesses resultados, pode-se admitir que as condições de cultivo das células e dos experimentos podem assegurar a confiabilidade dos dados a serem obtidos na avaliação da permeabilidade da rifampicina.

A viabilidade das membranas de células Caco-2 durante a condução dos experimentos de permeabilidade é um pré-requisito indispensável para confiabilidade dos resultados obtidos. A membrana formada pode, em algumas situações, apresentar um número considerável de células mortas, e mesmo assim manter-se aderida ao suporte permeável de crescimento das placas. Entretanto, as funções de transporte dessas células não estarão funcionando adequadamente, principalmente aquelas que dependem de gasto energético, como o transporte mediado por carreadores. A permeabilidade paracelular é dependente da integridade da membrana, a maioria dos fármacos ionizáveis é capaz de atravessar a membrana, mais ou menos intensamente, pela via paracelular, e, portanto, sua permeabilidade pode ser afetada pela diminuição da integridade da membrana. A administração de fármacos em altas concentrações é, também, outro fator que pode afetar a viabilidade e integridade da membrana. Desta forma, torna-se muito importante avaliar esses fatores na realização dos experimentos de permeabilidade. Uma das possíveis formas de avaliação se dá pela realização dos estudos de citotoxicidade. No presente estudo, a citotoxicidade da rifampicina foi avaliada em três concentrações. Foi empregado o método preconizado e padronizado conforme a ISO 10993-5, empregando a técnica do MTT. Nenhum efeito significativo em relação à atividade enzimática mitocondrial (teste MTT) foi observado nas concentrações e pelo período de exposição das células Caco-2 à rifampicina. Tal teste serviu ainda como indicativo da inocuidade do co-solvente utilizado para auxiliar na solubilização da rifampicina no tampão e meios utilizados nos experimentos e cultura celulares, o que era já esperado,

uma vez que foi utilizado como co-solvente o etanol, o qual apresentava uma concentração final menor que 0,1%.

A avaliação das diferentes concentrações da rifampicina empregadas nos experimentos trouxe informações importantes para o início dos estudos. Os experimentos devem ser conduzidos preferencialmente sob condições “sink”, para se evitar uma possível saturação do sistema. Nos estudos de permeabilidade, a condição “sink” é estabelecida por meio do percentual do fármaco encontrado no compartimento receptor em relação à quantidade do fármaco adicionado no compartimento doador. Este percentual deve ser de, no máximo, 10%, ou seja, os experimentos de permeabilidade devem ser conduzidos pelo tempo máximo em que a quantidade do fármaco que alcança o compartimento doador é menor que 10% da quantidade adicionada no compartimento receptor (TAVELLIN, 1999).

As três concentrações de rifampicina avaliadas neste estudo não atingiram o limite das condições “sink” pelo tempo de 180 minutos em que os experimentos foram conduzidos.

Outro dado que pode ser obtido a partir da avaliação da permeabilidade das diferentes concentrações de rifampicina relaciona-se ao mecanismo de permeação. As diferentes concentrações empregadas resultaram em coeficientes de permeabilidade aparente (*P_{app}*) semelhantes. Tal fato, aliado às características físico-químicas da rifampicina, sugere que seu mecanismo de permeação seja preferencialmente por difusão passiva. Entretanto, estes dados necessitam de confirmação, uma vez que foram apenas obtidos em experimentos piloto, sendo necessária a utilização de inibidores específicos para os transportadores já conhecidos.

A influência do pH na permeabilidade da rifampicina foi avaliada nos valores de 5,8; 6,8 e 7,4.

BIGANZOLI e col, 1999, estabeleceram uma correlação entre a biodisponibilidade oral de antibióticos, entre eles a rifampicina, em humanos e

a permeabilidade empregando cultura de células Caco-2 com os experimentos conduzidos no pH de 7,4 nos compartimentos apical e basolateral. Nessa correlação, os autores puderam agrupar os antibióticos por eles testados em três categorias: 1^a – os que apresentam uma baixa absorção, consequentemente, baixa biodisponibilidade oral (BD) (BD < 1%) apresentaram $P_{app} < 0,2 \times 10^{-6}$ cm/s; 2^a – os que apresentam BD entre 1 a 90% com P_{app} entre $0,2$ a 2×10^{-6} cm/s; e 3^a os antibióticos de alta absorção (BD > 90%) com $P_{app} > 2,0 \times 10^{-6}$ cm/s. Adotando-se esse critério, a rifampicina pode ser classificada como de alta permeabilidade, em todos os valores de pH avaliados, sendo o valor de P_{app} aumentada no pH 6,8 em relação às outras condições. Desta forma, os resultados obtidos para a rifampicina estão de acordo com a classificação apresentada pela OMS (WHO, 2006).

Os resultados obtidos demonstraram maior permeabilidade da rifampicina no valor de pH 6,8. Esta informação pode servir de subsídio para o desenvolvimento de um medicamento que apresente um mecanismo de liberação modificada da rifampicina, favorecendo sua liberação a partir da forma farmacêutica em local que permita sua melhor absorção e diminua o risco da degradação ácida sofrida por este fármaco.

Alguns autores descrevem como um potencial problema a utilização de valores diferentes de pH entre os compartimentos apical e basolateral nos estudos de permeabilidade com células Caco-2. Para NEUHOFF colaboradores (2003), um menor valor de pH na porção apical em relação à porção basolateral causa alteração no transporte passivo ocasionada pelo desequilíbrio das concentrações das frações ionizadas de fármacos, resultando em uma falsa assimetria de transporte (razão de efluxo).

A utilização de muco simulado (mucina) no compartimento apical e do soro (soro fetal bovino) no compartimento basolateral são artifícios empregados para otimizar a determinação da permeabilidade de fármacos. Tais compostos adicionados ao experimento podem evitar potenciais interferências que são consideradas limitações à técnica. Estas limitações se referem à possível adsorção do fármaco ao material plástico que constitui as placas, adsorção aos

filtros de suporte de crescimento e ao possível acúmulo do fármaco no interior das células, o que ocorre com maior frequência em fármacos de alta lipofilicidade (YAMASHIDA *et al.*, 2000; KRISHNA *et al.*, 1998; FOSSATI, 2008).

Outro aspecto a ser considerado em relação à presença de muco é a ligação do fármaco às glicoproteínas constituintes do muco que pode reduzir a quantidade do fármaco livre disponível para a absorção.

Os resultados demonstram que não há diferenças significativas entre os valores de *Papp* da rifampicina nos experimentos realizados com e sem a adição de mucina no meio do compartimento apical. Tais resultados sugerem que a permeação da rifampicina através das células Caco-2 não sofre influência das glicoproteínas que simulam o muco presente no lúmen do trato gastrintestinal.

