

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

Naira Fernanda Zanchett Schneider

**PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO PAMPA
(*Parallel Artificial Membrane Permeation Assay*) E
AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA PERMEABILIDADE INTESTINAL E
CUTÂNEA DE COMPOSTOS DE ORIGEM NATURAL E
SINTÉTICA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmácia.

Área de concentração: Fármaco-Medicamentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cláudia Maria Oliveira Simões.

Florianópolis

2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

S359p Schneider, Naira Fernanda Zanchett
Padronização do ensaio pampa (Parallel Artificial
Membrane Permeation Assay) e avaliação in vitro da
permeabilidade intestinal e cutânea de compostos de origem
natural e sintética [dissertação] / Naira Fernanda Zanchett
Schneider ; orientadora, Cláudia Maria Oliveira Simões. -
Florianópolis, SC, 2011.

111 p.: il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Absorção. 3. Medicamentos - Administração.
4. Ácido gálico. 5. Sistema gastrointestinal - Motilidade.
I. Simões, Claudia Maria Oliveira. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III.
Titulo.

CDU 615.12

Naira Schneider

**PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO PAMPA
(*Parallel Artificial Membrane Permeation Assay*) E
AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA PERMEABILIDADE INTESTINAL E
CUTÂNEA DE COMPOSTOS DE ORIGEM
NATURAL E SINTÉTICA**

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Orientadora:

Prof^a. Dr^a Cláudia Maria Oliveira Simões

Comissão julgadora:

Prof^a. Dr^a. Bibiana Verlindo de Araujo
(Faculdade de Farmácia/UFRGS/RS)

Dr^a. Betina Giehl Zanetti Ramos
(Empresa Nanovetores/SC)

Prof^a. Dr^a. Simone Gonçalves Cardoso
(Departamento de Ciências Farmacêuticas/CCS/UFSC)

Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel
Coordenador do Programa de Pós Graduação em
Farmácia

Florianópolis, 25 de fevereiro de 2011.

Aos meus pais Oto e
Delma e ao meu irmão
Otomar, pelo apoio,
compreensão e amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conduzir todos os dias pelo melhor caminho e me mostrar que tudo Nele posso.

A minha orientadora Cláudia Maria Oliveira Simões, por compartilhar seus conhecimentos e possibilitar todas as condições para a execução deste trabalho.

Aos colegas do laboratório Annelise de Carvalho, Ariadne Cabral da Cruz, Caroline Rigotto Borges, Dóris Marques Souza, Francielle de Souza Cardoso, Izabella da Silva, Jadel Kratz, Jéssica Bertol, Lucas Garcia, Mariana Nascimento, Mariana Silva, Mariana Pilloto, Marina Teixeira, Nicésio Delfino, Thiago Caon e Vanessa Moresco, pela paciência, conselhos, ensinamento das técnicas e companhia nas atividades do dia-a-dia.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Farmacognosia, que me auxiliaram durante as atividades desenvolvidas como bolsista Reuni e também da realização do estágio de docência, em especial ao professor Flávio Reginatto pelas orientações durante a realização dessas atividades, e pelas sugestões que enriqueceram este trabalho.

A todos os amigos e colegas de mestrado, em especial a Fernanda Madoglio e Cassandra Aresi, que vivenciaram as experiências comigo e tornaram mais fácil essa caminhada.

Aos técnicos do Laboratório Multiusuário de estudos em Biologia (LAMEB) Denis Dall Agnolo e Bibiana de Almeida pelo auxílio na leitura das amostras no espectrofotômetro de UV, e pela compreensão em muitos momentos.

Aos meus pais, Oto e Delma Schneider, por estarem ao meu lado em mais uma etapa cumprida e serem exemplo de luta durante a trajetória da minha formação profissional.

Ao meu irmão Otomar, por ter se tornado meu norte, por acreditar mais em mim do que eu mesma.

Aos meus novos e velhos amigos, que estiveram presentes, mesmo aqueles distantes.

E a todos que participaram e contribuíram de alguma maneira para o aperfeiçoamento e conclusão deste trabalho.

RESUMO

PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeation Assay*) E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA PERMEABILIDADE INTESTINAL E CUTÂNEA DE COMPOSTOS DE ORIGEM NATURAL E SINTÉTICA

O ensaio PAMPA tem demonstrado sua versatilidade desde 1998, sendo utilizado para avaliar a permeabilidade passiva transcellular de fármacos/compostos, e tem ganhado espaço por ser de baixo custo, muito rápido e por auxiliar, particularmente, na elucidação dos mecanismos de transporte, em conjunto com os ensaios que utilizam células Caco-2. Para padronizar este ensaio no Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC, dois modelos: o PAMPA TGI, variante *Double-Sink* e o PAMPA Pele foram selecionados por mimetizar, respectivamente, a absorção de fármacos/compostos através do trato gastrointestinal e da pele, sendo que estas duas vias foram escolhidas pela fácil adesão do paciente aos tratamentos por via oral e tópica. Inicialmente, para demonstrar a funcionalidade dos modelos em estudo, foram selecionados fármacos de alta e baixa permeabilidade, classificados segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica. Além dos fármacos utilizados para a padronização, alguns cardenólídeos e o composto galato de pentila foram selecionados para testar os modelos padronizados. Para a quantificação das amostras nos compartimentos aceptores e doadores das placas usadas nos experimentos, foram desenvolvidos e validados métodos analíticos por espectrofotometria no UV, segundo critérios preconizados pela ANVISA e ICH. Os resultados obtidos na validação analítica demonstraram que tais métodos foram suficientemente específicos, lineares, precisos e exatos para quantificar as amostras. A partir dos resultados obtidos nos modelos PAMPA TGI, variante *Double-Sink* e PAMPA Pele, foram calculados os coeficientes de permeabilidade efetiva ($\text{Log } P_e$) para os fármacos/compostos testados, que permearam através das membranas lipídicas usadas e, desta forma, foi

possível correlacioná-los com dados da literatura, quando existentes. O galato de pentila apresentou alta permeabilidade nos dois modelos avaliados; já os cardenolídeos apresentaram baixa permeabilidade nos dois modelos, exceto a digitoxigenina, que permeou através da membrana usada no ensaio PAMPA TGI, variante *Double-Sink*. A integridade das membranas lipídicas usadas nos dois modelos foi avaliada com corantes marcadores de baixa permeabilidade, Azul de Cresil Brilhante (ACB) e *Lucifer Yellow* (LY), e foi possível demonstrar a integridade e a uniformidade destas membranas, pela baixa passagem do ACB e pela rejeição do LY.

Palavras Chave: Absorção oral; modelo PAMPA Trato Gastrointestinal, variante *Double-Sink*; absorção cutânea; modelo PAMPA Pele; validação analítica; fármacos do Sistema de Classificação Biofarmacêutica; cardenolídeos; galato de pentila.

ABSTRACT

STANDARDIZATION OF PAMPA ASSAY (*Parallel Artificial Membrane Permeation Assay*) AND IN VITRO EVALUATION OF SKIN AND INTESTINAL PERMEABILITY OF NATURAL AND SYNTHETIC COMPOUNDS

PAMPA assay has demonstrated its versatility since 1998, and it has been used to assess the passive transcellular permeability of drug/compounds, and has gained importance because of its low cost, fast making profile, and also for its particularly help on the elucidation of transport mechanisms together with the assays that make use of caco-2 cells. In order to standardize this assay in *the Laboratorio de Virologia Aplicada* UFSC, two models: variant Double-Sink PAMPA-GIT and Skin PAMPA were selected by its mimetizing effect on drugs absorption through the gastrointestinal tract and skin, respectively. These two routes were chosen because of easy patient adherence to topical and oral treatment. Initially, to demonstrate the studying models functionality, drugs with high and low permeability were selected, as classified by the Biopharmaceutics Classification System. In addition to the drugs used for standardization, some cardenolide compounds and pentyl gallate were selected to test the standard models. To quantify the samples in compartment acceptors and donors of the plates used in the experiments were developed and analytical methods were validated by UV spectrophotometry, according to the criteria recommended by ICH and ANVISA. The results obtained in the analytical validation showed that these methods were sufficiently specific, linear, precise and accurate to quantify the samples. From the results obtained in PAMPA GIT model, variant Double-Sink PAMPA and skin, the effective permeability coefficients were calculated ($\log p_e$) for the drugs / compounds tested that permeated through the lipid membranes used and thus could correlate them with the literature data. The pentyl gallate showed high permeability in the two models evaluated, the cardenolide already had low permeability in the two models,

except the digitoxigenin, that permeated through the membrane used in the PAMPA assay TGI, variant Double-Sink. The integrity of the lipid membranes used in both models was assessed with colored markers of low permeability, brilliant cresyl blue (ACB) and Lucifer Yellow (LY), and it was possible to demonstrate the integrity and uniformity of these membranes, the low pass and the ACB rejection of LY.

Keywords: Oral absorption, Permeability, PAMPA Double-sink, PAMPA Skin, cutaneous absorption, analytical validation, drugs of Biopharmaceutics Classification System, cardenolides and pentyl gallate.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Representação esquemática da difusão passiva de um fármaco através da bicamada lipídica de uma membrana celular.Fonte: Kerns; Di; (2008). | 20 |
| Figura 2: Representação esquemática da estrutura da pele e seus apêndices..... | 22 |
| Figura 3: Esquema simplificado do ensaio PAMPA | 28 |
| Figura 4: Estruturas de alguns fosfolipídios utilizados para a preparação das membranas lipídicas usadas no ensaio PAMPA. Fonte: Adaptado de Kerns; Di; Carter (2008). | 31 |
| Figura 5: Estrutura química de um cardenólídeo..... | 48 |
| Figura 6: Estruturas químicas dos fármacos testados..... | 54 |
| Figura 7: Estruturas químicas dos cardenólídeos testados..... | 55 |
| Figura 7: Estruturas químicas dos cardenólídeos testados..... | 56 |
| Figura 8: Estrutura química do galato de pentila | 58 |
| Figura 9: Especificidade do método desenvolvido para quantificação por espectrofotometria no UV dos fármacos (A) atenolol (ATE), (B) metoprolol (MET) e (C) propranolol (PRO). Fármacos representados em verde e tampão PBS 0,5%DMSO em vermelho. Amplitude compreendida entre 230-450nm..... | 66 |
| Figura 10: Especificidade do método desenvolvido para quantificação por espectrofotometria no UV dos fármacos (A) carbamazepina (CBZ) pH 6,2; (B) carbamazepina (CBZ) pH | |

7,4; (C) furosemida (FUR) pH 2; (D) furosemida (FUR) pH 7,4; (E) hidroclorotiazida (HTZ) pH 7,4; (F) hidroclorotiazida (HTZ) pH 10 (fármacos representados em verde) e do tampão PBS 0,5%DMSO (representado em vermelho). Amplitude compreendida entre 230-450nm..... 67

Figura 11: Especificidade do método desenvolvido para quantificação por espectrofotometria no UV dos fármacos (A) naproxeno (NAP) pH 2; (B) naproxeno (NAP) pH 5; (C) naproxeno (NAP) pH 7,4; (D) verapamil (VER) pH 7,4; (E) verapamil (VER) pH 10 (fármacos representados em verde) e do tampão PBS 0,5%DMSO (representado em vermelho). Amplitude compreendida entre 230-450nm..... 68

Figura 12: Especificidade do método desenvolvido para quantificação por espectrofotometria no UV dos compostos (A) galato de pentila (GP) pH 5; (B) galato de pentila (GP) pH 7,4; (C) galato de pentila (GP) pH 10; (compostos representados em verde) e do tampão PBS 0,5%DMSO (representado em vermelho). Amplitude compreendida entre 230-450nm..... 69

Figura 12: Especificidade do método desenvolvido para quantificação por espectrofotometria no UV dos compostos (A) galato de pentila (GP) pH 5; (B) galato de pentila (GP) pH 7,4; (C) galato de pentila (GP) pH 10; (compostos representados em verde) e do tampão PBS 0,5%DMSO (representado em vermelho). Amplitude compreendida entre 230-450nm..... 69

Figura 13: Especificidade do método desenvolvido para quantificação por espectrofotometria no UV dos compostos (A) digoxina (DIG), (B) digitoxigenina (DGTX) (compostos representados em verde) e do tampão PBS (representado em vermelho). Amplitude compreendida entre 230-450nm..... 70

Figura 14: Coeficientes de permeabilidade efetiva ($\log P_e$) dos fármacos avaliados através do modelo PAMPA TGI,

variante *Double-Sink*, em diferentes valores de pH (compartimento doador). pH 5 pH 6,2 pH 7,4. Os dados representam a média de três experimentos independentes (\pm DP). Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA/TUKEY $p < 0,05$). 81

Figura 15: Perfis de permeabilidade dos fármacos carbamazepina (A), naproxeno (B) e verapamil (C) utilizando um gradiente de pH..... 82

Figura 16: Efeito da lipofilicidade na permeabilidade dos fármacos/compostos avaliados no modelo PAMPA TGI, variante *Double-Sink*. 88

Figura 17: Retenção da digoxina na membrana lipídica do modelo PAMPA TGI, variante *Double-Sink*. Os valores estão expressos em porcentagem, e representam a média de três experimentos independentes. Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significantes (ANOVA/TUKEY $p < 0,05$). 89

Figura 18: **(A)** Coeficientes de permeabilidade efetiva ($\text{Log } P_e$) do galato de pentila obtidos através do modelo PAMPA TGI, variante *Double-Sink*, em diferentes valores de pH (compartimento doador). **(B)** Dados de retenção do galato de pentila (%) na membrana lipídica no mesmo modelo. Os dados representam a média de três experimentos independentes. Letras diferentes referem-se a diferenças estatísticas significativas (ANOVA/TUKEY $p < 0,05$). 90

Figura 19: Coeficientes de permeabilidade efetiva ($\text{Log } P_e$) dos fármacos analisados, obtidos através do modelo PAMPA Pele, em diferentes valores de pH (compartimento doador) pH 2 pH

Figura 20: Coeficientes de permeabilidade efetiva ($\text{Log } P_e$) do galato de pentila, obtidos no modelo PAMPA Pele, em diferentes valores de pH (compartimento doador). Os dados representam a média de três experimentos independentes

±DP. Letras diferentes significam diferenças estatísticas significativas (ANOVA/TUKEY, $p < 0,05$) 100

Figura 21: Valores de fluorescência do corante *Lucifer Yellow*, medidos após os experimentos dos modelos PAMPA Pele e PAMPA TGI, variante *Double-Sink*. Os dados representam a média de cinco experimentos independentes ± DP. 104

Figura 22: Unidades de Absorvância (UA) do corante azul de crescil brilhante (ACB), medidas após os experimentos dos modelos PAMPA Pele e PAMPA TGI, variante *Double-Sink*. Os dados representam a média de cinco experimentos independentes ±DP..... 105

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Faixas de linearidade e limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) obtidos para os fármacos/compostos testados, em diferentes valores de pH. 71
- Tabela 2: Resultados da precisão intra-dia dos fármacos/compostos testados, em diferentes valores de pH..... 73
- Tabela 3: Resultados da precisão inter-dia dos fármacos/compostos testados, em diferentes valores de pH..... 74
- Tabela 4: Resultados do ensaio de exatidão dos fármacos/compostos testados, em diferentes valores de pH..... 76
- Tabela 5: Propriedades físico-químicas e valores percentuais de retenção na membrana lipídica (RM) dos fármacos avaliados através do modelo PAMPA TGI, variante *Double-Sink*, nos valores de pH 5, 6,2 e 7,4 (compartimento doador 85
- Tabela 6: Coeficientes de permeabilidade efetiva ($\text{Log } P_e$) dos cardenólídeos testados através do modelo PAMPA TGI, variante *Double-Sink*, em diferentes valores de pH (compartimento doador)..... 87
- Tabela 7: Coeficientes de permeabilidade efetiva ($\text{Log } P_e$) dos cardenólídeos avaliados através do modelo PAMPA Pele, em diferentes valores de pH (compartimento doador). 97
- Tabela 8: Percentuais de permeabilidade dos fármacos/compostos avaliados no modelo PAMPA Pele, expressos através da relação $CA_{(t)}/CD_{(0)}$ e dos valores de retenção na membrana (RM). 102

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Å: ångström
μM: Micromolar
A: área do filtro da placa PAMPA
ACB: Azul de Crescil Brilhante
ADME: Absorção, distribuição, metabolismo e excreção de fármacos
A-PAMPA: PAMPA Aniônico
ATE: Atenolol
BCS: *Biopharmaceutics Classification System*
BML: membrana lipídica em borda de escova
BBB: *Blood Brain Barrier*
BHE: Barreira hematoencefálica;
C₀: concentração inicial do composto
C_A: concentração aceptora
C_A/C₀: fluxo da concentração doadora inicial e concentração aceptora final.
CBZ: Carbamazepina
C_D: concentração doadora
CO: colesterol
CV: coeficiente de variação
DS: *Double-Sink*
DMSO: Dimetilsulfóxido
DOPC: Dioleilfosfatidilcolina;
DPPC: dipalmitoilfosfatidilcolina
DPR: Desvio padrão relativo
FC: Fosfatidilcolina
FDA: *Food and Drug Administration*
FE: Fosfatidiletanolamina
FI: Fosfatidilinositol
FUR: Furosemida
GM: Galato de Metila
GP: Galato de Pentila
GPR: Galato de Propila
GO: Galato de Octila
HDM: Hexadecano
HIA: *Human intestinal absorption*
H-aceptores: Hidrogênios aceptores
H-doadores: Hidrogênios doadores
HIA: *Human Intestinal Absorption*

HTZ: Hidroclorotiazida
Log D: Coeficiente de partição octanol/água em pH 7,4
Log P: Coeficiente de partição octanol/água
LY: *Lucifer Yellow*
ICH: *International Conference on Harmonization*
LD: Limite de Detecção
LQ: Limite de Quantificação
LogP: Constante de lipofilicidade
Log P_e : Logarítimo de Permeabilidade
MDCK: *Madin–Darby Canine Kidney*
MET: Metoprolol
MI: Miristato de isopropila
NAP: Naproxeno
OS: Óleo de Silicone;
PA: Porosidade Aparente
PBL: *Porcine Brain Lipid*
PBS: *Phosphate Buffered Saline*, Tampão fosfato
PC18:1: 1,2-dioleil-*sn*-glicero-3 fosfocolina
P&D: Pesquisa e Desenvolvimento
 P_e : Permeabilidade
PEG 400: Polietilenoglicol 400
Pgp: Glicoproteína P
pH: Potencial hidrogeniônico
pKa: Constante de ionização
PM: Peso molecular
PRO: Propranolol
PSA: Área de Superfície Polar
PS18:1: 1,2-dioleil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina
PVDF: Fluoreto de Polivinilideno
RL: Regra de Lipinski
RPM: Rotações por minuto
SCB: Sistema de Classificação Biofarmaceutica
TGI: Trato gastrointestinal
Tween 80: Polisorbato 80
UA: Unidades de Absorvância
UV: ultra-violeta
UWL: *Unstirred Water Layer*
VER: Verapamil
VIS: Visível
 V_A : volume do compartimento aceptor
 V_D : volume do compartimento doador

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 18 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 19 |
| 2.1 Barreiras biológicas | 19 |
| 2.1.1 Trato gastrointestinal | 20 |
| 2.1.2 Pele | 21 |
| 2.2 Modelos de estudo de permeabilidade de fármacos | 23 |
| 2.3 Ensaio PAMPA | 24 |
| 2.3.1 Breve histórico | 24 |
| 2.3.2 Vantagens e limitações | 25 |
| 2.3.3 Fundamento da técnica | 27 |
| 2.3.4 Membranas artificiais | 29 |
| 2.4 Doseamento dos analitos em estudo | 41 |
| 2.5 Aspectos importantes para obtenção e apresentação de dados de permeabilidade | 42 |
| 2.6 Validação analítica | 45 |
| 2.7 Amostras a serem testadas | 47 |
| 2.7.1 Cardenólídeos | 47 |
| 2.7.2 Galato de pentila | 50 |
| 3. OBJETIVOS | 52 |
| 3.1 Objetivo geral | 52 |
| 3.2 Objetivos específicos | 52 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 53 |
| 4.1 Objeto de estudo | 53 |
| 4.2 Desenvolvimento e validação dos métodos analíticos para a quantificação dos fármacos (SCB) e dos compostos de origem natural e sintética, por espectrofotometria no UV | 59 |
| 4.2.1 Especificidade | 59 |
| 4.2.2 Linearidade | 60 |
| 4.2.3 Limites de detecção e de quantificação | 60 |
| 4.2.4 Precisão | 60 |
| 4.2.5 Exatidão | 61 |
| 4.3. Avaliação <i>in vitro</i> da permeabilidade pelo ensaio PAMPA .. | 61 |
| 4.3.1 Modelo TGI, variante <i>Double-Sink</i> | 62 |
| 4.3.2 Modelo PAMPA Pele | 62 |
| 4.4. Avaliação da integridade das membranas lipídicas | 64 |
| 4.5. Análise estatística | 65 |

| | |
|--|-----|
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 66 |
| 5.1 Desenvolvimento e validação dos métodos analíticos | 66 |
| 5.1.1 Especificidade | 66 |
| 5.1.2 Linearidade..... | 71 |
| 5.1.3 Limites de detecção e de quantificação..... | 72 |
| 5.1.4 Precisão | 73 |
| 5.1.5 Exatidão | 75 |
| 5.2 Avaliação <i>in vitro</i> da permeabilidade pelo ensaio PAMPA... | 79 |
| 5.2.1 Modelo TGI, variante <i>Double-Sink</i> (DS) | 79 |
| 5.2.1.1 Fármacos | 79 |
| 5.2.1.2 Cardenólídeos..... | 86 |
| 5.2.1.3 Galato de pentila | 90 |
| 5.2.2 Modelo PAMPA Pele..... | 92 |
| 5.2.2.1 Fármacos | 92 |
| 5.2.2.2 Cardenólídeos..... | 96 |
| 5.2.2.3 Galato de pentila | 99 |
| 5.3 Avaliação da integridade das membranas lipídicas | 103 |
| 6. CONCLUSÕES | 106 |
| REFERÊNCIAS | 108 |

1. INTRODUÇÃO

Os parâmetros farmacocinéticos são reconhecidamente importantes nos processos de pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos fármacos, uma vez que muitos candidatos são eliminados nas fases iniciais dos estudos clínicos por apresentarem farmacocinética inadequada. Entre tais parâmetros, a absorção de fármacos tornou-se um problema frequente e, por isso, grandes esforços foram e continuam sendo realizados para propor ensaios que avaliem este parâmetro ainda nos estágios iniciais de P&D (CHEN et al., 2008; MENSCH et al., 2010).

