UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Avaliação dos mecanismos envolvidos na permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio dos modelos *ex vivo* (células de Franz) e *in vitro* (PAMPA)

André Bersani Dezani

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientadora:

Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra

São Paulo
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Avaliação dos mecanismos envolvidos na permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio dos modelos *ex vivo* (células de Franz) e *in vitro* (PAMPA)

André Bersani Dezani

Versão original

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientadora:

Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra

São Paulo
2017

Autorizo a reprodução e divulgação parcial ou total deste trabalho, por meio impresso ou eletrônico, para fins de estudo e/ou pesquisa, desde que citada a fonte.

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

Dezani, André Bersani
D532av Avaliação dos mecanismos envolvidos na permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio dos modelos *ex vivo* (células de Franz) e *in vitro* (PAMPA) / André Bersani Dezani. -- São Paulo, 2017.
406p.

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

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

615.4b CDD

André Bersani Dezani

Avaliação dos mecanismos envolvidos na permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio dos modelos *ex vivo* (células de Franz) e *in vitro* (PAMPA)

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do grau de DOUTOR

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

_____
Profa. Dra. Sílvia Storpirtis

_____
Profa. Dra. Patrícia Santos Lopes

_____
Profa. Dra. Josilene Chaves Ruela Corrêa

_____
Profa. Dra. Juliana Mazza Reis

São Paulo, __ de março de 2017.

Foi uma longa estrada vindo de lá até aqui.
Foi um longo tempo,
Mas minha hora finalmente se aproxima [...]
Porque eu tenho fé no coração
Eu vou onde meu coração me levar
Eu tenho fé para acreditar
Eu posso fazer qualquer coisa
Eu tenho força na alma
E ninguém vai me torcer ou barrar
Eu posso alcançar qualquer estrela
Tenho fé, tenho fé, fé no coração.

Diane Warren
Interpretado por Rod Stewart
Música tema em Star Trek: Enterprise

Dedico este trabalho aos meus pais Edison e Sueli,

à minha irmã Carla

e à minha querida esposa Thaisa.

Bem-aventurado o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire conhecimento.

Provérbios 3:13

Agradecimentos

Aos meus queridos pais Edison e Sueli pela paciência, apoio e constante incentivo na realização deste trabalho.

À minha querida esposa Thaisa pelo esforço em ajudar-me, pelo incentivo e, principalmente, pelo companheirismo em todos os momentos durante a realização deste trabalho.

À minha irmã Carla pela compreensão e apoio nos momentos difíceis.

À Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra pela confiança depositada em mim, pelas palavras de incentivo, apoio, paciência e compreensão em todos os momentos difíceis durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Claudinéia e ao Edgar pelo incentivo e amizade.

Ao amigo Marco Aurélio Lamolha pela amizade e apoio.

Aos colegas Marina, Juliana Reis, Juliana Maura, Mônica Coquemala, Michelle Barão, Ruberlan Santos e Thaisa Dezani pelas contribuições e pela compreensão.

À amiga Mônica Coquemala pela contribuição, amizade e muitas risadas.

Ao Prof. Dr. Leslie Z. Benet pela confiança, apoio e ajuda prestada no estágio desenvolvido no exterior, realizado em seu laboratório na Universidade da Califórnia em San Francisco.

Aos novos amigos do *Benet group*: Rosa Chan, Hsin-Fang, Chelsea Cojocari, Mark Yago, Christine Bowman, Xin Huang, Hideaki Okochi, Alan Wolfe, Jin Dong e Frances Peterson.

À Marisa Rizzi (supervisora de P&D) da Cristália pela doação das matérias-primas e padrões de referência e pela atenção dispensada.

Aos secretários Bete, Irineu, Alexandre e David pela atenção, paciência e dedicação.

Aos funcionários da biblioteca do Conjunto das Químicas pela elaboração da ficha catalográfica e pela atenção dispensada.

A todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq, à CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

SUMÁRIO I
LISTA DE QUADROS X
LISTA DE FIGURAS XIII
LISTA DE TABELAS XVIII
APRESENTAÇÃO.....23
RESUMO 28
ABSTRACT 31
OBJETIVO 34
OBJETIVO GERAL 35
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....35
CAPÍTULO 1: ASPECTOS BIOFARMACÊUTICOS RELACIONADOS À CARACTERIZAÇÃO DE FÁRMACOS 36
1.1 SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA (SCB) E SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA DE DISTRIBUIÇÃO DE FÁRMACOS (SCBDF): APLICAÇÕES NO DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS E NOS PROCESSOS DE BIOISENÇÃO.....37
RESUMO 38
INTRODUÇÃO 40
SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA (SCB).....42
SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA DE DISTRIBUIÇÃO DE FÁRMACOS (SCBDF).....48
RELAÇÃO ENTRE SCB E SCBDF 54
CONCLUSÃO 58
REFERÊNCIAS.....61
1.2 MÉTODOS IN VITRO E EX VIVO EMPREGADOS NA AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL DE FÁRMACOS.....66
RESUMO 67
INTRODUÇÃO 69
TRATO GASTRINTESTINAL (TGI) 72
MECANISMOS DE PERMEABILIDADE DE FÁRMACOS 76
MÉTODOS *IN VITRO* E *EX VIVO* EMPREGADOS NA AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE 78
Métodos *in vitro* não biológicos.....79

Membranas artificiais imobilizadas (MAI) 80
Membranas artificiais paralelas (PAMPA) 81
Métodos *in vitro* biológicos 85
Caco-2 86
MDCK 88
Co-cultura de células 90
Modelos *ex vivo* 91
Saco intestinal invertido 92
Câmaras de difusão horizontal tipo Ussing e câmaras de difusão vertical tipo Franz 94
PREDIÇÃO DA ABSORÇÃO *IN VIVO* 98
CONCLUSÃO 101
REFERÊNCIAS 103
1.3 PRINCIPAIS ASPECTOS CONSIDERADOS NA AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE EFLUXO PELA P-GP NOS ENSAIOS DE PERMEABILIDADE INTESTINAL 111
RESUMO 112
INTRODUÇÃO 114
GLICOPROTEÍNA-P (P-GP) 119
INIBIDORES DE P-GP 124
MÉTODOS EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE P-GP NA PERMEABILIDADE 128
MÉTODOS *IN VITRO* 130
MDCK e MDCK-MDR1 130
Caco-2 132
MÉTODOS *EX VIVO* COM EMPREGO DE SEGMENTOS INTESTINAIS ISOLADOS 133
MÉTODOS DE PERFUSÃO *IN SITU* 134
CONCLUSÃO 136
REFERÊNCIAS 139
1.4 PRINCIPAIS ASPECTOS RELACIONADOS AO METABOLISMO INTESTINAL E SUA INFLUÊNCIA NA ABSORÇÃO DE FÁRMACOS 149
RESUMO 150
INTRODUÇÃO 152
ENZIMAS NO TGI 155

MÉTODOS UTILIZADOS NA AVALIAÇÃO DO METABOLISMO INTESTINAL.....156
Modelos *in vitro*.....157
Células Caco-2 e MDCK.....157
Microssomas 160
Métodos *ex vivo*.....161
Homogenato intestinal 161
Saco intestinal invertido.....161
Segmentos intestinais em câmaras de difusão 162
Métodos de perfusão *in situ*.....163
CONCLUSÃO 165
REFERÊNCIAS.....168

CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DOS FÁRMACOS ANTIRRETROVIRAIS POR MEIO DOS MODELOS *IN VITRO* PAMPA E *EX VIVO* EM CÂMARAS DE DIFUSÃO VERTICAL TIPO FRANZ.....173

RESUMO 174
INTRODUÇÃO 176
MATERIAIS E MÉTODOS 183
MATERIAIS 184
ESTUDO DE PERMEABILIDADE POR MEIO DO MODELO *IN VITRO* PAMPA 184
ESTUDO DE PERMEABILIDADE POR MEIO DO MODELO *EX VIVO* EM CÂMARAS DE DIFUSÃO VERTICAL TIPO FRANZ 187
RESULTADOS E DISCUSSÕES 190
ESTUDO DE PERMEABILIDADE POR MEIO DO MODELO *IN VITRO* PAMPA 191
ESTUDO DE PERMEABILIDADE POR MEIO DO MODELO *EX VIVO* EM CÂMARAS DE DIFUSÃO VERTICAL TIPO FRANZ 200
MÉTODO *IN VITRO* PAMPA *VERSUS* MÉTODO *EX VIVO* EM CÂMARAS DE DIFUSÃO VERTICAL TIPO FRANZ 206
CONCLUSÃO 208
REFERÊNCIAS.....210

CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO FÁRMACO-CARREADOR DE EFLUXO DOS FÁRMACOS ANTIRRETROVIRAIS POR MEIO DOS MODELOS *IN VITRO* MDCK-MDR1 E *EX VIVO* EM CÂMARAS DE DIFUSÃO VERTICAL TIPO FRANZ.....216

RESUMO 217
INTRODUÇÃO 219
MATERIAIS E MÉTODOS 223
MATERIAIS 224
PREPARO DAS CULTURAS CELULARES MDCK-MDR1 225
PREPARO DOS SEGMENTOS INTESTINAIS 226
AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS MDCK-MDR1 E DOS SEGMENTOS INTESTINAIS UTILIZADOS NOS ESTUDOS DE PERMEABILIDADE 226
ESTUDO DO TRANSPORTE BIDIRECIONAL DE FÁRMACOS POR MEIO DO MODELO *IN VITRO* USANDO MDCK-MDR1 227
ESTUDO DO TRANSPORTE DE EFLUXO POR MEIO DO MODELO *EX VIVO* EM CÂMARAS DE DIFUSÃO VERTICAL TIPO FRANZ 228
CÁLCULO DA PERMEABILIDADE APARENTE (PAPP) 229
RESULTADOS E DISCUSSÕES 230
AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS MDCK-MDR1 E DOS SEGMENTOS INTESTINAIS UTILIZADOS NOS ESTUDOS DE PERMEABILIDADE 231
ESTUDO DO TRANSPORTE BIDIRECIONAL DE FÁRMACOS POR MEIO DO MODELO *IN VITRO* USANDO MDCK-MDR1 234
ESTUDO DO TRANSPORTE DE EFLUXO POR MEIO DO MODELO *EX VIVO* EM CÂMARAS DE DIFUSÃO VERTICAL TIPO FRANZ 237
CONCLUSÃO 243
REFERÊNCIAS 245

CAPÍTULO 4: AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA ENZIMA CYP3A NA PERMEABILIDADE DE FÁRMACOS ANTIRRETROVIRAIS POR MEIO DOS MODELOS *IN VITRO* EM MICROSSOMAS E *EX VIVO* EM CÂMARAS DE DIFUSÃO VERTICAL TIPO FRANZ 250

RESUMO 251
INTRODUÇÃO 253
MATERIAIS E MÉTODOS 257
MATERIAIS 258
METABOLISMO PRÉ-SISTÊMICO EM SEGMENTOS INTESTINAIS 258
METABOLISMO PRÉ-SISTÊMICO EM MICROSSOMAS 260
PREPARO DA SUSPENSÃO REACIONAL DE MICROSSOMAS 260

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DA SUSPENSÃO REACIONAL DE MICROSSOMAS 261
EXPERIMENTOS DE METABOLISMO EM MICROSSOMAS 261
PORCENTAGEM DE METABOLIZAÇÃO 262
ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS 262
RESULTADOS E DISCUSSÕES 263
METABOLISMO PRÉ-SISTÊMICO EM SEGMENTOS INTESTINAIS E EM MICROSSOMAS ...264
CONCLUSÃO 273
REFERÊNCIAS 275

CAPÍTULO 5: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICOS 279

5.1 Desenvolvimento e validação do método espectrofotométrico para a quantificação dos fármacos antirretrovirais nos estudos de permeabilidade por meio do modelo *in vitro* PAMPA 280
RESUMO 281
INTRODUÇÃO 283
MATERIAIS E MÉTODOS 286
MATERIAIS E EQUIPAMENTOS 287
MÉTODOS 287
Ensaios de permeabilidade em modelo *in vitro* PAMPA 287
Validação do método espectrofotométrico UV-VIS 290
RESULTADOS E DISCUSSÕES 293
CONCLUSÃO 304
REFERÊNCIAS 306

5.2 Desenvolvimento e validação do método cromatográfico para a quantificação simultânea de estavudina, lamivudina e zidovudina nos estudos de permeabilidade *ex vivo* (câmaras de difusão vertical tipo Franz) 309
RESUMO 310
INTRODUÇÃO 312
MATERIAIS E MÉTODOS 316
MATERIAIS E EQUIPAMENTOS 317
MÉTODOS 317

Ensaios de permeabilidade em modelo *ex vivo* com emprego de segmentos intestinais em câmaras de difusão vertical tipo Franz 317
Validação do método cromatográfico 319
RESULTADOS E DISCUSSÕES 324
CONCLUSÃO 332
REFERÊNCIAS 334
5.3 Desenvolvimento e validação do método cromatográfico LC-MS/MS para a quantificação dos fármacos antirretrovirais em estudos *in vitro* de permeabilidade e metabolismo 338
RESUMO 339
INTRODUÇÃO 341
MATERIAIS E MÉTODOS 344
Materiais e equipamentos 345
Métodos 345
Estudos *in vitro* em MDCK-MDR1 e microssomas 345
Validação dos métodos cromatográficos por LC-MS/MS 346
RESULTADOS E DISCUSSÕES 351
CONCLUSÕES 359
REFERÊNCIAS 361
CONSIDERAÇÕES FINAIS 364
ANEXOS 369
ANEXO A 370
Informações para os membros da banca julgadora de doutorado 370
ANEXO B 372
Aprovação do protocolo de estudo pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) 372
ANEXO C 374
Ficha do aluno 374
ANEXO D 377
Currículo Lattes 377
ANEXO E 386
Artigos publicados relacionados à tese 386

In situ intestinal perfusion in rodents: Future perspectives for application on absorption studies and classification of drugs.....387
Evaluating potential P-gp substrates: Main aspects to choose the adequate permebility model for assessing gastrointestinal drug absorption.....388
Determination of lamivudine and zidovudine permebility using a diferente *ex vivo* method in Franz cells.....389
Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, *ex vivo* and *in situ* single-pass intestinal perfusion (SPIP) in rat jejunum 390
Equilibrium solubility versus intrinsic dissolution: characterization of lamivudine, satvudine and zidovudine for BCS classification 391
ANEXO F.....392
ARTIGOS EM ELABORAÇÃO RELACIONADOS E/OU PERTENCENTES À TESE.....392
Biopharmaceutics Classification System (BCS) and Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS): Applications in drug development and biowaiver processes.....393
In vitro and *ex vivo* methods applied in the evaluation of intestinal drug permeability 394
Main aspects related to the intestinal metabolism and its influence in drug absorption.....395
Evaluation of permeability of antiretroviral drugs by *in vitro* model PAMPA and *ex vivo* model Franz cells 396
Evaluation of the drug-efflux interaction of antiretroviral drugs through *in vitro* MDCK-MDR1 and *ex vivo* Franz cells models 397
Evaluation of the CYP3A influence in the intestinal permeability of antiretroviral drugs by *in vitro* microsomes and *ex vivo* Franz cells models 398
Development and validation of the spectrophotometric method for the quantification of drugs in the permeability studies using the PAMPA model.....399
Development and validation of the chromatographic method for the simultaneous quantification of stavudine, lamivudine and zidovudine in *ex vivo* permeability studies.....400

Development and validation of the LC-MS/MS chromatographic method for the quantification of antiretroviral drugs in metabolism and eflux studies 401
ANEXO G 402
PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS INTERNACIONAIS 402
"4th International Pharma & Clinical pharmacy Congress – Poster Presentation" 403
"4th International Pharma & Clinical pharmacy Congress – Oral Presentation" 404
"2015 AAPS Annual Meeting and Exposition – Poster Presentation" .405
"6th World Congresso on Bioavaliability & Bioequivalence BA/BE Studies Summit – Poster Presentation" 406

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1: Classificação dos fármacos de acordo com o SCB e descrição das características e limitações relacionadas à cada classe. 44
Quadro 1.2: Classificação de fármacos segundo o SCBDF. 49
Quadro 1.3: Efeitos de transportadores de acordo com o SCBDF. 51
Quadro 1.4: Funções da P-gp em relação à sua localização nos diferentes tecidos do organismo de seres humanos. 121
Quadro 1.5: Vantagens e limitações dos modelos empregados na avaliação da permeabilidade intestinal de fármacos. 129
Quadro 1.6: Enzimas CYP presentes em células Caco-2, seus respectivos substratos e metabólitos considerados nos estudos de metabolismo em culturas celulares. Adaptado de (KÜBLBECK et al., 2016). 158
Quadro 2.1: Comparação das principais características dos ensaios realizados em modelo *in vitro* PAMPA e em modelo *ex vivo* em câmaras de difusão vertical tipo Franz com o emprego de segmentos intestinais. 181
Quadro 5.1: Descrição do modo de preparo de cada meio utilizado nos estudos de permeabilidade em PAMPA. Adaptado de (REIS et al., 2013). 288
Quadro 5.2: Formas de preparo das soluções das curvas analíticas para os fármacos e para os marcadores a partir das respectivas soluções padrão (SP, 10 mM). 291
Quadro 5.3: Condições cromatográficas definidas para a quantificação dos fármacos antirretrovirais estavudina (d4T), lamivudina (3TC) e zidovudina (AZT) e dos marcadores metoprolol (METO) e ranitidina (RNT) contidos em amostras provenientes dos estudos de permeabilidade por meio do modelo *ex vivo* com o emprego de segmentos intestinais em câmaras de difusão vertical tipo Franz...320
Quadro 5.4: Preparo das soluções das curvas analíticas para os fármacos e marcadores a partir das respectivas soluções padrão (SP, 25 µg/mL). 321
Quadro 5.5: Concentrações das curvas analíticas para cada fármaco ou marcador. 322
Quadro 5.6: Condições adotadas para os processos de validação cromatográfica por LC-MS/MS para a quantificação dos fármacos antirretrovirais estavudina (d4T), lamivudina (3TC) e zidovudina (AZT) e dos marcadores metoprolol (METO) e ranitidina (RNT) contidos em amostras provenientes dos estudos de efluxo e de metabolismo por meio de métodos *in vitro* (MDCK-MDR1 e microssomas). 347

Quadro 5.7: Concentrações das curvas analíticas para os fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina e para os marcadores metoprolol e ranitidina. 348
Quadro 5.8: Preparo das soluções das curvas analíticas a partir das respectivas soluções padrão (SP) com concentração de 1 µM (e 100 µM para a concentração final de 1000 nM).....349

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Ilustração esquemática do intestino delgado mostrando as porções duodeno, jejuno e íleo. A distribuição de importantes fatores que interferem na permeação de fármaco é também mostrada como as enzimas intestinais do sistema CYP, os transportadores de efluxo glicoproteína-P (P-gp) e o espaço paracelular. Adaptado de (ARTURSSON; UNGELL; LOFROTH, 1993; AVDEEF, 2003; DAHAN; AMIDON, 2009; GALETIN; GERTZ; HOUSTON, 2010).....73
Figura 1.2: Representação da monocamada de enterócitos contemplando os lados apical e basolateral, junções intercelulares e microvilosidades. A camada de muco, a região de microclima e o glicocálix são responsáveis pela formação da CAE. Os mecanismos de permeabilidade também estão representados nesta figura (asteriscos) mostrando o transporte passivo transcelular, transporte passivo paracelular, transporte ativo mediado por carreadores de influxo, transporte ativo mediado por carreadores de efluxo e endocitose. Adaptado de (AVDEEF, 2003; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008).....75
Figura 1.3: Representação do ensaio de permeabilidade em PAMPA. A solução doadora contendo o fármaco solubilizado é adicionada no compartimento doador e a solução tampão sem fármaco é adicionada no compartimento receptor, o qual apresenta seus filtros porosos previamente impregnados pela solução lipídica para formar a membrana artificial por onde o fármaco deverá atravessar. As placas doadora e receptora são montadas de modo a formar um modelo sanduíche de encaixe. Adaptado de (CHEN, 2008). 82
Figura 1.4: Representação esquemática da câmara de difusão horizontal tipo Ussing. O segmento intestinal é posicionado entre os compartimentos doador e receptor e permanece no sentido vertical. 95
Figura 1.5: Representação esquemática da câmara de difusão vertical tipo Franz mostrando os principais componentes: (A) presilha fixadora do compartimento doador, (B) compartimento doador, (C) adaptador de material inerte onde o segmento intestinal é posicionado, (D) circulação externa de água aquecida, (E) espiral utilizada para a agitação magnética do compartimento receptor, (F) via de reposição de meio isento de fármaco, (G) via de coleta das amostras, (H) compartimento receptor. O segmento intestinal é posicionado entre os compartimentos doador e receptor e permanece no sentido horizontal. Adaptado de (HANSON RESEARCH, 2001).....96

Figura 1.6: Principais vias de absorção do fármaco através de células intestinais: (1) efluxo mediado por transportador; (2) paracelular; (3) transcelular passiva; (4) transcelular mediado por carreador; (5) endocitose mediado por receptor. Adaptado de (DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008).....116
Figura 1.7: Estrutura da P-glicoproteína: as duas cadeias presentes na membrana, que contêm 6 cadeias em sequência e um núcleo de ligação (NBD) cada um. O primeiro *loop* extracelular é fortemente N-glicosilado.....119
Figura 2.1: Valores de permeabilidade (Pe) obtidos através do modelo *in vitro* PAMPA para os fármacos estavudina, lamivudina e zidovudina. As barras de erro representam os desvios padrão (DP) para cada substância em cada valor de pH (n=3).....192
Figura 2.2: Perfis de permeabilidade (Pe) obtidos através do modelo *in vitro* PAMPA em pH 6,8 para os fármacos estavudina, lamivudina e zidovudina e para os marcadores de alta e de baixa permeabilidade metoprolol e ranitidina, respectivamente. As barras de erro representam os desvios padrão (DP) para cada substância (n=3). A análise estatística dos resultados mostrou diferença significativa (*$p<0,05$) entre metoprolol e as demais substâncias utilizadas no estudo. 194
Figura 2.3: Imagens obtidas após o período de incubação de 4 horas para a determinação da integridade de membrana artificial PAMPA. O controle positivo foi realizado com o corante azul de cresil brilhante (imagem à esquerda) e o controle negativo com amarelo lúcifer (imagem à direita).....198
Figura 3.1: Representação da monocamada de enterócitos, lados apical e basolateral, junções intercelulares, microvilosidades e principais mecanismos de permeabilidade de fármacos, sendo: (*A*) transporte passivo paracelular, (*B*) transporte passivo transcelular, (*C*) transporte ativo de efluxo, (*D*) transporte ativo transcelular mediado por carreadores de influxo e (*E*) endocitose (adaptado de Dezani et al., 2017 - *ahead of print*). 221
Figura 3.2: Quantidade permeada em ng/mL em função do tempo para estavudina, lamivudina, zidovudina e metoprolol na ausência (A) e na presença (B) do inibidor de P-gp verapamil. Resultados obtidos por meio do modelo *ex vivo* com emprego de câmaras de difusão vertical tipo Franz (n=6). 238
Figura 3.3: Perfis de permeabilidade aparente (Papp) para os fármacos estavudina, lamivudina e zidovudina e para os marcadores metoprolol e ranitidina, na presença

e na ausência de inibidor de P-gp (verapamil). Valores médios obtidos através do modelo *ex vivo* em câmaras de difusão vertical tipo Franz (n=6).....239
Figura 3.4: Correlação da influência da interação entre fármaco e P-gp e dados de biodisponibilidade obtidos da literatura. 242
Figura 4.1: Representação gráfica dos resultados de Papp obtidos nos estudos de metabolismo pré-sistêmico com emprego de segmentos intestinais de jejuno em câmaras de difusão vertical tipo Franz (n=6). Os valores de Papp estão expressos em cm/s e as barras de erro indicam os respectivos valores de desvios padrão (DP) 264
Figura 4.2: Perfis das quantidades permeadas em função do tempo para a estavudina, lamivudina e zidovudina avaliadas por meio do emprego de segmentos intestinais em câmaras de difusão vertical tipo Franz (n=6).....266
Figura 4.3: Representação gráfica da quantidade de midazolam metabolizada em função do tempo de experimento (n=3), o que indica a atividade enzimática da suspensão reacional de microssomas. 267
Figura 4.4: Perfis de concentração em função do tempo para os fármacos antirretrovirais lamivudina, estavudina e zidovudina na presença e ausência do inibidor de CYP3A (cetoconazol). Resultados obtidos por meio dos ensaios de metabolismo pré-sistêmico com emprego de suspensão reacional de microssomas (n=3).....269
Figura 4.5: Porcentagens metabolizadas (%) obtidas para os fármacos estavudina, lamivudina e zidovudina nos ensaios de metabolismo pré-sistêmico com emprego de suspensão reacional de microssomas (n=3). As barras de erro representam os desvios padrão (DP).....270
Figura 5.1: Representações gráficas derivadas das leituras de absorbância para os fármacos estavudina, lamivudina, zidovudina e para os marcadores metoprolol e ranitidina solubilizados nos meios pH 3,0, pH 4,5, pH 6,8, pH 7,4 e pH 7,4 com tensoativo (pH 7,4+TA). 294
Figura 5.2: Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida em UV/VIS (1) Ringer-Krebs-Hepes modificado, (2) metoprolol (50 ng/mL), (3) ranitidina (50 ng/mL), (4) zidovudina (50 ng/mL), (5) lamivudina (50 ng/mL) e (6) estavudina (50 ng/mL). Todas as leituras foram realizadas em UV nos comprimentos de onda de maior absrobância para cada substância. 327

Figura 5.3: Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para os fármacos estavudina, lamivudina e zidovudina, para os marcadores metoprolol e ranitidina e para o padrão interno carbamazepina. 353

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Valores médios de permeabilidade (Pe) e respectivos desvios padrão (DP) obtidos a partir dos experimentos realizados em modelo *in vitro* PAMPA para os fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina. Também são apresentados os resultados de Pe e de DP referentes aos marcadores de alta e de baixa permeabilidade metoprolol e ranitidina, respectivamente. 193
Tabela 2.2: Resultados de permeabilidade (Pe) e respectivos desvios padrão (DP) obtidos por meio dos ensaios em modelo *in vitro* PAMPA descritos no presente trabalho para pH 6,8 e resultados de permeabilidade em PAMPA obtidos da literatura. 197
Tabela 2.3: Resultados de permeabilidade aparente (Papp) no sentido A→B e seus respectivos valores de desvio padrão (DP) referentes aos ensaios de permeabilidade em modelo *ex vivo* em câmaras de difusão vertical tipo Franz para os fármacos estavudina, lamivudina e zidovudina e os marcadores de alta e de baixa permeabilidade metoprolol e ranitidina, respectivamente. Os valores representam a média de seis determinações (n=6). 200
Tabela 2.4: Resultados de permeabilidade aparente (Papp) e desvios padrão (DP) obtidos por meio do modelo *ex vivo* em câmaras de difusão vertical tipo Franz e dados obtidos da literatura para os fármacos do presente trabalho.....202
Tabela 2.5: Valores de TEER referentes aos ensaios de permeabilidade para os fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina e para os marcadores metoprolol e ranitidina por meio do método *ex vivo* em câmaras de difusão vertical tipo Franz. As medições foram realizadas antes do início (I) e após os experimentos (F).....205
Tabela 3.1: Valores de TEER referentes aos ensaios de permeabilidade realizados por meio dos modelos *in vitro* (MDCK-MDR1, n=3) e *ex vivo* (câmara de difusão vertical tipo Franz, n=6) na presença e na ausência de inibidor de P-gp, sendo *I* correspondente às medições iniciais (antes dos experimentos) e *F* correspondente às medições finais (após os experimentos).....232
Tabela 3.2: Valores médios de Papp e de desvios padrão (DP) obtidos a partir dos ensaios de permeabilidade por meio do método *in vitro* com o emprego de células MDCK-MDR1 para os fármacos estavudina, lamivudina, zidovudina e para os marcadores metoprolol e ranitidina na direção A→B e B→A, na ausência e na presença de GG918. Os resultados foram expressos em cm/s e representam a média de três determinações. 235

Tabela 3.3: Razões B→A/A→B calculadas a partir dos valores de Papp obtidos por meio do modelo *in vitro* MDCK-MDR1 para os fármacos estavudina, lamivudina, zidovudina e os marcadores de alta e de baixa permeabilidade metoprolol e ranitidina, respectivamente.....236
Tabela 3.4: Valores médios de permeabilidade aparente (Papp) e desvios padrão (DP) obtidos a partir dos ensaios em modelo *ex vivo* (câmaras de difusão vertical tipo Franz) dos fármacos estavudina, lamivudina, zidovudina e dos marcadores metoprolol e ranitidina para os estudos sem e com inibidor de P-gp verapamil. Os resultados são expressos em cm/s e representam a média de seis determinações 240
Tabela 3.5: Comparação entre a influência da P-gp obtido no presente estudo e a variação dos ensaios de biodisponibilidade em seres humanos. 241
Tabela 4.1: Valores de Papp e respectivos desvios padrão (DP) obtidos nos estudos de metabolismo pré-sistêmico com emprego de segmentos intestinais de jejuno em câmaras de difusão vertical tipo Franz (n=6). 265
Tabela 4.2: Valores médios de porcentagem metabolizada (%) e seus respectivos desvios padrão (DP) para os fármacos antirretrovirais obtidos a partir dos ensaios de metabolismo pré-sistêmico em microssomas com e sem inibidor de CYP3A cetoconazol. Os resultados representam a média de três determinações. 268
Tabela 5.1: Resultados dos coeficientes de determinação (r) obtidos a partir das análises de regressão linear das curvas analíticas nos meios pH 3,0, pH 4,5, pH 6,8, pH 7,4 e pH 7,4 com tensoativo (pH 7,4+TA).....295
Tabela 5.2: Valores de desvio padrão relativo (DPR) referentes aos fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina e aos marcadores metoprolol e ranitidina nos diferentes meios (pH 3,0, pH 4,5, pH 6,8, pH 7,4 e pH 7,4+TA) e em três níveis de concentração (50, 100 e 200 µM). Os resultados representam a média de três determinações. 296
Tabela 5.3: Valores de desvio padrão relativo (DPR) referentes aos fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina e aos marcadores metoprolol e ranitidina nos diferentes meios (pH 3,0, pH 4,5, pH 6,8, pH 7,4, pH 7,4+TA) e em três níveis de concentração (50, 100 e 200 µM). Os resultados representam a média de seis determinações 298
Tabela 5.4: Valores médios referentes aos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) em µM em relação aos fármacos estavudina, lamivudina e

zidovudina e aos marcadores metoprolol e ranitidina nos diferentes meios (pH 3,0, pH 4,5, pH 6,8, pH 7,4, pH 7,4+TA). Os valores representam a média de três determinações. 299
Tabela 5.5: Valores médios de exatidão (em %) do método espectrofotométrico desenvolvido para a quantificação dos fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina e dos marcadores metoprolol e ranitidina. Os resultados representam a média de três determinações. 300
Tabela 5.6: Valores de exatidão (%) obtidos a partir da avaliação da estabilidade dos fármacos antirretrovirais e dos marcadores nos diferentes meios empregados (pH 3,0, pH 4,5, pH 6,8, pH 7,4, pH 7,4+TA). Os resultados expressam a média de três determinações. 301
Tabela 5.7: Valores de permeabilidade (Pe) e seus respectivos desvios padrão (DP) obtidos para os fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina e para os marcadores ranitidina e metoprolol (n=3). 302
Tabela 5.8: Resultados de LD, LQ e coeficientes de determinação (r^2) obtidos em meio RKHM na validação do método cromatográfico para a quantificação dos fármacos antirretrovirais e dos marcadores. Os valores expressam a média de seis determinações. 326
Tabela 5.9: Resultados referentes à precisão e à exatidão (intraensaio e interensaio) do método bioanalítico para a quantificação de estavudina, lamivudina, zidovudina, metoprolol e ranitidina por CLAE-UV. Valores expressos em porcentagem. 328
Tabela 5.10: Resultados referentes à exatidão dos métodos cromatográficos obtidos a partir da avaliação da estabilidade das amostras de estavudina, lamivudina, zidovudina, metoprolol e ranitidina (*ciclo CD = ciclo congelamento-descongelamento*). 330
Tabela 5.11: Valores médios de permeabilidade aparente (Papp, cm/s) e desvios padrão (DP) obtidos a partir dos ensaios de permeabilidade *ex vivo* com o emprego de segmentos intestinais em câmaras de difusão vertical tipo Franz para os fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e os marcadores metoprolol e ranitidina. Os valores representam a média de seis determinações. 331
Tabela 5.12: Valores obtidos para os LD, LQ e coeficientes de determinação (r^2) para cada substância. Os valores expressam a média de seis determinações. 355

Tabela 5.13: Valores referentes à precisão e à exatidão (intraensaio) do método LC-MS/MS para a quantificação de lamivudina, zidovudina, metoprolol, estavudina e ranitidina contidos em amostras provenientes de ensaios de permeabilidade e metabolismo pré-sistêmico.....356
Tabela 5.14: Valores médios de porcentagem metabolizada (%) obtidos a partir dos ensaios em microssomas na ausência e na presença do inibidor de CYP3A cetoconazol e valores referentes à razão entre permeabilidade aparente (Papp) B→A/A→B provenientes dos ensaios em MDCK-MDR1. Os valores representam a média de três determinações. 357

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho foi escrito na forma de capítulos, os quais foram estruturados e organizados com a finalidade de facilitar a compreensão dos variados assuntos relacionados ao tema central. Cada capítulo apresentado a seguir foi redigido buscando-se a elaboração prévia de artigos científicos para a divulgação dos estudos realizados. Assim, cada item foi preparado levando-se em consideração o conteúdo normalmente solicitado em periódicos de grande relevância científica na área.

Desta forma, o trabalho apresenta um total de 5 (cinco) capítulos, os quais são denominados a seguir:

- *Capítulo 1: Aspectos biofarmacêuticos relacionados à caracterização de fármacos;*

- *Capítulo 2: Avaliação da permeabilidade dos fármacos antirretrovirais por meio dos modelos* in vitro *PAMPA e* ex vivo *em câmaras de difusão vertical tipo Franz;*

- *Capítulo 3: Avaliação da interação fármaco-carreador de efluxo dos fármacos antirretrovirais por meio dos modelos* in vitro *MDCK-MDR1 e* ex vivo *em câmaras de difusão vertical tipo Franz;*

- *Capítulo 4: Avaliação da interação da enzima CYP3A na permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio dos modelos* in vitro *em microssomas e* ex vivo *em câmaras de difusão vertical tipo Franz;*

- *Capítulo 5: Desenvolvimento e validação dos métodos analíticos e bioanalíticos;*

O Capítulo 1 apresenta o levantamento bibliográfico relacionado aos principais conceitos abordados ao longo deste trabalho. Além disso, este item discute as principais lacunas a serem preenchidas na área de biofarmacotécnica e que atualmente não são esclarecidas na literatura, principalmente em relação à determinação da permeabilidade intestinal, mecanismos de efluxo e efeitos do metabolismo pré-sistêmico intestinal. Tais fatores representam uma grande influência sobre os processos de absorção oral de fármacos. Desta forma, os sistemas de classificação SCB (Sistema de Classificação Biofarmacêutica) e SCBDF (Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos) permitem, direta ou indiretamente, predizer a biodisponibilidade oral com base nos

fatores que influenciam a absorção. A classificação de fármacos é, portanto, estabelecida como base em diferentes métodos utilizados para a caracterização da solubilidade, da permeabilidade e do metabolismo de fármacos.

Portanto, o Capítulo 1 é composto por quatro itens, conforme indicado a seguir:

- Item 1.1: Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) e Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF): aplicações no desenvolvimento de fármacos e nos processos de bioisenção;

- Item 1.2: Métodos in vitro *e* ex vivo *empregados na avaliação da permeabilidade intestinal de fármacos;*

- Item 1.3: Principais aspectos considerados na avaliação dos mecanismos de efluxo pela P-gp nos ensaios de permeabilidade intestinal;

- Item 1.4: Principais aspectos relacionados ao metabolismo intestinal e sua influência na absorção de fármacos.

Ressalta-se que o item 1.3 supramencionado encontra-se publicado pela *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* (fator de impacto = 2,84) com o título *Evaluating Potential P-gp substrates: Main aspects to choose the adequate permeability model for assessing gastrointestinal drug absorption* de autoria de João Batista da Silva Júnior, Thaisa Marinho Dezani, André Bersani Dezani e Cristina Helena dos Reis Serra. O resumo do referido artigo encontra-se no Anexo E. Os demais itens contidos no Capítulo 1 estão em fase de elaboração e/ou submissão e contam com as contribuições do Professor Dr. Leslie Z. Benet (*Univerity of California San Francisco*, EUA).

O Capítulo 2 apresenta os ensaios de permeabilidade realizados por meio dos modelos *in vitro* PAMPA e *ex vivo* em câmaras de difusão vertical tipo Franz. Os resultados obtidos foram correlacionados com dados reportados na literatura, embora estes necessitam esclarecimentos quanto às condições e aos métodos empregados nos ensaios. Este capítulo teve ainda como propósito sugerir uma decisão lógica no emprego adequado entre os dois métodos utilizados. Os experimentos descritos foram realizados no Laboratório de Permeabilidade e Biodisponibilidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (LPB/FCF/USP). O Capítulo 2 é composto por um único item e encontra-

se em fase de finalização para futura publicação em periódico de alta relevância científica.

O Capítulo 3 aborda a influência dos transportadores de efluxo nos processos de absorção oral dos fármacos antirretrovirais. Este item apresenta os estudos realizados para investigar a influência da P-gp (glicoproteína-P) na permeabilidade dos fármacos antirretrovirais por meio dos modelos *in vitro* MDCK-MDR1 e *ex vivo* com emprego de segmentos intestinais isolados em câmaras de difusão vertical tipo Franz. Os resultados obtidos foram comparados aos dados relatados na literatura com a finalidade de discutir as importâncias e as limitações de cada um dos modelos utilizados. Os experimentos referentes ao método *ex vivo* com o emprego de segmentos intestinais em câmaras de difusão vertical tipo Franz foram desenvolvidos no LBP/FCF/USP. Já os experimentos *in vitro* em MDCK-MDR1 foram realizados na *University of California San Francisco* (CA, EUA) sob a supervisão do Professor Dr. Leslie Z. Benet. Este capítulo é constituído de um único item e encontra-se em fase de elaboração para futura publicação em periódico de alta relevância científica.

O Capítulo 4 apresenta as metodologias *in vitro* e *ex vivo* empregadas para avaliar a influência do metabolismo pré-sistêmico intestinal nos processos de absorção de fármacos. Foram consideradas neste estudo somente as enzimas da superfamília CYP3A (citocromo P450) e os ensaios foram realizados por meio dos modelos *in vitro* com o emprego de microssomas e *ex vivo* com o uso de segmentos intestinais em câmaras de difusão vertical tipo Franz. A expressiva presença de enzimas oxidativas nos enterócitos tem sido alvo de estudos recentes, embora experimentos focados no metabolismo intestinal sejam escassos na literatura. Os ensaios referentes ao método *ex vivo* com o emprego de segmentos intestinais em câmaras de difusão vertical tipo Franz foram realizados no LPB/FCF/USP. Já os experimentos de metabolismo pré-sistêmico foram realizados na *University of California San Francisco* (CA, EUA) sob a supervisão do Professor Dr. Leslie Z. Benet. Este capítulo é constituído de um único item e encontra-se em fase de elaboração para futura publicação em periódico de alta relevância científica.

O Capítulo 5 apresenta o desenvolvimento e validação dos métodos analíticos e bioanalíticos envolvidos nas quantificações das amostras provenientes dos estudos descritos nos Capítulos 2, 3 e 4. Em razão do emprego dos métodos espectrofotométricos, cromatográficos com detecção em UV (CLAE-UV) e

cromatográficos com detecção em massa (LC-MS/MS), este capítulo foi subdividido em três itens, conforme indicado a seguir:

- Item 5.1: Desenvolvimento e validação do método espectrofotométrico para a quantificação dos fármacos antirretrovirais nos estudos de permeabilidade por meio do modelo in vitro *PAMPA;*

- Item 5.2: Desenvolvimento e validação do método cromatográfico para a quantificação simultânea de estavudina, lamivudina e zidovudina nos estudos de permeabilidade ex vivo *(câmaras de difusão vertical tipo Franz);*

- Item 5.3: Desenvolvimento e validação do método cromatográfico LC-MS/MS para a quantificação dos fármacos antirretrovirais em estudos in vitro *de permeabilidade e metabolismo.*

Os processos de validação referentes aos métodos espectrofotométricos e cromatográficos com detecção em UV foram realizados no LPB/FCF/USP. Já a validação dos métodos cromatográficos com detecção em massa foi realizada na *University of California San Francisco* sob a supervisão do Professor Dr. Leslie Z. Benet. Este capítulo encontra-se em fase de elaboração para futura publicação em periódicos de alta relevância científica.

Portanto, a realização do presente trabalho representa uma pequena porção da linha de pesquisa que está sendo desenvolvida na área de biofarmacotécnica nos últimos anos, especialmente após o estabelecimento do SCB e do SCBDF. A aplicação dos estudos relacionados à classificação biofarmacêutica nos processos de bioisenção é considerada ainda um desafio, uma vez que a predição do comportamento *in vivo* de determinado fármaco envolve diferentes fatores que interferem na biodispobilidade, o que exige a padronização dos ensaios e o desenvolvimento de novas metodologias.

Diante da grande variedade de métodos disponíveis para avaliação de fármacos quanto à permeabilidade, mecanismos de transporte e metabolismo, torna-se imprescindível o emprego de tais métodos de maneira racional e organizada, de modo a otimizar os recursos envolvidos e, ao mesmo tempo, atender aos critérios éticos tão extensamente discutidos na atualidade.

RESUMO

DEZANI, A.B. **Avaliação dos mecanismos envolvidos na permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio dos modelos *ex vivo* (células de Franz) e *in vitro* (PAMPA).** Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 406p., 2017.

Para fármacos administrados por via oral, o controle da extensão e da velocidade de absorção depende basicamente de duas importantes etapas: solubilidade do fármaco nos líquidos fisiológicos e sua permeabilidade através das membranas biológicas. Assim, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto como uma ferramenta para o desenvolvimento de novos fármacos, de novas formulações e para auxiliar nos processos de bioisenção. No entanto, outro fator relacionado à biodisponibilidade e que deve ser considerado nos estudos biofarmacêuticos é o metabolismo. Desta forma, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF) foi proposto com a finalidade de classificar os fármacos de acordo com suas características de solubilidade e de metabolismo de modo que seja possível avaliar e predizer o comportamento do fármaco *in vivo*. O metabolismo tem sido amplamente investigado, sobretudo as enzimas do citocromo P450, as quais estão presentes também nos enterócitos. Além disso, o SCBDF oferece um suporte quanto à avaliação dos mecanismos de permeabilidade envolvidos nos processos de absorção, interações fármaco-fármaco e interações fármaco-alimento. Assim, o presente trabalho teve como objetivo elucidar os mecanismos envolvidos na permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio dos modelos *ex vivo* (câmaras de difusão vertical tipo Franz) e *in vitro* (PAMPA, MDCK-MDR1 e microssomas) considerando os aspectos relacionados ao metabolismo intestinal e ao efluxo destes fármacos. Dada a importância da utilização de fármacos antirretrovirais na terapia medicamentosa contra a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e que estes medicamentos são normalmente administrados cronicamente, a compreensão dos mecanismos envolvidos na permeabilidade é de suma importância, uma vez que estes não estão totalmente esclarecidos e poucas informações são encontradas na literatura. Além disso, a biodisponibilidade de fármacos como estavudina, lamivudina e zidovudina indica variação na permeabilidade, necessitando de uma investigação científica mais aprofundada dos processos absortivos. Assim, segmentos de jejuno provenientes de ratos machos Wistar foram utilizados para a avaliação da permeabilidade intestinal dos referidos antirretrovirais considerando a avaliação de efluxo pela glicoproteína-P e o metabolismo intestinal pela CYP3A. De maneira complementar, estudos *in vitro* com o emprego de membranas artificiais paralelas (PAMPA) e culturas celulares de MDCK-MDR1 foram realizados com a finalidade de auxiliar na elucidação dos mecanismos de permeabilidade dos fármacos antirretrovirais. Além disso, a avaliação do metabolismo dos referidos fármacos foi realizada com o emprego de microssomas a fim de verificar se tais substâncias são substratos de enzimas da família CYP3A e, assim, verificar o impacto do metabolismo intestinal na absorção. Os resultados de permeabilidade obtidos em PAMPA foram: 0,74±0,11 x 10^{-6} cm/s para a estavudina, 0,25±0,12 x 10^{-6} cm/s para a lamivudina e 1,14±0,25 x 10^{-6} cm/s para a zidovudina. Já no modelo *ex vivo* com o emprego de câmaras de difusão vertical tipo Franz, os resultados foram: 1,56±0,32 x 10^{-5} cm/s para a estavudina, 1,26±0,27 x 10^{-5} cm/s para a lamivudina e 2,54±0,49 x 10^{-5} cm/s para a zidovudina. Portanto, com base nos resultados obtidos a partir dos dois métodos empregados, sugere-se que

outro mecanismo de transporte que não envolva a permeabilidade por difusão transcelular passiva possa estar relacionado à permeabilidade dos fármacos antirretrovirais. Com relação aos estudos de efluxo, os resultados obtidos a partir dos experimentos realizados em câmaras de difusão vertical tipo Franz demonstraram o aumento significativo da permeabilidade dos três antirretrovirais quando o inibidor de P-gp foi empregado, sendo: de 15,6 x 10^{-6} para 42,5 x 10^{-6} cm/s para a estavudina, de 12,6 x 10^{-6} para 37,5 x 10^{-6} cm/s para a lamivudina e de 25,4 x 10^{-6} para 56,6 x 10^{-6} cm/s para a zidovudina. Em culturas celulares MDCK-MDR1, os resultados de permeabilidade foram utilizados para a obtenção das razões entre as direções B→A e A→B. Os valores de Papp na condição inibida para os fármacos estudados apresentaram razão menor do que 1. Já a razão B→A/A→B para cada fármaco nos ensaios sem inibidor apresentou-se igual ou maior que 2, evidenciando a interação fármaco-transportador. Com base nisso, o modelo *ex vivo* com o emprego de segmentos intestinais em câmaras de difusão vertical tipo Franz apresentou-se adequado na avaliação do mecanismo de efluxo dos fármacos antirretrovirais, o que foi confirmado com os estudos realizados em MDCK-MDR1. Assim, os fármacos antirretrovirais estudados apresentaram interação significativa com a P-gp. Em relação aos estudos de metabolismo realizados em câmaras de difusão vertical tipo Franz, os resultados demonstraram grande variação na permeabilidade dos três antirretrovirais quando o inibidor de CYP3A foi empregado, sendo: de 15,6 x 10^{-6} para 23,5 x 10^{-6} cm/s para a estavudina, de 12,6 x 10^{-6} para 27,3 x 10^{-6} cm/s para a lamivudina e de 25,4 x 10^{-6} para 40,5 x 10^{-6} cm/s para a zidovudina. Já no modelo que emprega microssomas, os resultados de metabolização na ausência e na presença de inibidor de CYP3A foram: de 16,56% para 19,79% para a estavudina, de 14,56% para 15,55% para a lamivudina e de 17,85% para 16,48% para a zidovudina. Com base nisso, sugere-se o emprego de microssomas para a determinação de metabolismo, uma vez que o método *ex vivo* empregado demonstrou grande variação entre os valores obtidos. Desta forma, observou-se que, para cada fármaco, não houve influência significativa no metabolismo pré-sistêmico relacionado às enzimas do complexo CYP3A, o que indica que a absorção oral das referidas substâncias não é limitada por tais enzimas. Portanto, a utilização dos diferentes métodos empregados no desenvolvimento do presente trabalho permitiu compreender os mecanismos envolvidos no transporte dos fármacos antirretrovirais, o que se torna de grande relevância nas etapas de desenvolvimento farmacêutico de novas moléculas e na compreensão de eventos clínicos ainda não esclarecidos atualmente.

Palavras-chave: antirretrovirais, glicoproteína-P, metabolismo, permeabilidade, SCB, SCBDF.

ABSTRACT

DEZANI, A.B. **Evaluation of mechanisms involved in the permeability of antiretroviral drugs through *ex vivo* (Franz cells) and *in vitro* (PAMPA) models.** Ph.D. Thesis – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 406p., 2017.

For orally administered drugs, control of the extent and rate of absorption depends on two important steps: solubility of the drug in physiological liquids and their permeability across biological membranes. Thus, the Biopharmaceutics Classification System (BCS) has been proposed as a tool for the development of new drugs, new formulations and aid in the biowaiver processes. However, another factor related to bioavailability that should be considered in biopharmaceutic studies is the metabolism. Thus, the Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS) has been proposed for drug classification according to their solubility and metabolism characteristics, so it is possible to evaluate and predict the *in vivo* behavior of a compound. Metabolism has been extensively investigated, especially cytochrome P450 enzymes, which are also expressed in enterocytes. Besides, BDDCS provides support in evaluating the permeability mechanisms involved in the absorption processes, drug-drug interactions and drug-food interactions. Thus, the present study aimed to evaluate the mechanisms of permeability of antiretroviral drugs through the *ex vivo* (Franz cells) and *in vitro* (PAMPA, MDCK-MDR1 and microsomes) models considering aspects related to the intestinal metabolism and efflux of these drugs. Given the importance of the use of antiretroviral drugs in drug therapy against Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) and that these drugs are usually administered in a long-term way, understanding the mechanisms involved in the permeability is of a great importance, since they are not totally elucidated and no information is found in the literature. In addition, drugs as stavudine, lamivudine and zidovudine indicate variation in the permeability, which require further scientific investigation of absorptive processes. Thus, jejunum segments from rats were used to evaluate the intestinal permeability of these antiretroviral drugs, considering the evaluation of efflux by P-glycoprotein and intestinal metabolism by CYP3A. In a complementary manner, *in vitro* studies using parallel artificial membranes (PAMPA) and cell cultures MDCK-MDR1 were performed to aid in the elucidation of the permeability mechanisms of antiretroviral drugs. Also, the evaluation of the metabolism was carried out using microsomes to verify if such substances are substrates of CYP3A, and verify the impact of the intestinal metabolism in the absorption. The permeability results obtained in PAMPA were: $0.74 \pm 0.11 \times 10^{-6}$ cm/s for stavudine, $0.25 \pm 0.12 \times 10^{-6}$ cm/s for lamivudine and $1.14 \pm 0.25 \times 10^{-6}$ cm/s for zidovudine. In *ex vivo* method using the intestinal segments in Franz cells, the results were: $1.56 \pm 0.32 \times 10^{-5}$ cm/s for stavudine, $1.26 \pm 0.27 \times 10^{-5}$ cm/s for lamivudine and $2.54 \pm 0.49 \times 10^{-5}$ cm/s for zidovudine. Thus, based on the results obtained from these two methods, it is suggested that the antiretroviral drugs present other transport mechanism that is different from transcellular passive diffusion. For efflux studies, results obtained from experiments performed in Franz cells shown the increase of the permeability of the three antiretroviral drugs when the P-gp inhibitor was used: from 15.6×10^{-6} to $42{,}5 \times 10^{-6}$ cm/s for stavudine, from 12.6×10^{-6} cm/s to 37.5×10^{-6} cm/s for lamivudine, and 25.4×10^{-6} to 56.6×10^{-6} cm/s for zidovudine. In MDCK-MDR1, the permeability results were used for obtaining ratio values between the directions B→A and A→B. The Papp values obtained with

inhibitor shown a ratio less than 1. For ratio B→A/A→B for each drug in experiments without inhibitor, the values obtained was equal or greater than 2, which shows the interaction between drug and transporter. Based on that, the *ex vivo* model using intestinal segments in Franz cells seems to be adequate for evaluation of efflux mechanism of antiretroviral drugs, which was confirmed by MDCK-MDR1 studies. Thus, the antiretroviral drugs presented interaction with P-gp. For metabolism studies in intestinal segments in Franz cells, a wide range of standard deviation was observed for the three antiretroviral drugs when the CYP3A inhibitor was used: from $15.6x10^{-6}$ cm/s to $23.5x10^{-6}$ cm/s for stavudine, from $12.6x10^{-6}$ cm/s to $27.3x10^{-6}$ cm/s for lamivudine, and from $25.4x10^{-6}$ cm/s to $40.5x10^{-6}$ cm/s for zidovudine. In experiments in microsomes, the results of metabolization in the absence and presence of CYP3A inhibitor were: from 16.56 to 19.79% for stavudine, from 14.56 to 15.55% for lamivudine and from 17.85 to 16.48% for zidovudine. Based on that, it is suggested the use of microsomes for metabolism evaluation, since the *ex vivo* method presented high variability between the results obtained. For each drug, no significative influence in pre-systemic metabolism related to CYP3A enzymes was observed, which indicates that the oral absorption of the drugs is not limited by these enzymes. The use of different methods in this work allowed to understand the mechanisms involved in the transport of antiretroviral drugs, which is of a great relevance in drug development and in the understanding of clinical events currently not clarified.

Keywords: antiretroviral drugs, P-glycoprotein, metabolism, permeability, BCS, BDDCS.

OBJETIVO

Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os mecanismos envolvidos na permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio dos modelos *ex vivo* (câmara de difusão vertical tipo Franz) e *in vitro* (PAMPA, MDCK-MDR1, microssomas), considerando os aspectos relacionados ao metabolismo intestinal e ao efluxo destes fármacos.

Objetivos específicos

- Desenvolvimento e validação dos métodos analíticos e bioanalíticos para a quantificação dos fármacos por meio de diferentes técnicas;
- Determinar a permeabilidade de fármacos antirretrovirais (estavudina, lamivudina e zidovudina) a partir de metodologia padronizada dos modelos *ex vivo* (câmaras de difusão vertical tipo Franz) e *in vitro* (PAMPA);
- Avaliar a influência dos mecanismos de efluxo sobre a permeabilidade intestinal dos fármacos antirretrovirais através da utilização de inibidor de P-gp em estudos *ex vivo* (câmara de difusão vertical tipo Franz) e estudos *in vitro* (MDCK-MDR1);
- Avaliar a influência do metabolismo pelo sistema CYP3A sobre a permeabilidade intestinal dos fármacos antirretrovirais através da utilização de inibidor de CYP3A em estudos *ex vivo* (câmara de difusão vertical tipo Franz) e *in vitro* (microssomas);
- Análise crítica dos sistemas de classificação biofarmacêutica de fármacos (SCB e SCBDF) já existentes com ênfase no desenvolvimento de novos fármacos e efeitos regulatórios.

CAPÍTULO 1: ASPECTOS BIOFARMACÊUTICOS RELACIONADOS À CARACTERIZAÇÃO DE FÁRMACOS

1.1 SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA (SCB) E SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA DE DISTRIBUIÇÃO DE FÁRMACOS (SCBDF): APLICAÇÕES NO DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS E NOS PROCESSOS DE BIOISENÇÃO

RESUMO

A via oral é a principal forma de administração de medicamentos em função da aceitação pelos pacientes, conveniência e baixo custo. Ao ser administrado por esta via, o fármaco necessita solubilizar-se nos líquidos contidos no trato gastrintestinal (TGI) e, em seguida, ser capaz de atravessar a parede intestinal com a finalidade de chegar à circulação sistêmica e, consequentemente, ao seu sítio de ação farmacológica. Assim, as características de solubilidade e de permeabilidade estão diretamente relacionadas à biodisponibilidade, a qual corresponde a uma propriedade biológica que representa a velocidade e a extensão pelas quais um fármaco é absorvido a partir de uma forma farmacêutica e se torna disponível no sítio de ação. Desta maneira, Amidon e colaboradores propuseram o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) como uma ferramenta para a classificação de fármacos de acordo com a solubilidade e a permeabilidade. Estas características têm ganhado notoriedade desde a publicação do guia para indústria baseado no SCB pela *Food and Drug Administration* (FDA). Uma vez que a solubilidade corresponde à uma etapa de extrema importância nos processos de absorção relacionados às propriedades ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção), outra ferramenta designada Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF) foi proposta por Wu e Benet e considera a solubilidade e o metabolismo para a classificação de substâncias. Desde então, muitos estudos têm sido desenvolvidos em relação à caracterização da solubilidade, da permeabilidade e do metabolismo com o objetivo de esclarecer eventos relacionados à farmacocinética dos fármacos. Com base no exposto, o presente trabalho teve como objetivo comparar o SCB e o SCBDF e discutir seus importantes papéis no desenvolvimento de novos fármacos, nos processos de bioisenção e na biodisponibilidade dentro do âmbito ADME. Alguns estudos na literatura descrevem os dois sistemas, porém existe a necessidade de avaliar a importância de cada um e suas relações entre si. Enquanto o SCB corresponde a uma ferramenta mais objetiva, o SCBDF é considerado mais complexo e está relacionado a diversos parâmetros não previstos pelo SCB. Embora ambos os sistemas considerem a solubilidade, a diferença está relacionada às características de permeabilidade e à extensão de metabolismo, as quais se correlacionam para alguns fármacos já estudados na literatura. Assim, o SCB e o SCBDF apresentam-se como importantes ferramentas complementares que auxiliam na compreensão do comportamento de substâncias administradas por via oral.

Palavras-chave: SCB, SCBDF, bioisenção, solubilidade, permeabilidade, metabolismo.

INTRODUÇÃO

A via oral é a principal forma de administração de medicamentos devido à sua conveniência, baixo custo, melhor aceitação pelos pacientes e facilidade na adesão ao tratamento farmacológico, sobretudo em casos de terapia crônica (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; LENNERNÄS; ABRAHAMSSON, 2005).

Após a administração oral, o fármaco deverá solubilizar-se nos líquidos contidos no trato gastrintestinal (TGI) e ser capaz de permear a parede intestinal com a finalidade de alcançar a circulação sistêmica e, consequentemente, o seu sítio de ação farmacológica. Estes eventos estão diretamente, porém não exclusivamente, relacionados à biodisponibilidade (BD), a qual corresponde a uma propriedade biológica que representa a velocidade e a extensão pelas quais um fármaco é absorvido a partir de uma forma farmacêutica e se torna disponível no sítio de ação. Assim, a biodisponibilidade depende basicamente das características de solubilidade e de permeabilidade da substância (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; BORCHARDT; SMITH; WILSON, 1996a; BRIOSCHI et al., 2013; CAO et al., 2006; CDER/FDA, 2003; CHAUDHARY et al., 2012; DAHAN; AMIDON, 2009; DAS et al., 2012; OLIVARES-MORALES et al., 2014).

Desta forma, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto por Amidon e colaboradores (1995) como ferramenta para a classificação de fármacos com base nas características de solubilidade e de permeabilidade. O SCB apresenta grande aplicação na predição da biodisponibilidade e permite o adequado desenvolvimento de novas moléculas, de novas formulações e de novos sistemas de liberação de fármacos (AMIDON et al., 1995; CDER/FDA, 2000, 2015a). Além disso, este sistema também vem sendo aplicado nos processos de bioisenção, ou seja, na isenção de estudos de biodisponibilidade e bioequivalência *in vivo* para alguns medicamentos, facilitando, assim, o registro destes produtos (ANVISA/BRASIL, 2011; CDER/FDA, 2000, 2015a).

Com base no SCB, a agência reguladora norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA) publicou um guia em agosto de 2000 destinado à isenção de estudos de biodisponibilidade e/ou bioequivalência *in vivo* para formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata. Esta publicação apresenta critérios referentes aos estudos de solubilidade e de permeabilidade para a classificação de substâncias e, assim, permite auxiliar nos processos de bioisenção de fármacos altamente solúveis e altamente permeáveis. Em maio de 2015, a mesma agência reguladora publicou uma nova versão do referido guia com a finalidade de

apresentar algumas modificações relacionadas aos ensaios envolvidos na determinação da classe biofarmacêutica de fármacos. No entanto, a nova versão encontra-se atualmente em fase de elaboração (CDER/FDA, 2000, 2015b).

Além do SCB, outra ferramenta que vem ganhando grande destaque atualmente é o Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF). Proposto por Wu e Benet (2005), este sistema classifica os fármacos de acordo com a solubilidade e a extensão de metabolismo. Além disso, o SCBDF tem sido capaz de predizer o comportamento *in vivo* das substâncias com base em diferentes parâmetros não considerados pelo SCB, como, por exemplo, interação fármaco-fármaco, interação fármaco-transportador e interação transportador-enzima (BENET, 2013; CUSTODIO; WU; BENET, 2008; LARREGIEU; BENET, 2014; WU; BENET, 2005).

Embora existam alguns trabalhos na literatura que apresentam discussões sobre o SCB e o SCBDF, é possível encontrar contradições quanto às classificações de substâncias. Portanto, há a necessidade de avaliar a importância de cada sistema, a relação entre ambos e suas finalidades no desenvolvimento farmacêutico, nos processos de bioisenção e na predição da biodisponibilidade *in vivo*.

Com base no exposto, o presente trabalho teve como objetivo apresentar o SCB e o SCBDF, relacioná-los e discutir suas finalidades propostas. Além disso, foram avaliadas suas relevâncias na área biofarmacêutica com relação ao desenvolvimento de fármacos, aos processos de bioisenção e às propriedades ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) (CHEN; YU, 2009; CHEN et al., 2011).

Sistema de classificação biofarmacêutica (SCB)

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto em 1995 por Amidon e colaboradores e representa uma importante ferramenta para o desenvolvimento de novos fármacos, de novas formulações e de novos sistemas de liberação. O SCB é baseado no princípio de que o controle da extensão e da velocidade de absorção de um fármaco administrado por via oral depende

basicamente de dois fatores: da solubilidade do próprio fármaco e de sua permeabilidade através das membranas biológicas. Com o auxílio deste sistema é possível prever variáveis na absorção oral, tais como: formulação, presença de alimentos, posologia, entre outras. Assim, o SCB classifica os fármacos em quatro classes, conforme demonstrado no Quadro 1.1 (AMIDON et al., 1995; CHEN; YU, 2009; LENNERNÄS, 2007; MARTINEZ; AMIDON, 2002; MASUNGI et al., 2008; PADE; STAVCHANSKY, 1998).

Quadro 1.1: Classificação dos fármacos de acordo com o SCB e descrição das características e limitações relacionadas à cada classe.

Classe	Solubilidade	Permeabilidade	Características	Limitações
I	Alta	Alta	Absorção rápida e completa; extensão de absorção > 90%; BD pode ser limitada pelo metabolismo pré-sistêmico.	Dissolução e/ou esvaziamento gástrico.
II	Baixa	Alta	Absorção é demorada e variável.	Solubilidade no TGI; variações nas formulações e variações fisiológicas.
III	Alta	Baixa	Velocidade e extensão de absorção variáveis. O perfil de dissolução é bem definido.	Permeabilidade no TGI; trânsito gastrintestinal e conteúdo intestinal.
IV	Baixa	Baixa	Alta variabilidade na velocidade e extensão de absorção; baixa absorção, baixa correlação *in vitro-in vivo.*	Solubilidade e permeabilidade; fatores fisiológicos no TGI, formulações.

(AMIDON et al., 1995; CDER/FDA, 2000, 2015a; PADE; STAVCHANSKY, 1998)

Para fármacos classe I, o SCB apresenta uma grande importância regulatória relacionada à substituição dos ensaios *in vivo* por ensaios *in vitro* que permitem obter conclusões sobre as características de solubilidade e de permeabilidade. Assim, medicamentos que contêm fármacos de classe I podem ser candidatos à bioisenção, ou seja, a aprovação de um produto farmacêutico baseada em testes de solubilidade e de permeabilidade *in vitro* poderá ser aceita no lugar de estudos *in vivo* em seres humanos. Portanto, o SCB permite a redução da exposição de voluntários sadios aos fármacos, bem como dos custos e do tempo necessários para os processos de desenvolvimento de produtos farmacêuticos (ANVISA/BRASIL, 2011; BENET, 2013; CDER/FDA, 2000, 2015a; CHEN; YU, 2009; COOK; ADDICKS; WU, 2008; KIM et al., 2006; LENNERNÄS; ABRAHAMSSON, 2005; LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004; LÖBENBERG; AMIDON, 2000).

Com base no SCB, a FDA publicou um guia em agosto de 2000 relacionado à isenção de estudos de biodisponibilidade e de bioequivalência *in vivo* para formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata para fármacos classe I. No entanto, a bioisenção poderá ser solicitada desde que estas formas farmacêuticas apresentem liberação maior que 85% do fármaco em até trinta minutos numa faixa de pH de 1,0 a 7,5 nos ensaios de dissolução. Assim, fármacos candidatos à bioisenção deverão apresentar alta solubilidade e alta permeabilidade e, portanto, extensão de absorção maior que 90%. Para a agência européia EMA (*European Medicines Agency*), a extensão de absorção considerada é ≥ 85% (CDER/FDA, 2000; CPMP/EMA, 2010; LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004; VOLPE, 2008).

Desta forma, o guia da FDA promove especificações de ensaios e critérios de aceitação para conduzir estudos de solubilidade, de permeabilidade e de dissolução para fins de classificação biofarmacêutica e bioisenção. Portanto, os fármacos devem apresentar alta solubilidade, alta permeabilidade, dissolução rápida e similar ao medicamento de referência, amplo índice terapêutico e estabilidade no TGI. Além disso, apenas devem ser empregados na formulação os excipientes previamente usados nas formas farmacêuticas aprovadas pela FDA (CDER/FDA, 2000; VOLPE, 2008).

No Brasil, a publicação recente da Resolução RDC n° 37 de 3 de agosto de 2011 (Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência) estabelece que os estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência não são necessários para medicamentos de liberação imediata e medicamentos de liberação retardada ou prolongada com o mesmo mecanismo de liberação, desde que apresentem a mesma forma farmacêutica e contenham fármacos que pertençam à classe I do SCB (ANVISA/BRASIL, 2011). A Instrução Normativa IN n° 7 publicada em 22 de agosto de 2014 apresenta a lista de fármacos candidatos à bioisenção com base no SCB (ANVISA/BRASIL, 2014).

Em maio de 2015, a FDA disponibilizou uma nova versão do guia publicado em 2000, porém esta ainda se encontra em elaboração e não é adotada oficialmente. O novo guia tem como objetivo apresentar novos critérios relacionados aos ensaios de solubilidade e de permeabilidade para fins de classificação biofarmacêutica e propõe que a bioisenção poderá ser estendida a medicamentos que contenham fármacos de classe III. Assim, ensaios de biodisponibilidade ou bioequivalência *in vivo* não são necessários para produtos que contenham fármacos de classe I ou III, desde que os excipientes contidos nos referidos medicamentos não afetem significativamente a absorção das substâncias ativas (CDER/FDA, 2015a).

De acordo com o guia da FDA em vigor atualmente, um fármaco apresenta alta solubilidade quando sua maior dose disponível comercialmente é solúvel em até 250 mL de meio aquoso. Para a avaliação deste parâmetro, o método da solubilidade em equilíbrio (método *shake-flask*) deve ser realizado a 37±1°C em meio aquoso sob faixa de pH 1,0 a 7,5. Outros métodos como as titulações ácidas ou básicas podem ser utilizados mediante a justificativa que suporte que tais métodos podem prever a solubilidade em equilíbrio da substância avaliada (CDER/FDA, 2000).

A classificação de um fármaco quanto à permeabilidade pode ser determinada diretamente pela medida da taxa de transferência de massa através da membrana intestinal humana, ou indiretamente por estimativa da extensão de absorção em estudos farmacocinéticos em seres humanos. Alternativamente, sistemas que permitem prever a extensão de absorção em seres humanos podem ser usados para classificar um fármaco, tais como: modelos *in vitro* baseados em culturas celulares, modelos *ex vivo* com uso de segmentos intestinais isolados,

estudos de perfusão *in situ* ou *in vivo* em modelos animais e estudos de perfusão *in vivo* em seres humanos (CDER/FDA, 2000; CHEN; YU, 2009; DAHAN et al., 2010; THIEL-DEMBY et al., 2009).

A avaliação da permeabilidade por diferentes modelos tem sido descrita amplamente na literatura e a grande diversidade de metodologias fornece informações sobre os variados mecanismos de transporte. No entanto, é importante destacar que os valores de permeabilidade podem variar quando existe a comparação entre diferentes modelos. Assim, é de suma importância a padronização dos ensaios realizados, bem como empregar substâncias que sejam utilizadas como marcadores de permeabilidade. O guia da FDA apresenta uma lista com substâncias que podem ser utilizadas como marcadores para os ensaios de permeabilidade. O metoprolol tem sido rotineiramente empregado como marcador de alta permeabilidade, enquanto que substâncias como manitol e ranitidina são utilizadas como marcadores de baixa permeabilidade. Portanto, o estabelecimento de valores limítrofes para a classificação biofarmacêutica de fármacos é necessário para a correta avaliação e classificação em relação à permeabilidade (CDER/FDA, 2000).

Apesar de existirem diferentes modelos destinados à avaliação da permeabilidade, nem sempre é possível predizer a absorção devido à dificuldade em obter uma boa correlação com os estudos *in vivo*. No entanto, a boa correlação entre diferentes modelos pode ser obtida quando fármacos transportados exclusivos ou predominantemente por via transcelular passiva são estudados em diferentes modelos preconizados pela FDA (BENET, 2013).

Do mesmo modo que o SCB tem sido adotado pelas agências regulatórias como a FDA e a EMA, este sistema também apresenta um importante papel no desenvolvimento de fármacos e formulações farmacêuticas, conforme mencionado previamente. Os estudos de solubilidade e de permeabilidade permitem prever o comportamento do fármaco *in vivo* e os dados obtidos promovem uma estimativa da absorção intestinal humana em estágios iniciais da descoberta de fármacos. Desta forma, o SCB contribui para a adequada seleção de moléculas candidatas a fármacos. Já nas etapas de desenvolvimento de formulações, é possível prever a influência de excipientes na extensão de absorção e, consequentemente, na biodisponibilidade oral (BENET, 2013; LENNERNÄS; ABRAHAMSSON, 2005; VOLPE, 2008).

Nos países em desenvolvimento, onde muitas vezes não há recursos suficientes para a realização dos ensaios de bioequivalência, o emprego do SCB torna-se importante para assegurar a qualidade entre os produtos farmacêuticos (BENET et al., 2008; LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004).

Embora o SCB tenha contribuído muito para a caracterização biofarmacêutica de fármacos, no desenvolvimento de novas moléculas e formulações e nos processos de bioisenção, este sistema considera apenas a solubilidade e a permeabilidade intestinal na tentativa de predizer a biodisponibilidade de fármacos administrados por via oral. Entretanto, a biodisponibilidade depende de vários fatores presentes no organismo e o metabolismo representa uma importante etapa relacionada às propriedades ADME. Em outras palavras, um determinado fármaco pode atender os critérios estabelecidos pela FDA e EMA para que seu produto seja candidato à bioisenção, porém sua elevada extensão de absorção pode não representar uma alta biodisponibilidade devido ao metabolismo pré-sistêmico ao qual está sujeito. Assim, uma nova ferramenta designada Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF) foi proposta em 2005 com a finalidade de responder questões ainda não esclarecidas a respeito do comportamento de fármacos *in vivo*.

Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF)

Outra ferramenta que apresenta grande importância na caracterização biofarmacêutica de fármacos é o Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF), o qual foi proposto em 2005 por Wu e Benet. Este sistema considera a solubilidade e o metabolismo na biodisponibilidade de substâncias (LARREGIEU; BENET, 2014; WU; BENET, 2005)

O SCBDF fundamenta-se no princípio de que fármacos extensamente metabolizados obrigatoriamente devem ter sido amplamente absorvidos, ou seja, substâncias que apresentam alta taxa de permeabilidade estão mais suscetíveis à ação das enzimas metabolizadoras. Este sistema apresenta-se como uma

ferramenta mais complexa capaz de prever a disponibilidade de fármacos e a influência de outros fatores relacionados às propriedades ADME como, por exemplo, as interações fármaco-fármaco no intestino, no fígado, nos rins e no sistema nervoso central. Assim como o SCB, o SCBDF também classifica os fármacos em quatro classes distintas considerando a solubilidade e a extensão de metabolismo, conforme demonstrado no Quadro 1.2 (BENET et al., 2008; LARREGIEU; BENET, 2014; WU; BENET, 2005).

Quadro 1.2: Classificação de fármacos segundo o SCBDF.

Metabolismo extenso	**Classe I**	**Classe II**
	Alta solubilidade Metabolismo extenso	Baixa solubilidade Metabolismo extenso
Baixo metabolismo	**Classe III**	**Classe IV**
	Alta solubilidade Baixo metabolismo	Baixa solubilidade Baixo metabolismo

Conforme apresentado no Quadro 1.2, os fármacos de classe I e II são primariamente eliminados por metabolismo, enquanto que fármacos de classe III e IV são eliminados inalterados na urina ou na bile (WU; BENET, 2005).

Quando o SCBDF foi proposto em 2005, a taxa de metabolização maior ou igual a 70% foi sugerida como um valor limítrofe para determinar se um fármaco é extensivamente metabolizado ou não. A partir de várias observações científicas ao longo dos anos, esta porcentagem foi alterada para maior ou igual a 90%, o que representa um valor mais rigoroso em comparação ao que foi proposto inicialmente. Esta nova taxa correlaciona-se melhor com altas taxas de permeabilidade apresentadas pelo metoprolol, o qual é classificado como pertencente à classe I do SCB e do SCBDF (fração absorvida > 90% e metabolismo ≥ 90%). Assim, se um

fármaco oralmente administrado é extensivamente metabolizado (taxa de metabolização maior que 90%) pelos processos metabólicos de fase I (processos de oxidação) e de fase II (processos de conjugação), tal substância teria de ter sido absorvida em uma elevada taxa (também superior a 90%). Desta maneira, os idealizadores do SCBDF acreditam que a extensão de metabolismo pode ser um método alternativo para a bioisenção de fármacos classificados no SCB como classe I (BENET et al., 2008; LARREGIEU; BENET, 2014).

Entretanto, em trabalho recente publicado por Hosey, Chan e Benet (2016), considerou-se que um fármaco é qualificado como extensivamente metabolizado quando a taxa de metabolização é igual ou maior que 70%, enquanto que a taxa igual ou menor que 30% sugere que o fármaco apresenta baixo metabolismo (HOSEY; CHAN; BENET, 2016). Isso indica a complexidade deste sistema, o qual ainda necessita aprimoramentos uma vez que diversos fatores ainda não esclarecidos podem interferir na classificação de fármacos.

Apesar do SCBDF não ser adotado por nenhuma agência reguladora atualmente, tal sistema apresenta-se condizente e apropriado para a classificação de fármacos de classe I do SCBDF. Isso se deve à boa correlação entre extensão de metabolismo e extensão de absorção para fins de bioisenção (LARREGIEU; BENET, 2014).

O SCBDF também é considerado uma ferramenta capaz de prever o efeito de transportadores em fármacos administrados por via oral, desde que tais substâncias sejam substratos de carreadores. O Quadro 1.3 mostra os efeitos de transportadores de acordo com a classificação SCBDF (BENET, 2013; WU; BENET, 2005).

Quadro 1.3: Efeitos de transportadores de acordo com o SCBDF.

	Alta solubilidade	Baixa solubilidade
Alta permeabilidade / extenso metabolismo	**Classe I** Efeitos de transportadores de efluxo e influxo é mínimo no intestino e no fígado.	**Classe II** Efeitos de efluxo no intestino e efeitos de transportadores de influxo e/ou efluxo no fígado.
Baixa permeabilidade / baixo metabolismo	**Classe III** Efeitos de transportadores de influxo predominam, mas pode haver influência de transportadores de efluxo.	**Classe IV** Efeito de transportadores de influxo e de efluxo são significativamente relevantes.

Conforme apresentado no Quadro 1.3, a interação entre fármacos administrados por via oral e diferentes transportadores auxilia na classificação de fármacos. Além disso, é possível observar a importância de diferentes regiões do organismo que não o TGI, os quais são considerados pelo SCBDF, conforme mencionado anteriormente.

No entanto, existem alguns casos descritos na literatura que divergem dos conceitos apresentados pelo SCBDF. Como exemplo, pode-se citar a amilorida e a cefalexina, as quais apresentam alta biodisponibilidade e baixo metabolismo. Neste caso, o baixo metabolismo não está relacionado com a baixa absorção dos dois fármacos. Dessa forma, apenas estudos farmacocinéticos em seres humanos podem auxiliar na correta classificação biofarmacêutica (LARREGIEU; BENET, 2014; SULLIVAN et al., 1969; WEISS et al., 1969).

As aplicações do SCBDF vêm se tornando bastante ampla desde sua concepção em 2005. Conforme mencionado anteriormente, este sistema pode ser utilizado para avaliar a influência de interações fármaco-fármaco, interações

fármaco-transportador e interações entre transportador e enzima no TGI. Além disso, o SCBDF pode ser utilizado nos estudos da influência de fatores farmacogenômicos, de efeito de alimentos na absorção de fármacos e das rotas de eliminação (HOSEY; CHAN; BENET, 2016).

Como o SCBDF permite avaliar a interação das substâncias com os transportadores, fármacos de classe I não são afetados por este efeito e, portanto, não necessitam de estudos para avaliar se eles são ou não substratos de carreadores (Quadro 1.3). Desta forma, mesmo quando estudos *in vitro* são realizados e uma substância classe I é considerada substrato de algum transportador de influxo ou de efluxo, não são necessárias alterações na conduta terapêutica, uma vez que não haverá relevância clínica significativa. Assim, este sistema permite auxiliar nos processos de bioisenção de fármacos classe I do SCB, pois apresentam alta solubilidade e extenso metabolismo, sendo este apresentado por consequência da elevada absorção. Este aspecto é de suma importância em esquemas terapêuticos empregados em pacientes que utilizam dois ou mais medicamentos. No entanto, é importante considerar a necessidade de realização de ensaios para verificar se fármacos de classe I são inibidores ou indutores de carreadores, pois poderá haver implicações clínicas relevantes quando outros medicamentos de outras classes biofarmacêuticas são utilizados simultaneamente (interação fármaco-fármaco) (HOSEY; CHAN; BENET, 2016).

Para fármacos oralmente administrados, diversos eventos podem ocorrer durante o processo de absorção no TGI, dentre os quais a interação existente entre a substância, os transportadores de efluxo e as enzimas metabolizadoras. Em outras palavras, o mesmo fármaco poderá ser substrato da glicoproteína-P (carreador de efluxo P-gp) e ao mesmo tempo substrato da enzima CYP3A4. Assim, o mecanismo de efluxo é responsável pela diminuição da biodisponibilidade de alguns fármacos substratos de enzimas (BENET; CUMMINS; WU, 2004).

A P-gp e a CYP3A4 atuam de maneira coordenada como um mecanismo de proteção no TGI, o que forma uma barreira à absorção de fármacos e outros xenobióticos. As enzimas CYP3A4 presente nos enterócitos representam significativamente a ocorrência de metabolismo pré-sistêmico para alguns fármacos, enquanto que a P-gp transporta o fármaco de volta ao lúmen intestinal. Assim, a investigação da interação do fármaco com a P-gp e com a CYP esclarece os reais fatores relacionados à baixa biodisponibilidade de alguns fármacos e que,

muitas vezes, não é realizada durante as etapas de desenvolvimento farmacêutico (BENET et al., 1996; BENET; CUMMINS; WU, 2004).

Outro aspecto a ser considerado pelo SCBDF é a ingestão de alimentos ricos em gorduras juntamente com medicamentos. É possível prever (precisão para 70% dos fármacos) os efeitos causados pela presença de gordura no processo de absorção e, consequentemente, na biodisponibilidade. A área sob a curva (AUC) e a biodisponibilidade são altamente influenciadas pelo teor de gordura presente na alimentação. Dentre os efeitos causados, pode-se citar alterações no tempo de esvaziamento gástrico, alterações no fluxo de bile no TGI, pH intestinal, alterações no fluxo sanguíneo no TGI e metabolismo intestinal. De maneira geral, o efeito da alimentação rica em gorduras não afeta a extensão de absorção de fármacos SCBDF classe I. No entanto, este efeito causa aumento da AUC e biodisponibilidade de fármacos de classe II, diminui a AUC e a biodisponibilidade de fármacos de classe III e não existem dados conclusivos para os de classe IV. Porém, estas observações podem alterar, uma vez que a ingestão de alimentos e a absorção de fármacos são variáveis e a predição tende a ser complexa e, às vezes, imprecisa (BENET, 2013; HOSEY; CHAN; BENET, 2016).

O SCBDF é muito amplo e muitas vezes este sistema é empregado para compreender outros fatores relacionados às propriedades farmacocinéticas. Atualmente, é considerada uma hipótese em que fármacos com alta taxa de permeabilidade são prontamente reabsorvidos a partir do lúmen renal e a partir da bile, o que facilita o acesso dos fármacos às enzimas metabolizadoras (BENET, 2013; HOSEY; CHAN; BENET, 2016).

Muitos fármacos altamente permeáveis são potencialmente reabsorvidos de sítios de eliminação no organismo e somente são excretados após os processos de metabolização. Com base nisso, a taxa de permeabilidade no âmbito do SCBDF pode ser avaliada com o uso de modelos que empregam membranas biológicas para investigar o transporte do fármaco com a finalidade de realizar sua correta caracterização (BENET, 2013).

A avaliação da permeabilidade em PAMPA ou em culturas celulares como Caco-2 e MDCK pode prever a extensão de metabolismo, enquanto que os ensaios de solubilidade são bem descritos no guia da FDA (CDER/FDA, 2000; HOSEY; CHAN; BENET, 2016). Para a classificação de fármacos, Varma e colaboradores (2012) realizaram experimentos de permeabilidade em MDCK-LE (células renais

Madin-Darby com baixa expressão de transportadores de efluxo) e de solubilidade pH-dependente e obtiveram 84% de correlação na classificação dos fármacos avaliados (VARMA et al., 2012).

Em outro estudo, os métodos *in silico* e *in vitro* foram utilizados para prever a taxa de permeabilidade de fármacos na tentativa de predizer a extensão de metabolismo. Fármacos como lobetalol, zidovudina e teofilina foram adotados como fármacos padrão nos estudos de previsão da extensão do metabolismo em Caco-2, MDCK e PAMPA, respectivamente (HOSEY; BENET, 2015; HOSEY; CHAN; BENET, 2016).

Em 2011, Benet, Broccatelli e Oprea publicaram uma lista com mais de 900 fármacos classificados de acordo com o SCBDF. Em 2016, Hosey, Chan e Benet publicaram uma lista adicional com mais 175 fármacos classificados de acordo com este sistema, além de discutirem a re-classificação de outros fármacos anteriormente classificados (BENET; BROCCATELLI; OPREA, 2011; HOSEY; CHAN; BENET, 2016).

Relação entre SCB e SCBDF

Conforme apresentado anteriormente, o SCB é uma ferramenta que permite a estimativa dos três maiores fatores considerados para a absorção oral do fármaco a partir de formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata administradas por via oral: dissolução, solubilidade e permeabilidade intestinal. A simplicidade dos ensaios de solubilidade e de permeabilidade relacionados ao SCB permitiu que esta ferramenta pudesse ser adotada pelas agências FDA e EMA (AVDEEF, 2003; BREDA et al., 2009).

Após a publicação do guia da FDA com base no SCB, a bioisenção é assegurada para aqueles fármacos nas seguintes condições: a alta solubilidade assegura que esta etapa não será a limitante da dissolução e, consequentemente, do processo de absorção, a alta permeabilidade garante que o fármaco é completamente absorvido mediante o limitado tempo de trânsito gastrintestinal e a dissolução assegura que o processo de esvaziamento gástrico é a etapa limitante para os fármacos de alta solubilidade e de alta permeabilidade (BENET, 2013).

Desde a publicação do guia da FDA em 2000, a possibilidade de estender a bioisenção para fármacos SCB classe III com alta solubilidade e limitada absorção é discutida pela EMA. Além disso, o relatório técnico da Organização Mundial da Saúde (OMS) ainda sugere que a bioisenção poderá ser estendida aos fármacos SCB classe II desde que sejam ácidos fracos que exibem baixa solubilidade somente em valores baixos de pH. Ainda, a OMS recomenda que os respectivos produtos de tais fármacos devem apresentar rápida dissolução em pH 6,8 e perfis de dissolução similares em comparação com os produtos inovadores em diferentes valores de pH (1,2, 4,5 e 6,8). Assim como a EMA, a OMS também recomenda que fármacos classe III sejam candidatos à bioisenção, desde que seus produtos sejam rapidamente dissolvidos e que não contenham nenhum excipiente capaz de alterar a motilidade e a absorção no TGI. No entanto, apesar de toda essa discussão, apenas os fármacos SCB classe I são elegíveis para os processos de bioisenção pela FDA atualmente (CDER/FDA, 2000; CPMP/EMA, 2010).

No entanto, o SCB apresenta como um fator crítico a avaliação da permeabilidade, a qual pode-se apresentar variável dependendo do método utilizado e das condições adotadas para sua avaliação. Além disso, o estudo de permeabilidade que visa determinada porção do TGI pode representar erros na classificação de fármacos. Em ensaios conduzidos por Dahan e colaboradores (2010), o sotalol apresentou valores de permeabilidade abaixo do metoprolol quando seu transporte foi avaliado nos valores de pH 6,5 e 7,0. Contudo, sua permeabilidade foi consideravelmente aumentada quando o valor do pH empregado foi de 7,4 (DAHAN et al., 2010).