Os resultados de *Papp* obtidos nos experimentos em que foi adicionado o soro fetal bovino não se mostraram significativamente diferentes dos resultados obtidos sem a adição do soro, apesar da rifampicina ser considerada um fármaco com alta lipofilicidade. Na maioria dos trabalhos publicados, o uso do soro fetal bovino no compartimento basolateral tem demonstrado ser um fator de melhora dos valores de permeabilidade, principalmente para compostos com características hidrofóbicas (KRISHNA *et al.*, 2001; AUNGST *et al.*, 2004). Segundo estes autores, a presença do soro fetal bovino no compartimento basolateral serve como um reservatório para o fármaco, impedindo que este retorne no sentido inverso da absorção e se acumule no interior da célula e até mesmo que fique adsorvido no material das placas e membranas.

Os resultados da avaliação da presença ou ausência do muco simulado e soro nas porções apicais e basolaterais, respectivamente, demonstram que não se justificaria a utilização destes adjuvantes na condução dos experimentos, uma vez que eles representariam uma fonte de interferência no método de quantificação, demandando a necessidade de tratamentos

prévios com as amostras, o que ocasionaria a elevação dos custos para realização do experimento e também demandaria maior trabalho de desenvolvimento do método analítico para quantificação.

Os resultados obtidos para os valores de *Papp* maiores no sentido secretório (B-A) em relação aos obtido na direção absorptiva (A-B), podem indicar o envolvimento de mecanismo de transporte ativo de efluxo para a rifampicina, possivelmente por ação da P-gp. Os dados de acúmulo intracelular e a utilização do inibidor da atividade das P-gp, o verapamil, corroboram para este pressuposto.

Muitos trabalhos publicados comprovam que a rifampicina é um potente indutor dos sistemas enzimáticos e do sistema de transporte de efluxo mediado pela Pgp em estudos *in vivo*. Tal efeito é considerado um importante caso de interação de fármaco-fármaco relacionado ao processo de absorção e metabolização e, ainda, tem-se discutido que a variabilidade da biodisponibilidade da rifampicina seja decorrente desse mesmo mecanismo (WESTPHAL *et al*, 2000; GREINER *et al.*, 1999; LAURENT e BENET, 1998; MARIAPPAN e SINGH, 2006).

Fatores ambientais podem afetar a expressão da Pgp. Dados provenientes de estudo *in vitro* revelaram que a expressão da Pgp pode ser induzida por grande variedade de fármacos e alguns hormônios (GREINER, *et a.*,1999; HASLAM, *et al.*, 2008), entretanto, o mecanismo molecular dessa indução não foi totalmente esclarecido. Acredita-se que a indução da Pgp e das CYP3A4 pela rifampicina seja mediada pelo receptor PXR (receptor nuclear órfão) (LEHMANN *et al.*, 1998; GEICK *et al.*,2001).

No presente estudo, o efeito indutor da rifampicina na atividade e expressão de RNAm e proteína do transportador de efluxo da Pgp foram realizados *in vitro*, utilizando a linhagem celular Caco-2.

As células Caco-2 foram tratadas com rifampicina em concentração de 10µg/mL no momento do cultivo por um período de 10 dias. O período de

incubação não causou nenhum efeito tóxico perceptível nas células, uma vez que os valores de resistência elétrica transepitelial e os resultados de permeabilidade dos marcadores de baixa permeabilidade permaneceram dentro dos limites esperados.

A análise do RNAm da Pgp por PCR-RT demonstrou que o tratamento das células Caco-2 com a rifampicina levou a um aumento significativo da expressão desse transportador (aumento de cerca de 40%).

A atividade da Pgp presente nas células Caco-2, cuja expressão foi induzida pela rifampicina foi estimada pela avaliação da permeabilidade da própria rifampicina em experimentos de permeabilidade conduzidos em sentido apical-basolateral e basolateral-apical. Os resultados demonstraram significativa redução dos valores de permeabilidade no sentido apical – basolateral quando comparado aos resultados obtidos com as células em condições normais de cultivo. Redução de cerca de 50 % do valor de permeabilidade aparente foi obtida. Ao se associar o inibidor verapamil no experimento, o valor de permeabilidade volta a aumentar, entretanto, os valores permanecem significativamente distintos em relação aos obtidos com o experimento em que se empregou o inibidor sem a indução da Pgp. Tal fato pode ser explicado pela alta variabilidade apresentada pelas células Caco-2 em relação ao nível de transportadores ou pela concentração do inibidor empregado. A concentração do verapamil foi a mesma utilizada em ambas as condições. Desta forma, no grupo de células tratadas, há uma inibição percentual menor da atividade da Pgp, uma vez que o nível da Pgp está maior em relação às células não tratadas.

Nos estudos realizados no sentido basolateral – apical, os resultados confirmaram o que ocorreu no sentido oposto, observando-se uma alteração de cerca de 50% de aumento na permeabilidade da rifampicina.

Resultados similares foram obtidos por MAGNARIN e colaboradores (2004), que investigaram a indução da expressão da Pgp e outros transportadores de efluxo pela rifampicina em células LLC-PK, que são células

derivadas de rim suíno empregadas para estudar o transporte epitelial de fármacos. Em tal trabalho, as células LLC-PK foram tratadas com variadas concentrações de rifampicina por um período de 15 dias. O efeito do tratamento sobre a expressão dos genes MDR1, MRP1, MRP2, LPR e CYP 3A4 foi avaliado por PCR – RT. Para todas as concentrações e tempos testados, uma significativa redução da permeabilidade da doxorubicina foi evidenciada pelo tratamento das células com a rifampicina. Para confirmar se a redução da permeabilidade foi realmente decorrente da indução da Pgp, utilizou-se o verapamil como inibidor da atividade desse transportador.

7- CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram as seguintes conclusões:

- 1- Os métodos desenvolvidos mostraram-se adequados à quantificação dos fármacos fluoresceína, lamivudina, zidovudina e rifampicina no meio em que são realizados os estudos de permeabilidade através das membranas de Caco-2.
- 2- Os procedimentos de cultivo e manutenção das células Caco-2 permitiram a obtenção de membranas viáveis para a realização dos estudos de permeabilidade, tendo como base os resultados obtidos com os fármacos modelo de baixa permeabilidade (floresceína) e de alta permeabilidade (lamivudina e zidovudina).
- 3- As concentrações da rifampicina (10,0 e 25,0 e 50,0 $\mu\text{g/mL}$) não ocasionaram danos às células Caco-2 no estudo de citotoxicidade pela técnica do MTT.
- 4- As concentrações de rifampicina (5, 10 e 25 $\mu\text{g/mL}$) não resultaram em valores estatisticamente diferentes de P_{app} em células Caco-2 nas condições do estudo. A concentração do fármaco deve ser a menor possível para que não afete a viabilidade das células, mas deve ser alta o suficiente para ser detectável pelo método analítico.
- 5- A rifampicina apresentou valor de P_{app} significativamente maior em pH 6,8 dentre os valores de pH (5,8 ; 6,8; 7,4) avaliados.
- 6- A presença de muco simulado no compartimento apical não resultou em valores de permeabilidade significativamente distintos do resultado obtido sem a presença do muco. Portanto, no presente estudo, o muco simulado não representou uma barreira para a permeabilidade da rifampicina em células Caco-2, sendo desnecessário o seu uso nos experimentos com este fármaco.