Em outras palavras, o aumento da probabilidade de sucesso na P&D de novos fármacos, a serem administrados por diferentes vias, está intimamente ligado à avaliação das características relativas à sua permeabilidade, através de membranas biológicas.

A realização de ensaios *in vitro* e em grande escala permite a avaliação de várias amostras, em um curto período de tempo, com várias repetições dos experimentos, propiciando uma análise estatística robusta dos resultados e envolvendo menos custos, em comparação com estudos em animais. Quando do estudo da permeabilidade intestinal *in vitro*, os ensaios mais frequentemente utilizados, individualmente ou em associação, são o de células Caco-2 (já implementado no Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC - LVA) e o não celular, que utiliza membranas lipídicas artificiais, conhecido como PAMPA (em inglês: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay), objeto desta dissertação.

Neste sentido, com o intuito de incrementar a linha de pesquisa recentemente criada no LVA (Estudos *in vitro* e *ex vivo* da absorção de fármacos de origem natural ou sintética), a implementação do ensaio PAMPA objetivou padronizar dois de seus modelos, tendo como objeto de estudo compostos naturais e sintéticos. Os modelos PAMPA Pele e PAMPA trato gastrointestinal (TGI), variante *Double-Sink* (DS) foram selecionados por mimetizar, respectivamente, a absorção de fármacos através da pele e do trato gastrointestinal, pois sabe-se que as vias de administração cutânea e oral são atrativas e garantem maior adesão dos pacientes, devido à sua conveniência de administração e aplicação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Barreiras biológicas

Em se tratando de estudos farmacocinéticos de fármacos envolvendo absorção, distribuição, metabolismo e excreção de fármacos, reconhecidos pela sigla ADME, as membranas lipídicas atuam como barreiras biológicas envolvendo um conjunto diversificado de processos físico-químicos e bioquímicos. Além das membranas celulares, as enzimas metabolizantes, o pH do meio, os transportadores de efluxo e as proteínas transmembranárias são também exemplos de barreiras biológicas (KERNS et al., 2008; TESTA et al., 2006.). O comportamento de um fármaco frente a uma barreira biológica é o resultado direto e combinado de sua estrutura química e de seu desempenho combinado, em todas as barreiras corpóreas, o que determina a exposição do mesmo no seu alvo terapêutico (KERNS et al., 2008).

Os fármacos podem permear as membranas celulares por diferentes mecanismos. A difusão passiva é o caminho disponível para a maioria daqueles que entram na circulação sistêmica e depende, principalmente, das propriedades físico-químicas dos mesmos, tal como a lipofilicidade (OOSTENDORP et al., 2009). Esse mecanismo envolve o movimento do fármaco através da bicamada lipídica de uma membrana celular, como demonstrado na Figura 1. A membrana é constituída de fosfolipídios, que formam uma bicamada, com a porção alifática no interior, longe das moléculas de água e, os grupos fosfatos de cabeça polar, voltados para as moléculas de água (KERNS et al., 2008).

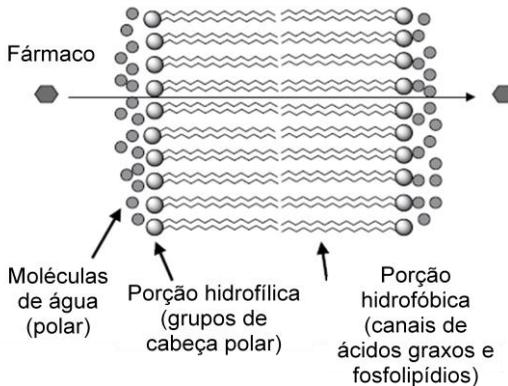


Figura 1: Representação esquemática da difusão passiva de um fármaco através da bicamada lipídica de uma membrana celular. Fonte: Kerns; Di; (2008).

2.1.1 Trato gastrointestinal

A administração oral de fármacos é, ainda hoje, a rota mais comum de utilização, e mesmo apesar dos avanços na área tecnológica de liberação de fármacos, ela continua sendo a preferida devido à sua conveniência para os pacientes e pela maior taxa de adesão dos mesmos ao tratamento (EHRHARDT et al., 2008).

A absorção oral depende da concentração de fármaco livre nos fluídos do trato gastrointestinal (TGI) e, subsequentemente, de sua permeação através da barreira lipídica e sua passagem para a circulação sanguínea. Assim, a permeabilidade através da membrana é uma barreira importante na absorção intestinal, e tal como acontece com a solubilidade, a permeabilidade varia com o pH da região intestinal e o valor do pKa de cada fármaco (DI et al., 2003).

Como dito anteriormente, os fármacos podem permear as membranas celulares por diferentes mecanismos. A absorção por difusão passiva ocorre mais comumente através dos enterócitos, via transcelular ou via junções oclusivas presentes entre estas células (rota paracelular). Essa rota paracelular é

apenas disponível no intestino delgado (tamanho do poro no jejuno humano: 6-8 Å), enquanto que a absorção transcelular pode ocorrer em toda a extensão do TGI (SCHNEIDER et al., 2008).

A absorção mediada por carreadores ocorre via transporte ativo ou por difusão facilitada. Vários transportadores de efluxo, localizados na porção apical celular, tal como a glicoproteína P (Pgp), são funcionais e podem limitar a absorção intestinal. Além disso, enzimas podem estar envolvidas na metabolização de fármacos em metabólitos ativos, que serão absorvidos e, por fim, a endocitose mediada por receptor também desempenha um importante papel na absorção intestinal (ARTURSSON et al., 2001; BALIMANE et al., 2006; PRESS et al., 2008). A discriminação de transporte ativo por efluxo e transporte passivo transcelular pode ser feita através da correlação de resultados obtidos a partir de experimentos *in vitro*, tais como o ensaio PAMPA e o de células Caco-2 (KERNES et al., 2004).

O processo de absorção de fármacos *in vivo* é o resultado de uma série complexa de eventos e depende dos parâmetros relacionados com suas características, bem como de alguns aspectos fisiológicos do TGI. Alguns fatores físico-químicos inerentes aos fármacos podem influenciar na absorção intestinal, tais como logP (Constante de Lipofilicidade), solubilidade, pKa, quantidade de hidrogênios doadores e aceptores, PM (Peso Molecular) e ASP (Área de Superfície Polar) (DEFERME et al., 2008).

2.1.2 Pele

A pele constitui uma grande interface entre o corpo e o ambiente, e sua função é proteger o organismo de agentes externos químicos, físicos e microbianos (EHRHARDT et al., 2008). A pele apresenta duas camadas principais: a derme, camada mais profunda, composta por proteínas fibrosas (colágeno e elastina) e um gel interfibrilar de glicosaminoglicanas, sais e água; e a epiderme, formada por

várias camadas de células, que incluem os estratos germinativo, espinhoso, granuloso e córneo (Figura 2) (EL MAGHRABY et al., 2008).

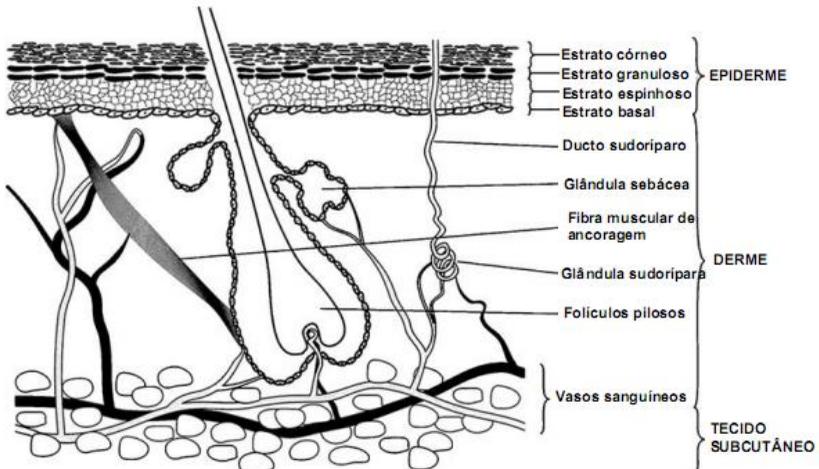


Figura 2: Representação esquemática da estrutura da pele e seus apêndices

Fonte: El Maghraby; Barry; Willians (2008).

A natureza bifuncional da pele depende de sua alta diferenciação estrutural, e a principal função de barreira está localizada na camada ultraperiférica da pele, o estrato córneo (EHRHARDT et al., 2008). Tal estrato é uma biomembrana de composição e morfologia únicas, extremamente fina, sendo considerada a menos permeável das camadas da pele e o último estágio do processo de diferenciação da epiderme (NAIK et al., 2000). Os lipídios do estrato córneo são ceramidas, ácidos graxos livres e colesterol (JUNGERSTED et al., 2008).

O estrato córneo é considerado limitante para a permeação cutânea da maioria das moléculas. A via transepidérmica pode ser definida como a via pela qual os compostos permeiam toda a camada do estrato córneo. Esse percurso inclui duas microvias: primeiro, a rota intercelular, que é um caminho contínuo, mas tortuoso, através dos domínios dos lipídios intercelulares e, por outro lado, a rota transcelular,

através dos queratinócitos. Essa última rota exige, não só a difusão através da queratina, mas também de todos os lipídios intercelulares (EL MAGHRABY et al., 2008).

2.2 Modelos de estudo de permeabilidade de fármacos

Existem diversos ensaios que podem ser utilizados na avaliação da permeabilidade de fármacos. Entre eles estão modelos físico-químicos, modelos computacionais *in silico*, modelos *in vitro*, modelos de perfusão *in situ* e modelos *ex vivo*, cada um apresentando vantagens e desvantagens (AVDEEF et al., 2002; BALIMANE et al., 2000; EHRHARDT et al., 2008).

Com base em um objetivo específico, um ou mais destes ensaios podem ser usados como ferramenta(s) de triagem para a seleção de compostos, durante o processo de P&D de novos fármacos. Com relação aos ensaios *in vitro*, o sucesso de cada um deles em prever a absorção dos compostos, através da mucosa intestinal, depende do quanto ele mimetiza as características do epitélio intestinal humano (BALIMANE et al., 2000).

Os ensaios *in vitro* mais frequentemente utilizados são o de células Caco-2 e o não celular PAMPA. Os resultados deles obtidos podem ser correlacionados entre si e com dados de absorção em animais, incluindo humanos, conferindo um enfoque mecanístico à avaliação (KERNNS et al., 2004).

Adicionalmente, o cultivo de células utilizadas para avaliar a permeabilidade intestinal, como por exemplo, Caco-2, MDCK e HT29, são mais onerosos e exigem equipamentos especializados. Com o objetivo de melhorar a eficiência, reduzir tempo de experimento e custos, os pesquisadores desenvolveram outros tipos de medidas de permeabilidade, com base em membranas artificiais (KERNNS et al., 2008).

No âmbito das considerações sobre a importância da avaliação da permeabilidade de fármacos *in vitro*, como um indicativo da absorção intestinal, segue abaixo a revisão da literatura sobre o ensaio PAMPA, objeto desta Dissertação.

2.3 Ensaio PAMPA

2.3.1 Breve histórico

A utilização do modelo de membranas lipídicas para avaliar a permeabilidade surgiu quando Mueller e colaboradores (1962) utilizaram 2% de fosfolipídios dissolvidos em um *n*-alcano, sobre uma fina folha de Teflon[®], formando um filme com excesso de lipídios. O filme central ficava opticamente preto, formando uma bicamada lipídica, que ficou conhecida como *Black Lipid Membrane*. A partir deste trabalho, outros modelos surgiram tentando demonstrar a passagem de compostos através da bicamada lipídica (THOMPSON et al., 1980; WALTER et al., 1996; XIANG et al., 1994). No entanto, somente em 1998, pesquisadores da indústria farmacêutica Roche foram capazes de relacionar as medidas dos valores de fluxo da absorção humana com os valores obtidos no ensaio PAMPA (KANSY et al., 1998).

O ensaio PAMPA é uma técnica para triagem de compostos em larga escala, desenvolvida para avaliar sua permeabilidade nos estágios iniciais da P&D de fármacos, considerada uma ferramenta útil para prever a permeabilidade através de membranas biológicas, tais como as barreiras: TGI (KANSY et al., 1998), hematoencefálica (DI et al., 2003) e cutânea (OTTAVIANI et al., 2006).

O ensaio PAMPA foi definido recentemente, de forma mais técnica, como “*Uma nova variante dos ensaios de permeabilidade, que consiste em um conjunto de cavidades recobertas individualmente por uma barreira lipídica, confinadas a uma zona planar por um microfiltro, separando dois compartimentos aquosos*” (AVDEEF, 2005; RUELL et al., 2004).

Devido à sua relativa versatilidade, esta técnica rapidamente ganhou popularidade no setor de P&D de empresas farmacêuticas e, desde então, surgiram algumas variações metodológicas (FALLER, 2008). Tais variações diferem entre si pela natureza da constituição química do filtro, da composição da membrana artificial, do pH nos compartimentos aceptores e

doadores, e do tempo de incubação. A título de exemplo, na maioria dos ensaios, emprega-se filtros hidrofóbicos de PVDF (Fluoreto de Polivinilideno) com 125 µm de espessura, que apresentam a vantagem de serem altamente estáveis e resistentes à agitação, mas que necessitam maior tempo de incubação (em torno de 15 h), quando não se aplica agitação ao sistema, devido à espessura relativamente elevada da membrana formada (AVDEEF, 2003). Já o grupo de pesquisadores da empresa farmacêutica Aventis utilizou um filtro de PVDF hidrofílico, também com 125 µm de espessura, mas que reduziu o tempo do experimento para 2 h (ZHU et al., 2002).

Um estudo, realizado por Liu e colaboradores (2003), demonstrou que o ensaio PAMPA pode ser utilizado para avaliar a permeabilidade de compostos associados à excipientes ou agentes solubilizadores. Esta proposta é muito importante, visto que muitos fármacos em fase inicial de P&D apresentam baixa solubilidade aquosa, o que dificulta tanto os bioensaios quanto a avaliação dos parâmetros farmacocinéticos. Desde então, diferentes co-solventes, tais como DMSO (dimetilsulfóxido), PEG 400 (polietilenoglicol 400), Tween 80 (polisorbato 80) e etanol, em diferentes concentrações, têm sido utilizados (FLATEN et al., 2008; SUGANO et al., 2001). Dessa forma, o uso de solubilizadores permite examinar rapidamente os efeitos no processo de transporte de fármacos com baixa solubilidade, o que pode ser útil quando da seleção dos excipientes na fase de pré-formulação farmacêutica.

2.3.2 Vantagens e limitações

O ensaio PAMPA apresenta uma característica extremamente vantajosa, que é o seu alto rendimento (avaliação concomitante de grande número de compostos), usando placas de 96 cavidades, aliado à possibilidade de quantificação em espectrofotômetro automatizado na região do ultravioleta (UV). O custo de cada ensaio é aproximadamente 5% do valor dos experimentos com células Caco-2 e, ainda, avalia somente o mecanismo passivo de difusão, que é o mecanismo

predominante do transporte de fármacos administrados por via oral. Além disso, a partir dos resultados obtidos, as estruturas das moléculas testadas podem ser remodeladas para melhorar seus aspectos físico-químicos, que afetam a absorção por difusão passiva (por exemplo, lipofilicidade, pKa, peso molecular, entre outros). Assim, o ensaio PAMPA é uma boa escolha para avaliação da permeabilidade de novos fármacos ainda nas etapas iniciais de P&D (KERNS et al., 2004).

O ensaio PAMPA também envolve procedimentos menos laboriosos do que nos experimentos com cultura de células e estudos *in vivo*, e apresenta um poder preditivo similar aos deles. Porém, há algumas limitações relativas à predição da absorção em humanos, como por exemplo, a variação da composição das bicamadas lipídicas usadas nas diferentes variações deste modelo, o que pode provocar alterações nos coeficientes de permeabilidade, assim como subestimar a absorção, tanto de fármacos transportados ativamente, quanto de pequenas moléculas hidrofóbicas transportadas passivamente através do mecanismo paracelular (BALIMANE et al., 2000; LI et al., 2008).

O principal problema inerente aos modelos que avaliam a permeabilidade de fármacos é a sua retenção na membrana (AVDEEF, 2001). Este fenômeno, frequentemente negligenciado, ocorre especialmente com compostos lipofílicos. Uma proposta simples para corrigir este fator foi introduzida por Youdim e colaboradores (2003), que sugeriram calcular, ao final do experimento, a massa do composto retida nas membranas. Tal cálculo é realizado a partir da diferença entre as massas inicial e final existentes nos compartimentos acceptor e doador. No entanto, esse cálculo só pode ser aplicado a compostos estáveis.

Outro problema envolvendo compostos altamente lipofílicos está relacionado à dificuldade de impedir o contra-fluxo do compartimento acceptor para o compartimento doador (SAWADA et al., 1999). Diferentes estratégias foram desenvolvidas para solucionar esse problema, dentre elas, a aplicação de condições *sink*, que pode reduzir em até 50% o fluxo contrário da amostra entre os compartimentos. Segundo Avdeef (2003), condição *sink* é qualquer processo aplicado ao

sistema, que reduz de forma significativa, a concentração da amostra em sua forma neutra no compartimento acceptor. Tais processos envolvem métodos físicos (onde o tampão do compartimento acceptor é constantemente renovado), químicos (onde a concentração da forma neutra da amostra é reduzida como resultado de sua ionização), biológicos (onde a concentração da forma neutra da amostra é reduzida através de sua ligação a proteínas séricas) ou tecnológicos (através da adição de surfactantes ao compartimento acceptor).

Outro aspecto importante a ser levado em consideração é a formação da camada aquosa imobilizada [em inglês: *Unstirred Water Layer* (UWL)], um filme aquoso presente em ambos os lados da membrana estudada. O transporte passivo de um fármaco, através de uma barreira, é fruto da combinação da sua difusão pela membrana alvo e da formação de um filme aquoso imóvel, que pode funcionar como um limitador da permeabilidade de fármacos altamente lipofílicos (AVDEEF, 2003). No tecido intestinal humano, estima-se que a espessura da UWL seja em torno de 30 a 100 μm (LENNERNAS, 1998). Contudo, no ensaio PAMPA, onde não há agitação, é estimado um valor de 1900 a 3800 μm , dependendo das condições experimentais utilizadas (NIELSEN et al., 2004). As primeiras tentativas de reduzir a espessura da UWL, através da agitação das placas do sanduíche (Figura 3), não obtiveram êxito (AVDEEF, 2001; AVDEEF et al., 2001). Porém, Wohnsland e Faller (2001) diminuíram a espessura da UWL para aproximadamente 300 μm , quando as placas foram agitadas entre 50 a 100 rpm. Com a introdução de agitadores magnéticos individuais em cada cavidade da placa de 96 cavidades, Avdeef e colaboradores (2004) reduziram a espessura da UWL para 13 μm , ao aplicarem uma agitação de 622 rpm, menor do que a do próprio limiar *in vivo*. Com esta aparelhagem, a permeabilidade efetiva de compostos lipofílicos aumentou consideravelmente e o tempo de ensaio pôde ser reduzido de 15 h para apenas 15 min.