Dentre os variados modelos utilizados para a avaliação da permeabilidade, o guia da FDA recomenda o uso de culturas celulares. No entanto, mesmo que este modelo apresente os diferentes mecanismos de transporte e fármacos, a melhor correlação com os estudos *in vivo* é obtida para substâncias que são transportadas por via transcelular passiva (ARTURSSON; PALM; LUTHMAN, 2001). Assim, quando algum fármaco apresenta alta permeabilidade em modelo celular como Caco-2, este fármaco é altamente permeável e pode ser considerado como altamente absorvido em conjunto com dados sobre sua biodisponibilidade. Ao contrário, se a substância avaliada por modelo celular apresentar baixa permeabilidade, isto não necessariamente determina a sua classificação. Isso se deve às diferenças relacionadas entre Caco-2 e o intestino humano como a área

disponível para a absorção e morfologia dos espaços intracelulares, os quais são mais apertados no modelo celular (CHEN et al., 2011).

Indiretamente, os ensaios de permeabilidade e de transporte em diferentes modelos *in vitro*, *ex vivo*, *in situ* e *in vivo* podem fornecer importantes informações sobre o fármaco ao considerar o SCBDF, ou seja, a alta taxa de permeabilidade de um fármaco indica que este tende a ser extensivamente metabolizado.

Para fins de classificação biofarmacêutica de fármacos segundo o SCB e SCBDF, o metoprolol tem sido amplamente utilizado como marcador referência de alta permeabilidade. Fármacos que apresentam valores iguais ou superiores ao valor de permeabilidade do metoprolol são consideradas altamente permeáveis. Já substâncias que apresentam valores inferiores ao do metoprolol são consideradas como sendo de baixa permeabilidade. No entanto, Larregieu e Benet (2014) discutem a necessidade de utilização de uma nova substância como marcador de alta permeabilidade (que apresente 90% de extensão de absorção), uma vez que o metoprolol apresenta extensão de absorção em torno de 95%, o que restringe a faixa para considerar um fármaco como sendo de alta permeabilidade e pode estar relacionado às divergências de classificação encontradas na literatura (LARREGIEU; BENET, 2014).

A classificação de fármacos pelo SCB e SCBDF tem sido um grande desafio para os pesquisadores. São observadas muitas diferenças na determinação de classe de uma mesma substância considerando os dois sistemas (SCB e SCBDF). As concordâncias em relação à classificação ocorrem quando o mesmo fármaco pertence à mesma classe em ambos sistemas (classe I tanto no SCB quanto no SCBDF) e pode ser divergente quando as classes são diferentes, ou seja, quando um mesmo fármaco é de classe I pelo SCB e de classe III no SCBDF (LARREGIEU; BENET, 2014).

Embora o SCB apresenta-se como uma ferramenta mais simples, muitas questões relacionadas às propriedades ADME não podem ser completamente resolvidas. A FDA aprova a utilização de modelos para fins de classificação de fármacos de acordo com suas características de permeabilidade com base no SCB. Métodos complementares que são amplamente utilizados na avaliação da permeabilidade nem sempre apresentam-se adequados para tal finalidade. Um exemplo a ser citado é o PAMPA, o qual tem apresentado, por meio de inúmeros trabalhos descritos na literatura, sua incapacidade de designar se um fármaco é de

alta ou baixa permeabilidade quando este apresenta outros mecanismos de absorção que não o transporte passivo transcelular.

Com base nisso, os estudos desenvolvidos ao longo dos anos desde o estabelecimento do SCB e do SCBDF têm demonstrado que ambos sistemas são complementares, uma vez que o foco de cada um é diferente. Enquanto o SCB considera apenas as características de solubilidade e de permeabilidade como parâmetros para a classificação de fármacos, o SCBDF é mais complexo e, por propor a classificação de fármacos com base na disponibilidade *in vivo* dos mesmos, outros fatores acabam sendo levados em consideração, tais como: interações fármaco-alimento, interações fármaco-fármaco, mecanismos de transporte diversos no TGI, extensão de metabolismo, eliminação renal e biliar, influência na permeação pela interação transporte-enzima no TGI, efeitos relacionados à farmacogenômica, dentre outros.

CONCLUSÃO

Desde o estabelecimento do SCB e do SCBDF, muitos estudos com relação ao comportamento *in vivo* de fármacos foram desenvolvidos com o intuito de permitir a compreensão das etapas farmacocinéticas de fármacos administrados por via oral. No entanto, nem todos os modelos disponíveis atualmente são capazes de elucidar a biodisponibilidade do fármaco no organismo.

Num primeiro momento, quando os sistemas de classificação foram apresentados, muitas comparações foram feitas entre SCB e SCBDF. No entanto, ambos sistemas possuem focos diferentes e podem ser aplicados nas etapas de desenvolvimento de novos fármacos de maneira complementar, com o intuito minimizar os estudos realizados em voluntários sadios durante as etapas de ensaios clínicos.

Em etapas de triagem de novas moléculas, é essencial conhecer as características de solubilidade e de permeabilidade de fármacos, conforme sugerido pelo SCB. Porém, também é de suma importância estudos que envolvam a investigação de transportadores nos principais tecidos como intestino, fígado, barreira hematoencefálica e rins, bem como o metabolismo, o qual não deverá ser ignorado, uma vez que este representa um importante papel na biodisponibilidade de fármacos.

Tanto o SCB quanto o SCBDF podem ser utilizados como ferramentas para avaliar a extensão de absorção de fármacos e sustentar a bioisenção. Assim, se um fármaco é de classe I nos dois sistemas (alta permeabilidade e extensão de metabolismo igual ou maior que 90%), a extensão de absorção será também alta (igual ou superior a 90%) (CHEN et al., 2011).

Com base no exposto, tanto o SCB quanto o SCBDF possuem importantes papéis na classificação de fármacos e são complementares, pois possuem como objetivo melhorar, simplificar e dinamizar o desenvolvimento de novas moléculas. Tanto o SCB quanto o SCBDF classificam os fármacos de acordo com a solubilidade. No entanto, o SCB considera a permeabilidade enquanto que o SCBDF considera o metabolismo.

O SCB é considerado uma ferramenta simples de classificação e permite avaliar a absorção de fármacos oralmente administrados. De maneira simplificada, considerando o sistema ADME, o SCB é capaz apenas de prever a absorção e supõe que esta indica a biodisponibilidade. Assim, o principal objetivo do SCB é

caracterizar os fármacos de acordo com a solubilidade e a permeabilidade para que seus respectivos produtos comerciais sejam elegíveis à bioisenção.

O SCBDF, ao considerar a classificação de fármacos com base na disposição do mesmo no organismo, demonstra-se mais amplo em comparação ao SCB e isso tem dificultado sua adoção pelas agências reguladoras. Muitos dos estudos de permeabilidade/transporte e metabolismo têm sido desenvolvidos com o objetivo de estabelecer critérios para a classificação de substâncias de acordo como SCBDF. O propósito deste sistema é aprofundar o entendimento em relação à biodisponibilidade e prever potenciais interações fármaco-fármaco em diferentes sítios como no intestino, no fígado, nos rins e no cérebro, o que não é possível prever com a aplicação do SCB. Assim, ao comparar os dois sistemas de classificação, o SCBDF está muito mais relacionado às condições fisiológicas do que o SCB (BENET, 2013). Logo, existe a necessidade de realização de diversos estudos para que o SCBDF se torne um sistema mais usual.

REFERÊNCIAS

AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical research**, v. 12, n. 3, p. 413–420, 1995.

ANVISA/BRASIL. Resolução - RDC n. 37, de 3 de agosto de 2011. [s.l: s.n.].

ANVISA/BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA - IN No 7, DE 21 DE AGOSTO DE 2014 Determina Lista de fármacos candidatos à bioisenção baseada no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB). [s.l: s.n.].

ARTURSSON, P.; PALM, K.; LUTHMAN, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport1PII of original article: S0169-409X(96)00415-2. The article was originally published in Advanced Drug Delivery Reviews 22 (1996) 67–84.1. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1–3, p. 27–43, 2001.

AVDEEF, A. Absorption and Drug Development:solubility, permeability and charge state. 1st. ed. Hoboken, New Jersey: Wiley Interscience, 2003.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S.; MORRISON, R. A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, n. 1, p. 301–312, 2000.

BENET, L. Z. et al. Intestinal drug metabolism and antitransport processes: A potential paradigm shift in oral drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 39, n. 2–3, p. 139–143, 1996.

BENET, L. Z. et al. The use of BDDCS in classifying the permeability of marketed drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 3, p. 483–488, 2008.

BENET, L. Z. The role of BCS (biopharmaceutics classificatrion system) and BDDCS (Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System) in drug development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 1, p. 34–42, 2013.

BENET, L. Z.; BROCCATELLI, F.; OPREA, T. I. BDDCS Applied to Over 900 Drugs. **The AAPS Journal**, v. 13, n. 4, p. 519–547, 2011.

BENET, L. Z.; CUMMINS, C. L.; WU, C. Y. Unmasking the dynamic interplay between efflux transporters and metabolic enzymes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 277, n. 1–2, p. 3–9, 2004.

BORCHARDT, RONALD T.; SMITH, P. L.; WILSON, G. Models for Assessing Drug Absorption and Metabolism. New York: Springer, 1996. v. 8

BREDA, S. A. et al. Solubility behavior and biopharmaceutical classification of novel high-solubility ciprofloxacin and norfloxacin pharmaceutical derivatives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 371, n. 1–2, p. 106–113, 2009.

BRIOSCHI, T. M. D. L. S. et al. Pharmacokinetics and bioequivalence evaluation of cyclobenzaprine tablets. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

CAO, X. et al. Why is it challenging to predict intestinal drug absorption and oral bioavailability in human using rat model. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 8, p. 1675–1686, 2006.

CDER/FDA. Guidance for Industry waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. Center for Drug Evaluation and Research, n. August, 2000.

CDER/FDA. Guidance for Industry Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products — General Considerations. [s.l: s.n.].

CDER/FDA. Guidance for Industry, Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. Center for Drug Evaluation and Research, n. May, p. 1–2, 2015a.

CDER/FDA. FDA Aproved Drug Products. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.Overview&DrugName=DIDANOSINE>. Acesso em: 1 jan. 2015b.

CHAUDHARY, A. et al. Enhancement of solubilization and bioavailability of poorly soluble drugs by physical and chemical modifications: A recent review. **Journal of Advanced Pharmacy Education & Research**, v. 2, n. 1, p. 32–67, 2012.

CHEN, M.-L.; YU, L. The use of drug metabolism for prediction of intestinal permeability (dagger). **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 1, p. 74–81, 2009.

CHEN, M. L. et al. The BCS, BDDCS, and regulatory guidances. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 7, p. 1774–1778, 2011.

COOK, J.; ADDICKS, W.; WU, Y. H. Application of the biopharmaceutical classification system in clinical drug development--an industrial view. **The AAPS Journal**, v. 10, n. 2, p. 306–310, 2008.

CPMP/EMA. Guideline on the investigation of bioequivalence. European Medicines Agency, n. August, 2010.

CUSTODIO, J. M.; WU, C. Y.; BENET, L. Z. Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 6, p. 717–733, 2008.

DAHAN, A. et al. High-permeability criterion for BCS classification: Segmental/pH dependent permeability considerations. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, n. 5, p. 1827–1834, 2010.

DAHAN, A.; AMIDON, G. L. Segmental dependent transport of low permeability compounds along the small intestine due to P-glycoprotein: The role of efflux transport in the oral absorption of BCS class III drugs. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 1, p. 19–28, 2009.

DAS, S. K. et al. Solid Dispersions : An Approach to Enhance the Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs. International **Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Technology**, v. 1, n. 1, p. 37–46, 2012.

HOSEY, C. M.; BENET, L. Z. Predicting the Extent of Metabolism Using in Vitro Permeability Rate Measurements and in Silico Permeability Rate Predictions. **Molecular Pharmaceutics**, v. 12, n. 5, p. 1456–1466, 2015.

HOSEY, C. M.; CHAN, R.; BENET, L. Z. BDDCS Predictions, Self-Correcting Aspects of BDDCS Assignments, BDDCS Assignment Corrections, and Classification for more than 175 Additional Drugs. **The AAPS Journal**, v. 18, n. 1, p. 251–60, 2016.

KIM, J. S. et al. The suitability of an in situ perfusion model for permeability determinations: Utility for BCS class I biowaiver requests. **Molecular Pharmaceutics**, v. 3, n. 6, p. 686–694, 2006.

LARREGIEU, C. A.; BENET, L. Z. Distinguishing between the permeability relationships with absorption and metabolism to improve BCS and BDDCS predictions in early drug discovery. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, n. 4, p. 1335–44, 2014.

LENNERNÄS, H. Animal data: The contributions of the Ussing Chamber and perfusion systems to predicting human oral drug delivery in vivo. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 11, p. 1103–1120, 2007.

LENNERNÄS, H.; ABRAHAMSSON, B. The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, n. 3, p. 273–285, 2005.

LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J. B. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 265–278, 2004.

LÖBENBERG, R.; AMIDON, G. L. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards**. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 3–12, 2000.

MARTINEZ, M. N.; AMIDON, G. L. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 42, n. 6, p. 620–643, 2002.

MASUNGI, C. et al. Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) combined with a 10-day multiscreen Caco-2 cell culture as a tool for assessing new drug candidates. **Pharmazie**, v. 63, n. 3, p. 194–199, 2008.

OLIVARES-MORALES, A. et al. The use of ROC analysis for the qualitative prediction of human oral bioavailability from animal data. **Pharmaceutical Research**, v. 31, n. 3, p. 720–730, 2014.

PADE, V.; STAVCHANSKY, S. Link between drug absorption solubility and permeability measurements in Caco-2 cells. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 12, p. 1604–1607, 1998.

SULLIVAN, H. R. et al. METABOLISM OF CEPHALEXIN-14C * IN MICE AND IN RATS Gephalexin is a broad spectrum antibiotic , active against gram positive cocci , includ- ing penicillin-resistant strains , as well as against many gram-negative a cephalosporin antibiotic , structurally. **Metabolism Clinical And Experimental**, v. XXII, n. 5, p. 195–200, 1969.

THIEL-DEMBY, V. E. et al. Biopharmaceutics classification system: Validation and learnings of an in vitro permeability assay. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 1, p. 11–18, 2009.

VARMA, M. V. et al. PH-dependent solubility and permeability criteria for provisional biopharmaceutics classification (BCS and BDDCS) in early drug discovery. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n. 5, p. 1199–1212, 2012.

VOLPE, D. A. Drug Permeability Studies in Regulatory Biowaiver Applications. In: Drug Absorption Studies: In Situ, In Vitro and In Silico Models. N: Springer, 2008. v. VIIp. 665–680.

WEISS, P. et al. The metabolism of amiloride hydrochloride in man. **Clinical and Pharmacology Therapeutics**, v. 10, n. 3, p. 401–406, 1969.

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.

1.2 MÉTODOS *IN VITRO* E *EX VIVO* EMPREGADOS NA AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL DE FÁRMACOS

RESUMO

Desde o surgimento do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) e sua aplicação para os processos de bioisenção, muitos estudos de permeabilidade têm sido desenvolvidos com o objetivo de predizer a absorção *in vivo*. A permeabilidade, considerada pelo SCB é um dos fatores responsáveis pela biodisponibilidade de fármacos administrados por via oral. Entretanto, muitos outros parâmetros interferem na biodisponibilidade, como o metabolismo de fármacos, por exemplo. Assim, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF) considera as características de solubilidade e de metabolismo das substâncias. A predição da absorção *in vivo* tem sido um desafio desde o estabelecimento do SCB e do SCBDF e muitos métodos utilizados para a avaliação da permeabilidade estão disponíveis atualmente. A absorção é um processo complexo influenciado por diversos fatores que incluem as características físico-químicas dos fármacos, os mecanismos de transporte e a atividade metabólica no trato gastrintestinal (TGI). Assim, com os experimentos realizados em modelos *in vitro* e *ex vivo* é possível compreender a influência de excipientes nos processos de permeabilidade, especialmente quando promotores de absorção são utilizados nas formas farmacêuticas. É de suma importância conhecer cada método disponível para os estudos de permeabilidade e considerar vários parâmetros como a influência de enzimas e/ou carreadores de influxo e efluxo. Além disso, cada modelo possui vantagens e desvantagens que devem ser cuidadosamente consideradas para a correta interpretação dos resultados a suas aplicações nas situações *in vivo*. Baseado nisso, este trabalho teve como objetivo apresentar uma revisão dos métodos atualmente empregados nos estudos de permeabilidade por meio de modelos *in vitro* e *ex vivo,* bem como fornecer orientações aos pesquisadores para a seleção do modelo mais apropriado nas avaliações da permeabilidade de fármacos.

Palavras-chave: permeabilidade, *in vitro*, *ex vivo*, absorção, transporte, efluxo.

INTRODUÇÃO

A via oral é a rota mais comum para a administração de medicamentos devido à conveniência, segurança, baixo custo e grande aceitação pelos pacientes (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; LENNERNÄS; ABRAHAMSSON, 2005).

Quando um fármaco é administrado oralmente, sua incompleta solubilização nos líquidos presentes no trato gastrintestinal (TGI) pode comprometer sua permeabilidade, o que resulta em problemas na biodisponibilidade. Assim, a solubilidade é considerada uma etapa fundamental e um pré-requisito para a permeabilidade através das membranas biológicas (SAVJANI; GAJJAR; SAVJANI, 2012).

Baseado nas características de solubilidade e de permeabilidade dos fármacos, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto em 1995 por Amidon e colaboradores como uma ferramenta para o desenvolvimento de novos fármacos e novas formulações farmacêuticas. Este sistema classifica as substâncias em quatro classes: alta solubilidade e alta permeabilidade (classe I), baixa solubilidade e alta permeabilidade (classe II), alta solubilidade e baixa permeabilidade (classe III) e baixa solubilidade e baixa permeabilidade (classe IV). Assim, em 2000, a agência FDA (*Food and Drug Administration*) publicou um guia relacionado aos processos de bioisenção de fármacos SCB classe I. Desde então, muitos estudos de solubilidade e de permeabilidade têm sido desenvolvidos com o intuito de caracterizar os fármacos e propor sua classificação biofarmacêutica (AMIDON et al., 1995; CDER/FDA, 2000).

No entanto, a biodisponibilidade oral de um fármaco é um processo complexo que envolve mais fatores além da solubilidade e da permeabilidade, como o metabolismo, por exemplo. Desse modo, uma nova ferramenta para a classificação de substâncias foi proposta por Wu e Benet (2005) designada Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF). Este sistema também classifica os fármacos em quatro classes considerando a solubilidade e o metabolismo, sendo elas: alta solubilidade e extenso metabolismo (classe I), baixa solubilidade e extenso metabolismo (classe II), alta solubilidade e baixo metabolismo (classe III) e baixa solubilidade e baixo metabolismo (classe IV) (WU; BENET, 2005).

O SCBDF é baseado na hipótese de que um fármaco extensamente metabolizado teria de ter sido previamente absorvido em grande extensão através do TGI. Este sistema permite, portanto, avaliar diferentes fatores que podem

influenciar na biodisponibilidade de fármacos, tais como: interações fármaco-fármaco, interações fármaco-transportador e interações transportador-enzima, dentre outros (BENET, 2013; HOSEY; CHAN; BENET, 2016).

Assim, os ensaios de permeabilidade e de transporte de fármacos com o propósito de predizer a absorção e, consequentemente, a biodisponibilidade *in vivo* têm sido amplamente desenvolvidos, o que permitiu o surgimento de novos modelos com variadas aplicações e finalidades.

A diversidade de metodologias empregadas nos experimentos de permeabilidade requer a padronização das condições utilizadas para minimizar a divergência de resultados. Ainda assim, diferentes fatores relacionados às características físico-químicas dos fármacos e fatores fisiológicos podem impactar na previsão da absorção *in vivo*, tais como: log*P*, peso molecular, estabilidade física e química, pH intestinal ou da solução tampão empregada no estudo, dissolução da forma farmacêutica, tempo de trânsito gastrintestinal, motilidade gastrintestinal, fluxo sanguíneo e linfático no TGI, presença de enzimas no TGI, interações fármaco-fármaco e fármaco-alimento e presença de muco na parede intestinal (ANTUNES et al., 2013a; GRASS, 1997; VOLPE, 2010).

A avaliação de fármacos de acordo com suas características de permeabilidade tem sido um grande desafio para muitos pesquisadores desde a publicação do guia da FDA e do sistema SCBDF. Variados métodos têm sido desenvolvidos para a classificação de fármacos e, como são aplicados para a caracterização da permeabilidade, muitas vantagens e desvantagens puderam ser notadas, o que promove uma ampla discussão em torno de métodos *in vitro* e *ex vivo* acerca do modelo mais adequado para determinada finalidade.

Em comparação com os ensaios *in vivo* e *in situ* recomendados pela FDA, os modelos *in vitro* e *ex vivo* apresentam a grande vantagem de serem facilmente empregados nos estudos de permeabilidade. Além disso, estes métodos apresentam alta produtividade, ou seja, é possível aplicá-los nas etapas iniciais de desenvolvimento de moléculas, pois permitem selecionar as principais substâncias candidatas a fármacos com redução de custos e de tempo. Além disso, a utilização desses métodos não requer uma quantidade elevada da substância a ser avaliada e, uma vez padronizados, permitem predizer a absorção *in vivo* com alto índice de correlação em determinadas situações (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; CAO; YU; SUN, 2008).

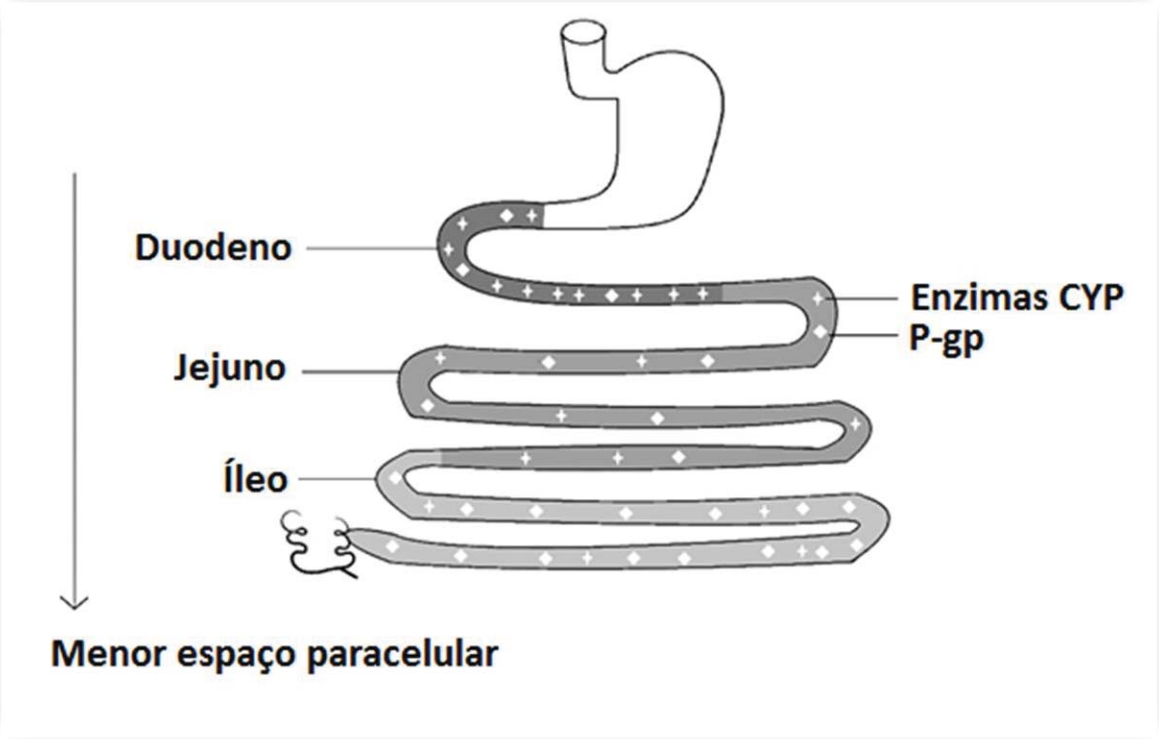
Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo descrever e discutir os principais métodos *in vitro* e *ex vivo* usados atualmente para os estudos de permeabilidade e de transporte de fármacos para fins de classificação de acordo com o SCB e o SCBDF. Além disso, é também discutido os conceitos relacionados aos termos *in vitro* e *ex vivo*, os quais são amplamente utilizados na literatura sem nenhum critério e são facilmente confundidos entre si. Ainda, o presente trabalho teve a finalidade de fornecer orientações aos pesquisadores na escolha dos métodos adequados para determinado propósito de estudo.

Trato gastrintestinal (TGI)

O intestino delgado é dividido em três porções: duodeno, jejuno e íleo. A absorção de fármaco no TGI ocorre geralmente no duodeno e na porção proximal do jejuno e, juntos, estes dois segmentos são responsáveis por mais de 99% dos processos de permeação de substâncias (AVDEEF, 2003).

Muitos estudos de permeabilidade descritos na literatura consideram o jejuno como um importante segmento intestinal para a realização de estudos de permeabilidade e transporte em razão da sua morfologia e características homogêneas em comparação com as demais porções do TGI. No entanto, a absorção local-dependente de uma substância pode ser estudada considerando principalmente as outras duas porções (duodeno e íleo). Assim, é possível investigar o principal sítio de absorção de um fármaco e avaliar as interferências causadas pela presença heterogênea de transportadores de influxo e efluxo, bem como a interferência de enzimas presentes nos enterócitos (DAHAN; AMIDON, 2009; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; LOZOYA-AGULLO et al., 2016). A Figura 1.1 mostra as três regiões do TGI consideradas para os estudos de permeabilidade e transporte com foco na predição de absorção *in vivo*, além de destacar as enzimas intestinais do sistema CYP, os transportadores de efluxo glicoproteína-P (P-gp) e o espaço paracelular, que podem interferir na absorção dos fármacos.

Figura 1.1: Ilustração esquemática do intestino delgado mostrando as porções duodeno, jejuno e íleo. A distribuição de importantes fatores que interferem na permeação de fármaco é também mostrada como as enzimas intestinais do sistema CYP, os transportadores de efluxo glicoproteína-P (P-gp) e o espaço paracelular. Adaptado de (ARTURSSON; UNGELL; LOFROTH, 1993; AVDEEF, 2003; DAHAN; AMIDON, 2009; GALETIN; GERTZ; HOUSTON, 2010).



O intestino é formado por células chamadas enterócitos, que são especializadas na absorção de nutrientes e substâncias. Tais células são unidas por junções intercelulares, as quais se apresentam mais unidas em porções distais do intestino delgado (Figura 1.1). Os enterócitos são polarizados, ou seja, são organizados de modo que a porção apical (borda em escova) esteja voltada para o lúmen intestinal, enquanto que o lado basolateral está voltado para a corrente sanguínea. Ambos os lados contêm transportadores variados que atuam no mecanismo de influxo e/ou efluxo de moléculas, enquanto que as enzimas estão localizadas na região da borda em escova (ANTUNES et al., 2013a; AVDEEF, 2003).

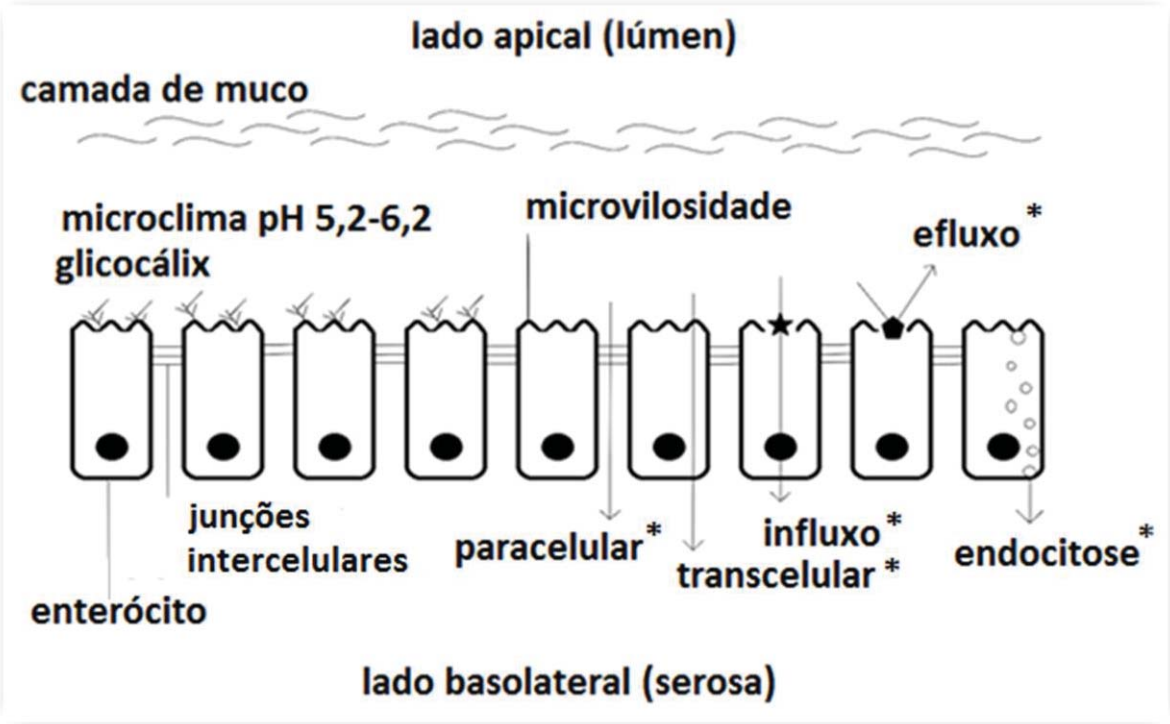
A presença de vilosidades ao longo do intestino permite o aumento da área superficial disponível para a absorção de substâncias. Tal área é ainda maior em razão da presença de microvilosidades na porção apical de cada enterócito.

Além dos enterócitos, as células M estão também presentes ao longo do intestino e são atualmente estudadas como um importante grupo celular envolvido no transporte de antígenos no sentido do lúmen intestinal para o sistema imunológico. Além disso, macromoléculas e pequenas partículas são também transportadas pelas células M, as quais permitem a absorção de fármacos com alto peso molecular, como vacinas e nanopartículas. Considerando que alguns fármacos são incorporados em nanoestruturas, estas células têm ganhado notoriedade em relação aos estudos de permeabilidade de proteínas e peptídeos destinados a estratégias de administração oral. Por outro lado, as células M representam uma pequena quantidade do total de células epiteliais no TGI, ou seja, constituem menos de 0,1% (FASANO, 1998; GEBERT; ROTHKÖTTER; PABST, 1996; LOPES et al., 2014).

Na superfície intestinal, as glicoproteínas (glicocálix) estão presentes nas microvilosidades e promovem a formação de um microclima com sua própria faixa de pH, independente do pH luminal. Em conjunto com o muco, a camada de água estacionária (CAE) é formada e interfere nos processos de permeação de fármacos de diferentes graus de lipofilicidade, ou seja, moléculas lipofílicas tendem a ser retardadas em seu processo absortivo devido à característica aquosa da CAE. A espessura *in vivo* desta camada é descrita como sendo de 30 a 100 μm e de 300 a 700 μm em métodos *in vitro* com uso de segmentos intestinais isolados (AVDEEF, 2003).

A Figura 1.2 representa a monocamada de enterócitos e suas porções presentes no intestino com os lados apical e basolateral, glicocálix e principais mecanismos de permeabilidade de fármacos (transporte passivo transcelular, transporte passivo paracelular, transporte ativo mediado por carreadores de influxo, transporte ativo mediado por carreadores de efluxo e endocitose), os quais serão abordados em seguida.

Figura 1.2: Representação da monocamada de enterócitos contemplando os lados apical e basolateral, junções intercelulares e microvilosidades. A camada de muco, a região de microclima e o glicocálix são responsáveis pela formação da CAE. Os mecanismos de permeabilidade também estão representados nesta figura (asteriscos) mostrando o transporte passivo transcelular, transporte passivo paracelular, transporte ativo mediado por carreadores de influxo, transporte ativo mediado por carreadores de efluxo e endocitose. Adaptado de (AVDEEF, 2003; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008).



A absorção de fármacos é um processo muito complexo que envolve diversos parâmetros que devem ser considerados quando um estudo de predição de absorção está sendo desenvolvido. Dentre os vários fatores apresentados anteriormente, a camada de muco na superfície da parede intestinal e as rotas transcelular e paracelular estão diretamente envolvidas na permeabilidade de fármacos. Alguns estudos têm demonstrado que a via paracelular representa uma faixa de 0,01 a 0,1% da área disponível para a absorção em comparação com a área total do intestino delgado (ANTUNES et al., 2013a; LOPES et al., 2014).

Mecanismos de permeabilidade de fármacos

O TGI constitui uma importante barreira para a absorção e os fármacos devem atravessar a parede intestinal por meio de um ou variados mecanismos de transporte a fim de alcançar a circulação sistêmica (ESTUDANTE et al., 2013a; GIACOMINI et al., 2010). Conforme apresentado na Figura 1.2, os principais mecanismos de permeabilidade de fármacos incluem o transporte passivo transcelular, transporte passivo paracelular, transporte ativo mediado por carreadores de influxo, transporte ativo mediado por carreadores de efluxo e endocitose.

O transporte passivo, tal como as vias transcelular e paracelular, constitui a principal via para a absorção de fármacos. No entanto, algumas características físico-químicas relacionadas aos fármacos estão envolvidas neste processo, tais como: caráter ácido-base, lipofilicidade, peso molecular, solubilidade e permeabilidade através da membrana (AVDEEF, 2003; SHAHBAZI; SANTOS, 2013).

O transporte transcelular corresponde à passagem do fármaco através dos enterócitos em função do gradiente de concentração, em um processo ativo ou passivo. Já o transporte paracelular envolve a passagem do fármaco entre as células, ou seja, através dos espaços entre os enterócitos. No entanto, este processo é muito restritivo e seletivo devido à presença das junções intercelulares e somente moléculas pequenas com características hidrofílicas são capazes de atravessar a parede intestinal por meio da via paracelular (ANTUNES et al., 2013a; AUNGST, 2012; SHAHBAZI; SANTOS, 2013).

Outro importante mecanismo que deve ser considerado é o transporte ativo mediado por carreadores de influxo. Ambos os lados, apical e basolateral, dos enterócitos apresentam diferentes tipos de transportadores, os quais são de grande importância para os processos de absorção. Os carreadores de influxo são responsáveis pelo transporte ativo governado pelo gradiente de concentração do fármaco e corresponde a um processo saturável. Alguns transportadores de grande importância incluem OATP (*organic anion transporting polypeptide*), PEPT1 (*peptide transporter 1*), MCT1 (*monocarboxylic acid transporter 1*) e ASBT (*ileal*

apical sodium/bile acid co-transporter), os quais estão localizados no lado apical dos enterócitos (GIACOMINI et al., 2010).

É importante considerar o papel dos transportadores de efluxo. A glicoproteína-P (P-gp) é o carreador mais estudado e é responsável pela secreção de moléculas do lado basolateral para o lado luminal do TGI. Tal efeito é considerável, uma vez que a biodisponibilidade do fármaco pode ser incompleta em razão da atividade da P-gp, desde que haja interação entre a substância e este transportador. Outros carreadores de efluxo também incluem: MRP2 (*multidrug resistance protein 2*) e BCRP (*breast cancer resistance protein*). Todos eles estão localizados na região apical dos enterócitos (BUGGINS; DICKINSON; TAYLOR, 2007; CORNAIRE et al., 2004; GIACOMINI et al., 2010).

O lado basolateral dos enterócitos também apresenta transportadores de grande importância para a absorção de fármacos. Alguns deles são: OCT1 (*organic cation transporter 1*), OSTα-OSTβ (*heteromeric organic solute transporter*) e MRP3 (GIACOMINI et al., 2010).

Os carreadores de influxo e de efluxo não são somente importantes na permeabilidade intestinal de fármacos, mas também podem causar influência significativa no transporte em diferentes tecidos, como nos rins, no fígado e na barreira hematoencefálica, o que é relevante para a farmacocinética, conforme relatado pelo SCBDF (BENET, 2013; HOSEY; CHAN; BENET, 2016).

Os hepatócitos e as células renais apresentam transportadores que são atualmente de grande interesse nos estudos *in vitro* realizados para prever a biodisponibilidade e as rotas de eliminação de fármacos. Alguns carreadores no fígado ou nos rins não estão presentes no epitélio intestinal e vice-versa. Isso levou, nos últimos anos, ao desenvolvimento de variadas técnicas *in vitro*, tais como o uso de culturas celulares transfectadas com determinados genes para expressar o transportador de interesse, com o propósito de elucidar o comportamento do fármaco *in vivo* de acordo com os conceitos apresentados pelo SCBDF (BENET, 2013; ESTUDANTE et al., 2013a; GIACOMINI et al., 2010).

Por fim, o transporte via endocitose não é frequentemente relatado na literatura para a maioria dos fármacos. Este mecanismo ocorre quando uma partícula (proteica ou peptídica) é envolvida pela membrana do enterócito no lado apical e é transportada para o lado oposto por meio de mecanismo ativo (LOPES et al., 2014; SHAHBAZI; SANTOS, 2013).

Métodos *in vitro* e *ex vivo* empregados na avaliação da permeabilidade

Primeiramente, é de suma importância esclarecer as terminologias *in vitro* e *ex vivo* frequentemente utilizadas na descrição de estudos de permeabilidade. Existe a falta de clareza com relação aos dois termos, o que leva à confusão no momento de definir se um método é *in vitro* ou *ex vivo*.

De acordo com o dicionário de termos de câncer da NCI (*National Cancer Institute*), a expressão *ex vivo* significa “fora de um corpo vivo”. Assim, este termo é adequadamente empregado quando um experimento é realizado com o uso de um tecido, órgão ou grupo de células isolados recentemente de um organismo vivo. Os parâmetros fisiológicos são mimetizados com a finalidade de manter as condições similares àquelas que seriam encontradas caso estivessem em um organismo intacto. Além disso, os componentes fisiológicos reproduzidos não podem ser mantidos por um longo período de tempo para os modelos *ex vivo* devido à viabilidade, a qual é um fator crítico neste tipo de metodologia. Assim, para os estudos de permeabilidade, métodos que empregam segmentos intestinais isolados são considerados modelos *ex vivo* (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN INSTITUTE; USA.GOV; SERVICES NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH NATIONAL CANCER, 2016).

Por outro lado, culturas celulares utilizadas nos estudos de permeabilidade são consideradas métodos *in vitro* embora sejam sistemas biológicos, uma vez que seu cultivo é controlado e mantido em laboratório a médio e a longo prazo (como, por exemplo, manutenção de certas linhagens celulares). Assim, modelos que empregam membranas lipídicas artificiais e culturas de células como Caco-2 são considerados métodos *in vitro* (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN INSTITUTE; USA.GOV; SERVICES NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH NATIONAL CANCER, 2016).

Com base nisso e com o objetivo de evitar confusão, os métodos *in vitro* foram divididos no presente trabalho em duas categorias: métodos *in vitro* não biológicos e métodos *in vitro* biológicos.

Atualmente, muitos modelos são descritos na literatura para os estudos de permeabilidade e transporte, os quais são amplamente utilizados na determinação de mecanismos de permeabilidade de fármacos e avaliação de fatores que podem interferir na biodisponibilidade, tais como: interação fármaco-fármaco, interação fármaco-transportador e interação fármaco-enzima. Uma razão para a grande variedade de métodos é a tentativa de predizer a absorção do fármaco em seres humanos. Dentre as diferentes técnicas utilizadas, os métodos *in vitro* não biológicos, *in vitro* biológicos e *ex vivo* são extensivamente usados nos estudos de permeabilidade e de predição de absorção *in vivo*. Os mecanismos de permeabilidade podem ser avaliados por estes métodos, o que reforça ainda mais a importância destes ensaios nas fases iniciais de desenvolvimento farmacêutico (ANTUNES et al., 2013a; ESTUDANTE et al., 2013a; HOSEY; CHAN; BENET, 2016).

Em comparação com os estudos *in vivo*, os métodos *in vitro* e *ex vivo* são menos trabalhosos, apresentam menor custo e envolvem menor número de animais. No entanto, as condições fisiológicas como taxa de esvaziamento gástrico, trânsito gastrintestinal, suprimento sanguíneo e inervação não são consideradas nestes métodos (ANTUNES et al., 2013a; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Métodos *in vitro* não biológicos

Os métodos *in vitro* não biológicos são de fácil execução e são extensivamente utilizados para a seleção de moléculas com potencial farmacológico nas fases iniciais de desenvolvimento farmacêutico. Os fatores que podem interferir nos estudos de permeabilidade *in vitro* incluem: composição da membrana utilizada, condições dos ensaios de transporte como composição e pH da solução tampão e velocidade de agitação do meio.

Membranas artificiais imobilizadas (MAI)

Pidgeon e Venkataram publicaram pela primeira vez um estudo com o método MAI em 1989, onde a lecitina foi empregada como fase estacionária (coluna) do ensaio. Este modelo é muito utilizado para avaliar o coeficiente de partição de fármacos e, de maneira geral, a coluna empregada nos estudos contém em seu interior uma superfície fosfolipídica ligada covalentemente a um suporte de propilamina-sílica inerte com o propósito de mimetizar a metade da bicamada lipídica biológica (PIDGEON; VENKATARAM, 1989).

Como este método é considerado de rápida e fácil execução, é muito comum o seu emprego como uma ferramenta preditiva para a avaliação da permeabilidade por transporte passivo juntamente com as características físico-químicas do fármaco, tais como: tamanho molecular, número de ligações de hidrogênio e área de superfície polar. A simplicidade na realização dos ensaios permitiu que o MAI tivesse aplicação no desenvolvimento farmacêutico (CHAN et al., 2005; PIDGEON; VENKATARAM, 1989; SARMENTO, 2015).

Alguns estudos relatados na literatura apresentam uma boa correlação entre MAI e células Caco-2 ou intestino de rato. Em experimento realizado por Genty e colaboradores (2001), doze fármacos com variadas estruturas moleculares foram avaliados quanto à absorção intestinal utilizando o modelo MAI e o modelo de saco intestinal invertido e não invertido. Uma boa correlação pôde ser observada entre os ensaios em MAI e em intestino de rato. Entretanto, algumas desvantagens relacionadas à rápida degradação da fase estacionária e dificuldade na previsão de interferências causadas por enzimas e transportadores têm sido um desafio para a predição da absorção *in vivo* (GENTY et al., 2001).

Em outro estudo foi observado uma baixa correlação entre valores obtidos em MAI e em Caco-2 para um grupo de 32 fármacos (r=0,31). Além disso, dois fármacos que apresentaram alta permeabilidade em Caco-2 mostraram uma baixa permeabilidade em MAI, o que está relacionado à possibilidade de retenção de cada fármaco à fase estacionária da coluna em função do pH (BOHETS et al., 2001).

Fosfolipídios e colesterol são muito empregados no empacotamento da coluna utilizada nos ensaios MAI. O uso de colunas contendo colesterol pode auxiliar na separação de fármacos quirais, o que pode ser promissor no

desenvolvimento de novas moléculas. Em estudo conduzido por Santoro e colaboradores (2016), o comportamento de eluição de diferentes flavonoides foi avaliado com o emprego de três colunas de MAI. Em comparação com a permeabilidade em Caco-2, a coluna com colesterol apresentou uma melhor correlação (r^2=0,96) (SANTORO et al., 2016).

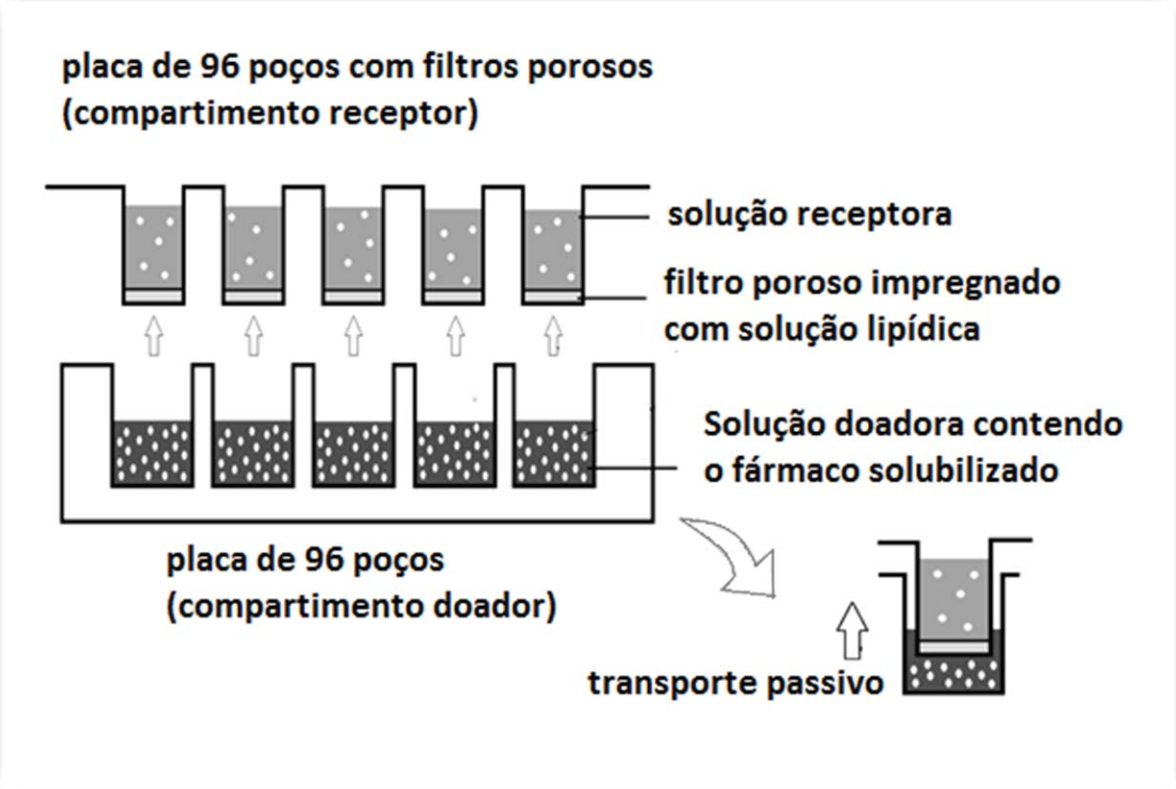
Uma grande desvantagem em relação ao uso de MAI é a superestimação do log*P*. O longo tempo de retenção do fármaco em uma coluna MAI não significa necessariamente alta permeabilidade, pois é importante considerar que a substância é incapaz de transpor a camada lipídica, ficando retida na coluna. Com base nisso, outros métodos têm sido desenvolvidos para melhor mimetizar a condição *in vivo* (AVDEEF et al., 2001).

Membranas artificiais paralelas (PAMPA)

O primeiro relato de ensaios de permeabilidade envolvendo o uso de membranas artificiais paralelas (PAMPA) foi feito por Kansy, Senner e Gubernator em 1998. Este modelo tem sido extensivamente utilizado para os estudos de permeabilidade e predição de absorção. Para os ensaios, uma combinação de lipídios é adicionada como membrana em placas, o que permite a avaliação de vários fármacos ou variar as condições dos ensaios (composição dos meios utilizados, pH do compartimento doador e pH no compartimento receptor) (KANSY; SENNER; GUBERNATOR, 1998).

Os experimentos são realizados em placas de 96 poços, onde a solução doadora é adicionada no compartimento doador. Os filtros porosos da placa receptora (96 poços) são impregnados com solução lipídica (mistura de lipídios solubilizados em solvente orgânico) e, em seguida, cada poço é preenchido com solução tampão isenta de fármaco. O início dos ensaios acontece quando as duas placas, compartimentos doador e receptor, são encaixadas entre si, o que forma um modelo sanduíche. Em seguida, as placas encaixadas são levadas para uma incubadora com controle de temperatura e agitação até o período especificado do ensaio (KANSY; SENNER; GUBERNATOR, 1998). A Figura 1.3 apresenta os componentes das placas utilizadas nos ensaios de permeabilidade em PAMPA.

Figura 1.3: Representação do ensaio de permeabilidade em PAMPA. A solução doadora contendo o fármaco solubilizado é adicionada no compartimento doador e a solução tampão sem fármaco é adicionada no compartimento receptor, o qual apresenta seus filtros porosos previamente impregnados pela solução lipídica para formar a membrana artificial por onde o fármaco deverá atravessar. As placas doadora e receptora são montadas de modo a formar um modelo sanduíche de encaixe. Adaptado de (CHEN, 2008).



Os ensaios em PAMPA são considerados rápidos, de fácil execução e de baixo custo em relação aos ensaios *in vivo*. Deste modo, este modelo *in vitro* é muito utilizado na seleção de novas moléculas nas etapas de desenvolvimento farmacêutico, uma vez que grande parte dos fármacos administrados por via oral são planejados para serem predominantemente transportados por difusão passiva (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; KANSY; SENNER; GUBERNATOR, 1998).

Os experimentos em modelo PAMPA são destinados à avaliação da permeabilidade de fármacos por difusão passiva transcelular, uma vez que a

mistura lipídica impregnada nos filtros porosos representa a bicamada lipídica dos enterócitos e não há interferência de quaisquer transportadores. Embora a via paracelular também seja um tipo de transporte passivo, sua avaliação não é possível, uma vez que a membrana artificial lipídica utilizada apresenta-se íntegra sem interrupções, ou seja, sem os poros correspondentes aos espaços paracelulares encontrados *in vivo* (CHEN, 2008).

A determinação da permeabilidade doador-receptor (*Pe*) foi calculada segundo o modelo matemático proposto por Avdeef (2003) e demostrado na Equação 1 representada a seguir:

$$P_e = -\frac{2.303 V_D}{A \cdot (t - \tau_{SS}) \cdot \varepsilon_a} \cdot \left(\frac{1}{1 + r_V}\right) \cdot \log_{10}\left[1 - \left(\frac{1 + r_V^{-1}}{1 - R_M}\right) \cdot \frac{C_A(t)}{C_D(0)}\right]$$

Equação 1

onde: *rv* corresponde à razão do volume dos compartimentos doador e receptor (V_D/V_A) em mL, *A* corresponde à área da membrana disponível para o processo de permeabilidade (0,3 cm^2), ε_a representa a porosidade aparente do filtro (0,76 µm) (NIELSEN; AVDEEF, 2004), $C_D(0)$ e $C_A(t)$ representam as concentrações (mol/mL) das amostras presentes nos compartimentos, doador no tempo $t = 0$ e no receptor no tempo *t* (segundos), respectivamente. O τ_{SS} corresponde ao tempo de equilíbrio necessário para saturar a membrana com o soluto, estimado em $(54\ R_M + 1) \cdot 60s$ (AVDEEF, 2003). R_M, que resulta em valores de 0 a 1, corresponde à fração molar da amostra retida na membrana definida em unidade mols (m) e calculada a partir da Equação 2.

$$R_M = 1 - \left(\frac{m_{D(t)}}{m_{D(0)}}\right) - \left(\frac{m_{A(t)}}{m_{D(0)}}\right)$$

Equação 2

Embora este procedimento seja simples e apresente boa capacidade de predição, problemas de reprodutibilidade, estabilidade, retenção do fármaco na membrana e erros de predição para algumas substâncias têm sido observados (CHEN, 2008).

Problemas de permeabilidade podem ocorrer para alguns fármacos classificados como altamente permeáveis em modelos *in vivo* ou em culturas celulares. O excesso de solvente orgânico na solução lipídica pode atuar como uma barreira adicional. A elevada taxa de retenção do fármaco no solvente utilizado na solubilização dos lipídios pode ser minimizada ao utilizar solventes voláteis que evaporam logo após sua impregnação nos filtros porosos (CHEN, 2008).

Muitas combinações de lipídios podem ser utilizadas no preparo das membranas artificiais. O método originalmente apresentado por Kansy, Senner e Gubernator (1998) descreve uma mistura de lecitina e n-dodecano, a qual foi impregnada nos filtros porosos em seguida (KANSY; AVDEEF; FISCHER, 2004; KANSY; SENNER; GUBERNATOR, 1998). Além disso, Sugano e colaboradores relataram uma solução lipídica diferente constituída por uma mistura de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol e colesterol solubilizados em 1,7-octadieno com a finalidade de mimetizar a membrana intestinal humana (SUGANO et al., 2003). Desta forma, é possível realizar variadas combinações de lipídios de acordo com o tipo de membrana que se pretende empregar nos estudos de permeabilidade, incluindo gastrointestinal, cutânea e da barreira hematoencefálica (AVDEEF et al., 2005).

Atualmente, placas de PAMPA pré-impregnadas têm sido utilizadas para os estudos de permeabilidade de fármacos, o que permite obter resultados mais precisos e com alta reprodutibilidade (CHEN et al., 2007) No ensaio tradicional, a mistura lipídica é impregnada nos filtros porosos das placas logo após o seu preparo, o que significa que para cada dia de experimento é necessário o preparo recente dos lipídios. Isto acarreta variações entre as placas, o que aumenta os desvios padrão dos resultados obtidos. Já as placas pré-impregnadas apresentam a proporção de lipídios estabelecida para os experimentos de interesse. Esta placa é mantida sob baixa temperatura, o que conserva a constituição lipídica e minimiza as divergências entre os resultados obtidos, além de reduzir o tempo necessário para o preparo da mistura lipídica e evitar que ocorram falhas de impregnação que resultariam em dados inconsistentes. Além disso, as placas pré-impregnadas não

apresentam excesso de solventes, o que reduz a retenção de fármacos nas membranas lipídicas (CHEN, 2008; FAIRSTEIN; SWISSA; DAHAN, 2013).

Em um estudo publicado por Chen e colaboradores (2008), resultados de permeabilidade obtidos a partir do modelo tradicional de PAMPA e a partir das placas pré-impregnadas foram comparados com dados obtidos em Caco-2 e em seres humanos. As placas pré-impregnadas foram capazes de fornecer resultados mais consistentes com Caco-2 e dados de absorção em seres humanos, o que não foi obtido com o modelo tradicional de PAMPA. Além disso, as placas pré-impregnadas permitiram a redução da retenção dos fármacos que ficam normalmente retidos no modelo tradicional e apresentaram-se robustas e estáveis o suficiente para serem conservadas por, pelo menos, um ano (CHEN, 2008).

Conforme mencionado anteriormente, os ensaios em PAMPA permitem a avaliação da permeabilidade de fármacos somente quando esta se dá por meio de transporte passivo transcelular. Desta forma, para avaliar a permeabilidade por outros mecanismos, como transporte passivo por via paracelular ou transporte ativo (influxo e efluxo), é necessário o emprego de outros modelos. Assim, o uso de diferentes métodos capazes de apresentar tais mecanismos pode complementar as informações obtidas em PAMPA e auxiliar na compreensão do transporte de fármacos através do TGI, o que permite a predição da absorção *in vivo* com maior precisão.

Métodos *in vitro* biológicos

Os modelos *in vitro* biológicos são amplamente utilizados nos estudos de permeabilidade e de transporte de fármacos através das membranas. Apesar de serem um pouco mais trabalhosos em comparação com os modelos não-biológicos, sua capacidade preditiva é elevada e permitem a elucidação dos mecanismos de permeabilidade envolvidos na absorção. Esses modelos são baseados em diferentes sistemas celulares, o que permite realizar experimentos em linhagens transfectadas para que seja possível a expressão de determinados transportadores de interesse. Os estudos de permeabilidade nos modelos *in vitro* biológicos podem ser influenciados por alguns fatores, tais como: passagem celular, idade celular,

densidade de semeadura, composição e pH da solução tampão empregada e velocidade de agitação (ANTUNES et al., 2013b).

As culturas celulares mais empregadas nos estudos de permeabilidade incluem Caco-2, MDCK e sistemas de co-cultura (linhagens mistas).

Caco-2

Isoladas primeiramente por Fogh e colaboradores em 1979, as células Caco-2 são originárias de adenocarcinoma de cólon humano e, após sua adequada diferenciação, são capazes de formar uma monocamada celular polarizada. Esta linhagem apresenta similaridades funcional e morfológica com o intestino delgado, enzimas e diferentes tipos de transportadores, como a P-gp. As junções intercelulares e as microvilosidades também estão presentes (ARTURSSON; PALM; LUTHMAN, 2012; AVDEEF, 2003; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; BALIMANE; HAN; CHONG, 2006; ELAMIN et al., 2012; FOGH et al., 1979).

A manutenção das células Caco-2 em laboratório é geralmente feita com o uso de frascos de cultivo, onde ocorre o crescimento celular com o emprego do meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com soro bovino fetal (SBF, 10%), aminoácidos não-essenciais (1%), L-glutamina, penicilina e estreptomicina. A substituição do meio é realizada a cada 48 horas (KOLJONEN et al., 2008).

Para a formação da suspensão celular, é utilizada uma solução de tripsina, a qual é responsável pelo rompimento das junções intercelulares e pela remoção das células da parede do frasco de cultivo. A adição de meio de cultura permite obter a adequada densidade celular no líquido formado, o qual poderá ser transferido para um novo frasco ou semeado nos suportes permeáveis utilizados nos experimentos de permeabilidade. Após a transferência das células, estes suportes são adaptados em placas de 6 poços, onde ocorre o crescimento celular e a formação da monocamada após 21 dias com o uso de meio DMEM. As condições de crescimento em incubadora de cultivo envolvem a manutenção da atmosfera com 5% de gás carbônico (CO_2), umidade relativa em 90% e temperatura a 37°C (KOLJONEN et al., 2008).

É importante destacar que é imprescindível a avaliação da viabilidade das células por meio da resistência elétrica transepitelial (TEER). Esta medida permite verificar a integridade da monocamada formada durante o período de crescimento, de modo que seja possível averiguar possíveis falhas, como regiões onde não houve expansão celular, responsáveis por resultados enganosos. A faixa de valores de TEER relatada na literatura para Caco-2 é de 300 a 500 Ωcm^2 e esta mensuração deverá ser feita antes e após a execução dos ensaios. Além disso, o uso de substâncias marcadoras de permeabilidade, tal como o metoprolol, o manitol e/ou ranitidina (marcadores de alta e de baixa permeabilidade, respectivamente), é recomendado como uma etapa adicional na verificação da viabilidade da monocamada de Caco-2 (KOLJONEN et al., 2008; LI et al., 2008a; WALGREN; WALLE; WALLE, 1998).

Alguns trabalhos relatados na literatura discutem sobre a adequabilidade do uso de células Caco-2 para os estudos de permeabilidade e transporte para a predição da absorção *in vivo*, uma vez que esta linhagem celular expressa enzimas e transportadores de maneira variável. Além disso, a ausência de camada de muco e os espaços paracelulares mais justapostos são constantemente debatidos na literatura, visto que as variações observadas nos resultados publicados são frequentes. Outras limitações relacionadas às células Caco-2 incluem: risco de contaminação por microrganismos, longo período de cultivo (21 dias), formação da CAE mais espessa que na situação *in vivo*, origem celular (cancerosa) e idade celular. Assim, a grande quantidade de variáveis implica nas diferenças significativas intra e interlaboratoriais, o que requer uma adequada padronização dos protocolos experimentais empregados (ANTUNES et al., 2013b; BALIMANE; HAN; CHONG, 2006; LI et al., 2008a).

A boa correlação entre dados obtidos a partir de ensaios em seres humanos e de experimentos em Caco-2 é relatada na literatura para alguns fármacos, especialmente para aqueles que são transportados por via passiva transcelular. Em alguns casos, a baixa permeabilidade em células não necessariamente significa que o fármaco apresenta baixa absorção, pois poderá haver o envolvimento de carreadores específicos nos processos de transporte que não foram expressos adequadamente (ARTURSSON; PALM; LUTHMAN, 2012; SKOLNIK et al., 2010; UNGELL, 2004).

Algumas condições específicas podem ser avaliadas no modelo *in vitro* usando células Caco-2. O impacto de componentes derivados de *Bifidobacterium lactis* 420, *Lactobacillus rhamnosus* HN001 e óleo de peixe foi avaliado em estudos de permeabilidade. Quando administrados separadamente, *B lactis* 420 e o óleo de peixe causaram o melhoramento da integridade da barreira intestinal, o que foi constatado pelo aumento dos valores de TEER da monocamada celular (MOKKALA; LAITINEN; RÖYTIÖ, 2016). No entanto, novas pesquisas são necessárias para compreender este mecanismo e estudos *in vivo* seriam recomendados, uma vez que Caco-2 apresenta diferenças nos parâmetros de integridade em comparação com a situação *in vivo*.

Os valores limites de permeabilidade aparente (Papp) a serem adotados em estudos em Caco-2 não são facilmente encontrados na literatura. Yee propôs que fármacos que apresentam resultados abaixo de 0,1 x 10^{-5} cm/s sejam considerados pouco permeáveis, enquanto que aqueles que apresentam valores de Papp superiores a 1,0 x 10^{-5} cm/s correspondem a fármacos de alta permeabilidade. Já substâncias com valores de Papp entre 0,1 e 1,0x 10^{-5} cm/s podem ser classificados como sendo de permeabilidade moderada (YEE, 1997).

MDCK

As células MDCK (*Madin-Darby canine kidney cells*) são originárias de rim canino e são amplamente utilizadas como uma alternativa ao Caco-2 em estudos de permeabilidade. Quando cultivadas em suportes permeáveis, se diferenciam em células epiteliais formando uma monocamada polarizada com junções intercelulares (ANTUNES et al., 2013b; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Uma boa correlação entre Caco-2 e MDCK pode ser observada para fármacos que são passivamente transportados. Devido à diferença em suas origens, existem irregularidades na expressão de transportadores entre estas duas linhagens de células (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; NEWBY; FREITAS; GHAFOURIAN, 2015).

Em um dos primeiros estudos descritos na literatura para investigar o uso de células MDCK como modelo para os ensaios de permeabilidade, Irvine e colaboradores (1999) avaliaram 55 fármacos com valores variados e conhecidos

de fração absorvida em seres humanos. Para fins de comparação, foram também utilizadas células Caco-2. Foi constatado que os resultados de Papp obtidos em MDCK apresentaram boa correlação com os resultados em Caco-2 (r^2=0,79). Já entre MDCK e os dados em seres humanos, a correlação obtida foi de r^2=0,58 em comparação com r^2=0,54 apresentado entre Caco-2 e seres humanos. Logo, as células MDCK podem ser uma ferramenta útil para ensaios rápidos de permeabilidade na seleção de novas moléculas (IRVINE et al., 1999).

Os procedimentos para manutenção e cultivo das células MDCK se assemelham aos adotados para Caco-2. A grande diferença e vantagem do uso dessa linhagem é o tempo de cultivo necessário para o crescimento celular, que corresponde de 3 a 5 dias. Desta forma, MDCK demonstra menores riscos de contaminação em relação ao Caco-2, além de apresentar menores custos e ser menos laborioso. Estas características contribuem para que os ensaios em MDCK sejam mais rápidos, permitindo avaliar um número maior de fármacos em menos tempo (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; IRVINE et al., 1999; NEWBY; FREITAS; GHAFOURIAN, 2015).

Assim como em culturas de células Caco-2, a avaliação da viabilidade em MDCK também é altamente recomendada nos ensaios de permeabilidade. O estabelecimento de uma faixa de valores de TEER em MDCK depende das condições de manutenção da cultura celular, como o tempo de cultivo para atingir a confluência adequada para os experimentos de permeabilidade. As células MDCK apresentam valores menores de TEER em comparação com Caco-2 e valores mais próximos dos relatados para o intestino delgado *in vivo*. Assim, a literatura tem estabelecido a faixa de valores de TEER para MDCK entre 200 a 300 $\Omega.cm^2$ (ANTUNES et al., 2013b; BRAUN et al., 2000; DE SOUZA et al., 2009; IRVINE et al., 1999; PUTNAM et al., 2002).

Os numerosos estudos de transporte em MDCK levaram ao desenvolvimento de uma nova linhagem designada MDCK-MDR1. Estas células são transfectadas com o gene MDR1, o qual é responsável pela expressão do transportador de efluxo P-gp. Estudos bidirecionais de transporte têm sido realizados neste modelo para avaliar se determinado fármaco é substrato de P-gp ou atua inibindo ou induzindo este carreador (BRAUN et al., 2000; ESTUDANTE et al., 2013b; GIACOMINI et al., 2010; JUNIOR et al., 2015).

As células MDCK-MDR1 apresentam as junções intercelulares mais resistentes em relação ao MDCK, o que dificulta o preparo da suspensão de células. Assim, a faixa de valores, neste caso, é relatada como sendo acima de 900 $\Omega.cm^2$ (BRAUN et al., 2000; DE SOUZA et al., 2009; KIM; BENET, 2004).

Co-cultura de células

Conforme apresentado anteriormente, o uso de células é muito comum nos estudos de permeabilidade intestinal para predizer a absorção *in vivo* de fármacos administrados oralmente. No entanto, alguns fatores que interferem nos processos absortivos não conseguem ser mimetizados *in vitro*. Com base nisso, sistemas de co-cultura têm sido utilizados com o objetivo de obter condições ainda mais próximas da situação *in vivo*.

Os sistemas de co-cultura consistem na combinação de dois ou três tipos celulares com o propósito de melhorar a capacidade preditiva das tradicionais monoculturas. A heterogeneidade celular obtida tem sido considerada como promissora nos ensaios de permeabilidade (HILGENDORF et al., 2000; LUNDQUIST; ARTURSSON, 2016).

Como o TGI não é formado exclusivamente por enterócitos, pesquisadores têm considerado a incorporação de outros tipos celulares, como células secretoras de muco e células M, com a finalidade de formar combinações variadas para os estudos de permeabilidade. Algumas associações de células descritas na literatura incluem Caco-2/HT-29 e Caco-2/Raji B (ANTUNES et al., 2013b; HILGENDORF et al., 2000; LUNDQUIST; ARTURSSON, 2016).

A combinação Caco-2/HT-29 corresponde ao modelo mais utilizado e é capaz de secretar muco, o que forma uma barreira adicional à absorção, tal como na condição encontrada *in vivo*. As células HT-29 são originárias de cólon humano e não expressam P-gp e nem microvilosidades (ARAÚJO; SARMENTO, 2013; ESTUDANTE et al., 2013b; LUNDQUIST; ARTURSSON, 2016).

Estudos de co-cultura tripla têm sido descritos na literatura e este tipo de combinação tem como principal objetivo avaliar a absorção de grandes moléculas, como vacinas destinadas à administração oral. Susewind e colaboradores (2016) utilizaram três tipos celulares (Caco-2/macrófagos/células dendríticas) com o

objetivo de formar uma co-cultura tridimensional destinada à avaliação da permeabilidade em situações de presença e ausência de inflamação. O modelo proposto por este grupo demonstrou ser adequado para mimetizar as condições de absorção no estado inflamatório (SUSEWIND et al., 2016). Em um estudo semelhante, Nielsen e colaboradores utilizaram as mesmas células para formar uma co-cultura tripla designada para estudos de absorção de vacinas. Esta formação celular se mostrou promissora para os estudos de absorção, apesar da necessidade de ensaios mais conclusivos (NIELSEN et al., 2016).

Em outro estudo de co-cultura tripla, foram utilizadas células Caco-2 em combinação com HT-29 e Raji B (originária de linfoma humano e que induz o aparecimento de células M) com o objetivo de obter um modelo ainda mais próximo das condições apresentadas pelo epitélio intestinal humano. Os três tipos celulares conseguiram manter-se viáveis quando cultivados em conjunto, o que permite que sejam aplicados no desenvolvimento de fármacos. Assim, este modelo de co-cultura tripla foi considerado como uma importante alternativa aos métodos *in vitro* tradicionais de monoculturas (ANTUNES et al., 2013b)

Outro grupo de pesquisadores utilizou o mesmo tipo de co-cultura tripla (Caco-2/HT-29/Raji B) para estudar o transporte de insulina mediante variadas condições. O modelo triplo apresentou-se como adequado para ser aplicado nos estudos de permeabilidade de fármacos. No caso de proteínas, estas podem ser avaliadas na forma de solução ou contidas em nanoestruturas. Os resultados mostraram que a co-cultura tripla pode ser um método adequado para avaliar a correlação *in vitro/in vivo* relativo à absorção da insulina destinada à administração oral. Assim, o sistema de co-cultura tripla possui grande potencial no sentido de substituir experimentos em animais, de acordo com a política dos 3 R's (ANTUNES et al., 2013b).

Modelos *ex vivo*

Para os estudos de permeabilidade de fármacos, os modelos *ex vivo* envolvem o uso de segmentos intestinais isolados provenientes de animais, normalmente ratos. A utilização de uma porção do intestino permite que importantes fatores relevantes nos processos de permeabilidade estejam

presentes, tais como: adequado espaço paracelular, camada de muco e expressão de transportadores. No entanto, alguns fármacos podem apresentar resultados incoerentes quanto à predição da absorção *in vivo* devido à ausência de fatores fisiológicos como suprimento sanguíneo, inervação e peristaltismo (ANNAERT et al., 2000; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Os experimentos realizados nos modelos *ex vivo* são normalmente usados para estimar a absorção intestinal de substâncias, estudar seus mecanismos de permeabilidade, predizer a fração absorvida, avaliar interações fármaco-fármaco e verificar o efeito de enzimas e excipientes nos processos de absorção (LUNDQUIST; ARTURSSON, 2016; LUO et al., 2013; RAMÍREZ-RIGO et al., 2014).

Vários métodos *ex vivo*, tais os que envolvem o uso de segmentos intestinais isolados montados em câmaras de difusão vertical e horizontal, têm sido descritos na literatura para os estudos de permeabilidade e elucidação dos mecanismos de transporte (DEZANI et al., 2013a; LUNDQUIST; ARTURSSON, 2016; REIS et al., 2013).

Em comparação com os modelos *in vitro*, os métodos *ex vivo* são mais trabalhosos devido ao envolvimento de animais e aos procedimentos experimentais. Ainda assim, são bem estabelecidos e permitem a avaliação da permeabilidade, o que possibilita a predição da absorção com maior acurácia (LUO et al., 2013). Além disso, os métodos *ex vivo* permitem estudar o transporte local-dependente no TGI, apresentam boa correlação com os modelos *in vivo* e podem ser usados como uma ferramenta auxiliar na seleção de moléculas candidatas a fármacos (JUNIOR et al., 2015).

Saco intestinal invertido

O modelo de saco intestinal invertido consiste na utilização de um segmento intestinal isolado, o qual é invertido. O primeiro relato de estudo *ex vivo* utilizando saco intestinal invertido foi feito por Wilson e Wieman em 1953. Este método permite estudar a permeabilidade de fármacos em diferentes locais do TGI com a finalidade de verificar seus sítios de absorção, especialmente para fármacos que são substratos de carreadores, pois estes estão distribuídos de maneira

heterogênea ao longo do TGI (ALAM; AL-JENOOBI; AL-MOHIZEA, 2012; JUNIOR et al., 2015; WILSON T.H.; WISEMAN G., 1953).

Os primeiros estudos tinham como objetivo avaliar o transporte de açúcares e aminoácidos. Com o passar dos anos, modificações nos protocolos permitiram o aprimoramento deste modelo *ex vivo* em relação às condições adotadas nos ensaios, tais como: soluções tampão empregadas, fornecimento de oxigenação e agitação. Estas alterações possibilitaram aumentar a viabilidade dos segmentos utilizados para mimetizar as condições *in vivo* (ALAM; AL-JENOOBI; AL-MOHIZEA, 2012; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; RUAN et al., 2006).

Na execução dos experimentos por meio do modelo de saco intestinal invertido, o rato é anestesiado após passar por um período de jejum. Uma incisão cirúrgica no abdômen permite acessar a porção intestinal de interesse e isolá-la. Logo após, o segmento intestinal é dividido em porções e invertido com o auxílio de um bastão de vidro. Os trechos intestinais são lavados em solução de Ringer-Krebs fria para a remoção dos resíduos presentes no interior do intestino. Em seguida, cada porção é invertida com o auxílio de um bastão de vidro e suas extremidades são amarradas para formar um saco, cujo interior é preenchido com solução tampão isenta de fármaco. Este sistema montado é colocado em um recipiente contendo o fármaco solubilizado a 37°C e borbulhamento de gases (95% O_2 e 5% CO_2). As coletas das amostras são realizadas a partir do interior do saco intestinal invertido e, ao final dos experimentos, as porções intestinais são lavadas com solução Ringer-Krebs (ALAM; AL-JENOOBI; AL-MOHIZEA, 2012; GRASS, 1997).

Algumas desvantagens relacionadas ao método incluem a perda rápida da viabilidade e da integridade do intestino utilizado. Danos estruturais e morfológicos podem ser observados em razão da extensa manipulação do tecido, o que pode comprometer os resultados de permeabilidade. É possível realizar uma análise histológica por meio de microscopia para investigar o nível de dano e as alterações morfológicas causadas ao intestino. Desta forma, estudos de integridade são de suma importância para avaliar as condições do segmento intestinal utilizado (ALAM; AL-JENOOBI; AL-MOHIZEA, 2012; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; LUO et al., 2013).

Câmaras de difusão horizontal tipo Ussing e câmaras de difusão vertical tipo Franz

O uso de câmaras de difusão em estudos de permeabilidade consiste em adaptar o segmento intestinal em um equipamento que permite a adição de uma solução com o fármaco solubilizado no compartimento doador e a coleta de amostras a partir do compartimento receptor. Existem dois tipos de câmaras de difusão que vêm sendo descritas na literatura para os estudos de permeabilidade intestinal e avaliação dos mecanismos de transporte de substâncias: câmaras de difusão horizontal tipo Ussing e câmaras de difusão vertical tipo Franz (DEZANI et al., 2013a; LUNDQUIST; ARTURSSON, 2016; REIS et al., 2013; USSING; ZERAHN, 1951).

Ussing e Zerahn desenvolveram as câmaras de difusão horizontal tipo Ussing em 1951 para serem utilizadas em estudos de transporte de íons em pele isolada de sapo (USSING; ZERAHN, 1951). Este equipamento consiste em câmaras e cada uma apresenta um compartimento doador e outro receptor posicionados lado a lado. O segmento intestinal isolado proveniente de rato é aberto longitudinalmente e posicionado entre os dois compartimentos, os quais são preenchidos com solução tampão, oxigenada com borbulhamento de mistura gasosa (95% de O_2 e 5% de CO_2). A movimentação causada pelo fluxo de gás em cada compartimento proporciona a mistura constante do líquido, além de promover a manutenção da viabilidade intestinal durante os experimentos e a redução da CAE (LUO et al., 2013).

Outro modelo de equipamento corresponde às câmaras de difusão vertical tipo Franz. Este dispositivo foi por muito tempo utilizado nos estudos de permeação cutânea e recentemente tem sido empregado nos estudos de permeabilidade intestinal. Assim como nas câmaras de Ussing, o modelo Franz, também é constituído de câmaras formadas pelos compartimentos doadores e receptores. A diferença entre os dois dispositivos se dá na direção do fluxo de transporte, ou seja, em câmaras tipo Ussing a direção é horizontal, enquanto que em câmaras tipo Franz, o fluxo é vertical (DEZANI et al., 2013a; USSING; ZERAHN, 1951).

O uso das câmaras de difusão tipo Ussing e tipo Franz possibilita estudar os diferentes sítios de absorção de fármacos, uma vez que podem ser utilizadas porções do duodeno, jejuno ou íleo. A quantidade de fármaco necessário para a

realização dos estudos em câmaras de difusão não é elevada, o que permite que tais estudos sejam aplicáveis em etapas do desenvolvimento farmacêutico (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; ROZEHNAL et al., 2012).

Os procedimentos de preparo dos ensaios são muito semelhantes entre os dois tipos de câmaras, com a diferença do posicionamento do segmento intestinal entre os compartimentos doador e receptor, ou seja, em câmaras de difusão tipo Ussing os segmentos intestinais são posicionados verticalmente, enquanto que em câmaras de difusão tipo Franz, os segmentos intestinais são posicionados horizontalmente (DEZANI et al., 2013a; REIS et al., 2013).

A grande vantagem do emprego das câmaras de difusão horizontal tipo Ussing é a possibilidade de mensurar a resistência elétrica dos segmentos intestinais para indicar a viabilidade durante a execução dos experimentos (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000). A Figura 1.4 e Figura 1.5 representam os dois tipos de câmaras de difusão empregadas nos estudos de permeabilidade intestinal.

Figura 1.4: Representação esquemática da câmara de difusão horizontal tipo Ussing. O segmento intestinal é posicionado entre os compartimentos doador e receptor e permanece no sentido vertical.

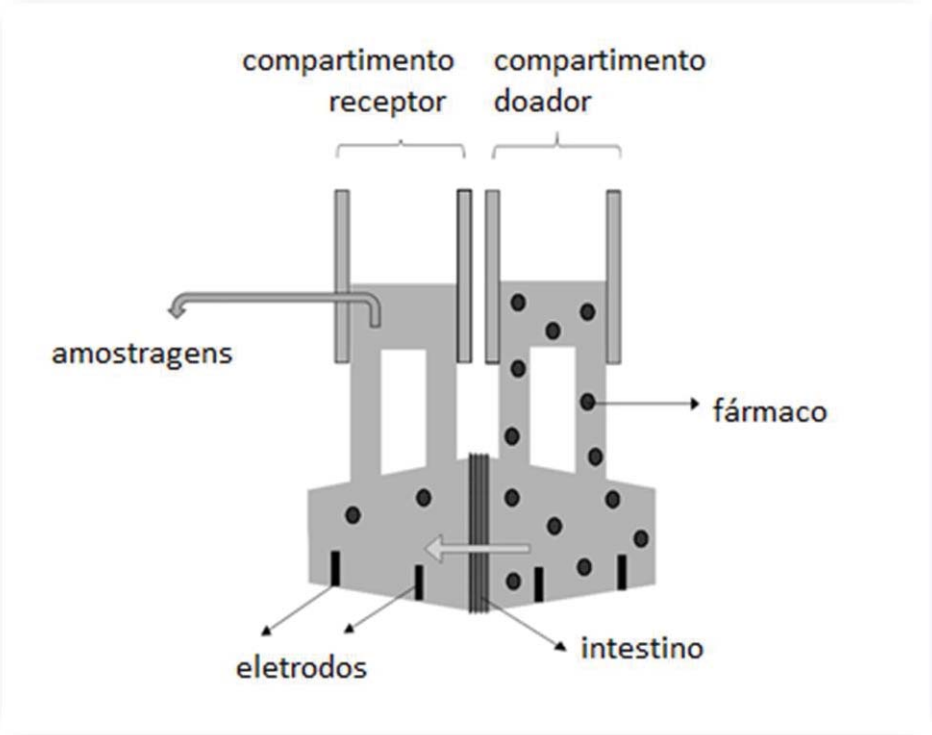
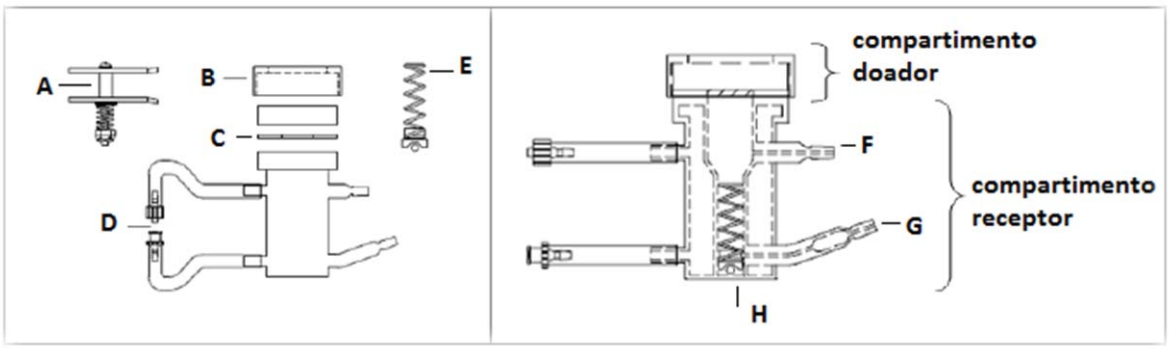


Figura 1.5: Representação esquemática da câmara de difusão vertical tipo Franz mostrando os principais componentes: (A) presilha fixadora do compartimento doador, (B) compartimento doador, (C) adaptador de material inerte onde o segmento intestinal é posicionado, (D) circulação externa de água aquecida, (E) espiral utilizada para a agitação magnética do compartimento receptor, (F) via de reposição de meio isento de fármaco, (G) via de coleta das amostras, (H) compartimento receptor. O segmento intestinal é posicionado entre os compartimentos doador e receptor e permanece no sentido horizontal. Adaptado de (HANSON RESEARCH, 2001).



A solução tampão contendo o fármaco solubilizado é adicionada no compartimento doador das câmaras tipo Ussing ou tipo Franz. O compartimento doador coincide com o lado apical do segmento intestinal, o que permite que o experimento seja realizado na direção A→B (apical-basolateral). Entretanto, é possível fazer a adição da solução contendo o fármaco no lado basolateral, o que permite, neste caso, avaliar o transporte secretório no sentido B→A (basolateral-apical). A realização dos ensaios nos sentidos A→B e B→A constituem os estudos bidirecionais, muito aplicados em casos de avaliação dos mecanismos de efluxo (ANTUNES et al., 2013b; DEZANI et al., 2013a).

A viabilidade do tecido é um parâmetro importante a ser considerado nos estudos de permeabilidade em câmaras de difusão. Embora a composição da solução tampão empregada e a oxigenação desta solução possam preservar o segmento intestinal, alguns estudos na literatura discutem sobre os danos morfológicos causados após um determinado tempo em incubação no equipamento. O uso de marcadores tais como fluoresceína e metoprolol, podem indicar as condições do intestino, uma vez que estas substâncias são marcadores

de baixa e alta permeabilidade, respectivamente. Ainda, substâncias como manitol, polietilenoglicol 400 e inulina podem também ser utilizados como marcadores de integridade, porém estas três substâncias são radiomarcadas e requerem protocolos adicionais de segurança para o manuseio adequado, a fim de evitar contaminação do ambiente de trabalho e dos pesquisadores envolvidos. Algumas estratégias podem ser adotadas para retardar a deterioração do segmento intestinal como o uso de solução tampão contendo HEPES (ácido 4-2-Hydroxythyl-1-piperazinesulfonico), glicose ou L-glutamina, adequado manuseio do intestino e borbulhamento de mistura de gases na solução (DEZANI et al., 2013a; TUKKER, 2000).

De maneira complementar à verificação da viabilidade, as medidas da resistência elétrica transepitelial (TEER) são recomendadas antes e após a execução dos experimentos, caso estes estejam sendo realizados nas câmaras de difusão vertical tipo Franz. Nas câmaras de difusão horizontais tipo Ussing, a mensuração do TEER pode ser feita ainda durante a execução dos ensaios, uma vez que o equipamento é dotado de eletrodos que permitem esta avaliação (DEZANI et al., 2013a; LUNDQUIST; ARTURSSON, 2016; REIS et al., 2013; TUKKER, 2000).

Existem poucos estudos na literatura que trazem valores de referências para TEER. O tratamento adotado na preparação dos segmentos intestinais pode influenciar esta medida e, por este motivo, é importante padronizar a faixa de valores aceitável para tais estudos. Em estudo conduzido por Dezani e colaboradores (2013), a faixa de valores de TEER utilizada como limite foi de 70-110 $\Omega.cm^2$ antes dos experimentos, após os experimentos, valores de TEER abaixo de 30 $\Omega.cm^2$ indicaram a exclusão do referido segmento intestinal utilizado (DEZANI et al., 2013a; JONES et al., 2013; LUNDQUIST; ARTURSSON, 2016; PRETORIUS; BOUIC, 2009; TUKKER, 2000).

Os resultados de permeabilidade oriundos dos experimentos executados em câmaras de difusão horizontal e vertical são expressos como Papp, a qual é baseada no aparecimento do fármaco no compartimento receptor em função do tempo.

A Papp é calculada usando a Equação 3, demonstrada abaixo (DEZANI et al., 2013a; REIS et al., 2013; TUKKER, 2000):

$$P_{app} = \frac{\Delta Q}{\Delta t}\ x\ \frac{1}{A}\ x\ \frac{1}{C_0}$$

Equação 3

onde: P_{app} corresponde à permeabilidade aparente em cm/s, $\Delta Q/\Delta t$ é o fluxo em µmol/min obtido para o ensaio de permeabilidade após o período de equilíbrio entre o segmento intestinal e o fármaco, *A* corresponde à área de superfície intestinal disponível para a absorção (cm^2) e C_0 é a concentração incial do fármaco no compartimento doador (µmol/mL).

Predição da absorção *in vivo*

Dentre os variados experimentos descritos na literatura para a avaliação da permeabilidade intestinal de fármacos, os métodos *in vitro* e *ex vivo* têm sido amplamente utilizados devido às suas capacidades de predizer a absorção *in vivo*.