- 7- A presença de soro fetal bovino no compartimento apical não resultou em valores de permeabilidade significativamente distintos dos resultados obtidos sem a presença do soro.
- 8- A expressão da Pgp em células Caco-2 é induzida pela adição da rifampicina na concentração de 10µg/mL.
- 9- Pelos resultados de permeabilidade obtidos em todas as condições avaliadas, a rifampicina pode ser considerada um fármaco de alta permeabilidade.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, S.; ASHOKRAJ, Y, BHARATAM, P.V.; PILLAI, O, PANCHAGNULA, R. Solid State Characterization of rifampicin samples and its biopharmaceutic relevance **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 22, 127-144, 2004.
- ALLANSON A.L.; COTTON M.M.; TETTEY J.N.A.; BOYTER A.C. Determination of rifampicin in human plasma and blood spots by high performance liquid chromatography with UV detection: A potential method for therapeutic drug monitoring. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 44, 963–969, 2007.
- AMIDON, G.L.; SINKO, P.J.; FLEISHER, D. Estimating human oral fraction dose absorbed: A correlation using rat intestinal membrane permeability for passive and carrier-mediated compounds. **Pharm. Res.**, v.5, p. 651-654, 1998.
- AMIDON, G.L.; LENNERNAS, 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, **Pharm. Res.**; 12, 413,1995.
- ARTURSSON, P.; BORCHARD, R.T. Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond. **Pharm. Res.**, v.14, n.12, p.1655-1658, 1997.
- ARTURSSON, P.; KARLSSON, J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**; Orlando, v.175, p.880-885, 1991.
- ARTURSSON, P.; MAGNUSSON, C. Epithelial transport of drug in cell culture. II: Effect of extracellular calcium concentration on paracellular transport of drugs of different lipophilicities across monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells. **J. Pharm. Sci.**, v.79, n.7, p.595-600, 1990.
- ARTURSSON, P.; UNGELL, A.; LOFROTH, J. E. Selective paracellular permeability in two models of intestinal absorption: cultured monolayer of human intestinal epithelial cells and rat intestinal segments. **Pharm. Res.** v. 10, p. 10-18, 1993.
- AUGUSTIJNS P.; MOLS R. HPLC with programmed wavelength fluorescence detection for the simultaneous determination of marker compounds of integrity and P-gp functionality in the Caco-2 intestinal absorption model. **J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, n. 5, p. 971-978, 2004.

- AUNGST, B.J.; NGUYEN, N.N.; BULGARELLI J.P.; OATES-LENZ K. The influence of donor and reservoir additives on Caco-2 permeability and secretory transport of HIV protease inhibitors and other lipophilic compounds. *Pharm. Res.* v.17, p. 1175–1180, 2000.
- AVDEEF, A. Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state). **Curr. Topics Med. Chem.** v.1, p. 277-351, 2001.
- BACCHI, A.; PELIZZI, G.; NEBULONI, M.; FERRARI, P. Comprehensive study on structure-activity relationships of rifamycins: Discussion of molecular and crystal structure and spectroscopic and thermochemical properties of rifamycin O. **Journal of Medicinal Chemistry**, 41, 2319-2332, 1998.
- BALIMANE P. V.; CHONG S. Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. **Drug Discovery Today.** v.10, n.5, p. 335-343, 2005.
- BALIMANE, P.V.; CHONG, S.; MORRISON, R.A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, v.44, p. 301-312, 2000.
- BAO D.; TRUONG T.; RENICK P. J.; PULSE M. E.; WEISS W. J. Simultaneous determination of rifampicin and levofloxacin concentrations in catheter segments from a mouse model of a device-related infection by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** xxx (2008) xxx–xxx Article in press
- BEAUMONT, K. The Importance of gut Wall Metabolism in Determining Drug Bioavailability. **In Drug Bioavailability: Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability.** Editado por Han van de Watebeemd, Hans Lennernas e Per Arturson, Wiley-VCH, cap. 13, p. 311-329, Weinheim, 2003.
- BEHRENS, I; KISSEL, T. Do cell culture conditions influence the carrier-mediated transport of peptides in Caco-2 cell monolayers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 19, 433–442, 2003.
- BENET, L. Z.; CUMMINS, C.L.; WU, C. U. Unmasking the dynamic interplay between efflux transporters and metabolic enzymes. **Int. J. Pharm.**v.277, p.3-9, 2004.
- BENET, L. Z.; WU, C. Y.;HEBERT,M. F.; WACHER, V. J. Intestinal drug metabolism and antitransport processes: A potential paradigm shift in oral drug delivery. **J Control Release** v.39, p. 139-143, 1996.

- BERGINC, K.; Ž AKELJ, S.; LEVSTIK, L.; URŠIČ, D.; KRISTL, A. Fluorescein transport properties across artificial lipid membranes, Caco-2 cell monolayers and rat jejunum. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, n. 66, 281–285, 2007.
- BHUTANI, H.; SINGH, S.; JINDAL, K.C.; CHAKRABORTI, AK. Mechanistic explanation to the catalysis by pyrazinamide and ethambutol of reaction between rifampicin and isoniazid in anti-TB FDCs. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.39, p.892-899, 2005.
- BIGANZOLI E, CAVENAGHI LA, ROSSI R, BRUNATI MC, NOLLI ML.. Use of a Caco-2 cell culture model for the characterization of intestinal absorption of antibiotics. **Farmaco**, 5, p.594–599, 1999.
- BOGMAN, K.; ZYSSET, Y.; DEGEN, L.; HOPFGARTNER, G.; GUTMANN, H.; ALSENZ, J.; *et al.* P-glycoprotein and surfactants: effect on intestinal talinolol absorption. **Clin Pharmacol Ther.**; v.77, p.24–32, 2005.
- BOLLELA, V.R.; SATO, D.N.; FONSECA, B.A.L. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. **Rev. Saúde Pública**, 33 (3), 281-286, 1999.
- BRASIL. Resolução RDC n.899, de 29 de maio de 2003. “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. (A agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento técnico para medicamentos genéricos). Via Internet, no endereço eletrônico <http://e-legis.bvs.br/leisref/publi/showAct.php?id=1237&word>. 2003.
- BRENNAN, M.J. The tuberculosis vaccine challenge, **Tuberculosis (Edinb)**, 85(1-2), 7-12, 2005.
- BRESSOLLE, F.; BROMET-PETIT, M. AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods: applications to pharmacokinetics. **Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications**, v.686, n.1, p.3-10, 1996.
- BURTON, P.S.; CONRADI, R.A.; GI, N.F.H.; HILGERS, A.R.; BORCHARDT, R.T. How structural features influence the biomembrane permeability of peptides. **J. Pharm. Sci.** v.85, p. 1336-1340, 1996.
- CAMENISCH G.; ALSENZ, J.; VAN DE WATERBEEMD, H.; FOLKERS, G. Estimation of permeability by diffusion through Caco-2 cell monolayers using the drugs’ lipophilicity and molecular weight. **Eur. J. Pharm. Sci.** v.6, p. 313-

319, 1998.