2.3.3 Fundamento da técnica

Fundamentalmente, o ensaio utiliza dois compartimentos (doador e acceptor) contendo tampões aquosos, separados por uma membrana artificial disposta sobre um filtro poroso, formando um sanduíche (Figura 3).

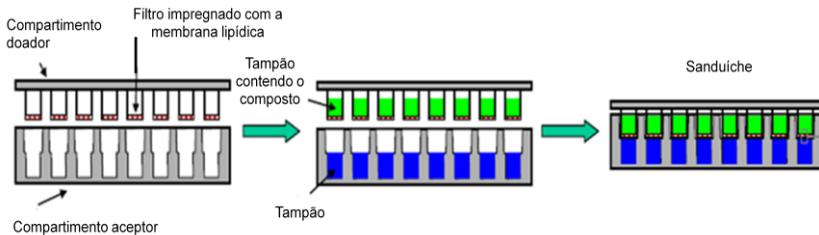


Figura 3: Esquema simplificado do ensaio PAMPA

Fonte: Adaptado de Chen (2008).

Nos experimentos iniciais, a composição fosfolipídica das membranas celulares era mimetizada usando-se uma solução a 10% de lecitina de ovo preparada com um solvente orgânico, que era depois impregnada sobre um filtro suporte poroso (KANSY et al., 1998). Os fosfolipídios puros são originalmente sólidos e apresentam dificuldades para se dispersar sobre o filtro da placa doadora do sistema. Por isso, solventes apolares, tal como o *n*-dodecano, são usados para dissolver os fosfolipídios antes da aplicação sobre este filtro (KANSY et al., 2004).

O composto a ser avaliado é diluído em tampão e adicionado no compartimento doador, movendo-se, a partir daí, por difusão passiva, para a barreira lipídica e, posteriormente, para o compartimento receptor, de onde são recolhidas alíquotas para realizar o doseamento do composto em questão (KERNES et al., 2004).

Kansy e colaboradores (1998) conseguiram obter, para os vários fármacos testados, valores de permeabilidade muito próximos aos obtidos no ensaio com células Caco-2. Além disso, conseguiu-se também prever corretamente a fração absorvida *in vivo*, demonstrando assim a validade do modelo (AVDEEF et al., 2002). Entretanto, esse grupo de pesquisa relatou

dificuldades para trabalhar com compostos polares ($PM < 250$), que eram transportados via paracelular e com compostos transportados ativamente. Outra desvantagem era a forte dependência da permeabilidade da membrana com o pH, especialmente para compostos com valores de pK_a próximos do pH do tampão utilizado.

Desde então, vários grupos de pesquisa vêm trabalhando na otimização dos diversos fatores envolvidos neste modelo, tais como a composição da membrana lipídica, o tipo de filtro suporte, os valores de pH testados, a composição dos tampões, o uso de co-solventes, a agitação aplicada ao sistema, a capacidade do composto de absorver em comprimentos de onda da região do UV, entre outros (AVDEEF et al., 2007; FLATEN et al., 2008; LOFTSSON et al., 2006; MENSCH et al., 2010; SINKO et al., 2009; SUGANO et al., 2002; WOHNSLAND et al., 2001). Tais esforços culminaram numa gama de variações do ensaio, com as mais diversas aplicações, como será explicado adiante.

2.3.4 Membranas artificiais

Como citado no item anterior, vários pesquisadores vêm trabalhando para otimizar este ensaio, e mais de 50 sistemas lipídicos já foram descritos (AVDEEF, 2003). O Quadro 1 resume as características das variantes mais utilizadas atualmente do ensaio PAMPA, que serão detalhadas nos itens posteriores.

| Variante | Barreira alvo | Filtro suporte e sua espessura | Solvente | Composição da membrana | pH | Condição Sink | Tempo de incubação (h) | Referência |
|------------------------------------|---------------|-----------------------------------|----------------------|---------------------------------------|--------------------|------------------------------|------------------------|-----------------------------------|
| PAMPA-Lecitina de ovo | TGI | Hidrofóbico (PVDF) 125 µm | <i>n</i> -dodecano | 1-20% de lecitina de ovo | Iso 6,5 e 7,4 | Não | 15 | KANSY et al. (1998) |
| | TGI | Hidrofílico (PVDF) 125 µm | <i>n</i> -dodecano | 1% de lecitina de ovo | Iso 5,5 e 7,4 | Não | 2 | ZHU et al. (2002) |
| PAMPA-HDM | TGI | Hidrofílico (Policarbonato) 10 µm | <i>n</i> -hexadecano | <i>n</i> -hexadecano | Iso 4,0; 6,8 e 8,0 | Não | 4 | WOHNSLAND; FALLER (2001) |
| PAMPA BML | TGI | Hidrofóbico (PVDF) 125 µm | 1,7-octadieno | 3% de uma mistura de fosfolípidios | Iso 6,5 | Não | 15 | SUGANO et al. (2001a,b) |
| PAMPA DOPC | TGI | Hidrofóbico (PVDF) 125 µm | <i>n</i> -dodecano | 2% de DOPC | Não informado | Não | 15 | AVDEEF et al. (2001) |
| PAMPA DS | TGI | Hidrofóbico (PVDF) 125 µm | <i>n</i> -dodecano | 20% de uma mistura de fosfolípidios | Gradiente 6-7,4 | Sim, surfactante no acceptor | 1-15 | AVDEEF (2003) |
| PAMPA LIPOSSOMA | TGI | Hidrofílico (Policarbonato) 10 µm | - | Lipossomas de fosfatidilcolina de ovo | Não informado | Não | Não informado | FLATEN et al., (2006) |
| PAMPA MEMBRANA TRI-LIPÍDICA | TGI | Hidrofóbico (PVDF) 125 µm | - | Óleo/lípido/óleo | Iso 7,4 | Não | Não informado | CHEN et al. (2008) |
| PAMPA BHE | BHE | Hidrofóbico (PVDF) 125 µm | <i>n</i> -dodecano | 2% de PBL | Iso 7,4 | Não | 18 | DI et al. (2003) |
| PAMPA Pele | Pele | Hidrofóbico (PVDF) 125 µm | Hexano | 70% OS + 30% MI | Ampla faixa de pH | Não | 7 | OTTAVIANI; MARTEL; CARRUPT (2006) |
| | Pele | Hidrofóbico (PVDF) 125 µm | Clorofórmio | Análogos de ceramida | 5,5 | Não | 7 | SINKÓ et al. (2009) |

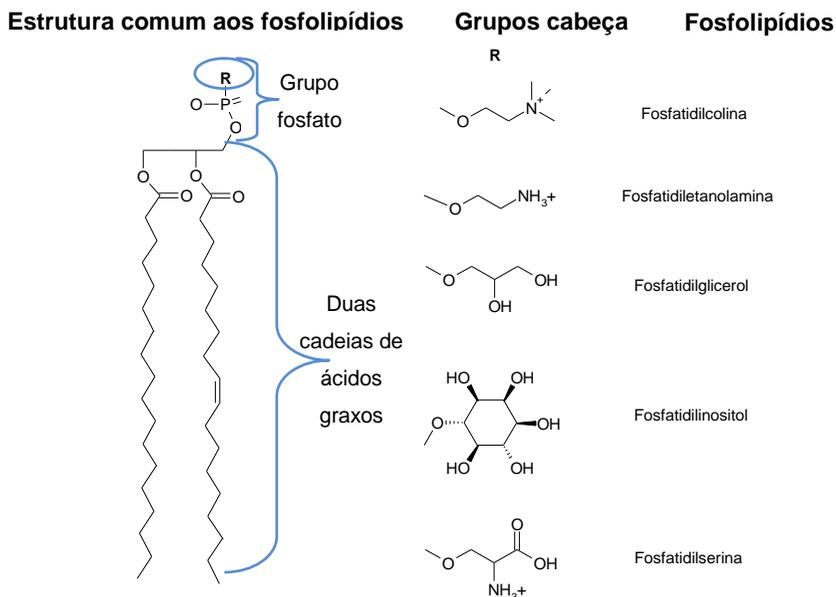
HDM: Hexadecano; BML: Membrana em borda de escova; DOPC: Dióleifosfatidilcolina; DS: *Double-Sink*; BHE: Barreira hematoencefálica; TGI: Trato gastrointestinal; PVDF: Fluoreto de polivinilideno; PBL: *Porcine brain lipid*; OS: Óleo de silicone; MI: Miristato de isopropila.
 Fonte: Adaptado de Faller (2008).

2.3.4.1 Modelo PAMPA-TGI

2.3.4.1.1 Variante lecitina de ovo – filtro hidrofóbico (Modelo Roche)

Embora estejam descritas grandes variações na composição fosfolipídica das membranas dos mamíferos, a lecitina de ovo [mistura de lipídios que contém fosfatidilcolina (FC), fosfatidiletanolamina (FE), fosfatidilinositol (FI), e colesterol (CO)] (

Figura 4)¹ imita a composição lipídica das membranas humanas e, portanto, foi escolhida para o primeiro experimento do modelo PAMPA (KANSY et al., 1998).



¹ Os fosfolipídios fosfatidilglicerol e fosfatidilserina, também presentes na Figura 4, são utilizados em outras variantes deste modelo.

Figura 4: Estruturas de alguns fosfolipídios utilizados para a preparação das membranas lipídicas usadas no ensaio PAMPA. Fonte: Adaptado de Kerns; Di; Carter (2008).

A membrana lipídica utilizada no ensaio de Kansy e colaboradores (1998) era composta por 20% de lecitina de ovo, dissolvida em *n*-dodecano. No ensaio original, foi utilizado um filtro hidrofóbico como suporte para a membrana lipídica. A placa doadora recebeu a solução tampão pH 6,5 contendo o composto a ser avaliado, e a placa receptora recebeu apenas a solução tampão (pH 7,4). Os estudos de transporte foram realizados através da formação do sanduíche (união das placas). O tempo de experimento foi de 15 h e o método analítico utilizado para quantificar as amostras foi espectrofotometria no UV, por ser simples e de rápida execução. Este ensaio permitiu determinar rapidamente a permeabilidade de fármacos, através de uma membrana lipídica, demonstrando grande potencial para a realização de triagens de grandes bibliotecas de compostos. Os valores de fluxo obtidos para os fármacos testados com os dados foram comparados com dados conhecidos da sua absorção em humanos, e confirmaram a aplicabilidade do primeiro modelo PAMPA.

2.3.4.1.2 Variante lecitina de ovo - filtro hidrofílico (Modelo Aventis)

Após o estudo de Kansy et al. (1998), várias mudanças foram realizadas a fim de otimizar o ensaio PAMPA. O grupo de Zhu et al., (2002) realizou alteração no filtro utilizado na placa doadora. Diferentemente do estudo anterior, este utilizou um filtro hidrofílico (PVDF com reduzida afinidade por proteínas), para aumentar a taxa de transporte e reduzir o tempo do experimento. Nesse estudo, a metodologia utilizada foi a mesma descrita por Kansy e colaboradores (1998), porém a membrana artificial utilizada foi preparada utilizando-se somente 1% de lecitina de ovo. Para demonstrar qual das duas variantes era mais adequada e fornecia resultados mais robustos, foram feitas comparações entre os coeficientes de permeabilidade obtidos nas variantes com filtros hidrofóbicos e hidrofílicos e aqueles

obtidos nos ensaios com células Caco-2, além de outras comparações com os coeficientes de partição ($\log P$ e $\log D$) e os valores de HIA (*Human Intestinal Absorption*). Os resultados mostraram que o uso de filtros hidrofílicos aumentou a taxa de permeabilidade e reduziu significativamente o tempo de transporte para 2h, em comparação com mais de 10h, quando um filtro hidrofóbico foi utilizado.

2.3.4.1.3 Variante *n*-hexadecano (Modelo Novartis)

Wohnsland e Faller (2001) desenvolveram uma variante trocando a tradicional membrana fosfolipídica por uma camada de *n*-hexadecano (em inglês, HDM), disposta em um filtro suporte de policarbonato (10 μm de espessura com 5 a 20% de porosidade e com diâmetro de poro em torno de 3 μm). Os experimentos de permeabilidade também foram realizados em placas de 96 cavidades, onde cada cavidade da placa/filtro foi impregnada com 15 μL de uma solução a 5% de hexadecano dissolvido em hexano, no mínimo, 10 min antes do experimento, para evaporação completa do solvente orgânico. Subsequentemente, os compartimentos da placa doadora foram preenchidos com a solução do composto a ser avaliado, dissolvido em tampão, e a mesma foi colocada sobre uma placa aceptora, cujas cavidades foram preenchidas com o tampão. O sanduíche resultante foi incubado à temperatura ambiente, sob agitação constante.

Esta variante apresentou sérias desvantagens, principalmente na avaliação de fármacos hidrofílicos, já que o *n*-hexadecano tem por si só uma função de barreira, em comparação com outras membranas. A ausência de sítios na membrana para ligações iônicas e de hidrogênio tornou-a menos permeável, o que acarretou em um tempo mais prolongado de incubação, quando comparado às outras variantes de PAMPA com filtros hidrofóbicos. Além disso, a camada de *n*-hexadecano não é muito estável, o que torna difícil aplicar esta variante como rotina (AVDEEF et al., 2006; DEFERME et al., 2008). Mesmo

assim, poucos estudos foram com ela realizados, apesar da facilidade de preparo da membrana lipídica (KELLARD et al., 2007; RICHTER et al., 2009).

2.3.4.1.4 Variante membrana lipídica em borda de escova

Nesta variante, foi empregada uma mistura de fosfolípidios muito semelhante à encontrada na membrana em borda de escova (em inglês, BML) do intestino humano, demonstrando uma melhor previsibilidade no processo de absorção de fármacos. Para garantir condições favoráveis, cargas negativas foram adicionadas à barreira lipídica, através da adição de fosfatidilserina e fosfatidilinositol, o que aumenta a permeabilidade de compostos carregados positivamente.

Dessa forma, o sistema lipídico formado (fosfolípidos carregados positivamente + solvente orgânico), foi chamado de BML/1,7-octadieno. Essa membrana aumentou a permeabilidade de fármacos básicos, os quais eram subestimados no ensaio de Kansy e colaboradores (1998), devido à utilização de uma membrana neutra. Além disso, foi realizada uma correlação entre os dados de permeabilidade obtidos com esta variante e os valores de FA (Fração Absorvida) em humanos e, estes, apresentaram uma correlação de 85%, demonstrando a adequabilidade do modelo (SUGANO et al., 2001; SUGANO et al., 2001).

Em estudo posterior, Sugano e colaboradores (2002) desenvolveram outra técnica para previsão total de transporte passivo, combinando a variante anterior (transporte transcelular) com um componente paracelular, avaliado pela função Renkin (modelo matemático que utiliza o peso molecular de cada composto como base de restrição da permeabilidade paracelular). Desta forma, foi possível prever a permeabilidade passiva total, de forma mais adequada do que na variante simples, permitindo uma abordagem rápida, precisa e completa da previsão da absorção passiva oral de fármacos, durante seu processo de P&D.

2.3.4.1.5 Variante dioleilfosfatidilcolina

A primeira formulação lipídica preparada comercialmente foi uma solução a 2% de um fosfolípideo sintético altamente purificado, a dioleilfosfatidilcolina (DOPC), dissolvida em *n*-dodecano. Esta composição lipídica demonstrou certa deficiência, pois gerou resultados falso-negativos para fármacos classificados pelo SCB² como sendo de alta permeabilidade. Para corrigir este erro, subseqüentemente, foi usada uma mistura de 20% de lecitina de soja, contendo uma carga negativa adicional, igualmente dissolvida em *n*-dodecano. Esta variante foi chamada de *Double-Sink*, que será discutida no próximo item (AVDEEF, 2003; RUELL et al., 2003).

2.3.4.1.6 Variante Double-Sink (DS)

Essa variante DS usou como membrana lipídica uma mistura de 20% de fosfolípidios da lecitina de soja (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, ácido fosfático, triglicerídeos e colesterol) dissolvida em *n*-dodecano. A lecitina de soja possui carga negativa em pH 7,4, sendo o fosfatidilinositol o lipídio com carga negativa predominante na membrana; assim, essa carga é 4X maior que a da lecitina de ovo (AVDEEF, 2003; AVDEEF et al., 2005).

Assim sendo, as condições tradicionais desenvolvidas por Kansy e colaboradores (1998) foram substituídas por duas condições *sink*. Nos experimentos tradicionais, o mesmo pH é

² SCB: Sistema de Classificação Biofarmacêutica [em inglês: *Biopharmaceutics Classification System* (BCS)]. Este sistema é fundamentado nas propriedades de solubilidade e permeabilidade dos fármacos, organizando-os em quatro classes: CI alta permeabilidade e alta solubilidade, CII alta permeabilidade e baixa solubilidade, CIII baixa permeabilidade e alta solubilidade, CIV baixa permeabilidade e baixa solubilidade (AMIDON et al., 1995).

mantido nos compartimentos acceptor e doador (iso-pH), já na variante PAMPA DS são aplicados gradientes de pH entre estes compartimentos (AVDEEF, 2005), pois no corpo humano o fármaco fica exposto a diferentes condições de pH, ao atravessar o TGI, enquanto que no sangue o pH é de 7,4. Para mimetizar este ambiente, usa-se um gradiente de pH entre os compartimentos, sendo o pH do compartimento doador ajustado entre 3 a 10, geralmente valores de pH= 5; 6,2 e 7,4, enquanto que no compartimento acceptor o pH é de 7,4. Esta diferença pode facilitar o transporte de compostos fracamente ácidos (com baixos valores de pK_a) através da membrana. Com um valor de pH mais baixo no tampão do compartimento doador, os compostos que permearem prontamente ionizarão ao atingirem o compartimento acceptor, criando a primeira condição *sink*.

A outra condição *sink* pode ser obtida utilizando-se surfactantes e/ou proteínas no compartimento acceptor, o que torna o transporte dos compostos lipofílicos unidirecional (AVDEEF, 2003). Em condições fisiológicas, o equilíbrio estático não é atingido com o fluxo sanguíneo e as proteínas séricas constantemente deslocam o equilíbrio a favor da absorção, mas quando estas substâncias são adicionadas ao compartimento acceptor ocorrerá simulação deste processo fisiológico (AVDEEF, 2005).

Essas duas condições *sink* promovem um aumento do volume de distribuição no compartimento acceptor, reduzindo drasticamente o tempo do experimento. Nos experimentos sem agitação, o tempo não ultrapassa 4h para a maioria dos compostos, e pode ainda ser reduzido quando for aplicada agitação ao sistema (AVDEEF et al., 2004).

Uma vantagem adicional é a baixa retenção dos compostos na membrana lipídica artificial, o que é de grande valia, já que a maioria dos compostos é altamente lipofílica (AVDEEF, 2005). Outra vantagem que se pode destacar é a excelente correlação entre os coeficientes de permeabilidade obtidos através desta variante e os parâmetros físico-químicos relacionados à absorção de fármacos (AVDEEF, 2003; AVDEEF et al., 2005; BERMEJO et al., 2004).

A comparação quantitativa entre as variantes DS, DOPC e HDM do modelo PAMPA TGI demonstrou que na variante DS ocorre melhor predição da permeabilidade intestinal e permitiu a classificação, em ordem crescente $DS > DOPC > HDM$. Fármacos como metoprolol e pindolol, quando avaliados nas variantes DOPC e HDM, apresentaram baixa permeabilidade, porém essas moléculas são classificadas pelo sistema SCB, como sendo de alta permeabilidade, o que demonstrou a ineficácia de predição destas duas variantes. Já com a variante DS, pôde-se discriminar corretamente fármacos de alta e baixa permeabilidade (AVDEEF et al., 2006).