O SCB e o SCBDF são ferramentas capazes de auxiliar na predição do comportamento *in vivo* dos fármacos oralmente administrados e contribuem para o desenvolvimento e de novas formulações e novas moléculas. Conforme mencionado, os dois sistemas classificam os fármacos em quatro classes de acordo com as características de solubilidade, permeabilidade e metabolismo (AMIDON et al., 1995; BENET, 2013; WU; BENET, 2005).

De acordo com o SCB, a permeabilidade refere-se a dados obtidos em jejuno de seres humanos e é considerada alta quando os resultados são maiores que 10^{-4} cm/s, enquanto que baixa permeabilidade significa valores abaixo deste número. Substâncias altamente permeáveis são usadas para a determinação de valores limítrofes para a classificação biofarmacêutica, pois são extensamente absorvidas e, consequentemente, apresentam valores de fração absorvida acima de 90% quando uma dose oral é administrada (AVDEEF, 2003).

Quando um ensaio *in vivo* é conduzido, algumas variações nos resultados podem ser observadas. Nesse caso, um estudo mais completo com o emprego de diferentes métodos, faz-se necessário para que seja possível elucidar os

mecanismos envolvidos na permeabilidade dos fármacos estudados. Assim, os modelos *in vitro* e *ex vivo* podem ser empregados como estudos bidirecionais para a investigação de potenciais substratos da P-gp, por exemplo.

Além dos transportadores, é importante destacar a influência do metabolismo sobre os processos de permeabilidade intestinal. Deste modo, o SCBDF fornece uma ferramenta que permite prever a influência de metabolismo na disponibilidade *in vivo* de fármacos. Além disso, este sistema também auxilia na predição das interações fármaco-fármaco, fármaco-alimento e interação transportador-enzima. Logo, os estudos de transporte em modelos já consolidados na literatura permitem também contribuir na predição das rotas de eliminação, uma vez que, na maioria dos casos, para que um fármaco seja extensivamente metabolizado, ele deverá inevitavelmente ter ampla absorção (BENET, 2013).

Em alguns métodos, as estratégias utilizadas para promover o aumento de permeabilidade de fármacos que são pouco absorvidos podem trazer algumas consequências que devem ser consideradas. O uso de co-solvente e promotores de absorção podem contribuir para a absorção de xenobióticos e de substâncias não desejáveis como toxinas e antígenos a partir do lado luminal do TGI (DELI, 2009).

Até o momento, não existe um método único capaz de predizer a absorção *in vivo*. A maneira mais racional de empregar cada modelo dependerá dos objetivos do estudo. Em outras palavras, a avaliação da permeabilidade pode envolver o uso de dois ou mais métodos. Assim, se o objetivo do estudo é avaliar se um fármaco apresenta o transporte passivo transcelular como seu mecanismo de permeabilidade predominante, o ensaio em PAMPA seria recomendado. Por outro lado, recomendam-se os ensaios em MDCK-MDR1 caso haja a necessidade de avaliar um potencial substrato de P-gp. Assim, os mecanismos envolvidos na permeabilidade de fármacos podem ser elucidados com a utilização de cada um dos métodos para que as estratégias a serem usadas no desenvolvimento sejam adequadas.

Em um estudo conduzido por Zur, Hanson e Dahan (2014), a classificação da codeína de acordo com o SCB foi discutida. Inicialmente, foi constatado na literatura que este fármaco era classificado como sendo de baixa permeabilidade com base em seu valor de log*P*. A permeabilidade intestinal da codeína foi, então, avaliada por meio de estudos *in vitro* e *in vivo* em ratos. Os estudos indicaram que

a alta permeabilidade desta substância ultrapassou os valores obtidos para o metoprolol (marcador de alta permeabilidade). Assim, a codeína foi reclassificada como classe I do SCB, o que está coerente com sua fração absorvida maior que 90%. Logo, o trabalho destacou a importância da utilização de diferentes métodos para a avaliação da permeabilidade de fármacos com a finalidade de evitar erros na classificação, uma vez que fatores e parâmetros mais complexos devem ser considerados e não são previstos com base nas características físico-químicas (ZUR; HANSON; DAHAN, 2014).

CONCLUSÃO

Devido à complexidade dos estudos de permeabilidade, muitos modelos têm sido desenvolvidos desde a publicação do guia da FDA. Para a permeabilidade, a adequada solubilidade do fármaco torna-se mandatória. Assim, a caraterização de uma substância quanto sua solubilidade não é somente importante para o SCB, mas também para o SCBDF, o qual considera diferentes fatores além das características de solubilidade, permeabilidade e metabolismo para melhor compreender o comportamento dos fármacos *in vivo* após a administração oral.

Dentre os variados modelos disponíveis para a avaliação da permeabilidade e transporte, os métodos *in vitro* e *ex vivo* têm sido reconhecidos como rápidos e de baixo custo em relação aos ensaios *in vivo*, o que permite que sejam aplicados na triagem de novas moléculas durante o desenvolvimento farmacêutico. Mais precisamente, a tendência atual é o desenvolvimento de métodos *in vitro* baseados em sistemas celulares e métodos *ex vivo* com uso de segmentos intestinais isolados. É importante destacar que os sistemas de co-cultura de duas ou três linhagens celulares têm sido recentemente aplicados para os estudos de permeabilidade de substâncias de diferentes pesos moleculares na tentativa de incluir fatores que interferem na absorção como a camada de muco e as células M, embora seja ainda impraticável a inclusão de parâmetros relacionados aos fatores fisiológicos.

Já os experimentos que envolvem animais enfrentam questões éticas cada vez mais rigorosas, o que pode retardar o desenvolvimento de moléculas com potencial farmacológico. Ainda assim, o uso de animais para a elucidação de questões não respondidas pelos demais modelos pode ser de grande valor preditivo. Assim, apesar dos experimentos realizados em animais serem mais trabalhosos, mais caros e mais demorados em comparação aos modelos *in vitro*, eles apresentam as melhores condições de predizer a absorção *in vivo* e devem ser utilizados de maneira racional, ou seja, em situações em que um fármaco apresenta algum problema específico em sua biodisponibilidade que deve ser investigado com maiores detalhes.

REFERÊNCIAS

ALAM, M. A.; AL-JENOOBI, F. I.; AL-MOHIZEA, A. M. Everted gut sac model as a tool in pharmaceutical research: Limitations and applications. Journal of Pharmacy and Pharmacology, v. 64, n. 3, p. 326–336, 2012.

AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. Pharmaceutical research, v. 12, n. 3, p. 413–420, 1995.

ANNAERT, P. et al. In vitro, ex vivo, and in situ intestinal absorption characteristics of the antiviral ester prodrug adefovir dipivoxil. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 89, n. 8, p. 1054–1062, 2000.

ANTUNES, F. et al. Models to predict intestinal absorption of therapeutic peptides and proteins. Current drug metabolism, v. 14, n. 1, p. 4–20, 2013a.

ANTUNES, F. et al. Establishment of a triple co-culture in vitro cell models to study intestinal absorption of peptide drugs. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 83, n. 3, p. 427–435, 2013b.

ARAÚJO, F.; SARMENTO, B. Towards the characterization of an in vitro triple co-culture intestine cell model for permeability studies. International Journal of Pharmaceutics, v. 458, n. 1, p. 128–134, 2013.

ARTURSSON, P.; PALM, K.; LUTHMAN, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 64, n. SUPPL., p. 280–289, 2012.

ARTURSSON, P.; UNGELL, A. L.; LOFROTH, J. E. Selective paracellular permeability in 2 models of intestinal-absorption - cultured monolayers of human intestinal epithelial-cells and rat intestinal segments. Pharm Res [0724-8741], v. 10, n. 8, p. 1123–1129, 1993.

AUNGST, B. J. Absorption Enhancers: Applications and Advances. The AAPS Journal, v. 14, n. 1, p. 10–18, 2012.

AVDEEF, A. et al. Drug absorption in vitro model: Filter-immobilized artificial membranes: 2. Studies of the permeability properties of lactones in Piper methysticum Forst. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 14, n. 4, p. 271–280, 2001.

AVDEEF, A. Absorption and Drug Development:solubility, permeability and charge state. 1st. ed. Hoboken, New Jersey: Wiley Interscience, 2003.

AVDEEF, A. et al. Caco-2 permeability of weakly basic drugs predicted with the Double-Sink PAMPA pKaflux method. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 24, n. 4, p. 333–349, 2005.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S.; MORRISON, R. A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, v. 44, n. 1, p. 301–312, 2000.

BALIMANE, P. V; HAN, Y.-H.; CHONG, S. Current industrial practices of assessing permeability and P-glycoprotein interaction. The AAPS journal, v. 8, n. 1, p. E1–E13, 2006.

BENET, L. Z. The role of BCS (biopharmaceutics classificatrion system) and BDDCS (Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System) in drug development. Journal of pharmaceutical sciences, v. 102, n. 1, p. 34–42, 2013.

BOHETS, H. et al. Strategies for absorption screening in drug discovery and development. Current topics in medicinal chemistry, v. 1, n. 5, p. 367–383, 2001.

BRAUN, A. et al. Cell cultures as tools in biopharmacy. European Journal of Pharmaceutical Sciences. Anais...2000

BUGGINS, T. R.; DICKINSON, P. A.; TAYLOR, G. The effects of pharmaceutical excipients on drug disposition. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 59, n. 15, p. 1482–1503, 2007.

CAO, X.; YU, L. X.; SUN, D. Drug absortion principles. In: Biopharmaceutics Applications in Drug Development. New York: Springer, 2008. p. 75–100.

CDER/FDA. Guidance for Industry waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. Center for Drug Evaluation and Research, n. August, 2000.

CHAN, E. C. Y. et al. Modeling Caco-2 permeability of drugs using immobilized artificial membrane chromatography and physicochemical descriptors. Journal of Chromatography A, v. 1072, n. 2, p. 159–168, 2005.

CHEN, M. L. Lipid excipients and delivery systems for pharmaceutical development: A regulatory perspective. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 60, n. 6, p. 768–777, 2008.

CHEN, X. et al. A novel design of artificial membrane for improving the PAMPA model. Pharmaceutical Research, v. 25, n. 7, p. 1511–1520, 2007.

CORNAIRE, G. et al. Impact of excipients on the absorption of P-glycoprotein substrates in vitro and in vivo. International Journal of Pharmaceutics, v. 278, n. 1, p. 119–131, 2004.

DAHAN, A.; AMIDON, G. L. Segmental dependent transport of low permeability compounds along the small intestine due to P-glycoprotein: The role of efflux transport in the oral absorption of BCS class III drugs. Molecular Pharmaceutics, v. 6, n. 1, p. 19–28, 2009.

DAHAN, A.; WEST, B. T.; AMIDON, G. L. Segmental-dependent membrane permeability along the intestine following oral drug administration: Evaluation of a triple single-pass intestinal perfusion (TSPIP) approach in the rat. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 36, n. 2–3, p. 320–329, 2009.

DE SOUZA, J. et al. Comparison of bidirectional lamivudine and zidovudine transport using MDCK, MDCK-MDR1, and Caco-2 cell monolayers. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 98, n. 11, p. 4413–4419, 2009.

DEFERME, S.; ANNAERT, P.; AUGUSTIJNS, P. In Vitro Screening Models to Assess and Metabolism. In: Drug Absorption Studies: In Situ, In Vitro and In Silico Models. [s.l: s.n.]. p. 182–215.

DELI, M. A. Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes, v. 1788, n. 4, p. 892–910, 2009.

DEZANI, A. B. et al. Determination of lamivudine and zidovudine permeability using a different ex vivo method in Franz cells. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, v. 67, n. 3, p. 194–202, 2013.

ELAMIN, E. et al. Effects of ethanol and acetaldehyde on tight junction integrity: In vitro study in a three dimensional intestinal epithelial cell culture model. PLoS ONE, v. 7, n. 4, 2012.

ESTUDANTE, M. et al. Intestinal drug transporters: an overview. Advanced drug delivery reviews, v. 65, n. 10, p. 1340–56, 2013a.

ESTUDANTE, M. et al. Effect of P-glycoprotein on the rat intestinal permeability and metabolism of the BDDCS class 1 drug verapamil. Molecular Pharmaceutics, v. 10, n. 11, p. 4038–4045, 2013b.

FAIRSTEIN, M.; SWISSA, R.; DAHAN, A. Regional-Dependent Intestinal Permeability and BCS Classification: Elucidation of pH-Related Complexity in Rats Using Pseudoephedrine. The AAPS Journal, v. 15, n. 2, p. 589–597, 2013.

FASANO, A. Innovative strategies for the oral delivery of drugs and peptides. Trends in biotechnology, v. 16, n. 4, p. 152–157, 1998.

FOGH, J. et al. Establishment of Human Colon Carcinoma Lines in Nude Mice. Pathobiology, v. 47, n. 2, p. 136–144, 1979.

GALETIN, A.; GERTZ, M.; HOUSTON, J. B. Contribution of intestinal cytochrome p450-mediated metabolism to drug-drug inhibition and induction interactions. Drug metabolism and pharmacokinetics, v. 25, n. 1, p. 28–47, 2010.

GEBERT, A.; ROTHKÖTTER, H.-J.; PABST, R. M Cells in Peyer's Patches of the Intestine. International Review of Cytology, v. 167, p. 91–159, 1996.

GENTY, M. et al. Determination of the passive absorption through the rat intestine using chromatographic indices and molar volume. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 12, n. 3, p. 223–229, 2001.

GIACOMINI, K. M. et al. Membrane transporters in drug development. Nature Reviews Drug Discovery, v. 9, n. 3, p. 215–236, 2010.

GRASS, G. M. Simulation models to predict oral drug absorption from in vitro data. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 23, n. 1–3, p. 199–219, 1997.

HANSON RESEARCH. Manual Diffusion Cell Operation Manual. [s.l: s.n.].

HILGENDORF, C. et al. Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: Permeabilities via diffusion, inside- and outside-directed carrier-mediated transport. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 89, n. 1, p. 63–75, 2000.

HOSEY, C. M.; CHAN, R.; BENET, L. Z. BDDCS Predictions, Self-Correcting Aspects of BDDCS Assignments, BDDCS Assignment Corrections, and Classification for more than 175 Additional Drugs. The AAPS journal, v. 18, n. 1, p. 251–60, 2016.

IRVINE, J. D. et al. MDCK (Madin − Darby Canine Kidney) Cells : A Tool for Membrane Permeability Screening. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 88, n. 1, 1999.

JONES, E. et al. Monolayered multipolymeric buccal films with drug and polymers of opposing solubilities for ARV therapy: Physico-mechanical evaluation and molecular mechanics modelling. International Journal of Pharmaceutics, v. 455, n. 1, p. 197–212, 2013.

JUNIOR, J. B. S. et al. Evaluating Potential P-gp Substrates : Main Aspects to Choose the Adequate Permeability Model for Assessing Gastrointestinal Drug Absorption. Mini reviews in medicinal chemistry, v. 15, n. 10, p. 858–871, 2015.

KANSY, M.; AVDEEF, A.; FISCHER, H. Advances in screening for membrane permeability: High-resolution PAMPA for medicinal chemists. Drug Discovery Today: Technologies, v. 1, n. 4, p. 349–355, 2004.

KANSY, M.; SENNER, F.; GUBERNATOR, K. Physicochemical high throughput screening: Parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. Journal of Medicinal Chemistry, v. 41, n. 7, p. 1007–1010, 1998.

KIM, W. Y.; BENET, L. Z. P-glycoprotein (P-gp/MDR1)-mediated efflux of sex-steroid hormones and modulation of P-gp expression in vitro. Pharmaceutical Research, v. 21, n. 7, p. 1284–1293, 2004.

KOLJONEN, M. et al. Transport evaluation of salicylic acid and structurally related compounds across Caco-2 cell monolayers and artificial PAMPA membranes. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 70, n. 2, p. 531–538, 2008.

LENNERNÄS, H.; ABRAHAMSSON, B. The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension. The Journal of pharmacy and pharmacology, v. 57, n. 3, p. 273–285, 2005.

LI, C. et al. Permeability evaluation of peptidic HCV protease inhibitors in Caco-2 cells-correlation with in vivo absorption predicted in humans. Biochemical Pharmacology, v. 76, n. 12, p. 1757–1764, 2008.

LOPES, M. A. et al. Intestinal absorption of insulin nanoparticles: Contribution of M cells. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, v. 10, n. 6, p. 1139–1151, 2014.

LOZOYA-AGULLO, I. et al. Segmental-dependent permeability throughout the small intestine following oral drug administration: Single-pass vs. Doluisio approach to in-situ rat perfusion. International Journal of Pharmaceutics, v. 515, n. 1–2, p. 201–208, 2016.

LUNDQUIST, P.; ARTURSSON, P. Oral absorption of peptides and nanoparticles across the human intestine: Opportunities, limitations and studies in human tissuesAdvanced Drug Delivery ReviewsThe Authors, , 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2016.07.007>

LUO, Z. et al. Ex vivo and in situ approaches used to study intestinal absorption. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, v. 68, n. 2, p. 208–216, 2013.

MOKKALA, K.; LAITINEN, K.; RÖYTIÖ, H. Bifidobacterium lactis 420 and fish oil enhances intestinal epithelial integrity in Caco-2 cells. Nutrition Research, v. 36, n. 3, p. 246–252, 2016.

NEWBY, D.; FREITAS, A. A.; GHAFOURIAN, T. Decision trees to characterise the roles of permeability and solubility on the prediction of oral absorption. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 90, p. 751–765, 2015.

NIELSEN, L. H. et al. Triple co-culture cell model as an in vitro model for oral particulate vaccine systems. 10th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology. Anais...Glasgow, United Kingdom.: 2016

PIDGEON, C.; VENKATARAM, U. V. Immobilized artificial membrane chromatography: Supports composed of membrane lipids. Analytical Biochemistry, v. 176, n. 1, p. 36–47, 1989.

PRETORIUS, E.; BOUIC, P. J. D. Permeation of four oral drugs through human intestinal mucosa. AAPS PharmSciTech, v. 10, n. 1, p. 270–275, 2009.

PUTNAM, W. S. et al. Comparison of bidirectional cephalexin transport across MDCK and Caco-2 cell monolayers: Interactions with peptide transporters. Pharmaceutical Research, v. 19, n. 1, p. 27–33, 2002.

RAMÍREZ-RIGO, M. V. et al. Enhanced intestinal permeability and oral bioavailability of enalapril maleate upon complexation with the cationic polymethacrylate Eudragit E100. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 55, n. 1, p. 1–11, 2014.

REIS, J. M. et al. Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, ex vivo and in situ Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 48, n. 4–5, p. 781–789, 2013.

ROZEHNAL, V. et al. Human small intestinal and colonic tissue mounted in the Ussing chamber as a tool for characterizing the intestinal absorption of drugs. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 46, n. 5, p. 367–373, 2012.

RUAN, L. P. et al. Prediction of human absorption of natural compounds by the non-everted rat intestinal sac model. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 41, n. 5, p. 605–610, 2006.

SANTORO, A. L. et al. Quantitative structure-retention relationships of flavonoids unraveled by immobilized artificial membrane chromatography. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 88, p. 147–157, 2016.

SARMENTO, B. Concepts and Models for Drug Permeability Studies: Cell and Tissue based In Vitro Culture Models. [s.l: s.n.].

SAVJANI, K. T.; GAJJAR, A. K.; SAVJANI, J. K. Drug solubility: importance and enhancement techniques. ISRN pharmaceutics, v. 2012, n. 100 mL, p. 195727, 2012.

SHAHBAZI, M.-A.; SANTOS, H. A. Improving oral absorption via drug-loaded nanocarriers: absorption mechanisms, intestinal models and rational fabrication. Current drug metabolism, v. 14, n. 1, p. 28–56, 2013.

SKOLNIK, S. et al. Towards prediction of in vivo intestinal absorption using a 96-well Caco-2 assay. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 99, n. 7, p. 3246–3265, 2010.

SUGANO, K. et al. Prediction of human intestinal permeability using artificial membrane permeability. International Journal of Pharmaceutics, v. 257, n. 1–2, p. 245–251, 2003.

SUSEWIND, J. et al. A 3D co-culture of three human cell lines to model the inflamed intestinal mucosa for safety testing of nanomaterials. Nanotoxicology, v. 5390, n. December, p. 1–10, 2016.

TUKKER, J. J. In vitro methods for the assessment of permeability. [s.l: s.n.].

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN INSTITUTE; USA.GOV; SERVICES NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH NATIONAL CANCER. NCI Dictionary of Cancer Terms. Disponível em: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms>. Acesso em: 21 dez. 2016.

UNGELL, A. L. B. Caco-2 replace or refine? Drug Discovery Today: Technologies, v. 1, n. 4, p. 423–430, 2004.

USSING, H. H.; ZERAHN, K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. Acta physiologica Scandinavica, v. 23, n. 2–3, p. 110–127, 1951.

VOLPE, D. A. Application of method suitability for drug permeability classification. The AAPS journal, v. 12, n. 4, p. 670–678, 2010.

WALGREN, R. A.; WALLE, U. K.; WALLE, T. Transport of quercetin and its glucosides across human intestinal epithelial Caco-2 cells. Biochemical Pharmacology, v. 55, n. 10, p. 1721–1727, 1998.

WILSON T.H.; WISEMAN G. A method for studying intestinal metabolism and absorption. The Journal of Physiology, v. 121, n. 2, p. 45, 1953.

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.

YEE, S. In Vitro Prmeability Across Caco-2 Cells (colonic) Can redict In Vivo (Small Intestinal) Absorption in Man - Fact or Myth. Pharmaceutical Research, v. 14, n. 6, p. 763–766, 1997.

ZUR, M.; HANSON, A. S.; DAHAN, A. The complexity of intestinal permeability: Assigning the correct BCS classification through careful data interpretation. European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences, v. 61, p. 11–7, 2014.

1.3 PRINCIPAIS ASPECTOS CONSIDERADOS NA AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE EFLUXO PELA P-GP NOS ENSAIOS DE PERMEABILIDADE INTESTINAL

RESUMO

O sucesso terapêutico de um fármaco administrado oralmente depende de inúmeros fatores que interferem na biodisponibilidade, eficácia farmacológica e segurança clínica. Em células humanas, carreadores de efluxo ATP-dependentes, como a glicoproteína P (P-gp), BCRP e MRP2, são responsáveis pela redução da absorção de algumas substâncias. A escolha de metodologias para avaliar fármacos como potenciais substratos, inibidores ou indutores de transportadores de efluxo, principalmente P-gp, deve ser cuidadosamente feita, uma vez que cada método de estudo possui vantagens e limitações. Dependendo das condições adotadas nos experimentos, os resultados podem não corresponder às características reais do fármaco em razão do seu transporte de fármaco através de membrana mediado por carreadores específicos de efluxo. O presente trabalho teve como objetivo apresentar a P-gp e sua função nos processos de absorção oral de substâncias, além de discutir sobre os principais métodos utilizados nos ensaios de permeabilidade para determinar a condição de um fármaco como substrato da P-gp. Estudos têm demonstrado que este carreador corresponde a uma proteína dinâmica, que facilita a secreção de substâncias endógenas como a aldosterona e protege as células contra a entrada de xenobióticos. Diferentes métodos utilizados para a avaliação dos mecanismos de efluxo são atualmente empregados para avaliar fármacos como substratos da P-gp. Em um planejamento inicial, MDCK-MDR1 tende a ser o modelo de primeira escolha para os estudos de efluxo devido à sua capacidade de expressar grande quantidade de P-gp, seguido pelos estudos conduzidos em células Caco-2. No entanto, é necessário avaliar as vantagens e as desvantagens de cada método a fim de obter resultados coerentes que permitam uma boa correlação *in vitro* x *in situ* x *in vivo*.

Palavras-chave: Caco-2, permeabilidade de fármacos, efluxo, *ex vivo, in situ, in vitro*, MDCK, MDCK-MDR1, glicoproteína-P.

INTRODUÇÃO

Na rotina clínica, a via oral constitui a rota de administração preferencial em razão da sua conveniência, segurança, eficiência com o mínimo de desconforto ao paciente e, ainda, baixo custo de produção. Muitos dos medicamentos comercializados mundialmente estão disponíveis sob formas farmacêuticas destinadas à administração oral. Entretanto, um dos pré-requisitos para o sucesso terapêutico é a adequada absorção intestinal a fim de assegurar a presença do fármaco em seu sítio de ação. A absorção do fármaco através do TGI (trato gastrintestinal) é complexa e pode ser influenciado por diversos fatores que impactam na dissolução/solubilidade e permeabilidade da substância, tais como: solubilidade aquosa do fármaco, tempo de esvaziamento gástrico, motilidade intestinal, pH intestinal, mecanismos envolvidos no transporte através das membranas dos enterócitos, metabolismo pré-sistêmico e excipientes farmacotécnicos (ANTUNES et al., 2013a; COOK; SHENOY, 2003; EGAN; LAURI, 2002; GRASS, 1997; MIRET; ABRAHAMSE; DE GROENE, 2004; POLLI et al., 2004; PRAKASH et al., 2008; SHARGEL; WU-PONG; YU, 2005).

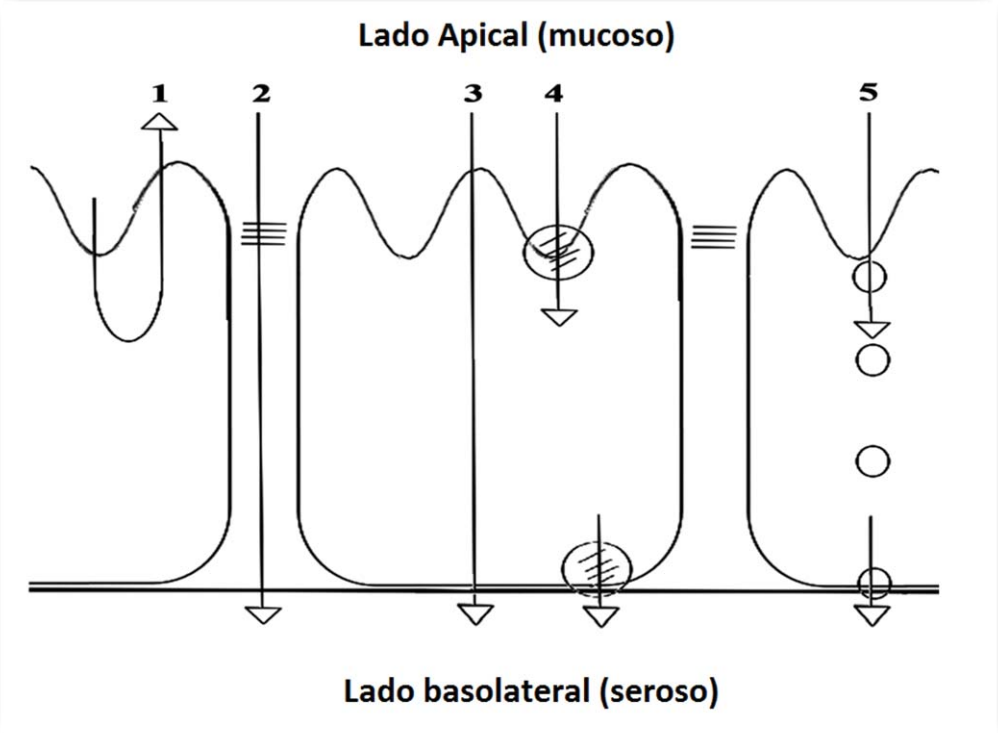
A absorção de fármacos ocorre principalmente no intestino delgado, especialmente no duodeno e porções proximais do jejuno, através dos enterócitos (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; FAGERHOLM; JOHANSSON; LENNERNÄS, 1996; GRASSI et al., 2007; HILLGREN; KATO; BORCHARDT, 1995; LENNERNÄS, 2007). Os enterócitos são células altamente polarizadas, ou seja, apresentam um lado apical (lado mucoso) voltado para o lúmen intestinal e um lado basolateral (lado seroso) voltado para a circulação sanguínea. Os enterócitos são conectados por junções intercelulares. As características lipofílicas das membranas dos enterócitos e as junções intercelulares constituem as principais barreiras físicas à permeabilidade de fármacos (FAGERHOLM, 2007; GRASSI et al., 2007; SALAMA; EDDINGTON; FASANO, 2006).

A permeabilidade de um fármaco através da parede intestinal é um processo dinâmico e pode ocorrer por meio de um ou mais mecanismos de difusão passiva ou transporte ativo (Figura 1.6). A difusão passiva é o mecanismo mais comum envolvido na absorção de substâncias através da parede intestinal e é dividido em dois tipos: transcelular (através dos enterócitos) e paracelular (através dos poros nas junções intercelulares). O transporte ativo é mediado por transportadores divididos em duas categorias: influxo e efluxo (APPARAJU; NALLANI, 2007;

BALIMANE; HAN; CHONG, 2006; BUCKLEY et al., 2012; CAO et al., 2006; GRASSI et al., 2007).

O transporte passivo transcelular ocorre através da bicamada lipídica dos enterócitos (Figura 1.6, rota 3) e consiste na transferência de massa por meio da membrana em função do gradiente de concentração sem que haja gasto de energia. Este tipo de transporte de fármacos através de membranas segue a lei de Fick, onde a taxa de absorção é proporcional à concentração do fármaco presente na área superficial do lado luminal. Em geral, este processo depende da fração não carregada da molécula e leva em consideração o pKa e as propriedades físico-químicas do fármaco como lipofilicidade (logP e logD), área de superfície polar, número de ligações de hidrogênio e tamanho molecular. Muitas substâncias são absorvidas através do TGI por meio deste mecanismo, especialmente fármacos hidrofóbicos (APPARAJU; NALLANI, 2007; CAO et al., 2006; GRASSI et al., 2007).

Figura 1.6: Principais vias de absorção do fármaco através de células intestinais: (1) efluxo mediado por transportador; (2) paracelular; (3) transcelular passiva; (4) transcelular mediado por carreador; (5) endocitose mediado por receptor. Adaptado de (DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008).



O transporte passivo paracelular ocorre através das junções intercelulares (Figura1.6, rota 2), e fármacos que são transportados por esta via são moléculas pequenas (peso molecular menor que 250 Da) e hidrofílicas (logP<0). As junções intercelulares são mais unidas nas porções distais do intestino delgado (ANTUNES et al., 2013a; AVDEEF, 2003; COOK; SHENOY, 2003). Por outro lado, a permeabilidade mediada por carreadores ocorre por mecanismo ativo ou por difusão facilitada e constitui um processo saturável (BUCKLEY et al., 2012).

Os transportadores podem estar presentes tanto no lado apical quanto no lado basolateral dos enterócitos e podem ser carreadores de influxo ou de efluxo. Transportadores de influxo são responsáveis pelo transporte de fármacos no sentido absortivo, enquanto os transportadores de efluxo atuam na direção contrária, ou seja, transportam os fármacos do lado basolateral para o lado apical, o que resulta em sua secreção. Para que estes dois mecanismos de transporte de fármacos possam ocorrer, é necessária a interação entre a substância e o transportador (Figura 1.6, rotas 1, 4 e 5). Nestes casos, as características estruturais dos fármacos são fatores críticos para que ocorra o reconhecimento da molécula substrato pelos carreadores. Transportadores de influxo, tal como a PEPT (transportadores peptídicos) são responsáveis pelo aumento na absorção intestinal, enquanto que os transportadores de efluxo possuem efeito contrário.

A glicoproteína-P (também conhecida como P-gp ou ABCB1) é codificada pelo gene MDR1 e é a maior representante dos transportadores de efluxo conhecidos atualmente, sendo a responsável pela baixa absorção intestinal de alguns fármacos. A P-gp apresenta uma importante função nos processos absortivos por atuar na secreção de substâncias endógenas e exógenas. O mecanismo de efluxo pela P-gp tende a ser mais eficiente em porções distais, a partir do estômago em direção ao cólon, o que torna um fato importante a ser considerado no desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação prolongada (CAO et al., 2006; DAHAN; AMIDON, 2009; MARTINEZ; AMIDON, 2002; TAKANO; YUMOTO; MURAKAMI, 2006).

Outros carreadores de efluxo, tal como BCRP (*breast cancer resistance protein*) e MRP2 (*multidrug resistance associated protein 2*) são também funcionais e também podem limitar a absorção de fármacos (BALIMANE; HAN; CHONG, 2006). Estes transportadores fazem parte da família ABC (ATP-bidding cassete) (AYLIN ARICI et al., 2010; BALIMANE; HAN; CHONG, 2006; DAHAN; AMIDON,

2009; FARDEL et al., 1995; GAO et al., 2014; IIDA; TOMITA; HAYASHI, 2005; KIMURA et al., 2007; QUEVEDO; NIETO; BRIÑÓN, 2011; SANKATSING et al., 2004; SCHINKEL; JONKER, 2012). Assim, um dos parâmetros que deve ser analisado durante o desenvolvimento de fármacos e formulações é a influência dos carreadores de efluxo na absorção, principalmente pela P-gp, uma vez que se a substância for substrato deste carreador, poderá haver problemas na biodisponibilidade, eficácia e segurança dos medicamentos.

A identificação de substâncias com permeabilidade intestinal adequada é uma importante meta durante os processos de otimização de novas moléculas (LI et al., 2008a). A caracterização da permeabilidade intestinal e dos mecanismos de transporte de fármacos é um fator crítico no desenvolvimento farmacêutico, pois auxilia na tomada de decisões e evita perdas de moléculas candidatas devido aos problemas farmacocinéticos não previstos anteriormente (UNGELL, 2002; VOLPE, 2010).

Com a finalidade de avaliar a permeabilidade de fármacos, vários métodos *in vitro*, *ex vivo* e *in situ* têm sido desenvolvidos. Atualmente, os métodos mais utilizados para a caracterização da permeabilidade são: métodos *in vitro* baseados em sistemas artificiais, métodos *in vitro* baseados em sistemas celulares, métodos *ex vivo* com o uso de segmentos intestinais isolados em câmaras de difusão, métodos de perfusão intestinal *in situ*, métodos *in vivo* em animais para estudos farmacocinéticos e métodos *in silico,* os quais utilizam programas computacionais. Um único método ou a combinação deles é rotineiramente utilizado na avaliação da permeabilidade nas etapas de descoberta de novas moléculas e na classificação biofarmacêutica. Cada modelo possui vantagens intrínsecas e limitações a serem consideradas. Assim, é frequente a dificuldade em usar um único modelo para predizer as características de permeabilidade *in vivo* com precisão. (BALIMANE; CHONG, 2005; BOHETS et al., 2001; VOLPE, 2010).

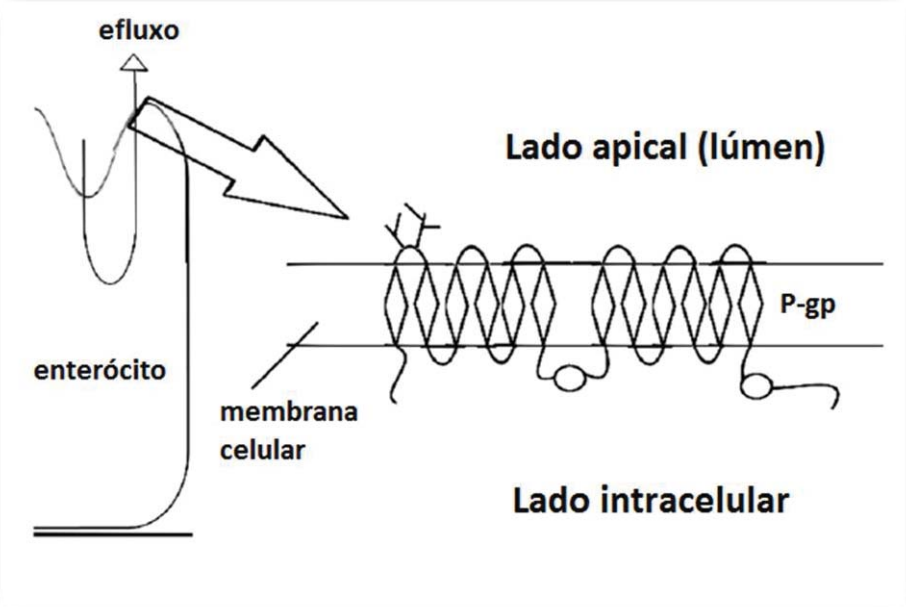
A escolha do método adequado para avaliar se um fármaco é substrato, inibidor ou indutor de P-gp em estudos de permeabilidade deve ser feita cuidadosamente. Alguns ensaios realizados em modelos *in silico* e em modelos *in vitro* com emprego de membranas artificiais paralelas (PAMPA) não consideram a importância da P-gp nos processos de absorção. Dependendo das condições adotadas nos estudos, os resultados podem não refletir as reais características do fármaco, caso este apresente interação com a P-gp.

Com base no exposto, o presente trabalho teve como objetivo apresentar as funções da P-gp e discutir sobre os principais métodos utilizados atualmente para avaliar se uma substância é considerada um substrato da P-gp ou não. Assim, a escolha de um método adequado para a avaliação da influência de efluxo dependerá do conhecimento dos diferentes modelos aplicados nos estudos de previsão da absorção *in vivo*. Além disso, o melhoramento das condições empregadas nos experimentos permite o uso racional dos métodos atualmente utilizados, com o fornecimento de resultados mais precisos, confiáveis e de alto valor preditivo.

Glicoproteína-P (P-gp)

Como mencionado anteriormente, a P-gp faz parte da família ABC de transportadores e é o carreador de efluxo mais estudado. Esta proteína apresenta 170 kDa e é formada por duas porções com um sítio intracelular para ligação de ATP, conforme demonstrado na Figura 1.7 (CHANG et al., 2013; CHOI; YU, 2014; SCHINKEL; JONKER, 2012).

Figura 1.7: Estrutura da P-glicoproteína: as duas cadeias presentes na membrana, que contêm 6 cadeias em sequência e um núcleo de ligação (NBD) cada um. O primeiro *loop* extracelular é fortemente N-glicosilado.



A P-gp está presente em diferentes tecidos do organismo e apresenta uma importante função de proteção contra xenobióticos. Sua função também inclui a secreção de substâncias endógenas, tais como aldosterona e cortisol, produzidas pela glândula adrenal (Quadro 1.4) (SANKATSING et al., 2004). Além disso, este carreador de efluxo é expresso em células de variadas barreiras biológicas, como por exemplo, barreira hematoencefálica, barreira testicular, barreira ocular e barreira placentária (TAKANO; YUMOTO; MURAKAMI, 2006). Estudos indicam que a expressão de P-gp ao longo do TGI é heterogênea. Alguns autores consideram que a quantidade deste carreador aumenta gradualmente da região proximal do TGI em direção às porções finais do intestino (DAHAN; AMIDON, 2009; TAKANO; YUMOTO; MURAKAMI, 2006). Já outros estudos relatam que o efeito de efluxo é maior no jejuno e íleo em comparação com a região colônica (IIDA; TOMITA; HAYASHI, 2005). As diferenças regionais na expressão de P-gp e de sua atividade necessitam ser levada em consideração, especialmente em relação ao desenvolvimento de formulações de liberação retardada/prolongada contendo fármacos que interagem com a P-gp de alguma maneira.

Quadro 1.4: Funções da P-gp em relação à sua localização nos diferentes tecidos do organismo de seres humanos.

Tecido	Localização	Função	*Referências*
Jejuno, íleo e cólon	Superfície mucosa	Secreta e transporta substâncias para o lúmen intestinal.	(HASLAM et al., 2008; KAGAN et al., 2010)
Fígado	Superfície dos canais biliares dos hepatócitos e superfície apical de células que recobrem pequenos ductos biliares	Excreção de xenobióticos	(PORTEOUS et al., 2013; SANKATSING et al., 2004)
Coração	Células endoteliais de arteríolas e capilares cardíacos	Proteção contra substâncias que podem causar toxicidade cardíaca	(AYLIN ARICI et al., 2010; BUDDE et al., 2011)
Cérebro	Endotélio de capilares	Proteção contra substâncias tóxicas	(PORTEOUS et al., 2013)
Medula óssea	Células-tronco hematopoiéticas	Proteção contra substâncias tóxicas	(KIM et al., 2011)
Sistema imunológico	Células CD4+, CD8+, T e exterminadoras naturais	Secreção de moléculas citotóxicas	(ZHANG et al., 2014)
Rins	Superfície de células epiteliais dos túbulos proximais	Excreção de xenobióticos	(MILLER, 2014)
Glândula adrenal	Superfície de células do córtex e medula	Secreção de aldosterona e cortisol	(BELLO-REUSS et al., 2000; ERNEST; BELLO-REUSS, 1995)

Um estudo de permeabilidade de fármacos foi realizado em modelo de perfusão *in situ* em ratos para avaliar o papel da P-gp na absorção da cimetidina e da famotidina. Ambos os fármacos apresentaram absorção segmento-dependente, onde as taxas de permeabilidade decresceram ao longo do TGI (cimetidina: 7,2 x 10^{-6} cm/s no jejuno proximal e 4,1 x 10^{-6} cm/s no íleo distal; famoditina: 3,7 x 10^{-6} cm/s no jejuno proximal e 1,0 x 10^{-6} cm/s no íleo distal). A co-perfusão de verapamil, um inibidor de P-gp, mostrou que não houve diferenças significativas na

permeabilidade nas regiões proximais, enquanto que o aumento da permeabilidade foi observado nas porções distais (cimetidina com verapamil: 7,3 x 10^{-6} cm/s no jejuno proximal e 7,4 x 10^{-6} cm/s no íleo distal; famotidina com verapamil: 4,8 x 10^{-6} cm/s no jejuno proximal e 5,2 x 10^{-6} cm/c no íleo distal). Com base nestes resultados, os autores sugeriram que a P-gp atua no transporte de efluxo da cimetidina e da famotidina, limitando a absorção de ambas nas porções distais, em comparação com as porções proximais do intestino delgado (DAHAN; AMIDON, 2009).

Atualmente, muitos estudos têm sido conduzidos com a finalidade de avaliar a absorção segmento-dependente de fármacos, principalmente para investigar o impacto da influência de transportadores de influxo e de efluxo nos processos de permeabilidade. Assim, é importante considerar a região intestinal que será submetida ao estudo nos modelos *ex vivo* com emprego de segmentos intestinais isolados ou em modelos de perfusão *in situ* (FAIRSTEIN; SWISSA; DAHAN, 2013; JIANG et al., 2014; LENNERNAS, 2014).

É importante destacar que a P-gp também atua na depuração sistêmica de substâncias não somente daquelas que são oralmente administradas, mas também dos fármacos administrados por via intravenosa (DRESCHER et al., 2003; ESTUDANTE et al., 2013a).

Descrita pela primeira vez na década de 70, em um estudo de agentes anticancerígenos, a P-gp atua no controle da permeabilidade de diversas classes farmacológicas de medicamentos, tais como agentes anticancerígenos, imunossupressores, hormônios esteroidais, bloqueadores de canais de cálcio, betabloqueadores, dentre outros (AZEREDO; COSTA; UCHOA, 2009; JULIANO; LING, 1976; TAKANO; YUMOTO; MURAKAMI, 2006). Tais moléculas apresentam características estruturais e orgânicas semelhantes, como por exemplo, peso molecular entre 200 até 1900 Da, não são carregados ou são fracamente básicos e apresentam coeficientes de partição (logP) maior que 2, sendo protonados em pH fisiológico (SCHINKEL; JONKER, 2012; SVENSSON et al., 1999). Substratos de P-gp tendem a ser anfifílicos e esta característica representa um importante papel na interação entre as moléculas e a P-gp (SCHINKEL; JONKER, 2012; SHAROM, 2014).

Alguns dos substratos da P-gp descritos na literatura incluem: abamectina, acebutolol, acetaminofeno, amprenavir, atenolol, atorvastatina, azitromicina,

betametasona, bromocriptina, camptotecina, carbamazepina, carvedilol, cloroquina, clorpromazina, cimetidina, dexametasona, digoxina, cloridrato de doxorrubicina, eritromicina, fexofenadina, imatinibe, indinavir, ivermectina, levofloxacino, lopinavir, losartana, metadona, metotrexato, metoprolol, monensina, nelfinavir, nifedipino, omeprazol, ondansetrona, paclitaxel, paracetamol, prednisona, ranitidina, reserpina, risperidona, ritonavir, saquinavir, timolol, triancinolona, trimetoprima, vecurônio, verapamil, vinblastina, vincristina, vinorelbina e zidovudina (QUEVEDO; NIETO; BRIÑÓN, 2011; SCHINKEL; JONKER, 2012; TAKANO; YUMOTO; MURAKAMI, 2006).

A atividade da P-gp pode ser induzida por uma ampla variedade de substâncias, tais como: clotrimazol, midazolam, fenobarbital, reserpina, rifampicina, erva de São João, amprenavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir, verapamil, carbamazepina, corticosterona, dexametasona, nifedipino, prednisolona, nefazodona, trazodona, aldosterona, ciclosporina, progesterona, levotiroxina e digoxina (TAKANO; YUMOTO; MURAKAMI, 2006). Outros fármacos indutores incluem os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINE) como o diclofenaco, indometacina e a nimesulida. Além disso, a P-gp é também induzida por estresse físico causado por raio-X, radiação ultravioleta e choque térmico (SILVA et al., 2011). Esta indução pode ser aplicável em estudos que avaliam especificidade de substratos e/ou inibidores da P-gp (TAKANO; YUMOTO; MURAKAMI, 2006). Alguns fármacos, como a rifampicina, induzem tanto a P-gp quanto a CYP3A4 presente no intestino e no fígado. Esta indução tem o potencial de alterar a farmacocinética de medicamentos administrados oralmente. Por exemplo, a administração concomitante de rifampicina (indutor de P-gp) e digoxina (substrato de P-gp) pode diminuir a biodisponibilidade deste último fármaco (AZEREDO; COSTA; UCHOA, 2009; OGA; YASAKA; JEN, 2003).

Uma vez que a P-gp desempenha uma importante função para reduzir a absorção de substâncias presentes no trato gastrointestinal, a inibição deste carreador de efluxo torna-se uma estratégia muito importante para aumentar a biodisponibilidade de fármacos (AYLIN ARICI et al., 2010; BANSAL et al., 2009; CUMMINS et al., 2003; DAHAN; AMIDON, 2009; IIDA; TOMITA; HAYASHI, 2005; QUEVEDO; NIETO; BRIÑÓN, 2011; SABABI; BORGÅ; HULTKVIST-BENGTSSON, 2001).

Inibidores de P-gp

A inibição da P-gp tem sido o foco de diversos estudos na identificação de substâncias que interagem com este carreador. Em ensaios de permeabilidade, o acúmulo de fármacos que são potenciais substratos da P-gp no interior de células que expressam este transportador é avaliado. Quando uma substância sofre a ação da P-gp, espera-se que a sua concentração intracelular seja baixa na ausência de inibidores (AYLIN ARICI et al., 2010; BANSAL et al., 2009; CUMMINS et al., 2003; DAHAN; AMIDON, 2009; FARDEL et al., 1995; IIDA; TOMITA; HAYASHI, 2005; JI; LI; HE, 2009; MATSSON et al., 2009; ODA et al., 2014; QUEVEDO; NIETO; BRIÑÓN, 2011; SABABI; BORGÅ; HULTKVIST-BENGTSSON, 2001).

Em tratamentos terapêuticos com medicamentos antineoplásicos e antirretrovirais, a inibição da P-gp pode trazer benefícios consideráveis com o objetivo de melhorar a biodisponibilidade de fármacos substratos. Em quimioterapia, uma das razões relacionadas à ineficácia do tratamento refere-se ao desenvolvimento de células tumorais resistentes a múltiplos fármacos (MDR) devido à expressão de P-gp (ABRAHAM; SALAMA; AZAB, 2015; DE SOUZA et al., 2009; JI; LI; HE, 2009; MATSSON et al., 2009; ODA et al., 2014; SANKATSING et al., 2004).

A busca por moduladores de P-gp mais eficazes tem sido feita para otimizar a resposta clínica de um fármaco. Alguns estudos *in silico* têm considerado a estrutura molecular deste carreador e seus possíveis inibidores, o que direciona a pesquisa sobre a inibição da P-gp (RAEVSKY et al., 2013; SHITYAKOV; FÖRSTER, 2014).

A P-gp possui ao menos dois sítios de ligação de ATP: um relacionado ao transporte de substâncias e outro relacionado à modulação deste transportador. Além disso, é possível que existam mais sítios de ligação com fármacos (CHANG et al., 2013; CROWLEY; CALLAGHAN, 2010; ISHIKAWA et al., 2010; JI; LI; HE, 2009; MATSSON et al., 2009; TAKANO; YUMOTO; MURAKAMI, 2006).

Em geral, os inibidores de P-gp apresentam elevada lipofilicidade e modulam a função deste carreador por competir com o sítio de ligação do substrato. Alguns exemplos de inibidores são: amiodarona, amitriptilina, anlodipino, astemizol, atorvastatina, aureobasidina A, azelastina, barnidipino, benidipino, bepridil,

biricodar, bromocriptina, buspirona, cafeína, caroverina, carvedilol, celiprolol, colesterol, cimetidina, claritromicina, clomipramina, clotrimazol, colchicina, cortisol, ciclosporina, daunorrubicina, desipramina, desloratadina, dexametasona, dexverapamil, digoxina, diltiazem, dipiridamol, doxepina, doxorrubicina, efonidipino, elacridar, eletriptana, emetina, emopamil, ergometrina, ergotamina, eritromicina, estramustina, etoposídeo, felodipino, fentanil, fluconazol, fluoxetina, flufenazina, fluvoxamina, galopamil, genisteína, haloperidol, hidrocortisona, indinavir, isradipino, itraconazol, ivermectina, cetoconazol, lansoprazol, loperamida, loratadina, lovastatina, manidipino, metadona, metoprolol, mibefradil, miconazol, midazolam, morfina, nefazodona, nelfinavir, nicardipino, nifedipino, nilvadipino, nisoldipino, nitrendipino, norverapamil, pristinamicina, progesterona, prometazina, valspodar, quercetina, quinidina, quinina, ranitidina, reserpina, ritonavir, saquinavir, silimarina, sinvastatina, sirolimo, sufentanila, talinolol, tamoxifeno, terfenadina, troleandomicina, verapamil, vinblastina (AZEREDO; COSTA; UCHOA, 2009; SANKATSING et al., 2004; SCHINKEL; JONKER, 2012; TAKANO; YUMOTO; MURAKAMI, 2006).

Em estudos de efluxo em culturas celulares, a digoxina e a rodamina-123 são as substâncias mais utilizadas para verificar a atividade da P-gp em função de serem excelentes substratos deste carreador (CHOI; KIM, 2014).

Alguns inibidores de P-gp são também inibidores das enzimas CYP3A (ciclosporina, elacridar, ritonavir, verapamil e eritromicina) (AZEREDO; COSTA; UCHOA, 2009; GAO et al., 2014). Este fato é considerado importante, uma vez que a CYP3A faz parte do citocromo P450 responsável pela metabolização intestinal de um grande número de fármacos (FANG et al., 2009; GAO et al., 2014). Assim, a administração oral de um inibidor de P-gp/ CYP3A e um substrato P-gp/CYP3A pode resultar em um aumento significativo da concentração plasmática do substrato de P-gp. Nesta situação, o risco de efeito tóxico aumenta em função do processo metabólico diminuído.

Outra característica a ser considerada em relação aos inibidores de P-gp é a especificidade. Alguns fármacos podem inibir diferentes carreadores de efluxo ao mesmo tempo. Matsson e colaboradores (2009) realizaram um estudo com 122 substâncias para determinar a inibição dos três principais transportadores de efluxo da família ABC em seres humanos: P-gp, BCRP e MRP2 (MATSSON et al., 2009). Foi observado pelos autores que o haloperidol, a maprotilina, noscapina,

prednisona, prociclidina, propafenona, quindina, quinina, tetraciclina e vinblastina apresentaram-se como inibidores específicos da P-gp. Outra substância denominada GF120918 atuou como inibidor na faixa de concentração de 300 nM a 5 mM. O verapamil atuou como inibidor da P-gp e da BCRP. Vários estudos de efluxo descritos na literatura utilizam o verapamil como inibidor da P-gp para determinar se um fármaco é ou não seu substrato. No entanto, como o verapamil também inibe BCRP, os valores de permeação de uma substância pode levar a conclusões enganosas (AYLIN ARICI et al., 2010; BANSAL et al., 2009; IIDA; TOMITA; HAYASHI, 2005; JI; LI; HE, 2009; SABABI; BORGÅ; HULTKVIST-BENGTSSON, 2001).

Em outro estudo conduzido por Ji, Li, e He (2009) foi investigada a utilização de um par de inibidores de P-gp: verapamil e CJX2 (derivado do anlodipino). Os autores concluíram que houve uma modulação simultânea da P-gp, porém os dois fármacos atuaram em diferentes sítios da glicoproteína (JI; LI; HE, 2009). Em estratégias utilizadas no desenvolvimento farmacêutico, uma alternativa para evitar o uso de inibidores de P-gp inclui o desenvolvimento de pró-fármacos.

A dinâmica da inibição da P-gp pode ser analisada a partir das perspectivas de competitividade e não competitividade. Quando a inibição é competitiva, o inibidor liga-se a todos os sítios de transporte e não deixa espaços livres para o substrato interagir com o carreador de efluxo. Por outro lado, a inibição não competitiva é caracterizada pela ligação do inibidor não competitivo a um sítio alostérico da P-gp. Em seguida, o inibidor não é deslocado pelo carreador e o processo de efluxo é bloqueado (SRIVALLI; LAKSHMI, 2012).

O polimorfismo genético também desempenha uma importante função na atividade da P-gp. Esse fator pode influenciar em como as células respondem a certas substâncias, especialmente em tratamentos terapêuticos. Além disso, diferenças nos níveis de expressão do gene MDR1 podem explicar as variadas respostas da P-gp em diferentes indivíduos, o que pode afetar os resultados dos tratamentos terapêuticos (AZEREDO; COSTA; UCHOA, 2009; ISHIKAWA et al., 2010; SANKATSING et al., 2004).

Para avaliar a atividade da P-gp e sua influência na absorção, diferentes ensaios de permeabilidade podem ser executados (Quadro 1.5.). Os modelos podem ser utilizados em associação para estudar este transportador, bem como seus substratos e inibidores (SRIVALLI; LAKSHMI, 2012; YANG et al., 2013).

Srivalli e Lakshmi (2012) propuseram dois estágios principais de triagem de moléculas a serem aplicados nos estudos de efluxo em etapas de desenvolvimento farmacêutico. O primeiro estágio consiste em realizar estudos *in silico* e *in vitro* com o propósito de analisar a afinidade química do fármaco com a P-gp. O segundo estágio inclui os estudos de perfusão *in situ* e/ou *in vivo* e estudos em seres humanos. As duas etapas permitem uma compreensão mais detalhada e mais precisa da afinidade e especificidade dos substratos e inibidores de P-gp. Neste sentido, as vantagens e limitações dos principais métodos utilizados para avaliar um potencial substrato devem ser analisadas e consideradas, a fim de que os resultados obtidos possam ser correlacionados adequadamente com os dados *in vivo* de seres humanos (SRIVALLI; LAKSHMI, 2012).

Fármacos BCS classe I são, em sua maioria, predominantemente transportados por difusão passiva e tendem a não sofrerem a influência da P-gp. Por outro lado, substâncias que apresentam baixa permeabilidade podem interagir com este carreador, o que dificulta o processo de absorção, principalmente em segmentos distais do intestino em função da grande heterogeneidade na expressão de P-gp (DAHAN; AMIDON, 2009).

Conforme mencionado anteriormente, existem muitos fármacos que são inibidores ou substratos da P-gp. Dentre eles, o verapamil é o mais utilizado nos estudos de efluxo com o intuito de investigar se determinada substância é um substrato da P-gp. É importante considerar, ainda, a influência na glicoproteína causada por outros componentes naturais provenientes de frutas como toranja, laranja, chá verde e alguns excipientes muito utilizados nas formulações farmacêuticas, como o polissorbato 80 (TAKANO; YUMOTO; MURAKAMI, 2006; WON; OBERLIES; PAINE, 2012; ZHAO et al., 2013).

A concentração do inibidor nos estudos de efluxo é um fator importante a ser considerado. O verapamil, por exemplo, pode ser apresentar-se como um substrato ou inibidor da P-gp, dependendo da concentração utilizada nos estudos. Assim, em baixas concentrações o verapamil atua como substrato, enquanto que em altas concentrações atua como inibidor (SHAHBAZI; SANTOS, 2013; TAKANO; YUMOTO; MURAKAMI, 2006).

O transporte de fármaco secretório está sujeito à saturação. Assim, a biodisponibilidade de alguns fármacos substratos de P-gp pode melhorar em função do aumento da dose devido à saturação deste carreador. Outro fator que aumenta

a biodisponibilidade é a coadministração de diferentes fármacos, onde um deles pode atuar como inibidor da P-gp enquanto o outro tem sua absorção favorecida (ARTURSSON; PALM; LUTHMAN, 2012; AUNGST, 1999).

Métodos empregados na determinação da influência de P-gp na permeabilidade

Os principais métodos empregados na determinação da permeabilidade de fármacos são: métodos *in silico* com o emprego de programas computacionais, métodos *in vitro* baseados em membranas artificiais paralelas (PAMPA), métodos *in vitro* baseados em sistemas celulares como Caco-2 e MDCK, métodos *ex vivo* com o uso de segmentos intestinais isolados em câmaras de difusão, métodos de perfusão *in situ* e métodos *in vivo* que envolvem estudos farmacocinéticos. Entretanto, nem todos os modelos supracitados consideram a influência de P-gp na permeabilidade, como é o caso do PAMPA e dos métodos *in silico*. Para os estudos de efluxo, os ensaios mais empregados envolvem o uso de células Caco-2, células MDCK-MDR1, modelos *ex vivo* e perfusão intestinal *in situ*. O Quadro 1.5 apresenta os principais métodos utilizados nos estudos de permeabilidade, suas vantagens e limitações (AYLIN ARICI et al., 2010; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; BANSAL et al., 2009; BERGGREN et al., 2004; COOK; SHENOY, 2003; CUMMINS et al., 2003; DAHAN; AMIDON, 2009; DE SOUZA et al., 2009; DEZANI et al., 2013a; GRASS, 1997; IIDA; TOMITA; HAYASHI, 2005; JAIN et al., 2007; KIM et al., 2006; MATSSON et al., 2009; REIS et al., 2013; SABABI; BORGÅ; HULTKVIST-BENGTSSON, 2001; SILVA et al., 2011; SVENSSON et al., 1999; TAKANO; YUMOTO; MURAKAMI, 2006).

Quadro 1.5: Vantagens e limitações dos modelos empregados na avaliação da permeabilidade intestinal de fármacos.

Método	Vantagens	Limitações	Referências
Células Caco-2	Expressão de carreadores de influxo e efluxo, origem humana.	Ausência de camada de muco, baixa expressão de enzimas, camada de água estacionária espessa, tempo longo de cultura e risco de contaminação.	(ANTUNES et al., 2013a; SILVA et al., 2011)
***Ex-vivo* (segmentos intestinais isolados em câmaras de difusão)**	Utilização de diferentes regiões intestinais e boa correlação com modelos *in vivo.*	Viabilidade do intestino, camada de água estacionária espessa e intensa manipulação do intestino.	(DEZANI et al., 2013a; REIS et al., 2013)
Perfusão intestinal i*n situ*	Modelo mais próximo das condições *in vivo*, suprimento sanguíneo e inervação intactos, transportadores e enzimas ativas.	Anestesia e procedimentos cirúrgicos, método laborioso e demorado.	(ANTUNES et al., 2013a; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; LI et al., 2014a)
PAMPA	Ensaios rápidos, baixo custo, permite alterar a composição da membrana estudada, boa correlação para fármacos passivamente transportados.	Permite somente avaliação do transporte passivo transcelular, retenção do fármaco na membrana e composição lipídica.	(DEZANI et al., 2013a; EHRHARDT; KIM, 2008; REIS et al., 2013; REIS; SINKÓ; SERRA, 2010)
In silico	Não requer material biológico, prevê a absorção intestinal antes da síntese, método simples e de baixo custo.	Não prevê transportadores e enzimas e nem interações complexas.	(DAHAN et al., 2013; EHRHARDT; KIM, 2008)

Métodos *in vitro*

A avaliação da permeabilidade por meio dos métodos *in vitro* é menos trabalhosa e de baixo custo em comparação com os estudos realizados *in vivo*. Uma grande desvantagem é a ausência de fatores fisiológicos, tais como: taxa de esvaziamento gástrico, trânsito gastrintestinal e pH gastrintestinal. Assim, a aplicação bem-sucedida de um modelo *in vitro* na previsão da absorção *in vivo* dependerá do quanto o método consegue mimetizar as características do epitélio intestinal (ANTUNES et al., 2013a; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; EHRHARDT; KIM, 2008).

Os modelos PAMPA e os baseados em sistemas celulares são de grande destaque nos ensaios de permeabilidade e têm sido amplamente empregados na área de desenvolvimento farmacêutico (BALIMANE; HAN; CHONG, 2006). No entanto, a ausência de transportadores e espaços intercelulares impedem que o PAMPA seja utilizado nos estudos de efluxo (BALIMANE; HAN; CHONG, 2006; DEFERME; AUGUSTIJNS, 2003; LI et al., 2008b).

Vários modelos de monocamada celulares que reproduzem o epitélio intestinal humano têm sido desenvolvidos. Ao contrário dos enterócitos, células tumorais humanas (como Caco-2) crescem rapidamente em monocamadas e sofrem diferenciação espontânea, o que fornece um sistema ideal para os estudos de transporte de fármacos (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000). Além disso, outras culturas celulares provenientes de animais, tais como células de cão e de porco, podem ser utilizadas.

MDCK e MDCK-MDR1

As células MDCK (*Madin-Darby canine kidney*) são obtidas a partir de rim canino e diferenciam-se em células epiteliais colunares quando cultivadas adequadamente em suportes permeáveis. Estas células possuem a formação de espaços intercelulares de forma variada, o que pode representar diferenças nos valores de permeabilidade. Ainda assim, apresentam boa correlação com modelos *in vivo* para alguns fármacos, especialmente aqueles passivamente transportados

(BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; NEWBY; FREITAS; GHAFOURIAN, 2015).

Braun e colaboradores (2000) estudaram permeabilidade de 14 fármacos utilizando células Caco-2 e MDCK e obtiveram uma boa correlação de $r^2 = 0,86$. Além disso, Irvine e colaboradores (1999) obtiveram uma correlação de 0,79 quando os resultados em Caco-2 foram comparados com valores obtidos em MDCK para 55 fármacos (BRAUN et al., 2000; IRVINE et al., 1999).

O tempo de cultura para células MDCK é relativamente curto (3 a 5 dias), o que representa uma vantagem ao tempo de crescimento necessário para as células Caco-2. Entretanto, para fármacos que são ativamente transportados, as células MDCK não são recomendadas devido às variações na expressão de carreadores e enzimas (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008; NEWBY; FREITAS; GHAFOURIAN, 2015).

Com baixa capacidade preditiva, MDCK é normalmente utilizada nos estudos de transporte de fármacos passivamente transportados em etapas iniciais de desenvolvimento farmacêutico por ser de origem biológica e de fácil e rápida execução. Além disso, este modelo celular é frequentemente utilizado como um substituto dos ensaios realizados em Caco-2 em razão de seus custos reduzidos, menor tempo de cultivo e baixo risco de contaminação (NEWBY; FREITAS; GHAFOURIAN, 2015).

Por outro lado, as células MDCK-MDR1 são amplamente utilizadas nos estudos de efluxo e na identificação de fármacos substratos de P-gp. Esta linhagem celular deriva da MDCK e foi transfectada com o gene MDR1 para permitir a expressão de P-gp. Em geral, os estudos de transporte de fármacos conduzidos em MDCK-MDR1 são bidirecionais, ou seja, o transporte do fármaco é avaliado no sentido apical-basolateral (A→B) e basolateral-apical (B→A). A comparação dos resultados obtidos nas dias direções permite a identificação de potenciais substratos da P-gp por meio da análise da razão B→A/A→B. No entanto, é importante considerar que a P-gp canina e a P-gp humana são diferentes e podem gerar resultados falso-negativo (DE SOUZA et al., 2009; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008; GARTZKE; FRICKER, 2014; GIACOMINI et al., 2010; LI; WANG; HIDALGO, 2013).

Em estudo de permeabilidade bidirecional conduzido por Souza e colaboradores (2009), a lamivudina e a zidovudina foram avaliadas em MDCK,

MDCK-MDR1 e Caco-2. A comparação dos resultados mostrou que ambos os fármacos são fracos substratos da P-gp devido ao elevado valor da razão B→A/A→B (DE SOUZA et al., 2009).

Embora alguns pesquisadores não reconheçam as células MDCK como um bom modelo para os estudos de transporte de fármacos, este método tem sido desenvolvido para estudos de efluxo com o objetivo de minimizar os falsos resultados na classificação de fármacos. A expressão heterogênea de transportadores endógenos e transfectadas em células MDCK (de origem canina e humana) geralmente não é considerada e, então, equívocos de classificação podem ocorrer. A padronização dos experimentos para os estudos de efluxo em modelos MDCK e suas linhagens derivadas pode fornecer dados confiáveis devido à expressão homogênea do carreador de interesse. Ainda hoje, os experimentos empregados para definir o impacto da P-gp sobre a biodisponibilidade necessitam ser complementados com outros modelos para o estabelecimento de protocolos mais robustos e passíveis de reconhecimento pelas agências regulatórias (GARTZKE; FRICKER, 2014; LAM; RAJARAMAN, 2012; LI; WANG; HIDALGO, 2013).

Caco-2

As células Caco-2 são amplamente utilizadas nos estudos de permeabilidade e são derivadas de adenocarcinoma de cólon humano. Esta linhagem foi utilizada pela primeira vez em 1989 para estudar a absorção de fármacos administrados por via oral. Quando cultivadas adequadamente, as células se diferenciam e formam uma monocamada polarizada de enterócitos, com microvilosidades e expressão de transportadores, incluindo as proteínas de influxo denominadas PEPT1 e os carreadores de efluxo como a P-gp (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; BANSAL et al., 2009; DAHAN; AMIDON, 2009; DE SOUZA et al., 2009; REIS et al., 2013; SILVA et al., 2011).

O protocolo mais frequentemente adotado para a determinação de substratos da P-gp utilizando células Caco-2 é o estudo bidirecional. O fármaco é estudado nas direções A→B e B→A, como descrito para estudos em MDCK-MDR1. Além disso, é importante considerar a idade das células e o tempo de cultivo, uma

vez que os transportadores presentes em Caco-2 são expressos de maneira heterogênea e sofrem mudanças na expressão e atividade em função destes fatores (DE SOUZA et al., 2009; LAM; RAJARAMAN, 2012; ZHAO et al., 2013).

Alguns autores sugerem que a expressão de P-gp em culturas celulares reflete a situação *in vivo* em seres humanos. Por outro lado, outros pesquisadores declaram que, apesar das células Caco-2 expressarem P-gp, as diferenças na expressão em comparação com a condição *in vivo* podem causar a subestimação na identificação de substratos deste transportador (ANTUNES et al., 2013a; BERGGREN et al., 2004; GOTOH; KAMADA; MOMOSE, 2005).

Na literatura é possível encontrar estudos de efluxo em Caco-2 com a finalidade de avaliar substâncias fitoquímicos como substratos/inibidores da P-gp (CHOI; KIM, 2014). Em um estudo conduzido por Oga e colaboradores (2012), um ensaio bidirecional em Caco-2 foi realizado com o uso da digoxina como substrato da P-gp. Algumas das substâncias fitoquímicos empregadas apresentaram atividade inibitória sobre o carreador de efluxo. Assim, a coadministração de fármacos substratos de P-gp devem ser monitoradas (OGA et al., 2012).

Métodos *ex vivo* com emprego de segmentos intestinais isolados

Nos métodos *ex vivo*, são utilizados segmentos intestinais isolados provenientes de animais, normalmente ratos. De maneira geral, um pequeno fragmento intestinal é posicionado entre dois compartimentos (doador e receptor) das câmaras de difusão vertical (tipo Franz) ou horizontal (tipo Ussing). A solução tampão contendo o fármaco solubilizado é adicionada na câmara doadora enquanto que as amostragens são realizadas a partir do compartimento receptor em intervalos regulares de tempo (DEZANI et al., 2013a; VOLPE, 2010). Este método permite avaliar o fluxo de transporte bidirecional através do segmento intestinal e estabelecer a correlação entre a permeabilidade em intestino de rato e em intestino de seres humanos (FRANCO et al., 2008; PRETORIUS; BOUIC, 2009; TUKKER, 2000; XIANHUA CAO, LAWRENCE X. YU, 2004; ŽAKELJ; ŠTURM; KRISTL, 2006).

Segmentos intestinais provenientes de ratos geneticamente modificados (*knockout*) para não expressarem a P-gp podem ser empregados em estudos comparativos na investigação de substratos de P-gp (COLLETT et al., 2005). Os métodos *ex-vivo* de permeabilidade têm demonstrado uma boa correlação com dados *in vivo* de absorção em seres humanos em função das semelhanças estruturais e fisiológicas entre os intestinos das duas espécies (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; CAO; YU; SUN, 2008; FRANCO et al., 2008; GRASS, 1997; JAIN et al., 2007; LENNERNÄS, 2007; PRETORIUS; BOUIC, 2009; TUKKER, 2000; YAO; CHIOU, 2006; ŽAKELJ; ŠTURM; KRISTL, 2006).

Em um estudo bidirecional, Dezani e colaboradores avaliaram a permeabilidade da lamivudina e da zidovudina em câmaras de difusão vertical tipo Franz. O ensaio foi conduzido no sentido A→B e B→A para investigar a influência da P-gp no transporte dos referidos fármacos. Foi observado que ambos os fármacos não demonstraram interação com a P-gp no segmento intestinal empregado (DEZANI et al., 2013a).

Estudos *ex vivo*, que envolvem o uso de saco intestinal invertido, também são empregados na avaliação de efluxo de fármacos. Parsa e colaboradores determinaram a influência da P-gp utilizando o verapamil como inibidor e constataram que o etoposídeo tem sua permeabilidade alterada pela presença do verapamil (PARSA et al., 2013).

Em outro estudo conduzido por Quevedo, Nieto e Brinon (2011), a influência da P-gp foi verificada na permeabilidade da zidovudina com o emprego de sacos intestinais invertidos de jejuno e íleo. Valores altos de permeabilidade foram encontrados nas porções proximais do intestino enquanto que valores baixos foram observados nas porções distais. Ainda, estudos bidirecionais mostraram que a zidovudina apresentou interação com a P-gp e sofreu efluxo nas regiões distais, o que foi confirmado em experimentos realizados com verapamil (QUEVEDO; NIETO; BRIÑÓN, 2011).

Métodos de perfusão *in situ*

Métodos de perfusão *in situ* são geralmente realizados em ratos e são frequentemente empregados na determinação da permeabilidade de fármacos e

predição de absorção *in vivo* em função das semelhanças morfológicas e fisiológicas com o intestino humano. Neste modelo, uma solução tampão contendo a substância solubilizada é perfundida no interior de um segmento intestinal e as amostras são coletadas em intervalos de tempo pré-definidos. Os ensaios podem ser controlados quanto à concentração do fármaco, pH da solução tampão, fluxo de infusão, região intestinal, entre outros fatores (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; CUMMINS et al., 2003; DAHAN; AMIDON, 2009; DAHAN; SABIT; AMIDON, 2009; IIDA; TOMITA; HAYASHI, 2005; REIS et al., 2013; SABABI; BORGÅ; HULTKVIST-BENGTSSON, 2001)

Recentemente este modelo tornou-se complexo e sofisticado por permitir a coleta de sangue mesentérico durante os experimentos de permeabilidade. Neste tipo de ensaio, é possível prever a extensão de absorção de um fármaco (cinética de absorção). Embora a perfusão *in situ* com coleta de sangue seja trabalhosa, este modelo proporciona maiores informações sobre os processos absortivos e possibilita avaliar os mecanismos de transporte de fármacos bem como e influência do metabolismo pré-sistêmico (BROUWERS et al., 2010; CUMMINS et al., 2003; VOLPE, 2010).

Em trabalho publicado por Fagerholm, Johansson e Lennernas (1996), foi apresentada a possibilidade de predizer a permeabilidade em seres humanos a partir dos resultados obtidos em ratos por meio do modelo de perfusão *in situ* (COOK; SHENOY, 2003; FAGERHOLM; JOHANSSON; LENNERNÄS, 1996; SVENSSON et al., 1999). Além disso, a previsão da fração absorvida pode também ser calculada a partir dos resultados de permeabilidade obtidos em ratos (SUGANO et al., 2001).

O método de perfusão *in situ* apresenta-se como o mais próximo das condições encontradas *in vivo* e pode ser utilizado para a avaliação de efluxo quando um inibidor específico para P-gp é empregado. Apesar das suas vantagens, este modelo possui limitações por ser baseado no desaparecimento do fármaco a partir do lado luminal como um indicador de absorção. Além disso, o uso de grande número de animais para obter um tamanho amostral significativo encarece os experimentos, além de possuir questões éticas envolvidas (ANTUNES et al., 2013a; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

CONCLUSÃO

O aumento do conhecimento sobre a P-gp revelou sua importância em diferentes tecidos do organismo humano. Na absorção oral de fármacos, este transportador presente ao longo do TGI é responsável pela incompleta biodisponibilidade encontrada para algumas substâncias. Diferentes estudos de efluxo são amplamente empregados com o objetivo de detalhar o mecanismo exato de atuação da P-gp.

O uso de inibidores eficazes e específicos permite aumentar a biodisponibilidade dos substratos de P-gp. O desenvolvimento de pró-fármacos também constitui uma estratégia relevante para melhorar a biodisponibilidade de alguns fármacos. Portanto, diversas metodologias devem ser aplicadas nos estudos de efluxo, incluindo os métodos *in vitro*, *ex vivo* e *in situ*. No entanto, é evidente que, além de adotar uma metodologia simples e de baixo custo, é necessário ponderar as vantagens e as limitações de cada método. Assim, a estratégia combinada pode gerar resultados que permitem a avaliação do fármaco como um substrato de P-gp com maior precisão e alta capacidade preditiva.

Nas etapas iniciais de desenvolvimento farmacêutico, estudos de efluxo conduzidos em um método rápido tendem a apresentar uma resposta imediata (células Caco-2 ou MDCK-MDR1). No entanto, o método *in vitro* pode não fornecer uma previsão adequada do processo de efluxo devido a algumas desvantagens, tais como a variabilidade na expressão de transportadores e a importância em padronizar a idade celular.

Os métodos *ex vivo* que empregam segmentos intestinais isolados e os ensaios de perfusão *in situ* podem também ser utilizados para a investigação do efluxo pela P-gp. Apesar de mais laboriosos, custosos e eticamente discutíveis, tais métodos podem fornecer uma resposta precisa sobre o efluxo, especialmente nos em ensaios de perfusão *in situ*, em que os transportadores permanecem ativos. Por outro lado, o cuidado na manipulação do segmento intestinal deve ser considerado para que não haja comprometimento dos ensaios e, consequentemente, obtenção de resultados enganosos.

Portanto, as etapas iniciais de desenvolvimento farmacêutico têm como objetivo selecionar moléculas como potencial farmacológico que sejam primariamente transportados por difusão passiva. Entretanto, a investigação de um possível substrato da P-gp permite que as condutas terapêuticas a serem estabelecidas nas etapas futuras possam considerar este fator no desenvolvimento

de formulações ou na associação de diferentes fármacos contidos na mesma forma farmacêutica. Assim, ensaios preliminares para a avaliação de efluxo devem ser realizados utilizando primeiramente os modelos *in vitro* (Caco-2 ou MDCK-MDR1), uma vez que estes são capazes de fornecer resultados rápidos. Caso não seja possível prever a influência da P-gp nestes modelos mais simples, estudos mais complexos que utilizam segmentos intestinais (modelos *ex vivo* e perfusão *in situ*) devem ser realizados nos casos em que são observados problemas na biodisponibilidade. Deste modo, uma escolha racional de métodos disponíveis para os ensaios de efluxo tem de ser considerado.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, J.; SALAMA, N. N.; AZAB, A. K. The role of P-glycoprotein in drug resistance in multiple myeloma. Leukemia & Lymphoma, v. 56, n. 1, p. 26–33, 2015.

ANTUNES, F. et al. Models to predict intestinal absorption of therapeutic peptides and proteins. Current drug metabolism, v. 14, n. 1, p. 4–20, 2013.

APPARAJU, S. K. .; NALLANI, S. C. . Basics of Drug Absorption from a Biopharmaceutical Perspective. [s.l.] CRC Press, 2007.

ARTURSSON, P.; PALM, K.; LUTHMAN, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 64, n. SUPPL., p. 280–289, 2012.

AUNGST, B. J. P-glycoprotein, secretory transport, and other barriers to the oral delivery of anti-HIV drugs. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 39, n. 1–3, p. 105–116, 1999.

AVDEEF, A. Absorption and Drug Development:solubility, permeability and charge state. 1st. ed. Hoboken, New Jersey: Wiley Interscience, 2003.

AYLIN ARICI, M. et al. Interactions between verapamil and digoxin in langendorff-perfused rat hearts: The role of inhibition of P-glycoprotein in the heart. Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology, v. 107, n. 5, p. 847–852, 2010.

AZEREDO, F. J.; COSTA, T. D.; UCHOA, F. D. T. Papel da Glicoproteína-P na Farmacocinética P-glycoprotein role on drug pharmacokinetics and interactions. Brazilian journal of Pharmaceutical sciences, v. 90, n. 4, p. 321–326, 2009.

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. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, v. 44, n. 1, p. 301–312, 2000.

BALIMANE, P. V; HAN, Y.-H.; CHONG, S. Current industrial practices of assessing permeability and P-glycoprotein interaction. The AAPS journal, v. 8, n. 1, p. E1–E13, 2006.

BANSAL, T. et al. Effect of P-glycoprotein inhibitor, verapamil, on oral bioavailability and pharmacokinetics of irinotecan in rats. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 36, n. 4–5, p. 580–590, 2009.

BELLO-REUSS, E. et al. Role of multidrug resistance P-glycoprotein in the secretion of aldosterone by human adrenal NCI-H295 cells. Am J Physiol Cell Physiol, v. 278, n. 6, p. C1256-65, 2000.

BERGGREN, S. et al. Characterization of jejunal absorption and apical efflux of ropivacaine, lidocaine and bupivacaine in the rat using in situ and in vitro absorption models. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 21, n. 4, p. 553–560, 2004.

BOHETS, H. et al. Strategies for absorption screening in drug discovery and development. Current topics in medicinal chemistry, v. 1, n. 5, p. 367–383, 2001.

BRAUN, A. et al. Cell cultures as tools in biopharmacy. European Journal of Pharmaceutical Sciences. Anais...2000

BROUWERS, J. et al. Validation of a differential in situ perfusion method with mesenteric blood sampling in rats for intestinal drug interaction profiling. Biopharmaceutics & Drug Disposition, v. 31, n. 5–6, p. 278–285, 2010.

BUCKLEY, S. T. et al. In vitro models to evaluate the permeability of poorly soluble drug entities: Challenges and perspectives. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 45, n. 3, p. 235–250, 2012.

BUDDE, T. et al. Acute Exposure to Doxorubicin Results in Increased Cardiac P-glycoprotein Expression. Journal of pharmaceutical sciences, v. 100, n. 9, p. 3951–3958, 2011.

CAO, X. et al. Why is it challenging to predict intestinal drug absorption and oral bioavailability in human using rat model. Pharmaceutical Research, v. 23, n. 8, p. 1675–1686, 2006.

CAO, X.; YU, L. X.; SUN, D. Drug absortion principles. In: Biopharmaceutics Applications in Drug Development. New York: Springer, 2008. p. 75–100.

CHANG, S. Y. et al. Molecular insight into conformational transmission of human P-glycoprotein. Journal of Chemical Physics, v. 139, n. 22, p. 225102, 2013.

CHOI, R. J.; KIM, Y. S. Evaluating the Regulation of P-glycoprotein by Phytochemicals Using Caco-2 Cell Permeability Assay System. Natural Product Sciences, v. 20, n. 1, p. 1–6, 2014.

CHOI, Y. H.; YU, A.-M. ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development. Current pharmaceutical design, v. 20, n. 5, p. 793–807, 2014.

COLLETT, A. et al. Comparison of P-glycoprotein-mediated drug-digoxin interactions in Caco-2 with human and rodent intestine: Relevance to in vivo prediction. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 26, n. 5, p. 386–393, 2005.

COOK, T. J.; SHENOY, S. S. Intestinal permeability of chlorpyrifos using the single-pass intestinal perfusion method in the rat. Toxicology, v. 184, n. 2–3, p. 125–133, 2003.

CROWLEY, E.; CALLAGHAN, R. Multidrug efflux pumps: Drug binding-gates or cavity? FEBS Journal, v. 277, n. 3, p. 530–539, 2010.

CUMMINS, C. L. et al. In vivo modulation of intestinal CYP3A metabolism by P-glycoprotein: studies using the rat single-pass intestinal perfusion model. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, v. 305, n. 1, p. 306–314, 2003.

DAHAN, A. et al. Purely in Silico BCS Classi fi cation: Science Based Quality Standards for the World ' s Drugs. 2013.

DAHAN, A.; AMIDON, G. L. Segmental dependent transport of low permeability compounds along the small intestine due to P-glycoprotein: The role of efflux transport in the oral absorption of BCS class III drugs. Molecular Pharmaceutics, v. 6, n. 1, p. 19–28, 2009.

DAHAN, A.; SABIT, H.; AMIDON, G. L. Multiple efflux pumps are involved in the transepithelial transport of colchicine: Combined effect of P-glycoprotein and multidrug resistance- associated protein 2 leads to decreased intestinal absorption throughout the entire small intestine. Drug Metabolism and Disposition, v. 37, n. 10, p. 2028–2036, 2009.

DE SOUZA, J. et al. Comparison of bidirectional lamivudine and zidovudine transport using MDCK, MDCK-MDR1, and Caco-2 cell monolayers. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 98, n. 11, p. 4413–4419, 2009.

DEFERME, S.; ANNAERT, P.; AUGUSTIJNS, P. In Vitro Screening Models to Assess and Metabolism. In: Drug Absorption Studies: In Situ, In Vitro and In Silico Models. [s.l: s.n.]. p. 182–215.

DEFERME, S.; AUGUSTIJNS, P. The effect of food components on the absorption of P-gp substrates: a review. The Journal of pharmacy and pharmacology, v. 55, n. 2, p. 153–62, 2003.

DEZANI, A. B. et al. Determination of lamivudine and zidovudine permeability using a different ex vivo method in Franz cells. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, v. 67, n. 3, p. 194–202, 2013.

DRESCHER, S. et al. P-glycoprotein-mediated intestinal and biliary digoxin transport in humans. Clinical Pharmacology and Therapeutics, v. 73, n. 3, p. 223–231, 2003.

EGAN, W. J.; LAURI, G. Prediction of intestinal permeability. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 54, n. 3, p. 273–289, 2002.

EHRHARDT, C.; KIM, K. Drug absorption studies. [s.l: s.n.].

ERNEST, S.; BELLO-REUSS, E. Expression and function of P-glycoprotein in a mouse kidney cell line. The American journal of physiology, v. 269, n. 2 Pt 1, p. C323-33, ago. 1995.

ESTUDANTE, M. et al. Intestinal drug transporters: an overview. Advanced drug delivery reviews, v. 65, n. 10, p. 1340–56, 2013.

FAGERHOLM, U. Prediction of human pharmacokinetics--gastrointestinal absorption. The Journal of pharmacy and pharmacology, v. 59, n. 7, p. 905–916, 2007.

FAGERHOLM, U.; JOHANSSON, M.; LENNERNÄS, H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum. Pharmaceutical Research, v. 13, n. 9, p. 1336–1342, 1996.

FAIRSTEIN, M.; SWISSA, R.; DAHAN, A. Regional-Dependent Intestinal Permeability and BCS Classification: Elucidation of pH-Related Complexity in Rats Using Pseudoephedrine. The AAPS Journal, v. 15, n. 2, p. 589–597, 2013.

FANG, H. et al. Involvement of cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein in first-pass intestinal extraction of omeprazole in rabbits. Acta Pharmacologica Sinica, v. 30, n. 11, p. 1566–1572, 2009.

FARDEL, O. et al. Rifampicin enhances anti-cancer drug accumulation and activity in multidrug-resistant cells. Biochemical Pharmacology, v. 49, n. 9, p. 1255–1260, 1995.

FRANCO, M. et al. Frog intestinal sac as an in vitro method for the assessment of intestinal permeability in humans: Application to carrier transported drugs. International Journal of Pharmaceutics, v. 352, n. 1–2, p. 182–188, 2008.

GAO, X. et al. Expression of P-glycoprotein and CYP3A4 along the porcine oral-gastrointestinal tract: implications on oral mucosal drug delivery. Drug development and industrial pharmacy, v. 40, n. 5, p. 599–603, 2014.

GARTZKE, D.; FRICKER, G. Establishment of optimized MDCK cell lines for reliable efflux transport studies. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 103, n. 4, p. 1298–1304, abr. 2014.

GIACOMINI, K. M. et al. Membrane transporters in drug development. Nature Reviews Drug Discovery, v. 9, n. 3, p. 215–236, 2010.