CASENGHI, M. **Development of new drugs for TUBERCULOSE chemotherapy: Analysis of the current drug pipeline**, Paris: Médecins Sans Frontières (MSF), 48 p.; 2006.

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

CHIOU, W. L.; CHUNG, S. M.; WU, T. C.; MA, C. A comprehensive account on the role of efflux transporters in the gastrointestinal absorption of 13 commonly used substrate drugs in humans. **Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.** v.39, p.93–101, 2001.

CHONG, S.; DANDO, S.A.; SOUCEK, K.M.; MORRISON, R.A. *In vitro* permeability through Caco-2 cells is not quantitatively predictive of *in vivo* absorption for peptide-like drugs absorbed via the dipeptide transporter system. **Pharm. Res.**, v.13, p.120-123, 1996.

COLLETT, A.; TANIANIS-HUGHES, J.; HALLIFAX, D.; WARHURST, G. Predicting p-glycoprotein effects on oral absorption: correlation of transportin Caco-2 with drug pharmacokinetics in wild-type and MDR1A(-/-) mice *in vivo*. **Pharm. Res.** v.21, n.5, p.819-826, 2004.

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

CUMMINS, C. L.; MANGRAVITE, L.M.; BENET, L. Z. Characterizing the expression of CYP3A4 and efflux transporters (P-gp, MRP1, and MRP2) in CYP3A4-transfected Caco-2 cells after induction with sodium butyrate and the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Pharm Res**, v.18, p.1102-9, 2001.

CUMMINS, C.L.; JACOBSEN, W.; CHRISTIANS, U.; BENET, L.Z. CYP3A4-transfected Caco-2 cells as a tool for understanding biochemical absorption barriers: studies with sirolimus and midazolam. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.308, n.1, p. 143-155, 2004.

DI PIETRO, A.; DAYAN, G.; CONSEIL, G.; STEINFELS, E.; KRELL, T.; TROMPIER, D.; BAUBICHON-CORTAY, H.; JAULT, J. M. P-glycoprotein-mediated resistance to chemotherapy in cancer cells: using recombinant cytosolic domains to establish structure-function relationships. **Braz. J. Med. Biol. Res.**

v. 32(8), p. 925-939, 1999.

DU TOIT, L.C.; PILLAY, V.; DANCKWERTS, M.P. Tuberculosis chemotherapy: current drug delivery approaches. **Respiratory Research**, 7:118. Disponível em <http://respiratory-research.com/content/7/1/118>, acessado em 03/10/2006.

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. **Arch. Biochem. Biophys.** v.284, p.338-345, 1991.

ENGMAN, H. Intestinal barriers to oral drug absorption – cytochrome P450 3A ABC-transport proteins. **Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations From the Faculty of Pharmacy.** v. 296, 2003.

FDA Guidance for Industry: Waiver of *In Vivo* Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms based on Biopharmaceutics Classification System. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, **Center for Drug Evaluation Research** (CDER), 2000.

FISHER, J.M.; WRINHTON, S.A.; CALAMINA, J.C.; SHEN, D.D.; KUNZE, K.L.; THUMMEL, K.E. Midazolam metabolism by modified Caco-2 monolayers: effects of extracellular protein binding. **J. Pharm. Exp. Ther.**; n. 289, p. 1143, 1999.

FOGH, J.; FOGH, J.M.; ORFEO, T. One hundred and twenty seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. **J. Natl Cancer Inst.**, v.91, p.221-226, 1977.

FOSSATI, L.; et al. Use of simulated intestinal fluid for Caco-2 permeability assay of lipophilic drugs, **International Journal of Pharmaceutics**, 360, 148–155, 2008.

FROMM, *et al.*; Differential induction of prehepatic and hepatic metabolism of verapamil by rifampicin. **Hepatology**, v.24, p. 796-801, 1996.

GAI, M. N. Influência dos alimentos sobre a biodisponibilidade dos medicamentos. In: STORPIRTIS *et al.*; **Biofarmacotécnica – Série Ciências Farmacêuticas**, 1 ed, p. 185-189, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2009.

GALLO, G.G, RADAELLI, P. Rifampicin In: FLOREY K (Ed.), **Analytical Profiles of Drug Substances**, London: Academic Press, 1976, p: 468-513.

- GANAPATHY, V.; HUANG, W.; WANG, H.; GANAPATHY, V.; LEIBACH, F. H. Valacyclovir: a substrate for the intestinal and renal peptide transporters PEPT1 and PEPT2. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 24, p. 470 – 475, 1998.
- GEICK, A.; EICHELBAUM, M.; BURK, O. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal mdr1 by rifampin. **J. Biol. Chem.** v. 276, p. 14581– 14587, 2001.
- GERSHANIK, T.; HALTNER, E.; LEHR, C.-M.; BENITA, S. Charge-dependent interaction of self-emulsifying oil formulations with Caco-2 cells monolayers: binding, effects on barrier function and cytotoxicity. **Int. J. Pharm.**, v. 211, p. 29-36, 2000.
- GINSKI, J.M.; POLLI, J.E. Prediction of dissolution/absorption relationships from a dissolution/ Caco-2 system. **Int. J. Pharm.**, v. 177, p. 117-125, 1999.
- GONÇALVES, J.E.; SOUZA, J.; STORPIRTIS, S. Avaliação da permeabilidade de fármacos empregando culturas celulares. In STORPIRTIS *et al*, **Biofarmacotecnica - Série Ciências Farmacêuticas**. Guanabara Koogan, 1ª Ed, Rio de Janeiro, 2009.
- GOODMAN, L.S.; HAYDEN, F.G.; *et al.* **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 9ª. edição , São Paulo: Mac Graw-Hill Interamericana, p.1160 , 1996.
- GRASS, G; SWEETANA, S. A correlation for permeabilities of passively transported compounds in monkey and rabbit jejunum. **Pharm. Res.**; v.6, p. 857-862, 1989.
- GREINER, B.; *et al.* The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. **The J. Clin. Invest.** v.104, n.2, p. 147-153, 1999.
- GUILLERM, M.; USDIN, M.; ARKINSTALL, J. **Tuberculosis diagnosis and drug sensitivity testing: An overview of the current diagnostic pipeline**. Paris: Médecins Sans Frontières (MSF), 36 p.; 2006.
- HAGENBUCH, B.; MEIER, P. J. The superfamily of organic anion transporting polypeptides. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1609, p. 1-18, 2003.
- HANSEN, M.B.; NIELSEN S.E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill, **J. Immunol. Methods**, n.119, p. 203–210, 1989.
- HARTKOORN R.; C.; KHOO S.; BACK D. J.; TJIA J. F.; WAITT C. J. W.; CHAPONDA M.; DAVES G.; ASHELIGH A. A.; WARD S. A.. A rapid and