2.3.4.1.7 Variante lipossomas

Uma outra abordagem para o estudo da difusão passiva de fármacos foi descrita por Flaten e colaboradores (2006), que propuseram formar uma barreira lipídica em um filtro/suporte sem utilizar um solvente orgânico inerte. A membrana lipídica foi formada por lipossomas de fosfatidilcolina de ovo, dissolvidos em uma mistura de clorofórmio e metanol, depositados por centrifugação no filtro de cada inserto. Diferente das variantes convencionais, que utilizam placas de 96 cavidades, essa metodologia emprega insertos com filtro de policarbonato, mais comumente utilizados em ensaios com células Caco-2. O processo de preparação da membrana lipídica compreende a deposição consecutiva de dois tipos de lipossomas nos filtros: lipossomas menores para preencher os poros dos filtros e lipossomas maiores para gerar uma camada de 0,1 mm de espessura. A evaporação do solvente é feita através de vácuo, e ciclos de congelamento e descongelamento promovem a fusão dos lipossomas a fim de obter uma barreira consistente. Para demonstrar a aplicabilidade da nova variante criada, os resultados obtidos foram comparados com aqueles de outros modelos de permeabilidade, entre eles, os ensaios com células Caco-2 e as variantes do modelo PAMPA TGI: DS e BML. Os dados encontrados foram muito similares aos obtidos com estas células e na variante DS, e mais satisfatórios do que os

alcançados com a variante BML. Adicionalmente, os fármacos avaliados foram correlacionados com a fração absorvida em humanos, demonstrando uma correlação de 81%, o que garante a validade do modelo. Além disso, não existe a desvantagem do preparo da membrana lipídica antes do experimento, o que aumenta a praticidade do mesmo

Além disso, com o intuito de caracterizar e avaliar a integridade física e funcional da barreira lipídica, os mesmos autores realizaram outros estudos: Inicialmente, foi avaliada a integridade da membrana sob diferentes valores de pH, que demonstrou-se íntegra em uma ampla faixa de pH (2-8). Após, ela foi armazenada em baixa temperatura (-80 °C) e também revelou-se íntegra por duas semanas consecutivas (FLATEN et al., 2006). Adicionalmente, quando o sistema foi submetido à agitação, observou-se que os fármacos que interagiram com os fosfolípidios da membrana, causaram alterações na resistência elétrica da mesma, afetando sua integridade. Cabe destacar que o efeito da agitação não melhorou a previsão de permeabilidade obtida, tal qual aquela no estudo inicial (FLATEN et al., 2007).

2.3.4.1.8 Variante da camada trilipídica (BD Gentest™)

Nesta variante, os filtros da placa de 96 cavidades foram pré-revestidos com uma membrana composta de lipídeo/óleo/lipídeo, sendo que a camada de óleo é ultrafina para minimizar a retenção dos compostos e mimetizar a porção hidrofóbica das membranas biológicas; já os lipídios anfifílicos ancorados na interface óleo/água substituem a porção externa da membrana (CHEN et al., 2008). Esses autores buscaram, da mesma forma que aqueles da variante anterior, reduzir o excesso de solvente utilizado para formar as barreiras lipídicas. Sabe-se que tal excesso pode constituir uma barreira extra para a permeação dos compostos, resultando em coeficientes de permeabilidade super ou subestimados.

Nas outras variantes, deve-se preparar a membrana lipídica extemporaneamente, devido à sua instabilidade, o que pode acarretar baixa reprodutibilidade nos dados obtidos

(AVDEEF, 2003). Nesta variante, as placas/filtros, já impregnados com a membrana lipídica, são acondicionadas a -20°C até o uso, sendo possível utilizar placas do mesmo lote e obter melhor reprodutibilidade. O ensaio é realizado com tampão PBS pH 7,4, em ambos os compartimentos.

2.3.4.1.9 Variante aniônica

Com base no estudo de Seo et al. (2006), que demonstrou que a permeabilidade de um fármaco depende do sistema lipídico usado nas diferentes variantes do modelo PAMPA, o grupo de Teksin et al. (2006) objetivou caracterizar o transporte de um fármaco, classificado como uma base fraca, o metoprolol, através de um sistema de três componentes lipídicos, denominado A-PAMPA (PAMPA Aniônico). Esses componentes foram projetados para mimetizar a composição lipídica da membrana dos enterócitos: 1,2-dioleil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina (PS18:1) como lipídio aniônico; 1,2-dioleil-*sn*-glicero-3 fosfocolina (PC18:1) e colesterol como lipídios neutros. Os experimentos foram realizados em diversas condições: diferentes valores de pH e de força iônica, e presença/ausência de cátions concorrentes. Os resultados foram semelhantes aos obtidos utilizando apenas o componente aniônico (PS18:1), demonstrando alta permeabilidade; porém, quando foram utilizados apenas PC18:1, lecitina de ovo ou 100% de dodecano (membranas neutras), o fármaco demonstrou baixíssima permeabilidade. Esses resultados sugerem que o sistema lipídico aniônico facilitou a taxa de transporte deste fármaco e, provavelmente, de outros compostos fracamente básicos, através da membrana. No entanto, recentemente, o mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que esta variante apresenta uma tendência de superestimar a classificação de fármacos do SCB, podendo ser útil, então, para selecionar compostos de alta permeabilidade, a serem estudados em células Caco-2 (TEKSIN et al., 2010).

2.3.4.2 Modelo PAMPA Pele

Este modelo mimetiza a permeação de fármacos através da pele humana (em inglês, PAMPA *Skin*), utilizando um filtro hidrofóbico de PVDF, cuja membrana é preparada com 70% de óleo de silicone (OS) e 30% de miristato de isopropila (MIP). Ele é capaz de mimetizar as principais propriedades da barreira do estrato córneo humano e pode ser utilizado para prever os coeficientes de permeabilidade de fármacos aplicados topicamente. Os resultados obtidos neste modelo *in vitro* podem ser comparados com os coeficientes de permeabilidade obtidos a partir de experimentos realizados com pele humana. Além disso, foi estabelecida uma correlação entre a retenção dos fármacos na membrana e os coeficientes de partição estrato córneo/água (OTTAVIANI et al., 2006).

Como o OS e o MIP não são componentes naturais da pele humana. Sinkó et al. (2009) sintetizaram análogos de ceramidas para prever a permeabilidade transdérmica, com o intuito de criar um modelo, que utilizasse componentes similares aos da pele. A mistura de lipídios (Certramida C12-C16) é dissolvida em clorofórmio e adicionada nos poços da placa doadora de 96 cavidades. Neste estudo, foi avaliada a permeabilidade dos fármacos ciprofloxacino, nifedipina e verapamil e pôde-se confirmar que a utilização de ceramidas teve um efeito significativo sobre a permeabilidade desses fármacos, em função da cadeia alquílica, mostrando correlação com os dados obtidos em experimentos com ceramidas naturais.

2.3.4.3 Modelo da barreira hematoencefálica (BHE)

Este modelo BHE (em inglês, *Blood Brain Barrier*, BBB-PAMPA) foi desenvolvido para separar fármacos de elevada penetração cerebral (BHE+) daqueles com baixa penetração (BHE-). A maioria dos fármacos que atua no sistema nervoso central penetra a BHE através de difusão passiva transcelular, devido às fortes junções existentes entre as células desta barreira e suas vias de transporte limitado (DI et al., 2003).

A melhor distinção entre fármacos BHE+ e BHE- foi obtida aplicando-se uma solução polar lipídica cerebral porcina (*Porcine Polar Brain Lipid* - PBL), constituída por uma mistura de fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilcolina, ácido fosfatídico e fosfatidilinositol, dissolvida em *n*-dodecano, disposta em um filtro hidrofóbico de PVDF. Aqui, foi empregada a condição de iso pH (7,4), sendo que o sanduíche foi construído da mesma forma que no estudo original de Kansy e colaboradores (1998). Este modelo fornece informações sobre a difusão passiva de fármacos através da BHE, com baixo custo, alta reprodutibilidade e usando pequeno volume de amostra (DI et al., 2003).

É importante ressaltar que, além do modelo PAMPA-TGI, o PAMPA- BHE tem atraído grande interesse dos pesquisadores, comprovado através da literatura publicada nos últimos anos (CARRARA et al., 2007; DAGENAIS et al., 2009; MALAKOUTIKHAH et al., 2008; MENSCH et al., 2010; MENSCH et al., 2010; TSINMAN et al., 2010).

2.4 Doseamento dos analitos em estudo

Como o ensaio PAMPA objetiva avaliar a permeabilidade de um grande número de amostras, a concentração dos analitos nos compartimentos aceptores, após o período de incubação, deve ser determinada rapidamente. Para tal, a detecção por espectrofotometria na região do UV é uma ferramenta comumente empregada (FALLER, 2008). O método é rápido, mas no caso de fármacos que não apresentam grupamentos cromóforos, ou de fármacos com baixa permeabilidade, há necessidade de um método mais sensível e outra forma de detecção deve ser aplicada (LIU et al., 2003). O uso de surfactantes comumente empregados na variante *Double-Sink* também limita as possibilidades de análise por espectrofotometria UV, já que estes geralmente possuem uma intensa absorção no UV, e dificultam a leitura dos fármacos/compostos avaliados (MENSCH et al., 2010)

A cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas (CL/EM) oferece como vantagens alta sensibilidade e alta especificidade; porém esta metodologia é relativamente lenta quando se analisa um grande número de amostras, o que contradiz o propósito do ensaio PAMPA, que é a avaliação rápida da permeabilidade de compostos (MENSCH et al., 2007).

2.5 Aspectos importantes para obtenção e apresentação de dados de permeabilidade

Os resultados obtidos nos modelos PAMPA podem ser representados de diversas formas, e geralmente são calculados os valores de $\text{Log } P_e$ (Logarítmo de Permeabilidade), P_e (Permeabilidade) e C_A/C_0 (fluxo da concentração doadora inicial e concentração acceptora final). As equações para calcular os coeficientes de permeabilidade dependem da concepção usada para medir o transporte de moléculas, através das membranas lipídicas. Para isso, é importante levar em consideração fatores importantes, tais como a concentração da amostra antes do experimento, a concentração doadora após o experimento, os volumes dos compartimentos acceptor e doador, o tempo de incubação, as condições do tampão acceptor, a formação de precipitado do soluto no compartimento doador, a geometria dos compartimentos, a velocidade de agitação, a espessura e porosidade do filtro, e o tamanho dos poros (AVDEEF, 2003).

Em outras palavras, o sucesso do uso do ensaio PAMPA na descoberta de novos fármacos depende da interpretação cuidadosa dos dados obtidos, do uso de condições ótimas de ensaio, da implementação e da integração de estratégias. Portanto, a seleção das variáveis do experimento deve ser cautelosa. O “Guia do ensaio PAMPA”, elaborado por Avdeef e colaboradores (2007), pode também auxiliar na seleção dos aspectos experimentais, que podem ser críticos para a padronização deste ensaio; os mesmos serão discutidos nos parágrafos a seguir. Outros trabalhos corroboram a seleção desses itens, e estão devidamente citados.

- *Pontos de amostragem:* O conteúdo de cada cavidade é geralmente medido em um único ponto de amostra, diferentemente do convencional multiponto (retirada da amostra do compartimento acceptor em vários períodos de tempo), como utilizado, por exemplo, nos ensaios com células Caco-2. As medidas multiponto tornam os ensaios muito lentos, caso sejam realizadas inúmeras medições, e como o ensaio PAMPA foi desenvolvido para obter grande quantidade de dados, mais rapidamente, não há necessidade de reposição contínua de tampão no compartimento acceptor. Consequentemente, deve-se realizar os procedimentos experimentais de modo que a única medida seja obtida de forma confiável (AVDEEF, 2003).
- *Tempo do experimento:* Para utilizar o tempo experimental adequado, e tornar uma única medida confiável, Avdeef e colaboradores (2007) constataram que os fármacos/compostos altamente lipofílicos (Log P>2) necessitam de um menor tempo de incubação (30 min à 4 h); no entanto, deve ser aplicada agitação vigorosa e um gradiente de pH ao sistema. Para fármacos/compostos hidrofílicos, o tempo de incubação recomendado é de 15 h e não é necessário aplicar agitação ao sistema, visto que a camada aquosa formada não interfere na permeabilidade de fármacos hidrofílicos. Ainda, deve-se considerar que, se o experimento for conduzido por um longo período de tempo (por exemplo, > 20 h) o sistema pode atingir um estado de equilíbrio, onde a concentração da amostra torna-se equivalente nos compartimentos doador e receptor, inviabilizando a determinação do coeficiente de permeabilidade. Sob tais condições, a amostra também se acumula sobre a membrana e, portanto, é conveniente utilizar um ponto único de amostragem de até 15 h para que o sistema não atinja este estado de equilíbrio.

- *Porosidade do filtro de PVDF:* A porosidade aparente dos filtros de PVDF foi discutida por Nielsen e Avdeef (2004), que afirmaram que quando a quantidade de lipídios depositadas sobre o filtro for superior à acomodada pelo volume dos poros, a porosidade aparente difere da porosidade nominal. Por exemplo, ao se utilizar os dados do fabricante de um filtro de PVDF, cuja porosidade nominal dos poros do filtro é 0,70, e considerar-se o volume da solução lipídica adicionada em cada cavidade da placa (~4 μL), a área do filtro (0,3 cm^2) e a espessura do mesmo (125 mm), pode-se calcular a espessura resultante da camada lipídica em excesso (46 mm) gerando uma membrana de 171 mm. Calculando esses dois últimos parâmetros, pode se chegar a um valor de porosidade aparente próximo a 0,76. Esse valor deve ser considerado nos cálculos de permeabilidade efetiva, já que ocorre um aumento de porosidade em torno de 9%, e se este dado não for levado em consideração pode-se sub ou superestimar os valores de permeabilidade de alguns fármacos/compostos (KANSY et al., 2004; NIELSEN et al., 2004).
- *Adição de cosolventes no tampão:* A baixa solubilidade de fármacos/compostos é descrita como uma condição que diminui a possibilidade de transporte. Para solucionar esse problema apresentado por alguns fármacos/compostos, é recomendado, em experimentos PAMPA, o uso de cosolventes no tampão escolhido, visto que, este ensaio é capaz de medir com precisão e rapidez a permeabilidade de compostos altamente lipofílicos. Tem sido uma prática comum a utilização de 5% de DMSO no tampão aquoso (AVDEEF, 2005). No entanto, para medições no espectrofotômetro de UV, tal percentual fica limitado para compostos que absorvem em baixos comprimentos de onda, pois esse agente solubilizante pode interferir na leitura das amostras, já

que ele também absorve em baixos comprimentos de onda (CHEN et al., 2008).

2.6 Validação analítica

O objetivo da validação de métodos analíticos é comprovar que os mesmos são adequados para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos ou outros compostos (BRASIL, 2003).

A aceitabilidade dos dados analíticos depende diretamente dos critérios que foram utilizados para validar o método (FDA, 2001). Os guias nacionais de referência, tal como o “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e os internacionais, tal como o guia “*Validation of analytical procedures: text and methodology*, Q2(R1)” do *International Conference on Harmonization (ICH)*, preconizam que, para a validação de métodos de doseamento, sejam realizados os ensaios de especificidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

O critério *especificidade* é a capacidade do método de avaliar, de forma inequívoca, o analito na presença de componentes que podem estar presentes. Adicionalmente, essas medidas poderão incluir impurezas presentes na amostra, produtos de degradação, componentes da matriz, entre outros (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

A *linearidade* é a capacidade do método de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. O coeficiente de correlação linear (r) é frequentemente usado para indicar o quanto a reta pode ser considerada adequada como modelo matemático. O critério mínimo aceitável do (r) deve ser $= 0,99$ (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003).

O *limite de detecção* (LD) é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três vezes a

razão ruído/sinal do equipamento. O LD é de suma importância quando são realizadas medidas de amostras com baixos níveis do analito, ou quando são analisados traços. Assim, é possível saber qual a menor concentração do analito que pode ser detectada pelo método (BRASIL, 2003).

O *limite de quantificação* (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser quantificada, com níveis aceitáveis de precisão e exatidão. Também pode ser considerado como a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 10 desvios-padrão (ICH, 2005).

A *precisão* de um método analítico descreve a proximidade das medidas individuais de um analito quando o procedimento é aplicado repetidamente a alíquotas múltiplas de um único e homogêneo volume. Ela deve ser medida utilizando um mínimo de nove determinações por concentração (FDA, 2001). A precisão pode ser considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetibilidade se refere à concordância entre os resultados, em um curto período de tempo, com o mesmo analista, e utilizando a mesma instrumentação (precisão intra-dia). Isto é verificado por, no mínimo, nove determinações, contemplando a linearidade do método, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta) com três réplicas cada; ou, no mínimo, seis determinações a 100% da concentração teste. A precisão intermediária é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, por analistas diferentes e/ou com equipamentos diferentes (precisão inter-dia). A reprodutibilidade é a concordância entre os resultados obtidos por laboratórios diferentes (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

A *exatidão* de um método reflete a proximidade dos resultados obtidos com o valor verdadeiro (BRASIL, 2003) e deve ser avaliada após a determinação da especificidade, linearidade e precisão do método (ICH 2005). Segundo o ICH (2005), a exatidão deve contemplar o intervalo linear e a especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações, (baixa, média e alta), com três

réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

2.7 Amostras a serem testadas

2.7.1 Cardenólídeos

Os cardenólídeos são encontrados em algumas famílias vegetais, tais como Apocynaceae e Plantaginaceae (RATES et al., 2003; TASKOVA et al., 2005) e em animais (hipotálamo bovino) (TYMIAK et al., 1993). Alguns trabalhos já relataram que seres humanos apresentam a capacidade de produzir substâncias semelhantes à ouabaína (HAMLIN et al., 1991) e à digoxina (GOTO et al., 1990) endógenas. Além disso, outros grupos de pesquisa demonstraram que o colesterol e a progesterona são substratos para a biossíntese de cardenólídeos endógenos e esta produção é controlada por outros hormônios, como a renina-angiotensina, endotelina e adrenalina (BAGROV et al., 2009; QAZZAZ et al., 2004).

Com relação à estrutura química, os cardenólídeos apresentam em sua estrutura um núcleo esteroidal e um anel pentagonal lactônico insaturado na posição C17 (porção aglicona ou genina), além de uma porção açúcar ligada ao C3.

Nos cardenólídeos, os anéis A/B e C/D apresentam-se na conformação *cis*, enquanto os anéis B/C encontram-se fusionados na conformação *trans* (RATES et al., 2003). Em relação à sua porção aglicona, os cardenólídeos são divididos em seis séries, de acordo com a estrutura química das agliconas (KREIS et al., 1998). A Figura 5 ilustra o esqueleto básico dos cardenólídeos.

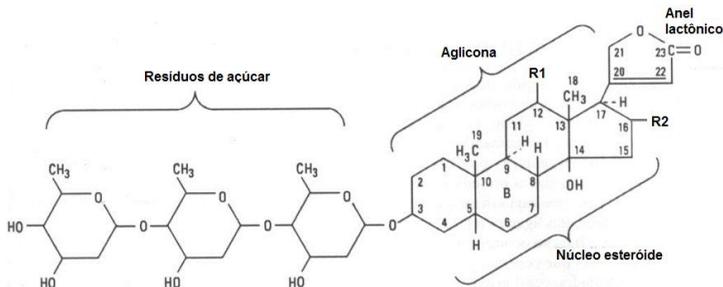


Figura 5: Estrutura química de um cardenolídeo.

Fonte: adaptado de RATES; BRIDI (2003)

Uma grande variedade de açúcares pode estar ligada ao C3 da aglicona e os mais comuns são digitoxose, sarmentose, diginose, ramnose, valarose, frutose, digitalose e glicose (RATES et al., 2003). Embora os açúcares não sejam os responsáveis pela atividade cardiotônica dos cardenolídeos, eles afetam sua farmacodinâmica e farmacocinética. Por exemplo, agliconas são absorvidas mais rapidamente e metabolizadas mais facilmente que cardenolídeos glicosilados (PRASSAS et al., 2008). No entanto, a presença dos açúcares confere maior solubilidade, fator importante na absorção e distribuição dessas moléculas pelo corpo, e a conformação estereoquímica dos açúcares influencia a afinidade da ligação pelo sítio ligante da proteína receptora (RATES et al., 2003).

Os cardenolídeos são caracterizados pela sua alta especificidade e poderosa ação que exercem no músculo cardíaco, tendo como principal ação farmacológica sua ação cardiotônica. Por isso, são utilizados para o tratamento da insuficiência cardíaca congestiva (ICC), podendo ser administrados em associação com diuréticos, se existir fibrilação auricular. Também são recomendados na profilaxia e tratamento de algumas arritmias como fibrilação atrial e taquicardia atrial paroxística e, ainda, no tratamento do choque cardiogênico (RATES et al., 2003).

O principal cardenolídeo utilizado terapeuticamente é a digoxina, mas existem outros que também o são. No mercado farmacêutico brasileiro, estão disponíveis medicamentos elaborados com digoxina e deslanosídeo (BRASIL, 2008).