GOTOH, Y.; KAMADA, N.; MOMOSE, D. The advantages of the Ussing chamber in drug absorption studies. Journal of biomolecular screening, v. 10, n. 5, p. 517–23, 2005.

GRASS, G. M. Simulation models to predict oral drug absorption from in vitro data. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 23, n. 1–3, p. 199–219, 1997.

GRASSI, M. et al. Understanding drug release and absorption mechanisms: a physical and mathematical approach. [s.l.] CRC Press, 2007.

HASLAM, I. S. et al. Induction of P-glycoprotein expression and function in human intestinal epithelial cells (T84). Biochemical Pharmacology, v. 76, n. 7, p. 850–861, 2008.

HILLGREN, K. M.; KATO, A.; BORCHARDT, R. T. In vitro systems for studying intestinal drug absorption. Medicinal Research Reviews, v. 15, n. 2, p. 83–109, mar. 1995.

IIDA, A.; TOMITA, M.; HAYASHI, M. Regional Difference in P-glycoprotein Function in Rat Intestine. Drug Metabolism and Pharmacokinetics, v. 20, n. 2, p. 100–106, 2005.

IRVINE, J. D. et al. MDCK (Madin − Darby Canine Kidney) Cells : A Tool for Membrane Permeability Screening. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 88, n. 1, 1999.

ISHIKAWA, T. et al. Emerging new technologies in Pharmacogenomics: rapid SNP detection, molecular dynamic simulation, and QSAR analysis methods to validate clinically important genetic variants of human ABC Transporter ABCB1 (P-gp/MDR1). Pharmacology & therapeutics, v. 126, n. 1, p. 69–81, 2010.

JAIN, R. et al. Intestinal absorption of novel-dipeptide prodrugs of saquinavir in rats. International Journal of Pharmaceutics, v. 336, n. 2, p. 233–240, 2007.

JI, B.-S.; LI, M.; HE, L. Effect of CJX2, an amlodipine derivative, combined with verapamil on P-glycoprotein efflux function in vitro. Drug Development Research, v. 70, n. 6, p. 445–449, set. 2009.

JIANG, C.-P. et al. Intestinal Absorptive Transport of Genkwanin from Flos genkwa Using a Single-Pass Intestinal Perfusion Rat Model. The American Journal of Chinese Medicine, v. 42, n. 2, p. 349–359, jan. 2014.

JULIANO, R. L.; LING, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. BBA - Biomembranes, v. 455, n. 1, p. 152–162, 1976.

KAGAN, L. et al. Role of P-glycoprotein in region-specific gastrointestinal absorption of talinolol in rats. Drug Metabolism and Disposition, v. 38, n. 9, p. 1560–1566, 2010.

KIM, J. S. et al. The suitability of an in situ perfusion model for permeability determinations: Utility for BCS class I biowaiver requests. Molecular Pharmaceutics, v. 3, n. 6, p. 686–694, 2006.

KIM, S.-G. et al. Inhibition of P-glycoprotein facilitated glycosaminoglycan accumulation during chondrogenesis of human bone marrow mesenchymal stem cells. International Journal of Rheumatic Diseases, v. 14, n. 2, p. 199–205, maio 2011.

KIMURA, Y. et al. Cholesterol fill-in model: Mechanism for substrate recognition by ABC proteins. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, v. 39, n. 5–6, p. 447–452, 2007.

LAM, K. C. L.; RAJARAMAN, G. Assessment of P-glycoprotein substrate and inhibition potential of test compounds in MDR1-transfected MDCK cells. Current Protocols in Pharmacology, n. SUPPL.58, p. 7.13.1-7.13.17, set. 2012.

LENNERNAS, H. Regional intestinal drug permeation: Biopharmaceutics and drug development. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 57, n. 1, p. 333–341, 2014.

LENNERNÄS, H. Animal data: The contributions of the Ussing Chamber and perfusion systems to predicting human oral drug delivery in vivo. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 59, n. 11, p. 1103–1120, 2007.

LI, C. et al. Permeability evaluation of peptidic HCV protease inhibitors in Caco-2 cells-correlation with in vivo absorption predicted in humans. Biochemical Pharmacology, v. 76, n. 12, p. 1757–1764, 2008a.

LI, C. et al. Correlation between PAMPA permeability and cellular activities of hepatitis C virus protease inhibitors. Biochemical Pharmacology, v. 75, n. 5, p. 1186–1197, 2008b.

LI, H. et al. Comparison of two approaches of intestinal absorption by puerarin. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, v. 70, n. 1, p. 6–11, 2014.

LI, J.; WANG, Y.; HIDALGO, I. J. Kinetic analysis of human and canine P-glycoprotein-mediated drug transport in MDR1-MDCK cell model: Approaches to reduce false-negative substrate classification. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 102, n. 9, p. 3436–3446, set. 2013.

MARTINEZ, M. N.; AMIDON, G. L. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. Journal of clinical pharmacology, v. 42, n. 6, p. 620–643, 2002.

MATSSON, P. et al. Identification of novel specific and general inhibitors of the three major human ATP-binding cassette transporters P-gp, BCRP and MRP2 among registered drugs. Pharmaceutical Research, v. 26, n. 8, p. 1816–1831, 2009.

MILLER, D. Sphingolipid Signaling Reduces Basal P-Glycoprotein Activity in Renal Proximal Tubule. J Pharmacol Exp Ther, n. March, p. 459–464, 2014.

MIRET, S.; ABRAHAMSE, L.; DE GROENE, E. M. Comparison of in Vitro Models for the Prediction of Compound Absorption across the Human Intestinal Mucosa. Journal of Biomolecular Screening, v. 9, n. 7, p. 598–606, 2004.

NEWBY, D.; FREITAS, A. A.; GHAFOURIAN, T. Decision trees to characterise the roles of permeability and solubility on the prediction of oral absorption. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 90, p. 751–765, 2015.

ODA, K. et al. In vitro experimental system for evaluating inhibitory effect of investigational drugs on P-glycoprotein-mediated transcellular transport of tacrolimus (FK506). Biopharmaceutics & Drug Disposition, v. 35, n. 3, p. 135–144, abr. 2014.

OGA, E. F. et al. P-glycoprotein mediated efflux in Caco-2 cell monolayers: The influence of herbals on digoxin transport. Journal of Ethnopharmacology, v. 144, n. 3, p. 612–617, ago. 2012.

OGA, S.; YASAKA, W. J.; JEN, L. H. The importance of P-glycoprotein (P-gp) and organic anion-transporting polypeptides (OATP) in drug interactions. Revista Brasileira de Medicina, v. 60, n. 3, p. 121–130, 2003.

PARSA, A. et al. Enhanced permeability of etoposide across everted sacs of rat small intestine by vitamin E-TPGS. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, v. 12, n. SUPPL., p. 35–44, 2013.

POLLI, J. E. et al. Summary workshop report: Biopharmaceutics classification system - Implementation challenges and extension opportunities. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 93, n. 6, p. 1375–1381, 2004.

PORTEOUS, C. M. et al. P-glycoprotein (Mdr1a/1b) and breast cancer resistance protein (Bcrp) decrease the uptake of hydrophobic alkyl triphenylphosphonium cations by the brain. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects, v. 1830, n. 6, p. 3458–3465, 2013.

PRAKASH, K. et al. Solubility and Dissolution Rate Determination of Different Antiretroviral Drugs in Different pH Media Using UV Visible Spectrophotometer. E-Journal of Chemistry, v. 5, n. s2, p. 1159–1164, 2008.

PRETORIUS, E.; BOUIC, P. J. D. Permeation of four oral drugs through human intestinal mucosa. AAPS PharmSciTech, v. 10, n. 1, p. 270–275, 2009.

QUEVEDO, M. A.; NIETO, L. E.; BRIÑÓN, M. C. P-glycoprotein limits the absorption of the anti-HIV drug zidovudine through rat intestinal segments. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 43, n. 3, p. 151–159, 2011.

RAEVSKY, O. A. et al. Computer modeling of blood brain barrier permeability for physiologically active compounds. Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry, v. 7, n. 2, p. 95–107, 2013.

REIS, J. M. et al. Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, ex vivo and in situ Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 48, n. 4–5, p. 781–789, 2013.

REIS, J. M.; SINKÓ, B.; SERRA, C. H. R. Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) - Is it better than Caco-2 for human passive permeability prediction? Mini reviews in medicinal chemistry, v. 10, n. 11, p. 1071–1076, 2010.

SABABI, M.; BORGÅ, O.; HULTKVIST-BENGTSSON, U. The role of P-glycoprotein in limiting intestinal regional absorption of digoxin in rats. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 14, n. 1, p. 21–27, 2001.

SALAMA, N. N.; EDDINGTON, N. D.; FASANO, A. Tight junction modulation and its relationship to drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 58, n. 1, p. 15–28, 2006.

SANKATSING, S. U. C. et al. P glycoprotein in human immunodeficiency virus type 1 infection and therapy. Antimicrob Agents Chemother, v. 48, n. 4, p. 1073–1081, 2004.

SCHINKEL, A. H.; JONKER, J. W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: An overview. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 64, n. SUPPL., p. 138–153, 2012.

SHAHBAZI, M.-A.; SANTOS, H. A. Improving oral absorption via drug-loaded nanocarriers: absorption mechanisms, intestinal models and rational fabrication. Current drug metabolism, v. 14, n. 1, p. 28–56, 2013.

SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A. Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics. 5th Editio ed. New York: MacGraw-Hill, 2005.

SHAROM, F. J. Complex Interplay between the P-Glycoprotein Multidrug Efflux Pump and the Membrane: Its Role in Modulating Protein Function. Frontiers in Oncology, v. 4, n. 41, p. 1–19, 2014.

SHITYAKOV, S.; FÖRSTER, C. In silico structure-based screening of versatile P-glycoprotein inhibitors using polynomial empirical scoring functions. Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2014.

SILVA, R. et al. In vitro study of P-glycoprotein induction as an antidotal pathway to prevent cytotoxicity in Caco-2 cells. Archives of Toxicology, v. 85, n. 4, p. 315–326, 2011.

SRIVALLI, K. M. R.; LAKSHMI, P. K. Overview of P-glycoprotein inhibitors: A rational outlook. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 48, n. 3, p. 353–367, 2012.

SUGANO, K. et al. High throughput prediction of oral absorption: improvement of the composition of the lipid solution used in parallel artificial membrane permeation assay. Journal of biomolecular screening : the official journal of the Society for Biomolecular Screening, v. 6, n. 3, p. 189–196, 2001.

SVENSSON, U. S. H. et al. High in situ rat intestinal permeability of artemisinin unaffected by multiple dosing and with no evidence of P-glycoprotein involvement. Drug Metabolism and Disposition, v. 27, n. 2, p. 227–232, 1999.

TAKANO, M.; YUMOTO, R.; MURAKAMI, T. Expression and function of efflux drug transporters in the intestine. Pharmacology and Therapeutics, v. 109, n. 1–2, p. 137–161, 2006.

TUKKER, J. J. In vitro methods for the assessment of permeability. [s.l: s.n.].

UNGELL, A.-L. Cell Culture Models of Biological Barriers: In vitro Test Systems for Drug Absorption and delivery. London: Taylor and Francis, 2002.

VOLPE, D. A. Application of method suitability for drug permeability classification. The AAPS journal, v. 12, n. 4, p. 670–678, 2010.

WON, C. S.; OBERLIES, N. H.; PAINE, M. F. Mechanisms underlying food - drug interactions: Inhibition of intestinal metabolism and transport. Pharmacology & Therapeutics, v. 136, n. 2, p. 186–201, 2012.

XIANHUA CAO, LAWRENCE X. YU, D. S. Drug Absorption Principles. [s.l: s.n.].

YANG, C. et al. P-glycoprotein is responsible for the poor intestinal absorption and low toxicity of oral aconitine: In vitro, in situ, in vivo and in silico studies. Toxicology and Applied Pharmacology, v. 273, n. 3, p. 561–568, 2013.

YAO, H. M.; CHIOU, W. L. The complexity of intestinal absorption and exsorption of digoxin in rats. International Journal of Pharmaceutics, v. 322, n. 1–2, p. 79–86, 2006.

ŽAKELJ, S.; ŠTURM, K.; KRISTL, A. Ciprofloxacin permeability and its active secretion through rat small intestine in vitro. International Journal of Pharmaceutics, v. 313, n. 1–2, p. 175–180, 2006.

ZHANG, J.-C. et al. Expression levels of P-glycoprotein in peripheral blood CD8+ T lymphocytes from HIV-1-infected patients on antiretroviral therapy. International journal of molecular medicine, v. 33, n. 2, p. 431–440, 2014.

ZHAO, G. et al. Enhanced intestinal absorption of etoposide by self-microemulsifying drug delivery systems: Roles of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A inhibition. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 50, n. 3–4, p. 429–439, 2013.

1.4 PRINCIPAIS ASPECTOS RELACIONADOS AO METABOLISMO INTESTINAL E SUA INFLUÊNCIA NA ABSORÇÃO DE FÁRMACOS

RESUMO

Atualmente, muitos dos medicamentos disponíveis no mercado são direcionados à administração oral em razão da sua segurança, conveniência, baixo custo e grande aceitação pelos pacientes. Assim, os fármacos oralmente administrados dependem das etapas de solubilidade e de permeabilidade no trato gastrintestinal (TGI) para apresentarem adequada biodisponibilidade oral. A solubilidade é considerada uma importante etapa e um pré-requisito para que ocorra o transporte da substância através da parede intestinal, enquanto que a etapa de permeabilidade é complexa e envolve diversos mecanismos pelos quais os fármacos estão sujeitos no processo de absorção. Com base nas características de solubilidade e de permeabilidade, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi estabelecido com o objetivo de ser utilizado como uma ferramenta para a classificação de fármacos e para os processos de desenvolvimento de novos fármacos, novas formulações farmacêuticas e, ainda, auxiliar nos processos de bioisenção de fármacos classe I. No entanto, outra ferramenta denominada Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF) foi proposta com a finalidade de classificar as substâncias de acordo com suas características de solubilidade e metabolismo. Desta maneira, a biodisponibilidade de um fármaco pode sofrer influência não apenas da solubilidade e da permeabilidade, mas também do metabolismo pré-sistêmico que muitas vezes ocorre nos enterócitos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo apresentar a importância do metabolismo intestinal e seu impacto sobre os processos de absorção, bem como discutir os métodos mais utilizados para identificar se um fármaco é substrato das enzimas CYP3A. Até o presente momento, poucos estudos têm abordado a importância do metabolismo intestinal e sua influência nos processos relacionados às propriedades ADME (absorção, distribuição, metabolismo e eliminação). No entanto, alguns modelos podem ser empregados com o objetivo de avaliar se o metabolismo intestinal está relacionado com a baixa biodisponibilidade observada para alguns fármacos. Com base nisso, ensaios em modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in situ* são os mais empregados para esta finalidade.

Palavras-chave: metabolismo, enterócitos, CYP3A, SCB, SCBDF.

INTRODUÇÃO

Atualmente, muitos dos medicamentos disponíveis no mercado são direcionados à administração oral devido à conveniência, segurança, baixo custo e grande aceitação por parte dos pacientes. No entanto, problemas relacionados à biodisponibilidade de alguns fármacos têm sido relatados na literatura. A absorção de fármacos através do trato gastrintestinal (TGI) é um processo complexo e requer, primeiramente, uma adequada solubilidade nas diferentes regiões do TGI a fim de que a etapa seguinte, permeabilidade através da parede intestinal, ocorra apropriadamente.

Considerando as características de solubilidade e de permeabilidade de fármacos, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto como uma ferramenta por Amidon e colaboradores (1995), onde os fármacos são classificados em quatro classes distintas: classe I (alta solubilidade e alta permeabilidade), classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade), classe III (alta solubilidade e baixa permeabilidade) e classe IV (baixa solubilidade e baixa permeabilidade). O SCB considera estes dois parâmetros, solubilidade e permeabilidade, como sendo de grande influência para a biodisponibilidade e este sistema foi adotado pela agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) em 2000 com a finalidade de estabelecer os processos de bioisenção de fármacos classe I (AMIDON et al., 1995; CDER/FDA, 2000).

Entretanto, o SCB não considera outros parâmetros relacionados às propriedades ADME (absorção, distribuição, metabolização e eliminação). Assim, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF) foi proposto por Wu e Benet (2005) e classifica os fármacos em quatro classes de acordo com suas características de solubilidade e metabolismo: classe I (alta solubilidade e extenso metabolismo), classe II (baixa solubilidade e extenso metabolismo), classe III (alta solubilidade e baixo metabolismo) e classe IV (baixa solubilidade e baixo metabolismo). Além disso, o SCBDF oferece um suporte para a investigação da influência de enzimas e transportadores presentes no TGI, bem como avaliação da interação fármaco-fármaco ou fármaco-alimento (BENET, 2013; HOSEY; CHAN; BENET, 2016; OLIVARES-MORALES et al., 2014; WU; BENET, 2005).

Embora não ainda adotada por agências reguladoras, o SCBDF representa uma importante ferramenta de classificação de fármacos, uma vez que problemas

relacionados à biodisponibilidade e farmacocinética não conseguem ser elucidados apenas com o SCB.

Assim, alguns problemas observados na absorção de substâncias estimulam a investigação mais aprofundada em relação aos mecanismos de permeabilidade e ao metabolismo intestinal de fármacos oralmente administrados. De uma maneira geral, a biodisponibilidade é basicamente considerada em função da fração absorvida através da parede intestinal, fração que escapa do metabolismo intestinal e fração que escapa do metabolismo pré-sistêmico hepático (MUSTHER et al., 2014; OLIVARES-MORALES et al., 2014).

O metabolismo intestinal corresponde a um processo complexo e de extrema importância que pode estar relacionado a problemas de absorção observados para alguns fármacos, visto que a presença de enzimas nos enterócitos constitui uma barreira bioquímica à absorção. A investigação da influência do metabolismo nos processos absortivos é de amplo interesse nas etapas de desenvolvimento de novas substâncias e formulações, bem como nos estudos pré-clínicos realizados, uma vez que estratégias podem ser elaboradas com o objetivo de melhorar a absorção de um fármaco substrato de enzimas intestinais (PEREIRA DE SOUSA; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2014; SJÖGREN et al., 2014).

O metabolismo é reconhecido como sendo de grande importância na biodisponibilidade de fármacos. Muitas enzimas presentes no fígado são também encontradas nos enterócitos. Todavia, poucos estudos são relatados na literatura em relação ao metabolismo intestinal e seu impacto nos processos de permeabilidade de fármacos (CUMMINS et al., 2003; KRISHNA; KLOTZ, 1994; LIN; LU, 2001; SJÖGREN et al., 2014; YANG et al., 2007).

Com base no exposto, o presente trabalho teve como objetivo apresentar a importância do metabolismo intestinal e sua influência sobre os processos absortivos de fármacos administrados oralmente, bem como discutir os principais modelos utilizados para a identificação de um fármaco substrato de enzimas CYP3A.

Enzimas no TGI

A mucosa intestinal é considerada um dos maiores sítios extra-hepáticos de metabolização de substâncias no organismo. Tal fato é significativamente considerável para fármacos que são administrados por via oral, uma vez que estes estão sujeitos à metabolização pré-sistêmica nos enterócitos. Em razão da baixa perfusão sanguínea no intestino em comparação com o fígado, muitos fármacos possuem um tempo de residência maior nos enterócitos do que nos hepatócitos, o que aumenta o tempo de contato dos substratos com estas enzimas (GALETIN; GERTZ; HOUSTON, 2010; LIN; LU, 2001; PEREIRA DE SOUSA; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2014; YANG et al., 2007).

A presença de enzimas nos enterócitos tem sido o foco de algumas pesquisas recentes e as principais encontradas no intestino delgado são pertencentes ao citocromo P450 (CYP450), mais especificamente as CYP3A4 e CYP3A5. Outras enzimas também presentes no intestino humano, mas em menor proporção, incluem: CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP2J2. As enzimas CYP estão relacionadas ao metabolismo de fase I (oxidação) (SJÖGREN et al., 2014).

A superfamília CYP3A está presente em grande proporção do intestino delgado, representando mais de 80% das enzimas presentes no TGI. Somente a isoenzima CYP3A4 representa em torno de 70% do total de enzimas CYP450 intestinal. Além disso, a isoenzima CYP3A5 representa uma importante atividade metabólica e é mais facilmente encontrada no intestino do que no fígado de seres humanos (PEREIRA DE SOUSA; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2014; SJÖGREN et al., 2014).

Além das enzimas CYP, deve-se considerar a presença de enzimas UGT (uridinodifosfato glicuronosiltransferase) no enterócito intestinal, as quais estão relacionadas ao metabolismo de fase II (conjugação). A metabolização de fármacos pelas enzimas UGT representa um importante papel na biodisponibilidade de alguns fármacos. Fármacos como raloxifeno e troglitazona, por exemplo, apresentam baixa biodisponibilidade oral em razão de serem substratos de UGT (KEMP; FAN; STEVENS, 2002; WATANABE; NAKAJIMA; YOKOI, 2002).

A distribuição de enzimas ao longo do TGI é heterogênea, ou seja, há maior expressão de enzimas nas regiões proximais do intestino humano em comparação

com as regiões distais. As isoenzimas CYP3A4 e CYP3A5 estão em maior quantidade no jejuno intestinal, o que representa em torno de 50% das enzimas CYP presentes no intestino (GALETIN; GERTZ; HOUSTON, 2010; SJÖGREN et al., 2014).

Os estudos de metabolismo intestinal devem ser realizados considerando a região principal de absorção de determinado fármaco. Para a previsão do metabolismo pré-sistêmico que ocorre no intestino, é necessário determinar a expressão de enzimas ao longo do TGI. Além disso, diferenças interindividuais também devem ser observadas e a compreensão de tais desigualdades pode justificar a variabilidade encontrada entre distintas etnias (GALETIN; GERTZ; HOUSTON, 2010; PEREIRA DE SOUSA; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2014).

Primariamente, o maior interesse em relação à avaliação do metabolismo pré-sistêmico está voltado à ação das enzimas do sistema CYP, uma vez que estas representam uma elevada atividade de metabolização de fármacos. Por outro lado, não existem muitos estudos de metabolismo intestinal que considerem as enzimas CYP. Mais raros ainda são os experimentos de caracterização da expressão e atividade de UGT. Assim, a importância em investigar o metabolismo intestinal fornece um suporte para a compreensão de mecanismos limitantes da biodisponibilidade oral (SJÖGREN et al., 2014).

Métodos utilizados na avaliação do metabolismo intestinal

Atualmente, vários métodos têm sido empregados para avaliar se determinado fármaco é substrato de enzimas metabólicas. Alguns modelos utilizados na caracterização da permeabilidade de fármacos podem também ser aplicados aos estudos de metabolismo intestinal.

Com o objetivo de avaliar o metabolismo pré-sistêmico de fármacos, os modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in situ* têm sido os mais usados com a finalidade de elucidar o comportamento do fármaco mediante sua interação com as enzimas presentes no enterócito intestinal. Para ensaios que se baseiam em segmentos intestinais, o rato é o animal mais utilizado em experimentos destinados a avaliar fármacos e novas substâncias. Apesar de alguns trabalhos publicados na literatura

discutirem as diferenças entre seres humanos e os modelos animais, em relação a constituição enzimática presente no enterócito, ainda assim os ratos são extensamente empregados por apresentarem, em diversas ocasiões, boa correlação em relação aos estudos de permeabilidade e metabolismo, especialmente para fármacos classificados como classe I no SCB (CAO et al., 2006; SJÖGREN et al., 2014).

Os estudos de metabolismo intestinal visam discutir a importância e a influência das enzimas metabólicas nos processos de absorção e, consequentemente, na biodisponibilidade oral de fármacos. Assim, as principais enzimas a serem consideradas nas etapas de desenvolvimento farmacêutico são pertencentes à superfamília CYP3A, a qual é amplamente expressa nos enterócitos.

Modelos *in vitro*

Células Caco-2 e MDCK

O uso de métodos *in vitro* para a investigação do metabolismo intestinal de fármacos tem representado um desafio nos últimos anos. Células Caco-2 são amplamente utilizadas em ensaios de permeabilidade uma vez que são derivadas de células humanas e mimetizam o epitélio intestinal por apresentarem microvilosidades, junções intercelulares, transportadores e enzimas, embora tais características sejam variáveis nesta linhagem celular (ARTURSSON; PALM; LUTHMAN, 2012; AVDEEF, 2003; KÜBLBECK et al., 2016).

Incoerência nos resultados de permeabilidade obtidos a partir de estudos em células Caco-2 tem sido relatada na literatura, o que pode estar relacionado às diferenças na expressão gênica e atividade de enzimas e transportadores. É importante considerar o baixo nível de expressão de enzimas CYP, especialmente isoformas CYP3A. Desta maneira, a correlação é dificultada em Caco-2 e compromete a predição da fração absorvida de fármacos substratos destas enzimas (KÜBLBECK et al., 2016).

Estratégias para melhorar a expressão e a atividade metabólica de enzimas CYP em culturas celulares têm sido relatadas na literatura e envolve a transfecção

de gene ou a ativação da CYP3A4 por meio da exposição da cultura Caco-2 ao éster de forbol, ao butirato de sódio e vitamina D3 e derivados (CUMMINS et al., 2004; KÜBLBECK et al., 2016).

Em estudo conduzido por Kublbeck e colaboradores (2016), as expressões e atividades das enzimas CYP foram aumentadas em células Caco-2, o que permitiu o surgimento de sublinhagens que não apresentaram alterações nas propriedades de absorção de fármacos. Para cada tipo de enzima, estudos com seu respectivo substrato são necessários a fim de que seja possível avaliar a atividade metabólica, bem como a identificação de seus metabólitos. O Quadro 1.6 apresenta as principais enzimas CYP encontradas em células Caco-2, seus substratos e metabólitos correspondentes (KÜBLBECK et al., 2016).

Quadro 1.6: Enzimas CYP presentes em células Caco-2, seus respectivos substratos e metabólitos considerados nos estudos de metabolismo em culturas celulares. Adaptado de (KÜBLBECK et al., 2016).

Enzima	**Substrato**	**Metabólito**
CYP1A2	melatonina	6-hidroximelatonina
CYP2A6	cumarina	7-hidroxicumarina
CYP2B6	bupropiona	(2S,3S)-hidroxibupropiona
CYP2C9	diclofenaco	4-hidroxidoclofenaco
CYP2C19	omeprazol	5-hidroxiomeprazol
CYP3A4	midazolam	1-hidroximidazolam

Um fator a ser considerado quando do uso de células Caco-2 transfectadas com gene CYP3A4, é a impossibilidade de controlar o processo de transfecção, ou seja, a expressão das enzimas não é padronizada e pode ser que outras características das células sofram mudanças durante o processo. Assim, o uso de substâncias que são substratos da CYP, bem como a realização de ensaios com inibidores devem ser considerados para cada conjunto de experimentos a serem realizados com os fármacos em estudo.

Em estudo conduzido por Cummins e colaboradores (2004), a linhagem de células Caco-2 transfectadas com gene CYP3A4 (CYP3A4-Caco-2) foi empregada como um modelo *in vitro* para avaliar a barreira química à absorção oral de substâncias. O fármaco midazolam foi utilizado como substrato de CYP3A4 e o sirolimo como substrato de CYP3A4 e de P-gp. O uso de inibidores de CYP e P-gp permitiram concluir que as células CYP3A4-Caco-2 podem ser empregadas para os estudos de interação fármaco-fármaco para avaliar as principais barreiras à absorção: efluxo e metabolismo (CUMMINS et al., 2004).

Embora seja incomum, a utilização de outro tipo celular como MDCK transfectada para expressão de enzimas CYP3A4 e de carreador de efluxo P-gp (células MMC) foi descrita por Kwatra e colaboradores (2012). Os estudos foram realizados em MDCK, MDCK-MDR1 (expressa P-gp) e MMC (expressa CYP3A4 e P-gp). Foi constatado que esta linhagem celular pode ser de grande utilidade na avaliação de interação fármaco-fármaco, uma vez que o cortisol (substrato de CYP 3A4) apresentou menor valor de transporte em células MMC quando comprado aos estudos realizados em MDCK-WT. A permeabilidade aumentou na razão de três vezes na presença de morfina (fraco inibidor de CYP3A4) (KWATRA et al., 2012).

Em modelos celulares que apresentam um protocolo de crescimento inferior aos 21 dias descritos normalmente para Caco-2, a atividade metabólica pode ser também monitorada em relação à fração do fármaco que não sofre metabolismo intestinal. Em estudo conduzido por Peng e colaboradores (2014), um modelo *in vitro* utilizando Caco-2 com 7 dias de crescimento foi descrito e utilizado para a avaliação da permeabilidade de dez fármacos, bem como a avaliação da fração do fármaco que não sofre metabolismo intestinal. Os autores sugerem que o modelo pode ser aplicado para a predição do metabolismo por meio da avaliação da fração de fármaco que não sofre metabolismo intestinal (PENG et al., 2014). No entanto, como a expressão de enzimas não pôde ser estabelecida e nem determinada, não é possível confirmar qual(is) enzima(s) está(ão) envolvida(s) no processo.

Microssomas

O uso de microssomas em ensaios de metabolismo *in vitro* é simples e rápido e permite avaliar a importância das enzimas intestinais sobre o metabolismo pré-sistêmico de muitos fármacos administrados oralmente. Diferentes tipos de microssomas podem ser utilizados nos estudos de metabolismo, o que possibilita realizar experimentos com enzimas hepáticas e intestinais de origem humana ou animal. Assim, é viável conduzir os ensaios de metabolismo pré-sistêmico e avaliar onde a atuação de enzimas é mais expressiva para determinados fármacos (CHIBA; HENSLEIGH; LIN, 1997; GAO et al., 2015).

O metabolismo intestinal e hepático do indinavir foi estudado por Chiba, Hensleigh e Lin (1997). Foram utilizados microssomas provenientes de ratos e de seres humanos para avaliar o metabolismo oxidativo do antirretroviral. Os resultados sugeriram que o metabolismo hepático é mais expressivo que o metabolismo intestinal em ambas as espécies. O uso de cetoconazol como inibidor de CYP3A permitiu observar que os metabolismos, hepático e intestinal, do indinavir foram fortemente inibidos tanto em ratos quanto em seres humanos, o que indicou o envolvimento de enzimas CYP3A no metabolismo pré-sistêmico do fármaco estudado (CHIBA; HENSLEIGH; LIN, 1997).

Deste modo, a atividade de enzimas oxidativas, tais como as pertencentes à superfamília CYP3A, pode ter diferentes proporções de atividade dependendo do sítio de metabolização (hepático ou intestinal) e, em alguns casos, podem apresentar-se como inversamente correlacionáveis intraindividualmente (MOULY et al., 2005).

Os ensaios de metabolismo que empregam microssomas são de suma importância para determinar onde um fármaco é principalmente metabolizado. Entretanto, fatores que não podem ser incluídos nos estudos, como fluxo sanguíneo hepático/intestinal, ligação às proteínas plasmáticas e interações com transportadores, são relevantes na determinação da influência do metabolismo pré-sistêmico na biodisponibilidade (VAN HERWAARDEN; VAN WATERSCHOOT; SCHINKEL, 2009).

Métodos *ex vivo*

Homogenato intestinal

Estudos de metabolismo também podem ser realizados utilizando frações isoladas de intestino. Em procedimento descrito por Li e colaboradores, o metabolismo intestinal da puerarina foi avaliado pela incubação do fármaco com a fração S9 intestinal (sobrenadante 9000g), ou seja, frações do intestino delgado foram removidos de ratos Sprague-Dawley e lavados com solução gelada de KCl 1,15%. Em seguida, a mucosa intestinal foi homogeneizada com solução tampão HEPES (pH 7,4) e KCl 1,15%. O homogenato foi centrifugado a 9000g por 20 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante obtido designado de fração S9. A incubação desta fração com a puerarina foi feita por 30 minutos a 37°C e a taxa de metabolismo observada indicou que a baixa absorção desta substância estava relacionada à sua metabolização na parede intestinal (LI et al., 2014b).

Saco intestinal invertido

Embora o modelo de segmentos intestinais invertidos (saco invertido) seja amplamente utilizado nos estudos de permeabilidade/transporte de fármacos, é possível realizar experimentos para avaliar o metabolismo intestinal de alguns fármacos (ALAM; AL-JENOOBI; AL-MOHIZEA, 2012; LUO et al., 2013). Em estudo conduzido Bouer e colaboradores (1999), o transporte de efluxo e o metabolismo intracelular da metadona foram avaliados por meio do emprego de segmentos intestinais invertidos provenientes de ratos Sprague-Dawley. Foi constatado que o metabólito do fármaco estava presente no interior do saco invertido, juntamente com a metadona. Assim, o metabolismo da substância pôde ser constatado, o que sugeriu o envolvimento das enzimas CYP3A4 presentes nos enterócitos. A interação da metadona com as enzimas CYP pode justificar a variável biodisponibilidade da substância observada *in vivo* (BOUËR et al., 1999).

Em outro estudo conduzido por Arellano e colaboradores (2007), o metabolismo do midazolam foi avaliado por meio do modelo de saco invertido. Foi constatado a metabolização do fármaco, o qual é substrato da enzima CYP3A4. O

modelo de saco invertido apresentou-se como adequado para estudar o metabolismo intestinal, bem como a interação transportador-enzima em virtude da presença de carreadores ativos durante os experimentos (ARELLANO et al., 2007).

A aplicação do modelo de saco invertido é limitada devido a problemas com a viabilidade. Há estudos na literatura que indicam que a atividade metabólica é aceitável em experimentos de até duas horas, desde que o segmento intestinal utilizado permaneça em condições fisiológicas (ALAM; AL-JENOOBI; AL-MOHIZEA, 2012; LUO et al., 2013). A extensa manipulação do tecido provoca disrupção e edema, o que pode ocasionar alterações nos resultados. A porção a ser selecionada para o estudo também deverá ser escolhida levando-se em consideração o metabolismo que pode ocorrer durante os experimentos, uma vez que a expressão enzimática é heterogênea ao longo do TGI (ALAM; AL-JENOOBI; AL-MOHIZEA, 2012; BARTHE et al., 1998).

Segmentos intestinais em câmaras de difusão

Os estudos de metabolismo que empregam segmentos intestinais posicionados em câmaras de difusão têm sido relatados na literatura com maior frequência em comparação com os ensaios realizados em sacos invertidos. Com foco nos experimentos que utilizam porções do intestino na tentativa de predizer a absorção *in vivo*, dois modelos de câmara de difusão têm sido empregados para estudos de permeabilidade de fármacos e sugere-se o uso para estudo de metabolismo: câmaras de difusão horizontal tipo Ussing e câmaras de difusão vertical tipo Franz (LAMPEN et al., 1996; SJÖBERG et al., 2013; SÖDERHOLM et al., 1998).

Devido à grande versatilidade do uso de câmaras de difusão, segmentos intestinais de variadas espécies podem ser empregados nos estudos de transporte de fármacos e metabolismo, inclusive segmentos intestinais de origem humana. Além disso, os ensaios de metabolismo segmento-dependente podem também ser realizados com o objetivo de identificar o principal sítio onde a metabolização é mais expressiva, principalmente quando a interação transportador-enzima (P-gp/CYP3A) está envolvida nos processos de absorção oral (LAMPEN et al., 1996; SJÖBERG et al., 2013; SÖDERHOLM et al., 1998).

As câmaras de difusão vertical tipo Franz são amplamente empregadas nos estudos de permeabilidade/transporte em segmentos de pele. No entanto, este equipamento tem sido recentemente utilizado para avaliar a absorção oral de fármacos através de segmentos intestinais e outros tecidos, o que tem despertado o interesse deste tipo de dispositivo para estudos de mecanismos de transporte fármacos e metabolismo (DEZANI et al., 2013a; JONES et al., 2013; NUNES; SILVA; CHAVES, 2015; REIS et al., 2013).

As câmaras de difusão mais amplamente empregadas em estudos de permeabilidade intestinal são as câmaras de Ussing. Em experimento conduzido por Lampen e colaboradores (1996), o metabolismo de tacrolimo, um imunossupressor, foi avaliado em segmentos intestinais oriundos de porcos. No fígado, este fármaco é substrato de enzima CYP3A e o objetivo dos pesquisadores foi avaliar a extensão de metabolismo no tecido intestinal de porcos utilizando as câmaras de Ussing. Foi verificado que o tacrolimo sofre metabolização, principalmente em porções iniciais do intestino delgado (duodeno), o que foi constatado após o uso de inibidor de CYP3A. Além disso, os metabólitos gerados foram encontrados tanto no lado mucoso como no lado seroso, o que fortemente indica o efluxo sofrido por estes resíduos. Assim, a baixa biodisponibilidade do tacrolimo está relacionada à ocorrência de metabolismo pré-sistêmico no intestino (LAMPEN et al., 1996).

Embora o uso de segmentos intestinais originários de diferentes espécies seja muito empregado em razão das facilidades nas questões éticas, a preocupação em utilizar porções de intestino humano em câmaras de difusão tem crescido ultimamente. Alguns estudos utilizam porções intestinais provenientes de processos cirúrgicos, o que torna este modelo *ex vivo* aceitável sob questões éticas (MIYAKE et al., 2013; ROZEHNAL et al., 2012).

Métodos de perfusão *in situ*

O modelo de perfusão intestinal *in situ* consiste em perfundir uma solução tampão contendo o fármaco solubilizado no interior de um segmento intestinal. Este experimento permite obter informações consistentes sobre a cinética de absorção,

sobretudo em ensaios que envolvem coleta de sangue mesentérico (BROUWERS et al., 2010; CUMMINS et al., 2003; DEZANI et al., 2016).

A grande vantagem relacionada à perfusão *in situ* é que este modelo mantém se às condições fisiológicas muito próximas daquelas encontradas *in vivo*, ou seja, o suprimento sanguíneo e inervação permanecem intactos durante a execução dos experimentos em animais, normalmente ratos. Além disso, transportadores e enzimas permanecem ativos e problemas de viabilidade são raramente observados quando o procedimento cirúrgico é adequadamente executado (DEZANI et al., 2016; LIN et al., 2003).

Em estudo conduzido por Cummins e colaboradores (2003), a interação do transportador de efluxo e da enzima no enterócito foi verificada com o emprego do modelo de perfusão intestinal *in situ* com coleta de sangue mesentérico. Foram empregados substratos e inibidores de P-gp e CYP3A com a finalidade de avaliar a influência do carreador e da enzima nos processos de absorção. Foi observado que a P-gp e a CYP3A agem de maneira coordenada para controlar a absorção de substâncias e xenobióticos, o que ocorre para alguns fármacos ao longo do TGI. Assim, o estudo conclui que o metabolismo pré-sistêmico intestinal não depende somente da ação das enzimas presentes nos enterócitos, mas também dos mecanismos de efluxo (P-gp), os quais controlam a entrada dos fármacos no interior das células e, consequentemente, limita a exposição das mesmas à enzimas metabolizadoras (CUMMINS et al., 2003).

Embora o modelo de perfusão *in situ* seja o mais próximo das condições *in vivo* e apresente boa correlação com dados em seres humanos, algumas desvantagens acabam dificultando seu emprego nas etapas de desenvolvimento farmacêutico, tais como: necessidade de habilidade cirúrgica, método laborioso e moroso, uso de anestésicos, grande quantidade de fármaco e necessidade de grande quantidade de animais para obter resultados significativamente válidos (JUNIOR et al., 2015; LIN et al., 2003).

CONCLUSÃO

O metabolismo de fármacos consiste em uma etapa fundamental no desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que o mesmo, pode ser responsável pela baixa biodisponibilidade encontrada *in vivo* para algumas substâncias e essa avaliação em etapas iniciais de seleção de moléculas com potencial farmacológico não é tão considerada em comparação com os estudos de metabolismo sistêmico.

Sabe-se atualmente que a presença de inúmeras enzimas nos enterócitos pode ter ação diferenciada em comparação às enzimas encontradas no fígado e ensaios que possam determinar se um fármaco é substrato de enzimas intestinais pode fornecer informações sobre a cinética de absorção e os mecanismos envolvidos. Com base nisso, estratégias podem ser traçadas nas etapas de desenvolvimento de formulações com o propósito de assegurar a biodisponibilidade adequada para alguns fármacos. O uso de inibidores específicos de enzimas, principalmente aquelas pertencentes à superfamília CYP3A, durante os experimentos de metabolismo intestinal permite identificar quais enzimas podem estar interferindo na absorção oral de determinado fármaco.

Estudos de metabolismo intestinal e hepático são relevantes antes da disponibilização de um medicamento comercialmente. Entretanto, a execução de ensaios *in vivo* em seres humanos acarreta dificuldades éticas e financeiras. Além disso, os estudos *in vivo* não permitem identificar o sítio exato de metabolização, o que pode acarretar em problemas futuros em pacientes que já estejam em tratamento.

Assim, mediante discussões apresentadas no presente trabalho, a importância de conhecer as vantagens e limitações dos principais métodos utilizados na avaliação de metabolismo pré-sistêmico intestinal é de suma importância para que excipientes sejam adequadamente empregados.

Ensaios de rápida execução como os modelos *in vitro*, permitem obter uma rápida ideia do comportamento do fármaco quando o mesmo está sendo avaliado quanto a interação fármaco-enzima. O uso de culturas celulares transfectadas com gene para expressão de enzimas e o emprego de microssomas podem indicar se um fármaco é substrato ou não de enzimas presentes nos enterócitos. Porém, nestes tipos de ensaios, a superexpressão de enzimas em modelos celulares e a quantidade de enzimas por mililitro de suspensão microssomal não necessariamente indicarão um impacto negativo na biodisponibilidade destes fármacos administrados oralmente. Assim, os estudos conduzidos com o uso de

segmentos intestinais isolados (métodos *ex vivo*) e do modelo de perfusão *in situ* podem fornecer uma ideia mais próxima do que acontece *in vivo*, em virtude da distribuição heterogênea das enzimas intestinais ao longo do TGI. Os resultados obtidos a partir do uso de segmentos intestinais provenientes de animais, ou até mesmo de seres humanos, permitem compreender a verdadeiro impacto do metabolismo intestinal relacionado aos processos de absorção, apesar de serem modelos laboriosos e que envolvem questões éticas.

REFERÊNCIAS

ALAM, M. A.; AL-JENOOBI, F. I.; AL-MOHIZEA, A. M. Everted gut sac model as a tool in pharmaceutical research: Limitations and applications. Journal of Pharmacy and Pharmacology, v. 64, n. 3, p. 326–336, 2012.

AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. Pharmaceutical research, v. 12, n. 3, p. 413–420, 1995.

ARELLANO, C. et al. The metabolism of midazolam and comparison with othe CYP enzyme substrates during intestinal absorption: In vitro studies with rat everted gut sacs. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, v. 10, n. 1, p. 26–36, 2007.

ARTURSSON, P.; PALM, K.; LUTHMAN, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 64, n. SUPPL., p. 280–289, 2012.

AVDEEF, A. Absorption and Drug Development:solubility, permeability and charge state. 1st. ed. Hoboken, New Jersey: Wiley Interscience, 2003.

BARTHE, L. et al. An improved everted gut sac as a simple and accurate technique to measure paracellular transport across the small intestine. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, v. 23, n. 2, p. 313–323, 1998.

BENET, L. Z. The role of BCS (biopharmaceutics classificatrion system) and BDDCS (Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System) in drug development. Journal of pharmaceutical sciences, v. 102, n. 1, p. 34–42, 2013.

BOUËR, R. et al. The roles of P-glycoprotein and intracellular metabolism in the intestinal absorption of methadone: in vitro studies using the rat everted intestinal sac. Fundamental & clinical pharmacology, v. 13, n. 4, p. 494–500, 1999.

BROUWERS, J. et al. Validation of a differential in situ perfusion method with mesenteric blood sampling in rats for intestinal drug interaction profiling. Biopharmaceutics & Drug Disposition, v. 31, n. 5–6, p. 278–285, 2010.

CAO, X. et al. Why is it challenging to predict intestinal drug absorption and oral bioavailability in human using rat model. Pharmaceutical Research, v. 23, n. 8, p. 1675–1686, 2006.

CDER/FDA. Guidance for Industry waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. Center for Drug Evaluation and Research, n. August, 2000.

CHIBA, M.; HENSLEIGH, M.; LIN, J. H. Hepatic and intestinal metabolism of indinavir, an HIV protease inhibitor, in rat and human microsomes: Major role of CYP3A. Biochemical Pharmacology, v. 53, n. 8, p. 1187–1195, 1997.

CUMMINS, C. L. et al. In vivo modulation of intestinal CYP3A metabolism by P-glycoprotein: studies using the rat single-pass intestinal perfusion model. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, v. 305, n. 1, p. 306–314, 2003.

CUMMINS, C. L. et al. CYP3A4-transfected Caco-2 cells as a tool for understanding biochemical absorption barriers: studies with sirolimus and midazolam. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, v. 308, n. 1, p. 143–155, 2004.

DEZANI, A. B. et al. Determination of lamivudine and zidovudine permeability using a different ex vivo method in Franz cells. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, v. 67, n. 3, p. 194–202, 2013.

DEZANI, T. M. et al. Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) and prediction of fraction absorbed and permeability in humans: A study with antiretroviral drugs. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 104, p. 131–139, 2016.

GALETIN, A.; GERTZ, M.; HOUSTON, J. B. Contribution of intestinal cytochrome p450-mediated metabolism to drug-drug inhibition and induction interactions. Drug metabolism and pharmacokinetics, v. 25, n. 1, p. 28–47, 2010.

GAO, C. et al. Interaction between oblongifolin C and UDP-glucuronosyltransferase isoforms in human liver and intestine microsomes. Xenobiotica, v. 45, n. 7, p. 578–585, 3 jul. 2015.

HOSEY, C. M.; CHAN, R.; BENET, L. Z. BDDCS Predictions, Self-Correcting Aspects of BDDCS Assignments, BDDCS Assignment Corrections, and Classification for more than 175 Additional Drugs. The AAPS journal, v. 18, n. 1, p. 251–60, 2016.

JONES, E. et al. Monolayered multipolymeric buccal films with drug and polymers of opposing solubilities for ARV therapy: Physico-mechanical evaluation and molecular mechanics modelling. International Journal of Pharmaceutics, v. 455, n. 1, p. 197–212, 2013.

JUNIOR, J. B. S. et al. Evaluating Potential P-gp Substrates : Main Aspects to Choose the Adequate Permeability Model for Assessing Gastrointestinal Drug Absorption. Mini reviews in medicinal chemistry, v. 15, n. 10, p. 858–871, 2015.

KEMP, D. C.; FAN, P. W.; STEVENS, J. C. Characterization of raloxifene glucuronidation in vitro: Contribution of intestinal metabolism to presystemic clearance. Drug Metabolism and Disposition, v. 30, n. 6, p. 694–700, 2002.

KRISHNA, D. R.; KLOTZ, U. Extrahepatic Metabolism of Drugs in Humans. Clinical Pharmacokinetics, v. 26, n. 2, p. 144–160, 1994.

KÜBLBECK, J. et al. Genetically Modified Caco-2 Cells With Improved Cytochrome P450 Metabolic Capacity. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 105, n. 2, p. 941–949, 2016.

KWATRA, D. et al. Transfected MDCK Cell Line with Enhanced Expression of CYP3A4 and P-Glycoprotein as a Model To Study Their Role in Drug Transport and Metabolism. Molecular Pharmaceutics, v. 9, n. 7, p. 1877–1886, 2 jul. 2012.

LAMPEN, A et al. Metabolism of the macrolide immunosuppressant, tacrolimus, by the pig gut mucosa in the Ussing chamber. British journal of pharmacology, v. 117, n. 8, p. 1730–1734, 1996.

LI, H. et al. Biopharmaceutics classification of puerarin and comparison of perfusion approaches in rats. International Journal of Pharmaceutics, v. 466, n. 1–2, p. 133–138, 2014.

LIN, J. et al. The Role of Absorption , Distribution , Metabolism , Excretion and Toxicity in Drug Discovery. Current topics in medicinal chemistry, v. 3, n. 10, p. 1125–1154, 2003.

LIN, J. H.; LU, A. Y. Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v. 41, p. 535–567, 2001.

LUO, Z. et al. Ex vivo and in situ approaches used to study intestinal absorption. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, v. 68, n. 2, p. 208–216, 2013.

MIYAKE, M. et al. Establishment of novel prediction system of intestinal absorption in humans using human intestinal tissues. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 102, n. 8, p. 2564–2571, 2013.

MOULY, S. J. et al. Variation in oral clearance of saquinavir is predicted by CYP3A5*1 genotype but not by enterocyte content of cytochrome P450 3A5. Clinical Pharmacology and Therapeutics, v. 78, n. 6, p. 605–618, 2005.

MUSTHER, H. et al. Animal versus human oral drug bioavailability: Do they correlate? European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 57, n. 1, p. 280–291, 2014.

NUNES, R.; SILVA, C. ATIA; CHAVES, L. Tissue-based in vitro and ex vivo models for intestinal permeability studies. In: Concepts and Models for Drug Permeability Studies: Cell and Tissue based In Vitro Culture Models. [s.l: s.n.]. p. 203.

OLIVARES-MORALES, A. et al. The use of ROC analysis for the qualitative prediction of human oral bioavailability from animal data. Pharmaceutical Research, v. 31, n. 3, p. 720–730, 2014.

PENG, Y. et al. Applications of a 7-day Caco-2 cell model in drug discovery and development. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 56, n. 1, p. 120–130, 2014.

PEREIRA DE SOUSA, I.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Pre-systemic metabolism of orally administered drugs and strategies to overcome itJournal of Controlled Release, 2014.

REIS, J. M. et al. Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, ex vivo and in situ Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 48, n. 4–5, p. 781–789, 2013.

ROZEHNAL, V. et al. Human small intestinal and colonic tissue mounted in the Ussing chamber as a tool for characterizing the intestinal absorption of drugs. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 46, n. 5, p. 367–373, 2012.

SJÖBERG, Å. et al. Comprehensive study on regional human intestinal permeability and prediction of fraction absorbed of drugs using the Ussing chamber technique. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 48, n. 1–2, p. 166–180, 2013.

SJÖGREN, E. et al. In vivo methods for drug absorption – Comparative physiologies , model selection , correlations with in vitro methods (IVIVC), and applications for formulation / API / excipient characterization including food. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 57, p. 99–151, 2014.

SÖDERHOLM, J. D. et al. Integrity and metabolism of human ileal mucosa in vitro in the Ussing chamber. Acta Physiologica Scandinavica, v. 162, n. 1, p. 47–56, 1998.

VAN HERWAARDEN, A. E.; VAN WATERSCHOOT, R. A. B.; SCHINKEL, A. H. How important is intestinal cytochrome P450 3A metabolism? Trends in Pharmacological Sciences, v. 30, n. 5, p. 223–227, 2009.

WATANABE, Y.; NAKAJIMA, M.; YOKOI, T. Troglitazone glucuronidation in human liver and intestine microsomes: High catalytic activity of UGT1A8 and UGT1A10. Drug Metabolism and Disposition, v. 30, n. 12, p. 1462–1469, 2002.

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.

YANG, J. et al. Prediction of intestinal first-pass drug metabolism. Current drug metabolism, v. 8, n. 7, p. 676–684, 2007.

CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DOS FÁRMACOS ANTIRRETROVIRAIS POR MEIO DOS MODELOS *IN VITRO* PAMPA E *EX VIVO* EM CÂMARAS DE DIFUSÃO VERTICAL TIPO FRANZ

RESUMO

A eficácia e a segurança de medicamentos administrados oralmente estão relacionadas à biodisponibilidade, uma propriedade biológica que representa a taxa e a extensão de absorção de um fármaco. De uma forma simplificada, a absorção oral depende da liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica, de sua solubilização nos fluidos biológicos e de sua permeabilidade através da parede intestinal. Desta forma, a solubilidade e a permeabilidade do fármaco são consideradas importantes etapas para a sua absorção. O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto com o propósito de classificar os fármacos de acordo com estas duas características, além de auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos, de novas formulações farmacêuticas e nos processos de bioisenção. Para a avaliação da permeabilidade, muitos métodos têm sido descritos na literatura, dentre os quais destacam-se o modelo *in vitro* PAMPA e o modelo *ex vivo* com o uso de segmentos intestinais isolados em câmaras de difusão vertical tipo Franz. O PAMPA permite a avaliação do transporte passivo transcelular enquanto que o uso de segmentos intestinais em câmaras de difusão tipo Franz apresentam os demais mecanismos, tais como o transporte ativo de influxo e/ou de efluxo, transporte passivo paracelular e endocitose. Ambos os modelos são utilizados de forma complementar, uma vez que nenhum método empregado isoladamente é capaz de predizer a absorção *in vivo*. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio dos modelos *in vitro* PAMPA e *ex vivo* com o emprego de câmaras de difusão vertical tipo Franz. Os fármacos antirretrovirais, como estavudina, lamivudina e zidovudina são amplamente utilizados no tratamento da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA) entretanto, os mesmos apresentam biodisponibilidade variável *in vivo*, o que pode estar relacionado aos mecanismos de transporte envolvidos na absorção dos mesmos. Para a avaliação da permeabilidade dos referidos fármacos, estudos em PAMPA foram realizados com a finalidade de avaliar a permeabilidade transcelular de cada fármaco. A variação de pH foi empregada considerando a faixa fisiológica de 3,0 a 7,4, temperatura de 37°C e incubação a 100 rpm por 15 horas. Já os estudos em câmaras de difusão vertical tipo Franz foram realizados no sentido A→B (apical-basolateral) a 37°C, onde cada fármaco solubilizado individualmente no meio de transporte (pH 6,8) foi adicionado ao compartimento doador e as amostras foram coletadas a partir do compartimento receptor em intervalos regulares de tempo. Para todos os ensaios foram empregados marcadores de alta e de baixa permeabilidade metoprolol e ranitidina, respectivamente. Os resultados de permeabilidade obtidos em PAMPA no pH 6,8, foram: 0,74±0,11 x 10^{-6} cm/s para a estavudina, 0,25±0,12 x 10^{-6} cm/s para a lamivudina e 1,14±0,25 x 10^{-6} cm/s para a zidovudina. Já no modelo *ex vivo* com o emprego de câmaras de difusão vertical tipo Franz, os resultados foram: 15,6±0,32 x 10^{-6}cm/s para a estavudina, 12,6±0,27 x 10^{-}6 cm/s para a lamivudina e 25,4±0,49 x 10^{-6} cm/s para a zidovudina. Os valores de permeabilidade obtidos por meio do modelo *ex vivo* e modelo *in vitro* PAMPA sugerem que os fármacos antirretrovirais apresentam outro mecanismo de transporte que não a via transcelular passiva.

Palavras-chave: antirretrovirais, permeabilidade, PAMPA, câmaras de difusão vertical tipo Franz, *in vitro*, *ex vivo*.

INTRODUÇÃO

Fármacos administrados por via oral e que possuem alta solubilidade e alta permeabilidade em seu sítio de absorção apresentam elevada correlação com a fração absorvida observada *in vivo*. Assim, as características de solubilidade e de permeabilidade são consideradas importantes etapas que antecedem a absorção. A avaliação de substâncias quanto a estas características pode fornecer importantes informações sobre a predição do comportamento *in vivo* de fármacos, além de auxiliar no desenvolvimento de novas substâncias e de novas formulações. Com base nisso, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto como uma ferramenta que classifica os fármacos em quatro classes de acordo com suas características de solubilidade e de permeabilidade, sendo: classe I (alta solubilidade e alta permeabilidade), classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade), classe III (alta solubilidade e baixa permeabilidade) e classe IV (baixa solubilidade e baixa permeabilidade)(AMIDON et al., 1995).

Baseada no SCB, a agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) publicou um guia voltado aos processos de bioisenção, ou seja, isenção de ensaios clínicos para fármacos classe I do SCB. Este guia descreve os ensaios de solubilidade e de permeabilidade utilizados para a classificação biofarmacêutica de fármacos e apresenta critérios para a classificação dos fármacos (CDER/FDA, 2000; VOLPE, 2008). Da mesma forma, baseado no SCB, a ANVISA (agência nacional de vigilância sanitária) propôs a isenção de ensaios clínicos para fármacos pertencentes a classe I do SCB (ANVISA/BRASIL, 2011).

Os estudos de solubilidade e de permeabilidade de fármacos permitem avaliar os efeitos de solventes, excipientes e/ou promotores de absorção (TRAPANI et al., 2004). Além disso, os ensaios de permeabilidade possibilitam avaliar os mecanismos de transporte pelos quais os fármacos estão sujeitos nos processos de absorção, tais como: transporte passivo transcelular, transporte passivo paracelular, transporte ativo mediado por carreadores de influxo e/ou efluxo e endocitose (SHUGARTS; BENET, 2009).

Atualmente, a caracterização da permeabilidade de fármacos pode ser realizada por meio de diferentes modelos, tais como: computacional *in silico*, *in vitro* com o emprego de membranas artificiais, *in vitro* com o emprego de culturas celulares, *ex vivo* com o emprego de segmentos intestinais isolados, perfusão intestinal *in situ* ou *in vivo* em animais, perfusão intestinal *in vivo* em seres humanos (BOHETS et al., 2001).

O modelo computacional *in silico* é simples e de fácil execução, pois se baseia no uso de programas que consideram as características físico-químicas dos fármacos, tais como: peso e tamanho molecular, área de superfície polar, capacidade de formação de pontes de hidrogênio, p*K*a, lipofilicidade e carga/ionização. No entanto, tais características constituem informações limitadas com baixo valor preditivo devido à impossibilidade de prever as interações entre os fármacos e as membranas biológicas, o que não permite considerar os mecanismos de transporte de fármacos e outros fatores fisiológicos potencialmente envolvidos. Além disso, este modelo não é recomendado pela FDA devido à inconsistência de dados (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; CDER/FDA, 2000; GRASS, 1997).

Os modelos *in vitro* que empregam culturas celulares são amplamente utilizados nos estudos de permeabilidade. Existem diferentes linhagens descritas na literatura, sendo as mais difundidas a Caco-2 (provenientes de células de adenocarcinoma humano) e a MDCK (provenientes de rim canino). No entanto, as células Caco-2 apresentam variações na expressão de transportadores, risco elevado de contaminação por microrganismos, longo período para o crescimento celular, variação na idade celular, junções intercelulares mais justapostas e formação de camada de água estacionária (CAE) mais espessa que na situação *in vivo*. Já as células MDCK apresentam como grande desvantagem a sua origem não humana e não intestinal. Assim, muitas variações intralaboratorial e interlaboratoriais referentes aos resultados de permeabilidade são relatadas na literatura (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008).

Estudos de permeabilidade realizados em modelos de perfusão *in situ* ou *in vivo* em animais ou de perfusão *in vivo* em seres humanos apresentam alta correlação com a fração absorvida. Estes modelos são considerados os mais próximos das condições *in vivo*, pois os suprimentos sanguíneos e de inervação permanecem intactos. No entanto, as limitações estão relacionadas ao uso de anestésicos que podem interferir nos processos de absorção, além de serem métodos trabalhosos e exigirem um número maior de animais para a obtenção de resultados significativos. Além disso, grande quantidade de fármaco é necessária para a realização destes estudos, o que não é viável nas etapas de

desenvolvimento de novas moléculas (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; JUNIOR et al., 2015).

O método *in vitro* baseado em sistemas de membranas artificiais como PAMPA (membranas artificiais paralelas) apresenta um baixo custo e um alto rendimento, ou seja, é possível realizar uma série de experimentos com variados fármacos em diferentes condições. Este modelo é amplamente utilizado em processos de seleção de moléculas candidatas, uma vez que a maioria dos fármacos são planejados para serem absorvidos principalmente ou parcialmente por transporte passivo transcelular. Assim, a permeabilidade através de uma simples membrana lipídica artificial permite indicar se o fármaco é ou não transportado por difusão passiva (BUCKLEY et al., 2012; KANSY; SENNER; GUBERNATOR, 1998).

Outro método bastante utilizado para os estudos de permeabilidade envolve o emprego de segmentos intestinais isolados provenientes de animais. Dois modelos *ex vivo* são os mais difundidos: saco invertido e uso câmaras de difusão tipo Ussing e tipo Franz (também conhecidas como células de Franz). Este último é amplamente utilizado nos estudos de permeação cutânea (HERAI et al., 2007). No entanto, mais recentemente, alguns ensaios de permeabilidade intestinal de fármacos podem ser encontrados na literatura utilizando este sistema. Os segmentos intestinais isolados apresentam a vantagem de expressar a grande maioria de carreadores de influxo e de efluxo encontrados *in vivo*, o que permite estabelecer uma boa correlação entre estudos realizados em ratos e em seres humanos (DEZANI et al., 2013a; PRETORIUS; BOUIC, 2009; REIS et al., 2013; TUKKER, 2000; ŽAKELJ; ŠTURM; KRISTL, 2006).

Desta forma, a previsão da solubilidade e da permeabilidade intestinal dos fármacos fornece dados importantes sobre a classificação biofarmacêutica e, consequentemente, sobre a fração absorvida e assim, pode ter influência ainda sobre a biodisponibilidade. A necessidade de associar diferentes métodos capazes de realizarem essa previsão tem sido abordada e discutida recentemente e o emprego de distintos modelos com a finalidade de predizer a absorção do fármaco *in vivo* tem sido amplamente recomendado (DEZANI et al., 2013a; REIS et al., 2013). Assim, estudos de permeabilidade em modelos *in vitro* PAMPA e *ex vivo* com emprego de câmaras de difusão vertical podem fornecer combinados, importantes informações quanto aos mecanismos de transporte envolvidos na

permeabilidade de fármacos (JUNIOR et al., 2015; REIS et al., 2013). O Quadro 2.1 apresenta as principais características relacionadas aos ensaios realizados em modelos *in vitro* PAMPA e *ex vivo* com uso de câmaras de difusão vertical tipo Franz.

Quadro 2.1: Comparação das principais características dos ensaios realizados em modelo *in vitro* PAMPA e em modelo *ex vivo* em câmaras de difusão vertical tipo Franz com o emprego de segmentos intestinais.

Características	**PAMPA**	**Câmaras de difusão vertical tipo Franz**
Material usado nos ensaios	Membrana artificial de natureza fosfolipídica	Segmento intestinal isolado proveniente de rato
Mecanismos de transporte avaliados	Somente transporte passivo transcelular	Transporte passivo transcelular, transporte passivo paracelular, transporte ativo mediado por carreadores de influxo, transporte ativo mediado por carreadores de efluxo e endocitose
Quantificação das amostras	Espectrofotômetro de placas (com detecção em UV e em Fluorescência) ou CLAE*	CLAE* ou LC-MS/MS**
Custo envolvido[a]	Baixo	Moderado
Tempo de ensaio[b]	Rápido	Moderado
Questões éticas	Não relevante	Relevante e requer aprovação por Comissão de Ética devido ao uso de animais

* *CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência*

** *LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas*

[a] *Custo envolvido: quando comparado aos estudos* in vivo

[b] *Tempo de ensaio: quando comparado aos estudos* in vivo

Muitos fármacos disponíveis comercialmente apresentam divergências quanto às suas classificações segundo o SCB. Além disso, problemas de biodisponibilidade observados *in vivo* podem estar relacionados a limitações nos processos de absorção, tal como ocorre com alguns fármacos antirretrovirais.

Os fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina são classificados como inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos e são amplamente empregados no combate ao vírus HIV (vírus da imunodeficiência humana) (CHECA et al., 2005). Dados de permeabilidade *ex vivo* destes fármacos são escassos na literatura e, quando encontrados, são divergentes ou inconclusivos em razão do emprego de diferentes técnicas nos estudos de permeabilidade.

Em estudo conduzido por Quevedo e Briñón (2009), a permeabilidade da zidovudina foi avaliada por meio do modelo de saco intestinal invertido e o resultado encontrado de permeabilidade aparente foi de $0{,}05\times10^{-4}$ cm/s. A intensa manipulação do segmento intestinal em virtude da sua inversão para o experimento e problemas na viabilidade do tecido podem ter causado um valor elevado de permeabilidade (QUEVEDO; BRIÑÓN, 2009).

Em outro estudo, Dezani e colaboradores (2016) avaliaram a permeabilidade intestinal dos três fármacos antirretrovirais utilizando o modelo de perfusão *in situ* em ratos. Os valores de permeabilidade efetiva encontrados foram: $3{,}96\times10^{-5}$ cm/s para a estavudina, $3{,}08\times10^{-5}$ cm/s para a lamivudina e $4{,}17\times10^{-5}$ cm/s para a zidovudina. No entanto, o tamanho amostral de seis animais por fármaco foi necessário para a obtenção de resultados significativos. Além disso, o procedimento cirúrgico realizado e a dificuldade na manutenção anestésica nos animais fazem com que este método seja considerado laborioso de elevado custo. Fato este contrário aos ensaios *ex vivo* que utilizam câmara de difusão vertical tipo Franz, onde apenas um único animal resulta na aquisição de seis amostragens (DEZANI et al., 2016).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a permeabilidade dos fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina por meio dos modelos *in vitro* PAMPA e *ex vivo* com o uso de segmentos intestinais isolados provenientes de ratos em câmaras de difusão vertical tipo Franz.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Os fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina foram generosamente doados por Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos (São Paulo, Brasil). O metoprolol e a ranitidina utilizados como marcadores de alta e de baixa permeabilidade, respectivamente, foram gentilmente doados pela Fundação para o Remédio Popular (FURP, São Paulo, Brasil).

Azul de cresil brilhante, amarelo lúcifer, ácido glicocólico, dimetilsufóxido (DMSO), n-dodecano, ácido cítrico, fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e hidróxido de sódio (NaOH) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os lipídios fosfatidilcolina (PC) e colesterol (CHO) utilizados na composição da membrana artificial foram adquiridos da Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, EUA).

Placas doadoras de 96 poços (MAIPN4550), placas receptoras de 96 poços (MATRNPS50) com filtro poroso e placas de leitura UV de 96 poços foram adquiridas da Millipore Corporation (EUA).

Solventes cromatográficos metanol e acetonitrila foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio ($CaCl_2$), sulfato de magnésio ($MgSO_4$), bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanossulfônico (HEPES) e D-glicose foram empregados no preparo da solução Ringer-Krebs-Hepes modificado (RKHM).

Estudo de permeabilidade por meio do modelo *in vitro* PAMPA

O protocolo de estudo de permeabilidade *in vitro* por meio do modelo *in vitro* PAMPA foi baseado no trabalho descrito por Kansy e colaboradores (1998), com algumas modificações. A preparação da membrana lipídica foi realizada com 10% de fosfatidilcolina (PC) e 0,5% de colesterol (CHO) solubilizados em n-dodecano. A mistura lipídica foi imediatamente utilizada na impregnação dos filtros das placas receptoras de 96 poços (KANSY et al., 1998; REIS et al., 2013).

O processo de impregnação das membranas nos filtros das placas receptoras foi feito com 5µL da mistura lipídica recém preparada. Em seguida, cada poço foi preenchido com 300 µL de solução tampão fosfato a 0,1M isento de fármaco (pH 7,4) com 0,5% (p/v) de ácido glicocólico, o que representou o lado basolateral do intestino.

Para as placas doadoras, soluções tampão com diferentes valores de pH e composição foram adicionadas aos poços. A solução tampão pH 3,0 foi preparada com ácido cítrico 10 mM e o pH foi ajustado com solução NaOH 1M. A solução tampão pH 4,5 foi preparada com KH_2PO_4 50 mM. As soluções tampão pH 6,8 e pH 7,4 foram preparadas com KH_2PO_4 50mM e seus respectivos valores de pH foram ajustados conforme necessário com solução NaOH 1M.

Cada substância utilizada no estudo foi previamente solubilizada em DMSO com a finalidade de preparar as soluções estoque. Em seguida, os fármacos em DMSO foram diluídos individualmente em cada solução tampão utilizada nos compartimentos doadores de acordo com os valores de pH até obter a concentração final de 250µM e não mais que 5% da concentração de DMSO.

Para o preenchimento de cada poço da placa doadora, foi utilizado o volume de 200 µL da solução tampão final contendo o fármaco solubilizado (250µM). A distribuição das soluções doadoras foi realizada de acordo com o gradiente de pH adotado para o desenho experimental (valores de pH 3,0, 4,5, 6,8 e 7,4).

O início dos experimentos foi marcado a partir do momento do encaixe entre as placas doadora e receptora, com a formação de um modelo sanduíche. Em seguida, o sistema foi selado para evitar a evaporação das soluções e levado à uma incubadora sob umidade constante e controlada. Os ensaios foram conduzidos sob agitação orbital de 100 rpm e temperatura de 37°C por 15 horas.

Após o período de incubação, as soluções receptoras e doadoras foram coletadas das placas dos ensaios e transferidas para placas de leitura UV de 96 poços para a determinação das respectivas concentrações das substâncias em cada compartimento (doador ou receptor). As quantificações das amostras foram realizadas por meio do método espectrofotométrico previamente validado com o emprego de espectrofotômetro UV de placas (Tecan Infinit M200). A leitura foi realizada na região do UV de máxima absorção para cada fármaco.

A determinação da permeabilidade doador-receptor (*Pe*) foi calculada segundo o modelo matemático proposto por Avdeef (2003) e demostrado na Equação 4 (AVDEEF, 2003).

$$P_e = -\frac{2.303 V_D}{A \cdot (t - \tau_{SS}) \cdot \varepsilon_a} \cdot \left(\frac{1}{1 + r_V}\right) \cdot \log_{10}\left[1 - \left(\frac{1 + r_V^{-1}}{1 - R_M}\right) \cdot \frac{C_A(t)}{C_D(0)}\right]$$

Equação 4

onde: *rv* corresponde à razão do volume dos compartimentos doador e receptor (V_D/V_A) em mL, *A* corresponde à área da membrana disponível para o processo de permeabilidade (0,3 cm^2), ε_a representa a porosidade aparente do filtro (0,76 µm) (NIELSEN; AVDEEF, 2004), $C_D(0)$ e $C_A(t)$ representam as concentrações (mol/mL) das amostras presentes nos compartimentos, doador no tempo $t = 0$ e no receptor no tempo *t* (segundos), respectivamente. O τ_{SS} corresponde ao tempo de equilíbrio necessário para saturar a membrana com o soluto, estimado em $(54\ R_M + 1) \cdot 60s$ (AVDEEF, 2003). R_M, que resulta em valores de 0 a 1, corresponde à fração molar da amostra retida na membrana, definida em unidade mols (m) e calculada a partir da Equação 5.

$$R_M = 1 - \left(\frac{m_{D(t)}}{m_{D(0)}}\right) - \left(\frac{m_{A(t)}}{m_{D(0)}}\right)$$

Equação 5

Após as amostragens e retirada das soluções restantes das placas, uma mistura de marcadores de integridade contendo amarelo lúcifer e azul de cresil brilhante a 0,1mg/mL solubilizados em tampão fosfato contendo 5% de DMSO foi adicionada à placa doadora (150 µL/poço). Na placa receptora foram adicionados 300 µL/poço de tampão fosfato pH 7,4 contendo 5% de DMSO isento dos marcadores de integridade. O encaixe no modelo sanduíche foi novamente formado e incubado por mais 4 horas nas mesmas condições empregadas nos estudos de permeabilidade.

Após o período de incubação, os marcadores de integridade foram avaliados em cada placa. Para o amarelo lúcifer, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro de placas com detecção em fluorescência (Tecan Infinit M200) nos comprimentos de onda de excitação em 425 nm e de emissão em 1528 nm. A transferência de azul de cresil brilhante através da membrana artificial foi verificada visualmente.

Estudo de permeabilidade por meio do modelo *ex vivo* em câmaras de difusão vertical tipo Franz

O protocolo adotado para os experimentos de permeabilidade em animais foi previamente avaliado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) sob número de registro P386, o qual recebeu resposta favorável à execução dos estudos, conforme certificado apresentado no ANEXO B.

A solução de Ringer-Krebs-Hepes modificado (RKHM) pH 6,8 foi utilizada como meio de transporte nos estudos de permeabilidade *ex vivo* e foi preparada com a seguinte composição: 115 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,5 mM $CaCl_2$, 2,5 mM $MgSO_4$, 9,0 mM $NaHCO_3$, 1,2 mM KH_2PO_4, 28,0 mM D-glicose e 25 mM HEPES (DAVIES et al., 2008; DEZANI et al., 2013a; MOTZ et al., 2007; REIS et al., 2013; SHARMA; CHAWLA; PANCHAGNULA, 2002).

Previamente aos ensaios, os compartimentos receptores das câmaras de difusão vertical tipo Franz foram preenchidos com solução RKHM isento de fármaco com a finalidade de manter o sistema a 37°C antes da inserção dos segmentos intestinais no equipamento.

Ratos machos da linhagem Wistar Hannover (*Rattus norvegicus*) com peso entre 250 e 300g foram utilizados nos ensaios de permeabilidade por meio do modelo *ex vivo* com o emprego de câmaras de difusão vertical tipo Franz.

Inicialmente, os animais foram submetidos a um período de jejum de 12 horas antes dos experimentos. Este período foi estabelecido com base em relatos descritos na literatura relacionados aos estudos de permeabilidade de fármacos com o uso de segmentos intestinais. Em seguida, os ratos foram anestesiados por

injeção intramuscular de mistura de cetamina-xilazina (0,1 g/kg e 0,02 g/kg, respectivamente) e segmentos de jejuno foram selecionados e isolados (DEZANI et al., 2016; ESCRIBANO et al., 2012; JAIN et al., 2007; KIM et al., 2006; LANGGUTH et al., 1997).

Após a retirada do segmento intestinal, este foi imediatamente acondicionado em solução fria (aproximadamente 4°C) de RKHM, por aproximadamente vinte minutos. Em seguida, o jejuno foi aberto longitudinalmente seguindo a linha mesentérica e cortado em pequenos fragmentos consecutivos, os quais foram inseridos de forma adequada nas seis câmaras de difusão vertical tipo Franz e mantidos sob temperatura de 37±0,5°C (DEZANI et al., 2013a; HIDALGO et al., 1993).

Antes da inserção de cada fragmento de jejuno nas câmaras de difusão vertical tipo Franz, a viabilidade dos segmentos foi avaliada pela resistência elétrica transepitelial (TEER) com o uso do equipamento Millicel®-ERS (Millipore Corporation, MA, EUA). A faixa de valores adotada para o TEER foi de 70-110 $\Omega.cm^2$ antes dos experimentos. Ao final dos ensaios, os segmentos intestinais foram novamente avaliados por meio da medida de TEER e valores abaixo de 30 $\Omega.cm^2$ determinaram a exclusão da referida câmara do estudo (DEZANI et al., 2013a; LENNERNÄS; NYLANDER; UNGELL, 1997). Além do TEER, a avaliação da viabilidade dos segmentos intestinais foi complementada com o emprego de substâncias marcadoras de alta e de baixa permeabilidade metoprolol e ranitidina, respectivamente.

Após a verificação da resistência elétrica, os segmentos intestinais foram inseridos nas câmaras de difusão vertical tipo Franz, de modo a serem posicionados entre os compartimentos doadores e receptores. O sistema foi mantido por mais vinte minutos com o objetivo de equilibrar os segmentos intestinais com o equipamento a 37°C (DEZANI et al., 2013a; HIDALGO et al., 1993; LEGEN; SALOBIR; KERČ, 2005; ŽAKELJ; ŠTURM; KRISTL, 2006). Após o período de equilíbrio, todos os fármacos e marcadores utilizados nos estudos de permeabilidade foram solubilizados individualmente na solução de RKHM e o volume de 5 mL de cada solução final foi adicionado aos compartimentos doadores. A concentração adicionada para cada uma das substâncias foi de 40 µg /mL para estavudina, 300 µg/mL para lamivudina, 300 µg/mL para zidovudina, 100 µg/mL para metoprolol e 300 µg/mL para ranitidina. O início dos experimentos (*t=0*) foi

determinado a partir da adição das soluções contendo os fármacos/marcadores nos compartimentos doadores das câmaras de difusão vertical tipo Franz.

O borbulhamento de mistura de gases O_2 e CO_2 (95%: 5%) a um fluxo de 1 mL/min nos compartimentos doadores das câmaras permitiu a oxigenação dos segmentos intestinais durante todo o período do experimento, o que contribuiu também para a agitação da solução doadora. A agitação no compartimento receptor foi realizada por meio magnético a 50 rpm (DEZANI et al., 2013a).

Os estudos de permeabilidade por meio do modelo *ex vivo* em câmaras de difusão vertical tipo Franz foram realizados na direção apical-basolateral (A→B) e as amostras foram coletadas (1 mL) a partir dos compartimentos receptores em intervalos de tempo regulares (30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 minutos) seguidas da reposição de meio com solução RKHM 37°C pH 6,8 isenta de fármaco/marcador. Após as coletas, todas as amostras foram mantidas congeladas a -20°C até a quantificação realizada por cromatografia líquida previamente validada.

A determinação da permeabilidade aparente (Papp, em cm/s) de cada fármaco foi calculada pela Equação 6:

$$P_{app} = \frac{\Delta Q}{\Delta t} . \frac{1}{A} . \frac{1}{C_0}$$

Equação 6

onde: $\Delta Q / \Delta t$ representa o fluxo em μmol/min, ou seja, a quantidade de substância permeada através da membrana intestinal no tempo *t* , *A* corresponde à área da membrana disponível para a permeabilidade (0,20 cm^2), C_0 representa a concentração inicial do fármaco/marcador na solução doadora colocada em contato com a membrana (DEZANI et al., 2013a).

Todos os resultados de permeabilidade obtidos por meio dos modelos *in vitro* PAMPA e *ex vivo* com o emprego de câmaras de difusão vertical tipo Franz foram comparados estatisticamente utilizando ANOVA (análise de variância) e teste de Tukey. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $p<0,05$ (DEZANI et al., 2013a; REIS et al., 2013).

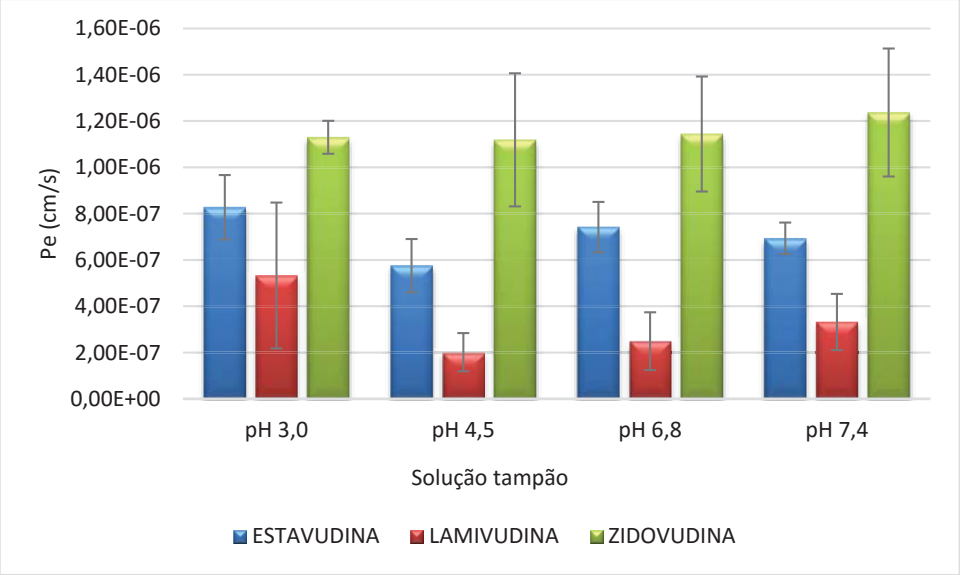
RESULTADOS E DISCUSSÕES

O transporte de fármacos por difusão passiva transcelular é o mecanismo mais comum e/ou predominantemente envolvido na permeabilidade de fármacos e representa um processo físico dependente do gradiente de concentração, ou seja, o fármaco tende a se difundir do lado mais concentrado para o lado menos concentrado com a finalidade de obter um equilíbrio entre os dois compartimentos sem que haja gasto de energia. Além disso, o transporte passivo transcelular pode ser afetado por diversas propriedades físico-químicas inerentes à molécula, tais como: lipofilicidade, capacidade de formar ligações de hidrogênio, p*K*a, peso molecular, área de superfície polar, dentre outras. Desta forma, a caracterização de um fármaco com relação às suas propriedades de permeabilidade permite, em alguns casos, realizar modificações estruturais com o objetivo de melhorar sua capacidade de absorção e, consequentemente, sua biodisponibilidade.

Estudo de permeabilidade por meio do modelo *in vitro* PAMPA

Para a avaliação da permeabilidade (*Pe*) da estavudina, lamivudina e zidovudina por meio do método PAMPA, foi considerado uma faixa fisiológica de pH nos compartimentos doadores, conforme descrito anteriormente. Fármacos que apresentam maior Pe em valores baixos de pH são de natureza ácida, enquanto que fármacos que apresentam maior Pe em valores elevados de pH são de natureza básica (KERNS et al., 2004). Os valores de Pe para cada um dos fármacos em função do pH estão apresentados na Figura 2.1.

Figura 2.1: Valores de permeabilidade (Pe) obtidos através do modelo *in vitro* PAMPA para os fármacos estavudina, lamivudina e zidovudina. As barras de erro representam os desvios padrão (DP) para cada substância em cada valor de pH (n=3).



Conforme demonstrado na Figura 2.1 é possível observar que os fármacos lamivudina, estavudina, zidovudina apresentaram perfis de Pe semelhantes em pH distintos (3,0, 4,5, 6,8 e 7,4), o que foi constatado por meio da análise estatística. Assim, alterações de pH ao longo do trato gastrintestinal não representam diferenças na capacidade de permeabilidade dos referidos fármacos, ou seja, os resultados sugerem que o pH não se apresenta como fator limitante à absorção dos mesmos ($p>0,05$ – não apresentou diferença estatística significativa entre os valores de Pe). Este dado indica, portanto, que a permeabilidade da lamivudina, por meio do mecanismo de transporte passivo transcelular, constatou-se diminuída que corrobora com mecanismo de permeação paracelular e/ou mediador por carreador, conforme apresentado por Reis e colaboradores ao que se refere a lamivudina e baseados nos resultados apresentados, tal comportamento pode ser estendido para os demais fármacos (REIS et al., 2013).

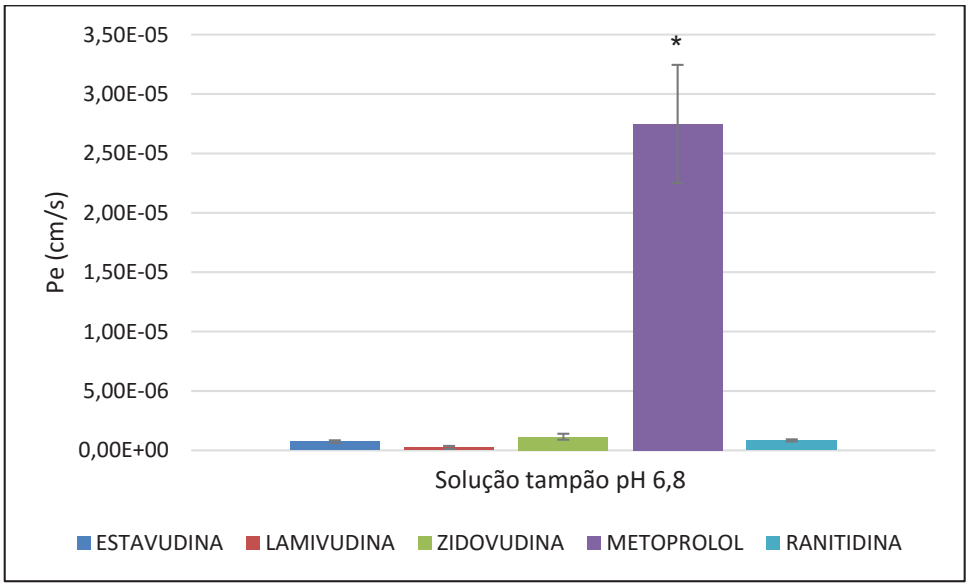
A estavudina, lamivudina e zidovudina são fármacos de natureza hidrofílica e de baixo peso molecular (224, 229 e 267 g/mol, respectivamente) (BENET; BROCCATELLI; OPREA, 2011). De acordo com estudos publicados na literatura, estes três fármacos antirretrovirais apresentam de moderada a alta permeabilidade,

ou seja, a necessidade de compreender os mecanismos envolvidos no transporte dos referidos fármacos permite verificar o envolvimento de diferentes vias de transporte que não o transporte passivo transcelular, tais como: transporte passivo paracelular e transporte ativo mediado por carreadores (ALT et al., 2004; DE SOUZA et al., 2009; DEZANI et al., 2016; MASUNGI et al., 2008). A Tabela 2.1 apresenta os valores médios de Pe em função do pH das soluções tampão empregadas nos ensaios em PAMPA e a Figura 2.2 representa graficamente os resultados de Pe no pH 6,8, o qual é relevante para a absorção *in vivo* dos referidos fármacos.

Tabela 2.1: Valores médios de permeabilidade (Pe) e respectivos desvios padrão (DP) obtidos a partir dos experimentos realizados em modelo *in vitro* PAMPA para os fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina. Também são apresentados os resultados de Pe e de DP referentes aos marcadores de alta e de baixa permeabilidade metoprolol e ranitidina, respectivamente.