- sensitive HPLC–MS method for the detection of plasma and cellular rifampicin. **Journal of Chromatography B**, 857, p.76–82, 2007.
- HASLAM, I.S.; JONES, K.; COLEMAN, T.; SIMMONS,N.L. Induction of P-glycoprotein expression and functions in human intestinal epithelial cells (T84). **Biochem. Pharm.**, v.78, p. 850-861, 2008.
- HENWOOD, S.Q.; DE VILLIERS, M.M.; LIEBENBERG, W.; LÖTHER, A.P. Solubility and dissolution properties of generic rifampicin raw materials, **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 26(4), 403-408, 2000.
- HIDALGO, I H.; Cultured intestinal epithelial cell models. In: T Borchardt, PL Smith, G Wilson, eds. **Models or Assessing Drug Absorption and Metabolism**. New York: Plenum Press, 35-50, 1996.
- HIDALGO, I.J. Assessing the absorption of New Pharmaceuticals, **Curr. Topics in Medicinal Chemistry**, v.1, p.385-401, 2001.
- HOCHMAN, J.H.; CHIBA,M.; YAMAZAKI,M.; TANG, C.; LIN, J. H. P-glycoprotein-mediated efflux of indinavir metabolites in Caco-2 cells expressing cytochrome P450 3A4. **J Pharmacol Exp Ther**, v . 298, p. 323-30, 2001.
- HOLTEBECKER, *et al.*; The nifedipine-rifampicin interaction. Evidencee of gut wall metabolism. **Drug Metab. Dispos.** v. 24, p.1121-1123, 1996.
- HORTER, D.; DRESSMAN, J.B.Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract, **Adv.Drug Deliv. Rev.** n.46, p75-83, 2001.
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). **ICH Q8: Pharmaceutical Development**, Current Step 4 version, 10 November 2005, 7pp.
- ISO – International Organization for Standardization. ISO 10993-5 – Biological Evaluation of medical devices. Part 5: Testes for *in vitro* cytotoxicity, 3^a Ed, ISO, 2009.
- IRVINE, J.D.; TAKAHASHI, L.; LOCKHART, K.;CHEONG, J.; TOLAN, J.W.; SELICK, H.E.; GROVE, J.R. MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: a tool for membrane permeability screening. **J. Pharm. Sci.**, v. 88, p. 28-33, 1999.
- ITO, K.; KUSUHARA, H.; SUGIYAMA, Y. Effects of intestinal CYP3A4 and Pglycoproteinon oral drug absorption--theoretical approach. **Pharm Res**, v.16, p.225-31, 1999.

- JOHNSON, B. M.; CHARMAN, W.N.; PORTER, C. J. The impact of Pglycoprotein efflux on enterocyte residence time and enterocyte-based metabolism of verapamil. **J Pharm Pharmacol**, v. 53, p.1611-9, 2001.
- JULIANO, R. L.; LING, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants, **Biochim. Biophys. Acta.**; n.455, p.152–162, 1976.
- KANO, E.K.; SERRA, C.H.R.; KOONO, E.E.; SCHRAMM, S.G.; PORTA, V. Determination of lamivudine in human plasma by HPLC and its use in bioequivalence studies. **International Journal of Pharmaceutics** v. 297, n. 1-2, p. 73-79, 2005.
- KANSY, M.; SENNER, F.; GUBERNATOR, K.; Physicochemical high throughput screening, parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. **J. Med. Chem.** v.41, p.1007-1010, 1998.
- KARLSSON, J.; UNGELL, A.; GRASJO, J.; ARTURSSON, P. Paracellular drug transport across intestinal epithelia: influence of charge and induced water flux. **Eur. J. Pharm. Sci.** n. 9, p. 47-56, 1999.
- KARLSSON, J.; WIKMAN, A.; ARTURSSON, P. The mucus layer as a barrier to drug absorption in monolayers of human intestinal HT29-H goblet cells. **Int. J. Pharm.** v. 99, p.209-218, 1993.
- KERNS, E. H. High throughput physicochemical profiling for drug discovery. **J. Pharm. Sci.** v. 90, p.1838-44, 2001.
- KIM J.-S.; MITCHELL, S.; KIJEK, P.; TSUME, Y.; HILFINGER, J.; AMIDON, G. L. The Suitability of an in Situ Perfusion Model for Permeability Determinations: Utility for BCS Class I Biowaiver Requests. **Mol. Pharm.** v. 3, n.6, p. 686-94, 2006.
- KOBAYASHI, D.; NOZAWA, T.; IMAI, K.; NEZU, J.; TSUJI, A.; TAMAI, I. Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP (SLC21A9) in pH-dependent transport across intestinal apical membrane. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 306, p.703-708, 2003.
- KOBAYASHI, M.; SADA, N.; SUGAWARA, M.; ISEKI, K.; MIYAZAKI, K. Development of a new system for prediction of drug absorption that takes into account drug dissolution and pH change in the gastro-intestinal tract. **Int. J. Pharm.**, v. 221, p. 87-94, 2001.