Adicionalmente, o mecanismo da ação cardiotônica ocorre através da inibição da enzima NKATPase, envolvida no mecanismo da bomba de Na^+/K^+ dependente destes íons, que promove, neste caso, a contração muscular cardíaca (HORISBERGER, 2004). Com a inibição desta bomba, os níveis de Na^+ no interior dos miócitos aumentam, ao contrário do que acontece com os íons K^+ , que são expelidos para fora da célula, sendo que esta troca iônica ocorre através do gasto de moléculas de ATP. O aumento intracelular dos íons Na^+ leva à modulação da atividade de um carreador de membrana envolvido nas trocas de íon Ca^{2+} por íons Na^+ , promovendo o aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} , por influxo ou pela mobilização dos reservatórios sarcoplasmáticos. Tal elevação da concentração intracelular dos íons cálcio resulta no aumento da força contrátil cardíaca, pois o Ca^{2+} fica disponível para as proteínas contráteis (RAHIMTOOLA et al., 1996).

No coração relaxado, a tropomiosina mascara o sítio de ligação da miosina, através de um bloqueio estérico. No processo de contração muscular, o contato dos íons Ca^{2+} com a troponina resulta numa alteração conformacional na tropomiosina, desmascarando o sítio de ligação da miosina e possibilitando a formação do complexo actina-miosina e, assim, induzindo a contração miocárdica ATP-dependente. Portanto, o aumento dos níveis intracelulares dos íons Ca^{2+} , ocasionado pelo tratamento com cardenolídeos, provoca um aumento do tônus muscular e do volume sanguíneo circulante por minuto e reduz a frequência e o volume cardíaco (RATES et al., 2003).

Entretanto, publicações recentes têm sugerido mecanismos adicionais ao modo clássico da ação inibitória desses fármacos na bomba Na^+/K^+ -ATPase, destacando novas possibilidades terapêuticas para os mesmos (PRASSAS et al., 2008). Uma das aplicações terapêuticas sugeridas é sua potencial ação antitumoral, tendo em vista que vários autores já

relataram os efeitos citotóxicos da digoxina (BIELAWSKI et al., 2006; RAGHAVENDRA et al., 2007), da digitoxina (JOHANSSON et al., 2001; LOPEZ-LAZARO et al., 2005), da ouabaína (KULIKOV et al., 2007) e da digitoxigenina (RAGHAVENDRA et al., 2007).

Outra aplicação recentemente sugerida diz respeito à sua ação antiviral, mais especificamente ao efeito inibitório da replicação do vírus herpético do tipo 1 (HSV-1) pela digoxina (HARTLEY et al., 2006), pela ouabaína (DODSON et al., 2007) e pela digitoxina (SU et al., 2008).

Com base nesses últimos relatos, foi realizada outra Dissertação, também orientada pela Prof. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões, no PPG em Biotecnologia e Biociências desta Universidade, que objetivou avaliar a atividade anti-herpética de 65 cardenólídeos de origem vegetal, microbiana e sintética (BERTOL, 2011).

2.7.2 Galato de pentila

Os ésteres *n*-alquílicos do ácido gálico (ácido 3,4,5-triidroxibenzóico) constituem um importante grupo de moléculas, que podem ser obtidas a partir de plantas (LI et al., 2005) ou sintetizadas (SAVI et al., 2005).

Alguns alquil-galatos, como os galatos de propila (C₃), octila (C₈) e dodecila (C₁₂) são amplamente utilizados como antioxidantes em alguns alimentos (ARUOMA et al., 1993; KITAGAWA et al., 2005; KUBO et al., 2010).

Adicionalmente, além da atividade antioxidante, diversas outras atividades farmacológicas já foram descritas para vários galatos: influência sobre enzimas hepáticas (OW et al., 2003), atividade antimicrobiana (KUBO et al., 2002; LEAL et al., 2009; PEREIRA RANGEL et al., 2010; SHIBATA et al., 2005), antiviral (KRATZ et al., 2008; b; SAVI et al., 2005; UOZAKI et al., 2007), antifúngica (LEAL et al., 2009; NIHEI et al., 2003), antitumoral (VELURI et al., 2006), antiinflamatória (LEE et al., 2007), tripanocida (EGER, 2010), entre outras.

Para o galato de pentila (GP), as principais atividades farmacológicas estão relacionadas com a inibição de agentes infecciosos, principalmente frente a vírus herpéticos (KRATZ et al., 2008; b; SAVI et al., 2005). Ainda, Shibata e colaboradores (2005) observaram a atividade deste composto frente a cepas resistentes e sensíveis de *Staphylococcus aureus*. Leal e colaboradores (2009) demonstraram a atividade antifúngica do GP contra leveduras e fungos filamentosos e, mais recentemente, Morais e colaboradores (2010) mostraram que o ácido gálico e vários galatos, incluindo o GP, inibiram o fator NFkB, que regula a expressão de alguns genes envolvidos no câncer.

Tendo em vista o potencial do GP como candidato a fármaco anti-herpético, o presente trabalho teve como objetivo avaliar sua permeabilidade intestinal e cutânea, visando ao potencial desenvolvido de formas farmacêuticas a serem administradas oral e/ou topicamente.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Implementar no Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC dois modelos do ensaio PAMPA para avaliar a permeabilidade *in vitro*, usando como objeto de estudo alguns fármacos selecionados de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), e compostos de origem natural e sintética.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar métodos analíticos para a quantificação dos fármacos selecionados do SCB e de alguns compostos de origem natural ou sintética, por espectrofotometria no UV.
- Avaliar a permeabilidade intestinal *in vitro* destes fármacos e compostos, através do modelo PAMPA TGI, variante *Double-Sink*.
- Avaliar a permeabilidade cutânea *in vitro* destes fármacos e compostos, através do modelo PAMPA Pele.
- Avaliar a integridade das membranas lipídicas utilizadas nestes dois modelos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Objeto de estudo

Para demonstrar a funcionalidade dos modelos do ensaio PAMPA em estudo, os mesmos devem ser capazes de diferenciar fármacos com perfis de alta e baixa permeabilidade. O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), descrito por Amidon e colaboradores (1995), categoriza os fármacos em quatro classes: (I) alta permeabilidade e alta solubilidade, (II) alta permeabilidade e baixa solubilidade, (III) baixa permeabilidade e alta solubilidade, e (IV) baixa permeabilidade e baixa solubilidade. De acordo com essa classificação, foram selecionados um ou mais fármacos de cada classe para a padronização (Quadro 2). As estruturas químicas destes fármacos constam na Figura 6.

Quadro 1. Fármacos utilizados nos experimentos de padronização do ensaio PAMPA.

| FÁRMACO | SIGLA | CLASSE DO SCB | ORIGEM | GRAU DE PUREZA |
|-------------------|-------|---------------|-----------------|----------------|
| Metoprolol | MET | I | LAPPS/ UFRGS | 98% |
| Propranolol | PRO | I | INCQS | ≥ 99% |
| Carbamazepina | CBZ | II | INCQS | ≥ 99% |
| Naproxeno | NAP | II | LAPPS/ UFRGS | 99,2% |
| Verapamil | VER | II | Sigma | ≥ 99% |
| Atenolol | ATE | III | INCQS | ≥ 99% |
| Hidroclorotiazida | HTZ | III | INCQS | ≥ 99% |
| Furosemida | FUR | IV | LAPPS/ UFRGS | ≥ 99% |

SCB: Sistema de Classificação Biofarmacêutica; LAPPS/UFRGS: Laboratório de Produção de Padrões Secundários da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, RJ.

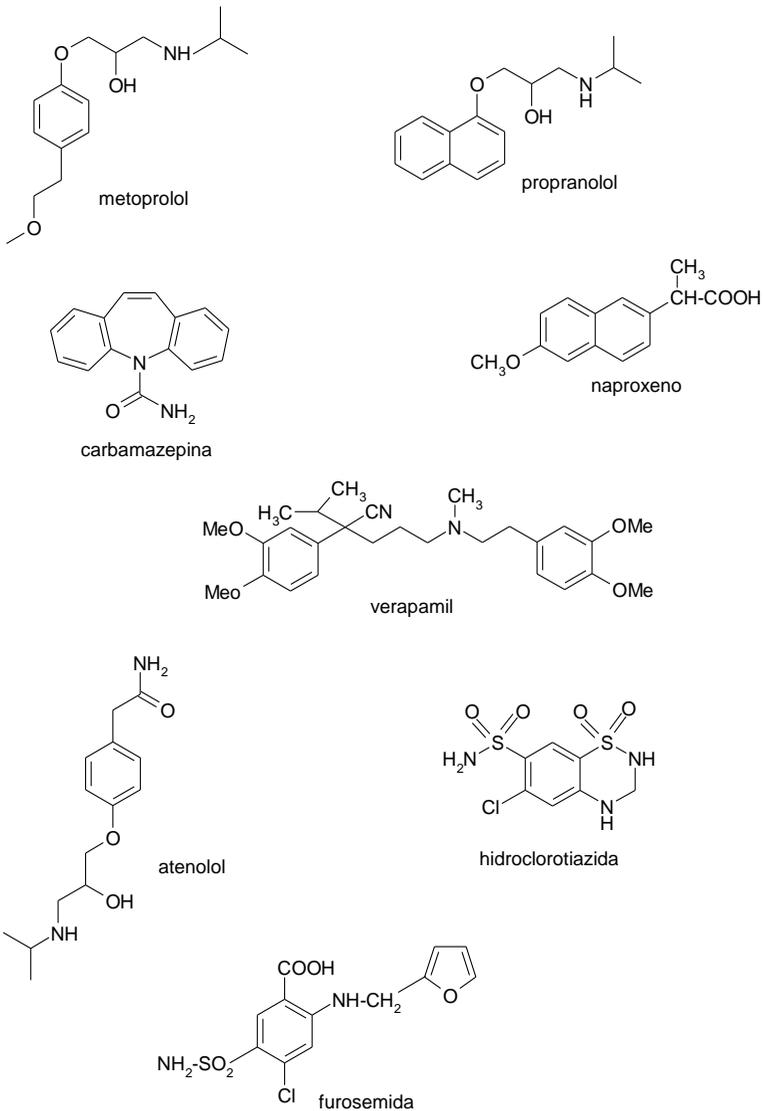


Figura 6: Estruturas químicas dos fármacos testados.

Além dos fármacos utilizados para a padronização, alguns cardenólídeos e o composto galato de pentila foram selecionados para aplicar o método padronizado. Os cardenólídeos foram disponibilizados pelo Prof. Dr. Fernão Castro Braga (Faculdade de Farmácia, UFMG) e pelo Prof. Dr. Wolfgang Kreis (Universidade Friedrich-Alexander, Alemanha). A identidade e a pureza destes compostos foram atestadas pelo Dr. Rodrigo Maia Pádua (Faculdade de Farmácia, UFMG) (dados não mostrados). A digoxina (GP 97,4% - D6003, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e a digitoxigenina (Merck, N° 24536, Darmstadt, Hessen, Alemanha) foram adquiridas comercialmente. As estruturas químicas dos cardenólídeos estão disponíveis na Figura 7.

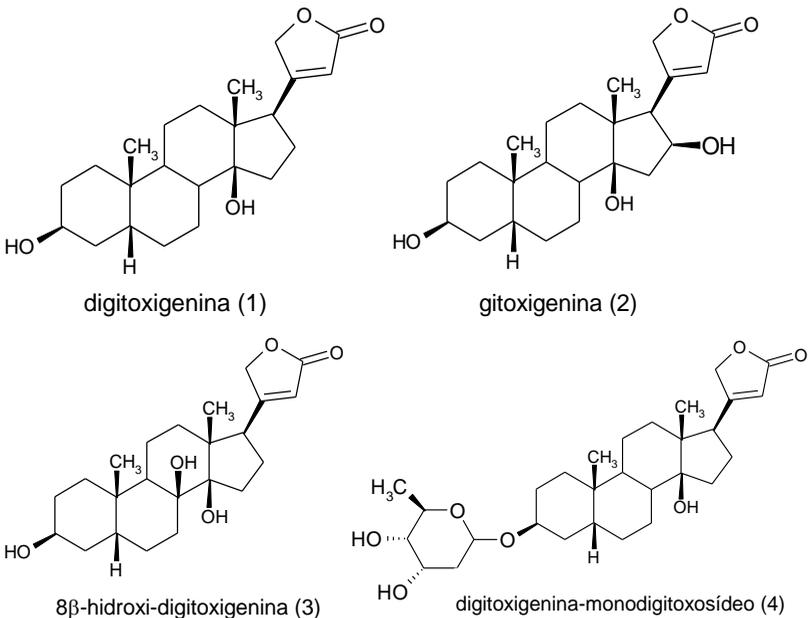


Figura 7: Estruturas químicas dos cardenólídeos testados

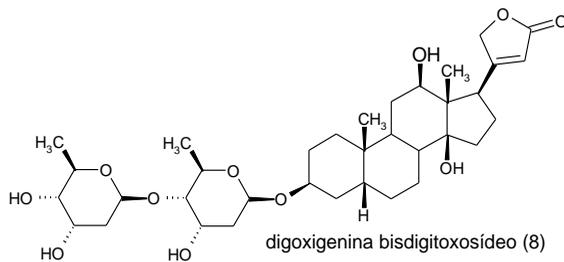
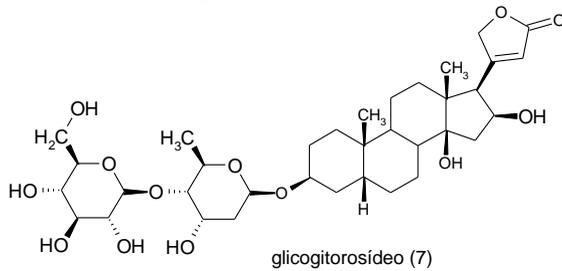
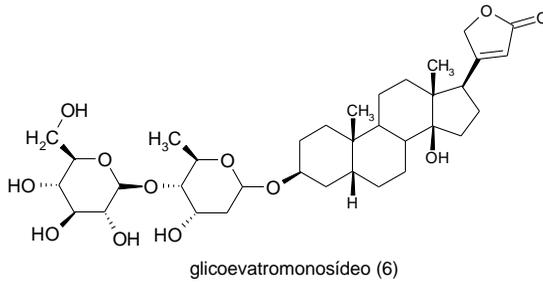
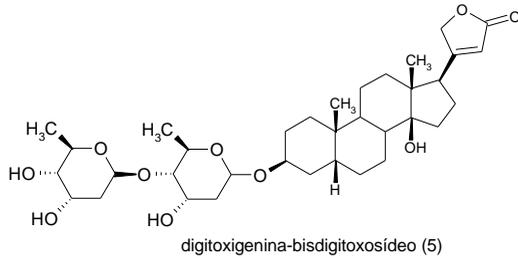
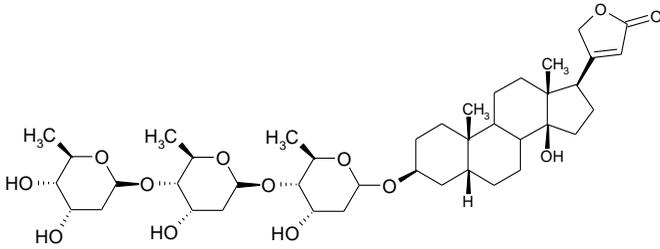
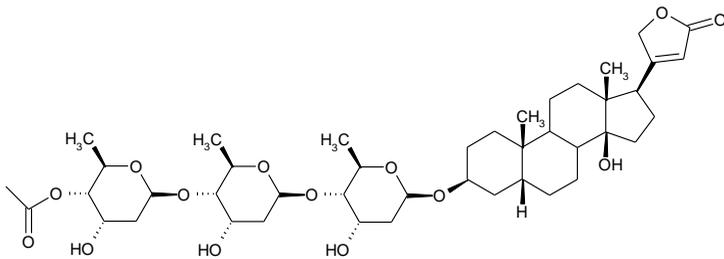


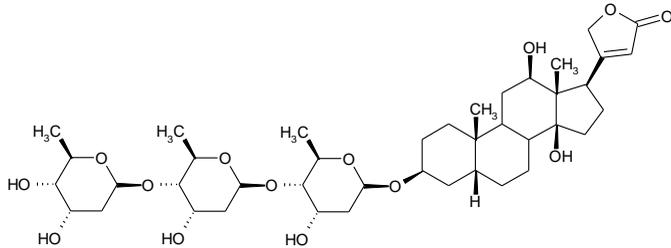
Figura 8: Estruturas químicas dos cardenólídeos testados



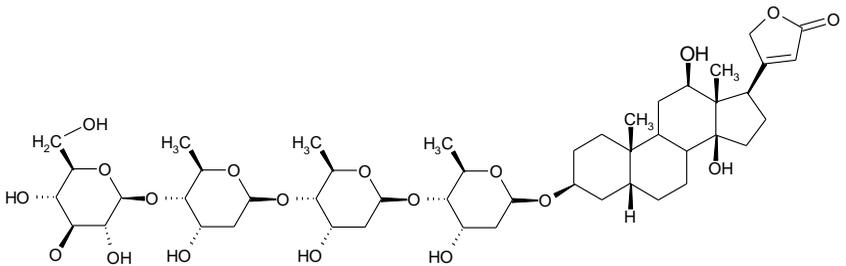
digitoxina (9)



β -acetildigitoxina (10)



digoxina (11)



desacetil- lanatosídeo C (12)

Figura 7: Estruturas químicas dos cardenólídeos testados

O galato de pentila (Figura 9) utilizado neste estudo foi obtido por síntese orgânica realizada pela Doutoranda Alessandra Mascarello, orientada pelo Prof. Dr. Ricardo José Nunes, do PPG em Química desta Universidade. A identidade e pureza desse composto foram atestadas e previamente descritas no trabalho de Savi e colaboradores (2005).

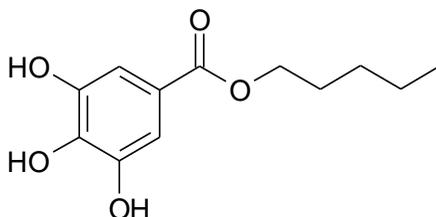


Figura 9: Estrutura química do galato de pentila

Todos os fármacos e compostos (50mM) foram diluídos em DMSO (GP >99,9% - Merck, Darmstadt, Hessen, Alemanha) e mantidos a -20°C . As soluções-estoques dos cardenólídeos foram diluídas em tampão fosfato (PBS³), extemporaneamente à realização de cada experimento. As soluções-estoques dos fármacos (SCB) e do galato de pentila foram diluídas em PBS contendo 0,5% de DMSO, também extemporaneamente à realização de cada experimento.

A utilização de DMSO nos tampões aquosos é comumente empregada em experimentos PAMPA, para melhorar as condições de solubilidade das amostras. No entanto, quando se utiliza como método de análise a espectrofotometria no UV, existem restrições do seu uso para fármacos/compostos que absorvem em baixos comprimentos de onda, como os cardenólídeos (faixa de 230nm), região essa que representa o máximo de absorção do DMSO, inviabilizando sua utilização para esta classe de compostos (CHEN et al., 2008).

³ **PBS:** Solução Tampão PBS: 8,0g de NaCl; 0,2g KCl; 1,44g Na₂HPO₄; 0,24g KH₂PO₄ por litro de água ultra pura. O pH foi ajustado com NaOH ou HCl.

À todos que forneceram estes fármacos e compostos, ficam aqui registrados os nossos agradecimentos.

4.2 Desenvolvimento e validação dos métodos analíticos para a quantificação dos fármacos (SCB) e dos compostos de origem natural e sintética, por espectrofotometria no UV.

Para demonstrar que o método escolhido poderia ser utilizado para a quantificação de compostos nos compartimentos aceptores e doadores no ensaio PAMPA, foram desenvolvidos e validados métodos analíticos de espectrofotometria no UV, adequando-os às necessidades dos ensaios de permeabilidade (VENKATESH et al., 2007).

Os métodos desenvolvidos foram validados segundo critérios preconizados pelo *International Conference on Harmonisation* Q2(R1) (ICH, 2005) e o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da ANVISA (BRASIL, 2003). Os critérios analisados foram especificidade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão. Para todos os parâmetros avaliados, as leituras foram realizadas no espectrofotômetro UV (Infinite M200 Tecan, Grödig, Austria), utilizando como suporte para leitura uma placa de quartzo de 96 cavidades (SPECTRAplate™ Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA).

4.2.1 Especificidade

No estudo da especificidade do método, analisou-se as soluções-padrões de todos os fármacos/compostos isoladamente, dissolvidos em tampão PBS/0,5%DMSO (exceto digoxina e digitoxigenina, que foram dissolvidas em tampão PBS sem DMSO). As soluções-padrões foram transferidas para uma placa de quartzo de 96 cavidades e foram realizadas varreduras espectrais entre 230-450nm no espectrofotômetro UV. Os perfis espectrofotométricos de todas as soluções-padrões dos fármacos/compostos foram comparados com os perfis dos tampões PBS e PBS/0,5%DMSO (interferentes da análise).