	Pe ± DP (x 10^{-6} cm/s)			
Fármaco ou Marcador	**pH 3,0**	**pH 4,5**	**pH 6,8**	**pH 7,4**
Metoprolol	27,01±4,19	30,74±6,04	27,48±4.98	56,61±4,80
Ranitidina	1,86±0,43	3,31±0,30	0,84±0,09	5,25±0,49
Estavudina	0,83±0,14	0,58±0,12	0,74±0,11	0,69±0,07
Lamivudina	0,53±0,32	0,20±0,08	0,25±0,12	0,33±0,12
Zidovudina	1,13±0,08	1,12±0,29	1,14±0,25	1,24±0,27

Figura 2.2: Perfis de permeabilidade (Pe) obtidos através do modelo *in vitro* PAMPA em pH 6,8 para os fármacos estavudina, lamivudina e zidovudina e para os marcadores de alta e de baixa permeabilidade metoprolol e ranitidina, respectivamente. As barras de erro representam os desvios padrão (DP) para cada substância (n=3). A análise estatística dos resultados mostrou diferença significativa (*$p<0,05$) entre metoprolol e as demais substâncias utilizadas no estudo.



Conforme apresentado na Tabela 2.1, o metoprolol foi a substância que apresentou o maior valor de Pe em todos os valores de pH em comparação com os demais fármacos. Tal resultado é esperado, uma vez que o metoprolol foi escolhido neste estudo como o marcador de alta permeabilidade. Muitos estudos na literatura afirmam que o metoprolol é transportado por transporte passivo transcelular. Além disso, é importante ressaltar que este fármaco é recomendado pela FDA como padrão de alta permeabilidade a ser utilizado nos estudos de transporte de fármacos (CDER/FDA, 2000).

O uso do metoprolol como marcador de alta permeabilidade é discutível. De acordo com alguns trabalhos publicados, esta substância apresenta fração absorvida muito elevada (em torno de 95%), o que pode ser a causa da divergência de resultados relacionados à classificação biofarmacêutica de alguns fármacos. Em outras palavras, fármacos que apresentam alto valor de fração absorvida (acima de

90% estabelecido pelo FDA) podem ter sido enganosamente classificados como sendo de baixa permeabilidade, uma vez que apresentam resultados abaixo dos apresentados pelo metoprolol por outros métodos. Além disso, classificações biofarmacêuticas podem ter sido estabelecidas para fármacos que apresentam outros mecanismos como transporte mediado por carreadores de influxo ou por via paracelular (LARREGIEU; BENET, 2013).

O metoprolol apresenta dois valores de p*K*a (9,6 e 14,1) esse fenômeno explica a elevação da permeabilidade no pH (7,4) devido à proximidade dos valores de pKa e assim possibilitando uma alteração na concentração da forma iônica da molécula. Os altos valores de Pe obtidos para o metoprolol indicam ainda que as condições adotadas para o presente estudo foram adequadas, e a integridade e funcionalidade do sistema foi posteriormente confirmado com o uso dos corantes amarelo lúcifer e azul de cresil brilhante.

Com relação aos resultados referentes ao marcador de baixa permeabilidade ranitidina, a Tabela 2.1 mostrou que esta substância apresentou valores de Pe bem inferiores ao metoprolol. Além disso, os resultados de Pe da ranitidina apresentaram-se variáveis de acordo com o pH da solução tampão empregada nos estudos de permeabilidade em PAMPA, sendo este marcador classificado como classe III do SCB.

A ranitidina apresenta dois valores de p*K*a (8,2 e 2,7), o que pode também explicar o fato da grande variação da sua permeabilidade em diferentes valores de pH empregados no presente estudo, fato que foi observado em experimento semelhante realizado por Reis em 2013 (REIS et al., 2013). Esse fenômeno explica a elevação da permeabilidade nos respectivos pH (3,0 e 7,4) devido à proximidade dos valores de pKa e assim possibilitando uma alteração na concentração da forma iônica da molécula. É importante ressaltar que, o transporte passivo transcelular ocorre preferencialmente quando a substância se apresenta na forma molecular, ou seja, sem cargas. Apesar de que os valores encontrados no presente trabalho corroborem para esta afirmação, ressalta-se que o fenômeno da camada de agua estacionária também pode ser responsável por variações na permeabilidade. Portanto, além do pKa a lipofilicidade torna-se de grande importância no processo de permeabilidade (AVDEEF, 2003; LENNERNÄS, 1998; REIS; SINKÓ; SERRA, 2010)

Contudo, outros estudos devem ser aplicados à ranitidina, a qual demonstra alguns dados controversos e incompletos na literatura referentes ao processo de absorção predominantemente paracelular (KORTEJÄRVI et al., 2005).

De acordo com a Figura 2.2, os resultados de Pe dos fármacos antirretrovirais apresentaram-se muito abaixo dos resultados do metoprolol e próximos aos resultados da ranitidina. Parâmetros relacionados aos ensaios em PAMPA podem influenciar de maneira significativa a obtenção de resultados de permeabilidade. Um exemplo a ser citado é o uso de solventes orgânicos utilizados na impregnação da membrana lipídica, o que pode ocasionar a retenção de alguns fármacos (CHEN, 2008).

Além das características da constituição da membrana e do tempo de ensaio, é importante ressaltar a influência na permeabilidade causada pelas características intrínsecas das moléculas. Esta influência é determinada principalmente pelas propriedades físico-químicas, dentre as quais destacam-se a lipofilicidade, p*K*a, peso molecular, volume molecular, número de ligações de hidrogênio e área de superfície polar (REYNOLDS et al., 2009).

A análise dos resultados em pH 6,8 (Figura 2.2) demonstrou que as condições adotadas para os estudos de permeabilidade em PAMPA foram adequadas para determinar o alto transporte observado para o metoprolol, uma vez que este fármaco é exclusivamente transportado por difusão passiva transcelular. No entanto, os valores obtidos pelo método em PAMPA devem ser cuidadosamente considerados, uma vez que muitos fármacos apresentam diferentes mecanismos de transporte de fármacos. Além disso, o longo tempo de experimento de 15 horas e a composição da membrana lipídica empregada podem interferir nos dados obtidos. Assim, existe a necessidade de padronização no preparo das membranas artificiais utilizadas em PAMPA com a finalidade de evitar ou minimizar tais problemas e garantir a obtenção de dados mais consistentes. A Tabela 2.2 apresenta a comparação dos dados obtidos no presente trabalho e os resultados originários do levantamento bibliográfico para ensaios em PAMPA.

Tabela 2.2: Resultados de permeabilidade (Pe) e respectivos desvios padrão (DP) obtidos por meio dos ensaios em modelo *in vitro* PAMPA descritos no presente trabalho para pH 6,8 e resultados de permeabilidade em PAMPA obtidos da literatura.

Substância	**Pe ± DP (x 10^{-6} cm/s) obtidos no presente estudo**	**Pe ± DP (x 10^{-6} cm/s) obtidos da literatura**
	pH 6,8	
Metoprolol	27,48±4,98	4,29±0,25[J] 153±18[l]
Ranitidina	0,84±0,09	0,45±0,06[J] 2,28±0,11[h] 0,2±0,3[l]
Estavudina	0,74±0,11	--------
Lamivudina	0,25±0,12	1,45±0,33[h]
Zidovudina	1,14±0,25	2,5± 0,8[l]

(h) (REIS et al., 2013); (j) (CHEN et al., 2007); (l) (GALINIS-LUCIANI; NGUYEN; YAZDANIAN, 2007).

Conforme apresentado na Tabela 2.2, os resultados de permeabilidade em PAMPA para o fármaco estavudina não foram encontrados na literatura. A comparação de resultados referentes à lamivudina demonstrou uma divergência dos valores, o que pode ser justificado pela diferença na composição da membrana utilizada (10% lecitina de ovo e 5% colesterol) (REIS et al., 2013). A composição lipídica é de suma importância, pois promove interações diferenciadas entre fármaco e a membrana, o que requer a padronização da técnica com finalidade de evitar a divergência de resultados.

Apesar dos valores encontrados serem diferentes daqueles descritos na literatura, tanto para os fármacos antirretrovirais, quanto para os marcadores,

observou-se o mesmo comportamento das substâncias quando comparados entre si, ou seja, o método empregado possui a capacidade de diferenciar entre alta permeabilidade e baixa permeabilidade. Da mesma forma, os fármacos antirretrovirais apresentaram o mesmo desempenho de permeabilidade, quando comparados com os valores obtidos da literatura.

Conforme mencionado anteriormente, após a realização dos estudos de permeabilidade em PAMPA, as membranas lipídicas tiveram sua integridade verificada com o uso de corantes amarelo lúcifer e azul de cresil brilhante (marcador negativo e positivo, respectivamente) com a finalidade de assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos. A intensidade do amarelo lucífer foi verificada por fluorescência, enquanto que a intensidade da coloração promovida pelo azul de cresil brilhante foi realizada por leitura visual. A Figura 2.3 demonstra a placa contendo o azul de cresil brilhante (à esquerda) e o amarelo lucífer (à direita).

Figura 2.3: Imagens obtidas após o período de incubação de 4 horas para a determinação da integridade de membrana artificial PAMPA. O controle positivo foi realizado com o corante azul de cresil brilhante (imagem à esquerda) e o controle negativo com amarelo lúcifer (imagem à direita).

Com base na Figura 2.3, pode-se observar a presença de azul de cresil brilhante na placa doadora e na placa receptora, o que indica a não obstrução da membrana lipídica, ou seja, a presença do azul de cresil brilhante é esperada na placa receptora. Já o amarelo lúcifer permaneceu na placa doadora por ser o marcador negativo de integridade, o que indicou a ausência de falhas na impregnação da membrana lipídica nos filtros das placas. Assim, a maior concentração de amarelo lúcifer foi constatada na placa doadora, o que indicou a integridade da membrana lipídica utilizada nos experimentos. Ressalta-se ainda que a determinação de amarelo lucífer foi realizada por espectrofotometria com detecção em fluorescência e não foi obtida diferença menor que 10000 UF (unidades de fluorescência) entre as placas doadora e receptora.

Para a avaliação da permeabilidade, o PAMPA representa um método rápido e de fácil execução, pois permite a realização de uma série de ensaios com diferentes fármacos em diferentes condições como variação da composição e pH das soluções tampão utilizadas, conforme apresentado no presente estudo. A ampla utilização deste método permite, ainda, auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos e/ou novas formulações quando a influência de excipientes é investigada.

Entretanto, neste modelo é possível apenas verificar a influência do transporte passivo transcelular, uma vez que o PAMPA não apresenta transportadores e nem espaços paracelulares. Isso não necessariamente representa uma desvantagem, pois é possível verificar se o transporte passivo transcelular representa o principal mecanismo de transporte de determinado fármaco.

Com base no exposto, ensaios de permeabilidade realizados em PAMPA são capazes de predizer o comportamento do fármaco mediante a camada lipídica dos enterócitos, representada neste modelo pela membrana artificial paralela. No entanto, apenas demonstram a capacidade do fármaco em transpor passivamente a membrana, ou seja, demostram apenas a via transcelular passiva. Assim os fármacos estudados apresentam pequena permeabilidade via transcelular passiva quando comparados com os marcadores de permeabilidade (ranitidina e metoprolol) (PRETORIUS; BOUIC, 2009; QUEVEDO; BRIÑÓN, 2009). Outros mecanismos de transporte de fármacos podem ser, então, verificados por meio do

emprego de outros modelos utilizados para o estudo de permeabilidade, como aqueles que utilizam membranas intestinais isoladas em câmaras de difusão vertical tipo Franz.

Estudo de permeabilidade por meio do modelo *ex vivo* em câmaras de difusão vertical tipo Franz

O modelo *ex vivo* em câmaras de difusão vertical tipo Franz utilizando segmentos intestinais de ratos apresenta como grande vantagem a presença de transportadores de influxo e de efluxo, os quais são extremamente relevantes nos processos de permeabilidade de fármacos que são seus substratos em potencial. Além disso, a presença de espaço paracelular permite obter resultados de permeabilidade de fármacos hidrofílicos com baixo peso molecular (DEZANI et al., 2013a; REIS et al., 2013).

Os estudos de permeabilidade em câmaras de difusão vertical tipo Franz foram realizados com o emprego de segmentos intestinais de ratos Wistar na diração A→B, ou seja, direção natural de absorção de fármacos. A Tabela 2.3 apresenta os valores de permeabilidade aparente (Papp) obtidos para os fármacos estavudina, lamivudina e zidovudina e para os marcadores de alta e baixa permeabilidade metoprolol e ranitidina, respectivamente.

Tabela 2.3: Resultados de permeabilidade aparente (Papp) no sentido A→B e seus respectivos valores de desvio padrão (DP) referentes aos ensaios de permeabilidade em modelo *ex vivo* em câmaras de difusão vertical tipo Franz para os fármacos estavudina, lamivudina e zidovudina e os marcadores de alta e de baixa permeabilidade metoprolol e ranitidina, respectivamente. Os valores representam a média de seis determinações (n=6).

	Papp ± DP (x 10^{-6} cm/s)				
Direção do estudo	**Estavudina**	**Lamivudina**	**Zidovudina**	**Metoprolol**	**Ranitidina**
A→ B	15,6±0,32	12,6±0,27	25,4±0,49	32,9±0,28	11,8±0,27

Conforme apresentado na Tabela 2.3, os valores de Papp referentes aos marcadores de alta e de baixa permeabilidade, metoprolol e ranitidina, indicam que o modelo aqui desenvolvido para o estudo de permeabilidade em câmaras de difusão vertical tipo Franz foi capaz de determinar a diferença entre os marcadores de alta e baixa permeabilidade. A Tabela 2.4 apresenta os resultados de Papp obtidos no presente estudo por meio do modelo *ex vivo* em câmaras de difusão vertical tipo Franz e os resultados encontrados na literatura para cada uma das substâncias avaliadas.

Tabela 2.4: Resultados de permeabilidade aparente (Papp) e desvios padrão (DP) obtidos por meio do modelo *ex vivo* em câmaras de difusão vertical tipo Franz e dados obtidos da literatura para os fármacos do presente trabalho

Fármaco/marcador	Papp ± DP em câmaras de difusão vertical tipo Franz (x 10^{-5} cm/s) obtidos no presente estudo	Permeabilidade ± DP (x 10^{-5} cm/s) obtidos da literatura
pH 6,8 / A→B		
Metoprolol	3,29±0,28	79,9±6,0[a*] 2,4[b***] 3,37[d**] 5,32±0,54[i****] 15,2[f****]
Ranitidina	1,18±0,27	1,75±0,759[k****]
Estavudina	1,56±0,32	0,45[g**] 3,96±0,47[i****]
Lamivudina	1,26±0,27	45,8±5,2[a*] 0,01[c**] 3,08±0,26[i****]
Zidovudina	2,54±0,49	53,4±5,6[a*] 0,2[c**] 6,14[e**] 4,17±0,43[i****]

* *Permeabilidade* ex vivo *(câmaras de difusão vertical tipo Franz)*

** *Permeabilidade* in vitro *(modelos celulares)*

*** *Permeabilidade* ex vivo *(Ussing chamber)*

****Permeabilidade* in situ *(perfusão intestinal)*

(a) (DEZANI et al., 2013a)*; (b)*(WATANABE; TAKAHASHI; HAYASHI, 2004)*; (c)* (DE SOUZA et al., 2009)*; (d)* (UCHIDA et al., 2009)*; (e)* (DE SOUZA et al., 2009)*; (f)* (MASAOKA et al., 2006)*; (g)* (SICCARDI et al., 2003)*; (i)* (DEZANI et al., 2016)*; (k)* (ESCRIBANO et al., 2012).

A comparação entre os resultados obtidos no presente estudo e os valores reportados na literatura (Tabela 2.4) mostraram que a lamivudina apresentou o menor valor de permeabilidade, seguida pela estavudina e pela zidovudina. Esta observação fica mais evidente quando os resultados em câmaras de difusão vertical tipo Franz, obtidos no presente estudo, são comparados com os resultados obtidos por meio do modelo de perfusão *in situ* publicados por Dezani e colaboradores (2016). Assim, foi possível verificar que as condições empregadas nos ensaios *ex vivo* permitiu a obtenção de resultados coerentes em comparação com dados disponíveis na literatura (DEZANI et al., 2016). Os ensaios *in situ* fornecem dados com maiores informações sobre a permeabilidade de fármacos por apresentarem de forma mais consistente a maioria dos mecanismos de transporte, também presente no processo *in vivo* em humanos.

Embora o modelo de perfusão *in situ* seja considerado o mais próximo das condições *in vivo*, sua aplicação nos estudos de permeabilidade acaba sendo limitada em razão da necessidade de utilizar um número maior de animais para obter significância estatística. Por outro lado, os ensaios *ex vivo* com o emprego de câmaras de difusão vertical tipo Franz apresentam a grande vantagem de permitir o emprego de segmentos intestinais provenientes do mesmo animal, ou seja, o segmento de jejuno selecionado para o estudo proveniente de um animal pode ser utilizado para compor o tamanho amostral de seis animais por ensaio (n=6), tal como realizado no presente estudo, o que reduz a variabilidade interindividual entre os resultados e permite a aquisição de resultados mais coerentes.

Os resultados de permeabilidade aparente apresentados por Dezani e colaboradores (2013) mostraram alguns descordos em relação aos resultados de Papp do presente estudo. Embora o mesmo modelo *ex vivo* com emprego de câmaras de difusão vertical tipo Franz tenha sido utilizado em ambos os casos, algumas diferenças entre os dois protocolos de estudo podem ser apontadas como fatores que causaram a influência nos resultados do metoprolol, lamivudina e zidovudina. Algumas das divergências relacionadas aos experimentos incluem: composição do meio de transporte utilizado (ausência de HEPES) e velocidade da agitação magnética empregada nos compartimentos receptores. Diferentemente, no presente estudo empregou-se como meio o tampão HEPES e a velocidade da agitação magnética empregada nos compartimentos receptores foi de 50 rpm.

Assim, a velocidade de agitação magnética (200 rpm) empregada no estudo conduzido por Dezani e colaboradores (2013) está diretamente relacionada à remoção da camada de água estacionaria no compartimento receptor, o que dependendo das propriedades físico-químicas da substância, poderá induzir ou reduzir a passagem das substâncias através da membrana intestinal e o valor de permeabilidade, especialmente de fármacos que são predominantemente transportados por difusão passiva transcelular como o metoprolol.

Conforme pode ser constado na Tabela 2.4 A agitação magnética empregada no presente estudo (50 rpm) permitiu a obtenção de resultados mais próximos do modelo de perfusão *in situ* com a vantagem de não requerer um número grande de animais, e ainda, apresentar maior facilidade na execução dos experimentos.

Quanto à diferença na composição do meio de transporte, a ausência de HEPES no estudo descrito por Dezani e colaboradores (2013) pode estar relacionada à diminuição da viabilidade do tecido intestinal. Assim, a execução dos experimentos descritos no presente trabalho envolveu o uso de HEPES na composição do meio de transporte utilizado, o que permitiu prolongar a viabilidade dos tecidos com o propósito de obter resultados mais precisos e exatos com menor variação. Esta constatação foi feita com base nos resultados de Papp dos marcadores metoprolol e ranitidina, obtidos no presente trabalho.

Além disso, foi observada uma menor diferença entre os valores de TEER mensurados antes e após os experimentos em comparação com os estudos realizados por Dezani e colaboradores (2013) e outros estudos que envolveram cultura celular para a determinação da permeabilidade (DAVIES et al., 2008; DEZANI et al., 2013a; HOSOYA; TOMI, 2008; MOTZ et al., 2007). Ressalta-se que há carências na literatura em relação a padronização do valor de TEER para membrana intestinal (DEZANI et al., 2013a). A Tabela 2.5 mostra os valores de TEER obtidos para cada substância empregada no presente estudo em modelo *ex vivo* com o emprego de câmaras de difusão vertical tipo Franz.

Tabela 2.5: Valores de TEER referentes aos ensaios de permeabilidade para os fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina e para os marcadores metoprolol e ranitidina por meio do método *ex vivo* em câmaras de difusão vertical tipo Franz. As medições foram realizadas antes do início (I) e após os experimentos (F).

	Estavudina Ω.cm²		**Lamivudina Ω.cm²**		**Zidovudina Ω.cm²**		**Metoprolol Ω.cm²**		**Ranitidina Ω.cm²**	
Exp	**I**	**F**	**I**	**F**	**I**	**F**	**I**	**F**	**I**	**F**
1	81	75	83	71	75	60	74	67	73	60
2	83	69	87	69	78	75	77	70	71	68
3	75	69	75	71	81	75	66	60	73	68
4	78	72	81	72	81	71	81	71	71	68
5	81	72	84	75	78	66	72	63	69	65
6	84	75	75	69	80	69	81	69	79	75

Conforme apresentado na Tabela 2.5, os valores de TEER referentes a cada segmento intestinal utilizado não sofreram grandes variações, o que permitiu verificar a viabilidade da condução do ensaio de permeabilidade em segmento intestinal, e portanto, os resultados de Papp foram considerados. Em todos os casos, os valores de TEER mantiveram-se dentro da faixa de valores considerada adequada para o presente estudo, ou seja, os valores mantiveram-se entre 70-110 $\Omega.cm^2$ antes dos experimentos e acima de 30 $\Omega.cm^2$ após os experimentos. Os valores aceitáveis foram definidos com a finalidade de garantir a integridade da membrana durante todo o período de ensaio, conforme já descrito anteriormente.

A importância dos valores de TEER para os ensaios de permeabilidade por meio do método *ex vivo* com o uso de segmentos intestinais e métodos *in vitro* com uso de culturas celulares deve ser considerado, uma vez que tal medida é capaz de indicar a integralidade da membrana. A padronização da faixa de valores de TEER para o presente estudo (70-110 $\Omega.cm^2$) foi estabelecida com a finalidade de uniformizar as condições dos ensaios, uma vez que a integridade da membrana é

fator relevante para a obtenção dos resultados de permeabilidade. Menon e Barr (2003) determinaram valores de TEER entre 74,0±18 Ω.cm² e 82,0±12 Ω.cm², enquanto que Mineo e colaboradores (2002) e Thomas e colaboradores (2006) estabeleceram valores de TEER de 123,9±3,5 Ω.cm² e de 125,0±27,7 Ω.cm², respectivamente. Assim, a faixa proposta no presente estudo está de acordo com os trabalhos descritos anteriormente (DEZANI et al., 2013a; MENON; BARR, 2003; MINEO; HARA; SHIGEMATSU, 2002).

Os dados obtidos no presente estudo demonstraram a viabilidade dos tecidos utilizados (baseado na capacidade demostrada pelos marcadores). A faixa de valores de TEER apresentada na Tabela 2.5 indicou que a utilização do meio RKHM e da oxigenação com a mistura de 95% de gás oxigênio e 5% de gás carbônico permitiram manter as condições adequadas do tecido intestinal para os ensaios de permeabilidade. Ressalta-se ainda que a pouca variação obtida nas medições de TEER indica uma melhor estabilidade da integridade do segmento intestinal.

Método *in vitro* PAMPA *versus* método *ex vivo* em câmaras de difusão vertical tipo Franz

Muito é discutido sobre qual método é o mais adequado para a avaliação da permeabilidade intestinal. O modelo *in vitro* PAMPA tem sido amplamente utilizado nas etapas de desenvolvimento de novos fármacos e para a caracterização do transporte passivo de alguns fármacos, visto que este mecanismo constitui a principal ou predominante rota para a absorção da maioria dos fármacos. Assim, os estudos de permeabilidade de fármacos neste modelo demonstram o transporte passivo transcelular dos fármacos estudados.

Como o processo de absorção é complexo e envolve um ou mais mecanismos de permeabilidade, a associação de PAMPA com outro modelo capaz de permitir a avaliação dos outros mecanismos é recomendada. Assim, o emprego do modelo *ex vivo* com o uso das câmaras de difusão vertical tipo Franz permite avaliar a interação dos fármacos com o segmento intestinal proveniente de ratos.

Os resultados de permeabilidade obtidos por meio dos modelos, *in vitro* PAMPA e do *ex vivo* em câmaras de difusão vertical tipo Franz mostraram-se próximos em relação ao metoprolol (Tabela 2.2 e Tabela 2.3) fármaco cuja a permeabilidade se dá por meio do transporte passivo transcelular (ANNAERT et al., 2010; DIXIT; JAIN; RAJPOOT, 2012; INCECAYIR; TSUME; AMIDON, 2013). Em relação aos fármacos antirretrovirais, observou-se que apresar dos valores absolutos de permeabilidade, dos dois modelos empregados, serem diferentes, a zidovudina apresentou valores de permeabilidade superiores seguido pela estavudina e lamivudina, ou seja, a zidovudina é o fármaco que apresenta maior permeação seguido pela estavudina, ambos conhecidamente pertencentes à classe I do BCS (SILVA et al., 2012; SOARES et al., 2013). Porém, diferenças entre os dois modelos indicam que outros mecanismos, além do transporte passivo, podem estar envolvidos nos processos de permeabilidade dos antirretrovirais.

Tais mecanismos podem ser avaliados por meio do uso de diferentes modelos que expressam tais carreadores e os espaços paracelulares, tais como modelos que empregam segmentos intestinais em câmaras de difusão tipo Franz.

A lamivudina, atualmente pertencente à classe I no SCB (WHO, 2005), apresentou valores de permeabilidade limítrofes no modelo *ex vivo* em câmaras de difusão verticais tipo Franz, conforme descrito por Lindenberg, Koop e Dressman (2004), o que dificulta o estabelecimento da sua classificação pelo SCB (LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004).

É importante ressaltar que, visto a avaliação da permeabilidade por estes dois distintos métodos, é possível realizar uma classificação primária do mecanismo envolvido. Conforme apresentado por Kansy e colaboradores (1998) e por diversos autores posteriormente, o modelo de PAMPA para estudos de permeabilidade possui apenas a capacidade de expressar o transporte passivo transcelular, de forma que a comparação dos resultados obtidos em ambos os métodos sugere que outros mecanismos de permeabilidade estejam envolvidos no transporte dos fármacos antirretrovirais, o que não foram devidamente observados no modelo *in vitro* em PAMPA. Entretanto, este modelo possui uma grande capacidade de triagem (seleção) inicial para fármacos em desenvolvimento em virtude de suas vantagens de aplicação (KANSY; SENNER; GUBERNATOR, 1998; REIS et al., 2013; REIS; SINKÓ; SERRA, 2010).

CONCLUSÃO

Nos ensaios realizados em modelo PAMPA, o metoprolol (marcador de alta permeabilidade) apresentou elevada Pe em todos os meios de diferentes valores de pH, em comparação com as demais substâncias estudadas. Este fato deve-se ao mecanismo de transporte predominante apresentado por este marcador (transporte passivo transcelular). Em contrapartida, a ranitidina (marcador de baixa permeabilidade) apresentou baixo valor de Pe e grande variabilidade nos resultados. Com base nisso, foi possível avaliar a permeabilidade dos fármacos antirretrovirais e, assim, obter resultados que auxiliassem na elucidação dos seus respectivos mecanismos de transporte. Desta forma, os antirretrovirais apresentaram valores de Pe mais próximos ao resultado do marcador de baixa permeabilidade.

Os estudos de permeabilidade realizados por meio do modelo *ex vivo* com uso de câmaras de difusão vertical tipo Franz mostraram que os resultados de permeabilidade obtidos para os fármacos antirretrovirais se assemelham ao resultado apresentado pelo marcador de alta permeabilidade. Porém, os valores obtidos para os antirretrovirais se distanciaram do resultado apresentado pelo marcador de baixa permeabilidade. Estas observações são condizentes com dados relatados na literatura em relação aos estudos *in vivo* em seres humanos.

Assim, com base nos resultados obtidos por meio dos modelos *in vitro* (PAMPA) e *ex vivo* (câmaras de difusão vertical tipo Franz), é possível sugerir que os fármacos antirretrovirais não apresentam a via transcelular passiva como principal mecanismo de transporte. Portanto, outras vias de permeação, como a via transcelular ativa mediada por carreadores e a via passiva paracelular, podem estar envolvidos no processo de permeabilidade destes fármacos.

REFERÊNCIAS

ALT, A. et al. Biopharmaceutical characterization of sotalol-containing oral immediate release drug products. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 58, n. 1, p. 145–150, 2004.

AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. Pharmaceutical research, v. 12, n. 3, p. 413–420, 1995.

ANNAERT, P. et al. Ex vivo permeability experiments in excised rat intestinal tissue and in vitro solubility measurements in aspirated human intestinal fluids support age-dependent oral drug absorption. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 39, n. 1–3, p. 15–22, 2010.

ANVISA/BRASIL. Resolução - RDC n. 37, de 3 de agosto de 2011. [s.l: s.n.].

AVDEEF, A. Absorption and Drug Development:solubility, permeability and charge state. 1st. ed. Hoboken, New Jersey: Wiley Interscience, 2003.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S.; MORRISON, R. A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, v. 44, n. 1, p. 301–312, 2000.

BENET, L. Z.; BROCCATELLI, F.; OPREA, T. I. BDDCS Applied to Over 900 Drugs. The AAPS Journal, v. 13, n. 4, p. 519–547, 2011.

BOHETS, H. et al. Strategies for absorption screening in drug discovery and development. Current topics in medicinal chemistry, v. 1, n. 5, p. 367–383, 2001.

BUCKLEY, S. T. et al. In vitro models to evaluate the permeability of poorly soluble drug entities: Challenges and perspectives. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 45, n. 3, p. 235–250, 2012.

CDER/FDA. Guidance for Industry waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. Center for Drug Evaluation and Research, n. August, 2000.

CHECA, A. et al. Fast determination of pKa values of reverse transcriptase inhibitor drugs for AIDS treatment by using pH-gradient flow-injection analysis and multivariate curve resolution. Analytica Chimica Acta, v. 554, n. 1–2, p. 177–183, 2005.

CHEN, M. L. Lipid excipients and delivery systems for pharmaceutical development: A regulatory perspective. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 60, n. 6, p. 768–777, 2008.

CHEN, X. et al. A novel design of artificial membrane for improving the PAMPA model. Pharmaceutical Research, v. 25, n. 7, p. 1511–1520, 2007.

DAVIES, S. L. et al. Extracellular calcium- and magnesium-mediated regulation of passive calcium transport across Caco-2 monolayers. Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes, v. 1778, n. 10, p. 2318–2324, 2008.

DE SOUZA, J. et al. Comparison of bidirectional lamivudine and zidovudine transport using MDCK, MDCK-MDR1, and Caco-2 cell monolayers. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 98, n. 11, p. 4413–4419, 2009.

DEFERME, S.; ANNAERT, P.; AUGUSTIJNS, P. In Vitro Screening Models to Assess and Metabolism. In: Drug Absorption Studies: In Situ, In Vitro and In Silico Models. [s.l: s.n.]. p. 182–215.

DEZANI, A. B. et al. Determination of lamivudine and zidovudine permeability using a different ex vivo method in Franz cells. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, v. 67, n. 3, p. 194–202, 2013.

DEZANI, T. M. et al. Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) and prediction of fraction absorbed and permeability in humans: A study with antiretroviral drugs. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 104, p. 131–139, 2016.

DIXIT, P.; JAIN, D. K.; RAJPOOT, J. S. Differential effect of oxidative stress on intestinal apparent permeability of drugs transported by paracellular and transcellular route. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, v. 37, n. 3, p. 203–209, 2012.

ESCRIBANO, E. et al. Single-pass intestinal perfusion to establish the intestinal permeability of model drugs in mouse. International Journal of Pharmaceutics, v. 436, n. 1–2, p. 472–477, 2012.

GALINIS-LUCIANI, D.; NGUYEN, L.; YAZDANIAN, M. Is PAMPA a useful tool for discovery? Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 96, n. 11, p. 2886–2892, 2007.

GRASS, G. M. Simulation models to predict oral drug absorption from in vitro data. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 23, n. 1–3, p. 199–219, 1997.

HERAI, H. et al. Doxorubicin skin penetration from monoolein-containing propylene glycol formulations. International Journal of Pharmaceutics, v. 329, n. 1–2, p. 88–93, 2007.

HIDALGO, I. J. et al. pH-dependent transepithelial transport of cephalexin in rabbit intestinal mucosa. International Journal of Pharmaceutics, v. 98, n. 1–3, p. 83–92, 1993.

HOSOYA, K.; TOMI, M. Inner Blood—Retinal Barrier: Transport Biology and Methodology. In: Drug Absorption Studies. Boston, MA: Springer US, 2008. p. 321–338.

INCECAYIR, T.; TSUME, Y.; AMIDON, G. L. Comparison of the permeability of metoprolol and labetalol in rat, mouse, and caco-2 cells: Use as a reference standard for BCS classification. Molecular Pharmaceutics, v. 10, n. 3, p. 958–966, 2013.

JAIN, R. et al. Intestinal absorption of novel-dipeptide prodrugs of saquinavir in rats. International Journal of Pharmaceutics, v. 336, n. 2, p. 233–240, 2007.

JUNIOR, J. B. S. et al. Evaluating Potential P-gp Substrates : Main Aspects to Choose the Adequate Permeability Model for Assessing Gastrointestinal Drug Absorption. Mini reviews in medicinal chemistry, v. 15, n. 10, p. 858–871, 2015.

KANSY, M.; SENNER, F.; GUBERNATOR, K. Physicochemical high throughput screening: Parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. Journal of Medicinal Chemistry, v. 41, n. 7, p. 1007–1010, 1998.

KERNS, E. H. et al. Combined application of parallel artificial membrane permeability assay and Caco-2 permeability assays in drug discovery. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 93, n. 6, p. 1440–1453, 2004.

KIM, J. S. et al. The suitability of an in situ perfusion model for permeability determinations: Utility for BCS class I biowaiver requests. Molecular Pharmaceutics, v. 3, n. 6, p. 686–694, 2006.

KORTEJÄRVI, H. et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Ranitidine hydrochloride. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 94, n. 8, p. 1617–1625, 2005.

LANGGUTH, P. et al. Intestinal absorption of the quaternary trospium chloride: Permeability- lowering factors and bioavailabilities for oral dosage forms. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 43, n. 3, p. 265–272, 1997.

LARREGIEU, C. A; BENET, L. Z. Drug discovery and regulatory considerations for improving in silico and in vitro predictions that use Caco-2 as a surrogate for human intestinal permeability measurements. The AAPS journal, v. 15, n. 2, p. 483–97, 2013.

LEGEN, I.; SALOBIR, M.; KERČ, J. Comparison of different intestinal epithelia as models for absorption enhancement studies. International Journal of Pharmaceutics, v. 291, n. 1–2, p. 183–188, 2005.

LENNERNÄS, H. Human intestinal permeability. Journal of pharmaceutical sciences, v. 87, n. 4, p. 403–410, 1998.

LENNERNÄS, H.; NYLANDER, S.; UNGELL, A. L. Jejunal permeability: A comparison between the ussing chamber technique and the Single-Pass perfusion in humansPharmaceutical Research, 1997.

LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J. B. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 58, n. 2, p. 265–278, 2004.

MASAOKA, Y. et al. Site of drug absorption after oral administration: Assessment of membrane permeability and luminal concentration of drugs in each segment of gastrointestinal tract. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 29, n. 3–4 SPEC. ISS., p. 240–250, 2006.

MASUNGI, C. et al. Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) combined with a 10-day multiscreen Caco-2 cell culture as a tool for assessing new drug candidates. Pharmazie, v. 63, n. 3, p. 194–199, 2008.

MENON, R. M.; BARR, W. H. Comparison of ceftibuten transport across Caco-2 cells and rat jejunum mounted on modified Ussing chambers. Biopharmaceutics and Drug Disposition, v. 24, n. 7, p. 299–308, 2003.

MINEO, H.; HARA, H.; SHIGEMATSU, N. Nutrient Interactions and Toxicity Melibiose , Difructose Anhydride III and Difructose Anhydride IV Enhance Net Calcium Absorption in Rat Small and Large Intestinal Epithelium by Increasing the Passage of Tight Junctions In Vitro. The Journal of nutrition, v. 132, n. August, p. 3394–3399, 2002.

MOTZ, S. A. et al. Permeability assessment for solid oral drug formulations based on Caco-2 monolayer in combination with a flow through dissolution cell. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 66, n. 2, p. 286–295, 2007.

NIELSEN, P. E.; AVDEEF, A. PAMPA - A drug absorption in vitro model: 8. Apparent filter porosity and the unstirred water layer. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 22, n. 1, p. 33–41, 2004.

PRETORIUS, E.; BOUIC, P. J. D. Permeation of four oral drugs through human intestinal mucosa. AAPS PharmSciTech, v. 10, n. 1, p. 270–275, 2009.

QUEVEDO, M. A.; BRIÑÓN, M. C. In vitro and in vivo pharmacokinetic characterization of two novel prodrugs of zidovudine. Antiviral Research, v. 83, n. 2, p. 103–111, 2009.

REIS, J. M. et al. Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, ex vivo and in situ Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 48, n. 4–5, p. 781–789, 2013.

REIS, J. M.; SINKÓ, B.; SERRA, C. H. R. Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) - Is it better than Caco-2 for human passive permeability prediction? Mini reviews in medicinal chemistry, v. 10, n. 11, p. 1071–1076, 2010.

REYNOLDS, D. P. et al. Ionization-specific analysis of human intestinal absorption. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 98, n. 11, p. 4039–4054, 2009.

SHARMA, P.; CHAWLA, H. P. S.; PANCHAGNULA, R. LC determination of cephalosporins in in vitro rat intestinal sac absorption model. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 27, n. 1–2, p. 39–50, 2002.

SHUGARTS, S.; BENET, L. Z. The role of transporters in the pharmacokinetics of orally administered drugs. Pharmaceutical Research, v. 26, n. 9, p. 2039–2054, 2009.

SICCARDI, D. et al. Stereoselective and concentration-dependent polarized epithelial permeability of a series of phosphoramidate triester prodrugs of d4T: an in vitro study in Caco-2 and Madin-Darby canine kidney cell monolayers. The

Journal of pharmacology and experimental therapeutics, v. 307, n. 3, p. 1112–1119, 2003.

SILVA, A. L. L. et al. Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: StavudineJournal of Pharmaceutical Sciences, 2012.

SOARES, K. C. C. et al. Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: Zidovudine (azidothymidine). Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 102, n. 8, p. 2409–2423, 2013.

TRAPANI, G. et al. Frog intestinal Sac: A new in vitro method for the assessment of intestinal permeability. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 93, n. 12, p. 2909–2919, 2004.

TUKKER, J. J. In vitro methods for the assessment of permeability. [s.l: s.n.].

UCHIDA, M. et al. A modified fast (4 days) 96-well plate Caco-2 permeability assay. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, v. 59, n. 1, p. 39–43, 2009.

VOLPE, D. A. Drug Permeability Studies in Regulatory Biowaiver Applications. In: Drug Absorption Studies: In Situ, In Vitro and In Silico Models. N: Springer, 2008. v. VIIp. 665–680.

WATANABE, E.; TAKAHASHI, M.; HAYASHI, M. A possibility to predict the absorbability of poorly water-soluble drugs in humans based on rat intestinal permeability assessed by an in vitro chamber method. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 58, n. 3, p. 659–665, 2004.

WHO. PROPOSAL TO WAIVE IN VIVO BIOEQUIVALENCE REQUIREMENTS FOR THE WHO MODEL LIST OF ESSENTIAL MEDICINES. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/services/expertcommittees/pharmprep/QAS04_109Rev1_Waive_invivo_bioequiv.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2016.

ŽAKELJ, S.; ŠTURM, K.; KRISTL, A. Ciprofloxacin permeability and its active secretion through rat small intestine in vitro. International Journal of Pharmaceutics, v. 313, n. 1–2, p. 175–180, 2006.

CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO FÁRMACO-CARREADOR DE EFLUXO DOS FÁRMACOS ANTIRRETROVIRAIS POR MEIO DOS MODELOS *IN VITRO* MDCK-MDR1 E *EX VIVO* EM CÂMARAS DE DIFUSÃO VERTICAL TIPO FRANZ

RESUMO

Para fármacos oralmente administrados, a determinação das características de permeabilidade e de mecanismos relacionados aos processos de absorção tem se tornado relevante uma vez que tais fatores interferem diretamente na biodisponibilidade. A influência do transporte de efluxo, causada principalmente pela glicoproteína-P (P-gp), é considerada importante no desenvolvimento e caracterização de fármacos, uma vez que este transportador pode estar relacionado à biodisponibilidade incompleta observada para alguns medicamentos. Diferentes métodos têm sido empregados para os estudos de efluxo de fármacos, dentre os quais os modelos *in vitro* com uso de culturas celulares MDCK-MDR1 e *ex vivo* com a utilização de segmentos intestinais provenientes de ratos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do mecanismo de efluxo causado pela P-gp sobre a permeabilidade dos fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina. Para isto, os modelos *in vitro* com utilização células MDCK-MDR1 e *ex vivo* com o uso de segmentos intestinais em câmaras de difusão vertical tipo Franz foram empregados nos estudos de efluxo. Em células MDCK-MDR1, a substância GG918 foi utilizada como inibidor da P-gp. Os experimentos neste modelo foram conduzidos no sentido apical-basolateral (A→B) e basolateral-apical (B→A) na presença e na ausência do inibidor. Para os experimentos em modelo *ex vivo*, segmentos intestinais de jejuno foram inseridos nas câmaras de difusão vertical tipo Franz e o verapamil foi empregado como inibidor de P-gp. Nos ensaios em MDCK-MDR1, as razões B→A/A→B foram: 1,7 para a estavudina, 2,0 para a lamivudina e 3,2 para a zidovudina. Já no modelo *ex vivo*, a comparação dos resultados obtidos na ausência e na presença de verapamil indicaram o aumento significativo da permeabilidade dos três antirretrovirais quando o inibidor foi empregado, sendo: de 15,6 x 10^{-6} para 42,5 x 10^{-6} cm/s para a estavudina, de 12,6 x 10^{-6} para 37,5 x 10^{-6} cm/s para a lamivudina e de 25,4 x 10^{-6} para 56,6 x 10^{-6} cm/s para a zidovudina. Com base nisso, o modelo *ex vivo* com o emprego de segmentos intestinais em câmaras de difusão vertical tipo Franz apresentou-se adequado na avaliação do mecanismo de efluxo dos fármacos antirretrovirais, o que foi confirmado com os estudos realizados em MDCK-MDR1. Assim, com base nos resultados obtidos, os fármacos antirretrovirais estudados apresentaram interação significativa com a P-gp.

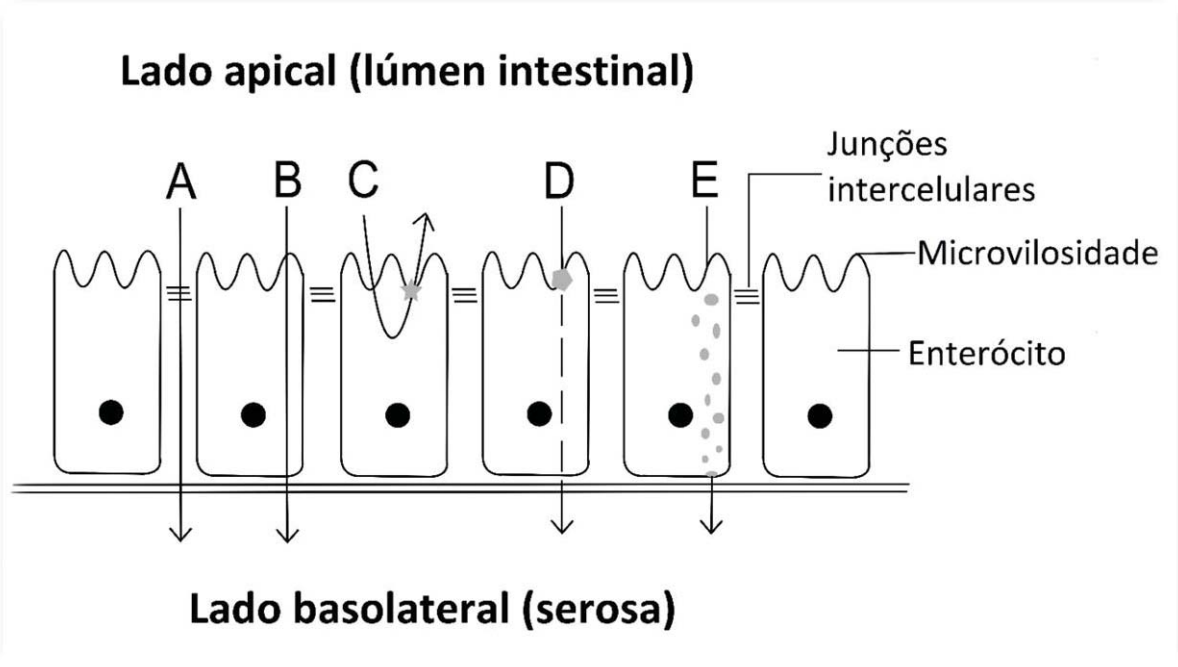
Palavras-chave: MDCK-MDR1, câmara de difusão vertical tipo Franz, antirretrovirais, P-gp, efluxo.

INTRODUÇÃO

A via oral constitui a principal rota de administração de medicamentos e a forma farmacêutica sólida representa a forma de dosagem mais comum e prática para tal finalidade. Assim, inicialmente, a forma farmacêutica deve desintegrar-se nos fluidos orgânicos presentes no trato gastrintestinal (TGI), o que permite a solubilização do fármaco e possibilita que este, por sua vez, seja capaz de atravessar a membrana biológica em seu sítio de absorção. Estes processos são fundamentais, porém não determinantes, para uma boa biodisponibilidade oral (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

A biodisponibilidade é, portanto, uma propriedade biológica que depende basicamente das características de solubilidade e de permeabilidade do fármaco. Desta maneira, o processo de permeabilidade ocorre nas porções proximais do intestino delgado, principalmente no duodeno e jejuno, através dos enterócitos. Estas células são especializadas na absorção de nutrientes e de outras substâncias por apresentarem microvilosidades, carreadores de efluxo e influxo, junções intercelulares e características lipídicas intrínsecas organizadas, o que permite a formação de uma monocamada celular polarizada. Assim, os enterócitos apresentam uma porção apical voltada para o lúmen intestinal e uma porção basolateral voltada para a camada serosa, conforme demonstrado na Figura 3.1 (AMIDON et al., 1995; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008).

Figura 3.1: Representação da monocamada de enterócitos, lados apical e basolateral, junções intercelulares, microvilosidades e principais mecanismos de permeabilidade de fármacos, sendo: (*A*) transporte passivo paracelular, (*B*) transporte passivo transcelular, (*C*) transporte ativo de efluxo, (*D*) transporte ativo transcelular mediado por carreadores de influxo e (*E*) endocitose (adaptado de Dezani et al., 2017 - *ahead of print*).



O processo de absorção de fármacos demonstra ser extremamente complexo e pode ocorrer por envolvimento de um ou mais mecanismos de permeabilidade, dentre outros fatores. A difusão passiva é o mecanismo mais comum envolvido no transporte de substâncias e é dividido em difusão passiva transcelular, que ocorre através da membrana de enterócitos, e difusão passiva paracelular, que ocorre através das junções intercelulares. O transporte ativo pode ser categorizado como de influxo ou efluxo, enquanto que a endocitose constitui a via menos comum de transporte de fármacos, pois é responsável pela permeação de moléculas maiores, normalmente de natureza peptídica. A Figura 3.1 mostra também os principais mecanismos de permeabilidade de fármacos (APPARAJU; NALLANI, 2007; BALIMANE; HAN; CHONG, 2006; BUCKLEY et al., 2012; CAO et al., 2006; GRASSI et al., 2007).

Dentre os variados mecanismos de transporte, o estudo da influência de carreadores de efluxo, principalmente pela glicoproteína-P (P-gp), na absorção de fármacos tem sido amplamente investigado e discutido na literatura devido à

capacidade da interação fármaco-carreador de efluxo interferir negativamente na biodisponibilidade de muitos fármacos (ANTUNES et al., 2013a). Inicialmente, a metodologia de estudo deve ser abordada de maneira cuidadosa, pois diversos modelos apresentam vantagens e desvantagens para a avaliação de um fármaco substrato de P-gp. O método comumente utilizado inclui o emprego de culturas celulares, principalmente MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) transfectado com o gene MDR1 (*Multidrug Resistence*) para expressão de P-gp. Outro método inclui os estudos *ex vivo*, como modelos que empregam membranas intestinais isoladas em câmara de difusão vertical tipo Franz (DE SOUZA et al., 2009; DEZANI et al., 2013a; JUNIOR et al., 2015).

A investigação da ocorrência de efluxo de um fármaco durante o processo de permeabilidade é importante para a compreensão da biodisponibilidade incompleta observada quando medicamentos são administrados por via oral. Além disso, permite avaliar a influência de excipientes contidos em formulações farmacêuticas já comercializadas ou em fase de desenvolvimento, de modo que estratégias possam ser delineadas com a finalidade de melhorar a biodisponibilidade e eficácia dos medicamentos (JUNIOR et al., 2015).

A utilização de um método *in vitro* em associação com um método *ex vivo*, conforme mencionado anteriormente, permite uma melhor predição da permeabilidade *in vivo*, uma vez que o uso de segmentos intestinais de ratos, o modelo animal mais utilizado, apresenta boa correlação com dados observados em humanos. Por outro lado, o uso de culturas celulares como MDCK-MDR1 permite avaliar com maior precisão a interação fármaco-P-gp. Porém este modelo *in vitro* não é capaz de predizer a permeabilidade *in vivo* quando utilizada isoladamente. Assim, a execução de experimentos para investigação de efluxo em diferentes modelos permite prever o impacto causado pelo mecanismo de efluxo no processo de permeabilidade de fármacos (JUNIOR et al., 2015).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o mecanismo de efluxo dos fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina por meio do emprego de câmaras de difusão vertical tipo Franz e de culturas celulares MDCK-MDR1. Os referidos antirretrovirais apresentam divergências quanto aos seus mecanismos de permeabilidade, além de apresentarem variabilidade interindividual observada por meio de estudos em seres humanos, o que pode estar relacionado ao envolvimento da P-gp nos processos de absorção.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Os fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina foram gentilmente doados pela Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos (São Paulo, Brasil). O metoprolol e a ranitidina foram gentilmente doados pela Fundação para o Remédio Popular (FURP, São Paulo, Brasil). Culturas celulares de MDCK-MDR1 foram fornecidas pelo Dr. Ira Paston do Instituto Nacional do Câncer e Centro Nacional de Saúde (NCI/NIH, USA). Soluções DMEM-H21 (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) contendo 1% de mistura penicilina-estreptomicina e 10% de soro bovino fetal (SBF, *fetal bovine serum*) foram obtidas da Unidade de Cultura Celular da UCSF (*University of California San Francisco*). Colchicina (40 nM) foi obtida de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) para utilização nas culturas de MDCK-MDR1. Soluções HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution* isento de íons cálcio e magnésio), tampão HEPES 1M e tripsina 0,25% foram adquiridas da Unidade de Cultura Celular da UCSF.

Frascos para cultivo celular com área de crescimento de 75 cm^3 (frascos T-75) e suportes permeáveis (*inserts*) para cultivo celular foram obtidos da Falcon BD. Placas para cultivo celular com seis poços foram adquiridos da *Corning Incorporated*. Inibidor de P-gp GG918 e DMSO (dimetilsufóxido) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Solução PBS (tampão fosfato-salino isento de íons cálcio e magnésio) foi obtida da Unidade de Cultura Celular da UCSF.

Verapamil (inibidor de P-gp) foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Solução de Ringer-Krebs-Hepes modificado (RKHM) pH 6,8 foi preparada com cloreto de sódio (NaCl) 115 mM, cloreto de potássio (KCl) 5,0 mM, cloreto de cálcio ($CaCl_2$) 1,5 mM, sulfato de magnésio ($MgSO_4$) 2,5 mM, bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) 9,0 mM, fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) 1,2 mM, D-glicose 28,0 mM e ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanolssulfônico (HEPES) 25,0 mM (DAVIES et al., 2008; MOTZ et al., 2007; SHARMA; CHAWLA; PANCHAGNULA, 2002). Todos solventes cromatográficos foram obtidos da Merck SA.

A resistência elétrica transepitelial foi mensurada com o uso do equipamento Millicel®-ERS adquirido da Millipore Corporation (EUA).

Preparo das culturas celulares MDCK-MDR1

Para a cultura celular MDCK-MDR1, foi empregada a solução DMEM-H21 suplementada com soro bovino fetal, estreptomicina, penicilina e colchicina. Este meio de cultivo preparado foi filtrado assepticamente e adicionado em frascos T-75 contendo a suspensão de células. O sistema foi acondicionado em incubadora destinada ao cultivo celular programada para manter a temperatura em 37°C com 5% de CO_2 e atmosfera úmida em 95% (DE SOUZA et al., 2009). O meio de cultivo foi trocado regularmente até atingir a confluência celular adequada para a realização da próxima troca de frasco ou para a preparação das placas a serem utilizadas nos experimentos de transporte.

Após o período de 6 dias de incubação, as células apresentaram uma confluência celular de 85-95%, ou seja, 85-95% da área de crescimento do frasco T-75 esteve coberta pelas células. A partir desta fase, foi possível preparar a próxima passagem das células para um novo frasco T-75 com o uso de tripsina 0,25% para a formação da suspensão celular, a qual pôde ser utilizada para o preparo das placas de cultivo destinadas aos experimentos de permeabilidade.

Para a preparação das placas de cultivo de seis poços, foi considerada a faixa de passagem de 4 a 10. Assim, a suspensão de células obtida, conforme descrito anteriormente, foi transferida a uma densidade de 2,5 x 10^6 células/suporte permeável. Cada suporte contendo a suspensão de células foi cuidadosamente colocado dentro da placa de cultivo previamente preenchida com meio de cultivo DMEM-H21, descrito anteriormente. Em seguida, este mesmo meio foi adicionado no interior dos suportes permeáveis, permitindo o contato das células com o meio de crescimento tanto no lado apical, quanto no basolateral. As placas preparadas foram levadas à incubadora mantida a 37°C (95% de umidade e 5% de CO_2) e o meio de cultivo foi substituído regularmente a fim de manter o fornecimento de nutrientes para as células em crescimento nas placas. No dia anterior ao experimento, o meio de cultivo foi trocado pelo mesmo tipo de solução, porém sem a colchicina. O emprego da colchicina no cultivo celular de MDCK-MDR1 é indispensável, uma vez que esta substância é utilizada como marcador seletivo das células MDCK-MDR1.

Preparo dos segmentos intestinais

O protocolo de estudo utilizado na execução dos experimentos envolvendo animais foi primeiramente submetido à avaliação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) e obteve aprovação sob número de registro P386, o qual é apresentado no ANEXO B.

Ratos machos da linhagem Wistar Hannover (*Rattus norvegicus*) com faixa de peso entre 250 e 300 g foram utilizados nos ensaios de permeabilidade utilizando o modelo *ex vivo* com uso de câmara de difusão vertical tipo Franz. Os animais foram submetidos a um período de jejum de 12 horas antes dos experimentos. Em seguida, os ratos foram anestesiados por injeção intramuscular de mistura de cetamina-xilazina (0,1 g/kg e 0,02 g/kg, respectivamente) e os segmentos intestinais de jejuno foram isolados e preparados para sua inserção nas câmaras de difusão vertical tipo Franz (DEZANI et al., 2016; ESCRIBANO et al., 2012; JAIN et al., 2007; KIM et al., 2006; LANGGUTH et al., 1997).

Avaliação da viabilidade das células MDCK-MDR1 e dos segmentos intestinais utilizados nos estudos de permeabilidade

Previamente à execução de todos os experimentos, a resistência elétrica transepitelial (TEER) foi mensurada para todas as células MDCK-MDR1 cultivadas nos suportes permeáveis e em todos os segmentos intestinais utilizados nas câmara de difusão vertical tipo Franz. Para células MDCK-MDR1 foi adotada a faixa de valores de TEER de 1500 a 2000 Ω cm^2. Monocamadas celulares com valores de TEER fora da faixa admissível foram descartadas do estudo (SOLDNER et al., 2000). De maneira semelhante, a viabilidade das porções intestinais obtidas a partir de ratos Wistar foi avaliada pela TEER com faixa de valores aceitáveis de 70 a 110 Ω cm^2. Os segmentos intestinais foram também verificados após os experimentos e valores de TEER menores que 30 Ω cm^2 foram determinantes para a exclusão dos resultados provenientes da referida câmara de difusão (DEZANI et al., 2013a; LENNERNÄS; NYLANDER; UNGELL, 1997).

Além da medida da resistência elétrica, a avaliação da viabilidade dos segmentos intestinais empregados nos estudos *ex vivo* com o uso das câmaras de difusão vertical tipo Franz foi também realizada com substâncias marcadoras de baixa e de alta permeabilidade ranitidina e metoprolol, respectivamente (DEZANI et al., 2013a; REIS et al., 2013).

Estudo do transporte bidirecional de fármacos por meio do modelo *in vitro* usando MDCK-MDR1

Os estudos de transporte bidirecional foram realizados em duas condições: na ausência e na presença de inibidor de P-gp (GG918). Assim, duas placas foram utilizadas para cada fármaco estudado e cada placa de seis poços foi utilizada para cada condição (sem inibidor ou com inibidor), sendo os três poços superiores destinados aos ensaios na direção A→B (apical-basolateral) e os poços inferiores destinados aos ensaios na direção B→A (basolateral-apical).

O meio de cultivo contido nas placas de seis poços foi substituído por meio HBSS contendo 25 mM de HEPES e 1% SBF em pH 7,4±0,05 a 37°C. Esta solução foi dividida em quatro porções diferentes, sendo: HBSS branco (isento de fármaco) a ser adicionado na porção receptora das placas (estudo sem inibidor), HBSS com o fármaco a ser adicionado na porção doadora das placas (estudo sem inibidor), HBSS branco com inibidor GG918 (isento de fármaco) a ser adicionado na porção receptora das placas (estudo com inibidor), HBSS com o fármaco e com inibidor GG918 a ser adicionado na porção doadora das placas.

Durante a lavagem das células, novas placas de seis poços foram preparadas para os estudos de transporte. Após o período de lavagem das células, o conteúdo dos poços foi removido e descartado tanto do lado apical quanto do lado basolateral dos suportes permeáveis. O início do ensaio de transporte se deu a partir do contato das células com a solução HBSS contendo o fármaco a 15 μM (na presença ou na ausência de inibidor de P-gp a 0,5 μM). Após a adição das correspondentes soluções HBSS nos suportes permeáveis, as placas foram levadas à incubadora a 37°C. As amostras foram coletadas a partir dos

compartimentos receptores (200 µL) nos tempos 30, 60 e 90 minutos com reposição do respectivo meio HBSS isento de fármaco.

Após a realização de todas as coletas das amostras, as membranas foram lavadas com solução fria (4°C) de PBS e expostas à temperatura ambiente até completa secagem. Em seguida, as membranas foram removidas dos suportes permeáveis e colocadas individualmente em frascos com 1 mL de solução acetonitrila/água (75:25%) com a finalidade de se obter a fração do fármaco retido nas membranas. A mistura foi levada ao banho ultrassônico por 15 minutos e transferida para tubos de microcentrifugação e centrifugadas à 12000 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi separado e congelado para posterior análise por método cromatográfico com detecção em massa.

Estudo do transporte de efluxo por meio do modelo *ex vivo* em câmaras de difusão vertical tipo Franz

Após o isolamento e retirada do jejuno, este foi imediatamente acondicionado em solução fria (4°C) de RKHM por aproximadamente vinte minutos. Em seguida, o segmento intestinal foi aberto longitudinalmente e cortado em pequenos fragmentos consecutivos. Tais fragmentos intestinais foram inseridos de forma adequada nas seis câmaras de difusão vertical do tipo Franz e, então, mantidos sob temperatura de 37±0,5°C com oxigenação constante de gás carbogênio (mistura de gases contendo 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico) a um fluxo de 1 mL/min por mais vinte minutos, com a finalidade de equilibrar os segmentos intestinais com o sistema de câmaras (DEZANI et al., 2013a; HIDALGO et al., 1993).

Após o período de equilíbrio, todos os fármacos e marcadores solubilizados individualmente na solução de RKHM foram adicionados individualmente a um volume de 5 mL em cada compartimento doador. A concentração adicionada de cada fármaco foi de 40 µg/mL para estavudina, 300 µg/mL para lamivudina, 300 µg/mL para zidovudina, 100 µg/mL para metoprolol e de 300 µg/mL para ranitidina. Um volume de 7,0 mL de solução de RKHM isenta de fármaco ou marcador foi previamente adicionado na câmara receptora e mantida a 37°C.

Os experimentos foram conduzidos sob oxigenação das soluções doadoras, conforme previamente mencionado, o que permitiu a agitação dos meios. Já nos compartimentos receptores, a agitação foi promovida por meio magnético a 50 rpm (DEZANI et al., 2013a).

Após a adição dos fármacos ou marcadores nos compartimentos doadores das câmaras de difusão vertical tipo Franz (*t=0*), foram realizadas as coletas das amostras (1 mL) nos tempos 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 minutos a partir dos compartimentos receptores, com reposição do mesmo volume de solução de RKHM isento de fármacos ou marcadores. As amostras foram congeladas a -20 °C para posterior quantificação por método cromatográfico.

Cálculo da permeabilidade aparente (Papp)

Os valores de permeabilidade aparente (Papp em cm/s) foram calculados a partir das análises das amostras obtidas em MDCK-MDR1 (n=3) e em câmaras de difusão vertical tipo Franz (n=6), conforme a Equação 7.

$$P_{app} = \frac{\Delta Q}{\Delta t} \cdot \frac{1}{A} \cdot \frac{1}{C_0}$$

Equação 7

onde: $\Delta Q / \Delta t$ representa o fluxo em μmol/min ou a quantidade de fármaco permeado através do segmento intestinal no tempo *t*; *A* corresponde à área de exposição do jejuno (de 0,20 cm^2 para os estudos em câmaras de difusão vertical tipo Franz e 4,2 cm^2 para MDCK-MDR1) e C_0 representa a concentração inicial do fármaco na solução colocada em contato com o segmento intestinal (compartimento doador) (DEZANI et al., 2013a; SHAH, 1993; TRAPANI et al., 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Avaliação da viabilidade das células MDCK-MDR1 e dos segmentos intestinais utilizados nos estudos de permeabilidade

Conforme apresentado anteriormente, as faixas de valores consideradas aceitáveis para a avaliação de TEER em MDCK-MDR1 e em membranas intestinais foram baseadas em estudos descritos na literatura e na padronização intralaboratorial, de forma a garantir a viabilidade dos tecidos utilizados e a confiabilidade dos resultados obtidos (DEZANI et al., 2013a; SOLDNER et al., 2000) A Tabela 3.1 apresenta os valores de TEER obtidos para cada um dos experimentos executados.

Tabela 3.1: Valores de TEER referentes aos ensaios de permeabilidade realizados por meio dos modelos *in vitro* (MDCK-MDR1, n=3) e *ex vivo* (câmara de difusão vertical tipo Franz, n=6) na presença e na ausência de inibidor de P-gp, sendo *I* correspondente às medições iniciais (antes dos experimentos) e *F* correspondente às medições finais (após os experimentos).

Câmaras de difusão vertical tipo Franz sem inibidor										
	Estavudina $\Omega.cm^2$		Lamivudina $\Omega.cm^2$		Zidovudina $\Omega.cm^2$		Metoprolol $\Omega.cm^2$		Ranitidina $\Omega.cm^2$	
Exp	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F
1	81	75	83	71	75	60	74	67	73	60
2	83	69	87	69	78	75	77	70	71	68
3	75	69	75	71	81	75	66	60	73	68
4	78	72	81	72	81	71	81	71	71	68
5	81	72	84	75	78	66	72	63	69	65
6	84	75	75	69	80	69	81	69	79	75
Câmaras de difusão vertical tipo Franz com inibidor										
Exp	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F
1	90	73	87	83	75	78	90	82	78	77
2	89	78	90	80	87	80	83	77	82	76
3	83	76	83	77	90	80	87	80	76	73
4	83	76	100	83	89	80	83	80	79	73
5	90	80	100	88	100	87	87	78	78	71
6	80	73	93	75	100	87	93	82	72	71
MDCK-MDR1* sem inibidor										
	A→B	B→A	A→B	B→A	A→B	B→A	A→B	B→A	A→B	B→A
1	1550	1560	1530	1510	1580	1580	1580	1510	1520	1500
2	1530	1530	1580	1510	1530	1560	1550	1550	1560	1600
3	1540	1500	1570	1550	1520	1580	1540	1580	1540	1570
MDCK-MDR1* com inibidor										
	A→B	B→A	A→B	B→A	A→B	B→A	A→B	B→A	A→B	B→A
1	1521	1590	1560	1540	1560	1520	1560	1500	1500	1500
2	1540	1500	1530	1580	1580	1510	1500	1550	1520	1600
3	1550	1520	1560	1520	1550	1520	1600	1540	1620	1640

** Para MDCK-MDR1 obteve-se apenas os valores iniciais, devido à estabilidade da cultura celular no curto período de tempo do ensaio.*

Conforme apresentado na Tabela 3.1, os valores de TEER para os ensaios de permeabilidade realizados em câmara de difusão vertical tipo Franz apresentaram-se estáveis, ou seja, pouca variação foi observada entre as fases iniciais e finais dos experimentos. Embora haja poucos estudos descritos na literatura que destacam a importância do TEER na viabilidade de membranas biológicas, estes valores podem sofrer alterações de acordo com a forma de preparo dos segmentos intestinais. Assim, destaca-se a importância na padronização das condições adotadas nos experimentos que envolvem a utilização de porções intestinais (BORCHARDT; SMITH; WILSON, 1996b).

Em relação à faixa de valores de TEER aceitáveis para os estudos *ex vivo*, observou-se que todos os valores estiveram entre 70-110 $\Omega.cm^2$ (Tabela 3.1), o que permitiu considerar todos os segmentos intestinais empregados no estudo. O estabelecimento desta faixa foi baseado em diversos estudos realizados previamente em nosso laboratório. Além disso, um levantamento de experimentos semelhantes descritos na literatura foi realizado para auxiliar no estabelecimento da referida faixa de valores, apesar da falta de padronização em trabalhos publicados. Assim, valores muito abaixo da faixa estipulada indicam danos causados durante a manipulação do segmento intestinal, o que compromete significativamente os resultados de permeabilidade (constatado com o uso de marcadores de baixa permeabilidade) (DEZANI et al., 2013a; MENON; BARR, 2003; MINEO; HARA; SHIGEMATSU, 2002).

É importante ressaltar que a modificação da solução de RKHM utilizada nos ensaios se deu pela inclusão do tampão HEPES com o objetivo de promover a melhoria na integridade e viabilidade do segmento intestinal empregado, o que permitiu a obtenção de resultados mais consistentes e com menor variação (DEZANI et al., 2013a; HIDALGO et al., 1993; LEGEN; SALOBIR; KERČ, 2005; ŽAKELJ; ŠTURM; KRISTL, 2006). A padronização dos valores de TEER é de suma importância, uma vez que tais resultados demonstram a capacidade do intestino em preservar suas principais estruturas, incluindo a manutenção dos espaços intracelulares, o que é fundamental para a obtenção de dados confiáveis e que

expressam uma boa correlação e previsão da permeabilidade em seres humanos (DEZANI et al., 2013a).

Em relação aos experimentos realizados em culturas celulares MDCK-MDR1, os valores de TEER foram obtidos apenas no início dos ensaios e estiveram dentro da faixa de valores aceitáveis (1500 a 2000 $\Omega.cm^2$), conforme apresentado anteriormente. Tais medidas demonstraram que as células atingiram a confluência adequada para a execução dos experimentos, ou seja, não houveram espaços sem crescimento que promovessem a passagem do fármaco do compartimento doador para o receptor (NAVARRO et al., 2011; SOLDNER et al., 2000).

Com base na literatura, o valor de TEER para células MDCK-MDR1 são mais elevados, conforme demonstrado neste estudo, o que está relacionado à morfologia desta linhagem celular. Em outras palavras, os altos valores de TEER se devem ao modo de crescimento das células, as quais apresentam-se mais aderidas umas às outras. Por esta razão, o uso de tripsina a 0,25% nos procedimentos de preparação das suspensões celulares é considerado adequada para a formação da suspensão celular do que a tripsina a 0,05% normalmente utilizada em células MDCK (não transfectadas) (NAVARRO et al., 2011; SOLDNER et al., 2000).

Estudo do transporte bidirecional de fármacos por meio do modelo *in vitro* usando MDCK-MDR1

Os estudos de transporte bidirecional em MDCK-MDR1 foram realizados para os fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina. Com a finalidade de avaliar a viabilidade das células de maneira complementar, foram utilizados marcadores de alta e de baixa permeabilidade metoprolol e ranitidina, respectivamente. Os experimentos foram realizados na ausência e na presença de inibidor de P-gp (GG918) e o fluxo de transporte foi avaliado nos sentidos A→B e B→A. Os valores de permeabilidade aparente (Papp) são apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Valores médios de Papp e de desvios padrão (DP) obtidos a partir dos ensaios de permeabilidade por meio do método *in vitro* com o emprego de células MDCK-MDR1 para os fármacos estavudina, lamivudina, zidovudina e para os marcadores metoprolol e ranitidina na direção A→B e B→A, na ausência e na presença de GG918. Os resultados foram expressos em cm/s e representam a média de três determinações.

	Papp ± DP (x 10^{-6} cm/s)			
Fármaco	**Sem inibidor**		**Com inibidor**	
	A→B	**B→A**	**A→B**	**B→A**
Metoprolol	9,32±0,99	8,46±0,31	12,10±1,01*	6,27±0,45*
Ranitidina	0,07±0,02*	1,84±0,4*	0,19±0,04	0,16±0,04
Estavudina	0,51±0,06	0,83±0,04	0,45±0,16	0,41±0,14
Lamivudina	0,13±0,01*	0,24±0,02*	0,09±0,05	0,13±0,05
Zidovudina	0,65±0,04*	1,80±0,47*	0,77±0,08	0,48±0,10

** As análises estatísticas mostraram diferenças significativas quando p<0,05.*

Apesar do modelo MDCK-MDR1 não ser o mais adequado para a determinação de permeabilidade, o valor obtido para o fármaco lamivudina apresentou-se ligeiramente superior ao valor encontrado para a ranitidina na direção A→B do estudo sem inibidor. Já os resultados referentes à estavudina mostraram que este fármaco apresentou valores próximos àqueles encontrados para a zidovudina na direção A→B com ou sem o uso de inibidor, o que sugere que ambos fármacos possuem mecanismos semelhantes de transporte.

A avaliação dos valores de razão B→A/A→B foi baseada nos resultados de Papp obtidos em MDCK-MDR1. Para todos os fármacos antirretrovirais, os valores da razão foram menores que 1 (<1) para os estudos realizados com inibidor, o que não representou diferenças estatísticas. Esta observação indica a presença de P-gp na porção apical da membrana, e, quando este carreador encontra-se inibido, é observado apenas o transporte de difusão passiva. Já a razão B→A/A→B para cada fármaco nos ensaios sem inibidor apresentou-se próximo de 2, evidenciando a interação fármaco-transportador, conforme apresentado na Tabela 3.3. O valor

de razão do metoprolol indicou que o mecanismo de transporte deste fármaco se dá por difusão passiva transcelular.

Tabela 3.3: Razões B→A/A→B calculadas a partir dos valores de Papp obtidos por meio do modelo *in vitro* MDCK-MDR1 para os fármacos estavudina, lamivudina, zidovudina e os marcadores de alta e de baixa permeabilidade metoprolol e ranitidina, respectivamente.

	Razão (Papp B→A/Papp A→B)				
Parâmetros	**Estavudina**	**Lamivudina**	**Zidovudina**	**Metoprolol**	**Ranitidina**
B→A/A→B sem inibidor	1,7±0,2	2,0±0,2	3,2±0,2	0,9±0,1	26,2±8,9
B→A/A→B com inibidor	0,9±0,3	1,2±0,8	0,6±0,1	0,5±0,1	0,8±0,2

Conforme apresentado por Giacomini e colaboradores (GIACOMINI et al., 2010), a razão entre os valores de Papp obtidos por modelo celular de superexpressão de P-gp, como o MDCK-MDR1, deve ser igual ou maior que dois (≥2) para que a substância seja considerado substrato de P-gp. Com base nisso, de acordo com as razões apresentadas na Tabela 3.3, a zidovudina apresentou maior influência quando a P-gp foi inibida, seguido pela lamivudina e pela estavudina. Assim, a zidovudina apresentou-se como substrato de P-gp, enquanto que a lamivudina e a estavudina apresentaram uma interação mais fraca com este carreador.

Poucos estudos na literatura apresentam os valores de Papp para estes fármacos antirretrovirais determinados a partir de células MDCK-MDR1. Em estudo publicado por Souza e colaboradores (DE SOUZA et al., 2009), a lamivudina foi considerada como sendo um pobre substrato da P-gp por ter apresentado uma razão de 2,27. Neste caso, esta substância pode ser considerada substrato de P-gp, pois apresentou razão maior ou igual a dois de acordo com o estabelecido por Giacomini e colaboradores (GIACOMINI et al., 2010). Entretanto, é importante

ressaltar que o referido estudo conduzido por Souza e colaboradores considerou uma faixa de TEER menor (de 900 a 1500 $\Omega.cm^2$) do que a adotada no presente estudo, o que pode justificar o valor mais elevado de permeabilidade no sentido B→A em comparação com o sentido A→B.

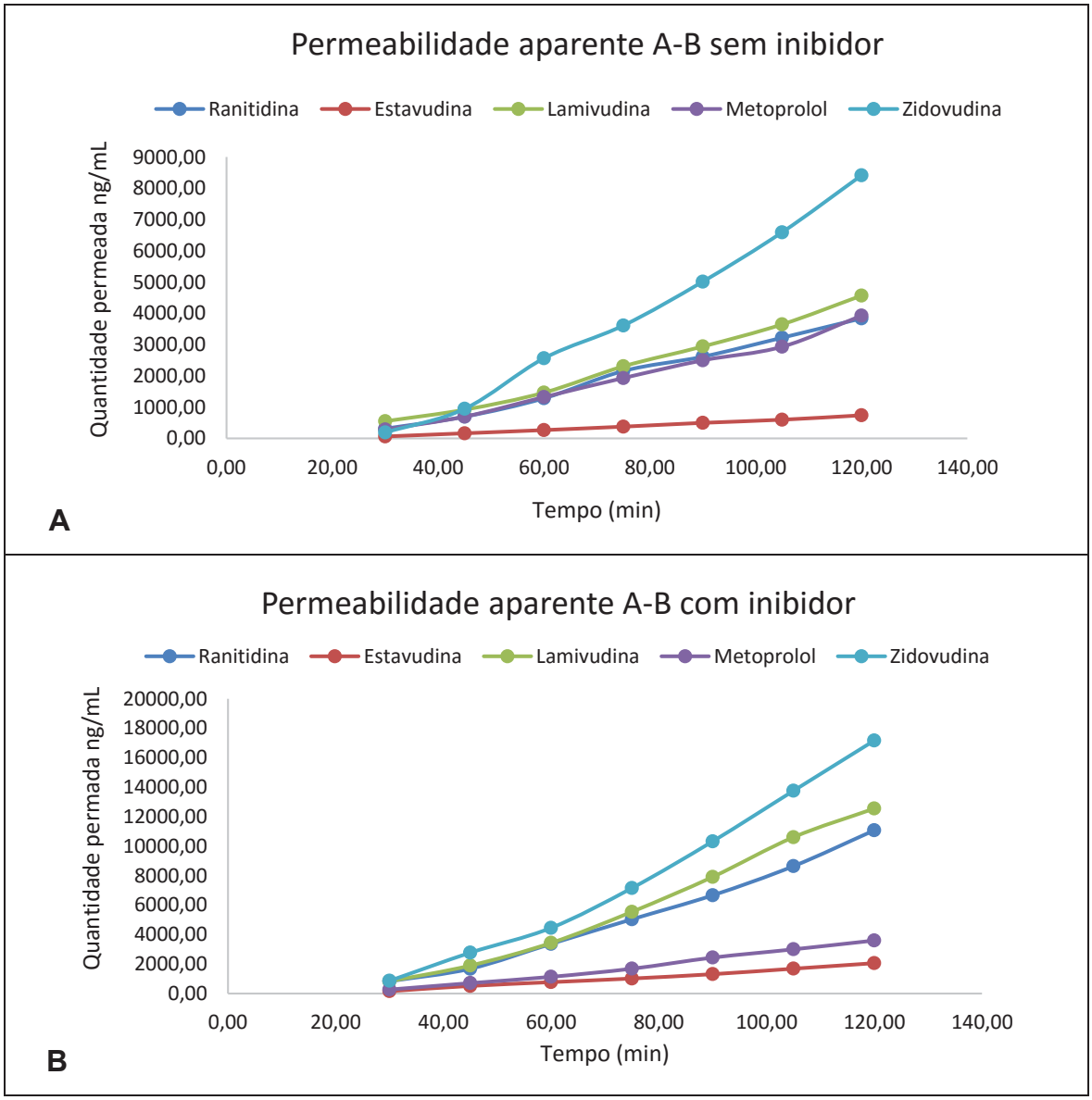
Com relação à zidovudina, Souza e colaboradores encontraram uma razão bem superior ao valor de dois (5,79), o que indica uma forte interação entre este fármaco e a P-gp. Entretanto, os autores sugerem que a zidovudina é um fraco substrato para a P-gp, diferentemente do observado neste trabalho, onde os fármacos antirretrovirais são substratos de P-gp. Esta observação corrobora com os estudos realizados por Quevedo, Nieto e Briñón (2011) por meio do uso de saco intestinal invertido (QUEVEDO; NIETO; BRIÑÓN, 2011). Apesar da lamivudina e da estavudina apresentarem razões limítrofes ao estabelecido por Giacomini e colaboradores (2010), é possível afirmar a importância da influência de efluxo nos processos de absorção destes fármacos.

Estudo do transporte de efluxo por meio do modelo *ex vivo* em câmaras de difusão vertical tipo Franz

O modelo *ex vivo* com o emprego de segmentos intestinais em câmara de difusão vertical tipo Franz foi utilizado para avaliar o transporte de efluxo dos fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina. Os ensaios foram realizados no sentido A→B na presença e na ausência de inibidor de P-gp verapamil.

A permeabilidade aparente (Papp) demonstrou a taxa de transporte do fármaco através de uma determinada área do segmento intestinal utilizado nos estudos *ex vivo* (quantidade permeada em função do tempo) (DAHAN; AMIDON, 2009; DEZANI et al., 2013a). Os valores de Papp apresentados na Figura 3.2 demonstram o aumento da quantidade permeada em função do tempo para cada uma das substâncias (fármacos e marcadores). Os perfis praticamente lineares demonstraram que não houve saturação dos meios de transporte contidos nos compartimentos receptores e nem saturação dos mecanismos de transporte para a concentração do fármaco empregada no estudo.

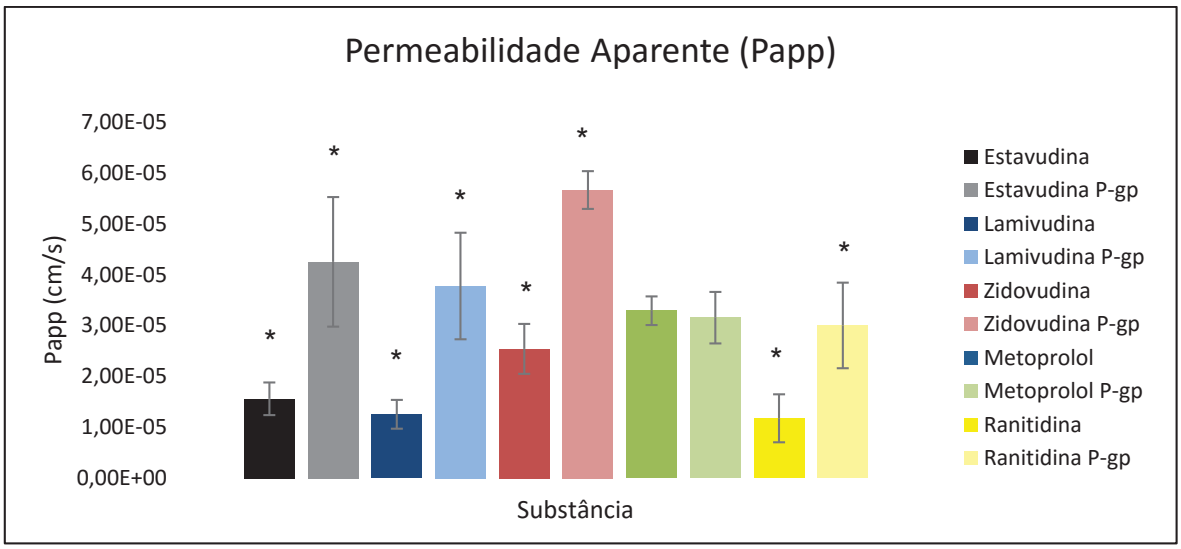
Figura 3.2: Quantidade permeada em ng/mL em função do tempo para estavudina, lamivudina, zidovudina e metoprolol na ausência (A) e na presença (B) do inibidor de P-gp verapamil. Resultados obtidos por meio do modelo *ex vivo* com emprego de câmaras de difusão vertical tipo Franz (n=6).



A Papp determina a velocidade (fluxo) em que ocorre o transporte do fármaco do compartimento doador para o compartimento receptor. Assim, para fármacos que são passivamente transportados é imprescindível que não ocorra a saturação do meio receptor, mantendo-se assim as condições ideais do ensaio.

Os valores de Papp obtidos nos ensaios com câmaras de difusão vertical tipo Franz na presença e na ausência de inibidor de P-gp (verapamil) apresentaram diferentes resultados para a estavudina, lamivudina e zidovudina. A análise estatística permitiu a observação de dois grupos diferentes ($p<0,05$), o que evidencia a influência do efluxo nos processos de permeabilidade destes fármacos. Além disso, foi possível observar a capacidade do método *ex vivo* em diferenciar fármacos que são substratos de efluxo dos que não são substratos, como o metoprolol. A Figura 3.3 apresenta os perfis de Papp para cada substância na presença e na ausência do inibidor de P-gp.

Figura 3.3: Perfis de permeabilidade aparente (Papp) para os fármacos estavudina, lamivudina e zidovudina e para os marcadores metoprolol e ranitidina, na presença e na ausência de inibidor de P-gp (verapamil). Valores médios obtidos através do modelo *ex vivo* em câmaras de difusão vertical tipo Franz (n=6).



** Análises estatísticas mostraram diferenças significativas quando $p<0,05$ (para cada fármaco na presença e na ausência de inibidor).*

Apesar do resultado da zidovudina apresentar maior alteração quando a P-gp foi inibida, este antirretroviral sofre menor impacto de tal interação em comparação com a lamivudina e a estavudina. Isso se deve aos altos valores de permeabilidade apresentados na ausência do inibidor, diferentemente dos demais

fármacos. Este fato é constatado pelo SCBDF (Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Disposição de Fármacos), que afirma que fármacos de classe I (alta permeabilidade/metabolismo e alta solubilidade) não apresentam problemas nos processos de absorção quando administrados oralmente, embora possam ser substratos de carreadores de efluxo (BENET; BROCCATELLI; OPREA, 2011). Em contrapartida, quando fármacos apresentam valores de permeabilidade baixos ou limítrofes, a influência de transportadores de efluxo pode ser significativa nos processos de absorção, trazendo consequências que podem ser observadas clinicamente. A Tabela 3.4 apresenta os resultados de Papp e as taxas de influência nos processos de permeabilidade de cada fármaco.

Tabela 3.4: Valores médios de permeabilidade aparente (Papp) e desvios padrão (DP) obtidos a partir dos ensaios em modelo *ex vivo* (câmaras de difusão vertical tipo Franz) dos fármacos estavudina, lamivudina, zidovudina e dos marcadores metoprolol e ranitidina para os estudos sem e com inibidor de P-gp verapamil. Os resultados são expressos em cm/s e representam a média de seis determinações

	Papp ± DP (x 10^{-6} cm/s)			
Fármacos	**Sem inibidor**	**Com inibidor**	**Diferença estatística**	**Taxa de aumento com inibidor/sem inibidor**
	A→B	**A→B**		**%**
Metoprolol	32,9±2,8	31,5±5,1	Não	-4,4
Ranitidina	11,8±2,7	30,0±8,4	Sim*	39,3
Estavudina	15,6±3,2	42,5±12,7	Sim*	36,7
Lamivudina	12,6±2,7	37,5±10,5	Sim*	33,4
Zidovudina	25,4±4,9	56,6±3,7	Sim*	44,9

** As análises estatísticas foram significativas quando p<0,05.*

Conforme observado na Tabela 3.4, os valores de permeabilidade na presença e na ausência de inibidor obtidos para os fármacos antirretrovirais demonstraram uma forte interação entre a ranitidina e P-gp (39,3%), lamivudina e

P-gp (33,4%), estavudina e P-gp (36,7%) e zidovudina e P-gp (44,9%). Entretanto, o mesmo não foi observado para o metoprolol (-4,4%).