- KOLARS, J. C.; SHMEDLIN, P.; SCHUELZ, J. D.; FANG, C.; WATKINS, P. B. Identification of rifampicin-inducible P450III_{A4} (CYP3A4) in human small bowel enterocytes. **J. Clin. Invest.** n. 90, p. 1871-1878, 1992.
- KOLJONEN M.; HAKALA K S.; AHTOLA-SAˆTILA T.; LAITINEN L. A.; KOSTIAINEN R.; KOTIAHO T.; KAUKONEN A. N.; HIRVONEN J. Evaluation of cocktail approach to standardise Caco-2 permeability experiments. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 64, 379–387, 2006.
- KRISHNA, D. R.; KLOTZ, U. Extrahepatic metabolism of drug in humans. **Clin. Pharmacok.** n. 26, p. 144-160, 1994.
- KRISHNA, G.; CHEN, K.J.; LIN, C.C.;NOMEIR, A.A. Permeability of lipophilic compounds in drug discovery using in vitro human absorption model, Caco-2 cell. **Int. J. Pharm.**; 222, 77-89, 2001.
- KRISHNA, G.; CHEN, K. J.; LIN, C. C.; NOMEIR, A. Estimation of permeability in Caco-2 monolayer of compounds that exhibit extensive nonspecific binding. **Pharm. Res.** suppl. 1,S-8, 1998.
- KUEHL, P.; *et al.*, Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A expression. **Nat Genet.**, v. 27, p. 383 - 391, 2001.
- LAMPEM, *et al.*; Metabolism of the immunosuppressant tacrolimus in the small intestine: cytochrome P450, drug interactions, and interindividual variability. **Drug Met. Dispos**, v.23, p. 1315-1324, 1995;
- LARHED, W.A.; ARTURSSON, P.; BJÖRK, E. The influence of intestinal mucous components on the diffusion of drugs. **Pharm. Res.** N.15, p.66-71, 1998.
- LAURENT, S.; BENET, L. Modulation of P-glycoprotein expression by cytochrome P450 inducers in male and female rat livers. **Biochemical Pharmacology**, v.55, p 387-395, 1998.
- LE GUELLEC C.; GAUDET M.-L.; LAMANETRE S.; BRETEAU M. Stability of rifampin in plasma : Consequences for therapeutic monitoring and pharmacokinetic studies. **Therapeutic drug monitoring**, vol. 19, n°6, pp. 669-67, (1997).
- LEHMANN, J.M.; MCKEE, D.D.; WATSON, M.A.; WILLSON, T.M.; MOORE, J.T.; KLIEWER; S.A.. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. **J. Clin. Invest.** v.102, p.1016– 1023, 1998.

- LENNERNÄS, H. Human intestinal permeability. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.87, n.4, p. 403 – 410, 2000.
- LENNERNAS, H.; *et al.*; Regional jejunal perfusion, a new *in vivo* approach to study oral drug absorption in man. **Pharm. Res.**, v. 9, p. 1243- 1251, 1992.
- LENTZ, K.A.; HAYASHI, J.; LUCISANO, L.J.; POLLI, J.E. Development of a more rapid, reduced serum culture system for Caco-2 monolayers and a application to the biopharmaceutics classification system. **Int. J. Pharm.**, v. 200, p. 41-51, 2000.
- LEVEILLE-WEBSTER, C. R.; ARIAS, I.M. The biology of the P-glycoproteins. **J Membr Biol** v. 143, p. 89-102, 1995.
- LIN, J. H.; LU, A. Y. H. Role of Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Discovery and Development. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**. vol. 49, n. 4, p.403-449, 1997.
- LIU, J.; SUN, J.; ZHANG, W.; GAO, K.; HE, Z. HPLC determination of rifampicin and related compounds in pharmaceuticals using monolithic column. **J Pharm Biomed Anal**. v.46(2), p.405-9, 2008.
- LIU, X-Y.; NAKAMURA, C.; YANG, Q.; KAMO, N.; MIYAKE, J. Immobilized liposome chromatography to study drug-membrane interactions. Correlation with drug absorption in humans. **J. Chromatogr A**, v .961: p.113-118, 2002.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta C(T)) method. **Methods**, v. 25, p.402-408, 2001.
- LOWN, K. S.; FONTANA, R. J.;SCHMIEDLIN-REN, P.; TURGEON, D. K.; WATKINS, P. B.; Interindividual variation in intestinal MDR1 expression: lack of short term diet effects, **Gastroenterology**, n.108, A737, 1995.
- LUO, F.R.; PARANJPE, P.V.; GUO, A.; RUBIN, E.; SINKO, P. transport of irinotecan in Caco-2 cells and MDCK II cells over expressing efflux transporters Pgp, cMOAT, and MRP1. *Drug Metab. Dispos.*, v. 30, p. 763-70, 2002.
- MACKAY, M; WILLIAMSON, I.; HASTEWELL, J. Cell biology of epithelia. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v.7, p. 313-338, 1991.
- MAGGI, N.; PASQUALUCCI C.R.; BALLOTTA R.; SENSI, P. Rifampicin: a new orally active rifamycin. **Chemotherapy**,v.11, n.5, p.285-92, 1966.

- MAGNARIN M.; *et al.*; Induction of proteins involved in multidrug resistance (P-glycoprotein, MRP1, MRP2, LRP) and of CYP 3A4 by rifampicin in LLC-PK1 cells. **European Journal of Pharmacology**, v.483, p.19– 28, 2004.
- MAINARDES, R.M.; PALMIRA, D.; GREMIÃO, M. Reversed phase HPLC determination of zidovudine in rat plasma and its pharmacokinetics after a single intranasal dose administration. **Biol Res.** v.42, n.3, p.357-64. 2009.
- MAKHEY, V.D.; GUO, A.; NORRIS D.A.; H.U. P.; YAN, J.; SINKO, P.J. Characterization of the regional intestinal kinetics of drug efflux in rat and human intestine and in Caco-2 cells. **Pharm Res.**; v. 15, p.1160-7, 1998.
- MANDARA, J.L.; TRIER, J.S. The functional morphology of the mucosa of the small intestine. In *Physiology of the gastrointestinal tract*. Ed R. Johnson (Raven Press, New York), 1577p, 1994.
- MARIAPPAN T. T.; SINGH S. Evidence of Efflux-Mediated and Saturable Absorption of Rifampicin in Rat Intestine Using the Ligated Loop and Everted Gut Sac Techniques **Molecular Pharmaceutics**, v.1, n.5, p. 363–367, 2004.
- MARIAPPAN, T.T.; SINGH S. Positioning of Rifampicin in the Biopharmaceutics Classification System (BCS). **Clinical Research and Regulatory Affairs**, 23(1), 1-10, 2006.
- MENON, R.M.; BARR, W.H. Comparison of ceftibuten transport across Caco-2 cells and rat jejunum mounted on modified Using chambers. **Biopharm. Drug Dispos.**; v. 24, p. 299-308, 2003.
- MOSMANN, T.; Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, n.65, p. 55-63, 1983.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger – **Principles of Biochemistry**, 4 ed, 2006.
- NEUHOFF, S.; UNGELL, AL.; ZAMORA, I.; ARTURSSON P. pH-dependent bidirectional transport of weakly basic drugs across Caco-2 monolayers: implications for drug-drug interactions. **Pharm Res.**; 20(8), p.1141-1148, 2003.
- NEUHOFF, S.; UNGELL, AL.; ZAMORA, I.; ARTURSSON P. pH dependent passive and active transport of acidic drugs across Caco-2 monolayers. **Eur. J. Pharm. Sci.** v. 25, n. 2-3, p. 211-220, 2005.
- O'BRIEN, R.J.; NUNN, P.P. The need for new drugs against tuberculosis: Obstacles, opportunities, and next steps. **Am J Respir Crit Care Med**, 162, 1055–1058, 2001.