Além do comparativo realizado entre as soluções-padrões e os tampões, foi necessário realizar varreduras das

soluções das amostras, nos valores de pH utilizados nos experimentos de permeabilidade (pH 2, 5, 6,2 e 10), a fim de verificar seu comportamento espectral, nessa ampla faixa de pH. Para cada amostra que apresentou perfis espectrais diferentes nesses valores de pH, atingindo máximos de absorvância distintos, a validação analítica desta amostra, em um ou mais pHs, também foi realizada.

4.2.2 Linearidade

A linearidade foi determinada através da construção de três curvas de calibração, obtidas com cinco concentrações, em três dias diferentes, por meio das leituras das absorvâncias, nos comprimentos de onda determinados, a partir dos dados de especificidade de cada fármaco/composto, em cada valor de pH selecionado. A faixa de variação das concentrações de cada amostra foi selecionada de acordo com as concentrações de cada amostra usadas nos experimentos.

4.2.3 Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram estabelecidos a partir da curva analítica resultante da média de três réplicas. O cálculo para determinar os valores correspondentes aos LD (a) e LQ (b) baseia-se no desvio padrão residual da linha de regressão e sua relação com a inclinação da reta (coeficiente angular) na curva analítica. Para tal, foram utilizadas as seguintes equações:

$$LD: \left(\frac{DP}{I}\right) \times 3,3 \quad (a)$$

$$LQ: \left(\frac{DP}{I}\right) \times 10 \quad (b)$$

onde:

DP: desvio padrão do intercepto com relação ao eixo dos Y; *I*: valor da inclinação da curva analítica.

4.2.4 Precisão

A precisão intra-dia (repetibilidade) foi avaliada através de seis réplicas das soluções-padrões dos fármacos/compostos, que foram preparadas em PBS ou PBS/0,5%DMSO, para cada valor de pH selecionado, de acordo com as concentrações dos mesmos utilizadas nos experimentos. Foram realizadas leituras em três diferentes períodos do dia (manhã, início da tarde e final da tarde).

A precisão inter-dia foi avaliada através da comparação entre as leituras de uma mesma concentração, realizadas em três dias diferentes, utilizando seis réplicas de cada solução-padrão.

Para todas as leituras de precisão foram registrados os valores das absorvâncias e efetuados os cálculos dos desvios padrão relativos entre as determinações.

4.2.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método da recuperação de cada analito, após os experimentos, adicionando-se quantidades conhecidas aos tampões, em três concentrações diferentes (alta, média e baixa). O coeficiente de variação e a porcentagem de recuperação foram utilizados para avaliar a exatidão definida como:

$$Exatidão = \left(\frac{\text{concentração experimental obtida}}{\text{concentração teórica}} \right) \times 100$$

4.3. Avaliação *in vitro* da permeabilidade pelo ensaio PAMPA

Os experimentos foram realizados através do modelo PAMPA TGI, variante *Double-Sink* (AVDEEF, 2003; AVDEEF et al., 2007) e do modelo PAMPA Pele (OTTAVIANI; MARTEL; CARRUPT, 2006 e 2007), que mimetizam, respectivamente, o transporte de fármacos/compostos através do trato gastrointestinal e da pele humana. Em ambas as metodologias, foram utilizadas placas de 96 cavidades MultiScreen®IP (Millipore, Billerica, MA, EUA) como compartimento acceptor e placas/filtros de PVDF de 96 cavidades MultiScreen®IP (Millipore,

Billerica, MA, EUA) como compartimento doador. Para os cardenólídeos, em ambos os experimentos, foi utilizado o tampão PBS como tampão aquoso dos compartimentos acceptor e doador; já para os fármacos (SCB) e para o galato de pentila foi utilizado como tampão PBS/0,5% DMSO.

4.3.1 Modelo TGI, variante *Double-Sink*

Nesta variante, cada cavidade da placa filtro recebeu 5 µL de uma solução a 20% (p/v) de lecitina de soja (541601G - Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, EUA), dissolvida em dodecano (GP >99% - D221104 - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As soluções doadoras iniciais (150 µL) foram preparadas através da diluição das soluções-estoques dos fármacos/compostos em tampão PBS ou PBS/0,5%DMSO, nos valores de pH 5; 6,2 e 7,4, mimetizando as diferentes condições de pH do trato gastrointestinal. Na placa acceptora, foram adicionados 300 µL do tampão selecionado para os fármacos/compostos, em pH 7,4 para mimetizar o pH da circulação sanguínea. Posteriormente, os sanduíches formados foram incubados por diferentes tempos (1, 4 ou 15 h), a $21 \pm 2^\circ\text{C}$, com agitação de 300 rpm, em agitador orbital (QUIMIS, São Paulo, SP, Brasil). Posteriormente, as placas foram separadas e seus conteúdos foram transferidos para a placa de quartzo de 96 cavidades para leitura das absorvâncias no espectrofotômetro de UV.

4.3.2 Modelo PAMPA Pele

Para preparar a membrana lipídica, foi utilizada uma mistura (v/v) de 70% de óleo de silicone (OS - DC 200 - Sigma, St. Louis, MO, EUA) e 30% de miristato de isopropila (IPM, 98% – Alfa Aesar, Karlsruhe, Baden-Wurttemberg, Alemanha). A membrana lipídica foi preparada imediatamente antes dos experimentos, e 17 µL de 35% (v/v) da membrana dissolvida em hexano (GP 99,9% - Acros Organics, Geel, Vlaams Gewest, Bélgica) foram adicionados em cada cavidade da placa doadora

20 min antes da formação dos sanduíches, para evaporação do solvente orgânico.

Para melhor predizer a permeabilidade de fármacos/compostos de diferentes valores de pKa, os valores de pH do tampão no compartimento doador foram 2, 5 e 10. As soluções doadoras iniciais (150 µL) foram preparadas através da diluição das soluções-estoques dos fármacos/compostos em tampão, nos valores de pH selecionados. Na placa acceptora foram adicionados 300 µL do tampão selecionado para os fármacos/compostos, em pH 7,4 para mimetizar o pH da circulação sanguínea. Posteriormente, os sanduíches formados foram incubados por 7h, a $21 \pm 2^\circ\text{C}$, com agitação de 150 rpm, em agitador orbital. Cada placa foi envolvida com papel toalha umedecido com água, para garantir que as soluções contidas em ambos os compartimentos não evaporassem. Posteriormente, as placas foram separadas e seus conteúdos foram transferidos para a placa de quartzo de 96 cavidades, e as leituras das absorvâncias foram realizadas no espectrofotômetro de UV. O tempo de incubação de 7 h foi escolhido para se obter uma discriminação correta entre as amostras neste modelo, a fim de impedir o estabelecimento de equilíbrio entre as concentrações, em ambos os compartimentos. Além disso, o uso do filtro de PVDF neste modelo também requer um maior tempo de incubação (MARTEL, 2010).

O cálculo do coeficiente de permeabilidade efetiva ($\text{Log } P_e$, cm/s) foi realizado conforme descrito por Chen e colaboradores (2008), através da aplicação da seguinte fórmula:

$$\text{Log } P_e = \text{Log} \left[C_x - \ln \left(\frac{1 - C_A}{C_{\text{equilibrium}}} \right) \right]$$

onde:

$$C_x = \frac{(V_D \times V_A)}{[(V_D + V_A) \times A \times \text{porosidade} \times t]}$$

$$C_{\text{equilibrium}} = \frac{[C_D \times V_D + C_A \times V_A]}{V_D + V_A}$$

onde:

C_A (t): concentração do fármaco/composto no compartimento acceptor no tempo t;

C_D (t): concentração do fármaco/composto no compartimento doador no tempo t;

V_D : volume do compartimento doador;

V_A : volume do compartimento acceptor;

A: área do filtro (cm^2);

Porosidade: porosidade do filtro

t: tempo de incubação (segundos);

A equação usada para determinar a massa do fármaco/composto retida na membrana foi a seguinte:

$$R = \frac{1 - [C_D \times V_D + C_A \times V_A]}{C_0 \times V_D}$$

onde:

C_A (t): concentração do fármaco/composto no compartimento acceptor no tempo t;

C_D (t): concentração do fármaco/composto no compartimento doador no tempo t;

V_D : volume do compartimento doador;

V_A : volume do compartimento acceptor;

C_0 : concentração inicial do fármaco/composto.

4.4. Avaliação da integridade das membranas lipídicas

Para garantir a robustez dos resultados dos experimentos de transporte, é desejável incluir, após o experimento, um ensaio que verifique a integridade das membranas utilizadas. Para tal, utilizam-se corantes que não atravessam as barreiras biológicas através da via transcelular, ou que apresentam baixa permeabilidade através dessa via. Alguns estudos demonstraram a eficiência dessa avaliação em modelos PAMPA com diversas barreiras lipídicas, tais como dioleilfosfatidilcolina (LIU, et al., 2003), lecitina de ovo (ZHU, et al., 2002) e lecitina de soja (MIRET et al., 2004).

Neste trabalho, foi aplicada a metodologia proposta pela empresa Millipore (MILLIPORE, 2005) para avaliar a integridade

da membrana lipídica, após a avaliação da permeabilidade. Foram utilizados os corantes *Lucifer Yellow* (LY) (Sigma, St. Louis, MO, EUA), que é rejeitado pela membrana lipídica, e Azul de Crescil Brilhante (ACB) (Merck, Darmstadt, Hessen, Alemanha), que apresenta baixa permeabilidade.

Os corantes foram preparados em tampão PBS/0,5%DMSO, pH 7,4, na proporção 9:1 (ACB:LY). Esta solução (150 μ L) foi adicionada no compartimento doador, logo após o experimento. O tampão PBS/0,5%DMSO (300 μ L, pH 7,4) foi adicionado no compartimento acceptor e, posteriormente, os sanduíches foram formados e mantidos à temperatura ambiente, por 3 h. Após, as placas foram separadas e 200 μ L do conteúdo do compartimento acceptor foram transferidos para a placa de quartzo. A leitura foi realizada a 610nm para quantificar a passagem do corante ACB. A leitura do LY foi realizada utilizando-se o leitor de fluorescência (excitação 425nm e emissão 528nm).

4.5. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Microsoft Office Excel[®] 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA) para os dados da validação analítica do método espectrofotométrico no UV, através da análise de regressão.

A análise estatística dos resultados aqui obtidos foi realizada por análise de variância (ANOVA). Para as amostras que apresentaram diferenças estatisticamente significativas, realizou-se o pós-teste Tukey. As análises foram realizadas com o programa GraphPad Prism[®] 5, versão 5.01 para Windows (Graph Pad Software, La Jolla, CA, EUA). O intervalo de confiança adotado foi de 95% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento e validação dos métodos analíticos

5.1.1 Especificidade

O estudo de especificidade possibilitou determinar o comprimento de onda adequado para análise dos fármacos/compostos estudados. Os espectros demonstraram que o método é específico, pois não ocorreu sobreposição das bandas dos mesmos, individualmente, e as dos tampões PBS e PBS/0,5%DMSO. À título ilustrativo, as Figuras 9, 10, 11, 12 e 13 mostram os espectros de varredura obtidos por espectrofotometria no UV de todas as amostras avaliadas, bem como o comprimento de onda selecionado como o máximo de absorção no UV. Os espectros de varredura dos fármacos atenolol, carbamazepina, hidroclorotiazida, naproxeno e propranolol foram comparados com dados da literatura, sendo que os mesmos perfis e os mesmos comprimentos de onda máximos de absorção foram encontrados (MOFFAT et al., 1986).

Os perfis dos espectros obtidos de UV-VIS (230-450nm) de todas as amostras, em tampão PBS, nos diferentes valores de pH (2; 5; 6,2; 7,4 e 10), foram avaliados e comparados. Esses espectros mostraram que grande parte dos compostos apresentam comportamentos distintos, devido a variações de pH.

Para os fármacos atenolol, metoprolol e propranolol (Figura 9), os perfis das bandas foram muito similares, em todos os valores de pH (dados não mostrados), o que possibilitou a validação do método em um único pH (pH 7,4).

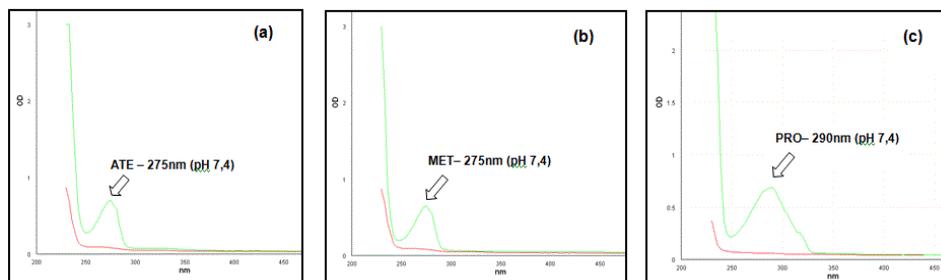


Figura 10: Especificidade do método desenvolvido para quantificação por espectrofotometria no UV dos fármacos (A) atenolol (ATE), (B) metoprolol (MET) e (C) propranolol (PRO). Fármacos representados em verde e tampão PBS 0,5%DMSO em vermelho. Amplitude compreendida entre 230-450nm.

Os espectros dos fármacos carbamazepina (pH 6,2), furosemida (pH 2), hidroclorotiazida (pH10), naproxeno (pH 2 e pH 5) e verapamil (pH 10) (Figuras 10 e 11) mostraram que houve diferenças de intensidade nos valores máximos de absorção, com relação ao pH 7,4. Desse modo, a faixa de linearidade utilizada nesses valores de pH foi distinta e uma nova validação analítica foi realizada.

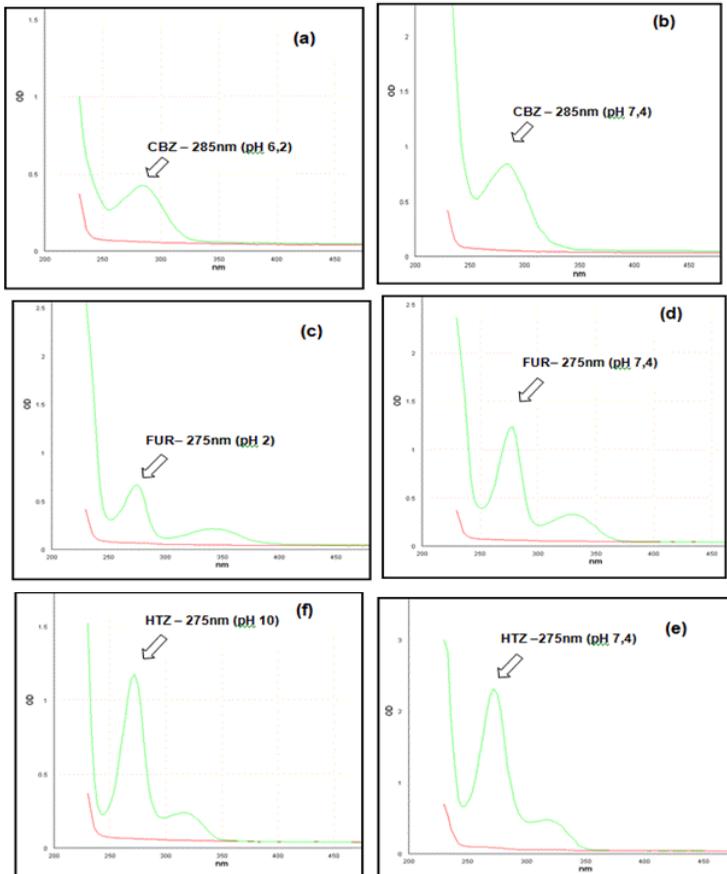


Figura 11: Especificidade do método desenvolvido para quantificação por espectrofotometria no UV dos fármacos (A) carbamazepina (CBZ) pH 6,2; (B) carbamazepina (CBZ) pH 7,4; (C) furosemida (FUR) pH 2; (D) furosemida (FUR) pH 7,4; (E) hidroclorotiazida (HTZ) pH 7,4; (F) hidroclorotiazida (HTZ) pH 10 (fármacos representados em verde) e do tampão PBS 0,5%DMSO (representado em vermelho). Amplitude compreendida entre 230-450nm.

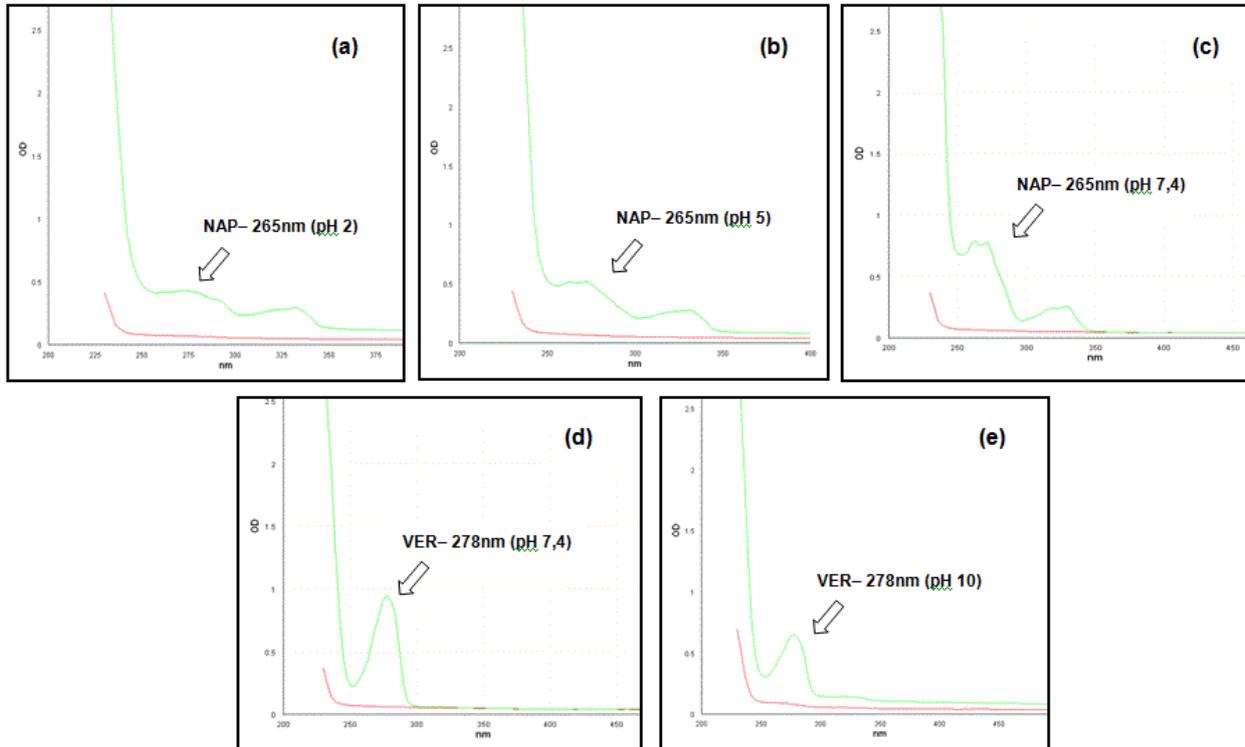


Figura 12: Especificidade do método desenvolvido para quantificação por espectrofotometria no UV dos fármacos (A) naproxeno (NAP) pH 2; (B) naproxeno (NAP) pH 5; (C) naproxeno (NAP) pH 7,4; (D) verapamil (VER) pH 7,4; (E) verapamil (VER) pH 10 (fármacos representados em verde) e do tampão PBS 0,5%DMSO (representado em vermelho). Amplitude compreendida entre 230-450nm.

Diferentemente das outras amostras, os espectros do composto galato de pentila (Figuras 12 A, B e C) mostraram deslocamentos das bandas nos valores de pH 7,4 e 10, e por isso foi imprescindível realizar a validação analítica em diferentes comprimentos de onda. A validação não foi necessária nos outros valores de pH (2; 5 e 6,2) onde os perfis de absorvância no UV foram muito similares (dados não mostrados). Esses resultados podem ser atribuídos à degradação do composto em condições de pH básico, enquanto que em meios ácidos e oxidativos, o GP apresentou-se altamente estável, conforme relatado por Kelmann (2011).