É importante ressaltar que os valores dos desvios padrão encontrados para os fármacos estavudina e lamivudina foram claramente elevados, assim como nos resultados obtidos em culturas celulares MDCK-MDR1. Isto sugere uma variação da afinidade dos referidos fármacos pela proteína de efluxo quando o inibidor de P-gp foi utilizado. Esta variação em função da diferente capacidade de interação com a P-gp pode ser estar relacionada com a variabilidade encontrada em estudos realizados *in vivo* descritos na literatura. A Tabela 3.5 demonstra a correlação da influência de P-gp no processo de permeabilidade e as variações obtidas em ensaios de biodisponibilidade em seres humanos.

Tabela 3.5: Comparação entre a influência da P-gp obtido no presente estudo e a variação dos ensaios de biodisponibilidade em seres humanos.

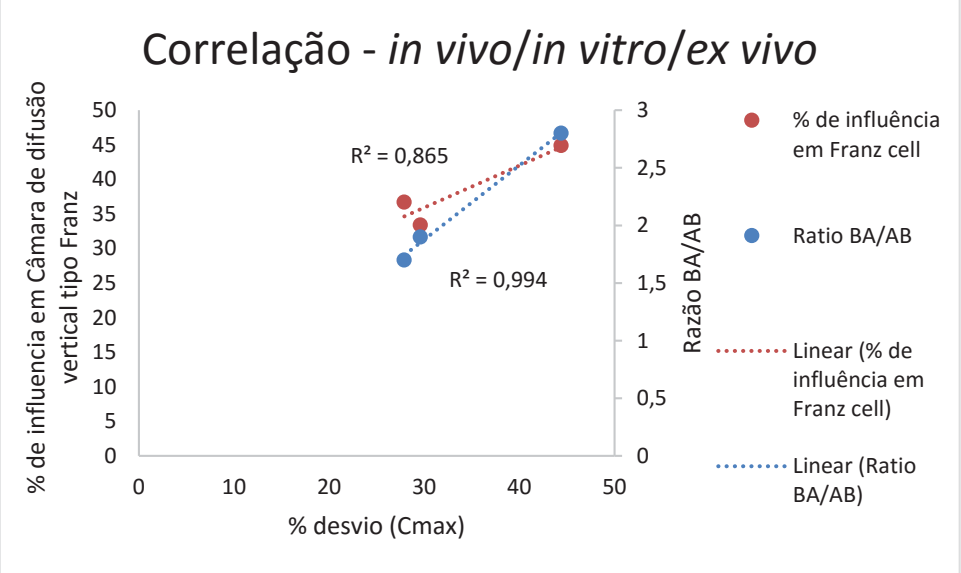
Parâmetros	Estavudina	Lamivudina	Zidovudina
% de influência de P-gp (razão B→A/A→B em MDCK-MDR1)	70% (1,7)	90% (1,9)	140% (2,8)
% de influência de P-gp em câmaras de difusão vertical tipo Franz	36,7%	33,4%	44,9%
% de variação Cmax obtidos da literatura	27,9% [b]	29,6% [c]	44,4% [a]

[a] (DOS REIS SERRA et al., 2008), [b] (NARANG et al., 2004), [c] (KANO et al., 2005)

Com base nos resultados demonstrados na Tabela 3.5 e na Figura 3.4, é possível verificar a tendência de variação causada pela influência significativa da P-gp em diferentes níveis de interação, o que pode influenciar a biodisponibilidade. Este impacto pode estar relacionado diretamente com a alta variabilidade interindividual apresentada em estudos *in vivo* que relaciona estes fármacos (DOS REIS SERRA et al., 2008; GEOFFREY J. YUEN et al., 1995; NARANG et al., 2004).

A Figura 3.4 correlaciona os dados obtidos a partir dos estudos em câmaras de difusão vertical tipo Franz e em cultura celular MDCK-MDR1, com dados de porcentagem de desvio obtidos a partir de estudo de biodisponibilidade.

Figura 3.4: Correlação da influência da interação entre fármaco e P-gp e dados de biodisponibilidade obtidos da literatura.



A correlação de r^2=0,99 demonstrada na Figura 3.4 corresponde aos resultados obtidos em cultura celular (MDCK-MDR1), enquanto que a correlação r^2=0,87 corresponde aos dados provenientes do estudo em câmara de difusão vertical tipo Franz. Estes índices de correlação indicam a eficiência dos ensaios realizados e a relação dos mesmos com a variabilidade encontrada nos estudos de biodisponibilidade descritos na literatura, uma vez que existe uma considerável variação interindividual na expressão de P-gp nos enterócitos em seres humanos, o que pode levar a diferentes condições experimentais quando o fármaco em estudo apresenta interação significativa com este carreador. Ressalta-se, ainda, que a correlação apresentada é um estudo preliminar e demanda outros experimentos complementares com fármacos pertencentes a diferentes classes biofarmacêuticas para uma melhor compreensão dos parâmetros observados no presente estudo.

CONCLUSÃO

O estudo de permeabilidade através do método que utiliza a cultura celular MDCK-MDR1 sugere uma significativa interação dos fármacos com a P-gp, uma vez que a lamivudina, estavudina e zidovudina apresentaram razão B→A/A→B igual ou maior que 2. Portanto, foi observada a influência do carreador de efluxo sobre a permeabilidade dos antirretrovirais.

Esta mesma interação foi constatada pelos ensaios realizados por meio do método *ex vivo* em câmaras de difusão vertical tipo Franz. Este modelo que utiliza segmentos intestinais apresentou-se como uma alternativa confirmatória para os ensaios *in vitro* realizados para a avaliação do transporte de efluxo. Além disso, o método *ex vivo* apresentado ressalta suas aplicações nos processos de permeabilidade a serem estudados, uma vez que outros mecanismos podem também estar envolvidos e, muitas vezes, não estão presentes adequadamente nas referidas culturas celulares.

A utilização dos modelos *in vitro* e *ex vivo* empregados no presente trabalho demonstrou que ambos métodos são complementares para os estudos de transporte de efluxo de fármacos, não sendo recomendada a utilização isolada de cada modelo, mas sim em associação. Assim, enquanto o modelo MDCK-MDR1 representa uma importante ferramenta para avaliar a influência de efluxo no processo de permeabilidade, o modelo *ex vivo* com utilização de segmentos intestinais isolados em câmaras de difusão vertical tipo Franz permite uma melhor predição do comportamento do fármaco *in vivo*, uma vez que a correlação existente entre modelos animais (principalmente ratos) e seres humanos tem sido cada vez mais evidenciada e defendida na literatura devido às semelhanças entre as duas espécies.

REFERÊNCIAS

AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. Pharmaceutical research, v. 12, n. 3, p. 413–420, 1995.

ANTUNES, F. et al. Models to predict intestinal absorption of therapeutic peptides and proteins. Current drug metabolism, v. 14, n. 1, p. 4–20, 2013.

APPARAJU, S. K. .; NALLANI, S. C. . Basics of Drug Absorption from a Biopharmaceutical Perspective. [s.l.] CRC Press, 2007.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S.; MORRISON, R. A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, v. 44, n. 1, p. 301–312, 2000.

BALIMANE, P. V; HAN, Y.-H.; CHONG, S. Current industrial practices of assessing permeability and P-glycoprotein interaction. The AAPS journal, v. 8, n. 1, p. E1–E13, 2006.

BENET, L. Z.; BROCCATELLI, F.; OPREA, T. I. BDDCS Applied to Over 900 Drugs. The AAPS Journal, v. 13, n. 4, p. 519–547, 2011.

BORCHARDT, R. T.; SMITH, P. L.; WILSON, G. Models for Assessing Drug Abosorption and Metabolism. New York: Plenum Press, 1996.

BUCKLEY, S. T. et al. In vitro models to evaluate the permeability of poorly soluble drug entities: Challenges and perspectives. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 45, n. 3, p. 235–250, 2012.

CAO, X. et al. Why is it challenging to predict intestinal drug absorption and oral bioavailability in human using rat model. Pharmaceutical Research, v. 23, n. 8, p. 1675–1686, 2006.

CORÁ, L. A. et al. Biomagnetic methods: Technologies applied to pharmaceutical research. Pharmaceutical Research, v. 28, n. 3, p. 438–455, 2011.

DAHAN, A.; AMIDON, G. L. Segmental dependent transport of low permeability compounds along the small intestine due to P-glycoprotein: The role of efflux transport in the oral absorption of BCS class III drugs. Molecular Pharmaceutics, v. 6, n. 1, p. 19–28, 2009.

DAHAN, A.; WEST, B. T.; AMIDON, G. L. Segmental-dependent membrane permeability along the intestine following oral drug administration: Evaluation of a triple single-pass intestinal perfusion (TSPIP) approach in the rat. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 36, n. 2–3, p. 320–329, 2009.

DAVIES, S. L. et al. Extracellular calcium- and magnesium-mediated regulation of passive calcium transport across Caco-2 monolayers. Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes, v. 1778, n. 10, p. 2318–2324, 2008.

DE SOUZA, J. et al. Comparison of bidirectional lamivudine and zidovudine transport using MDCK, MDCK-MDR1, and Caco-2 cell monolayers. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 98, n. 11, p. 4413–4419, 2009.

DEFERME, S.; ANNAERT, P.; AUGUSTIJNS, P. In Vitro Screening Models to Assess and Metabolism. In: Drug Absorption Studies: In Situ, In Vitro and In Silico Models. [s.l: s.n.]. p. 182–215.

DEZANI, A. B. et al. Determination of lamivudine and zidovudine permeability using a different ex vivo method in Franz cells. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, v. 67, n. 3, p. 194–202, 2013.

DEZANI, T. M. et al. Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) and prediction of fraction absorbed and permeability in humans: A study with antiretroviral drugs. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 104, p. 131–139, 2016.

DOS REIS SERRA, C. H. et al. Bioequivalence and pharmacokinetics of two zidovudine formulations in healthy brazilian volunteers: An open-label, randomized, single-dose, two-way crossover study. Clinical Therapeutics, v. 30, n. 5, p. 902–908, 2008.

ESCRIBANO, E. et al. Single-pass intestinal perfusion to establish the intestinal permeability of model drugs in mouse. International Journal of Pharmaceutics, v. 436, n. 1–2, p. 472–477, 2012.

GEOFFREY J. YUEN et al. Pharmacokinetics, Absolute, Bioavailability and Absorption Characteristics of Lamivudine. Journal of clinical pharmacology, p. 1174–1180, 1995.

GIACOMINI, K. M. et al. Membrane transporters in drug development. Nature Reviews Drug Discovery, v. 9, n. 3, p. 215–236, 2010.

GRASSI, M. et al. Understanding drug release and absorption mechanisms: a physical and mathematical approach. [s.l.] CRC Press, 2007.

HIDALGO, I. J. et al. pH-dependent transepithelial transport of cephalexin in rabbit intestinal mucosa. International Journal of Pharmaceutics, v. 98, n. 1–3, p. 83–92, 1993.

JAIN, R. et al. Intestinal absorption of novel-dipeptide prodrugs of saquinavir in rats. International Journal of Pharmaceutics, v. 336, n. 2, p. 233–240, 2007.

JUNIOR, J. B. S. et al. Evaluating Potential P-gp Substrates : Main Aspects to Choose the Adequate Permeability Model for Assessing Gastrointestinal Drug Absorption. Mini reviews in medicinal chemistry, v. 15, n. 10, p. 858–871, 2015.

KANO, E. K. et al. 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.

KIM, J. S. et al. The suitability of an in situ perfusion model for permeability determinations: Utility for BCS class I biowaiver requests. Molecular Pharmaceutics, v. 3, n. 6, p. 686–694, 2006.

LANGGUTH, P. et al. Intestinal absorption of the quaternary trospium chloride: Permeability- lowering factors and bioavailabilities for oral dosage forms. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 43, n. 3, p. 265–272, 1997.

LEGEN, I.; SALOBIR, M.; KERČ, J. Comparison of different intestinal epithelia as models for absorption enhancement studies. International Journal of Pharmaceutics, v. 291, n. 1–2, p. 183–188, 2005.

LENNERNÄS, H.; NYLANDER, S.; UNGELL, A. L. Jejunal permeability: A comparison between the ussing chamber technique and the Single-Pass perfusion in humansPharmaceutical Research, 1997.

MENON, R. M.; BARR, W. H. Comparison of ceftibuten transport across Caco-2 cells and rat jejunum mounted on modified Ussing chambers. Biopharmaceutics and Drug Disposition, v. 24, n. 7, p. 299–308, 2003.

MINEO, H.; HARA, H.; SHIGEMATSU, N. Nutrient Interactions and Toxicity Melibiose , Difructose Anhydride III and Difructose Anhydride IV Enhance Net Calcium Absorption in Rat Small and Large Intestinal Epithelium by Increasing the Passage of Tight Junctions In Vitro. The Journal of nutrition, v. 132, n. August, p. 3394–3399, 2002.

MOTZ, S. A. et al. Permeability assessment for solid oral drug formulations based on Caco-2 monolayer in combination with a flow through dissolution cell. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 66, n. 2, p. 286–295, 2007.

NARANG, V. S. et al. Bioequivalence evaluation of two marketed brands of stavudine 40mg capsules in healthy human South African volunteers. Pharmacological Research, v. 50, n. 5, p. 511–516, 2004.

NAVARRO, C. et al. Influence of polyunsaturated fatty acids on Cortisol transport through MDCK and MDCK-MDR1 cells as blood – brain barrier in vitro model. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 42, n. 3, p. 290–299, 2011.

QUEVEDO, M. A.; NIETO, L. E.; BRIÑÓN, M. C. P-glycoprotein limits the absorption of the anti-HIV drug zidovudine through rat intestinal segments. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 43, n. 3, p. 151–159, 2011.

REIS, J. M. et al. Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, ex vivo and in situ Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 48, n. 4–5, p. 781–789, 2013.

SHAH, J. C. Analysis of permeation data: Evaluation of the lag time method. International Journal of Pharmaceutics, v. 90, n. 2, p. 161–169, 1993.

SHARMA, P.; CHAWLA, H. P. S.; PANCHAGNULA, R. LC determination of cephalosporins in in vitro rat intestinal sac absorption model. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 27, n. 1–2, p. 39–50, 2002.

SOLDNER, A et al. Active transport of the angiotensin-II antagonist losartan and its main metabolite EXP 3174 across MDCK-MDR1 and caco-2 cell monolayers. British journal of pharmacology, v. 129, p. 1235–1243, 2000.

TRAPANI, G. et al. Frog intestinal Sac: A new in vitro method for the assessment of intestinal permeability. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 93, n. 12, p. 2909–2919, 2004.

ŽAKELJ, S.; ŠTURM, K.; KRISTL, A. Ciprofloxacin permeability and its active secretion through rat small intestine in vitro. International Journal of Pharmaceutics, v. 313, n. 1–2, p. 175–180, 2006.

CAPÍTULO 4: AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA ENZIMA CYP3A NA PERMEABILIDADE DE FÁRMACOS ANTIRRETROVIRAIS POR MEIO DOS MODELOS *IN VITRO* EM MICROSSOMAS E *EX VIVO* EM CÂMARAS DE DIFUSÃO VERTICAL TIPO FRANZ

RESUMO

Para que haja a adequada absorção por via oral, o fármaco contido em uma forma farmacêutica deve, primeiramente, solubilizar-se nos líquidos contidos no trato gastrintestinal (TGI). Em seguida, a substância deverá ser capaz de atravessar a parede intestinal a fim de que possa alcançar a circulação sanguínea e, posteriormente, chegar ao seu sítio de ação farmacológica. Assim, as características de solubilidade e de permeabilidade de um fármaco são, dentre outros fatores, fundamentais para a biodisponibilidade *in vivo*. Com bases nessas duas propriedades, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto como uma importante ferramenta que auxilia na predição da absorção de substâncias, no desenvolvimento de novos fármacos e novas formulações. Além da solubilidade e da permeabilidade, o metabolismo também representa um aspecto relevante para a biodisponibilidade e, devido à isto, o Sistema de Classificação de Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF) foi proposto como uma ferramenta complementar que auxilia na compreensão do comportamento do fármaco *in vivo*. O SCBDF classifica os fármacos com base nas características de solubilidade e metabolismo, o qual também ocorre no TGI. O intestino é um dos principais sítios extra-hepáticos encontrados no organismo capaz de expressar diferentes enzimas, dentre as quais as CYP3A4 e CYP3A5. O metabolismo pré-sistêmico intestinal é considerado de suma importância nos processos de absorção e, em alguns casos, apresenta-se como responsável pela baixa biodisponibilidade oral de determinados fármacos. Com base no exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do metabolismo pré-sistêmico na absorção de fármacos antirretrovirais (estavudina, lamivudina e zidovudina), uma vez que tais substâncias apresentam variações na biodisponibilidade *in vivo* que devem ser investigadas. No presente estudo, o metabolismo intestinal foi avaliado por meio do emprego de segmentos intestinais em câmaras de difusão vertical tipo Franz com o uso de inibidor de enzimas CYP3A (cetoconazol). De maneira complementar, foram realizados estudos em microssomas com a finalidade de avaliar a porcentagem metabolizada de cada fármaco. Os resultados em microssomas na ausência e na presença de inibidor foram: de 16,56% para 19,79% para estavudina, de 14,56% para 15,55% para a lamivudina e de 17,85% para 16,48% para a zidovudina. Já nos ensaios em segmentos intestinais em camaras de difusão tipo Franz, os valores apresentados foram: de 15,6 $x10^{-6}$ para 23,5 $x10^{-6}$ cm/s para a estavudina, de 12,6 $x10^{-6}$ para 27,3 $x10^{-6}$ cm/s para a lamivudina e de 25,4 $x10^{-6}$ para 40,5 $x10^{-6}$ cm/s para a zidovudina. Os ensaios realizados em segmentos intestinais e em microssomas não demonstraram a influência significativa das enzimas CYP3A nos processos de metabolização dos antirretrovirais. Assim, os resultados indicaram que a absorção oral das referidas substâncias não é limitada pelas enzimas CYP3A, o que sugere a realização de ensaios mais específicos para compreender as razões relacionadas aos valores de biodisponibilidade variáveis dos fármacos antirretrovirais avaliados.

Palavras-chave: metabolismo pré-sistêmico, CYP3A, microssomas, enterócitos, absorção.

INTRODUÇÃO

A administração de medicamentos por via oral é a forma mais comum utilizada no tratamento de diversas enfermidades atualmente conhecidas. Para a adequada absorção através do trato gastrintestinal (TGI), o fármaco contido em uma forma farmacêutica deverá, primeiramente, solubilizar-se nos líquidos presentes ao longo do intestino e, em seguida, ser capaz de atravessar a parede intestinal com a finalidade de alcançar a circulação sistêmica e, consequentemente, seu sítio de ação farmacológica no organismo (SHUGARTS; BENET, 2009).

Desta forma, as características de solubilidade e de permeabilidade correspondem a importantes fatores que interferem na biodisponibilidade, a qual corresponde a uma propriedade biológica referente à extensão e à velocidade de absorção de um fármaco administrado por via oral. Assim, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto por Amidon e colaboradores (1995) como uma importante ferramenta de classificação de fármacos de acordo com a solubilidade e permeabilidade, o que contribui para a predição da absorção *in vivo* e nos processos de bioisenção de fármacos altamente solúveis e altamente permeáveis (AMIDON et al., 1995; CDER/FDA, 2000).

Entretanto, o SCB não é capaz de prever a influência de outros fatores que interferem significativamente na absorção e, por conseguinte, na biodisponibilidade. O metabolismo ao qual alguns fármacos estão sujeitos representa uma importante característica a ser considerada no desenvolvimento de fármacos. Assim, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF) foi proposto como uma ferramenta complementar ao SCB e considera a solubilidade e o metabolismo na predição da biodisponibilidade *in vivo* de fármacos administrados por via oral (BENET, 2013; HOSEY; CHAN; BENET, 2016; WU; BENET, 2005).

Desta maneira, os três principais fatores de grande relevância nos processos de absorção intestinal a serem considerados nas etapas iniciais de desenvolvimento e seleção de fármacos incluem a solubilidade, a permeabilidade e o metabolismo. Os ensaios de solubilidade são simples e de fácil execução, uma vez que tais experimentos são descritos no guia de bioisenção baseado no SCB e publicado pela *Food and Drug Administration* (FDA) (AMIDON et al., 1995; CDER/FDA, 2000; WU; BENET, 2005).

Para os ensaios de permeabilidade, variados métodos são descritos no guia da FDA. Além disso, o desenvolvimento de novos modelos tem permitido o estudo

de diferentes fatores que interferem na predição da absorção *in vivo*. Desta maneira, os mesmos experimentos empregados na determinação da permeabilidade podem também ser de grande aplicação para os ensaios de transporte de fármacos e metabolismo mediante algumas adaptações e/ou alterações nos protocolos experimentais (LUO et al., 2013; SJÖGREN et al., 2014).

O metabolismo de fármacos oralmente administrados tem se apresentado como um importante fator interferente na biodisponibilidade observada *in vivo*, conforme previamente mencionado. Entretanto, a execução de experimentos para determinar a ocorrência de metabolismo em diferentes sítios metabólicos é complexa quando realizados em ensaios *in vivo*. Assim, os estudos de metabolismo envolvem o uso de distintos modelos, incluindo ensaios *in vitro* e *ex vivo* (SJÖGREN et al., 2014).

O metabolismo intestinal ocorre ao longo do TGI, embora a distribuição de enzimas seja heterogênea. O intestino é um dos principais sítios extra-hepáticos responsável pelas variações de biodisponibilidade oral observada *in vivo* e a presença de enzimas nos enterócitos constitui uma barreira bioquímica à absorção de xenobióticos (LIN; LU, 2001; PEREIRA DE SOUSA; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2014; SJÖGREN et al., 2014).

A superfamília CYP3A está presente em grande quantidade do intestino delgado, o que representa mais de 80% do total de enzimas no TGI. A principal isoenzima encontrada é a CYP3A4. A isoenzima CYP3A5 também apresenta uma importante atividade metabólica e é mais facilmente encontrada no intestino do que no fígado de seres humanos (PEREIRA DE SOUSA; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2014; SJÖGREN et al., 2014).

Os enterócitos apresentam em seu interior uma quantidade considerável de enzimas metabolizadoras. Entretanto, poucos estudos são relatados na literatura em relação ao metabolismo pré-sistêmico intestinal e seu impacto sobre os processos de absorção e, consequentemente, biodisponibilidade de alguns fármacos, tais como os antirretrovirais (CUMMINS et al., 2003; KRISHNA; KLOTZ, 1994; LIN; LU, 2001; SJÖGREN et al., 2014; YANG et al., 2007).

Os fármacos antirretrovirais são amplamente utilizados no tratamento farmacológico da síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids) e os valores de biodisponibilidade oral de fármacos como estavudina, lamivudina e zidovudina são variáveis, o que pode estar relacionado aos mecanismos envolvidos na absorção

dos referidos fármacos, como o metabolismo intestinal (BRUNTON LL; CHABNER BA; KNOLLMANN BC., 2011; SILVA et al., 2012; SOARES et al., 2013; STRAUCH et al., 2011).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o metabolismo pré-sistêmico dos fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina em segmentos intestinais de ratos em câmaras de difusão vertical tipo Franz. De maneira complementar, a porcentagem metabolizada de cada substância foi avaliada por meio do emprego de microssomas com a finalidade verificar o impacto dos processos metabólicos causados pelas enzimas CYP3A na predição da absorção e na biodisponibilidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Os fármacos antirretrovirais, estavudina, lamivudina e zidovudina foram gentilmente doados pela Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos (São Paulo, Brasil). Os microssomas foram adquiridos da *BD Gentest* (microssomas hepáticos provenientes de ratos Sprague-Dawley). Solução PBS (tampão fosfato-salino) pH 7,4 foi adquirida da Unidade de Cultura Celular da UCSF (University of California San Francisco). NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) e cetoconazol (inibidor de CYP3A) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Todos os solventes cromatográficos foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio ($CaCl_2$), sulfato de magnésio ($MgSO_4$), bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanossulfônico (HEPES) e D-glicose foram empregados no preparo da solução Ringer-Krebs-Hepes modificado (RKHM).

Metabolismo pré-sistêmico em segmentos intestinais

Previamente à execução dos ensaios em animais, o protocolo experimental foi avaliado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) sob número de registro P386 e recebeu resposta favorável à execução dos experimentos.

A solução RKHM pH 6,8 foi preparada de acordo com a seguinte composição: 115 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,5 mM $CaCl_2$, 2,5 mM $MgSO_4$, 9 mM $NaHCO_3$, 1,2 mM KH_2PO_4, 28 mM D-glicose e 25 mM HEPES (DAVIES et al., 2008; DEZANI et al., 2013a; MOTZ et al., 2007; REIS et al., 2013; SHARMA; CHAWLA; PANCHAGNULA, 2002).

Anteriormente ao início dos ensaios, os compartimentos receptores das câmaras de difusão vertical tipo Franz foram preenchidos com solução RKHM isenta de fármaco com a finalidade de manter o sistema a 37°C antes da colocação dos segmentos intestinais no equipamento.

Ratos machos da linhagem Wistar Hannover (*Rattus norvegicus*) com peso entre 250 e 300g foram empregados nos estudos em câmaras de difusão vertical tipo Franz. Após o período de jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados com mistura de cetamina-xilazina (0,1 g/kg e 0,02 g/kg, respectivamente) por via intramuscular, segundo o protocolo P386 já descrito anteriormente (DEZANI et al., 2016).

Segmentos de jejuno foram isolados e acondicionados em solução fria de RKHM por aproximadamente vinte minutos. Em seguida, o intestino foi cuidadosamente aberto e fragmentado em porções, as quais foram adequadamente inseridas no equipamento de câmaras de difusão vertical tipo Franz após a verificação da resistência elétrica transepitelial (TEER) (DEZANI et al., 2013a; HIDALGO et al., 1993; REIS et al., 2013).

A viabilidade de cada segmento intestinal foi verificada por meio da medida de TEER (Millicel®-ERS, Millipore Corporation, MA, EUA). Porções de jejuno que apresentaram valores iniciais (antes dos experimentos) entre 70-110 $\Omega.cm^2$ e valores finais (após os experimentos) acima de 30 $\Omega.cm^2$ foram consideradas adequadas para o presente estudo (DEZANI et al., 2013a; LENNERNÄS; NYLANDER; UNGELL, 1997).

A inserção dos segmentos intestinais nas câmaras de difusão vertical tipo Franz permitiu que os tecidos biológicos fossem posicionados entre os compartimentos doador e receptor (DEZANI et al., 2013a; HIDALGO et al., 1993; LEGEN; SALOBIR; KERČ, 2005; ŽAKELJ; ŠTURM; KRISTL, 2006).

Cada fármaco antirretroviral foi previamente solubilizado em solução RKHM e o volume de 5 mL foi adicionado no compartimento doador na concentração de 40 µg /mL para estavudina, 300 µg/mL para lamivudina, 300 µg/mL para zidovudina. Para os estudos de metabolismo, o cetoconazol foi empregado como inibidor de enzima CYP3A. Esta substância foi acrescentada em cada solução contendo o fármaco antirretroviral a fim de atingir a concentração final de 50µM. O início dos experimentos (*t=0*) foi estabelecido a partir do momento de adição da solução pronta no compartimento doador.

Durante os ensaios, o borbulhamento de gases O_2 e CO_2 (95%:5%) contribuiu para a homogeneização da solução doadora, além de auxiliar na manutenção da viabilidade dos segmentos intestinais. A solução presente no

compartimento receptor foi agitada por meio magnético a 50 rotações por minuto (rpm) (DEZANI et al., 2013a).

Os experimentos *ex vivo* realizados com o emprego de segmentos intestinais em câmaras de difusão vertical tipo Franz foram conduzidos no sentido apical-basolateral (A→B) na presença ou ausência de inibidor de CYP3A. As amostras foram coletadas em intervalos regulares de tempo (30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 minutos) a partir do compartimento receptor, seguidas da reposição de meio RKHM isento de fármaco. Após as coletas, todas as amostras adquiridas foram mantidas congeladas a -20°C até a realização das análises cromatográficas.

A partir dos ensaios *ex vivo*, foi possível obter os valores de permeabilidade aparente (Papp) de cada fármaco antirretroviral estudado. Os resultados são expressos em cm/s e calculados a partir da Equação 8:

$$P_{app} = \frac{\Delta Q}{\Delta t} \cdot \frac{1}{A} \cdot \frac{1}{C_0}$$

Equação 8

onde: $\Delta Q / \Delta t$ representa o fluxo em μmol/min, ou seja, a quantidade de substância permeada através da membrana intestinal no tempo *t* , *A* corresponde à área da membrana disponível para a permeabilidade (0,20 cm^2), C_0 representa a concentração inicial do fármaco/marcador na solução doadora (DEZANI et al., 2013a).

Metabolismo pré-sistêmico em microssomas

Preparo da suspensão reacional de microssomas

Os microssomas obtidos comercialmente são mantidos sob congelamento a -80°C até o uso em experimentos. A preparação inicial é feita a partir do descongelamento dos microssomas até 4°C, quando são diluídos com PBS em

tubo cônico com capacidade para 2,0 mL. A suspensão diluída foi, então, utilizada no preparo da suspensão reacional.

Para a preparação de cada 1000 µL de suspensão reacional de microssomas (concentração final de 0,5 mg/mL) foi considerada a mistura dos seguintes componentes: 830 µL de PBS, 150 µL da suspensão contendo os microssomas, 10 µL do fármaco solubilizado em PBS na concentração de 1 mM e 10 µL de NADPH na concentração de 100 mM.

Avaliação da viabilidade da suspensão reacional de microssomas

Previamente à execução de todos os experimentos, a avaliação da viabilidade dos microssomas foi realizada com a finalidade de verificar a atividade enzimática da suspensão utilizada nos estudos de metabolismo pré-sistêmico. Para esta avaliação, o midazolam foi empregado como um marcador de metabolismo por ser substrato de enzimas CYP3A4. O método seguiu o mesmo procedimento adotado para a determinação da influência do metabolismo em relação aos fármacos estavudina, lamivudina e zidovudina, conforme descrito a seguir.

Experimentos de metabolismo em microssomas

Imediatamente após o preparo, a suspensão reacional de microssomas contendo o fármaco sem adição de NADPH, foi pré-incubada a 37±0,5°C por 5 minutos. Após o período de estabilização, foi realizada a primeira coleta de amostra, a qual corresponde ao $t = 0$. Em seguida, foi adicionada a solução NADPH. Durante o período do experimento, todos os tubos foram mantidos a 37±0,5°C e as demais coletas foram realizadas (100 µL) nos tempos 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos.

Para os ensaios com inibidor de CYP3A, o mesmo procedimento foi adotado, porém o cetoconazol foi empregado como inibidor de CYP3A na concentração de 0,5 mM e foi adicionado na suspensão juntamente com os fármacos do estudo.

Após a coleta de todas as amostras, 100 µL de acetonitrila gelada (4°C) foi adicionada em todos os tubos do experimento, os quais foram submetidos à agitação em vórtex com a finalidade de cessar a atividade metabólica.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata (n=3) e as amostras provenientes do estudo sem inibidor e do estudo com inibidor foram imediatamente congeladas a -80°C até a quantificação em espectrofotometria de massa (LC-MS/MS).

Porcentagem de metabolização

Os valores de metabolismo expressos em porcentagem foram obtidos a partir dos ensaios em microssomas (n=3) por meio da relação entre as quantidades de fármaco encontradas no início e no final do experimento. A porcentagem de metabolização foi calculada de acordo com a Equação 9.

$$\%\, Metabolizada = \frac{Ct}{Co}\, x\, 100$$

Equação 9

onde: C_0 representa a concentração inicial do fármaco na suspensão reacional de microssomas e Ct representa a concentração final do fármaco na suspensão reacional de microssomas.

Análise estatística dos resultados

Os resultados de Papp e porcentagem de metabolização foram estatisticamente avaliados usando a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Os resultados com índice de significância menor que 0,05 ($p<0,05$) foram considerados estatisticamente significativos (DEZANI et al., 2013a, 2016; JAIN et al., 2007; REIS et al., 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Metabolismo pré-sistêmico em segmentos intestinais e em microssomas

Segmentos intestinais de jejuno provenientes de ratos Wistar foram utilizados nos estudos de metabolismo pré-sistêmico com o emprego de câmaras de difusão vertical tipo Franz. Apesar de, em todos os casos, apresentarem um pequeno aumento nos valores de permeabilidade, na presença do inibidor, a comparação estatística dos resultados de Papp nos estudos, com e sem o inibidor, permitiu observar que todos os antirretrovirais não apresentaram mudanças significativas quando o cetoconazol foi utilizado como inibidor de CYP, conforme apresentado graficamente na Figura 4.1. A Tabela 4.1 apresenta os valores referentes à Papp e seus respectivos valores de desvios padrão obtidos para cada fármaco antirretroviral.

Figura 4.1: Representação gráfica dos resultados de Papp obtidos nos estudos de metabolismo pré-sistêmico com emprego de segmentos intestinais de jejuno em câmaras de difusão vertical tipo Franz (n=6). Os valores de Papp estão expressos em cm/s e as barras de erro indicam os respectivos valores de desvios padrão (DP)

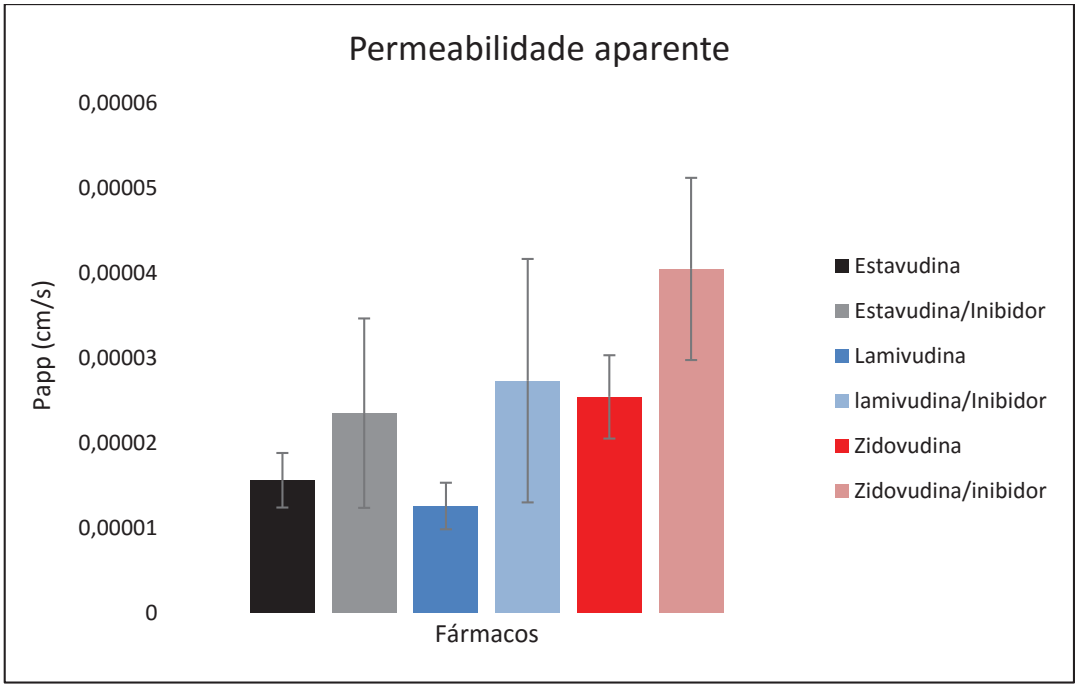


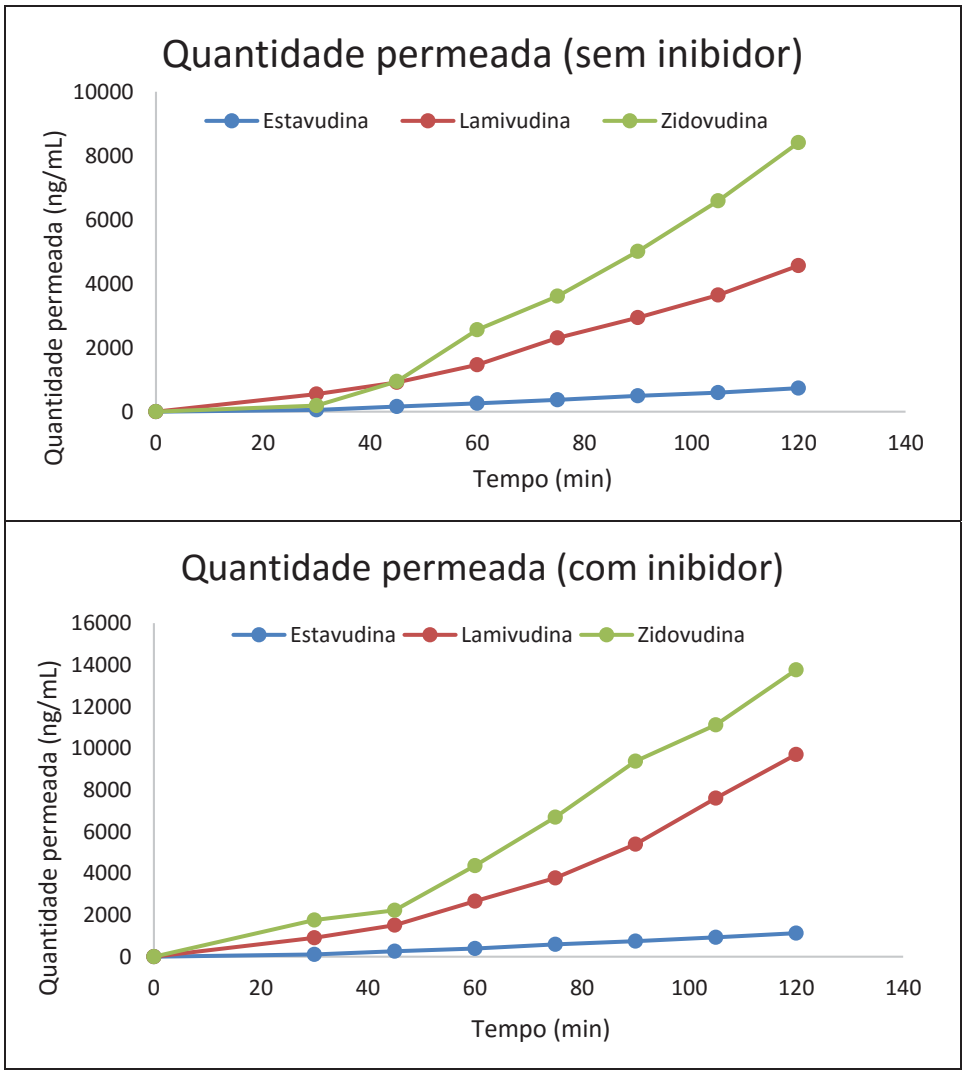
Tabela 4.1: Valores de Papp e respectivos desvios padrão (DP) obtidos nos estudos de metabolismo pré-sistêmico com emprego de segmentos intestinais de jejuno em câmaras de difusão vertical tipo Franz (n=6).

Papp ± SD (x 10^{-6} cm/s)		
Fármacos	**Sem cetoconazol**	**Com cetoconazol**
Estavudina	15,6 ±0,32	23,5 ±1,11
Lamivudina	12,6 ±0,27	27,3 ±1,43
Zidovudina	25,4 ±0,49	40,5 ±1,07

Conforme apresentado na Figura 4.1, os fármacos estavudina, lamivudina e zidovudina não apresentaram mudanças significativas entre os estudos sem e com inibidor de CYP3A cetoconazol. Assim, os perfis obtidos foram semelhantes nas duas condições estudadas, o que sugere que tais fármacos não interagiram significativamente com as enzimas CYP3A mediante as condições empregadas.

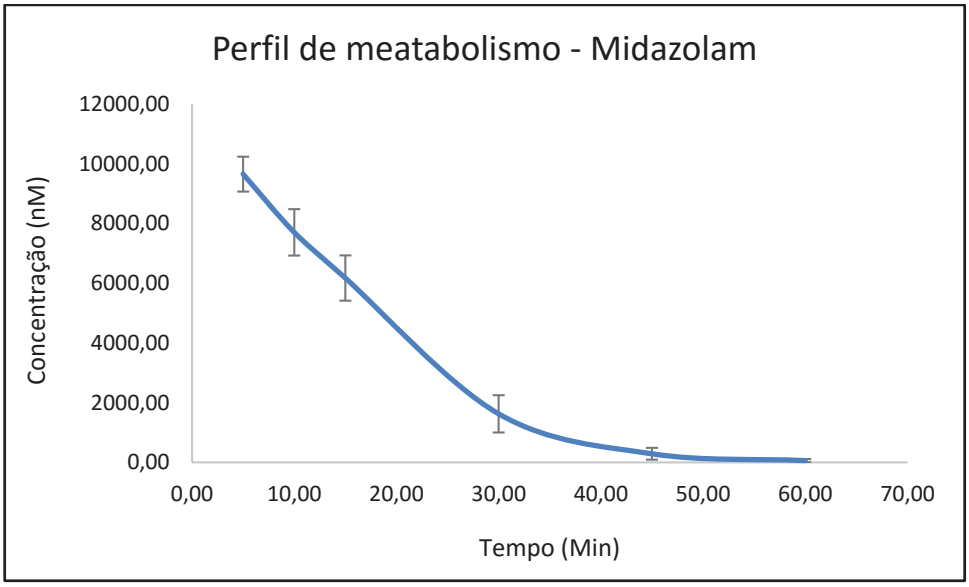
As análises das quantidades permeadas ao longo do tempo de experimento em câmaras de difusão vertical tipo Franz mostraram que nenhum fármaco antirretroviral sofreu interferência nos processos absortivos em função da saturação das enzimas CYP ou transportadores. A Figura 4.2 demonstra os perfis das quantidades permeadas em função do tempo decorrido no experimento.

Figura 4.2: Perfis das quantidades permeadas em função do tempo para a estavudina, lamivudina e zidovudina avaliadas por meio do emprego de segmentos intestinais em câmaras de difusão vertical tipo Franz (n=6)



Com relação aos estudos de metabolismo em microssomas, a suspensão reacional foi avaliada quanto à viabilidade, conforme previamente descrito. Para isso, o midazolam foi empregado com substrato de CYP3A4. Assim, as enzimas CYP3A foram adequadamente ativadas após a adição de NADPH e metabolizaram o substrato empregado, conforme demonstrado na Figura 4.3. Esta observação indicou a viabilidade da suspensão de microssomas empregada nos estudos de metabolismo pré-sistêmico, o que foi demonstrada pela atividade enzimática sobre o midazolam.

Figura 4.3: Representação gráfica da quantidade de midazolam metabolizada em função do tempo de experimento (n=3), o que indica a atividade enzimática da suspensão reacional de microssomas.



Conforme apresentado na Figura 4.3, o midazolam foi extensamente metabolizado nos ensaios com microssomas. A porcentagem de metabolismo observada para este substrato foi de 99,4%.

A elevada metabolização do midazolam em microssomas foi esperada, uma vez que este fármaco é reconhecidamente um substrato de enzimas CYP3A4 (KÜBLBECK et al., 2016). Desta forma, no tempo 60 minutos, a concentração da substância inalterada foi extremamente baixa, o que dificultou sua quantificação pelo método analítico empregado. É importante salientar que a identificação dos metabólitos formados não foi considerada no presente estudo.

Uma vez que os resultados obtidos com midazolam indicaram que a suspensão reacional de microssomas foi adequada para os estudos de metabolismo pré-sistêmico, procedeu-se os ensaios com os fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina. Neste caso, os experimentos foram realizados na ausência e na presença de inibidor de CYP3A (cetoconazol) e a porcentagem de metabolização foi determinada em função do tempo. Os valores de metabolismo para cada uma das substâncias são apresentados na Tabela 4.2.

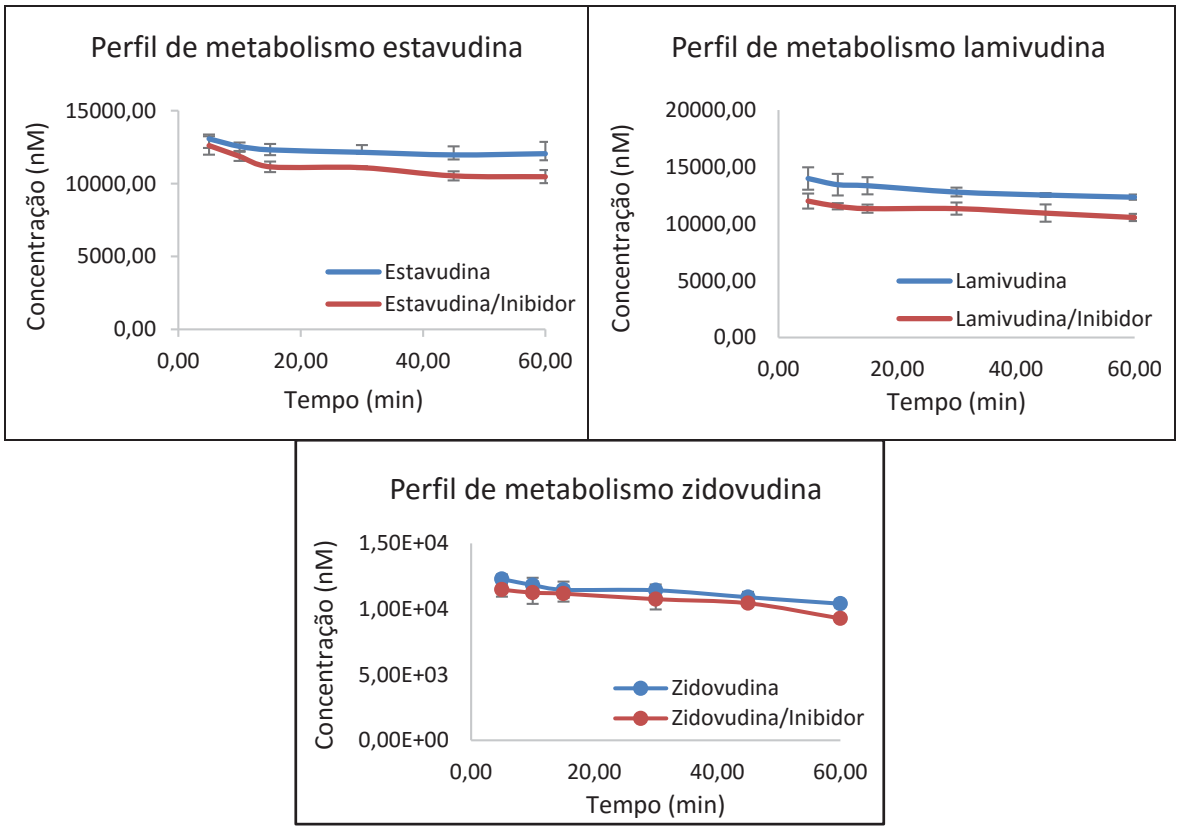
Tabela 4.2: Valores médios de porcentagem metabolizada (%) e seus respectivos desvios padrão (DP) para os fármacos antirretrovirais obtidos a partir dos ensaios de metabolismo pré-sistêmico em microssomas com e sem inibidor de CYP3A cetoconazol. Os resultados representam a média de três determinações.

Fármacos	**% Metabolizada [1]**			
	Com cetoconazol	**DP**	**Sem cetoconazol**	**DP**
Lamivudina	15,55	4,05	14,56	3,22
Estavudina	19,79	0,80	16,56	0,94
Zidovudina	16,48	1,90	17,85	1,74

[1] A comparação estatística dos resultados não indicou diferenças significativas entre os ensaios realizados com e sem cetoconazol.

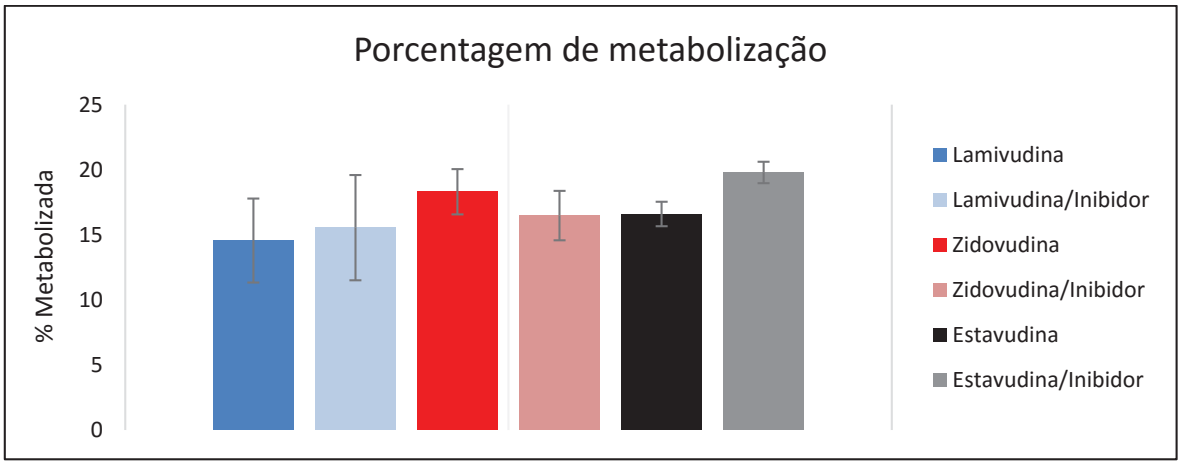
Conforme apresentado na Tabela 4.2, os valores de taxa metabolizada referentes aos fármacos antirretrovirais mostraram-se semelhantes tanto na presença quanto na ausência de cetoconazol, o que é demonstrado na representação gráfica da concentração do fármaco em função do tempo de experimento (Figura 4.4).

Figura 4.4: Perfis de concentração em função do tempo para os fármacos antirretrovirais lamivudina, estavudina e zidovudina na presença e ausência do inibidor de CYP3A (cetoconazol). Resultados obtidos por meio dos ensaios de metabolismo pré-sistêmico com emprego de suspensão reacional de microssomas (n=3).



As avaliações estatísticas dos valores obtidos para os fármacos antirretrovirais não demonstraram diferenças significativas entre os ensaios realizados na presença e ausência de cetoconazol. A Figura 4.5 apresenta os valores da porcentagem metabolizada para cada fármaco.

Figura 4.5: Porcentagens metabolizadas (%) obtidas para os fármacos estavudina, lamivudina e zidovudina nos ensaios de metabolismo pré-sistêmico com emprego de suspensão reacional de microssomas (n=3). As barras de erro representam os desvios padrão (DP).



Os estudos de metabolismo pré-sistêmico são de grande importância nas etapas iniciais de desenvolvimento farmacêutico. Entretanto, a identificação dos principais sítios metabólicos responsáveis pelas variações na biodisponibilidade de alguns fármacos é dificultada em estudos *in vivo*. Assim, a utilização de diferentes modelos pode contribuir na elucidação dos mecanismos envolvidos na absorção de fármacos oralmente administrados, bem como na biodisponibilidade (LIN; LU, 2001).

Os fármacos antirretrovirais utilizados no presente estudo apresentam valores de biodisponibilidade variáveis, o que pode estar relacionado ao processo de absorção de tais substâncias, uma vez que o intestino é um dos maiores sítios extra-hepáticos de metabolização. Isto se deve à capacidade do TGI em atuar como uma barreira física e bioquímica contra toxinas e xenobióticos. Assim, a presença de enzimas no TGI deve ser considerada durante o desenvolvimento de novos fármacos, bem como nos estudos para compreender a cinética de absorção de substâncias (LIN; LU, 2001; PEREIRA DE SOUSA; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2014; SJÖGREN et al., 2014).

Os mecanismos envolvidos nos processos absortivos dos fármacos antirretrovirais não são completamente esclarecidos e poucas informações são encontradas na literatura. Além disso, a biodisponibilidade de fármacos como

estavudina, lamivudina e zidovudina indica variabilidade nos processos de absorção que pode estar relacionada ao envolvimento de transportadores e de enzimas intestinais.

Os resultados apresentados no presente estudo objetivaram identificar se os fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina são substratos de CYP3A. A estavudina apresenta biodisponibilidade oral em torno de 82±5% e é classificada como classe I do SCB e classe III do SCBDF. Sua porcentagem de excreção na urina na forma inalterada é de 39%, o que indica uma metabolização considerável, o que não foi observado no presente estudo. Entretanto, não existem estudos de metabolismo sobre este fármaco que levam a concluir sobre sua metabolização (BENET; BROCCATELLI; OPREA, 2011; BRUNTON LL; CHABNER BA; KNOLLMANN BC., 2011; LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004; SILVA et al., 2012).

A lamivudina apresenta biodisponibilidade variável em torno de 86±17% e é 67-70%, e é excretada na forma inalterada na urina. Esta porcentagem indica metabolismo baixo, porém não são discutidos na literatura os sítios de metabolização deste fármaco. Este fármaco é classificado como SCB classe I ou II e SCBDF classe III e, conforme dados da literatura, somente de 5 a 10% do fármaco sofre metabolização (BENET; BROCCATELLI; OPREA, 2011; BRUNTON LL; CHABNER BA; KNOLLMANN BC., 2011; HOSEY; CHAN; BENET, 2016; LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004; STRAUCH et al., 2011).

A zidovudina apresenta o menor valor de biodisponibilidade oral em relação à lamivudina e à estavudina: 63±10%. Este fármaco é extensamente metabolizado, sendo sua porcentagem de eliminação na forma inalterada na urina de apenas 2,8%. Entretanto, os resultados obtidos no presente estudo em segmentos intestinais e com microssomas não indicaram o envolvimento de metabolismo oxidativo pela CYP3A nos processos metabólicos da zidovudina. Este fármaco é classificado como SCB classe I e SCBDF classe I. Entretanto, esta substância sofre fortemente o efeito de metabolismo pré-sistêmico, conforme observado pela faixa de valores de sua biodisponibilidade (BENET; BROCCATELLI; OPREA, 2011; BRUNTON LL; CHABNER BA; KNOLLMANN BC., 2011; LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004; SOARES et al., 2013).

Com base no exposto, o presente estudo procurou investigar se o metabolismo oxidativo causado pelas enzimas CYP3A está envolvido diretamente

na influência da biodisponibilidade dos referidos fármacos antirretrovirais. Assim, os ensaios de metabolismo pré-sistêmico em segmentos intestinais e em microssomas, descritos no presente estudo demonstraram que todas as substâncias não apresentam interações relevantes com as enzimas CYP3A. Desta forma, o que poderia justificar os valores de biodisponibilidade oral dos três fármacos antirretrovirais seria o envolvimento de outras enzimas (provavelmente enzimas relacionadas aos processos de metabolismo de fase II). Assim, ao considerar os processos de absorção através do TGI, as enzimas metabolizadoras de fase II e o envolvimento de transportadores devem ser investigados com maior profundidade com objetivo de buscar as razões para os valores de biodisponibilidade oral reportados na literatura. Em outras palavras, investigar quais são os fatores limitantes para a biodisponibilidade incompleta dos fármacos antirretrovirais.

CONCLUSÃO

Os estudos de metabolismo pré-sistêmico descritos no presente trabalho buscaram identificar se os fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina possuem interação com enzimas oxidativas CYP3A. Apesar de seus valores de biodisponibilidade estarem abaixo de 90%, conforme relatos na literatura, é necessário investigar as limitações da biodisponibilidade incompleta observada *in vivo*. Assim, os resultados obtidos no presente estudo não demonstraram a interação entre os antirretrovirais estudados e as enzimas CYP3A presentes nos segmentos intestinais e na suspensão reacional de microssomas.

Entretanto, os dados obtidos no presente estudo sugerem que experimentos mais aprofundados sejam realizados para investigar o envolvimento de transportadores e outras enzimas, principalmente aquelas relacionadas ao metabolismo de fase II, sobre a biodisponibilidade oral de tais fármacos, uma vez que o metabolismo oxidativo é mínimo, com base nas condições adotadas no presente estudo.

Portanto, os estudos realizados em segmentos intestinais e em suspensão reacional de microssomas indicaram que o metabolismo oxidativo que ocorre nos enterócitos não é um processo limitante à absorção dos fármacos antirretrovirais, embora ensaios com outros tipos de enzimas sejam recomendados com a finalidade de investigar as razões envolvidas na biodisponibilidade incompleta de tais fármacos.

REFERÊNCIAS

AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. Pharmaceutical research, v. 12, n. 3, p. 413–420, 1995.

BENET, L. Z. The role of BCS (biopharmaceutics classificatrion system) and BDDCS (Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System) in drug development. Journal of pharmaceutical sciences, v. 102, n. 1, p. 34–42, 2013.

BENET, L. Z.; BROCCATELLI, F.; OPREA, T. I. BDDCS Applied to Over 900 Drugs. The AAPS Journal, v. 13, n. 4, p. 519–547, 2011.

BRUNTON LL; CHABNER BA; KNOLLMANN BC. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. [s.l: s.n.].

CDER/FDA. Guidance for Industry waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. Center for Drug Evaluation and Research, n. August, 2000.

CUMMINS, C. L. et al. In vivo modulation of intestinal CYP3A metabolism by P-glycoprotein: studies using the rat single-pass intestinal perfusion model. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, v. 305, n. 1, p. 306–314, 2003.

DAVIES, S. L. et al. Extracellular calcium- and magnesium-mediated regulation of passive calcium transport across Caco-2 monolayers. Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes, v. 1778, n. 10, p. 2318–2324, 2008.

DEZANI, A. B. et al. Determination of lamivudine and zidovudine permeability using a different ex vivo method in Franz cells. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, v. 67, n. 3, p. 194–202, 2013.

DEZANI, T. M. et al. Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) and prediction of fraction absorbed and permeability in humans: A study with antiretroviral drugs. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 104, p. 131–139, 2016.

HIDALGO, I. J. et al. pH-dependent transepithelial transport of cephalexin in rabbit intestinal mucosa. International Journal of Pharmaceutics, v. 98, n. 1–3, p. 83–92, 1993.

HOSEY, C. M.; CHAN, R.; BENET, L. Z. BDDCS Predictions, Self-Correcting Aspects of BDDCS Assignments, BDDCS Assignment Corrections, and Classification for more than 175 Additional Drugs. The AAPS journal, v. 18, n. 1, p. 251–60, 2016.

JAIN, R. et al. Intestinal absorption of novel-dipeptide prodrugs of saquinavir in rats. International Journal of Pharmaceutics, v. 336, n. 2, p. 233–240, 2007.

KRISHNA, D. R.; KLOTZ, U. Extrahepatic Metabolism of Drugs in Humans. Clinical Pharmacokinetics, v. 26, n. 2, p. 144–160, 1994.

KÜBLBECK, J. et al. Genetically Modified Caco-2 Cells With Improved Cytochrome P450 Metabolic Capacity. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 105, n. 2, p. 941–949, 2016.

LEGEN, I.; SALOBIR, M.; KERČ, J. Comparison of different intestinal epithelia as models for absorption enhancement studies. International Journal of Pharmaceutics, v. 291, n. 1–2, p. 183–188, 2005.

LENNERNÄS, H.; NYLANDER, S.; UNGELL, A. L. Jejunal permeability: A comparison between the ussing chamber technique and the Single-Pass perfusion in humansPharmaceutical Research, 1997.

LIN, J. H.; LU, A. Y. Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v. 41, p. 535–567, 2001.

LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J. B. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 58, n. 2, p. 265–278, 2004.

LUO, Z. et al. Ex vivo and in situ approaches used to study intestinal absorption. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, v. 68, n. 2, p. 208–216, 2013.

MOTZ, S. A. et al. Permeability assessment for solid oral drug formulations based on Caco-2 monolayer in combination with a flow through dissolution cell. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 66, n. 2, p. 286–295, 2007.

PEREIRA DE SOUSA, I.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Pre-systemic metabolism of orally administered drugs and strategies to overcome itJournal of Controlled Release, 2014.

REIS, J. M. et al. Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, ex vivo and in situ Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 48, n. 4–5, p. 781–789, 2013.

SHARMA, P.; CHAWLA, H. P. S.; PANCHAGNULA, R. LC determination of cephalosporins in in vitro rat intestinal sac absorption model. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 27, n. 1–2, p. 39–50, 2002.

SHUGARTS, S.; BENET, L. Z. The role of transporters in the pharmacokinetics of orally administered drugs. Pharmaceutical Research, v. 26, n. 9, p. 2039–2054, 2009.

SILVA, A. L. L. et al. Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: StavudineJournal of Pharmaceutical Sciences, 2012.

SJÖGREN, E. et al. In vivo methods for drug absorption – Comparative physiologies , model selection , correlations with in vitro methods (IVIVC), and applications for formulation / API / excipient characterization including food. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 57, p. 99–151, 2014.

SOARES, K. C. C. et al. Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: Zidovudine (azidothymidine). Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 102, n. 8, p. 2409–2423, 2013.

STRAUCH, S. et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Lamivudine. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 100, n. 6, p. 2054–2063, 2011.

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.

YANG, J. et al. Prediction of intestinal first-pass drug metabolism. Current drug metabolism, v. 8, n. 7, p. 676–684, 2007.

ŽAKELJ, S.; ŠTURM, K.; KRISTL, A. Ciprofloxacin permeability and its active secretion through rat small intestine in vitro. International Journal of Pharmaceutics, v. 313, n. 1–2, p. 175–180, 2006.

CAPÍTULO 5: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICOS

5.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS ANTIRRETROVIRAIS NOS ESTUDOS DE PERMEABILIDADE POR MEIO DO MODELO *IN VITRO* PAMPA

RESUMO

Para fármacos oralmente administrados, a biodisponibilidade depende basicamente das características de solubilidade e de permeabilidade. Muitos métodos têm sido descritos na literatura com o propósito de avaliar a permeabilidade de fármacos, dentre os quais os modelos *in vitro* com o emprego de membranas artificias paralelas PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*). Os estudos de permeabilidade neste modelo permitem compreender o mecanismo de transporte envolvido nos processos de absorção oral de fármacos, tais como os antirretrovirais. A estavudina, lamivudina e zidovudina apresentam valores de biodisponibilidade variáveis, o que pode estar relacionado aos seus mecanismos de transporte. Assim, os estudos de permeabilidade em PAMPA dos referidos fármacos fornecem informações diretas e indiretas sobre a predição da absorção *in vivo*. Para tanto, o método empregado na quantificação das amostras é de suma importância. Uma vez que a metodologia analítica empregada seja considerada precisa e exata, a obtenção dos resultados tendem a fornecer os dados mais próximos das condições reais. Assim, o presente trabalho teve como objetivo apresentar o desenvolvimento e a validação do método analítico espectrofotométrico UV-VIS para a quantificação dos fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina e dos marcadores metoprolol e ranitidina contidos nas amostras provenientes dos ensaios de permeabilidade em modelo *in vitro* PAMPA. A validação do método foi realizada em espectrofotômetro Tecan® com comprimentos de onda de 270 nm para os três antirretrovirais, 254 nm para o metoprolol e 315 nm para a ranitidina. Para os fármacos e marcadores, a linearidade foi estabelecida entre 50 e 250 µM. Os coeficientes de determinação obtidos nos diferentes meios empregados foram de 0,9954 a 0,9998 para estavudina, de 0,9990 a 0,9998 para a lamivudina, de 0,9991 a 0,9994 para a zidovudina, de 0,9998 a 0,9999 para o metoprolol e de 0,9990 a 0,9998 para a ranitidina. Os limites de detecção apresentaram-se na faixa entre 0,11 µM e 10,00 µM. Com base nos resultados obtidos, o método espectrofotométrico desenvolvido e validado demonstrou-se adequado para a quantificação dos fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina e dos marcadores metoprolol e ranitidina provenientes dos estudos de permeabilidade por meio do modelo *in vitro* PAMPA. Além disso, os parâmetros avaliados (especificidade, linearidade, reprodutibilidade, precisão, exatidão e limites de detecção e quantificação) mostraram-se adequados em todos os meios empregados.

Palavras-chave: PAMPA, permeabilidade, espectrofotometria, UV-VIS, validação analítica.

INTRODUÇÃO

Atualmente, muitos medicamentos disponíveis no mercado são indicados para a administração oral. Assim, as características de solubilidade e de permeabilidade são extremamente importantes para a absorção através do trato gastrintestinal (TGI) e, consequentemente, para a biodisponibilidade oral de fármacos (LUO et al., 2013).

Muitos métodos são empregados na avaliação da permeabilidade de substâncias, incluindo os modelos *in vitro* com o emprego de culturas celulares Caco-2 e MDCK, *ex vivo* com o uso de segmentos intestinais isolados em câmaras de difusão ou sacos invertidos e modelos de perfusão intestinal *in situ*. Estes métodos apresentam boa correlação com os estudos *in vivo*, porém são ensaios laboriosos e, muitas vezes, envolvem questões burocráticas devido ao uso de animais ou seres humanos (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; SJÖGREN et al., 2014).

Outro modelo de grande destaque envolve os estudos *in vitro* com o emprego de membranas artificias paralelas (PAMPA). Estes experimentos são rápidos, de fácil execução e podem ser automatizados, o que permite avaliar diversos fármacos em diferentes condições (composição e pH do meio e constituição da membrana, por exemplo) (ARTURSSON; PALM; LUTHMAN, 2001; DI et al., 2003; OTIS et al., 2001).

Os ensaios de permeabilidade são empregados com a finalidade de avaliar o fluxo de transporte de uma substância a partir de um compartimento doador para um compartimento receptor. Em ensaios realizados no modelo PAMPA, somente o transporte passivo transcelular pode ser avaliado devido à impossibilidade da expressão de outros fatores relacionados aos mecanismos de permeabilidade, tais como: carreadores de influxo e/ou efluxo, enzimas metabolizadoras e espaços intercelulares. Assim, valores de permeabilidade elevados neste modelo indicam que a substância estudada apresenta como principal mecanismo de transporte a via transcelular passiva e, portanto, demonstra boa correlação com a biodisponibilidade observada *in vivo* (DEZANI et al., 2013a; REIS et al., 2013).

Os valores de biodisponibilidade de fármacos como estavudina, lamivudina e zidovudina são reportados na literatura como sendo variáveis (BRUNTON LL; CHABNER BA; KNOLLMANN BC., 2011; SILVA et al., 2011; SOARES et al., 2013). Desta maneira, as razões da biodisponibilidade incompleta podem estar relacionadas aos diferentes mecanismos de transporte envolvidos nos processos

de absorção através do TGI. Assim, estudos em PAMPA podem indicar se o transporte passivo transcelular é a via predominante envolvida na permeabilidade dos referidos fármacos.

Diante do exposto, fica evidente a necessidade do desenvolvimento de pesquisa científica visando não apenas avaliar as características de permeabilidade de alguns fármacos, mas também aprimorar protocolos que permitam a avaliação destes parâmetros de forma simples e segura.

Portanto, a análise de amostras de antirretrovirais provenientes de estudos de permeabilidade em PAMPA constitui uma importante etapa na aquisição dos resultados. A espectrofotometria apresenta grande aplicação por sua facilidade de manuseio, entretanto poucos estudos relacionados ao desenvolvimento e validação de métodos analíticos têm sido descritos na literatura (ANANDAKUMAR; KANNAN; VETRICHELVAN, 2011; BEHERA et al., 2011).

Até o presente momento, não foram encontradas na literatura metodologias analíticas envolvendo o método analalítico em espectrofotometria dos fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina. Para a análise de amostras provenientes de ensaios de permeabilidade em modelo PAMPA, o método espectrofotométrico com detecção em UV é descrito no presente trabalho.

O desenvolvimento de método analítico tem como diretriz a importância e a utilidade para o fim proposto, sendo coerente com seu objetivo e capaz de fornecer dados consistentes que assegurem a confiabilidade de resultados (ANVISA/BRASIL, 2003, 2012; ICH, 2005; USP, 2007). Assim, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar o método analítico em espectrofotômetro UV-VIS para aplicação nos estudos de permeabilidade realizados em modelo *in vitro* PAMPA. Foram considerados os seguintes parâmetros: especificidade/seletividade, linearidade, precisão e exatidão. Tais fatores estão descritos na ICH 2005, na RDC N°27/2012 e na RE N°899/2003 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (ANVISA/BRASIL, 2003, 2012; ICH, 2005; USP, 2007).

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais e equipamentos

Os fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina e os marcadores metoprolol e ranitidina (grau de pureza superior a 99%) foram fornecidos gentilmente pela Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., pela FURP (Fundação para o Remédio Popular) e pela Farmanguinhos (Instituto de Tecnologia em Fármacos).

Água ultrapurificada foi obtida através do sistema de filtração Milli-Q (Millipore Corporation, EUA). Hidróxido de sódio, tetraborato de sódio, ácido clorídrico, ácido glicocólico, dimetilsulfóxido (DMSO) 99,6% e dodecano reagente plus® (>99%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

As análises espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS para microplacas de 96 poços (Tecan® Infinite M200). Filtros Millex LCR (com membrana em PTFE) 0,45 µm e 13 mm foram empregados na filtração de solventes aquosos (Millipore Corporation, EUA).

Métodos

Ensaios de permeabilidade em modelo *in vitro* PAMPA

Os ensaios de permeabilidade dos fármacos antirretrovirais e dos marcadores de alta e de baixa permeabilidade em modelo *in vitro* PAMPA foram realizados em placas de 96 poços. Cada uma das substâncias foi avaliada em triplicata em diferentes valores de pH (3,0, 4,5, 6,8 e 7,4). A correção do pH de cada meio empregado foi realizada com ácido clorídrico 0,1 M e hidróxido de sódio 0,2 M, quando necessário (AVDEEF, 2003; KANSY; SENNER; GUBERNATOR, 1998). O Quadro 5.1 descreve o preparo de cada solução tampão utilizada nos ensaios de permeabilidade em PAMPA.

Quadro 5.1: Descrição do modo de preparo de cada meio utilizado nos estudos de permeabilidade em PAMPA. Adaptado de (REIS et al., 2013).

Solução	Modo de preparo
pH 1,2	Em balão volumétrico de 2 L foram dissolvidos 4,0g de NaCl em água purificada Milli-Q. Foram adicionados 10 mL de HCl e completou-se o volume com água purificada Milli-Q.
pH 3,0	Foram adicionados 0,96 g de ácido cítrico em balão volumétrico de 500 mL e completou-se o volume com água purificada Milli-Q.
pH 4,5	Foram adicionados 6,8 g de fosfato de potássio monobásico em balão volumétrico de 1 L e completou-se o volume com água purificada Milli-Q.
pH 6,8	Em balão volumétrico de 1 L foram adicionados 250 mL de solução de fosfato de potássio monobásico 0,2N*. Em seguida, acrescentou-se 90 mL de solução de NaOH 0,2N**. Completou-se o volume do balão com água purificada Milli-Q.
pH 7,4	Em balão volumétrico de 2 L foram adicionados 500 mL da solução de fosfato de potássio monobásico 0,2 N* e 395 mL de solução de NaOH 0,2 N**. Completou-se o volume do balão com água purificada Milli-Q.
pH 7,4 com adição de tensoativo	Em balão volumétrico de 2L foram adicionados 500 mL da solução de fosfato de potássio monobásico 0,2 N* e 395 mL de solução de NaOH 0,2 N**. Acrescentou-se 1,0g de ácido glicocólico e completou-se o volume do balão com água purificada Milli-Q.

(continua)

pH 9,0	Foram adicionados 46 mL de solução de HCl**** a 500 mL de solução de tetraborato de sódio*** e completou-se o volume do balão volumétrico de 1 L com água purificada Milli-Q.
* solução de fosfato de potássio monobásico 0,2 N	Foram dissolvidos 27,2 g de fosfato de potássio monobásico em balão volumétrico de 1 L e completou-se o volume com água purificada Milli-Q.
** solução de NaOH 0,2 N	Foram dissolvidos 8 g de NaOH em balão volumétrico de 1 L e completou-se o volume com água purificada Milli-Q.
*** solução de tetraborato de sódio (0,025M)	Foram dissolvidos 9,5 g de tetraborato de sódio em balão volumétrico de 1L e completou-se o volume com água purificada Milli-Q.
****solução de HCl (0,1M)	Foram dissolvidos 3,65 g de HCl em balão volumétrico de 1 L e completou-se o volume com água purificada Milli-Q.

A membrana lipídica foi preparada a partir da mistura de 10% de fosfatidilcolina (PC) e 0,5% de colesterol (CHO) solubilizados em n-dodecano. A solução lipídica recém-preparada foi impregnada (5 µL) nos filtros das placas receptoras de 96 poços (KANSY; SENNER; GUBERNATOR, 1998; REIS et al., 2013).

Após a impregnação, os poços das placas receptoras foram preenchidos com 300 µL de solução tampão pH 7,4 contendo o ácido glicocólico, enquanto que os poços das placas doadoras foram preenchidos com as soluções de diferentes valores de pH contendo os fármacos solubilizados. A inserção da placa doadora na receptora forma um modelo sanduíche de encaixe e o contato da membrana artificial com a solução doadora que contém o fármaco solubilizado determina o início dos experimentos (*t=0*). As placas montadas foram imediatamente levadas à uma incubadora por 15 horas a 37°C com agitação orbital de 100 rotações por

minuto. Após o período de incubação, os compartimentos doadores e receptores foram separados e tanto as soluções receptoras quanto as doadoras foram transferidas para placas de leitura UV descartáveis (REIS et al., 2013).

A determinação da permeabilidade (Pe) foi calculada de acordo com a Equação 10:

$$P_e = -\frac{2.303 V_D}{A \cdot (t - \tau_{SS}) \cdot \varepsilon_a} \cdot \left(\frac{1}{1 + r_V}\right) \cdot \log_{10}\left[1 - \left(\frac{1 + r_V^{-1}}{1 - R_M}\right) \cdot \frac{C_A(t)}{C_D(0)}\right]$$

Equação 10

onde: rv = corresponde à razão do volume dos compartimentos doador e receptor (V_D/V_A) em mL, *A* corresponde à área da membrana disponível para o processo de permeabilidade (0,3 cm^2), ε_a representa a porosidade aparente do filtro (0,76 µm) (NIELSEN; AVDEEF, 2004); $C_D(0)$ e $C_A(t)$ representam as concentrações (mol/mL) das amostras presentes nos compartimentos doador no tempo $t = 0$ e no receptor no tempo *t* (segundos), respectivamente. O τ_{SS} corresponde ao tempo de equilíbrio necessário para saturar a membrana com o soluto, estimado em $(54\ R_M + 1) \cdot 60s$ (AVDEEF, 2003). R_M, que resulta em valores de 0 a 1, corresponde à fração molar da amostra retida na membrana, definida em unidade mols (m) e calculada a partir da Equação 11

$$R_M = 1 - \left(\frac{m_{D(t)}}{m_{D(0)}}\right) - \left(\frac{m_{A(t)}}{m_{D(0)}}\right)$$

Equação 11

Validação do método espectrofotométrico UV-VIS

A validação do método espectrofotométrico foi realizada em espectrofotômetro para leitura de microplacas Tecan® M200. Os comprimentos de

onda empregados foram: 270 nm para os fármacos antirretrovirais (estavudina, lamivudina e zidovudina), 254 nm para o metoprolol e 315 nm para a ranitidina.

As concentrações consideradas para a avaliação da linearidade foram estabelecidas a partir do conhecimento prévio sobre o intervalo de absorbância de aproximadamente 0,2 a 3,0 UA (unidades de absorbância). Assim, as soluções das curvas analíticas de cada substância foram preparadas na faixa de 50 a 250 μM, conforme descrito no Quadro 5.2. A equação da reta foi obtida a partir da curva analítica por regressão linear, através do método dos mínimos quadrados (ANVISA/BRASIL, 2012).

Quadro 5.2: Formas de preparo das soluções das curvas analíticas para os fármacos e para os marcadores a partir das respectivas soluções padrão (SP, 10 mM).

Balões volumétricos de 10 mL	**Volume de SP adicionado (μL)**	**Concentração final obtida em μM**
1	50	50
2	75	75
3	100	100
4	150	150
5	200	200
6	250	250

Simultaneamente à obtenção dos dados de linearidade, foram avaliados os parâmetros de especificidade e seletividade, os quais permitiram a construção das curvas analíticas para os fármacos e marcadores do estudo em cada um dos meios utilizados (Quadro 5.1).

A seletividade/especificidade foi baseada nas leituras em UV realizadas no comprimento de onda de máxima absorbância na presença e na ausência do fármaco em sua respectiva matriz.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados a partir dos valores obtidos na construção das três curvas analíticas.

A precisão intraensaio (ensaios consecutivos) e a precisão intermediária (ensaios não consecutivos) foram realizadas em três diferentes concentrações (50 μM, 100 μM e 200 μM) em triplicata. Os resultados foram expressos pelos desvios padrão relativos (DPR) dos resultados destas análises (ANVISA/BRASIL, 2003, 2012; ICH, 2005; USP, 2007).

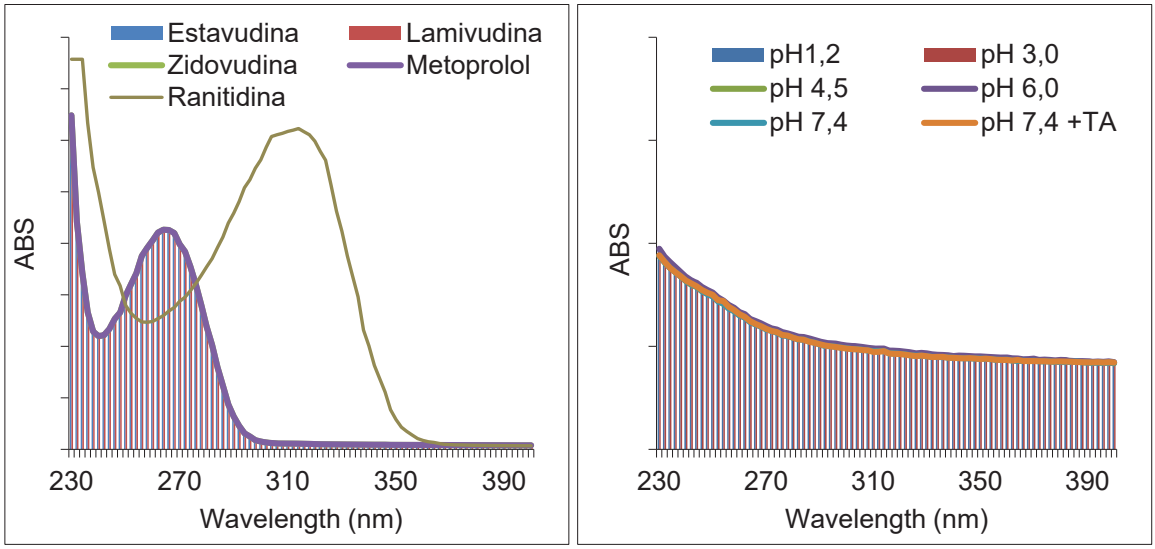
A exatidão do método foi determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade. A exatidão foi verificada a partir de, no mínimo, nove determinações, ou seja, três concentrações (50 μM, 100 μM e 200 μM) com três réplicas cada. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (ANVISA/BRASIL, 2012; ICH, 2005; USP, 2007).

A estabilidade dos fármacos foi verificada utilizando as diferentes concentrações das soluções padrão (50 μM, 100 μM e 200 μM) mantidas a 37°C, durante 12 horas nos meios utilizados (descritos no Quadro 5.1). Os resultados foram expressos em porcentagens de desvio (ANVISA/BRASIL, 2003, 2012; USP, 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A especificidade/seletividade do método foi avaliada por meio da simples conferência dos espectrogramas na presença e na ausência dos fármacos e marcadores empregados. A Figura 5.1 demonstra a especificidade para cada substância e para cada meio utilizado nos experimentos de permeabilidade em PAMPA (descritos no Quadro 5.1).

Figura 5.1: Representações gráficas derivadas das leituras de absorbância para os fármacos estavudina, lamivudina, zidovudina e para os marcadores metoprolol e ranitidina solubilizados nos meios pH 3,0, pH 4,5, pH 6,8, pH 7,4 e pH 7,4 com tensoativo (pH 7,4+TA).



A linearidade consistiu na capacidade do método analítico em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais às concentrações do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2012; ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2014).

O método espectrofotométrico desenvolvido para a quantificação dos fármacos propostos, em todas as condições adotadas no estudo, mostrou-se linear no intervalo de concentração definido, uma vez que os coeficientes de determinação (r) foram superiores a 0,99, conforme apresentado na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Resultados dos coeficientes de determinação (r) obtidos a partir das análises de regressão linear das curvas analíticas nos meios pH 3,0, pH 4,5, pH 6,8, pH 7,4 e pH 7,4 com tensoativo (pH 7,4+TA).

Fármacos	pH 1,2	pH 3,0	pH 4,5	pH 6,8	pH 7,4	pH 7,4+TA
Estavudina	0,9998	0,9993	0,9954	0,9979	0,9996	0,9994
Lamivudina	0,9990	0,9996	0,9998	0,9998	0,9997	0,9997
Zidovudina	0,9991	0,9991	0,9994	0,9995	0,9992	0,9994
Metoprolol	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999
Ranitidina	0,9998	0,9998	0,9990	0,9990	0,9991	0,9990

A precisão do método analítico foi expressa como porcentagem do desvio padrão relativo (DPR). Os resultados referentes à repetibilidade (precisão intraensaio), em todos os meios, indicaram concordância com o limite de 5% preconizado na RE 899/03, o que permite afirmar que o método, nas condições adotadas, atende o requisito de precisão (ANVISA/BRASIL, 2003). Estes valores (precisão intraensaio ou intradia) estão apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2: Valores de desvio padrão relativo (DPR) referentes aos fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina e aos marcadores metoprolol e ranitidina nos diferentes meios (pH 3,0, pH 4,5, pH 6,8, pH 7,4 e pH 7,4+TA) e em três níveis de concentração (50, 100 e 200 µM). Os resultados representam a média de três determinações.

Meios	Conc. (µM)	Estavudina (%)	Lamivudina (%)	Zidovudina (%)	Metoprolol (%)	Ranitidina (%)
pH 1,2	50	2,53	0,45	1,12	4,45	1,98
	100	0,60	1,12	1,06	4,75	1,49
	200	0,54	0,44	1,62	3,45	2,43
pH 3,0	50	1,58	1,18	0,89	2,25	1,54
	100	3,96	0,47	0,62	3,75	0,98
	200	1,84	0,56	0,69	1,18	0,97
pH 4,5	50	0,50	0,41	0,48	4,45	1,33
	100	0,58	0,42	0,67	2,28	0,83
	200	3,67	0,49	1,03	2,30	0,78
pH 6,8	50	0,67	0,78	1,18	3,72	1,11
	100	1,67	0,57	0,46	2,96	0,63
	200	0,90	0,44	0,64	2,71	0,93
pH 7,4	50	1,11	1,16	0,51	3,83	1,77
	100	0,91	1,33	1,61	1,16	0,43
	200	0,44	1,49	1,61	1,68	0,54
pH 7,4 +TA	50	2,11	1,78	2,00	1,12	1,84
	100	4,22	1,71	2,00	4,71	0,77
	200	3,74	2,45	3,16	4,31	0,79

A precisão intermediária corresponde à concordância entre os resultados obtidos no mesmo laboratório, mas em dias diferentes. A determinação da precisão intermediária foi realizada em três dias diferentes.

Os resultados referentes à precisão intermediária (interdia) são apresentados na Tabela 5.3 e representam a média de seis determinações. Os dados obtidos indicaram concordância com o limite de 5% preconizado na RE nº 899/03, o que permite afirmar que o método é preciso, nas condições adotadas (ANVISA/BRASIL, 2003).

Tabela 5.3: Valores de desvio padrão relativo (DPR) referentes aos fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina e aos marcadores metoprolol e ranitidina nos diferentes meios (pH 3,0, pH 4,5, pH 6,8, pH 7,4, pH 7,4+TA) e em três níveis de concentração (50, 100 e 200 µM). Os resultados representam a média de seis determinações

Meios	**Conc. (µM)**	**Estavudina (%)**	**Lamivudina (%)**	**Zidovudina (%)**	**Metoprolol (%)**	**Ranitidina (%)**
pH 1,2	50	1,76	2,87	1,59	1,27	1,86
	100	1,19	1,09	1,20	0,67	1,40
	200	0,55	0,85	1,59	0,81	2,28
pH 3,0	50	1,22	2,45	4,46	0,70	2,12
	100	0,80	1,01	1,37	1,18	1,96
	200	0,59	1,02	1,18	0,76	1,96
pH 4,5	50	0,54	0,87	2,63	1,58	1,25
	100	0,82	0,88	0,85	0,77	0,90
	200	1,19	0,91	1,14	1,90	0,87
pH 6,8	50	0,97	1,88	2,69	1,23	1,06
	100	0,97	2,33	1,01	0,82	1,01
	200	1,01	0,44	1,13	0,96	1,20
pH 7,4	50	0,54	1,54	2,37	0,95	0,88
	100	0,67	2,28	1,84	1,64	3,30
	200	0,44	2,61	1,78	0,41	3,56
pH 7,4 +TA	50	0,54	1,64	2,46	0,95	2,08
	100	0,67	1,68	2,32	1,64	2,12
	200	0,44	2,42	2,93	0,41	2,18

Os resultados referentes aos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para os fármacos e marcadores do estudo estão apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4: Valores médios referentes aos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) em µM em relação aos fármacos estavudina, lamivudina e zidovudina e aos marcadores metoprolol e ranitidina nos diferentes meios (pH 3,0, pH 4,5, pH 6,8, pH 7,4, pH 7,4+TA). Os valores representam a média de três determinações.