- OLLILA, F.; HALLING, K.; VUORELA, P.; VUORELA, H.; SLOTTE, P. Characterization of flavonoid-biomembrane interactions. **Arch. Biochem. Biophys.** v.399, p. 103-108, 2002.
- OZDEMIR, V. *et al.*, Evaluation of the genetic component of variability in CYP3A4 activity: a repeated drug administration method. **Pharmacogenetics**, v.10, p.373-338, 2000.
- PACIFICI, G. M.; ELIGI, M.; GUILIANI, L. (b) and (-) terbutaline are sulphated at a higher rate in human intestine than in liver. **Eur. J. Clin. Pharmacol.** N.45, p.483–487, 1993.
- PAINE, M. F.; *et al.*; First-pass metabolism of midazolam by the human intestine. **Clin. Pharmacol. Ther.** n. 60, p. 14-24, 1996.
- PALM, K.; STENBERG, P.; LUTHMAN, K.; ARTURSSON, P. Polar molecular surface properties predict the intestinal absorption of drugs in humans. **Pharm. Res.** v.14p. 568-571, 1997.
- PANCHAGNULA, R.; AGRAWAL, S. Biopharmaceutic and pharmacokinetics aspects of variable bioavailability of rifampicin, **International Journal of Pharmaceutics**, 271,1-4, 2004.
- PANCHAGNULA, R.; BEDI, S.; YASVANTH, A. Rifampicin: Polymorphism or Crystal Defects, **Clinical Research and Regulatory Affairs**, 23(2), 71-83, 2006.
- PINTO, M.; *et al.*, Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. **Biol. Cell**, v.47, p.323-330, 1983.
- PRUEKSARITONONT, T.; GORHAM, L. M.; HOCHMAN, J. H.; TRAN, L. O.; VYAS, K. P. Comparative studies of drug metabolizing enzymes in dog, monkey and human small intestines and in Caco-2 cells, **Drug Metab. Disp.**; n. 24, p.634–642, 1996.
- QUARONI, A.; HOCHMAN, J. Development of intestinal cell culture models for drug transport and metabolism studies. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v.22, n.1, p. 3-53, 1996.
- REGARDH, C. G.; *et al.*; Pharmacokinetics of fleplodipine in patients with liver disease. **Eur. J. Clin. Pharmacol.** N.36, p. 437- 439, 1989.
- RUBAS, W.; JEZYK, N.; GRASS, G.M. Comparison of the permeability characteristics of a human colonic epithelial (Caco-2) cell line to colon of rabbit,

monkey, and dog intestine and human drug absorption. *Pharm. Res.*, v. 10, p. 113-118, 1993.

RUTISHAUSER, B. R.;- BRAUN, A.; GÜNTHERT, M.; WUNDERLI-ALLENSPACH, H. Formation of Multilayers in the Caco-2 Cell Culture Model: A Confocal Laser Scanning Microscopy Study. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 4 p.460-465, 2000.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3 Ed, Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2344p, 2001.

SHARGEL L, WU-PONG S, YU ABC. **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**, 5^a. Ed., McGraw-Hill, 2005.

SCHMIDT, E.; KELLYB, S.M.; VAN DER WALLE, C.F. Tight junction modulation and biochemical characterisation of the zonula occludens toxin C-and N-termini **FEBS Letters**, n.58, 2974–2980, 2007.

SHIMADA, T.; TSUMURA, F.; YAMAZAKI, H. Prediction of human liver microsomal oxidations of 7-ethoxycoumarin and chlorzoxazone with kinetic parameters of recombinant cytochrome P-450 enzymes. **Drug Metab Dispos** v.27, p.1274–1280, 1999.

SHISHOO, C.J.; SHAH, S.A.; RATHOD, I.S.; SAVALE, S.S.; KOTTECHA, J.S.; SHAH, P.B. Stability of rifampicin in the dissolution medium in presence of isoniazid, **International Journal of Pharmaceutics**, 190, 109-123, 1999.

SHISHOO, C.J.; SHAH, S.A.; RATHOD, I.S.; SAVALE, S.S.; VORA, M.J. Impaired bioavailability of rifampicin in presence of isoniazid from fixed dose combination (FDC) formulation, **International Journal of Pharmaceutics**, n. 228, p.53-67, 2001.

SINGH, S.; MARIAPPAN, T.T.; SANKAR, R.; SARDA, N. SINGH, B. A critical review of probable reasons for the poor/variable bioavailability of rifampicin from anti-tubercular fixed-dose combination (FDC) products, and the likely solutions to the problem. **International Journal of Pharmaceutics**, 228, 5-17, 2001.

SOUZA, J.; BENET, L. Z.; HUANG, Y.; STORPIRTIS, S. Comparison of Bidirectional Lamivudine and Zidovudine Transport Using MDCK, MDCK–MDR1, and Caco-2 Cell monolayers **J. Pham. Sciences**, v. 98, n. 11, 2009.

SOUZA, J.; FREITAS, Z. M. F.; STORPIRTIS, S. Modelos in vitro para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação