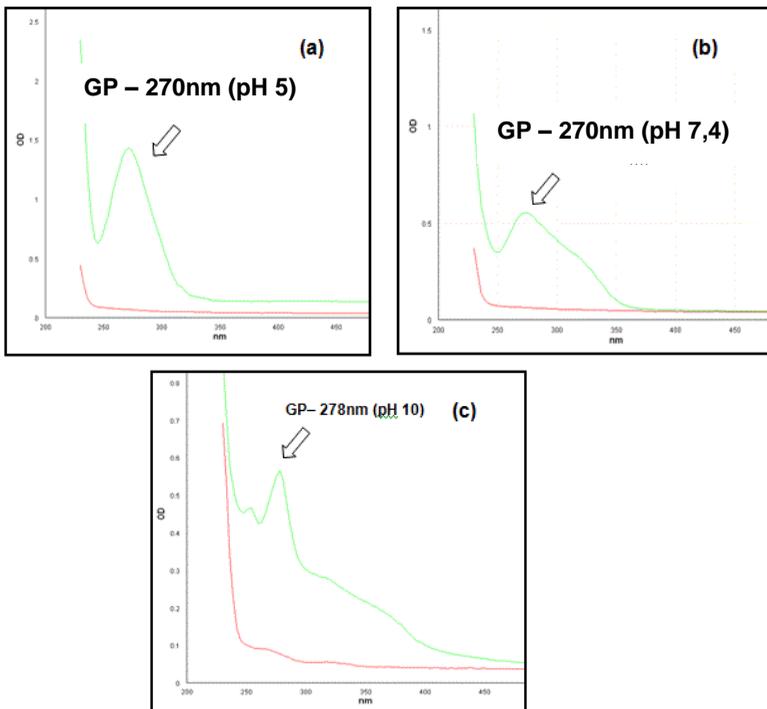


Figura 13: Especificidade do método desenvolvido para quantificação por espectrofotometria no UV dos compostos (A) galato de pentila (GP) pH 5; (B) galato de pentila (GP) pH 7,4; (C) galato de pentila (GP) pH 10; (compostos representados em verde) e do tampão PBS 0,5%DMSO (representado em vermelho). Amplitude compreendida entre 230-450nm.

Os cardenólídeos testados apresentam o mesmo grupamento cromóforo no UV e, por este motivo, não foi necessário validar o método analítico para todos eles, tendo sido selecionados para tal, a digoxina e a digitoxigenina (Figura 13). Tais compostos geralmente são detectados em espectrofotômetro de UV com um máximo de absorção na região de 220 nm. No entanto, devido às limitações do equipamento utilizado, essas leituras foram realizadas em 230 nm, região na qual os compostos ainda apresentaram uma intensa absorção no UV.

Na Figura 13 A e B foi possível observar que o tampão aquoso escolhido não interfere na absorvância das amostras na região de 230nm; porém, não foi possível visualizar as bandas características desses cardenólídeos no UV, e, assim detectar o máximo de absorção desses compostos. No entanto, através de uma varredura (200-240nm) em outro espectrofotômetro de UV (Lambda 25 UV/VIS, PerkinElmer, SP, Brasil) (dados não mostrados), e de uma busca na literatura, foi possível não só observar o perfil de absorvância no UV de diferentes cardenólídeos, mas também destacar que na região de 230nm ainda ocorre uma intensa absorção desta classe de compostos, as quais não interferem na qualidade dos resultados obtidos nos experimentos de permeabilidade (ASHLEY, 1957; DONG, 1999; NACHTRNANN, 1976; SCHNEIDER et al., 1998; STOLL, 1954).

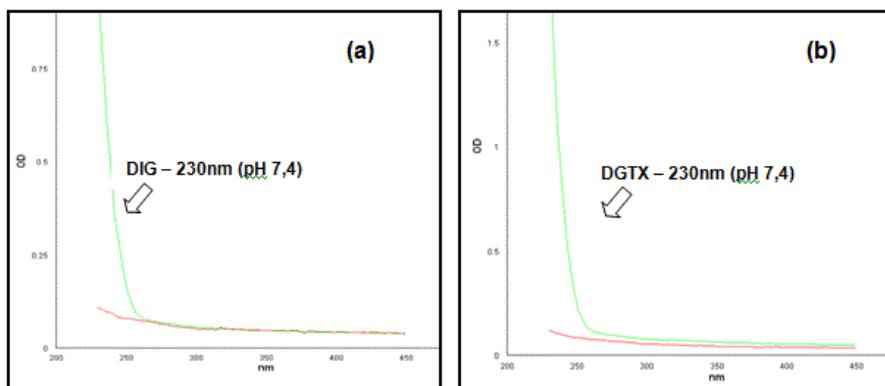


Figura 15: Especificidade do método desenvolvido para quantificação por espectrofotometria no UV dos compostos (A) digoxina (DIG), (B) digitoxigenina (DGTX) (compostos representados em verde) e do tampão PBS (representado em vermelho). Amplitude compreendida entre 230-450nm.

5.1.2 Linearidade

As curvas de calibração dos fármacos/compostos analisados apresentaram-se lineares na faixa de concentração determinada, com coeficientes de correlação entre 0,9955 a 0,9999. Na Tabela 1 encontram-se as faixas de linearidade utilizadas para os fármacos/compostos, bem como os dados obtidos através da equação da reta, determinada por regressão linear (a representação gráfica das equações da reta não foi apresentada).

Tabela 1: Faixas de linearidade e limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) obtidos para os fármacos/compostos testados, em diferentes valores de pH.

| Fármacos/ compostos | pH da soluça o | Faixa de linearidade µM | Linearidade | LD | LQ |
|-------------------------------|----------------------|-------------------------------|--|-------|--------|
| | | | | µM | µM |
| Atenolol | 7,4 | 125-1000 | $y = 0,0004x + 0,0298$ $R^2 = 0,9961$ | 36,07 | 109,32 |
| Metoprolol | 7,4 | 200-2500 | $y = 0,0003x - 0,0093$ $R^2 = 0,9997$ | 53,52 | 162,20 |
| Propranolol | 7,4 | 30-500 | $y = 0,0012x + 0,0005$ $R^2 = 0,9999$ | 10,15 | 30,75 |
| Carbamazepi na | 6,2 | 25-300 | $y = 0,003x + 0,014$ $R^2 = 0,9999$ | 5,28 | 15,99 |
| | 7,4 | 25-300 | $y = 0,0033x + 0,0001$ $R^2 = 0,9994$ | 4,62 | 14,01 |
| Furosemida | 2 | 50-600 | $y = 0,0015x + 0,0853$ $R^2 = 0,9989$ | 12,48 | 37,84 |
| | 7,4 | 25-300 | $y = 0,0042x + 0,0097$ $R^2 = 0,9998$ | 2,33 | 7,06 |
| Hidroclorotiaz ida | 2 | 30-500 | $y = 0,0044x + 0,0077$ $R^2 = 0,9997$ | 4,46 | 13,56 |
| | 7,4 | 25-300 | $y = 0,0044x - 0,0139$ $R^2 = 0,9999$ | 4,77 | 14,45 |
| Naproxeno | 5 | 125-1000 | $y = 0,0004x + 0,0184$ $R^2 = 0,9955$ | 20,93 | 63,58 |
| | 7,4 | 25-700 | $y = 0,0013x - 0,0215$ $R^2 = 0,9998$ | 5,18 | 15,71 |
| Verapamil | 7,4 | 100-700 | $y = 0,0012x - 0,0349$ $R^2 = 0,9992$ | 14,99 | 45,44 |
| | 10 | 125-1000 | $y = 0,0024x + 0,0826$ $R^2 = 0,9976$ | 21,22 | 64,30 |
| Galato de pentila | 5 | 30-500 | $y = 0,003x + 0,0022$ $R^2 = 0,9996$ | 9,23 | 27,97 |
| | 7,4 | 30-500 | $y = 0,0034x - 0,0008$ $R^2 = 0,9991$ | 7,80 | 23,65 |
| Digoxina | 7,4 | 100-700 | $y = 0,0028x + 0,0423$ $R^2 = 0,9957$ | 25,93 | 78,58 |
| Digitoxigenin a | 7,4 | 25-300 | $y = 0,0048x + 0,0036$ $R^2 = 0,9995$ | 8,03 | 24,34 |

LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação.

Não foi possível atribuir uma faixa de linearidade para o naproxeno em pH2, devido à insolubilidade do mesmo em soluções fortemente ácidas. Nesse pH, além do fármaco não atingir o valor de R^2 desejado ($>0,99$), resultados posteriores de precisão e exatidão também não foram alcançados. Por isso, os dados de permeabilidade do naproxeno em pH 2 não foram apresentados neste trabalho.

Para garantir a validade do ensaio foi realizada a análise de variância ANOVA e evidenciou-se a linearidade dos métodos, através de alguns parâmetros avaliados. Na análise dos valores calculados de F, não foi demonstrada a falta de ajuste do modelo, uma vez que os mesmos foram superiores aos valores de F críticos, no nível de 95% de confiança (dados não mostrados).

A análise dos resíduos, definida a partir dos desvios verticais de cada ponto da linha da reta, também fornece informações importantes sobre os dados de linearidade (SKOOG et al., 2006). Neste estudo, gráficos de concentração *versus* resíduo (dados não mostrados) foram elaborados para todos os fármacos/compostos validados, e os pontos localizaram-se em torno do eixo das abscissas, descartando, assim, uma possível tendência dos resultados.

Por fim, os limites de confiança para o intercepto também foram calculados para cada fármaco/composto e, estes, incluem o valor zero (dados não mostrados). Com esses dados, foi possível constatar a ausência de erro sistemático, no qual o fator de variação independe da concentração dos componentes analisados (SKOOG et al., 2006).

5.1.3 Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram obtidos a partir das curvas de calibração dos fármacos/compostos testados e também estão representados na Tabela 1. Para a maioria dos fármacos/compostos, os valores de LD e LQ obtidos foram baixos, demonstrando sensibilidade para a detecção e a quantificação destas amostras, nas condições descritas. Para o atenolol e o metoprolol, que apresentam baixa absorção no UV (valores de LQ: 109,32 μM e 162,20 μM ,

respectivamente), foi necessário o uso de altas concentrações nos experimentos PAMPA. Mesmo quando esses fármacos foram utilizados em altas concentrações, a solubilidade não foi afetada, e eles foram suficientemente solúveis para a realização dos ensaios de permeabilidade. Dados de solubilidade em água foram obtidos no programa SciFinder Scholar™ 2007.

5.1.4 Precisão

A Tabela 2 apresenta os dados de precisão intra-dia (repetibilidade) dos fármacos/compostos avaliados. Os resultados obtidos, em três diferentes períodos do dia, com as amostras nas mesmas concentrações usadas nos experimentos PAMPA, em cada valor de pH apresentaram valores de desvio padrão relativo (DPR) entre 0,30 a 4,48%, que são menores que o valor máximo estabelecido de 5,0% (BRASIL, 2003).

Tabela 2: Resultados da precisão intra-dia dos fármacos/compostos testados, em diferentes valores de pH.

| Fármacos/ compostos | pH | Manhã (UA) | Início tarde (UA) | Final tarde (UA) | Média | DP | DPR (%) |
|--------------------------|-----|---------------|-------------------------|------------------------|-------|-------|------------|
| Atenolol | 7,4 | 0,50 | 0,49 | 0,49 | 0,49 | 0,006 | 1,25 |
| Metoprolol | 7,4 | 0,53 | 0,54 | 0,54 | 0,50 | 0,004 | 0,83 |
| Propranolol | 7,4 | 0,35 | 0,39 | 0,36 | 0,35 | 0,017 | 4,48 |
| Carbamazepina | 6,2 | 0,65 | 0,65 | 0,67 | 0,66 | 0,011 | 1,70 |
| | 7,4 | 0,62 | 0,64 | 0,65 | 0,64 | 0,014 | 2,16 |
| Furosemida | 2 | 0,53 | 0,57 | 0,55 | 0,55 | 0,016 | 2,92 |
| | 7,4 | 1,45 | 1,43 | 1,54 | 1,47 | 0,056 | 3,77 |
| Hidroclorotiazida | 2 | 0,81 | 0,81 | 0,80 | 0,81 | 0,003 | 0,27 |
| | 7,4 | 1,15 | 1,15 | 1,15 | 1,15 | 0,004 | 0,29 |
| Naproxeno | 5 | 0,29 | 0,30 | 0,31 | 0,30 | 0,008 | 2,82 |
| | 7,4 | 0,71 | 0,74 | 0,72 | 0,72 | 0,016 | 2,24 |
| Verapamil | 7,4 | 0,67 | 0,66 | 0,67 | 0,66 | 0,003 | 0,43 |
| | 10 | 0,58 | 0,58 | 0,57 | 0,58 | 0,004 | 0,60 |
| Galato de pentila | 5 | 0,69 | 0,68 | 0,67 | 0,68 | 0,006 | 0,91 |
| | 7,4 | 1,27 | 1,22 | 1,20 | 1,23 | 0,033 | 2,65 |
| Digoxina | 7,4 | 1,15 | 1,09 | 1,09 | 1,11 | 0,032 | 2,87 |
| Digitoxigenina | 7,4 | 0,90 | 0,90 | 0,90 | 0,90 | 0,028 | 0,30 |

UA: Unidades de absorvância; DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo.

A precisão inter-dia (Tabela 3) foi verificada em três dias diferentes, também com as amostras nas mesmas concentrações usadas nos experimentos PAMPA. Os valores de DPR foram inferiores a 5%, assim como no ensaio de repetibilidade, estando em conformidade com os guias de referência (BRASIL, 2003).

Tabela 3: Resultados da precisão inter-dia dos fármacos/compostos testados, em diferentes valores de pH.

| Fármacos/ Compostos | pH | Dia 1 (UA) | Dia 2 (UA) | Dia 3 (UA) | Média | DP | DPR (%) |
|--------------------------|-----|------------------|------------------|---------------|-------|-------|------------|
| Atenolol | 7,4 | 0,49 | 0,47 | 0,46 | 0,47 | 0,01 | 3,21 |
| Metoprolol | 7,4 | 0,52 | 0,54 | 0,54 | 0,53 | 0,009 | 1,62 |
| Propranolol | 7,4 | 0,37 | 0,39 | 0,40 | 0,39 | 0,01 | 3,84 |
| Carbamazepina | 6,2 | 0,67 | 0,62 | 0,65 | 0,65 | 0,02 | 3,52 |
| | 7,4 | 0,65 | 0,63 | 0,59 | 0,62 | 0,03 | 4,45 |
| Furosemida | 2 | 0,55 | 0,51 | 0,53 | 0,53 | 0,02 | 3,66 |
| | 7,4 | 1,37 | 1,41 | 1,28 | 1,35 | 0,07 | 4,94 |
| Hidroclorotiazida | 2 | 0,81 | 0,83 | 0,82 | 0,82 | 0,01 | 1,51 |
| | 7,4 | 1,01 | 0,99 | 1,05 | 1,02 | 0,03 | 2,85 |
| Naproxeno | 5 | 0,27 | 0,29 | 0,27 | 0,27 | 0,01 | 4,40 |
| | 7,4 | 0,74 | 0,72 | 0,79 | 0,75 | 0,03 | 4,53 |
| Verapamil | 7,4 | 0,66 | 0,65 | 0,63 | 0,65 | 0,01 | 2,31 |
| | 10 | 0,58 | 0,60 | 0,59 | 0,59 | 0,01 | 1,94 |
| Galato de pentila | 5 | 0,68 | 0,64 | 0,67 | 0,67 | 0,02 | 2,77 |
| | 7,4 | 1,03 | 0,99 | 0,99 | 1,00 | 0,02 | 2,41 |
| Digoxina | 7,4 | 1,05 | 0,99 | 1,01 | 1,02 | 0,03 | 3,03 |
| Digitoxigenina | 7,4 | 0,93 | 0,98 | 0,97 | 0,96 | 0,02 | 2,51 |

UA: Unidades de absorvância; DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo.

Os dados apresentados nas Tabelas 2 e 3 confirmam que o método analítico de espectrofotometria no UV proposto é suficientemente preciso para quantificar as amostras, de acordo com a legislação vigente.

5.1.5 Exatidão

A exatidão foi verificada através da análise de recuperação, para três níveis de concentração das amostras (baixa, média e alta). Os resultados obtidos revelaram a faixa de recuperação dos analitos entre (95,20 - 113,07%) e o maior valor de DPR de 5,2 % (Tabela 4). Estes resultados demonstram que pequenas variações na concentração de cada amostra testada podem ser prontamente quantificadas pelo método desenvolvido, que mostrou ser satisfatoriamente exato.

Contudo, o único composto que não atendeu as exigências de exatidão do método foi o galato de pentila em pH 10 (valores de recuperação menores que 95%). Embora tenham sido obtidos dados de linearidade e precisão satisfatórios para o mesmo, foi possível observar, quando da validação da especificidade do método (Figura 12C), um comportamento diferente e instável no pH básico, demonstrando a necessidade de estudos que avaliem a estabilidade desse composto. Com isso, os dados de permeabilidade do galato de pentila em pH 10 foram excluídos do presente trabalho.

De acordo com os resultados obtidos para os parâmetros validados (especificidade, linearidade, precisão e exatidão), o método apresentou a confiabilidade requerida para um método analítico. Além disso, mostrou ser uma alternativa rápida e de baixo custo para quantificar os fármacos/compostos avaliados nos experimentos PAMPA.

Tabela 4: Resultados do ensaio de exatidão dos fármacos/compostos testados, em diferentes valores de pH.

| Fármacos/compostos | pH da solução | Concentração Teórica (μM) | Concentração média experimental (μM) | DP | DPR (%) | Recuperação (%) |
|----------------------|---------------|--|---|-------|---------|-----------------|
| Atenolol | 7,4 | 1000 | 981,46 | 6,04 | 1,22 | 98,15 |
| | | 500 | 485,11 | 2,46 | 0,67 | 97,02 |
| | | 250 | 268,62 | 8,82 | 3,21 | 107,45 |
| Metoprolol | 7,4 | 2000 | 2015,97 | 23,36 | 1,16 | 100,80 |
| | | 1000 | 969,03 | 18,00 | 1,86 | 96,90 |
| | | 500 | 497,36 | 16,69 | 3,35 | 99,47 |
| Propranolol | 7,4 | 250 | 251,57 | 0,25 | 0,10 | 100,63 |
| | | 125 | 119,26 | 1,21 | 1,02 | 95,41 |
| | | 62,5 | 60,99 | 2,92 | 4,80 | 97,58 |
| Carbamazepina | 6,2 | 200 | 200,15 | 3,16 | 0,95 | 100,07 |
| | | 100 | 102,82 | 0,41 | 0,26 | 102,82 |
| | | 50 | 51,95 | 1,10 | 0,25 | 103,91 |
| | 7,4 | 200 | 197,95 | 2,76 | 1,39 | 98,97 |
| | | 100 | 101,40 | 1,37 | 1,35 | 101,39 |
| | | 50 | 48,38 | 0,20 | 0,42 | 96,77 |

(...)

| Fármacos/compostos | pH da solução | Concentração Teórica (μM) | Concentração média experimental (μM) | DP | DPR (%) | Recuperação (%) |
|--------------------------|---------------|--|---|------|---------|-----------------|
| Furosemida | 2 | 350 | 362,45 | 7,05 | 2,33 | 103,56 |
| | | 200 | 226,15 | 2,46 | 0,75 | 113,07 |
| | | 100 | 109,01 | 3,82 | 3,09 | 109,01 |
| | 7,4 | 200 | 199,89 | 1,38 | 0,69 | 99,94 |
| | | 100 | 103,04 | 0,97 | 0,94 | 103,04 |
| | | 50 | 52,18 | 0,59 | 1,14 | 104,36 |
| Hidroclorotiazida | 2 | 200 | 199,42 | 3,29 | 0,16 | 99,71 |
| | | 100 | 97,20 | 2,24 | 0,26 | 97,20 |
| | | 50 | 48,44 | 0,87 | 0,98 | 96,88 |
| | 7,4 | 200 | 196,88 | 4,61 | 2,34 | 98,44 |
| | | 100 | 98,65 | 1,54 | 1,48 | 98,65 |
| | | 50 | 47,60 | 2,56 | 5,20 | 95,20 |
| Naproxeno | 5 | 750 | 746,71 | 1,05 | 0,14 | 99,56 |
| | | 500 | 513,07 | 2,48 | 2,24 | 102,61 |
| | | 250 | 268,40 | 9,48 | 3,02 | 107,36 |
| | 7,4 | 500 | 500,04 | 1,87 | 0,37 | 100,02 |
| | | 350 | 347,58 | 3,24 | 0,93 | 99,31 |
| | | 200 | 197,84 | 4,67 | 2,36 | 98,92 |

(...)

| Fármacos/compostos | pH da solução | Concentração Teórica (μM) | Concentração média experimental (μM) | DP | DPR (%) | Recuperação (%) |
|--------------------------|---------------|--|---|------|---------|-----------------|
| Verapamil | 7,4 | 500 | 508,17 | 6,24 | 2,57 | 101,60 |
| | | 350 | 345,70 | 2,85 | 1,07 | 98,72 |
| | | 200 | 199,42 | 0,59 | 0,77 | 99,77 |
| | 10 | 700 | 702,91 | 7,83 | 1,70 | 100,41 |
| | | 300 | 319,94 | 7,33 | 1,52 | 106,64 |
| | | 125 | 132,05 | 2,32 | 1,02 | 105,61 |
| Galato de pentila | 5 | 250 | 254,07 | 4,79 | 1,88 | 101,63 |
| | | 125 | 130,37 | 1,01 | 0,78 | 104,29 |
| | | 62,5 | 66,76 | 2,35 | 3,52 | 106,82 |
| | 7,4 | 250 | 253,71 | 4,18 | 1,65 | 101,48 |
| | | 125 | 124,14 | 3,90 | 3,14 | 99,31 |
| | | 62,5 | 64,20 | 0,86 | 1,34 | 102,72 |
| Digitoxigenina | 7,4 | 200 | 199,03 | 3,16 | 1,57 | 99,51 |
| | | 100 | 97,79 | 1,09 | 1,12 | 97,79 |
| | | 50 | 49,78 | 0,43 | 0,87 | 99,56 |
| Digoxina | 7,4 | 500 | 508,65 | 9,96 | 1,42 | 101,73 |
| | | 350 | 357,11 | 4,99 | 0,71 | 102,03 |
| | | 200 | 210,88 | 6,87 | 1,95 | 105,44 |

DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo.