Meios	**Estavudina LD/LQ**	**Lamivudina LD/LQ**	**Zidovudina LD/LQ**	**Metoprolol LD/LQ**	**Ranitidina LD/LQ**
pH 1,2	04,50/20,00	01,32/04,40	00,65/02,18	06,00/30,00	00,11/00,37
pH 3,0	10,00/34,00	02,62 /08,73	00,66/02,20	06,00/20,00	03,76/12,53
pH 4,5	03,50/11,00	03,25/10,83	02,35/07,84	09,00/25,00	02,60/08,66
pH 6,8	09,00/11,00	03,84/12,82	06,96/23,20	10,00/40,00	00,87/02,91
pH 7,4	06,00/20,00	04,26/14,22	09,77/32,58	05,00/40,00	00,31/01,05
pH 7,4 +TA	06,00/20,00	01,82/06,07	01,63/05,44	05,00/40,00	09,32/31,06

Os resultados obtidos em todos os meios demonstraram que os LD e LQ são satisfatórios, uma vez que os valores foram inferiores à menor concentração utilizada na construção das curvas analíticas (50 uM), conforme apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5.5: Valores médios de exatidão (em %) do método espectrofotométrico desenvolvido para a quantificação dos fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina e dos marcadores metoprolol e ranitidina. Os resultados representam a média de três determinações.

Meios	Conc. (μM)	Estavudina (%)	Lamivudina (%)	Zidovudina (%)	Metoprolol (%)	Ranitidina (%)
pH 1,2	50	99,84	99,14	95,94	100,11	97,60
	100	99,62	102,89	101,76	100,22	95,75
	200	99,67	100,71	99,90	100,48	96,44
pH 3,0	50	99,89	95,32	96,34	100,06	99,43
	100	99,74	101,74	100,67	100,38	104,58
	200	99,64	101,57	99,54	100,45	95,38
pH 4,5	50	99,95	97,17	96,54	100,14	99,44
	100	99,74	100,4	100,81	100,24	95,34
	200	99,28	99,41	100,06	101,14	95,20
pH 6,8	50	99,91	98,92	97,91	100,11	99,76
	100	99,70	100,57	101,27	100,26	104,49
	200	99,40	99,24	99,61	100,57	95,75
pH 7,4	50	99,96	95,33	100,82	100,09	101,04
	100	99,78	103,46	100,02	100,52	104,63
	200	99,73	99,27	99,52	100,24	95,40
pH 7,4 +TA	50	99,91	101,09	99,85	100,11	99,10
	100	99,70	104,44	103,50	100,26	98,96
	200	99,40	104.37	104,76	100,57	96,34

A análise da estabilidade de cada fármaco e de cada marcador nos meios empregados nos estudos (pH 3,0, pH 4,5, pH 6,8, pH 7,4 e pH 7,4+TA) considerou três níveis de concentração (50, 100 e 200 μM). As amostras apresentaram-se estáveis por, no mínimo, 12 horas sob temperatura de 37°C, conforme valores de exatidão (%) demonstrados na Tabela 5.6.

Tabela 5.6: Valores de exatidão (%) obtidos a partir da avaliação da estabilidade dos fármacos antirretrovirais e dos marcadores nos diferentes meios empregados (pH 3,0, pH 4,5, pH 6,8, pH 7,4, pH 7,4+TA). Os resultados expressam a média de três determinações.

Exatidão (%)						
Meio.	**Conc. (µM)**	**Estavudina (0/12 h)**	**Lamivudina (0/12 h)**	**Zidovudina (0/12 h)**	**Metoprolol (0/12 h)**	**Ranitidina (0/12 h)**
pH 1,2	50	099,28/099,00	099,67/098,06	096,86/096,77	100,92/099,76	096,80/097,60
	100	100,90/101,15	103,03/102,89	102,09/100,20	099,95/098,80	103,49/104,66
	200	100,15/100,02	101,30/099,83	098,95/097,49	099,17/099,42	097,02/096,44
pH 3,0	50	099,48/100,19	097,34/101,93	095,77/097,38	098,00/098,03	103,57/098,47
	100	099,68/099,77	102,93/096,92	100,45/098,95	099,58/099,24	104,58/104,12
	200	099,85/100,53	103,82/099,37	099,92/098,77	101,97/100,95	097,29/095,39
pH 4,5	50	101,38/100,77	098,19/100,61	096,51/096,89	099,83/099,53	103,58/99,06
	100	100,20/100,03	100,91/099,41	100,48/099,07	100,90/100,59	104,21/103,19
	200	100,38/100,50	099,92/098,46	100,63/099,29	099,70/099,75	095,20/096,81
pH 6,8	50	099,24/098,75	098,84/097,49	102,80/098,85	099,79/099,82	099,37/098,91
	100	100,34/099,33	100,34/099,64	101,15/099,36	099,27/099,37	104,36/103,20
	200	098,23/098,19	098,90/100,5	099,49/097,82	099,17/099,45	096,62/095,54
pH 7,4	50	100,94/099,41	095,87/104,76	100,79/097,40	099,77/098,88	100,39/099,91
	100	101,58/100,21	096,83/102,55	099,62/100,48	101,37/101,25	103,52/102,05
	200	099,86/099,54	098,01/103,81	098,98/099,93	099,87/100,05	097,31/095,91
pH 7,4 +TA	50	100,94/099,41	104,60/103,35	99,87/96,17	099,77/098,88	100,68/101,07
	100	101,58/100,21	104,50/104,20	104,74/101,97	101,37/101,25	103,29/102,82
	200	099,86/099,54	104,67/103,24	104,14/101,50	099,87/100,05	104,10/103,60

O método espectrofotométrico apresentou-se adequado para a quantificação das amostras obtidas a partir dos ensaios de permeabilidade por meio do modelo *in vitro* PAMPA, o que demonstra a capacidade do método analítico em determinar

as concentrações dos fármacos nas amostras. Os valores de permeabilidade (Pe) são apresentados na Tabela 5.6.

Os valores obtidos de permeabilidade demonstraram valores precisos de leitura evidenciando a capacidade do método analítico na determinação analítica de amostras provenientes do estudo em PAMPA, conforme demostrado na Tabela 5.7.

Tabela 5.7: Valores de permeabilidade (Pe) e seus respectivos desvios padrão (DP) obtidos para os fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina e para os marcadores ranitidina e metoprolol (n=3).

Substância	**Pe ± DP (x 10^{-6} cm/s)**			
	pH 3,0	**pH 4,5**	**pH 6,8**	**pH 7,4**
Metoprolol	27,01±4,19	30,74±6,04	27,48±4,98	56,61±4,80
Ranitidina	1,86±0,43	3,31±0,30	0,84±0,09	5,25±0,49
Estavudina	0,83±0,14	0,58±0,12	0,74±0,11	0,69±0,07
Lamivudina	0,53±0,32	0,20±0,08	0,25±0,12	0,51±0,01
Zidovudina	1,13±0,08	1,12±0,29	1,14±0,25	1,24±0,27

Os resultados referentes ao metoprolol (marcador de alta permeabilidade) e à ranitidina (marcador de baixa permeabilidade) apresentados na Tabela 5.7, demonstraram a capacidade do método analítico em quantificar as amostras obtidas a partir dos ensaios em PAMPA com precisão e exatidão. Além disso, o método validado foi capaz de diferenciar os valores dos desvios, o que oferece maior confiabilidade aos resultados obtidos.

Os métodos espectrofotométricos com detecção em UV desenvolvidos para a quantificação dos fármacos estavudina, lamivudina e zidovudina e dos marcadores metoprolol e ranitidina contidos em amostras provenientes dos ensaios de permeabilidade em PAMPA mostraram-se adequados. Os parâmetros de especificidade/seletividade, linearidade, reprodutibilidade, precisão e exatidão apresentaram-se de acordo com os critérios preconizados na literatura e na regulamentação atual para os fins propostos. Não foram observadas alterações significativas dos componentes da matriz empregada. As concentrações definidas

para as curvas analíticas demonstraram que os métodos foram lineares (absorbância em função da concentração). Os parâmetros de precisão e de exatidão mantiveram-se dentro dos limites preconizados (variação aceitável de 5%).

CONCLUSÃO

Os métodos espectrofotométricos em UV-VIS que utilizam placas de 96 poços aplicados para a detecção e quantificação dos fármacos estavudina, lamivudina e zidovudina e dos marcadores metoprolol e ranitidina contidos em amostras provenientes dos ensaios de permeabilidade mostraram-se adequados para a finalidade proposta.

Com base nos resultados obtidos, o método espectrofotométrico com detecção em UV pode ser uma ferramenta útil para a quantificação de amostras provenientes de ensaios de permeabilidade por meio do modelo *in vitro* PAMPA. Além disso, o emprego de método cromatográfico representa um baixo custo operacional, rapidez metodológica e fácil acesso tecnológico.

REFERÊNCIAS

ANANDAKUMAR, K.; KANNAN, K.; VETRICHELVAN, T. Development and validation of emtricitabine and tenofovir disoproxil fumerate in pure and in fixed dose combination by UV spectrophotometry. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, v. 6, n. 3, p. 1085–1090, 2011.

ANVISA/BRASIL. Resolução n 899 Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diario oficial da União, v. 29 de maio, 2003.

ANVISA/BRASIL. Resolução RE n 27, de 17 de maio de 2012. Guia para validação de métodos bioanalíticos. Diario oficial da União, v. 22 de maio, 2012.

ARTURSSON, P.; PALM, K.; LUTHMAN, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport1PII of original article: S0169-409X(96)00415-2. The article was originally published in Advanced Drug Delivery Reviews 22 (1996) 67–84.1. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 46, n. 1–3, p. 27–43, 2001.

AVDEEF, A. Absorption and Drug Development:solubility, permeability and charge state. 1st. ed. Hoboken, New Jersey: Wiley Interscience, 2003.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S.; MORRISON, R. A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, v. 44, n. 1, p. 301–312, 2000.

BEHERA, A. et al. Development and Validation of Spectrophotometric method for determination of Emtricitabine and Tenofovir Disoproxil Fumarate in Bulk and Tablet dosage form. International Journal of PharmTech Research Anindita Behera et al /Int.J. PharmTech Res, v. 3, n. 3, p. 1874–1882, 2011.

BRUNTON LL; CHABNER BA; KNOLLMANN BC. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. [s.l: s.n.].

DEZANI, A. B. et al. Determination of lamivudine and zidovudine permeability using a different ex vivo method in Franz cells. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, v. 67, n. 3, p. 194–202, 2013.

DI, L. et al. High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 38, n. 3, p. 223–232, 2003.

ICH. Validation of a analytical Procedures : text and methodology Q2(R1). Guidance, v. 1994, n. November 1996, p. 17, 2005.

KANSY, M.; SENNER, F.; GUBERNATOR, K. Physicochemical high throughput screening: Parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. Journal of Medicinal Chemistry, v. 41, n. 7, p. 1007–1010, 1998.

LUO, Z. et al. Ex vivo and in situ approaches used to study intestinal absorption. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, v. 68, n. 2, p. 208–216, 2013.

NIELSEN, P. E.; AVDEEF, A. PAMPA - A drug absorption in vitro model: 8. Apparent filter porosity and the unstirred water layer. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 22, n. 1, p. 33–41, 2004.

OTIS, K. W. et al. Evaluation of the BBMEC model for screening the CNS permeability of drugs. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, v. 45, n. 1, p. 71–77, 2001.

REIS, J. M. et al. Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, ex vivo and in situ Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 48, n. 4–5, p. 781–789, 2013.

SILVA, R. et al. In vitro study of P-glycoprotein induction as an antidotal pathway to prevent cytotoxicity in Caco-2 cells. Archives of Toxicology, v. 85, n. 4, p. 315–326, 2011.

SJÖGREN, E. et al. In vivo methods for drug absorption – Comparative physiologies , model selection , correlations with in vitro methods (IVIVC), and applications for formulation / API / excipient characterization including food. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 57, p. 99–151, 2014.

SOARES, K. C. C. et al. Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: Zidovudine (azidothymidine). Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 102, n. 8, p. 2409–2423, 2013.

USP. UNITED STATES PHARMACOPEIA30/National Formulary 25. CD ROMRockvilleUSP, , 2007.

5.2 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA A QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE ESTAVUDINA, LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA NOS ESTUDOS DE PERMEABILIDADE *EX VIVO* (CÂMARAS DE DIFUSÃO VERTICAL TIPO FRANZ)

RESUMO

Fármacos que são oralmente administrados necessitam apresentar adequadas características de solubilidade e de permeabilidade para que a absorção ocorra através do trato gastrintestinal (TGI). Muitos estudos descritos na literatura apresentam diferentes modelos que podem ser empregados para a caracterização de fármacos quanto à permeabilidade. Os métodos *ex vivo* com o emprego de segmentos intestinais em câmaras de difusão apresentam-se adequados para os estudos de predição da absorção *in vivo* e, consequentemente, da biodisponibilidade. Alguns fármacos antirretrovirais, tais como a estavudina, a lamivudina e a zidovudina, apresentam valores de biodisponibilidade variáveis, o que pode estar relacionado aos mecanismos de transporte envolvidos nos processos de absorção. Assim, os estudos de permeabilidade em segmentos intestinais podem auxiliar na elucidação dos mecanismos de transporte de fármacos e o método bioanalítico é considerado de grande relevância para a obtenção dos resultados experimentais. Assim, o presente trabalho teve como objetivo apresentar as validações dos métodos bioanalíticos cromatográficos utilizados para a quantificação dos fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina e dos marcadores metoprolol e ranitidina contidos em amostras provenientes de ensaios de permeabilidade *ex vivo* com uso de segmentos intestinais em câmaras de difusão vertical tipo Franz. Para isto, os comprimentos de onda de 270 nm para os três fármacos antirretrovirais, 254 nm para o metoprolol e 315 nm para a ranitidina foram empregados. Uma coluna cromatográfica Phenomenex® Gemini C18 de 15 cm foi utilizada como fase estacionária, enquanto que a fase móvel pH 4,5 foi constituída de mistura de tampão fosfato, acetonitrila e metanol (gradiente de concentração). Os tempos de retenção variaram de 4,5 a 21,5 minutos. Os métodos cromatográficos foram validados em cromatógrafo Merck-Hitachi acoplado ao detector UV e mostraram-se lineares para os fármacos e marcadores na faixa de concentração de 25 a 3000 ng/mL. Os coeficientes de determinação foram superiores a 0,999 para todas as substâncias e os limites de detecção obtidos apresentaram-se na faixa entre 0,3 e 6,9 ng/mL. Os parâmetros de validação analisados (especificidade, linearidade, reprodutibilidade, precisão, exatidão, limites de detecção e de quantificação) mostraram-se de acordo com o preconizado em literatura, o que permitiu concluir que os métodos desenvolvidos são adequados na quantificação das amostras.

Palavras-chave: permeabilidade, cromatografia, validação, antirretrovirais, CLAE.

INTRODUÇÃO

A via oral constitui a principal rota de administração de medicamentos em razão dos baixos custos, da segurança e da boa aceitação pelos pacientes. A forma de dosagem sólida é a apresentação farmacêutica mais comum. Assim, o fármaco presente no trato gastrintestinal (TGI) deverá apresentar-se solúvel nos líquidos contidos no lúmen intestinal e, posteriormente, capaz de atravessar a parede intestinal a fim de alcançar a circulação sistêmica e se dirigir ao seu sítio de ação farmacológica. Estas etapas são fundamentais e, embora não sejam exclusivas, podem interferir na biodisponibilidade oral de alguns fármacos. Desta forma, a solubilidade e a permeabilidade são características diretamente envolvidas nos processos de absorção, o qual ocorre através dos enterócitos presentes ao longo do TGI (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; CORÁ et al., 2011; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008; LENNERNÄS, 1998).

Os enterócitos são as células especializadas na absorção de nutrientes e substâncias e estão dispostos de maneira polarizada, ou seja, apresentam uma região apical voltada para o lúmen intestinal e uma região basolateral voltada para o lado seroso. Tanto no lado apical quanto no basolateral, as expressões de transportadores de influxo e de efluxo desempenham um importante papel nos processos de absorção e, por conseguinte, na biodisponibilidade. Os enterócitos são unidos por junções intercelulares, as quais correspondem a poros que permitem a passagem de substâncias hidrofílicas e de baixo peso molecular. A presença dos enterócitos, dos carreadores de efluxo e das junções intercelulares no TGI forma uma barreira física à absorção. Além disso, as enzimas metabolizadoras contidas no interior dos enterócitos representam uma barreira bioquímica à absorção e também influenciam na biodisponibilidade de alguns fármacos (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008; GIACOMINI et al., 2010; SJÖGREN et al., 2014).

Alguns fármacos antirretrovirais, tais como a estavudina, a lamivudina e a zidovudina, apresentam valores de biodisponibilidade variáveis, o que pode estar relacionado a limitações nos processos de absorção, como o envolvimento de transportadores (BRUNTON LL; CHABNER BA; KNOLLMANN BC., 2011; SILVA et al., 2012; SOARES et al., 2013; STRAUCH et al., 2011).

Vários modelos têm sido descritos na literatura para a avaliação da permeabilidade de fármacos. Dentre os quais, os métodos *ex vivo* demonstram uma

boa correlação com os estudos realizados *in vivo* e permitem predizer a absorção oral em seres humanos. Ensaios realizados com o emprego de segmentos intestinais em câmaras de difusão vertical tipo Franz tem sido relatado na literatura para avaliar as características de permeabilidade intestinal de fármacos. Este modelo apresenta algumas vantagens, tais como: pouco manuseio do intestino, possibilidade de amostragem contínua e pouca quantidade do fármaco é necessária para a execução dos experimentos (CAO; YU; SUN, 2008; DEZANI et al., 2013a, 2016; JAIN et al., 2007; LENNERNÄS, 2007; LOPEZ; COLLETT; BENTLEY, 2000; PRETORIUS; BOUIC, 2009; REIS et al., 2013; RÖPKE et al., 2002; SANDRI et al., 2007; TUKKER, 2000; ŽAKELJ; ŠTURM; KRISTL, 2006).

As etapas relacionadas à execução dos ensaios de permeabilidade por meio do modelo *ex vivo* em câmaras de difusão devem ser executadas com cautela a fim de assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos. Outra fase de grande importância diz respeito ao método bioanalítico empregado na quantificação das amostras provenientes dos estudos de permeabilidade. Para os ensaios realizados com segmentos intestinais inseridos em câmaras de difusão vertical tipo Franz, a faixa de concentração do analito encontrada nas amostras coletadas apresenta-se ampla devido ao tempo de execução dos experimentos. Em outras palavras, baixas concentrações são encontradas nos tempos de coleta iniciais, enquanto que concentrações mais elevadas são obtidas nos tempos finais dos ensaios (DEZANI et al., 2013a).

A necessidade de desenvolver um método cromatográfico que atenda a ampla faixa de concentração constitui um desafio. Além disso, as amostras provenientes de ensaios com segmentos intestinais apresentam impurezas relacionadas à própria execução dos ensaios, tais como presença de proteínas e alto teor de sais contidos na solução tampão empregada no estudo. Poucos métodos cromatográficos descritos na literatura para a quantificação dos três fármacos antirretrovirais supramencionados consideram tais influências, o que indica a necessidade de desenvolvimento de métodos bioanalíticos que possam ser empregados na quantificação de amostras para garantir a confiabilidade das leituras realizadas (DEZANI et al., 2013b).

A necessidade de desenvolver um método cromatográfico que atenda a ampla faixa de concentração constitui um desafio. Além disso, as amostras provenientes de ensaios com segmentos intestinais apresentam impurezas

relacionadas à própria execução dos ensaios, tais como presença de proteínas e alto teor de sais contidos na solução tampão empregada no estudo. Poucos métodos cromatográficos descritos na literatura para a quantificação dos três fármacos antirretrovirais supramencionados consideram tais influências, o que indica a necessidade de desenvolvimento de métodos bioanalíticos que possam ser empregados na quantificação de amostras para garantir a confiabilidade das leituras realizadas (DEZANI et al., 2013a).

Alguns métodos bioanalíticos em LC-MS/MS (cromatografia líquida acoplada ao detector de massas) são relatados na literatura para a quantificação de antirretrovirais em diferentes matrizes, como plasma, líquor e outros fluidos biológicos (HUANG et al., 2004). Entretanto, as características únicas da matriz utilizada em estudos *ex vivo* com emprego de segmentos intestinais em câmaras de difusão vertical tipo Franz demandam algumas adaptações e variações dos métodos cromatográficos já existentes (DE SOUZA et al., 2009; DEZANI et al., 2013a; DOS REIS SERRA et al., 2008).

Diante do exposto, fica evidente a necessidade do desenvolvimento de métodos cromatográficos para a determinação simultânea de fármacos antirretrovirais em amostras provenientes de estudos de permeabilidade *ex vivo* que empregam segmentos intestinais em câmaras de difusão vertical tipo Franz, uma vez que os métodos já existentes não consideram uma faixa ampla de concentração do analito para este tipo de ensaio. Assim, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar os métodos bioanalíticos cromatográficos UV-VIS para a quantificação dos fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina e dos marcadores de alta e de baixa permeabilidade metoprolol e ranitidina contidos em amostras provenientes de estudos de permeabilidade *ex vivo* com o emprego de segmentos intestinais em câmaras de difusão vertical tipo Franz.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais e equipamentos

Os fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina e os marcadores metoprolol e ranitidina (grau de pureza superior a 99%) foram gentilmente fornecidos pela Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., pela FURP (Fundação para o Remédio Popular) e pela Farmanguinhos (Instituto de Tecnologia em Fármacos).

Água ultrapurificada foi obtida a partir do sistema de purificação Milli-Q (Millipore Corporation, USA). Di-hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4), ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os regentes cromatográficos acetonitrila e metanol foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio ($CaCl_2$), sulfato de magnésio ($MgSO_4$), bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), D-glicose e ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanossulfônico (HEPES) foram usados no preparo da solução de Ringer-Krebs Hepes Modificada (RKHM).

Para a validação dos métodos cromatográficos, foi utilizado o CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) Merck-Hitachi LaChrom® (EUA) equipado com detector ultravioleta (G-7400), bomba (L-7100), amostrador automático (G-7200), forno de coluna (G-7300) e degaseificador a vácuo (G-7612). A conexão entre todos os componentes do sistema e do software específico (versão 4.1, 1994-2001, P / N 810866201) foi feita pela interface D-7000 para possibilitar a aquisição e o processamento de dados.

Métodos

Ensaios de permeabilidade em modelo *ex vivo* com emprego de segmentos intestinais em câmaras de difusão vertical tipo Franz

A solução Ringer-Krebs-Hepes modificada (RKHM) foi preparada de acordo com a seguinte composição: NaCl 115 mM, KCl 5 mM, $CaCl_2$ 1,5 mM, $MgSO_4$ 2,5

mM, $NaHCO_3$ 9 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, D-Glicose 28 mM e HEPES 25 mM (CLARKE, 2009; HOSOYA; TOMI, 2008; MICHAEL W. SINZ, 1960; MOTZ et al., 2007; SHARMA; CHAWLA; PANCHAGNULA, 2002).

O protocolo experimental que envolveu o uso de animais foi previamente analisado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) e recebeu resposta favorável para a execução dos experimentos sob número de registro P386.

Ratos machos da linhagem Wistar Hannover (*Rattus norvegicus*) com faixa de peso entre 250 e 300 g foram utilizados nos ensaios de permeabilidade *ex vivo* com o emprego de câmaras de difusão vertical tipo Franz. Os animais foram submetidos a 12 horas de jejum antes dos experimentos. Em seguida, os ratos foram anestesiados por injeção intramuscular de mistura de cetamina-xilazina (0,1 g/kg e 0,02 g/kg, respectivamente) e os segmentos intestinais de jejuno foram isolados e preparados para sua inserção nas câmaras de difusão vertical tipo Franz (DEZANI et al., 2013a; ESCRIBANO et al., 2012; JAIN et al., 2007; KIM et al., 2006; LANGGUTH et al., 1997).

Os segmentos intestinais foram mantidos sob temperatura de 37±0,5°C com oxigenação constante de gás carbogênio (mistura de gases contendo 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico) a um fluxo de 1 mL/min no compartimento doador (DEZANI et al., 2013a; HIDALGO et al., 1993).

Em seguida, todos os fármacos e marcadores solubilizados individualmente na solução de RKHM foram adicionados a um volume de 5 mL em cada compartimento doador separadamente. A concentração adicionada de cada substância foi de 40 µg/mL para estavudina, 300 µg/mL para lamivudina, 300 µg/mL para zidovudina, 100 µg/mL para metoprolol e de 300 µg/mL para ranitidina, sendo estas duas últimas substâncias empregadas como marcadores de alta e de baixa permeabilidade, respectivamente. Um volume de 7,0 mL de solução de RKHM isenta de fármaco ou marcador foi previamente adicionado na câmara receptora antes da inserção dos segmentos intestinais.

As coletas das amostras (1 mL) foram realizadas nos tempos 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 minutos a partir dos compartimentos receptores, com reposição do mesmo volume de solução de RKHM isento de fármaco.

A permeabilidade aparente (Papp) foi calculada de acordo com a Equação 12.

$$P_{app} = \frac{\Delta Q}{\Delta t} \cdot \frac{1}{A} \cdot \frac{1}{C_0}$$

Equação 12

onde: $\Delta Q/\Delta t$ representa o fluxo em μmol/min ou a quantidade de fármaco permeado através do segmento intestinal no tempo *t*; *A* corresponde à área de exposição do intestino (0,20 cm^2) e C_0 representa a concentração inicial do fármaco na solução colocada em contato com o segmento intestinal (compartimento doador)

Validação do método cromatográfico

Para a validação do método cromatográfico foram considerados os seguintes comprimentos de onda: 270 nm para os três antirretrovirais, 254 nm para o metoprolol e 315 nm para a ranitidina. Ressalta-se que para os marcadores metoprolol e ranitidina foram desenvolvidos métodos cromatográficos diferentes para cada um, o que não foi feito para os antirretrovirais, os quais foram quantificados simultaneamente.

Cada fase móvel empregada foi basicamente constituída por uma mistura de tampão fosfato, acetonitrila e metanol em diferentes proporções, de acordo com a substância a ser quantificada. O ajuste do pH de cada solução foi feito conforme a necessidade com o uso de ácido o-fosfórico. Em seguida, procedeu-se a filtração das soluções utilizando membrana filtrante de acetato de celulose (poro de 0,22 μm) e, logo após, cada fase móvel pronta foi levada ao banho ultrassônico para degaseificação por 30 minutos. O Quadro 5.3 apresenta as condições cromatográficas empregadas na validação dos métodos cromatográficos.

Quadro 5.3: Condições cromatográficas definidas para a quantificação dos fármacos antirretrovirais estavudina (d4T), lamivudina (3TC) e zidovudina (AZT) e dos marcadores metoprolol (METO) e ranitidina (RNT) contidos em amostras provenientes dos estudos de permeabilidade por meio do modelo *ex vivo* com o emprego de segmentos intestinais em câmaras de difusão vertical tipo Franz.

Condições cromatográficas	**d4T**	**3TC**	**AZT**	**Meto**	**RNT**
Detector	UV				
Comprimento de onda	270 nm			254 nm	315 nm
Componentes da fase móvel e proporções	Tampão fosfato 20 mM, acetonitrila e metanol (90:7:3%)			Tampão fosfato 20 mM, acetonitrila, metanol e trietilamina (69:15:15:1%)	Tampão fosfato 10 mM, e metanol (90:11:1%)
pH	4,5				7,2
Fase estacionária	Coluna cromatográfica Phenomenex® Gemini C18 de 15 cm				
Fluxo	0,7 mL/min			1,0 mL/min	

As soluções padrão (SP) dos fármacos e dos marcadores foram preparadas na concentração de 25 µg/mL partir dos padrões secundários com grau de pureza superior a 99%. Os fármacos foram dissolvidos em mistura de água ultrapurificada e metanol na proporção de 80:20% com a finalidade de obter a faixa de concentração considerada para as curvas analíticas. Todas as soluções prontas foram levadas ao banho ultrassônico para degaseificação por 30 minutos. O Quadro 5.4 apresenta a forma de preparo das soluções empregadas na construção das curvas analíticas.

Quadro 5.4: Preparo das soluções das curvas analíticas para os fármacos e marcadores a partir das respectivas soluções padrão (SP, 25 µg/mL).

Balão volumétrico (mL)	**Volume de SP adicionado (µL)**	**Concentração final obtida em ng/mL**
200	200	25
100	200	50
50	200	100
500	5000	250
250	5000	500
100	3000	750
50	3000	1500
50	4000	2000
50	6000	3000

As soluções diluídas, conforme apresentadas no Quadro 5.4, foram empregadas na obtenção das curvas analíticas. O mesmo procedimento foi realizado considerando o meio RKHM como matriz, a fim de possibilitar a adequada validação e posterior quantificação das amostras provenientes dos estudos de permeabilidade *ex vivo*.

A linearidade dos métodos cromatográficos foi avaliada a partir das curvas analíticas preparadas para cada substância. A faixa de concentração utilizada na validação dos métodos cromatográficos para a quantificação dos fármacos antirretrovirais compreendeu o intervalo de 25 a 3000 ng/mL. Para o metoprolol e ranitidina, as faixas consideradas foram de 10 a 2000 ng/mL e de 25 a 2000 ng/mL, respectivamente. O Quadro 5.5 apresenta as concentrações consideradas nas curvas analíticas para a verificação da linearidade de cada método cromatográfico (ANVISA/BRASIL, 2003, 2012; ICH, 2005).

Quadro 5.5: Concentrações das curvas analíticas para cada fármaco ou marcador.

Fármaco	Concentração (ng/mL)	Padrão Interno
Estavudina	25, 50, 100, 250, 500, 750, 1500 e 3000	Didanosina 62,5 µg/mL
Lamivudina	25, 50, 100, 250, 500, 750, 1500 e 3000	
Zidovudina	25, 50, 100, 250, 500, 750, 1500 e 3000	
Metoprolol	10, 20, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 e 2000	---
Ranitidina	25, 50, 100, 250, 500, 750, 1500 e 2000	Zidovudina 50 µg/mL

A seletividade do método foi determinada a partir da observação dos cromatogramas isolados de cada substância e da matriz. Este parâmetro teve como finalidade identificar a interferência de outros componentes não previstos nos cromatogramas (ANVISA/BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP, 2007).

O limite de detecção (LD) corresponde ao menor valor de concentração detectável, mas não necessariamente determinável com precisão e exatidão, e pode ser estimado como sendo, no mímino, 3 vezes maior que a linha de base do cromatograma obtido. Já o limite de quantificação (LQ) compreende a menor concentração determinada com precisão e exatidão e pode ser estimado como sendo 10 vezes maior que a linha de base do cromatograma obtido.

A precisão foi determinada pela análise de três níveis de concentração em réplicas de cinco no mesmo dia (precisão intraensaio) e em dias consecutivos (precisão interensaio). Esse parâmetro foi calculado a partir da Equação 13.

$$DPR\ (\%) = \frac{desvio\ padrão}{concentração\ média}\ x\ 100$$

Equação 13

onde: *DPR* representa o desvio padrão relativo expresso em porcentagem (ANVISA/BRASIL, 2012).

A exatidão indica o erro sistemático definido como a concordância entre o valor determinado pelo método proposto e o valor real. Tanto a exatidão intradia (análises realizadas no mesmo dia em réplicas de seis) quanto a interdia (análises realizadas em três dias diferentes em réplicas de nove, no total) considera três níveis de concentração (ANVISA/BRASIL, 2003, 2012; USP, 2007).

A estabilidade é um parâmetro fundamental para garantir que a substância a ser analisada não sofreu nenhum tipo de alteração. Este critério foi determinado com base nas soluções padrão mantidas congeladas a -20°C e utilizadas diariamente para a preparação das curvas de calibração. Além disso, foi considerada as amostras descongeladas e mantidas em temperatura ambiente por 4 horas e amostras processadas e mantidas por 24 e 48 horas em temperatura ambiente (ANVISA/BRASIL, 2012; CAUSON, 1997; USP, 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os métodos cromatográficos mostraram-se lineares nas faixas de concentração consideradas para a quantificação dos fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina e dos marcadores metoprolol e ranitidina. Os coeficientes de determinação (r^2) obtidos a partir das curvas analíticas foram superiores a 0,999 para todas as substâncias, conforme apresentados na Tabela 5.8.

A linearidade para os métodos cromatográficos desenvolvidos no presente estudo apresenta uma peculiaridade importante que é a ampla faixa de concentração (de 10 a 3000 ng/mL). Esta característica é relevante, uma vez que os estudos de permeabilidade por meio do modelo *ex vivo* com o emprego de segmentos intestinais em câmaras de difusão vertical tipo Franz apresentam variados valores na quantificação das amostras. Assim, a linearidade apresenta-se como um parâmetro significativo na validação de metodologias bioanalíticas para estes ensaios.

Para as amostras provenientes dos estudos de permeabilidade *ex vivo*, os LD e LQ tornam-se de suma importância devido às baixas concentrações que podem ser encontradas nos tempos iniciais dos experimentos. Isto é, em parte, intensificado quando fármacos de baixa permeabilidade são estudados. Além disso, a área intestinal disponível para a absorção é muito pequena (0,2 cm^2). Entretanto, ao final dos experimentos são observados valores elevados na quantificação das amostras, o que é devido ao acúmulo da quantidade de fármaco encontrada no compartimento receptor, especialmente para substâncias altamente permeáveis. Assim, a necessidade do desenvolvimento de um método cromatográfico capaz de atender a estes critérios por meio das concentrações das curvas analíticas empregadas é evidenciada.

Conforme mencionado anteriormente, os LD e LQ foram determinados a partir dos valores obtidos na construção das curvas analíticas. Estes limites para as substâncias avaliadas mostraram-se adequados e abaixo da primeira concentração das curvas analíticas. Os resultados referentes ao LD e ao LQ são apresentados na Tabela 5.8.

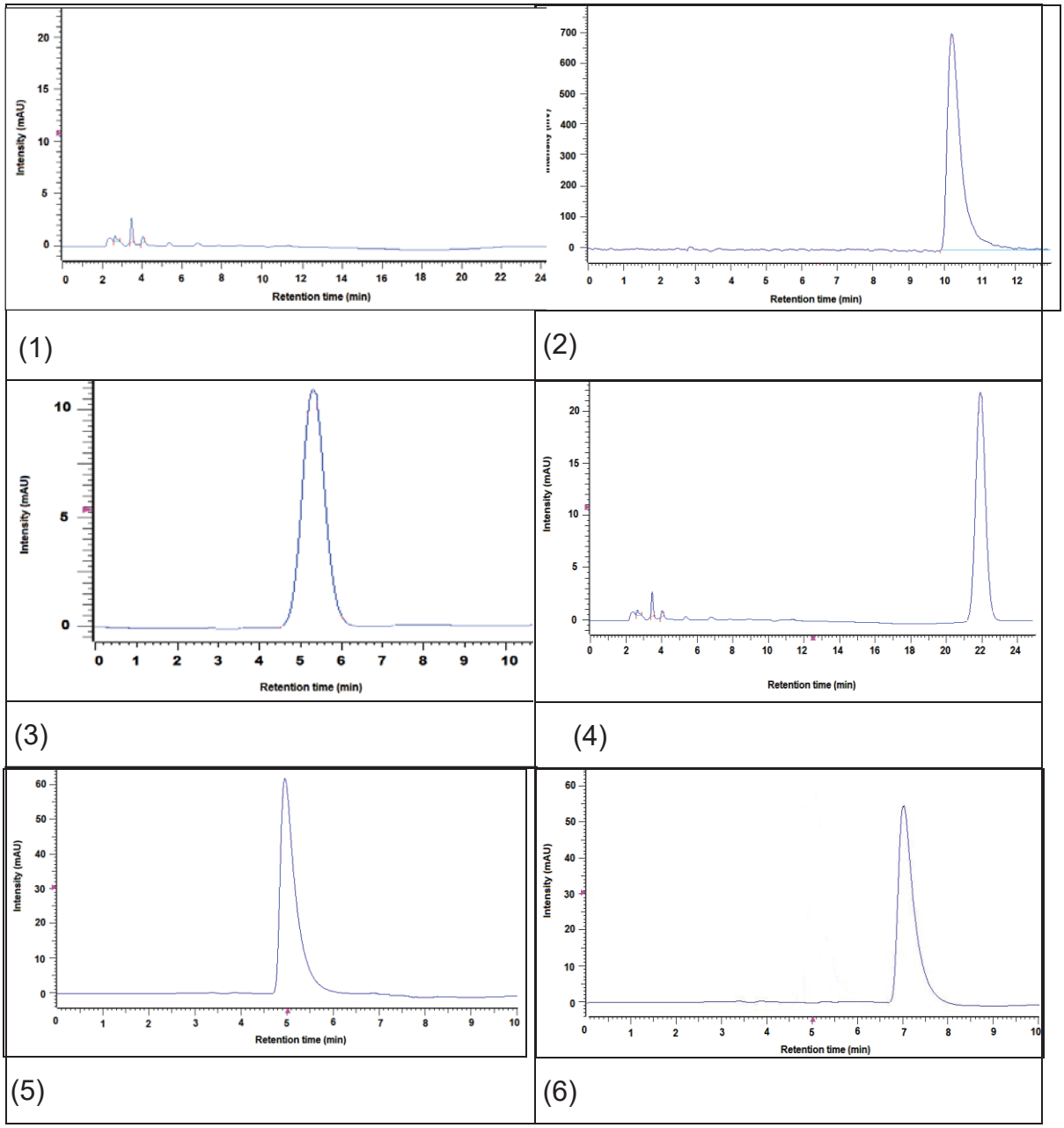
Tabela 5.8**:** Resultados de LD, LQ e coeficientes de determinação (r^2) obtidos em meio RKHM na validação do método cromatográfico para a quantificação dos fármacos antirretrovirais e dos marcadores. Os valores expressam a média de seis determinações.

Substância	Limite de detecção (ng/mL)	Limite de quantificação (ng/mL)	Coeficiente de determinação (r^2)
Lamivudina	1,63	5,42	0,9996
Zidovudina	2,07	6,90	0,9999
Metoprolol	0,60	2,18	0,9993
Estavudina	1,92	6,30	0,9996
Ranitidina	0,31	1,04	0,9999

A especificidade foi verificada por meio da comparação dos cromatogramas obtidos a partir da solução do fármaco na presença e na ausência da matriz das soluções amostras contendo estavudina, lamivudina, zidovudina, metoprolol e ranitidina na concentração de 1000 ng/mL. As substâncias do estudo apresentaram boa separação da matriz com tempos de retenção de 4,9 minutos para a lamivudina, 6,8 minutos para a estavudina, 21,5 minutos para a zidovudina, 10,0 minutos para o metoprolol e 4,5 minutos para a ranitidina.

Além disso, verificou-se também os cromatogramas referentes à fase móvel e à eluição da matriz isenta de fármaco com a finalidade de verificar a presença de possíveis interferentes. Não foram observadas diferenças significativas nos tempos de retenção exibidos (ANVISA/BRASIL, 2003, 2012; ICH, 2005; USP, 2007). A Figura 5.2 apresenta os cromatogramas obtidos para a verificação da especificidade

Figura 5.2: Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida em UV/VIS (1) Ringer-Krebs-Hepes modificado, (2) metoprolol (50 ng/mL), (3) ranitidina (50 ng/mL), (4) zidovudina (50 ng/mL), (5) lamivudina (50 ng/mL) e (6) estavudina (50 ng/mL). Todas as leituras foram realizadas em UV nos comprimentos de onda de maior absrobância para cada substância.



O parâmetro de precisão foi determinado com base na análise de três níveis de concentração (50, 500 e 1500 ng/mL) em réplicas de seis para cada concentração no mesmo dia (precisão intraensaio) e em dias diferentes (precisão interensaio). As análises de exatidão intradia (análises realizadas no mesmo dia) e

interdia (análises realizadas em três dias diferentes, preferencialmente em equipamentos e com analistas diferentes) foram realizadas utilizando três níveis de concentração (50, 500 e 1500 ng/mL) (ANVISA/BRASIL, 2012; ICH, 2005; USP, 2007). A Tabela 5.9 apresenta os valores de precisão e de exatidão para cada uma das substâncias.

Tabela 5.9: Resultados referentes à precisão e à exatidão (intraensaio e interensaio) do método bioanalítico para a quantificação de estavudina, lamivudina, zidovudina, metoprolol e ranitidina por CLAE-UV. Valores expressos em porcentagem.

Concentração	**Precisão (%)**		**Exatidão (%)**	
(ng/mL)	**Intraensaio**	**Interensaio**	**Intraensaio**	**Interensaio**
Lamivudina				
50	96,33	95,45	102,33	102,78
500	99,08	96,11	95,70	99,36
1500	98,11	97,78	100,03	101,77
Zidovudina				
50	94,17	93,13	97,70	98,05
500	99,11	96,69	100,15	101,75
1500	98,93	98,83	100,63	100,16
Metoprolol				
50	96,82	95,15	99,35	101,45
500	98,51	97,71	98,06	99,90
1500	97,12	98,41	92,91	99,93
Estavudina				
50	98,11	97,34	101,21	102,82
500	98,93	98,68	98,69	98,46
1500	99,04	98,32	99,73	99,70
Ranitidina				
50	95,67	100,05	98,17	98,78
500	99,80	99,30	99,15	100,86
1500	100,01	100,80	95,84	103,39

A avaliação da estabilidade foi realizada utilizando as amostras recém-preparadas e as amostras preparadas e submetidas após um ciclo de congelamento-descongelamento. Este parâmetro teve como finalidade garantir a confiabilidade dos resultados obtidos nos ensaios de permeabilidade. É importante considerar ainda que os fármacos solubilizados em solução RKHM foram previamente submetidos à temperatura de 37°C por 4 horas e, após as coletas, as amostras foram submetidas a um ciclo de congelamento-descongelamento até as quantificações por CLAE, de acordo com as condições descritas anteriormente para os ensaios de permeabilidade por meio do modelo *ex vivo* em câmaras de difusão vertical tipo Franz.

Com a finalidade de considerar possíveis variáveis que possam comprometer a aquisição dos resultados, as soluções doadoras foram submetidas às mesmas condições das amostras coletadas a partir dos compartimentos receptores e, assim, o mesmo método cromatográfico foi aplicado aos cálculos posteriores de permeabilidade. Os valores de exatidão referentes à estabilidade são apresentados na Tabela 5.10 e demostraram que as amostras submetidas às condições analisadas permaneceram de acordo com os limites estabelecidos de 15% de desvio (ANVISA/BRASIL, 2012).

Tabela 5.10: Resultados referentes à exatidão dos métodos cromatográficos obtidos a partir da avaliação da estabilidade das amostras de estavudina, lamivudina, zidovudina, metoprolol e ranitidina (*ciclo CD = ciclo congelamento-descongelamento*).

Tempo (horas)	**Exatidão (%)**		
	50 ng/mL	**500 ng/mL**	**1500 ng/mL**
lamivudina			
24	97,38	103,23	104,04
48	97,95	97,96	101,11
ciclo CD	94,39	104,31	103,36
zidovudina			
24	104,54	100,46	100,22
48	99,05	101,83	100,96
ciclo CD	101,52	102,16	99,82
metoprolol			
24	105,17	99,31	96,75
48	99,13	99,92	93,99
ciclo CD	90,85	96,73	92,53
estavudina			
24	102,70	98,36	98,45
48	103,24	97,16	96,84
ciclo CD	105,88	104,56	96,85
ranitidina			
24	98,69	99,07	103,76
48	95,69	96,10	96,16
ciclo CD	101,37	104,67	95,05

Conforme apresentado na Tabela 5.10, as substâncias envolvidas nos estudos de permeabilidade *ex vivo* contidas nas amostras com meio RKHM permaneceram estáveis por até 48 horas em temperatura ambiente. As amostras

submetidas a um ciclo de congelamento-descongelamento mantiveram-se dentro dos limites de exatidão preconizados na literatura (variação inferior a 15%).

As validações dos métodos cromatográficos apresentados atendem aos parâmetros exigidos e demonstram-se aptos para serem empregados na quantificação dos fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina e dos marcadores metoprolol e ranitidina contidos nas amostras provenientes dos ensaios de permeabilidade por meio do emprego de segmentos intestinais em câmaras de difusão vertical tipo Franz. Os resultados de permeabilidade aparente (Papp) são apresentados na Tabela 5.11.

Tabela 5.11: Valores médios de permeabilidade aparente (Papp, cm/s) e desvios padrão (DP) obtidos a partir dos ensaios de permeabilidade *ex vivo* com o emprego de segmentos intestinais em câmaras de difusão vertical tipo Franz para os fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e os marcadores metoprolol e ranitidina. Os valores representam a média de seis determinações.

	Papp ± DP (x 10^{-6} cm/s)				
Direção do estudo	**Estavudina**	**Lamivudina**	**Zidovudina**	**Metoprolol**	**Ranitidina**
A→ B	15,6±0,32	12,6±0,27	25,4±0,49	32,9±0,28	11,8±0,27

Os métodos bioanalíticos descritos no presente trabalho demostraram-se capazes de quantificar os fármacos antirretrovirais bem como os marcadores contidos em amostras provenientes dos estudos de permeabilidade *ex vivo*. Parâmetros de precisão e exatidão foram satisfatórios e adequados, enquanto que os valores de LD e LQ estiveram bem abaixo da primeira concentração das curvas analíticas. Os métodos cromatográficos também demonstraram boa linearidade, o que permite suas aplicações na quantificação das amostras com diferentes níveis de concentração para uma aquisição simples e rápida dos dados.

CONCLUSÃO

A validação dos métodos cromatográficos em CLAE/UV resultou em um tempo de análise total de 22,5 minutos. Entretanto, o método foi capaz de quantificar os três fármacos antirretrovirais simultaneamente. A ampla faixa de concentração das curvas analíticas demonstrou excelente linearidade para todas as substâncias, o que reforça a aplicação dos métodos nos estudos de permeabilidade *ex vivo* com emprego de câmaras de difusão vertical tipo Franz. Além disso, os LD e LQ mostraram-se adequados uma vez que estes mostraram valores muito abaixo da primeira concentração das curvas analíticas.

Com base no exposto, os métodos cromatográficos bioanalíticos foram validados e apresentaram-se adequados para a quantificação das substâncias em ensaios de permeabilidade *ex vivo*. Assim, os resultados de Papp puderam ser adquiridos com precisão, refletindo o comportamento dos fármacos mediante o segmento intestinal empregado.

REFERÊNCIAS

ANVISA/BRASIL. Resolução n 899 Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diario oficial da União, v. 29 de maio, 2003.

ANVISA/BRASIL. Resolução RE n 27, de 17 de maio de 2012. Guia para validação de métodos bioanalíticos. Diario oficial da União, v. 22 de maio, 2012.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S.; MORRISON, R. A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, v. 44, n. 1, p. 301–312, 2000.

BRUNTON LL; CHABNER BA; KNOLLMANN BC. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. [s.l: s.n.].

CAO, X.; YU, L. X.; SUN, D. Drug absortion principles. In: Biopharmaceutics Applications in Drug Development. New York: Springer, 2008. p. 75–100.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. Journal of Chromatography B: Biomedical Applications, v. 689, n. 1, p. 175–180, 1997.

CLARKE, L. L. A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology, v. 296, n. 6, p. G1151–G1166, 2009.

CORÁ, L. A. et al. Biomagnetic methods: Technologies applied to pharmaceutical research. Pharmaceutical Research, v. 28, n. 3, p. 438–455, 2011.

DAHAN, A.; WEST, B. T.; AMIDON, G. L. Segmental-dependent membrane permeability along the intestine following oral drug administration: Evaluation of a triple single-pass intestinal perfusion (TSPIP) approach in the rat. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 36, n. 2–3, p. 320–329, 2009.

DE SOUZA, J. et al. Comparison of bidirectional lamivudine and zidovudine transport using MDCK, MDCK-MDR1, and Caco-2 cell monolayers. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 98, n. 11, p. 4413–4419, 2009.

DEFERME, S.; ANNAERT, P.; AUGUSTIJNS, P. In Vitro Screening Models to Assess and Metabolism. In: Drug Absorption Studies: In Situ, In Vitro and In Silico Models. [s.l: s.n.]. p. 182–215.

DEZANI, A. B. et al. Determination of lamivudine and zidovudine permeability using a different ex vivo method in Franz cells. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, v. 67, n. 3, p. 194–202, 2013a.

DEZANI, A. B. et al. Equilibrium solubility versus intrinsic dissolution : characterization of lamivudine , stavudine and zidovudine for BCS classification. Brazilian journal of Pharmaceutical sciences, v. 49, n. 4, 2013b.

DEZANI, T. M. et al. Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) and prediction of fraction absorbed and permeability in humans: A study with antiretroviral drugs. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 104, p. 131–139, 2016.

DOS REIS SERRA, C. H. et al. Bioequivalence and pharmacokinetics of two zidovudine formulations in healthy brazilian volunteers: An open-label, randomized, single-dose, two-way crossover study. Clinical Therapeutics, v. 30, n. 5, p. 902–908, 2008.

ESCRIBANO, E. et al. Single-pass intestinal perfusion to establish the intestinal permeability of model drugs in mouse. International Journal of Pharmaceutics, v. 436, n. 1–2, p. 472–477, 2012.

GIACOMINI, K. M. et al. Membrane transporters in drug development. Nature Reviews Drug Discovery, v. 9, n. 3, p. 215–236, 2010.

HIDALGO, I. J. et al. pH-dependent transepithelial transport of cephalexin in rabbit intestinal mucosa. International Journal of Pharmaceutics, v. 98, n. 1–3, p. 83–92, 1993.

HOSOYA, K.; TOMI, M. Inner Blood—Retinal Barrier: Transport Biology and Methodology. In: Drug Absorption Studies. Boston, MA: Springer US, 2008. p. 321–338.

ICH. Validation of a analytical Procedures : text and methodology Q2(R1). Guidance, v. 1994, n. November 1996, p. 17, 2005.

JAIN, R. et al. Intestinal absorption of novel-dipeptide prodrugs of saquinavir in rats. International Journal of Pharmaceutics, v. 336, n. 2, p. 233–240, 2007.

KIM, J. S. et al. The suitability of an in situ perfusion model for permeability determinations: Utility for BCS class I biowaiver requests. Molecular Pharmaceutics, v. 3, n. 6, p. 686–694, 2006.

LANGGUTH, P. et al. Intestinal absorption of the quaternary trospium chloride: Permeability- lowering factors and bioavailabilities for oral dosage forms. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 43, n. 3, p. 265–272, 1997.

LENNERNÄS, H. Human intestinal permeability. Journal of pharmaceutical sciences, v. 87, n. 4, p. 403–410, 1998.

LENNERNÄS, H. Animal data: The contributions of the Ussing Chamber and perfusion systems to predicting human oral drug delivery in vivo. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 59, n. 11, p. 1103–1120, 2007.

LOPEZ, R. F. V; COLLETT, J. H.; BENTLEY, M. V. L. B. Influence of cyclodextrin complexation on the in vitro permeation and skin metabolism of dexamethasone. International Journal of Pharmaceutics, v. 200, n. 1, p. 127–132, 2000.

MICHAEL W. SINZ. In Vitro Metabolism: Hepatocytes. In: PEARSON, P. G.; WIENKERS, L. C. (Eds.). . Handbook of drug metabolism. 2nd ed. ed. New York: informa helthcare, 1960.

MOTZ, S. A. et al. Permeability assessment for solid oral drug formulations based on Caco-2 monolayer in combination with a flow through dissolution cell. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 66, n. 2, p. 286–295, 2007.

PRETORIUS, E.; BOUIC, P. J. D. Permeation of four oral drugs through human intestinal mucosa. AAPS PharmSciTech, v. 10, n. 1, p. 270–275, 2009.

REIS, J. M. et al. Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, ex vivo and in situ Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 48, n. 4–5, p. 781–789, 2013.

RÖPKE, C. D. et al. Evaluation of percutaneous absorption of 4-nerolidylcathecol from four topical formulations. International Journal of Pharmaceutics, v. 249, n. 1–2, p. 109–116, 2002.

SANDRI, G. et al. Nanoparticles based on N-trimethylchitosan: Evaluation of absorption properties using in vitro (Caco-2 cells) and ex vivo (excised rat jejunum) models. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 65, n. 1, p. 68–77, 2007.

SHARMA, P.; CHAWLA, H. P. S.; PANCHAGNULA, R. LC determination of cephalosporins in in vitro rat intestinal sac absorption model. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 27, n. 1–2, p. 39–50, 2002.

SILVA, A. L. L. et al. Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: StavudineJournal of Pharmaceutical Sciences, 2012.

SJÖGREN, E. et al. In vivo methods for drug absorption – Comparative physiologies , model selection , correlations with in vitro methods (IVIVC), and applications for formulation / API / excipient characterization including food. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 57, p. 99–151, 2014.

SOARES, K. C. C. et al. Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: Zidovudine (azidothymidine). Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 102, n. 8, p. 2409–2423, 2013.

STRAUCH, S. et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Lamivudine. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 100, n. 6, p. 2054–2063, 2011.

TUKKER, J. J. In vitro methods for the assessment of permeability. [s.l: s.n.].

USP. UNITED STATES PHARMACOPEIA30/National Formulary 25. CD ROMRockvilleUSP, , 2007.

ŽAKELJ, S.; ŠTURM, K.; KRISTL, A. Ciprofloxacin permeability and its active secretion through rat small intestine in vitro. International Journal of Pharmaceutics, v. 313, n. 1–2, p. 175–180, 2006.

5.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO LC-MS/MS PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS ANTIRRETROVIRAIS EM ESTUDOS *IN VITRO* DE PERMEABILIDADE E METABOLISMO

RESUMO

Quando fármacos são administrados oralmente, diversos fatores podem influenciar nos processos absortivos, dentre os quais os mecanismos de efluxo causados pela glicoproteína-P (P-gp) e o metabolismo intestinal causado pelas enzimas CYP presentes nos enterócitos. Tanto a P-gp quanto as enzimas CYP podem interferir significativamente na biodisponibilidade de alguns fármacos. Assim, estudos de efluxo e de metabolismo têm sido relatados na literatura para avaliar se determinada substância é substrato de P-gp, de CYP ou de ambos. Os modelos amplamente utilizados incluem os estudos de transporte realizados em culturas celulares e os ensaios de metabolismo em microssomas. Os mecanismos de efluxo e metabolismo não estão completamente elucidados para fármacos que apresentam biodisponibilidade variável, tais como os antirretrovirais estavudina, lamivudia e zidovudina. Assim, a realização de ensaios para investigar o envolvimento destes dois fatores é necessária. Além disso, as quantificações das amostras deverão ser realizadas por meio de método bioanalítico devidamente validado que assegure a confiabilidade dos dados adquiridos. Com base nisso, o presente trabalho teve como objetivo validar o método cromatográfico em CLAE-MS/MS para a quantificação dos fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina, bem como dos marcadores metoprolol e ranitidina utilizados nos ensaios de transporte de efluxo e de metabolismo. As condições adotadas incluíram: coluna cromatográfica Sinergi polar-RP 80 Å (4,6 x 75 mm, 4 µm), temperatura ambiente a 20°C, fonte de *electrospray* no modo de ionização turbo *spray* com voltagem de 5 kV e temperatura da fonte de 400°C. A fase móvel foi constituída por uma mistura de tampão acetato de amônio, água ultrapurificada e acetonitrila em diferentes proporções. Os tempos de retenção obtidos foram: 2,9 minutos para a lamivudina, 2,7 minutos para a estavudina, 3,3 minutos para a zidovudina, 3,5 minutos para o metoprolol, 2,9 minutos para a ranitidina e 4,5 minutos para a carbamazepina (padrão interno). A faixa de concentração considerada foi de 0,5 a 1000 nM e o método apresentou boa linearidade (superior a 0,99 para todas as substâncias). Os limites de detecção obtidos apresentaram-se na faixa entre 0,01 nM e 0,38 nM e os demais parâmetros analisados apresentaram-se de acordo com o preconizado em literatura específica. Assim, os métodos cromatográficos validados demonstraram-se adequados para as finalidades propostas.

Palavras-chave: permeabilidade, cromatografia, validação, antirretrovirais, LC-MS/MS.

INTRODUÇÃO

Fármacos que são oralmente administrados devem apresentar adequadas características de solubilidade e de permeabilidade a fim de que a absorção oral ocorra adequadamente.

Recentemente, diversos modelos têm sido descritos para a avaliação da permeabilidade e dos mecanismos de transporte de fármacos administrados oralmente. Assim, a influência de transportadores de efluxo, tal como a glicoproteína-P (P-gp), podem interferir no transporte do fármaco através da membrana biológica. Além disso, a atuação de enzimas metabolizadoras, como as pertencentes à família CYP3A, ao longo do trato gastrintestinal (TGI) contribui para dificultar o transporte de fármacos substratos do lúmen intestinal em direção à circulação sanguínea (JUNIOR et al., 2015; SHUGARTS; BENET, 2009).

Tanto a P-gp quanto a CYP3A representam importantes fatores que interferem diretamente na absorção oral e, consequentemente, na biodisponibilidade. Fármacos como estavudina, lamivudina e zidovudina apresentam biodisponibilidade variável, o que pode estar relacionado à eventos como efluxo (pela P-gp) e metabolismo pré-sistêmico. Desta forma, estudos que sejam capazes de prever o impacto da influência da P-gp e da CYP nos processos absortivos têm sido um grande desafio recentemente. Alguns métodos têm sido descritos na literatura para serem empregados na predição dessas influências em seres humanos (ARTURSSON; PALM; LUTHMAN, 2001; KANSY; SENNER; GUBERNATOR, 1998; OTIS et al., 2001; WOHNSLAND; FALLER, 2001).

Para os estudos de transporte de fármacos com ênfase na avaliação do efluxo pela P-gp, são empregadas as culturas celulares como MDCK-MDR1. Esta linhagem de células é originária de rim canino e é transfectada com o gene MDR1 para a expressão de P-gp. Já para os estudos de metabolismo pré-sistêmico, o uso de microssomas constitui um ensaio rápido e de fácil execução para avaliar a metabolização de fármacos pela ação das enzimas, principalmente CYP3A (ABUASAL et al., 2012; BASU; SHAIK, 2016; DE SOUZA et al., 2009; JUNIOR et al., 2015; SHAIK; VISHWAKARMA; KHAN, 2016; WANG et al., 2002).

Os estudos de efluxo e de metabolismo por meio dos métodos *in vitro* supramencionados devem ser realizados com cautela a fim de não comprometer os resultados. Além disso, a aquisição de dados experimentais requer que as etapas analíticas sejam adequadamente validadas a fim de assegurar a confiabilidade dos resultados. Assim, estudos de efluxo em MDCK-MDR1 e de

metabolismo pré-sistêmico em microssomas necessitam de elevada seletividade analítica, para que pequenas mudanças na quantificação sejam detectadas e consideradas na obtenção de dados.

Apesar de alguns trabalhos relacionados à validação de métodos em CLAE com detecção em UV terem sido descritos na literatura, métodos cromatográficos com detecção em massa (LC-MS/MS) representam maior seletividade e especificidade, o que reflete na confiabilidade dos resultados obtidos (CHU et al., 2002; HAKALA et al., 2003; KOLJONEN et al., 2006; LIU et al., 2003).

Para a análise de amostras provenientes de ensaios *in vitro* para avaliação do mecanismo de efluxo e de metabolismo pré-sistêmico, o uso de metodologias que empregam LC-MS/MS (cromatografia liquida de alta eficiência acoplada ao detector de espectrometria de massas) oferece as vantagens de aumento da sensibilidade e da especificidade. Além disso, a duração das análises é menor em comparação com os métodos em CLAE, o que permite analisar amostras provenientes de ensaios *in vitro* de maneira rápida (NOVÁKOVÁ; MATYSOVÁ; SOLICH, 2006; SWARTZ, 2005).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar métodos cromatográficos em LC-MS/MS para os fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina e para os marcadores de alta e de baixa permeabilidade metoprolol e ranitidina contidos em amostras provenientes de estudos de transporte de efluxo (MDCK-MDR1) e de metabolismo pré-sistêmico (microssomas).

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais e equipamentos

Os fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina e os marcadores de alta e de baixa permeabilidade metoprolol e ranitidina (grau de pureza superior a 99%) foram gentilmente doados por Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., FURP (Fundação para o Remédio Popular, BRA) e Farmanguinhos (Instituto de Tecnologia em Fármacos).

Água ultrapurificada foi obtida através do sistema de filtração Milli-Q (Millipore Corporation, EUA). Acetato de amônio e ácido fórmico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Acetonitrila de pureza cromatográfica foi obtida da Merck (Darmstadt, Alemanha). Solução de Hanks (pH 7,4) contendo 25 mM de HEPES e 1% de soro bovino fetal (SBF) foi adquirido a partir da Unidade de Cultura Celular da UCSF (Universidade da Califórnia San Francisco).

A validação cromatográfica em LC-MS/MS foi realizada em sistema de CLAE Prominence Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com amostrador automático (SIL-20AC), bomba de alta pressão (LC-20AB), degaseificador a vácuo (DGU-20A3), interface (CBM-20Alite) e programa gestor do sistema LC-Solution para a aquisição e processamento de dados.

Métodos

Estudos *in vitro* em MDCK-MDR1 e microssomas

A influência da atividade de efluxo desempenhada pela P-gp foi avaliada por meio do método *in vitro* utilizando células MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*) transfectadas com o gene MDR1 para a superexpressão de P-gp. Os valores de permeabilidade obtidos indicam o grau de interação do fármaco com o carreador de efluxo por meio do emprego de um inibidor de P-gp (GG918) (BRAUN et al., 2000; DE SOUZA et al., 2009; KONDRATOV et al., 2001).

A cultura celular MDCK-MDR1 foi utilizada entre a 4ª e a 10ª passagem. Tripsina a 0,25% foi empregada para a preparação da suspensão de células, a qual foi transferida para os suportes permeáveis (*inserts*) na densidade de 2,5 x 10^6

células/mL. Placas de 6 poços foram utilizadas para o crescimento celular por seis dias até atingir a confluência de 90% da área total disponível para o crescimento. Os estudos de transporte de fármacos foram realizados bidirecionalmente, ou seja, na direção apical-basolateral (A→B) e basolateral-apical (B→A). As soluções de Hanks contendo cada uma das substâncias solubilizadas individualmente (15 µM) foram adicionadas nos compartimentos doadores. As amostras foram coletadas (200 µL) a partir dos compartimentos receptores nos tempos 30, 60 e 90 minutos com reposição imediata de meio isento de fármaco. Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3).

Os valores de permeabilidade aparente (Papp, cm/s) foram calculados a partir da Equação 14

$$Papp = \frac{\frac{\Delta C}{\Delta t}\ x\ Vr}{\mathrm{A\ x\ Co}}$$

Equação 14

onde: *dC/dt* corresponde à concentração do fármaco no compartimento receptor em função do tempo *t* (expresso em M/s), *Vr* é o volume do compartimento receptor em cm^3, *A* corresponde à área da monocamada celular disponível para a absorção (4,2 cm^2) e C_0 é a concentração inicial do fármaco contido no compartimento doador (expresso em M).

Os experimentos de metabolismo pré-sistêmico foram realizados com o emprego de microssomas hepáticos provenientes de ratos Sprague-Dawley (BD Gentest®) devido à presença elevada de enzimas CYP3A, as quais também estão presentes nos enterócitos.

Validação dos métodos cromatográficos por LC-MS/MS

Para a validação dos métodos cromatográficos foi utilizada uma coluna cromatográfica Sinergi polar-RP 80Å (4,6 x 75 mm, 4 µm) (Phenomenex®

Incorporation, EUA). As análises foram conduzidas em temperatura ambiente a 20°C e os espectrogramas foram realizados com uma fonte de *electrospray* no modo de ionização turbo *spray* na voltagem de 5 kV e temperatura da fonte de 400°C.

As soluções de fase móvel para cada método foram preparadas com tampão acetato de amônio (10 mM), água ultrapurificada e acetonitrila em variadas proporções, de acordo com a substância a ser quantificada. O Quadro 5.6 apresenta as condições adotadas para os processos de validação cromatográfica para cada uma das substâncias do estudo.

Quadro 5.6: Condições adotadas para os processos de validação cromatográfica por LC-MS/MS para a quantificação dos fármacos antirretrovirais estavudina (d4T), lamivudina (3TC) e zidovudina (AZT) e dos marcadores metoprolol (METO) e ranitidina (RNT) contidos em amostras provenientes dos estudos de efluxo e de metabolismo por meio de métodos *in vitro* (MDCK-MDR1 e microssomas).

Parâmetros	**d4T**	**AZT**	**RNT**	**3TC**	**METO**
Detector	**MS/MS**				
Massa Q1/Q3 (Da)	225,2/127,1	268,0/127,2	315,2/124,9	230,2/112,2	237,0/194,3
Composição da fase móvel e proporções	Água ultrapurificada com 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (90:10)	Água ultrapurificada com 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (90:10)	Água ultrapurificada com 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (90:10)	Água ultrapurificada com 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (90:10)	Tampão acetato de amônio (10 mM) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (50:50)
Volume de injeção	30 µL				
Fluxo da fase móvel	0,75 mL/min				

Todas as soluções empregadas como fase móvel foram filtradas em membrana filtrante de acetato de celulose (poro de 0,22 µm) e, em seguidas, levas em banho ultrassônico para degaseificação por 30 minutos.

A linearidade foi avaliada por meio da construção das curvas analíticas com soluções padrão de estavudina, lamivudina, zidovudina, ranitidina e metoprolol em diferentes níveis de concentração, conforme descrições no Quadro 5.7 A faixa de concentração utilizada na validação dos métodos espectrométricos compreendeu o intervalo de 0,5 a 1000 ng/mL e foi obtida a partir da diluição da solução mãe preparada na concentração de 1µM. A carbamazepina foi empregada como padrão interno na concentração de 2 µM (ANVISA/BRASIL, 2003, 2012; ICH, 2005).

Quadro 5.7: Concentrações das curvas analíticas para os fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina e para os marcadores metoprolol e ranitidina.

	Concentração (nM**)**	**Padrão Interno**
Estavudina	0,5, 1, 10, 50, 75, 125, 250, 500, 750 e 1000	Carbamazepina 2 µM
Lamivudina	0,5, 1, 10, 50, 75, 125, 250, 500, 750 e 1000	
Zidovudina	0,5, 1, 10, 50, 75, 125, 250, 500, 750 e 1000	
Metoprolol	0,5, 1, 10, 50, 75, 125, 250, 500, 750 e 1000	
Ranitidina	0,5, 1, 10, 50, 75, 125, 250, 500, 750 e 1000	

As soluções empregadas para obtenção das curvas analíticas foram preparadas por meio de diluições sucessivas da solução padrão de cada substância empregada no estudo utilizando a matriz resultante do experimento como diluente, conforme descritas no Quadro 5.8.

Quadro 5.8: Preparo das soluções das curvas analíticas a partir das respectivas soluções padrão (SP) com concentração de 1 µM (e 100 µM para a concentração final de 1000 nM).

Volume total (mL)	Volume de SP adicionado (µL)	Concentração final (nM)
2	1,0	0,5
2	2,0	1,0
2	20,0	10,0
2	100,0	50,0
2	150,0	75,0
2	250,0	125,0
2	500,0	250,0
2	1000,0	500,0
2	1500,0	750,0
10	100,0	1000,0

Para as respectivas diluições supracitadas, foi utilizada mistura de acetonitrila e água ultrapurificada Milli-Q (50:50) como veículo. Após o preparo, todas as soluções foram levadas ao banho ultrassônico para degaseificação por 30 minutos.

A especificidade foi verificada por meio da comparação dos cromatogramas obtidos a partir da solução padrão de cada fármaco no estudo. Além disso, também foi verificado os cromatogramas referentes à fase móvel e à eluição da matriz isenta de fármaco (ANVISA/BRASIL, 2003, 2012; ICH, 2005; USP, 2007). Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados a partir dos valores obtidos na construção das três curvas analíticas, considerando os parâmetros DPa (desvio padrão da inclinação *a*) e IC (inclinação da reta).

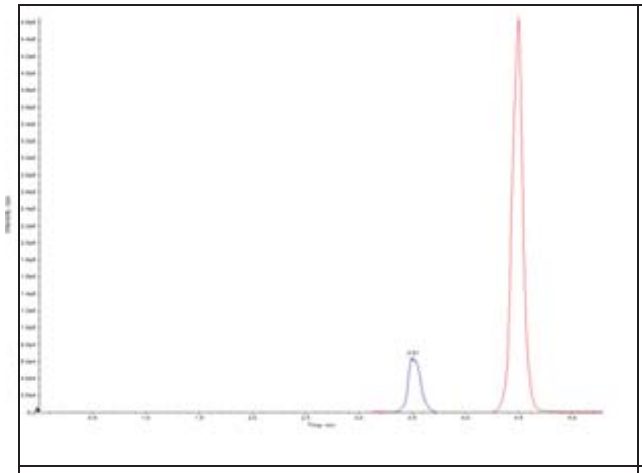
A precisão foi determinada com base na análise de três níveis de concentração (10, 250 e 750 nM) em réplicas de seis para cada concentração no mesmo dia (precisão intraensaio) e em dias diferentes (precisão interensaio). O parâmetros de exatidão intradia (análises realizadas no mesmo dia) e interdias (análises realizadas em três dias diferentes, preferencialmente por equipamentos e

analistas diferentes) foram avaliados com base na utilização de três níveis de concentração (10, 250 e 750 nM)(ANVISA/BRASIL, 2012; ICH, 2005; USP, 2007).

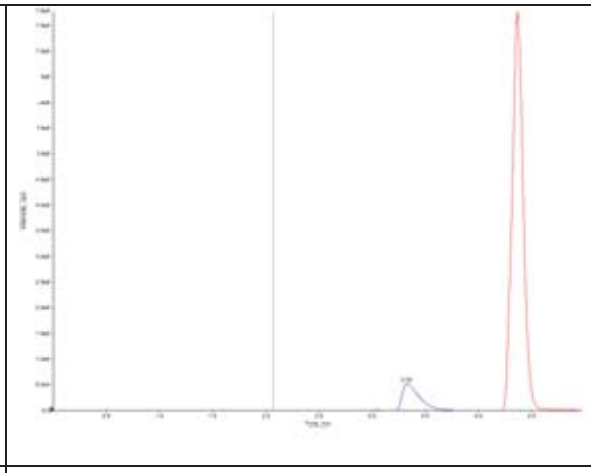
RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os métodos bioanalíticos para a determinação das concentrações dissolvidas dos fármacos e dos marcadores contidos nas amostras provenientes dos ensaios de permeabilidade e de metabolismo pré-sistêmico foram validados a partir dos procedimentos preconizados pela RDC Nº27/2012 da ANVISA, pelo ICH 2005 e pela Farmacopéia Americana (*United States Pharmacopeia*). Nas condições adotadas para o LC-MS/MS, os cromatogramas e suas transições de massa para a lamivudina (Q1/Q2: 230,2/112,2), estavudina (Q1/Q2: 225,2/127,1), zidovudina (Q1/Q2: 268,0/127,2), ranitidina (Q1/Q2: 315,2/124,9), metoprolol (Q1/Q2: 237,0/194,3) e do padrão interno carbamazepina (Q1/Q2: 237,00/194,30) estão apresentados na Figura 5.3. (ANVISA/BRASIL, 2012; ICH, 2005; USP, 2007).

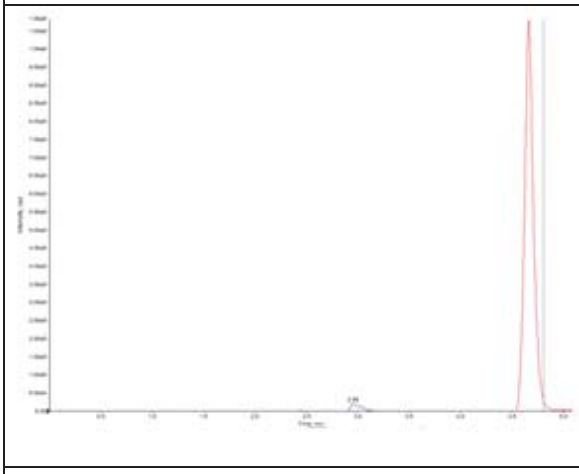
Figura 5.3: Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para os fármacos estavudina, lamivudina e zidovudina, para os marcadores metoprolol e ranitidina e para o padrão interno carbamazepina.



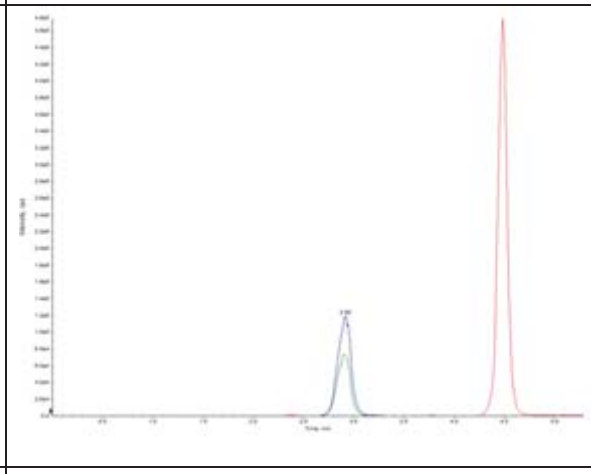
Metoprolol



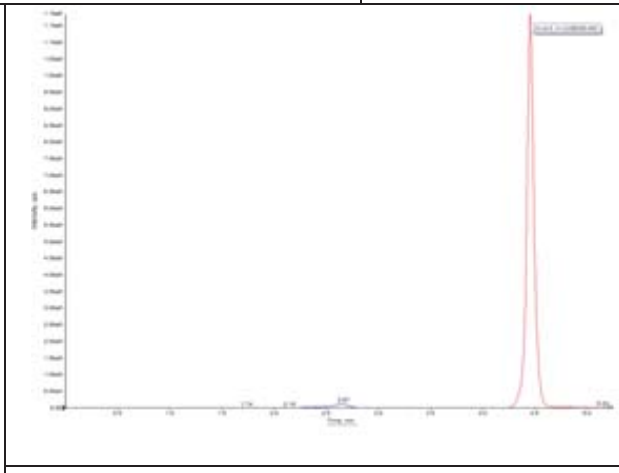
Zidovudina



Lamivudina



Ranitidina



Estavudina

A especificidade e a seletividade dos métodos foram verificadas através de comparação entre os cromatogramas na presença e na ausência dos fármacos solubilizados na matriz. Não foram observadas interferências relevantes nos sinais adquiridos nos tempos de retenção de interesse e nos pesos moleculares específicos das substâncias. Os métodos mostraram excelente separação da matriz com tempos de retenção de 2,9 minutos para a lamivudina, 2,7 minutos para a estavudina, 3,3 minutos para a zidovudina, 3,5 minutos para o metoprolol, 2,9 minutos para a ranitidina e 4,5 minutos para a carbamazepina (padrão interno).

A linearidade dos métodos foi realizada na faixa de 0,5 a 1000,0 nM para os fármacos estavudina, lamivudina e zidovudina e para os marcadores metoprolol e ranitidina. Os coeficientes de determinação (r^2) foram determinados por regressão linear quadrática ou ponderada ($1/x^2$) e os valores obtidos variaram de 0,9981 a 0,9995. A Tabela 5.12 apresenta os valores referentes aos LD, LQ e coeficientes de determinação (r^2).

A faixa de concentração considerada para a construção das curvas analíticas é um fator importante a ser considerado no desenvolvimento de métodos analíticos e bioanalíticos. No presente trabalho, os ensaios em MDCK-MDR1 e em microssomas podem fornecer amostras contendo uma ampla faixa de concentração dos fármacos, o que constitui uma vantagem para o método validado descrito no presente trabalho. Em um estudo publicado por Rao e Shinde, a faixa de concentração utilizada para a construção das curvas analíticas para avaliação da linearidade é muito estreita (de 4 a 50 ng/mL) em comparação à faixa descrita no presente trabalho (0,5 a 1000 ng/mL) (NAGESWARA RAO; SHINDE, 2009). Desta forma, o mesmo método cromatográfico descrito no presente trabalho pode ser utilizado para diferentes situações de estudos de permeabilidade e metabolismo pré-sistêmico. Em outras palavras, estudos de efluxo em MDCK-MDR1 com ou sem inibidor de P-gp e estudos em microssomas com ou sem inibidor de CYP podem ser realizados sem grandes problemas, uma vez que as diferentes concentrações de fármacos que podem estar presentes nas amostras poderão ser quantificadas com precisão e exatidão.

Tabela 5.12: Valores obtidos para os LD, LQ e coeficientes de determinação (r^2) para cada substância. Os valores expressam a média de seis determinações.

Substâncias	Limite de detecção (nM)	Limite de quantificação (nM)	Coeficiente de determinação (r^2)
Lamivudina	0,04	0,13	0,9995
Zidovudina	0,11	0,38	0,9981
Metoprolol	0,02	0,31	0,9995
Estavudina	0,01	0,04	0,9981
Ranitidina	0,02	0,07	0,9983

Conforme apresentado na Tabela 5.12, os LD e LQ foram determinados a partir dos valores obtidos na construção das três curvas analíticas, conforme determinado em compêndios oficiais (ANVISA/BRASIL, 2012; ICH, 2005). Os valores de LD e LQ obtidos estiveram bem abaixo da primeira concentração das curvas analíticas, o que permite aos métodos uma adequada quantificação das amostras.

Em trabalho publicado por Fayet e colaboradores (2009), a validação de um método cromatográfico em LC-MS/MS foi descrito com a finalidade de permitir a quantificação de fármacos antirretrovirais (darunavir, etravirina, maraviroque, raltegravir e ritonavir) em plasma. Entretanto, embora o método tenha apresentado bons parâmetros, os LD e LQ não foram tão baixos quanto os apresentados no presente trabalho (FAYET et al., 2009). Assim, os baixos valores de LD e LQ apresentados na Tabela 5.12 representam a alta sensibilidade dos métodos cromatográficos desenvolvidos.

Os resultados de precisão e de exatidão (intraensaios) apresentaram-se de acordo com os limites estabelecidos pela ANVISA e por outros compêndios internacionais, como ICH (2005). Os valores referentes a estes parâmetros estão apresentados na Tabela 5.13 (ANVISA/BRASIL, 2012; ICH, 2005).

Tabela 5.13: Valores referentes à precisão e à exatidão (intraensaio) do método LC-MS/MS para a quantificação de lamivudina, zidovudina, metoprolol, estavudina e ranitidina contidos em amostras provenientes de ensaios de permeabilidade e metabolismo pré-sistêmico.

Concentração (nM)	Precisão (%) (DPR)	Exatidão (%)
Lamivudina		
10	3,50	104,00
250	2,00	96,80
750	1,60	90,00
Zidovudina		
10	7,60	101,00
250	4,92	99,60
750	0,85	102,27
Metoprolol		
10	4,80	106,87
250	2,20	105,94
750	1,40	96,11
Estavudina		
10	2,10	104,29
250	9,50	91,38
750	0,90	96,12
Ranitidina		
10	3,80	93,78
250	2,00	91,08
750	0,60	100,84

A quantificação de amostras contendo antirretrovirais pode ser encontrada na literatura por meio da descrição de métodos analíticos e bioanalíticos para diversas finalidades. As matrizes mais comuns incluem plasma e urina. Porém, é possível encontrar métodos LC-MS/MS para fármacos em fluido de lavado

broncoaveolar, líquido seminal, fluido cérebro-espinhal, tecidos provenientes de tonsilas, dentre outros materiais (FAYET et al., 2009; HUANG et al., 2004).

A avaliação dos parâmetros analisados durante os processos de validação é complexa quando dois métodos cromatográficos semelhantes são comparados (LC-MS/MS). Em estudo conduzido por Huang e colaboradores (2004), a validação de métodos cromatográficos para a quantificação de fármacos em diferentes matrizes demonstrou que estas podem, de alguma maneira, interferir nos valores obtidos de LD e LQ, conforme descrito para os fármacos estavudina e didanosina no referido trabalho (HUANG et al., 2004). Assim, o presente método apresentou baixos valores de LD e LQ em virtude da utilização de matriz mais limpa em comparação com líquidos biológicos.

Os métodos em LC-MS/MS proporcionam alta sensibilidade e especificidade com simplicidade no preparo de amostra em comparação a outros métodos analíticos. No presente trabalho, foram obtidas corridas de curta duração para todas as substâncias empregadas, o que representa uma vantagem devido à extensa quantidade de amostras provenientes dos ensaios de permeabilidade, efluxo/influxo e metabolismo. Os resultados referentes aos ensaios de transporte de efluxo em MDCK-MDR1 e metabolismo pré-sistêmico são apresentados na Tabela 5.14.

Tabela 5.14: Valores médios de porcentagem metabolizada (%) obtidos a partir dos ensaios em microssomas na ausência e na presença do inibidor de CYP3A cetoconazol e valores referentes à razão entre permeabilidade aparente (Papp) B→A/A→B provenientes dos ensaios em MDCK-MDR1. Os valores representam a média de três determinações.

Fármacos	**Metabolismo**		**Efluxo**
	% Metabolizada ±DP		**Razão B→A/A→B ± DP**
	Com inibidor	**Sem inibidor**	
Estavudina	19,79(±0,80)	16,56(±0,94)	1,7(±0,21)
Lamivudina	15,55(±4,05)	14,56(±3,22)	1,9(±0,19)
Zidovudina	16,48(±1,90)	17,85(±1,74)	2,8(±0,75)
Metoprolol	---	---	0,9(±0,10)

Os resultados obtidos a partir dos ensaios *in vitro* com microssomas demonstraram uma fraca interação entre a enzima e a estavudina, lamivudina e zidovudina. Os valores encontrados para a estavudina, lamivudina e zidovudina não apresentaram diferenças significativas ($p<0,005$)

Os valores de metabolismo e influência do efluxo foram adquiridos através do método validado em LC-MS/MS e demostraram-se altamente estáveis dentro dos desvios padrão. Os típicos valores médios obtidos de Papp e nas transições de massa validados resultaram em uma boa avaliação estatística e excelente intervalo de confiança dos resultados de permeabilidade (efluxo) e metabolismo.

CONCLUSÕES

Os parâmetros avaliados com relação à validação dos métodos em LC-MS/MS mostraram-se adequados para quantificação dos fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina e dos marcadores metoprolol e ranitidina contidos em amostras provenientes de estudos em MDCK-MDR1 e microssomas.

O método cromatográfico em LC-MS/MS é capaz de fornecer rapidez às análises devido ao curto tempo de corrida obtido. Os ensaios de efluxo e de metabolismo necessitam de métodos bioanalíticos sensíveis e confiáveis para a adequada quantificação das substâncias presentes nas amostras, bem como maior especificidade para a separação dos fármacos e seus subprodutos provenientes da degradação enzimática.

Os métodos apresentados no presente trabalho demonstraram uma excelente linearidade, precisão e exatidão na faixa de concentração de 0,5 a 1000 nM. Assim, os métodos cromatográficos desenvolvidos podem ser aplicados nas análises diárias de amostras dos fármacos antirretrovirais empregados no presente estudo.

REFERÊNCIAS

ABUASAL, B. S. et al. In Silico Modeling for the Nonlinear Absorption Kinetics of UK- 343,664: A P-gp and CYP3A4 Substrate. Molecular Pharmaceutics, v. 9, p. 492–504, 2012.

ANVISA/BRASIL. Resolução n 899 Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diario oficial da União, v. 29 de maio, 2003.

ANVISA/BRASIL. Resolução RE n 27, de 17 de maio de 2012. Guia para validação de métodos bioanalíticos. Diario oficial da União, v. 22 de maio, 2012.

ARTURSSON, P.; PALM, K.; LUTHMAN, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport1PII of original article: S0169-409X(96)00415-2. The article was originally published in Advanced Drug Delivery Reviews 22 (1996) 67–84.1. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 46, n. 1–3, p. 27–43, 2001.

BASU, S.; SHAIK, A. N. Is there a paradigm shift in use of microsomes and hepatocytes in drug discovery and development? ADMET and DMPK, v. 4, n. 2, p. 114, 2016.

BRAUN, A. et al. Cell cultures as tools in biopharmacy. European Journal of Pharmaceutical Sciences. Anais...2000

CHU, I. et al. Generic fast gradient liquid chromatography/tandem mass spectrometry techniques for the assessment of the in vitro permeability across the blood-brain barrier in drug discovery. Rapid Communications in Mass Spectrometry, v. 16, n. 15, p. 1501–1505, 2002.

DE SOUZA, J. et al. Comparison of bidirectional lamivudine and zidovudine transport using MDCK, MDCK-MDR1, and Caco-2 cell monolayers. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 98, n. 11, p. 4413–4419, 2009.

FAYET, A. et al. A LC–tandem MS assay for the simultaneous measurement of new antiretroviral agents: Raltegravir, maraviroc, darunavir, and etravirine. Journal of Chromatography B, v. 877, n. 11, p. 1057–1069, 2009.