- dissolução/absorção. RBCF. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 515-527, 2007.
- STENBERG, P.; LUTHMAN, K.; ARTURSSON, P. Virtual screening of intestinal drug permeability. **J. Control Release**. v. 65, p. 231-243, 2000.
- STEWART, B.H.; *et al.*, Comparison of intestinal permeabilities determined in multipole *in vitro* and *in situ* models: Relationship to absorption in humans. **Pharm. Res.**, v.12, p 693-699, 1995.
- STORPIRTIS, S.; OLIVEIRA, P.G.; RODRIGUES, D.; MARANHO, D. Considerações biofarmacotécnicas para a fabricação de medicamentos genéricos: fatores que afetam a dissolução e a absorção de fármacos. **Rev. Bras. Ciên. Farm.** v. 35, p.1-16, 1999.
- STORPIRTIS, S.; GAI, M. N. Biofarmacotécnica: Princípios de Biodisponibilidade, Bioequivalência, Equivalência Farmacêutica, Equivalência Terapêutica e Intercambialidade de Medicamentos. In STORPIRTIS *et al*, **Biofarmacotécnica - Série Ciências Farmacêuticas**. Guanabara Koogan, 1^a Ed, Rio de Janeiro, 2009.
- SURENDRAN, N.; COVITZ, K-M.Y.; HAN, H.; SADEE, W.; OH, D.M.; AMIDON, G.L.; WILLIAMSON, R.M.; BIGGE, C.F.; STEWART, B.H. Evidence for overlapping substrate specificity between large neutral amino acid (LNAA) and dipeptide (hPEPT1) transporters for PD 158473, an NMDA antagonist. **Pharm. Res.** v .16, p.391-395, 1999.
- SYNOLD, T. W.; DUSSAULT, I.; FORMAN, B.M. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. **Nat Med**, v.7, p. 584- 90, 2001.
- TAILLARDAT-BERTSCHINGER A.; MARCA MARTINET, C.A.; CARRUPT, P-A.; REIST, M.; CARON, G.; FRUTTERO, R.; TESTA, B. Molecular factors influencing retention on immobilized artificial membranes (IAM) compared to partitioning in liposomes and n-octanol. **Pharm. Res.** v.19, p. 729-737, 2002.
- TAVELIN, S.; *et al.*; Prediction of the oral absorption of low-permeability drugs using small intestine-like 2/4/A1 cell monolayers. **Pharm Res.**, v. 20, p. 397-405, 2003.
- TAVELIN, S.; MILOVIC, V.; OCKLIND, G.; OLSSON, S.; ARTURSSON, P. A conditionally immortalized epithelial cell line for studies of intestinal drug transport. **J. Pharm. Exp. Ther.** v.290, p. 1212-1221, 1999.

- THUMMEL, K. E.; *et al.*, Use of midazolam as a human cytochrome P4503A probe II. Characterization of inter and intraindividual hepatic CYP3A after liver transplantation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** V 271, p.557-566, 1994.
- TSUJI, A.; TAMAI, I. Carrier – mediated intestinal transport of drugs. **Pharm. Res.** v.13, p. 963-977, 1996.
- TURNER, J.R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease_ **Nature Reviews Immunology**, n.9, p.799–809, 2009.
- UNGELL, A.L. *In vitro* absorption studies and their relevance to absorption from the GI tract. **Drug Dev. Indust. Pharm.**, v.23,p 879-892, 1997.
- UNITED States Pharmacopeia: USP 28; The National Formulary: NF 23. Rockville: **United States Pharmacopeia Convention.** p.1727, 2005.
- UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. **Guidance for industry: bioanalytical method validation.** 25p, 2001.
- VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time Quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v.3, n.34, p. 1-34, 2002.
- VELAGALETI, R.; BURNS, P.K.; GILL, M. Analytical support for drug manufacturing in the United States – Ingredient synthesis to drug product shelf life, **Drug Information Journal**, 37, 407-438, 2003.
- VENTER, J.C.; ADAMS, M. D.; MYERS, E. W.; LI, P. W.; MURAL, R. J. SUTTON, G. G.; SMITH, H. O.; YANDELL, M., EVANS, C. A., HOLT, R. A.; *et al.* The sequence of the human genome. **Science.** v. 291, p. 1305-1351, 2001.
- WACHER, V. J.; SILVERMAN, J. A.; ZHANG, Y.; BENET, L. Z. Role of P-glycoprotein and cytochrome P4503A in limiting oral absorption of peptides and peptidomimetics, **J. Pharm. Sci.**; v.87, p.1322–1330, 1998.
- WACHER, V. J.; WU, C.Y.; BENET, L. Z. Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy. **Mol Carcinog**, v.13, p.129-34, 1995.
- WATERBEEMD, H.V.; GIFFORD, E. ADMET *in silico* modeling: Towards prediction paradise? **Nature Publishing Group**, v.2, p. 192-204, 2003.

- WATKINS, P. B. The barrier function of CYP3A4 and P-glycoprotein in the small bowel. **Adv Drug Deliv.**, n. 27, p. 161-170, 1997.
- WESTPHAL, K.; *et al.* Induction of P-glycoprotein by rifampin increases intestinal secretion of talinolol in human beings: A new type of drug/drug interaction. **Clinical Pharm. Therap.** v.68, n. 4, p.345-355, 2000.
- WHO, **Model list of essential medicines**, 14th edition, 2005.
- WHO, **Technical Report Series**, No. 937, Annex 8 Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for WHO Model List of Essential Medicines immediate-release, solid oral dosage forms, 2006.
- WHO/CDS/TUBERCULOSE/99.274. **Establishing the bioequivalence of rifampicin in the fixed dose formulations containing isoniazid with or without pyrazinamide and/or etambutol compared to single drug reference preparations administered combination (Model Protocol)**, World Health Organization, 1999, 47 p.
- WILS, P.; WARNEY, A.; PHUNG-PA, V.; LEGRAIN, D.; SCHERMAN, J. High lipophilicity decreases drug transport across intestinal epithelial cells. **J. Pharm. Exp. Ther.** v. 269, p.654-658, 1994.
- WILSON, G.; HASSAN, I.F.; DIX, C.J.; WILLIANSO, I.; MACKAY, M. Transport and permeability properties of human Caco-2 cells. An *in vitro* model for intestinal epithelial cell barrier. **J. Control. Release**, v.11, p.25-40, 1990.
- WU, C.Y.; BENET, L. Z.; HEBERT, M .F.; GUPTA, S. K.; ROWLAND, M.; GOMES, D. Y.; WACHER, V. J. Differentiation of absorption and first pass gut and hepatic metabolism in humans: Studies with cyclosporin, **Clin. Pharmac. Ther.**; n. 58, p 492, 1995.
- WU, C.Y.; BENET, L. Z. Predicting Drug Disposition via Application of BCS: Transport/Absorption/ Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 1, p. 11-23, 2005.
- WU, X.; HUANG,W.; PRASSAD, P. D.; SETH, P.; RAJAN, D. P.; LLEIBACH, F. H.; CEHN, J.; CONWAY, S. J.; GANAPATHY, V. Functional characteristics and tissue distribution pattern of organic cation transporter 2 (OCTN2), an organic cation/carnitine transporter. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 290, p. 1482-1849, 1999.
- YAMASHITA, S. *et al.*; Optimized conditions for prediction of intestinal drug

- permeability using Caco-2 cell. **Eur J. Pharm. Sci**, 10, 195-204, 2000.
- YEE S. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man-fact or myth. **Pharm Res.**; 14, p.763–766, 1997.
- YEN, T.E.; AGATONOVIC-KUSTRIN, S.; EVANS, A.M.; NATION, R.L.; RYAND, J. X Prediction of drug absorption based on immobilized artificial membrane (IAM) chromatography separation and calculated molecular descriptors. **J. Pharm. Biomed. Anal.** v.38: p.472-478, 2001.
- ZHANG, Y.; The magic bullets and tuberculosis drug targets, **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**; 45, 529–64, 2005.