HAKALA, K. S. et al. Development of LC/MS/MS Methods for Cocktail Dosed Caco-2 Samples Using Atmospheric Pressure Photoionization and Electrospray Ionization. Analytical Chemistry, v. 75, n. 21, p. 5969–5977, 2003.

HUANG, Y. et al. Liquid chromatographic–tandem mass spectrometric assay for the simultaneous determination of didanosine and stavudine in human plasma, bronchoalveolar lavage fluid, alveolar cells, peripheral blood mononuclear cells, seminal plasma, cerebrospinal fluid an. Journal of Chromatography B, v. 799, n. 1, p. 51–61, 5 jan. 2004.

ICH. Validation of a analytical Procedures : text and methodology Q2(R1). Guidance, v. 1994, n. November 1996, p. 17, 2005.

JUNIOR, J. B. S. et al. Evaluating Potential P-gp Substrates : Main Aspects to Choose the Adequate Permeability Model for Assessing Gastrointestinal Drug Absorption. Mini reviews in medicinal chemistry, v. 15, n. 10, p. 858–871, 2015.

KANSY, M.; SENNER, F.; GUBERNATOR, K. Physicochemical high throughput screening: Parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. Journal of Medicinal Chemistry, v. 41, n. 7, p. 1007–1010, 1998.

KOLJONEN, M. et al. Evaluation of cocktail approach to standardise Caco-2 permeability experiments. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 64, n. 3, p. 379–387, 2006.

KONDRATOV, R. V et al. Small molecules that dramatically alter multidrug resistance phenotype by modulating the substrate specificity of P-glycoprotein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 98, n. 24, p. 14078–83, 2001.

LIU, H. et al. In Vitro Permeability of Poorly Aqueous Soluble Compounds Using Different Solubilizers in the PAMPA Assay with Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Detection. Pharmaceutical Research, v. 20, n. 11, p. 1820–1826, 2003.

NAGESWARA RAO, R.; SHINDE, D. D. Two-dimensional LC–MS/MS determination of antiretroviral drugs in rat serum and urine. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 50, n. 5, p. 994–999, 2009.

NOVÁKOVÁ, L.; MATYSOVÁ, L.; SOLICH, P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. Talanta, v. 68, n. 3, p. 908–918, 2006.

OTIS, K. W. et al. Evaluation of the BBMEC model for screening the CNS permeability of drugs. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, v. 45, n. 1, p. 71–77, 2001.

SHAIK, A. N.; VISHWAKARMA, S. K.; KHAN, A. A. Metabolism of six CYP probe substrates in fetal hepatocytes. ADMET and DMPK, v. 4, n. 2, p. 84, 2016.

SHUGARTS, S.; BENET, L. Z. The role of transporters in the pharmacokinetics of orally administered drugs. Pharmaceutical Research, v. 26, n. 9, p. 2039–2054, 2009.

SWARTZ, M. E. UPLCTM: An Introduction and Review. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, v. 28, n. 7, p. 1253–1263, 2005.

USP. UNITED STATES PHARMACOPEIA30/National Formulary 25. CD ROMRockvilleUSP, , 2007.

WANG, J. S. et al. Gemfibrozil inhibits CYP2c8-mediated cerivastatin metabolism in human liver microsomes. Drug Metabolism and Disposition, v. 30, n. 12, p. 1352–1356, 2002.

WOHNSLAND, F.; FALLER, B. High-throughput permeability pH profile and high-throughput alkane/water log P with artificial membranes. Journal of Medicinal Chemistry, v. 44, n. 6, p. 923–930, 2001.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A validação de métodos analíticos e bioanalíticos constitui a primeira etapa da execução de experimentos, uma vez que esse procedimento garantirá a aquisição de resultados confiáveis e precisos. Para os estudos de permeabilidade em PAMPA, os métodos espectrofotométricos com leituras em UV/VIS são adaptados para viabilizar as leituras de um grande número de amostras. O desenvolvimento e validação do método espectrofotométrico descrito no presente trabalho mostrou-se adequado para a quantificação dos fármacos estavudina, lamivudina e zidovudina e dos marcadores metoprolol e ranitidina com precisão e exatidão.

O desenvolvimento de métodos cromatográficos em CLAE com detecção em UV/VIS oferece maior sensibilidade na quantificação de amostras. Os bons resultados obtidos referentes aos parâmetros analisados demonstraram que os métodos descritos são adequados para as finalidades pretendidas. Apesar da ampla faixa de concentração utilizada nas construções das curvas analíticas (de 10 a 3000 ng/mL) foi obtida uma excelente linearidade (coeficientes de determinação superior a 0,99). Os limites de detecção e de quantificação apresentaram-se bem abaixo da primeira concentração da curva analítica, o que representa a sensibilidade do método nas condições empregadas. Deste modo, os métodos cromatográficos validados constituem uma importante ferramenta para a análise de amostras provenientes de ensaios de permeabilidade.

Com relação à validação de métodos cromatográficos em LC-MS/MS, os parâmetros avaliados foram adequados para a quantificação dos fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina e dos marcadores metoprolol e ranitidina contidos em amostras provenientes de estudos em MDCK-MDR1 e microssomas. Os ensaios de efluxo e de metabolismo necessitam que as etapas bioanalíticas sejam sensíveis e precisas para que haja a adequada quantificação dos analitos presentes nas amostras. Além disso, a elevada especificidade e seletividade permitem a adequada separação dos componentes diversos presentes nas amostras, incluindo subprodutos decorrentes de degradação enzimática.

Os experimentos realizados em modelo *in vitro* PAMPA demonstraram a alta permeabilidade (Pe) do marcador metoprolol, o que está de acordo com os inúmeros relatos descritos na literatura. Este resultado deve-se ao predominante mecanismo de transporte desta substância: difusão passiva transcelular. Por outro

lado, a ranitidina (marcador de baixa permeabilidade) apresentou baixo valor de Pe, o que foi esperado, uma vez que este marcador é transportado por via paracelular.

A avaliação da permeabilidade dos antirretrovirais em PAMPA demonstrou que os três fármacos apresentaram transporte limitado do compartimento doador para o compartimento receptor. Uma vez que o método PAMPA permite apenas avaliar o transporte passivo transcelular, os baixos valores de Pe da estavudina, lamivudina e zidovudina sugerem que estes fármacos sejam transportados por outros mecanismos que não o transporte transcelular passivo. Por esta razão, os resultados de permeabilidade dos antirretrovirais estiveram mais próximos do resultado apresentado pela ranitidina.

Os estudos de permeabilidade realizados por meio do modelo *ex vivo* com emprego de segmentos intestinais em câmaras de difusão vertical tipo Franz foram realizados com a finalidade de complementar os dados obtidos através do modelo *in vitro* PAMPA. Para isto, segmentos de jejuno provenientes de ratos machos Wistar foram utilizados nos ensaios de transporte, uma vez que o intestino apresenta mais fatores relacionados à permeabilidade *in vivo* em comparação com PAMPA, tais como: expressão de transportadores de influxo e de efluxo, presença de enzimas metabolizadoras e espaços paracelulares. Os resultados de permeabilidade aparente (Papp) dos marcadores metoprolol e ranitidina permitiram diferenciar as características de alta e de baixa permeabilidade. Assim, os fármacos antirretrovirais apresentaram valores de Papp mais próximos do metoprolol, o que indica seu elevado transporte através dos segmentos intestinais.

Portanto, os resultados obtidos por meio dos modelos *in vitro* PAMPA e *ex vivo* em câmaras de difusão vertical tipo Franz sugerem que os fármacos estavudina, lamivudina e zidovudina podem ser transportados por carreadores de influxo e/ou por via passiva paracelular. Assim, apesar dos altos valores de Papp dos antirretrovirais no método *ex vivo*, não é descartada a interação dos referidos fármacos com transportadores de efluxo e com enzimas metabolizadoras.

Para avaliar a influência de mecanismos de efluxo, ensaios de transporte foram realizados em culturas MDCK-MDR1. Esta linhagem celular é amplamente utilizada na investigação do efluxo promovido pela P-gp, uma vez que estas células apresentam superexpressão deste carreador. Ensaios bidirecionais foram conduzidos na presença e na ausência de inibidor de P-gp GG918. Os resultados sugeriram que os fármacos estavudina e lamivudina apresentaram menor interação

com a P-gp, embora tenha sido observado que tais substâncias comportaram-se como substratos deste transportador. Por outro lado, a zidovudina apresentou maior interação com a P-gp, o que pode estar relacionado à variação nos valores de biodisponibilidade relatados na literatura.

Os ensaios de efluxo em modelo *ex vivo* foram realizados no sentido absortivo (apical-basolateral ou A→B) na presença e na ausência do inibidor de P-gp verapamil. Os resultados obtidos apresentaram a mesma interação entre P-gp e os fármacos estavudina, lamivudina e a zidovudina, o que confirma as observações feitas a partir dos dados obtidos através do modelo *in vitro* MDCK-MDR1. Com base nos resultados adquiridos, a utilização dos modelos *in vitro* em culturas celulares e *ex vivo* em câmaras de difusão vertical tipo Franz demonstrou que ambos modelos são complementares para os estudos de transporte de efluxo de fármacos, não sendo recomendada o emprego de cada método de maneira isolada, mas sim em associação. Desta forma, enquanto o MDCK-MDR1 representa uma importante ferramenta para avaliar a influência de efluxo no processo de permeabilidade, o modelo *ex vivo* que emprega segmentos intestinais em câmaras de difusão vertical tipo Franz permite uma melhor predição do comportamento (permeabilidade) do fármaco *in vivo*.

Outro fator a ser considerado na influência dos processos absortivos por via oral inclui o metabolismo pré-sistêmico intestinal. Os experimentos foram conduzidos com o emprego de microssomas na presença e na ausência de inibidor de CYP3A (cetoconazol) e os resultados obtidos não indicaram a interação significativa entre os antirretrovirais e as enzimas oxidativas. Esta observação foi confirmada por meio do estudo *ex vivo* com emprego de segmentos intestinais em câmaras de difusão vertical tipo Franz. Logo, os experimentos realizados em microssomas e em segmentos intestinais indicaram que o metabolismo pré-sistêmico intestinal causado pela ação das enzimas CYP3A não constitui uma etapa limitante aos processos de absorção dos fármacos antirretrovirais estudados, embora seja recomendada a realização de ensaios para investigar o envolvimento de outros tipos de enzimas relacionadas ao metabolismo de fase II (conjugação).

Com base nos dados obtidos no presente trabalho e considerando a importância dos sistemas SCB e SCBDF, os quais são considerados complementares na classificação biofarmacêutica de fármacos, percebeu-se a necessidade da padronização não somente dos métodos empregados, mas

também da organização de utilização dos modelos disponíveis para os estudos de permeabilidade, transporte e metabolismo. Em outras palavras, cada método possui vantagens e limitações que devem ser consideradas no momento de definir o desenho experimental.

Embora grandes descobertas tenham sido feitas desde o surgimento do SCB e do SCBDF em relação à predição *in vivo* de fármacos e moléculas candidatas, muitos fatores que influenciam na biodisponibilidade e que representam grande impacto nos estudos farmacocinéticos e na terapêutica clínica continuam atualmente não elucidados. Os dois sistemas de classificação atuam de maneira complementar com o propósito de predizer o comportamento *in vivo* de fármacos não somente em relação à absorção, mas também em relação a outras características relacionadas às propriedades ADME (absorção, distribuição, metabolização e excreção).

Assim, o presente trabalho pretende contribuir de maneira significativa na caracterização dos fármacos antirretrovirais em relação aos mecanismos de transporte não totalmente esclarecidos até então e auxilia na definição de ensaios a serem realizados de maneira racional e organizada para a caracterização biofarmacêutica.

ANEXOS

ANEXO A

Informações para os membros da banca julgadora de doutorado

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

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

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

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

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

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

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

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

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

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

São Paulo, 23 de maio de 2014.

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

ANEXO B

Aprovação do protocolo de estudo pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Ofício CEUA/FCF/114 /2012

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto "**Avaliação dos mecanismos de absorção envolvidos na permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio de modelo ex-vivo (Franz Cells)**" (Protocolo CEUA/FCF/386), de responsabilidade do pesquisador **André Bersani Dezani,** sob a orientação da Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 5 de novembro de 2012.

São Paulo, 06 de novembro de 2012.

Prof. Dr. Jolson de Oliveira Martins
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

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

ANEXO C

Ficha do aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

FICHA DO ALUNO

9139 - 6336962/2 - André Bersani Dezani

Email:	andredezani@usp.br
Data de Nascimento:	13/06/1980
Cédula de Identidade:	RG - 32.259.178-8 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico - Universidade São Judas Tadeu - São Paulo - Brasil - 2003
Mestrado:	Mestre em Ciências - Área: Produção e Controle Farmacêuticos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2010

Curso:	Doutorado
Programa:	Fármaco e Medicamentos
Área:	Produção e Controle Farmacêuticos
Data de Matrícula:	14/09/2012
Início da Contagem de Prazo:	14/09/2012
Data Limite para o Depósito:	12/01/2017
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Cristina Helena dos Reis Serra - 14/09/2012 até o presente. Email: chserra@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 14/09/2012
Prorrogação(ões):	120 dias Período de 14/09/2016 até 12/01/2017
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 06/11/2014
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 14/09/2012 Prorrogação em 18/07/2016

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).
Última ocorrência: Prorrogação em 18/07/2016
Impresso em: 09/01/2017 19:42:58

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

9139 - 6336962/2 - André Bersani Dezani

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
Atividade do Programa	Publicação na European Journal of Pharmaceutical Sciences, com o trabalho intitulado: "Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, ex vivo and in situ Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum, v. 48, p. 781 – 789 – 2013 (1)	05/01/2013	05/01/2013	-	2	-	-	-	-
Atividade do Programa	Publicação no Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, com o trabalho intitulado: "Determination of lamivudine and zidovudine permeability using different ex vivo method in Franz cells", v. 67, p. 194 202 – 2013 (1)	08/01/2013	08/01/2013	-	2	-	-	-	-
FBF5794-2/3	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos II	06/03/2013	14/05/2013	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5799-1/2	Farmacocinética Básica	07/03/2013	15/05/2013	150	10	90	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBF0432 - Fundamentos de Farmácia Clínica e Atenção Farmacêutica, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (2)	05/08/2013	02/12/2013	-	3	-	-	-	-
VCI5782-4/3	Técnicas Microscópicas e Imagologia Aplicada (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo)	21/10/2013	10/11/2013	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	21
Estágios:			
Total:	0	20	21

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto no Artigo 65 do Regimento de Pós-Graduação e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 11/12/2013.

2) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 10/03/2014.

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

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

Última ocorrência: Prorrogação em 18/07/2016
Impresso em: 09/01/2017 19:42:58

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

9139 - 6336962/2 - André Bersani Dezani

Comissão julgadora da tese de doutorado:

NUSP	Nome	Vínculo	Função
205252	Cristina Helena dos Reis Serra	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Prorrogação em 18/07/2016
Impresso em: 09/01/2017 19:42:58

ANEXO D

Currículo Lattes

Currículo Lattes

André Bersani Dezani
Endereço para acessar este CV:http://lattes.cnpq.br/7364684323244071
Última atualização do currículo em 28/12/2016

Resumo informado pelo autor

Doutorado sanduíche pela University of California San Francisco (UCSF, San Francisco, CA, USA) no Departament of Bioengineering and Therapeutic Sciences (20152016). Doutorado em Fármacos e Medicamentos na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP, São Paulo, SP, Brasil) no Departamento de Farmácia (2012atual). Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade de São Paulo (2010). Pesquisador na área de biofarmácia com ênfase nos estudos de solubilidade e permeabilidade (modelos in vitro, ex vivo e in situ) e sistema ADME. Possui experiências na área de controle de qualidade em indústria e laboratórios de farmacotécnica, controle de qualidade, tecnologia farmacêutica e cosmetologia. Bolsista CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). Bolsista PDSE CAPES e CNPq.

(Texto informado pelo autor)
Links para Outras Bases:

SciELO - Artigos em texto completo

Dados pessoais

Nome: André Bersani Dezani
Filiação: Edison Dezani e Sueli Bersani Dezani
Nascimento: 13/06/1980 São Paulo/SP Brasil

Formação acadêmica/titulação

2012-atual: Doutorado em Fármaco e Medicamentos.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
com período sanduíche em University of California San Francisco
(Orientador: Leslie Z. Benet).
Título: Avaliação dos mecanismos envolvidos na permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio de modelo *ex vivo* (Franz cells) e *in vitro* (PAMPA)
Orientador: Cristina Helena dos Reis Serra
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2008-2010: Mestrado em Fármacos e Medicamentos.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Avaliação *in vitro* da solubilidade e da permeabilidade da lamivudina e da zidovudina. Aplicações na classificação biofarmacêutica
Ano de obtenção: 2010
Orientador: Dra. Cristina Helena dos Reis Serra
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2010-2010: Especialização em Docência no Ensino Superior.

Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas, FMU, Sao Paulo, Brasil
Título: A utilização da Educação à Distância (EAD) como ferramenta para a educação no Brasil
Orientador: Maria Evani Machado Toledo

1999-2002: Graduação em Farmácia Industrial.
Universidade São Judas Tadeu, USJT, Sao Paulo, Brasil
Título: Alimentos funcionais na prevenção de doenças

1997-1999: Ensino Profissional de nível técnico em Química.
Colégio São Judas Tadeu, CSJT, Brasil

Formação complementar

2012-2014: MBA em Gestão Estratégica de Negócios.
Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas, FMU, Sao Paulo, Brasil
Título: Plano de negócios para a implantação de uma farmácia magistral
Orientador: Antônio Estrela

2015-2015: Curso de curta duração em *Cyber Security Awareness Training*.
University of California San Francisco, UCSF, Estados Unidos

2015-2015: Curso de curta duração em *Carcinogen Training*.
University of California San Francisco, UCSF, Estados Unidos

2015-2015: Curso de curta duração em *Radiation Safety Training*.
University of California San Francisco, UCSF, Estados Unidos

2015-2015: Curso de curta duração em *Animal Biosafety Level 3 (ABSL3)*.
University of California San Francisco, UCSF, Estados Unidos

2015-2015: Curso de curta duração em *Bloodborne Pathogens Training*.
University of California San Francisco, UCSF, Estados Unidos

2015-2015: Curso de curta duração em *Biosafety Training*.
University of California San Francisco, UCSF, Estados Unidos

2015-2015: Curso de curta duração em *Laboratory Safety for Researchers at UCSF*.
University of California San Francisco, UCSF, Estados Unidos

Atuação profissional

1. *University of California San Francisco* UCSF
Vínculo institucional
2015-2016
Vínculo: *Exchange Visitor*, Enquadramento funcional: *Visiting Scholar*, Carga horária: 40, Regime:
Dedicação exclusiva.

2. Universidade de São Paulo USP
Vínculo institucional
2013-2013
Vínculo: PAE, Enquadramento funcional: bolsista, Carga horária: 20, Regime: Parcial
2012-Atual
Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: PesquisadorDoutorando, Carga horária: 40, Regime:Dedicação exclusiva.
Outras informações: Desenvolvimento do projeto "Avaliação dos mecanismos de absorção envolvidos na permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio de modelo *ex vivo* (Franz cells) e *in vitro* (PAMPA)", no qual a permeabilidade de fármacos antirretrovirais

será estudada levando-se em consideração a ocorrência de efluxo pela glicoproteína-P e metabolismo no enterócito. Apoio financeiro: CNPq (bolsa).
2009-2009
Vínculo: PAE, Enquadramento funcional: Bolsista, Carga horária: 20, Regime: Parcial.
2008-2010
Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Pesquisador Mestrando, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.
Outras informações: Desenvolvimento do projeto de pesquisa "Avaliação *in vitro* da solubilidade e da permeabilidade da lamivudina e da zidovudina. Aplicações na Classificação Biofarmacêutica", no qual a permeabilidade de fármacos antirretrovirais foi avaliada a partir do desenvolvimento de método *in vitro* com utilização de Franz cells. Apoio financeiro CNPq (bolsa) e FAPESP (projeto).

3. Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas FMU
Vínculo institucional
2009-Atual
Vínculo: Celetista, Enquadramento funcional: Professor universitário, Regime: Parcial.

4. Universidade São Judas Tadeu USJT
Vínculo institucional
2005-2008
Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: Técnico Farmacêutico, Carga horária: 44, Regime: Integral.
Outras informações: Atuação direta com alunos do curso de farmácia, auxiliando em aulas práticas de farmacotécnica, cosmetologia, tecnologia farmacêutica e controle de qualidade.

Projetos de pesquisa

2013-Atual:
Avaliação dos mecanismos envolvidos na permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio do modelo de perfusão *in situ* em ratos
Descrição: O trabalho tem como objetivo estudar a permeabilidade de fármacos antirretrovirais, bem como os mecanismos de efluxo que podem estar envolvidos e a ocorrência de metabolismo pré-hepático.
Situação: Em andamento, Natureza: Projetos de pesquisa.
Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (2); Doutorado (1).
Integrantes: André Bersani Dezani; Cristina Helena dos Reis Serra (Responsável); Thaisa Marinho Dezani
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São PauloFAPESP

2012-Atual:
Avaliação dos mecanismos de absorção envolvidos na permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio de modelo *ex vivo* (Franz cells) e *in vitro* (PAMPA)
Descrição: Estudo de permeabilidade intestinal de fármacos antirretrovirais com a utilização de método *ex vivo* (Franz cells) e método *in vitro* (PAMPA), considerando a ocorrência de mecanismos de efluxo e metabolismo no enterócito.
Situação: Em andamento, Natureza: Projetos de pesquisa.
Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (2); Doutorado (1);
Integrantes: André Bersani Dezani; Cristina Helena dos Reis Serra (Responsável); Thaisa Marinho Dezani
Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e TecnológicoCNPq

2009-2012:
Avaliação da solubilidade e da permeabilidade intestinal de fármacos antirretrovirais. Aplicações na Classificação Biofarmacêutica
Descrição: O trabalho teve como objetivo avaliar a solubilidade empregando o método do equilíbrio (técnica *shake-flask*) e os ensaios de dissolução intrínseca. O estudo de permeabilidade intestinal foi realizado com o uso do modelo de perfusão *in situ* para os fármacos estavudina, lamivudina e zidovudina.
Situação: Concluído, Natureza: Projetos de pesquisa.
Alunos envolvidos: Graduação (2); Mestrado acadêmico (1); Doutorado (1);
Integrantes: André Bersani Dezani; Cristina Helena dos Reis Serra (Responsável); João Batista da Silva Júnior; Thaisa Marinho Dezani
Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e TecnológicoCNPq

2008-2010:
Avaliação *in vitro* da solubilidade e da permeabilidade da lamivudina e da zidovudina. Aplicações na Classificação Biofarmacêutica
Descrição: Estudo de permeabilidade de fármacos antirretrovirais a partir do desenvolvimento de método *ex vivo* usando Franz cells com a finalidade de classificação biofarmacêutica de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB).
Apoio financeiro: CNPq (bolsa) e FAPESP (projeto).
Situação: Concluído, Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (2); Doutorado (1);
Integrantes: André Bersani Dezani; Cristina Helena dos Reis Serra (Responsável); Arthur Massabki Caffaro; Thaisa Marinho Dezani
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São PauloFAPESP

Revisor de periódico

1. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences (Impresso)
Vínculo
2013-Atual
Regime: Parcial

2. Journal of AOAC International
Vínculo
2010-Atual
Regime: Parcial

Producão

Artigos completos publicados em periódicos:

1. DEZANI, THAISA MARINHO; DEZANI, ANDRÉ BERSANI; JUNIOR, JOÃO BATISTA DA SILVA; SERRA, CRISTINA HELENA DOS REIS
SinglePass Intestinal Perfusion (SPIP) and Prediction of Fraction Absorbed and Permeability in Humans: A Study with Antiretroviral Drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.104, p.131-139, 2016.

2. SILVA JUNIOR, J. B.; DEZANI, T. M.; DEZANI, A. B.; SERRA, C. H. R.
Evaluating Potential P-gp Substrates: Main Aspects to Choose the Adequate Permeability Model for Assessing Gastrointestinal Drug Absorption. *Mini-Reviews in Medical Chemistry*, v.15, p.858-871, 2015.

3. DEZANI, ANDRÉ BERSANI; PEREIRA, THAISA MARINHO; CAFFARO, ARTHUR MASSABKI; REIS, JULIANA MAZZA; SERRA, CRISTINA HELENA DOS REIS
Determination of lamivudine and zidovudine permeability using a different *ex vivo* method in Franz cells. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v.67, p.194-202, 2013.

4. DEZANI, ANDRÉ BERSANI; PEREIRA, THAISA MARINHO; CAFFARO, ARTHUR MASSABKI; REIS, JULIANA MAZZA; SERRA, CRISTINA HELENA DOS REIS
Equilibrium solubility *versus* intrinsic dissolution: characterization of lamivudine, stavudine and zidovudine for BCS classification. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* (Impresso), v.49, p.853-863, 2013.

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

Artigos aceitos para publicação

1. DEZANI, T. M.; Dezani, A.B.; COQUEMALA, M.; SERRA, C.
In situ intestinal perfusion in rodents: Future perspectives for application on absorption studies and classification of drugs. *Mini-Reviews in Medical Chemistry*, 2017.

2. DEZANI, ANDRÉ BERSANI; DEZANI, T. M.; Ferreira, J.C.F.; SERRA, C. H. R.
Solubility evaluation of didanosine: a comparison between equilibrium method and intrinsic dissolution for biopharmaceutical classification purposes. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* (Impresso), 2017.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. Ferreira, J.C.F.; Dezani, A.B.; DEZANI, T. M.; Silva, M.M.C.; SERRA, C.H.R.
Biopharmaceutical Classification System: solubility evaluation of didanosine (ddI) In: XIX Pharmaceutical Science and Technology Meeting of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, 2014, São Paulo. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, 2014. v.50. p.20.

2. Silva, M.M.C.; DEZANI, T. M.; Dezani, A.B.; SERRA, C.H.R.
Development of a HPLC-UV method for quantification of zidovudine in buccal permeability studies In: XIX Pharmaceutical Science and Technology Meeting of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, 2014, São Paulo. *Brazailian Journal of Pharmaceutical Sciences*. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, 2014. v.50. p.19.

3. DEZANI, T. M.; Dezani, A.B.; Silva, M.M.C.; SERRA, C.H.R.
SinglePass Intestinal Perfusion as a method to predict absorption of drugs in humans: a study with cephalexin In: XIX Pharmaceutical Science and Technology Meeting of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, 2014, São Paulo. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, 2014. v.50. p.20.

Apresentação de trabalho e palestra

1. Dezani, A.B.; DEZANI, T. M.; SERRA, C.H.R.
Evaluation of solubility and permeability using Franz cells for Biopharmaceutical Classification System (BCS), 2016. (Congresso, Apresentação de Trabalho).

2. Dezani, A.B.; DEZANI, T. M.
Experiências no exterior II EPIFAR, 2016. (Outra, Apresentação de Trabalho).

3. A.B. Dezani Métodos para avaliar a permeabilidade de fármacos, 2014. (Outra, Apresentação de Trabalho).

4. PEREIRA, THAISA MARINHO; Dezani, A.B.; SILVA JUNIOR, J. B.; SERRA, C.H.R.
Intestinal permeability assay of antiretroviral drugs using *in situ* perfusion model, 2012. (Simpósio, Apresentação de Trabalho).

5. SERRA, C.H.R.; PEREIRA, T.M.; Dezani, A.B.; REIS, J.M.
Métodos para avaliar a permeabilidade de fármacos, 2012. (Outra, Apresentação de Trabalho).

6. Dezani, A.B.; PEREIRA, T.M.; CAFFARO, A. M.; SERRA, C.H.R.
Permeability evaluation of lamivudine and zidovudine using *ex vivo* method, 2012. (Simpósio, Apresentação de Trabalho).

7. PEREIRA, T. M.; DEZANI, A. B.; SERRA, C. H. R.
Sistema de Classificação Biofarmacêutica: avaliação da solubilidade da estavudina utilizando o método *shake-flask*, 2010. (Simpósio, Apresentação de Trabalho).

8. DEZANI, A. B.; CAFFARO, A. M.; SERRA, C. H. R.
Sistema de Classificação Biofarmacêutica: Avaliação da Solubilidade da Zidovudina e da Lamivudina, 2009. (Simpósio, Apresentação de Trabalho).

Orientações e Supervisões

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. Damaris de Andrade e Jéssica Ozelami. Aspectos gerais da biofarmacotécnica. 2013. Curso (Farmácia) Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas

Eventos

Participação em eventos

1. 4th International Pharma & Clinical Pharmacy Congress. Solubility characterization of didanosine using shake flask and intrinsic dissolution methods: Application for biopharmaceutical classification. 2016. (Congresso).

2. 4th International Pharma & Clinical Pharmacy Congress. Application of the Single-Pass Intestinal Perfusion studies on drug absorption prediction in humans. 2016. (Congresso).

3. 4th International Pharma & Clinical Pharmacy Congress. Evaluation of intestinal

permeability and efflux of lamivudine using *ex vivo* method in Franz cells. 2016. (Congresso).

4. 4th International Pharma & Clinical Pharmacy Congress. Permeability study using the Single-Pass Intestinal Perfusion in rats: Is the zidovudine a substrate for P-gp?. 2016. (Congresso).

5. 6th World Congress on Bioavailability & Bioequivalence: BA/BE Studies Summit. A rapid HPLC method for ranitidine quantification: Application for in situ intestinal perfusion studies. 2015. (Congresso).

6. 6th World Congress on Bioavailability & Bioequivalence: BA/BE Studies Summit. A rapid HPLC method for metoprolol quantification: Application for *ex vivo* intestinal studies using Franz cells. 2015. (Congresso).

7. 6th World Congresso n Bioavailability&Bioequivalence: BA/BE Studies Summit. Development and validation of a HPLC-FL method for fluorescein quantification in buccal permeability studies. 2015. (Congresso).

8. 2015 Annual Meeting and Exposition. Metoprolol permeability: Intestinal permeation assessment by the Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) method. 2015. (Congresso).

9. 2015 Annual Meeting and Exposition. Influence of magnetic stirring speed on intestinal permeability in Franz cells. 2015. (Congresso).

10. UCSF AMGEN Symposium, 2015. (Simpósio)

11. Apresentação de Poster / Painel no(a) 49ª Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, 2014. (Congresso)
Single-pass intestinal perfusion as a method to predict absorption of drugs in humans: a study with
Cephalexin

12. Apresentação de Poster / Painel no(a) 49ª Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, 2014. (Congresso)
Development of a HPLC-UV method for quantification of zidovudine in buccal permeability studies.

13. Apresentação de Poster / Painel no(a) 49ª Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, 2014. (Congresso)
Biopharmaceutical Classification System: solubility evaluation of didanosine (ddI).

14. Workshop Polimorfos em Medicamentos United States Pharmacopeia, 2013. (Outra)

15. Apresentação de Poster / Painel no(a) XVII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2012. (Simpósio)
Intestinal permeability assay of antiretroviral drugs using *in situ* perfusion model.

16. Apresentação de Poster / Painel no(a) XVII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2012. (Simpósio)
Permeability evaluation of lamivudine and zidovudineusing *ex vivo* method.

17. Apresentação de Poster / Painel no(a) XV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2010. (Simpósio) Sistema de Classificação Biofarmacêutica: Avaliação da Solubilidade da Estavudina Utilizando o Método *Shake-Flask*.

18. Apresentação de Poster / Painel no(a) XIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2009. (Simpósio) Sistema de Classificação Biofarmacêutica: Avaliação da Solubilidade da Zidovudina e Lamivudina.

19. Simpósio de Atualização em Farmacologia Clínica, 2007. (Simpósio)

20. IX Jornada Farmacêutica, 2006. (Seminário)
Teste de atividade antimicrobiana.

21. IX Jornada Farmacêutica, 2006. (Congresso)
Perfumes.

22. Pharma Congress, 2006. (Congresso)

23. Semana Racine, 2006. (Seminário)
Critérios no desenvolvimento de formulações dermocosméticas para peles sensíveis.

24. II Jornada Farmacêutica, 1999. (Simpósio)

Organização de evento

1. Dezani, A.B.
Oficina Atividades Clínicas do Farmacêutico: Conceitos, Práticas e Perspectivas para o SUS, 2013.
(Outro, Organização de evento)

ANEXO E

Artigos publicados relacionados à tese

In situ **intestinal perfusion in rodents: Future perspectives for application on absorption studies and classification of drugs**

Ahead of print

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae

***Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2017, *17*, 000-000** **1**

REVIEW ARTICLE

In situ Intestinal Perfusion in Rodents: Future Perspectives for Application on Absorption Studies and Classification of Drugs

Thaisa Marinho Dezani, André Bersani Dezani, Mônica Maria Coquemala da Silva and Cristina Helena dos Reis Serra*

Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences of the University of São Paulo - Avenida Professor Lineu Prestes, 580, Bl. 13, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE HISTORY

Received: October 21, 2015
Revised: June 03, 2016
Accepted: June 19, 2016

DOI:
10.2174/1389557516666160921145613

Abstract: In 1995, the Biopharmaceutics Classification System (BCS) was proposed by Amidon and colleagues as a tool that considers two important parameters regarding drugs: solubility and permeability. Since then, several methods for solubility and permeability studies have been developed for drug delivery and absorption prediction. In recent years, permeability has gained a great highlight and the interaction between a molecule and a biological membrane is not enough to predict the *in vivo* behavior of a compound. Thus, different methods for permeability assessment are currently used for mechanistic studies including involvement of carriers and several transport pathways. Furthermore, the investigation regarding metabolism has been a focus in recent researches. Based on this idea, Wu and Benet proposed a new tool called Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS), where drugs are classified into four classes considering their solubility and metabolism. Among several methods for permeability studies, the *in situ* intestinal perfusion is considered the closest to *in vivo* conditions due advantages as intact blood supply and innervation. This review presents the *in situ* intestinal perfusion model and its application for permeability/transport studies of drugs and intestinal metabolism. Also, this paper discusses about how the *in situ* perfusion studies can be used for classification of drugs and the future perspectives for *in vivo* absorption prediction.

Keywords: BCS, BDDCS, *in situ* perfusion, intestinal metabolism, permeability, transport.

1. INTRODUCTION

In 1995, Amidon and colleagues proposed the Biopharmaceutics Classification System (BCS) as a tool for drug assessment and it is based on aqueous solubility and permeability through biological membranes. Thus, drugs can be classified into four classes: (I) high solubility and high permeability, (II) low solubility and high permeability, (III) high solubility and low permeability, and (IV) low solubility and low permeability [1].

In 2000, Food and Drug Administration (FDA) adopted BCS for biowaiver purposes of class I drugs orally administered. Since then, the BCS is used for the development of new drugs and pharmaceutical dosage forms. Several methods were developed for solubility and permeability studies and some of them have been accepted by FDA for biopharmaceutical classification of drugs [2, 3].

*Address correspondence to this author at the Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences of the University of São Paulo - Avenida Professor Lineu Prestes, 580, Bl. 13, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil; Tel: +55 11 30913623; Fax: +55 11 38154418;
E-mail: chserra@usp.br

Currently, for screening purposes, Caco-2 cell line has been widely used in pharmaceutical industries to select potential chemical entities. However, some drawbacks regarding this *in vitro* model can underestimate or overestimate the drug absorption due to irregular expression of carriers, lack of mucus layer and low intracellular levels of CYP3A enzymes. Also, the site-dependent absorption cannot be evaluated using cell cultures as well as enzyme-transporter interplay. The long period for cultivation (21 days) led some researchers to develop additional protocols with short period for cell growth. In this case, the establishment of a new protocol for cell culture in permeability/transport studies requires a good validation of the method and a good correlation between results from the new protocol and results from well-established models [4-6].

Among different methods used for permeability studies, the *in situ* intestinal perfusion has been used as a model due its similarity to the *in vivo* conditions such as intact blood supply, innervation, active carriers and enzymes. Although permeability studies have been strongly conducted since the FDA guidance publication, some methods may not explain doubts about absorption prediction. A well-established

1389-5575/17 $58.00+.00 © 2017 Bentham Science Publishers

Evaluating potential P-gp substrates: Main aspects to choose the adequate permebility model for assessing gastrointestinal drug absorption

858 *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2015, *15*, 858-871

Evaluating Potential P-gp Substrates: Main Aspects to Choose the Adequate Permeability Model for Assessing Gastrointestinal Drug Absorption

João Batista da Silva Junior, Thaisa Marinho Dezani, André Bersani Dezani and Cristina Helena dos Reis Serra*

Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Avenida Professor Lineu Prestes, 580-Bl. 13, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil

Abstract: The success of an oral drug route administration depends on many factors that interfere in its bioavailability, therapeutic efficacy and clinical safety. In human cells, ATP-dependent efflux transporter proteins, such as P-glycoprotein (P-gp), BCRP and MRP2, reduce the absorption of drugs. A tiered approach chosen to evaluate drugs as substrates or inhibitors of efflux pumps, particularly P-gp, should be carefully selected, since each study method has advantages and intrinsic limitations to their processes. Depending on the adopted study conditions, the results may not correspond to the real characteristics of the drug regarding to its modulation by specific efflux proteins. This mini-review aims at summarizing the role of P-gp in the drugs oral absorption and correlating some of the most used permeability methods to determine the drug condition as P-gp substrate. Studies about P-gp have shown that it is a dynamic protein, facilitating secretion of endogenous compounds, as aldosterone, and protecting cells against xenobiotics. Different efflux assays are employed to evaluate drugs as P-gp substrates. In an initial planning, MDCK-MDR1 tend to be the chosen method for efflux studies due its ability of express P-gp, followed by studies conducted in Caco-2 models. However, it is necessary to evaluate the advantages and disadvantages of each method to generate sound results and to set the correlation *in vitro* x *in situ* x *in vivo*.

Keywords: Caco-2, drug permeability, efflux, *ex vivo*, *in situ*, *in vitro*, MDCK, MDCK-MDR1, P-glycoprotein.

INTRODUCTION

In clinical routine, oral drug administration is the preferred route due to its convenience, safety, efficiency, with minimal discomfort to the patient, and still with relatively low production costs. Most drugs marketed worldwide are available as oral dosage forms. However, one of the prerequisites for successful therapy is sufficient intestinal absorption to ensure that the drug is available at its intended target site. Nevertheless, drug absorption in the gastrointestinal tract is complex and may be influenced by several factors that impact in drug dissolution/solubility and permeability, such as drug aqueous solubility, gastric emptying time, intestinal motility, intestinal pH, mechanisms involved in the transport of drugs across the membranes of enterocytes, pre-systemic drug metabolism and pharmaceutical excipients [1-7].

Drug absorption occurs mainly in small intestine, especially in duodenum and proximal jejunum portions, through enterocytes [8-12]. Enterocytes are highly polarized cells, i.e. they have an apical side (mucosal or intestinal lumen), which faces the lumen of the intestine, and a basolateral side (serosal). Intercellular complexes called tight junctions connect the enterocytes. Lipid characteristic of enterocytes membranes and tight junctions are the main physical barriers for drug permeation [12-14]. Drug absorption across the intestinal membrane is a dynamic and complex multi-pathway process, and it may occur through one or more mechanisms by passive diffusion or active transport (Fig. **1**). Passive diffusion is the most common mechanism involved in absorption across the intestinal membrane and it is divided into two pathways: transcellular, through the membrane of enterocytes; and paracellular, through the aqueous pores at the tight junctions. The active transport pathway is mediated by transporters and is divided into active influx and efflux [12, 15-18].

Transcellular passive absorption (Fig. **1**, route 3) occurs across the lipid bilayer of enterocytes. It is a concentration gradient-driven mass transport across the cell membrane, and it is a non-consuming energy process. This pathway follows Fick's law, whereby the absorption rate is proportional to the drug concentration and the surface area. Generally, it depends on the uncharged fraction of the molecule taking into consideration the pKa and the physicochemical properties of the drug, such as lipophilicity (log P/log D), polar surface area, hydrogen bond number and molecular

*Address correspondence to this author at the Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Avenida Professor Lineu Prestes, 580 Bl. 13, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil; Tel: +55 11 30913623; Fax: + 55 11 38154418; E-mail: chserra@usp.br

1875-5607/15 $58.00+.00 © 2015 Bentham Science Publishers

Determination of lamivudine and zidovudine permebility using a diferente *ex vivo* method in Franz cells

Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 67 (2013) 194–202

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Pharmacological and Toxicological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpharmtox

Original article

Determination of lamivudine and zidovudine permeability using a different *ex vivo* method in Franz cells

André Bersani Dezani, Thaisa Marinho Pereira, Arthur Massabki Caffaro, Juliana Mazza Reis, Cristina Helena dos Reis Serra *

Faculty of Pharmaceutical Sciences of the University of São Paulo, Avenida Professor Lineu Prestes, 580, Bl. 13, 05508-000, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 26 September 2012
Accepted 8 January 2013
Available online 19 January 2013

Keywords:
Permeability
Franz cells
Lamivudine
Zidovudine
Biopharmaceutical Classification System
Methods

ABSTRACT

Introduction: The major processes that control the absorption of orally administered drugs are dissolution and gastrointestinal permeation. These processes depend on two main properties: solubility and permeability. Based on these characteristics, the Biopharmaceutical Classification System (BCS) was proposed as a tool to assist in biowaiver and bioavailability prediction of drugs.

Methods: The purpose of the present study was to evaluate the permeability of lamivudine (3TC) and zidovudine (AZT) using a different *ex vivo* method in Franz cells. A segment of jejunum was inserted in a Franz cells apparatus, in order to assess drug permeability in the apical–basolateral (A–B) and basolateral–apical (B–A) directions. Each drug was added to the donor chamber, collected from the acceptor chamber and analyzed by HPLC. Fluorescein (FLU) and metoprolol (METO) were used as low and high permeability markers, respectively.

Results: The apparent permeability (P_{app}) results for the A–B direction were: $P_{app\ FLU\ A-B} = 0.54 \times 10^{-4}$ cm·s^{-1}, $P_{app\ METO\ A-B} = 7.99 \times 10^{-4}$ cm·s^{-1}, $P_{app\ 3TC\ A-B} = 4.58 \times 10^{-4}$ cm·s^{-1} and $P_{app\ AZT\ A-B} = 5.34 \times 10^{-4}$ cm·s^{-1}. For the B–A direction, the P_{app} results were: $P_{app\ FLU\ B-A} = 0.56 \times 10^{-4}$ cm·s^{-1}, $P_{app\ METO\ B-A} = 0.25 \times 10^{-4}$ cm·s^{-1}, $P_{app\ 3TC\ B-A} = 0.24 \times 10^{-4}$ cm·s^{-1} and $P_{app\ AZT\ B-A} = 0.19 \times 10^{-4}$ cm·s^{-1}.

Discussion: For the A–B direction, the P_{app} results of fluorescein and metoprolol show low and high permeability, respectively, indicating that the membranes were appropriate for permeability studies. For the A–B direction, the P_{app} results of 3TC and AZT suggest that these antiretroviral drugs have permeability values close to metoprolol. Nevertheless, for the B–A direction the P_{app} results do not suggest efflux mechanism for any of the drugs. Thereby, the different *ex vivo* methods using Franz cells can be successfully applied in drug permeability studies, in particular for drug biopharmaceutical classification.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Oral drug administration is the most common route for drug intake, mainly due to the convenience, safety, low cost and good acceptance by patients (Balimane, Chong, & Morrison, 2000; Corá et al., 2011; Lennernäs & Abrahamsson, 2005; Pretorius & Bouic, 2009).

The active ingredient in a solid dosage form must be soluble in biological fluids and should be able to cross the biological membrane in physiological conditions (Balimane et al., 2000; Dahan, West, & Amidon, 2009). Thus, solubility and permeability characteristics are important processes for drug absorption and, consequently, for its bioavailability (Amidon, Lennernäs, Shah, & Crison, 1995).

Drug absorption takes place especially in the small intestine, mostly in the duodenum and proximal jejunum portions, through enterocytes (Balimane et al., 2000; Fagerholm, Johansson, & Lennernäs, 1996; Hillgren, Kato, & Borchardt, 1995; Lennernäs, 1998). These cells are connected to each other by tight junctions, which are considered the main physical barriers for drug permeation, together with lipid membrane characteristics (Artursson, Ungell, & Löfroth, 1993; Deferme, Annaert, & Augustijns, 2008).

Absorption of drugs is a dynamic and complex process that occurs by different pathways, such as: passive transcellular and paracellular, active uptake transporters (including influx and efflux mechanisms) and endocytosis (Balimane, Han, & Chong, 2006; Balimane et al., 2000; Cook & Shenoy, 2003; Corá et al., 2011; Deferme et al., 2008; Kerns et al., 2004). About 80–95% of drugs are absorbed by passive diffusion and this route is affected by physicochemical properties such as lipophilicity, hydrogen bonding, pK_a, and molecular weight (Cao et al., 2006; Kerns et al., 2004).

Therefore, based on aqueous drug solubility and permeability, the Biopharmaceutical Classification System (BCS) was proposed by Amidon et al. (1995). This system allows the classification of drugs into four classes: high solubility and high permeability (class I), low solubility and high permeability (class II), high solubility and low permeability (class III) and, low solubility and low permeability (class IV).

* Corresponding author at: University of São Paulo, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Avenida Professor Lineu Prestes, 580, Bl. 13, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 11 30913623; fax: +55 11 38154418.
E-mail address: chserra@usp.br (C.H.R. Serra).

1056-8719/$ – see front matter © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2013.01.005

Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, *ex vivo* and *in situ* single-pass intestinal perfusion (SPIP) in rat jejunum

European Journal of Pharmaceutical Sciences 48 (2013) 781–789

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutical Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejps

Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, *ex vivo* and *in situ* Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum

J.M. Reis [a,1], A.B. Dezani [a], T.M. Pereira [a], A. Avdeef [b], C.H.R. Serra [a,*]

[a] Faculty of Pharmaceutical Sciences of the University of São Paulo, 580 Prof. Lineu Prestes Av., Bl. 13, 05508-900 São Paulo, Brazil
[b] in-ADME Research, 20 Second St., Cambridge, MA 02141, USA

ARTICLE INFO

Article history:
Received 26 June 2012
Received in revised form 27 November 2012
Accepted 17 December 2012
Available online 5 January 2013

Keywords:
Permeability
Lamivudine
PAMPA
In situ perfusion
Franz cell
Jejunum *ex vivo*

ABSTRACT

In order to reach the bloodstream and thus the target receptor, an orally-administered drug must first cross the intestinal barrier, which can occur via a paracellular, passive transcellular, or carrier-mediated uptake and/or efflux process (active or concentration gradient-driven). Our work aimed to explore the transport mechanism of the antiretroviral lamivudine (deoxycytidine nucleoside analogue), using a three-part strategy: *in vitro*, an *ex vivo* and an *in situ* method, represented by PAMPA, rat jejunum patches and rat Single Pass Intestinal Perfusion (SPIP), respectively. The determined permeability coefficients were compared with those from a published Caco-2 and MDCK study. Computational prediction of human jejunal permeability was explored, using various non-human permeability coefficients as descriptors. The *ex vivo* technique was performed in Franz-type diffusion cells, mounted with male Wistar rat jejunum segment patches. PAMPA was performed with an acceptor solution simulating the binding of serum proteins, an artificial membrane impregnated with egg lecithin/cholesterol and a gradient of pH between donor and acceptor solutions. The SPIP was conducted by proximal jejunum cannulation and drug perfusion in a constant flow rate of 0.2 mL/min. The outcomes of our studies showed the following predicted pattern for lamivudine effective jejunal permeability: $P_{eff}^{ex\,vivo\,A>B} > P_{eff}^{SPIP} > P_{eff}^{ex\,vivo\,\ B>A} > P_{eff}^{Caco\text{-}2} \approx P_{eff}^{MDCK} \approx P_{eff}^{PAMPA}$, strongly suggesting that this compound has *carrier-mediated uptake* as its dominant transport mechanism. Notwithstanding, Caco-2 cells may indicate an under-expression of uptake transporters and possibly an over-expression efflux transporters, compared to that found in the rat jejunum.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Identifying compounds with sufficient membrane permeability is an important goal during lead optimization of new chemical entities (Li et al., 2008). Following oral administration, a dissolved drug may cross the intestinal barrier by a single or a combination of several pathways, including passive paracellular diffusion, passive transcellular diffusion, and/or carrier-mediated uptake/efflux (active or concentration gradient-driven), before entering systemic circulation (Fujikawa et al., 2005; Shugarts and Benet, 2009).

There are many known uptake transporters, whose substrates include amino acids, peptides, and nucleosides. Efflux transporters include the well-studied P-glycoprotein (P-gp), which is responsible for secreting drugs out of the cell (Kim and Benet, 2004). P-gp substrates are generally hydrophobic molecules, often cationic (Giacomini et al., 2010). Other efflux transporters comprise multi-drug resistance proteins (MRPs) and breast cancer-related protein (BCRP) (Chan et al., 2004; Quevedo et al., 2011).

Current approaches to characterize drug permeability draw on various models: octanol–water partition coefficients, artificial membrane permeability, *ex vivo*/*in vitro* (tissue- or cultured cell-based), *in situ* and *in vivo* intestinal perfusion, as well as *in silico* methods (Bohets et al., 2001).

The established *in vitro* permeability assay in pharmaceutical research is based on cellular monolayer systems, such as Caco-2 and MDCK. The Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) has evolved as an adjunct to the cellular methods (Kansy et al., 1998). PAMPA is a low-cost, high-throughput permeability method. Since the majority of drugs are thought to be absorbed primarily or partially by passive transport, the rate of permeation through a simple artificial membrane is likely to provide an indication of a drug's absorption potential (Kansy et al., 1998; Balimane et al., 2000; Avdeef et al., 2005; Fujikawa et al., 2005; Masungi et al., 2008; Li et al., 2008; Nirasay et al., 2011; Buckley et al., 2012).

Ex vivo assays using excised rat intestinal segment patches have the advantage of expressing the vast majority of influx and efflux transporters found *in vivo*. Rat intestinal segment patches can be used to establish intestinal correlation between rats and humans (Tukker, 2000; Trapani et al., 2004; Zakelj et al., 2006; Cao et al., 2008; Pretorius and Bouic, 2009). Models which employ vertical

* Corresponding author. Tel.: +55 11 30913623; fax: +55 11 38154418.
E-mail addresses: ju_gene@hotmail.com (J.M. Reis), chserra@usp.br (C.H.R. Serra).
[1] Tel.: +55 11 987825524.

0928-0987/$ - see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2012.12.025

Equilibrium solubility versus intrinsic dissolution: characterization of lamivudine, satvudine and zidovudine for BCS classification

BJPS

Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences
vol. 49, n. 4, oct./dec., 2013

Article

Equilibrium solubility *versus* intrinsic dissolution: characterization of lamivudine, stavudine and zidovudine for BCS classification

André Bersani Dezani, Thaisa Marinho Pereira, Arthur Massabki Caffaro, Juliana Mazza Reis, Cristina Helena dos Reis Serra*

Department of Pharmacy, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Solubility and dissolution rate of drugs are of major importance in pre-formulation studies of pharmaceutical dosage forms. The solubility improvement allows the drugs to be potential biowaiver candidates and may be a good way to develop more dose-efficient formulations. Solubility behaviour of lamivudine, stavudine and zidovudine in individual solvents (under pH range of 1.2 to 7.5) was studied by equilibrium solubility and intrinsic dissolution methods. In solubility study by equilibrium method (shake-flask technique), known amounts of drug were added in each media until to reach saturation and the mixture was subjected to agitation of 150 rpm for 72 hours at 37 °C. In intrinsic dissolution test, known amount of each drug was compressed in the matrix of Wood's apparatus and subjected to dissolution in each media with agitation of 50 rpm at 37 °C. In solubility by equilibrium method, lamivudine and zidovudine can be considered as highly soluble drugs. Although stavudine present high solubility in pH 4.5, 6.8, 7.5 and water, the solubility determination in pH 1.2 was not possible due stability problems. Regarding to intrinsic dissolution, lamivudine and stavudine present high speed of dissolution. Considering a boundary value presented by Yu and colleagues (2004), all drugs studied present high solubility characteristics in intrinsic dissolution method. Based on the obtained results, intrinsic dissolution seems to be superior for solubility studies as an alternative method for biopharmaceutical classification purposes.

Uniterms: Drugs/solubility. Drugs/dissolution rate. Intrinsic dissolution/method/biopharmaceutical classification. Biopharmaceutical Classification System.

A solubilidade e a taxa de dissolução de fármacos são de grande importância em estudos de pré-formulação de formas farmacêuticas. A melhora na solubilidade permite que os fármacos sejam candidatos potenciais à bioisenção, podendo ser uma boa maneira para desenvolver formulações dose-eficientes. O comportamento de solubilidade da lamivudina, estavudina e zidovudina em solventes individuais (sob faixa de pH 1,2 a 7,5) foi estudado pelos métodos de solubilidade em equilíbrio e dissolução intrínseca. No estudo de solubilidade pelo método do equilíbrio (método de agitação de frascos), conhecidas quantidades do fármaco foram adicionadas em cada meio até atingirem a saturação e a mistura foi submetida à agitação de 150 rpm por 72 horas a 37 °C. No ensaio de dissolução intrínseca, conhecida quantidade de cada fármaco foi comprimida na matriz do aparato de Wood e submetida à dissolução em cada meio com agitação de 50 rpm a 37 °C. No método de solubilidade em equilíbrio, a lamivudina e a zidovudina podem ser consideradas como fármacos altamente solúveis. Embora a estavudina apresente alta solubilidade nos meios pH 4,5, 6,8, 7,5 e água, a determinação da solubilidade em pH 1,2 não foi possível devido a problemas de estabilidade. Com relação à dissolução intrínseca, a lamivudina e a estavudina apresentaram alta velocidade de dissolução. Considerando o valor limite apresentado por Yu e colaboradores (2004), todos os fármacos apresentaram características de alta solubilidade no método de dissolução intrínseca. Com base nos resultados obtidos, a dissolução intrínseca parece ser superior para os estudos de solubilidade como um método alternativo para o propósito de classificação biofarmacêutica.

Unitermos: Fármacos/solubilidade. Fármacos/taxa de dissolução. Dissolução intrínseca/método/classificação biofarmacêutica. Sistema de Classificação Biofarmacêutica.

***Correspondence:** C. H. R. Serra. Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes, n.580, 05508-000 – São Paulo – SP, Brasil. E-mail: chserra@usp.br; andredezani@usp.br

ANEXO F

Artigos em elaboração relacionados e/ou pertencentes à tese

Biopharmaceutics Classification System (BCS) and Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS): Applications in drug development and biowaiver processes

Thaisa M. Dezani*[a], André B. Dezani*[a], Leslie Z. Benet[b], Cristina H.R. Serra[a];

[a] Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

[b] Department of Bioengineering & Therapeutic Sciences

* These authors contributed equally to this work

ABSTRACT

The oral administration is the main route for drug intake due to acceptance by patients, convenience and low costs. After oral administration, the drug should to be solubilized in the liquids of the gastrointestinal tract (GIT) and be able to cross the gut wall in order to reach the systemic circulation and, consequently, performs its pharmacological action. Thus, solubility and permeability characteristics are directly related to bioavailability, which corresponds to a biological property related to the rate and extent of drug's absorption from a pharmaceutical form and it becomes available at the site of action. Based on that, Amidon and colleagues proposed the Biopharmaceutics Classification System (BCS) as a tool for drug classification according to the solubility and the permeability. These characteristics have gained notoriety since the publication of the SCB-based guidance by the Food and Drug Administration (FDA). Since the solubility corresponds to a mandatory step for absorption processes related to ADME properties (absorption, distribution, metabolization, excretion), another tool called Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS) was proposed by Wu and Benet and this system considers solubility and metabolism for the classification of drugs. Since then, many studies have been developed regarding the characterization of solubility, permeability and metabolism in order to clarify events related to the pharmacokinetics of the drugs. Thus, this study aimed to compare BCS and BDDCS and discuss their important roles in the development of new drugs, in the biowaiver processes in the AMDME scope. Some studies in the literature describe both systems, but there is a need to evaluate the importance of each one and their relationships between them. While the BCS corresponds to a more objective tool, the BDDCS is considered more complex and is related to several parameters not considered by the BCS. Although both systems contemplate solubility, the difference is related to the characteristics of permeability and the extent of metabolism, which correlate to some drugs already studied in the literature. Thus, BCS and BDDCS present themselves as important complementary tools that help in understanding the behavior of orally administered substances.

Keywords: BCS, BDDCS, biowaiver, solubility, permeability, metabolism.

In vitro and *ex vivo* methods applied in the evaluation of intestinal drug permeability

André B. Dezani*[a], Thaisa M. Dezani*[a], Leslie Z. Benet[b], Cristina H. R. Serra[a]

[a] Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

[b] Department of Bioengineering & Therapeutic Sciences

* These authors contributed equally to this work

ABSTRACT

Since the presentation of the Biopharmaceutics Classification System (BCS) and its application to biowaiver processes, many permeability studies have been developed with the aim of predicting *in vivo* absorption. The permeability, considered by BCS is one of the factors responsible for the bioavailability of orally administered drugs. However, many other parameters interfere in the bioavailability, such as drug metabolism. Thus, the Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS) considers the solubility and metabolism characteristics of the substances. The prediction of *in vivo* absorption has been a challenge since the establishment of BCS and BDDCS and many methods used for the permeability evaluation are currently available. Absorption is a complex process influenced by several factors including the physicochemical characteristics of drugs, transport mechanisms and metabolic activity in the gastrointestinal tract (GIT). Thus, with the experiments carried out in *in vitro* and *ex vivo* models it is possible to understand the influence of excipients on the permeability processes, especially when absorption promoters are used in the pharmaceutical forms. It is extremely important to know each method available for the studies of permeability and to consider several parameters such as the influence of enzymes and / or carriers of influx and efflux. In addition, each model has advantages and disadvantages, which must be carefully considered for the correct interpretation of results to their applications in *in vivo* situations. Based on that, this work aimed to present a review of the methods currently used for the permeability studies by *in vitro* and *ex vivo* models, as well as, provides guidelines to the researchers for the selection of the most appropriate model in drug permeability evaluation.

Keywords: permeability, *in vitro* methods, *ex vivo* methods, absorption, efflux transport.

Main aspects related to the intestinal metabolism and its influence in drug absorption

André B. Dezani*[a], Thaisa M. Dezani*[a], Hideaki Okochi[b], Cristina H.R. Serra[a], Leslie Z. Benet[b]

[a] Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

[b] Department of Bioengineering & Therapeutic Sciences

* These authors contributed equally to this work

ABSTRACT

Currently, many of the pharmaceutical products available on the market are directed to oral administration because of their safety, convenience, low costs and great acceptance by the patients. Thus, orally administered drugs depend on the steps of solubility and permeability in the gastrointestinal tract (GIT) to have adequate oral bioavailability. Solubility is considered an important and mandatory step for drug transport through the gut wall, since the permeability step is complex and involves several mechanisms. Based on the characteristics of solubility and permeability, the Biopharmaceutics Classification System (BCS) was proposed as a tool for the drug classification and for the development of new compounds and new dosage formulations. Another tool called Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS) was proposed in order to classify drugs according to their characteristics of solubility and metabolism. Thus, the bioavailability may be influenced not only by the solubility and permeability, but also by the pre-systemic metabolism that often occurs in enterocytes. The aim of the present study was to present the importance of intestinal metabolism and its impact in absorption processes, as well as to discuss the most used methods to identify if a drug is a substrate of CYP3A enzymes. Currently, few studies have addressed the importance of intestinal metabolism and its influence on processes related to the ADME properties (absorption, distribution, metabolism and elimination). However, some méthods may be employed to assess whether intestinal metabolism is related to the low bioavailability observed for some drugs. Based on that, assays in *in vitro*, *ex vivo* and in situ models are the most used for this purpose.

Keywords: intestinal metabolism, enterocytes, CYP3A, BCS, BDDCS.

Evaluation of permeability of antiretroviral drugs by *in vitro* model PAMPA and *ex vivo* model Franz cells

André B. Dezani*[a], Thaisa M. Dezani*[a], Cristina H.R. Serra[a]

[a] Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil
* These authors contributed equally to this work

ABSTRACT
The efficacy and safety of orally administered drugs are related to the bioavailability, a biological property related to the rate and extent of drug absorption. Oral absorption depends on the release of the drug from the pharmaceutical dosage form, its solubilization in biological fluids and its permeability through the gut wall. Based on that, the solubility and permeability of drugs are considered important steps for the absorption. The Biopharmaceutics Classification System (BCS) has been proposed for drug classification according to these two characteristics, as well as assisting in the development of new drugs, new pharmaceutical formulations and in biowaiver processes. For the evaluation of permeability, many methods have been described in the literature, such as the *in vitro* model PAMPA and the *ex vivo* model with use of isolated intestinal segments in Franz cells. PAMPA allows evaluation of transcellular passive transport while the intestinal segments is able to elucidate the involvement of other mechanisms, such as active transport influx and/or efflux, passive paracellular transport and endocytosis. Both models are used in a complementary way, since no single method is able to predict the absorption *in vivo*. Thus, this study aimed to evaluate the permeability of antiretroviral drugs by *in vitro* PAMPA and *ex vivo* models with the use of Franz cells. Antiretroviral drugs, such as stavudine, lamivudine, and zidovudine are widely used in the treatment of Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). However, these drugs have variations in the *in vivo* bioavailability, which may be related to the transport mechanisms involved in their absorption. For the evaluation of the permeability of these drugs, studies in PAMPA were carried out with the purpose of evaluating the transcellular permeability of each drug. The pH variation was used considering the physiological range of 3.0 to 7.4, temperature of 37 ° C and incubation at 100 rpm for 15 hours. On the other hand, studies in Franz cells were performed in the A→B (apical-basolateral) direction at 37°C, where each drug was added to the donor compartment and the samples were collected from the acceptor compartment at regular intervals. For all experiments, high and low permeability markers (metoprolol and ranitidine) were used. The permeability results obtained in PAMPA pH 6.8 were: $0.74 \pm 0.11 \times 10^{-6}$ cm/s for stavudine, $0.25 \pm 0.12 \times 10^{-6}$ cm/s for lamivudine and $1.14 \pm 0.25 \times 10^{-6}$ cm/s for zidovudine. In the *ex vivo* model using Franz, the results were: $1.56 \times 10^{-5} \pm 0.32$ cm/s for stavudine, $1.26 \times 10^{-5} \pm 0.27$ cm/s for lamivudine and $2.54 \times 10^{-5} \pm 0.49$ cm/s for zidovudine. The permeability values obtained through the *ex vivo* model suggested that the antiretroviral drugs present the active transcellular pathway and/or paracellular route as mechanisms of transport. The results obtained in PAMPA were divergent from the results obtained by the *ex vivo* model, which indicates that the conditions provided by the PAMPA assay did not comprise all the variables involved in the permeability process of the analyzed drugs in comparison to the data obtained by the model *ex vivo*.

Keywords: antiretroviral, permeability, PAMPA, Franz cells, *in vitro*, ex vivo.

Evaluation of the drug-efflux interaction of antiretroviral drugs through *in vitro* MDCK-MDR1 and *ex vivo* Franz cells models

André B. Dezani*[a], Thaisa M. Dezani*[a], Cristina H.R. Serra[a]; Leslie Z. Benet[b]

[a] Faculty of Pharmaceutical Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

[b] Department of Bioengineering & Therapeutic Sciences

* These authors contributed equally to this work

ABSTRACT

For orally administered drugs, the determination of permeability characteristics and mechanisms related to the absorption processes has become relevant since such factors interfere directly on bioavailability. The influence of efflux transport, caused mainly by the P-glycoprotein (P-gp), is considered important in the development and characterization of drugs, since this transporter may be related to the incomplete *in vivo* bioavailability observed for some drugs. Different methods have been employed for drug efflux studies, including *in vitro* models using MDCK-MDR1 cell cultures and *ex vivo* with the use of intestinal segments from rats in Franz cells. Thus, the present work aimed to evaluate the influence of the efflux mechanism caused by P-gp in the permeability of antiretroviral drugs stavudine, lamivudine and zidovudine. *In vitro* models using MDCK-MDR1 cells and *ex vivo* method with the use of intestinal segments in Franz cells were employed in the efflux studies. In MDCK-MDR1 cells, GG918 was used as a P-gp inhibitor. The experiments were conducted in the apical-basolateral (A→B) and basolateral-apical (B→A) directions in the presence and absence of the inhibitor. For experiments in *ex vivo* model, intestinal segments of jejunum were mounted into the Franz cells device and verapamil was employed as a P-gp inhibitor. In the MDCK-MDR1 assays, the B→A / A→B ratios were: 1.7 for stavudine, 2.0 for lamivudine and 3.2 for zidovudine. In the *ex vivo* model, a comparison of the results obtained in the absence and presence of verapamil indicated a significant increase in the permeability of the three antiretroviral drugs when the inhibitor was used: from 15.6 x 10^{-6} to 42.5 x 10-6 cm/s for stavudine, 12.6 x 10^{-6} for 37.5 x 10^{-6} cm/s for lamivudine and 25.4 x 10^{-6} for 56.6 x 10^{-6} cm/s for zidovudine. Based on that, the *ex vivo* model with the use of intestinal segments in Franz cells was adequate in evaluating the efflux mechanism of antiretroviral drugs, which was confirmed by the MDCK-MDR1 studies. Thus, based on the results obtained, the antiretroviral drugs studied showed a significant interaction with P-gp.

Keywords: MDCK-MDR1, Franz cells, antiretroviral drugs, P-gp, efflux.

Evaluation of the CYP3A influence in the intestinal permeability of antiretroviral drugs by *in vitro* microsomes and *ex vivo* Franz cells models

André B. Dezani*[a], Thaisa M. Dezani*[a], Cristina H.R. Serra[a], Leslie Z. Benet[b]

[a] Faculty of Pharmaceutical Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

[b] Department of Bioengineering & Therapeutic Sciences

* These authors contributed equaly to this work

ABSTRACT

For adequate oral absorption, the drug contained in a pharmaceutical dosage form must be firstly solubilized in the liquids contained in the gastrointestinal tract (GIT). Thereafter, the substance should be able to cross the gut wall, reach the bloodstream and its site of pharmacological action. Thus, the solubility and permeability characteristics of a drug are, among other factors, critical for *in vivo* bioavailability. Based on these two properties, the Biopharmaceutics Classification System (BCS) was proposed as an important tool that assists in the prediction of substance absorption, in the development of new drugs and new formulations. In addition to solubility and permeability, metabolism is also a relevant factor for bioavailability and the Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS) has been proposed as a complementary tool that helps in understanding the behavior of the drug *in vivo*. BDDCS classifies drugs based on their solubility and metabolism characteristics. The intestine is one of the major extrahepatic sites found in the body capable of expressing different enzymes, including CYP3A4 and CYP3A5. Pre-systemic intestinal metabolism is considered to be extremely important in the absorption processes and, in some cases, is responsible for the low oral bioavailability of certain drugs. This study aimed to evaluate the influence of presystemic metabolism on the absorption of antiretroviral drugs (stavudine, lamivudine and zidovudine), since these substances present variations in *in vivo* bioavailability that should be investigated. In this study, intestinal metabolism was evaluated by the use of intestinal segments in Franz cells with the use of CYP3A enzyme inhibitor (ketoconazole). In a complementary way, studies were carried out in microsomes with the purpose of evaluating the metabolized percentage of each drug. Assays performed in intestinal segments and microsomes have not demonstrated the significant influence of CYP3A enzymes in antiretroviral metabolism processes. Thus, the results indicated that oral absorption of these substances is not limited by the CYP3A enzymes, which suggest more specific assays to understand the ratios related to the variable bioavailability values of the antiretroviral drugs evaluated.

Keywords: pre-systemic metabolism, CYP3A, microsomes, enterocytes, absorption.

Development and validation of the spectrophotometric method for the quantification of drugs in the permeability studies using the PAMPA model

André B. Dezani*[a], Thaisa M. Dezani*[a], Cristina H.R. Serra[a]

[a] Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

* These authors contributed equally to this work

ABSTRACT

For orally administered drugs, the bioavailability depends on the solubility and permeability characteristics. Many methods have been described in the literature for evaluating drug permeability, including *in vitro* models through Parallel Artificial Membrane Permeability Assays (PAMPA). The permeability studies in this model allow understanding the transport mechanism involved in oral drug absorption processes. Stavudine, lamivudine and zidovudine have variable bioavailability values, which may be related to their transport mechanisms. Thus, the permeability studies in PAMPA provide direct and indirect information about in vivo absorption prediction. Therefore, the method used in the quantification of the samples is of great importance. Once the analytical methodology used is considered accurate and accurate, obtaining the results tends to provide the data that is closest to the real conditions. The aim of this study was to present the development and validation of the UV-VIS spectrophotometric analytical method for the quantification of the antiretroviral drugs stavudine, lamivudine and zidovudine and the markers metoprolol and ranitidine contained in the samples from the *in vitro* model PAMPA. The validation of the method was performed using a Tecan® spectrophotometer with wavelengths of 270 nm for all three antiretroviral drugs, 254 nm for metoprolol and 315 nm for ranitidine. For drugs and markers, linearity was established between 50 and 250 µM. The determination coefficients obtained in the different media were 0.9954 to 0.9999 for stavudine, 0.99990 to 0.9999 for lamivudine, 0.9999 to 0.9999 for zidovudine, 0.9999 to 0.9999 for metoprolol and 0.9990 to 0.9999 for ranitidine. Detection limits were in the range of 0.11 µM to 10.00 µM. Based on the results obtained, the spectrophotometric method developed and validated was adequate for the quantification of the antiretroviral drugs stavudine, lamivudine and zidovudine and the markers metoprolol and ranitidine from the permeability studies using the *in vitro* model PAMPA. In addition, the parameters evaluated (specificity, linearity, reproducibility, precision, accuracy and limits of detection and quantification) were adequate.

Keywords: PAMPA, permeability, spectrophotometry, UV-VIS, analytical validation

Development and validation of the chromatographic method for the simultaneous quantification of stavudine, lamivudine and zidovudine in *ex vivo* permeability studies

André B. Dezani*[a], Thaisa M. Dezani*[a], Cristina H.R. Serra[a]

[a] Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

* These authors contributed equally to this work

ABSTRACT

Drugs that are orally administered need to have adequate solubility and permeability characteristics for absorption occurs through the gastrointestinal tract (GIT). Many studies described in the literature present different models that can be used for the characterization of drugs in terms of permeability. *Ex vivo* methods in intestinal segments in diffusion chambers are suitable for studies of prediction of *in vivo* absorption. Some antiretroviral drugs, such as stavudine, lamivudine and zidovudine, have variable bioavailability values, which may be related to the transport mechanisms involved in the absorption processes. Thus, permeability studies in intestinal segments may elucidate the mechanisms of transport and the bioanalytical method is considered of great relevance to obtain the experimental results. The aim of this study was to present the validations of the chromatographic bioanalytical methods used for the quantification of the antiretroviral drugs stavudine, lamivudine and zidovudine and of the markers metoprolol and ranitidine contained in samples from *ex vivo* permeability assays using intestinal segments in Franz cells. Wavelengths of 270 nm for the three antiretroviral drugs, 254 nm for metoprolol and 315 nm for ranitidine were employed. A 15 cm Phenomenex® Gemini C18 chromatographic column was used as the stationary phase, while the mobile phase pH 4.5 consisted of a mixture of phosphate buffer, acetonitrile and methanol. Retention times ranged from 4.5 to 21.5 minutes. Chromatographic methods were validated on a Merck-Hitachi equipment with UV detector and were linear for the drugs and markers in the concentration range of 25 to 3000 ng/mL. The determination coefficients were higher than 0.999 for all substances and the detection limits were in the range of 0.3 to 6.9 ng/mL. The validation parameters analyzed (specificity, linearity, reproducibility, precision, accuracy, limits of detection and quantification) were in agreement with the recommended in the literature, which allowed concluding that the developed methods are adequate in the quantification of the samples.

Keywords: permeability, chromatography, validation, antiretroviral drugs, HPLC.

Development and validation of the LC-MS/MS chromatographic method for the quantification of antiretroviral drugs in metabolism and eflux studies

André B. Dezani*[a], Thaisa M. Dezani*[a], Hideaki Okochi[b], Cristina H.R. Serra[a], Leslie Z. Benet[b]

[a] Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

[b] Department of Bioengineering & Therapeutic Sciences

* These authors contributed equally to this work

ABSTRACT

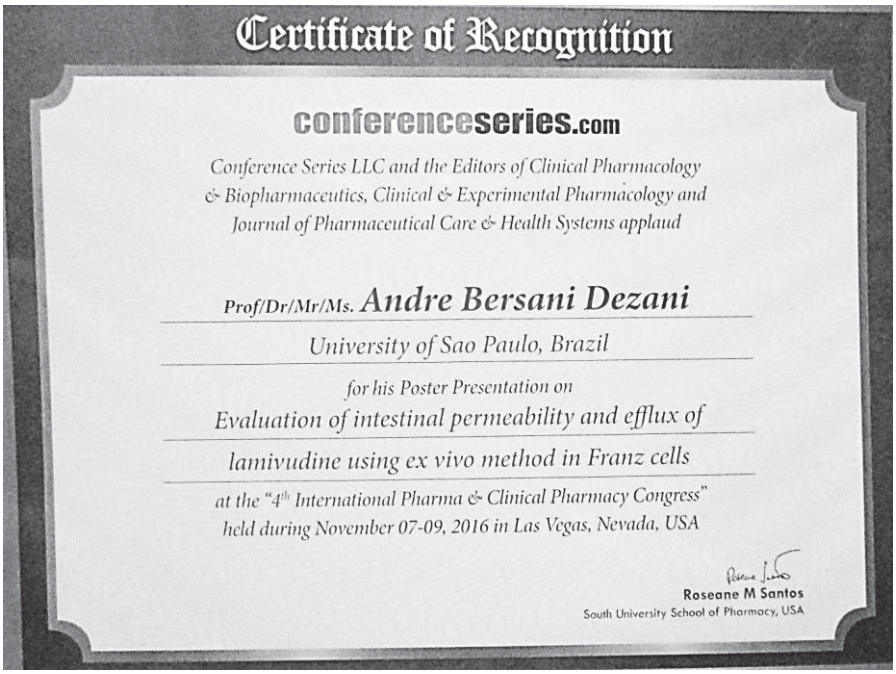
When drugs are orally administered, several factors may influence absorption processes, such as the efflux mechanisms caused by P-glycoprotein (P-gp) and intestinal metabolism caused by CYP enzymes present in enterocytes. Both P-gp and CYP enzymes may interfere with the bioavailability of some drugs. Thus, efflux and metabolism studies have been reported in the literature to evaluate if a substance is a P-gp and/or CYP substrate. The widely used models include transport studies performed on cell cultures and metabolism assays in microsomes. The mechanisms of efflux and metabolism are not completely elucidated for drugs that have variable bioavailability, such as the antiretroviral drugs stavudine, lamivudine and zidovudine. Thus, trials to investigate the involvement of these two factors are necessary. In addition, the quantification of the samples must be performed by a validated bioanalytical method that ensures the reliability of the acquired data. Based on that, the present study aimed to validate the chromatographic method in HPLC-MS/MS for the quantification of the antiretroviral drugs stavudine, lamivudine and zidovudine, as well as the markers metoprolol and ranitidine used in the efflux transport and metabolism assays. The conditions used included: Sinergi polar-RP 80 Å chromatographic column (4.6 x 75 mm, 4 µm), room temperature at 20°C, electrospray source in the turbo spray ionization mode with 5 kV voltage and source temperature of 400°C. The mobile phase consisted of a mixture of ammonium acetate buffer, ultrapurified water and acetonitrile in different proportions. The retention times were: 2.9 minutes for lamivudine, 2.7 minutes for stavudine, 3.3 minutes for zidovudine, 3.5 minutes for metoprolol, 2.9 minutes for ranitidine and 4.5 minutes for carbamazepine (internal standard). The concentration range was 0.5 to 1000 nM and the method showed good linearity (greater than 0.99 for all substances). The detection limits obtained were in the range of 0.01 nM to 0.38 nM and the other parameters were presented according to the recommendations in the specific literature. Thus, the validated chromatographic methods showed to be suitable for the proposed purposes.

Keywords: permeability, chromatography, validation, antiretroviral drugs, LC-MS/MS

ANEXO G

Participação em congressos internacionais

"4th International Pharma & Clinical pharmacy Congress – Poster Presentation"



Certificate of Recognition

conferenceseries.com

Conference Series LLC and the Editors of Clinical Pharmacology & Biopharmaceutics, Clinical & Experimental Pharmacology and Journal of Pharmaceutical Care & Health Systems applaud

Prof/Dr/Mr/Ms. *Andre Bersani Dezani*

University of Sao Paulo, Brazil

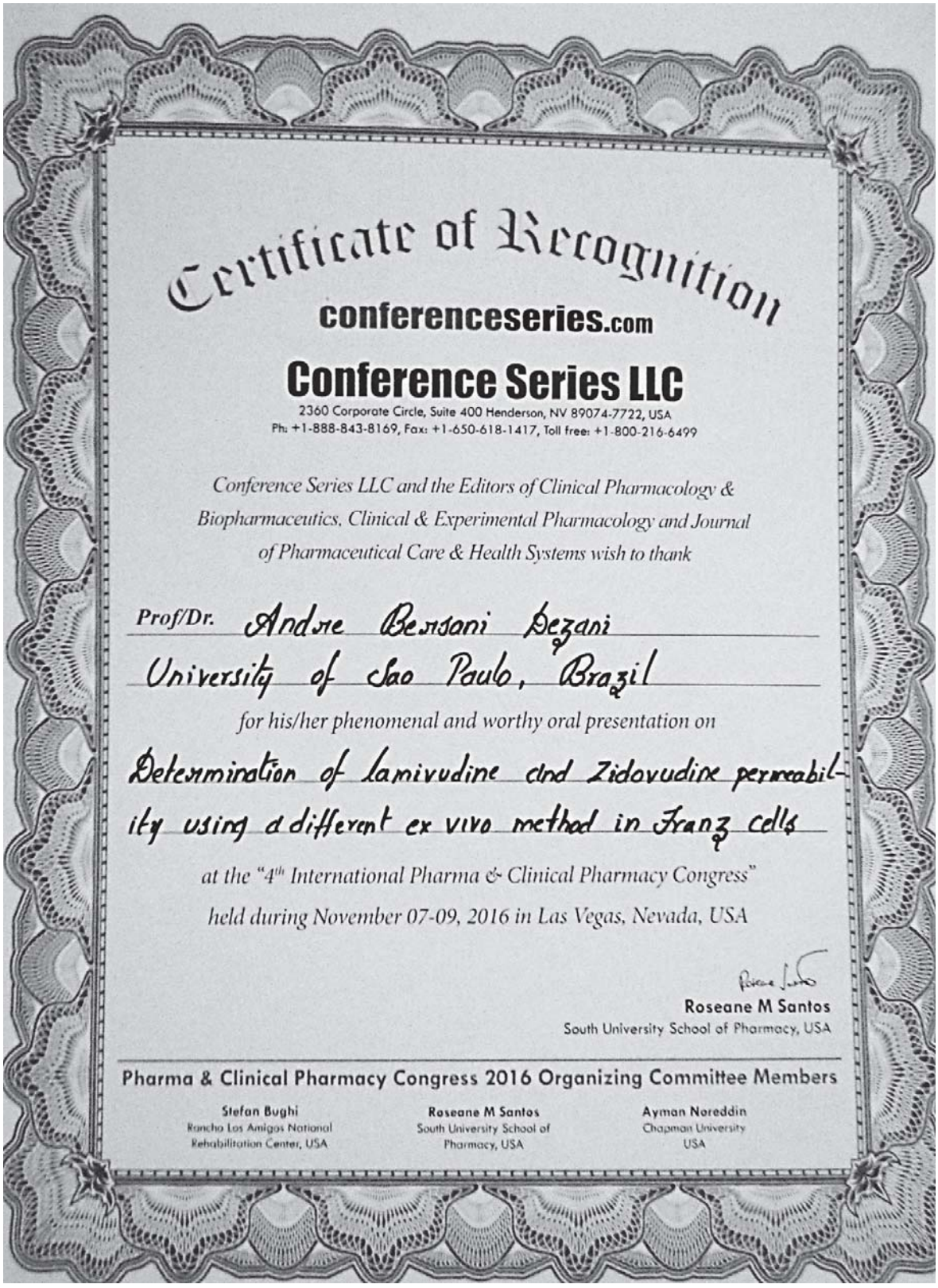
for his Poster Presentation on

Evaluation of intestinal permeability and efflux of lamivudine using ex vivo method in Franz cells

at the "4th International Pharma & Clinical Pharmacy Congress" held during November 07-09, 2016 in Las Vegas, Nevada, USA

Roseane M Santos
South University School of Pharmacy, USA

"4th International Pharma & Clinical pharmacy Congress – Oral Presentation"



Certificate of Recognition

conferenceseries.com

Conference Series LLC

2360 Corporate Circle, Suite 400 Henderson, NV 89074-7722, USA
Ph: +1-888-843-8169, Fax: +1-650-618-1417, Toll free: +1-800-216-6499

Conference Series LLC and the Editors of Clinical Pharmacology & Biopharmaceutics, Clinical & Experimental Pharmacology and Journal of Pharmaceutical Care & Health Systems wish to thank

Prof/Dr. Andre Bersani Dezani

University of Sao Paulo, Brazil

for his/her phenomenal and worthy oral presentation on

Determination of lamivudine and zidovudine permeability using a different ex vivo method in Franz cells

at the "4th International Pharma & Clinical Pharmacy Congress" held during November 07-09, 2016 in Las Vegas, Nevada, USA

Roseane M Santos
South University School of Pharmacy, USA

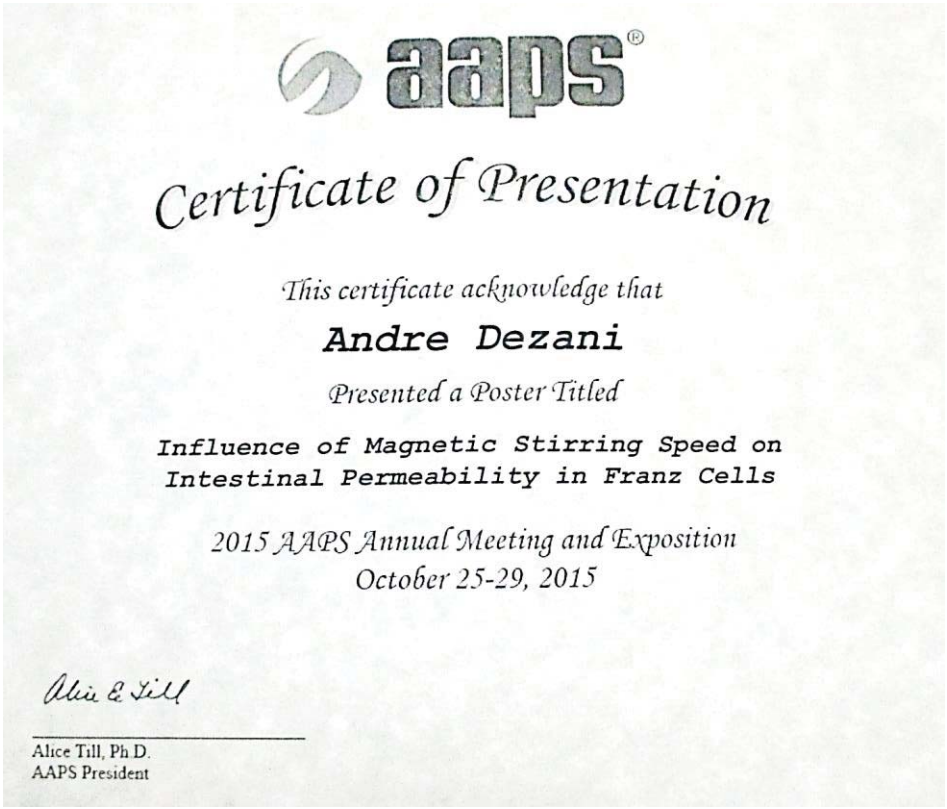
Pharma & Clinical Pharmacy Congress 2016 Organizing Committee Members

Stefan Bughi
Rancho Los Amigos National Rehabilitation Center, USA

Roseane M Santos
South University School of Pharmacy, USA

Ayman Noreddin
Chapman University USA

“2015 AAPS Annual Meeting and Exposition – Poster Presentation”



aaps®

Certificate of Presentation

This certificate acknowledge that

Andre Dezani

Presented a Poster Titled

Influence of Magnetic Stirring Speed on Intestinal Permeability in Franz Cells

2015 AAPS Annual Meeting and Exposition
October 25-29, 2015

Alice Till

Alice Till, Ph.D.
AAPS President

"6th World Congresso on Bioavaliability & Bioequivalence BA/BE Studies Summit – Poster Presentation"

Certificate of Recognition

OMICS International
conferenceseries.com

OMICS International and the Editors of Journal of Bioequivalence & Bioavailability, Journal of Bioanalysis & Biomedicine and Pharmaceutica Analytica Acta applaud

Prof/Dr/Mr/Ms. *Andre Bersani Dezani*

University of Sao Paulo, Brazil

for his Poster Presentation
at the "6th World Congress on
Bioavailability & Bioequivalence: BA/BE Studies Summit"
held on August 17-19, 2015 in Chicago, USA

Keith Gallicano
Novum Pharmaceutical Research Services, USA