5.2 Avaliação *in vitro* da permeabilidade pelo ensaio PAMPA

5.2.1 Modelo TGI, variante *Double-Sink* (DS)

5.2.1.1 Fármacos

Os dados de permeabilidade dos fármacos avaliados no modelo TGI, variante *Double-Sink* estão representados na

Figura 16. Os resultados estão expressos como valores dos coeficientes de permeabilidade efetiva ($\text{Log } P_e$), que são comumente utilizados para expressar a permeabilidade de amostras através de membranas lipídicas no ensaio PAMPA. Os experimentos foram realizados em tampão PBS nos valores de pH 5; 6,2 e 7,4 (compartimento doador) e pH 7,4 no compartimento acceptor. Esses valores de pH foram selecionados para mimetizar o ambiente encontrado no TGI superior, onde ocorre uma maior absorção. Além disso, a maioria dos candidatos a fármacos (80%) são ionizáveis e dependem de um gradiente de pH (FALLER, 2008).

No estudo realizado por Teksin et al. (2006), o fármaco metoprolol (Classe I, SCB) apresentou valores de P_e marcadamente influenciados pela composição da fase lipídica, pois quando foram utilizadas membranas lipídicas com carga superior negativa, ele apresentou alta permeabilidade, diferentemente do que ocorreu quando foram usadas fases lipídicas de carga neutra. Além disso, este fármaco tem sido utilizado em experimentos de permeabilidade por ser considerado “límitrofe de alta permeabilidade”, ou seja, por conseguir diferenciar compostos de alta e baixa permeabilidade (LENTZ et al., 2000; TEKSIN et al., 2010) o que também foi observado neste trabalho (

Figura 16A).

Os fármacos propranolol (Classe I, SCB), carbamazepina, naproxeno e verapamil (Classe II, SCB), comumente utilizados nos modelos PAMPA, por serem altamente lipofílicos e permearem com facilidade através das membranas lipídicas, apresentaram alta permeabilidade através do modelo PAMPA TGI, variante *Double-sink*, nos três valores de pH testados (

Figura 16B, C e D), exceto o verapamil (Figura 14E), que apresentou uma menor permeabilidade no pH 5, o que pode ser justificado, visto que esse fármaco, está mais ionizado nesse valor de pH. A relação de ionização do fármaco com sua permeabilidade será discutida na pág 79.

Já em relação à furosemida (Classe IV, SCB), essa demonstrou baixa permeação pela barreira lipídica nos valores de pH 6,2 e 7,4, como era esperado. Porém, em pH 5, ela apresentou alta permeabilidade (

Figura 16F), como encontrado em outros estudos (AVDEEF, 2003; AVDEEF, 2005).

Para os fármacos hidroclorotiazida e atenolol, por serem hidrofílicos de baixa permeabilidade (Classe III, SCB), não foi possível calcular seus coeficientes de permeabilidade efetiva, nas condições experimentais utilizadas neste trabalho. Outros estudos, utilizando diferentes variantes dos modelos PAMPA, também não conseguiram obter dados de permeabilidade para esses fármacos (AVDEEF, 2003; GALINIS-LUCIANI D et al., 2007; LIU et al., 2003; MASUNGI et al., 2008).

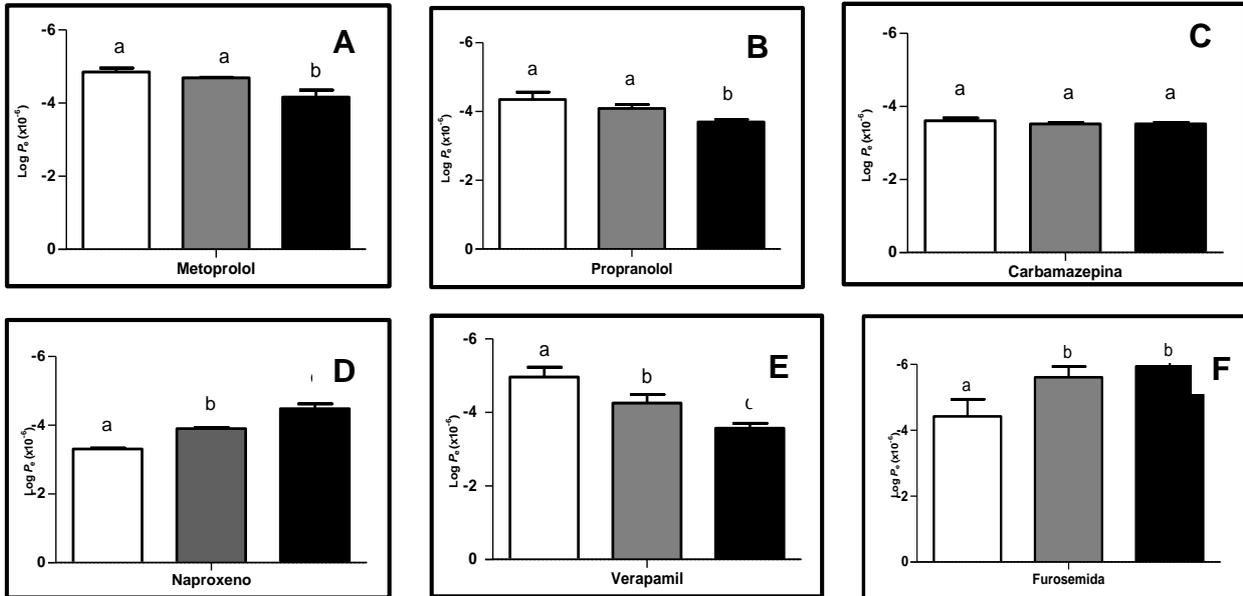


Figura 16: Coeficientes de permeabilidade efetiva ($\text{Log } P_e$) dos fármacos avaliados através do modelo PAMPA TGI, variante *Double-Sink*, em diferentes valores de pH (compartimento doador). pH 5 pH 6,2 pH 7,4. Os dados representam a média de três experimentos independentes (\pm DP). Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA/TUKEY $p < 0,05$).

De modo geral, o comportamento de todos os fármacos avaliados está de acordo com a teoria “Hipótese de partição/pH”, que foi introduzida por Shore e colaboradores (1957) para explicar a influência do pH intestinal na absorção de eletrólitos fracos. Em outras palavras, pode se relacionar essa hipótese com a dificuldade que os fármacos ionizados possuem de permear através de membranas lipídicas, e com isso eles dependem do pH do meio. Em termos gerais, pode-se esperar a absorção de ácidos no estômago e bases no intestino (FLORENCE et al., 2003).

A título ilustrativo, pode-se observar na Figura 17, as correlações obtidas entre os valores dos coeficientes de permeabilidade efetiva ($\text{Log } P_e$) de um fármaco não ionizável (carbamazepina) (Figura 17A), de um fármaco ácido (naproxeno $\text{pKa } 4,32$) (Figura 17B), e de um fármaco básico (verapamil $\text{pKa } 9,07$) (Figura 17C), com os diferentes valores de pH testados. De acordo com esses dados, é possível afirmar que os fármacos naproxeno (pH 7,4) e verapamil (pH 5) estão mais ionizados nesses valores de pH e, por isso, permeiam menos; já a carbamazepina não sofre influência do pH do meio. Esses dados corroboram aqueles encontrados em outros modelos PAMPA

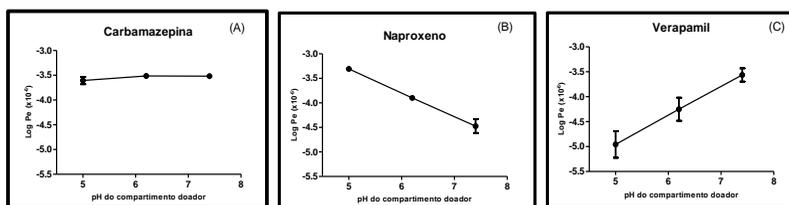


Figura 17: Perfis de permeabilidade dos fármacos carbamazepina (A), naproxeno (B) e verapamil (C) utilizando um gradiente de pH.

Em ensaios PAMPA, Avdeef e colaboradores (2008) alertaram que pode ocorrer uma inversão da “Hipótese de partição/pH”, se os fármacos/compostos não estiverem solúveis no pH selecionado, ou ainda, se a camada aquosa (UWL) presente em ambos os lados da membrana lipídica não for reduzida, acarretando erros na avaliação da permeabilidade.

Ainda de acordo com o estudo de Avdeef e colaboradores (2008), pode-se concluir que os fármacos carbamazepina, verapamil e naproxeno (Classe II do SCB) foram solúveis nos diferentes valores de pH testados, e que a agitação aplicada ao sistema (300rpm) reduziu de forma correta a camada UWL neste trabalho, assim, esses fatores não interferiram na correlação da permeabilidade desses fármacos com a “Hipótese de partição/pH”.

As porcentagens de retenção dos fármacos na membrana lipídica (RM) foram estimadas, uma vez que a RM é considerada um dos fatores que afetam a permeabilidade de compostos lipofílicos (AKAMATSU et al., 2009). A Tabela 5 contém dados físico-químicos e de retenção na membrana lipídica dos fármacos em estudo. Neste sentido, pode-se correlacionar os valores de RM com a lipofilicidade, através de seus valores de Log P. Fármacos lipofílicos, como verapamil e propranolol, apresentaram dados de RM >50%; no entanto, o naproxeno, fármaco de alta lipofilicidade, não apresentou valores de RM significativos (<1%).

Resultados muito similares foram encontrados no estudo de Avdeef (2003), que comparou a RM de 32 fármacos, em diferentes modelos PAMPA. Os modelos que possuíam membranas contendo fosfolipídios de carga negativa (ex. ácido fosfatídico e fosfatidilglicerol) apresentaram valores maiores de RM para fármacos lipofílicos, quando comparados aos resultados obtidos com membranas neutras (ex. DOPC e dodecano). Dados de RM dos fármacos verapamil e propranolol foram respectivamente de $60 \pm 10\%$ e $45 \pm 16\%$, valores muito similares aos observados neste trabalho (verapamil: $63,5 \pm 7\%$ e propranolol: $60,3 \pm 16\%$). Quando esses fármacos foram avaliados em membranas neutras, os valores de RM diminuíram consideravelmente (verapamil 28-39% e propranolol 11-18%).

Para os fármacos carbamazepina (6-11%), naproxeno (4-6%), furosemida (1-2%) e hidroclorotiazida (1-2%) foram encontrados baixos valores de RM, em todos os modelos avaliados, sendo que não foram observadas diferenças de retenção entre as membranas de carga neutra e negativa. Dados semelhantes podem ser observados na Tabela 5 para os fármacos furosemida e hidroclorotiazida.

O fármaco metoprolol ficou 10-15% retido nas membranas lipídicas utilizadas no estudo de Avdeef (2003), diferentemente do que foi observado neste trabalho (Tabela 5). Adicionalmente, a RM do metoprolol poderia ser correlacionada com o seu tempo de contato com a membrana lipídica (4 h), que foi superior aos dos demais fármacos das Classes I e II do SCB (1 h), e não com a sua lipofilicidade (Log P 1,9). O tempo de experimento do metoprolol teve que ser maior, pois ele tem $\text{LogP} < 2$ e apresenta baixa absorção no UV, dificultando as leituras nos compartimentos aceptores, em curtos períodos de tempo (AVDEEF et al., 2007).

Tabela 5: Propriedades físico-químicas e valores percentuais de retenção na membrana lipídica (RM) dos fármacos avaliados através do modelo PAMPA TGI, variante *Double-Sink*, nos valores de pH 5, 6,2 e 7,4 (compartimento doador

| Classe SCB | Fármacos | RM (%) | | | PM* (g/mol) | Log P* | HA* | HD* | pKa* | FA** |
|---------------|-------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------|--------|-----|-----|---------------|------|
| | | pH 5 | pH 6,2 | pH 7,4 | | | | | | |
| I | Propranolol | 52,52 ^b ±1, 32 | 61,56 ^c ± 2,43 | 68,57 ^c ±7,2 3 | 259,34 | 3 | 3 | 2 | 9,50± 0,30 | 99 |
| I | Metoprolol | 32,95 ^d ±5, 53 | 34,84 ^d ± 5,50 | 12,55 ^e ±8,0 1 | 267,36 | 1,9 | 4 | 2 | 9,43± 0,10 | 95 |
| II | Carbamazepina | <1 ^a | <1 ^a | <1 ^a | 236,26 | 2,5 | 1 | 1 | - | 100 |
| II | Naproxeno | <1 ^a | <1 ^a | <1 ^a | 230,25 | 3,3 | 3 | 1 | 4,84± 0,30 | 99 |
| II | Verapamil | 68,28 ^c ±1 2,57 | 61,22 ^c ± 5,36 | 64,04 ^c ±14, 54 | 454,60 | 3,8 | 6 | 0 | 8,97± 0,50 | 95 |
| III | Atenolol | <1 ^a | <1 ^a | <1 ^a | 266,33 | 0,2 | 4 | 3 | 9,43± 0,10 | 65 |
| III | Hidroclorotiazida | <1 ^a | <1 ^a | <1 ^a | 297,73 | -0,1 | 7 | 3 | 4,08± 0,20 | 67 |
| IV | Furosemida | <1 ^a | <1 ^a | <1 ^a | 330,74 | 2 | 7 | 3 | 3,04± 0,36 | 61 |

Os valores de RM representam a média de três experimentos independentes. Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA/TUKEY p<0,05).

SCB: Sistema de Classificação Biofarmacêutica; RM: retenção na membrana; PM: peso molecular; Log P: coeficiente de lipofilicidade; HA: hidrogênios aceptores; HD: hidrogênios doadores; pKa: constante de ionização; FA: fração absorvida em humanos.

*Fonte: Pubchem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

**Fonte: Avdeef (2003).

5.2.1.2 Cardenolídeos

Os dados de permeabilidade, em diferentes valores de pH, dos cardenolídeos avaliados no modelo PAMPA TGI, variante *Double-Sink* encontram-se na Tabela 6, que também contém algumas de suas características físico-químicas.

As agliconas (digitoxigenina, gitoxigenina e 8β -hidroxydigitoxigenina) e os heterosídeos (digitoxigenina monodigitoxosídeo, digitoxigenina bisdigitoxosídeo, digitoxina e β -acetildigitoxina) atravessaram a membrana de lecitina de soja, que mimetiza o TGI. Dentre todos eles, a aglicona digitoxigenina apresentou o maior valor de $\text{Log } P_e$, sendo portanto, o cardenolídeo que mais permeou essa membrana lipídica (ANOVA/TUKEY $p < 0,05$).

Já os heterosídeos (glicoevatromonosídeo, glicogitorosídeo, digoxigenina bisdigitoxosídeo e digoxina), não permearam através desta membrana, o que pode ser explicado pela “Regra de Lipinski” (RL) ou “*Rule of Five*”, que é um conjunto de valores, que classifica os compostos, de acordo com a maior ou menor probabilidade deles serem absorvidos, após administração oral, através da análise de suas propriedades físico-químicas (LIPINSKI et al., 1997). Tal regra tem sido bastante útil na predição da absorção oral de fármacos (KERNS et al., 2008).

Neste trabalho, a violação de três dos quatro enunciados da RL (H aceptores >10 , H doadores >5 e $PM > 500$) pelos heterosídeos testados, (aqueles que não atravessaram a membrana lipídica), foi de suma importância para demonstrar a aplicabilidade da variante *Double-Sink*.

No entanto, a digitoxina foi o único heterosídeo que infringiu três enunciados da RL e permeou através da membrana lipídica. Uma das explicações para a passagem deste composto pela membrana seria sua alta lipofilicidade ($\text{Log } P$ 2,44), quando comparada às dos outros heterosídeos, que também infringem três enunciados da RL. Esse composto apresentou os menores coeficientes de permeabilidade dentre todos os compostos testados, nos três valores de pH.

Tabela 6: Coeficientes de permeabilidade efetiva ($\text{Log } P_e$) dos cardenolídeos testados através do modelo PAMPA TGI, variante *Double-Sink*, em diferentes valores de pH (compartimento doador).

| CARDENOLÍDEOS | | Log P_e ($\times 10^{-6}$ cm/s) | | | PM | Log P^* | HA | HD | RL |
|---------------|----------------------------------|------------------------------------|------------|------------|--------|-----------|----|----|----|
| | | pH5 | pH6,2 | pH7,4 | | | | | |
| 1 | Digitoxigenina | -3,86±0,11 | -3,93±0,08 | -3,88±0,09 | 374,51 | 2,79±0,46 | 4 | 2 | 0 |
| 2 | Gitoxigenina | -4,38±0,12 | -4,35±0,10 | -4,34±0,15 | 390,51 | 1,58±0,48 | 5 | 3 | 0 |
| 3 | 8β-hidroxdigitoxigenina | -4,99±0,08 | -4,90±0,04 | -5,09±0,07 | 390,51 | 1,59±0,5 | 5 | 3 | 0 |
| 4 | Digitoxigenina monodigitoxosídeo | -4,32±0,01 | -4,32±0,07 | -4,33±0,03 | 504,66 | 2,66±0,61 | 7 | 3 | 1 |
| 5 | Digitoxigenina bisdigitoxosídeo | -4,57±0,08 | -4,52±0,04 | -4,56±0,12 | 634,79 | 2,55±0,72 | 10 | 4 | 2 |
| 6 | Glicoevatromonosídeo | NP | NP | NP | 666,81 | 0,4±0,60 | 12 | 6 | 3 |
| 7 | Glicogitorosídeo | NP | NP | NP | 682,81 | - | 13 | 7 | 3 |
| 8 | Digoxigenina bisdigitoxosídeo | NP | NP | NP | 650,79 | 0,96±0,75 | 11 | 5 | 3 |
| 9 | Digitoxina | -5,39±0,28 | -5,22±0,08 | -5,26±0,02 | 764,94 | 2,44±0,84 | 13 | 5 | 3 |
| 10 | β-acetildigitoxina | -4,67±0,08 | -4,88±0,10 | -5,20±0,35 | 806,97 | 2,94±0,80 | 14 | 4 | 2 |
| 11 | Digoxina | NP | NP | NP | 780,94 | 1,3±0,5 | 14 | 6 | 3 |
| 12 | Desacetil Lanatosídeo C | NP | NP | NP | 943,07 | 1,40±0,83 | 19 | 9 | 3 |

Os dados representam a média de três experimentos independentes.

*Cálculos de Log P foram produzidos com o software ACD/ChemSketch vs. 12 por Dr. Rodrigo Pádua.

NP: não permeou, ou não permeou em quantidade suficiente para ser detectado; PM: peso molecular; Log P : coeficiente de lipofilicidade; HA: hidrogênios aceptores; HD: hidrogênios doadores; RL: número de parâmetros infringidos da Regra de Lipinski.

Adicionalmente, as características físico-químicas dos fármacos e compostos, apresentados nas Tabelas 5 e 6, são de grande relevância quando se trata da permeabilidade intestinal, conforme mencionado nesse item (relação dos parâmetros físico-químicos com a infração da Regra de Lipinski).

Os números de H-doadores e aceptores são de suma importância devido à formação de ligações de hidrogênio dos fármacos/compostos, com os oxigênios dos grupos cabeça dos fosfolípidios da membrana usada no modelo PAMPA TGI, variante *Double-Sink*. Essa interação pode aumentar a permeabilidade ou reter o fármaco/composto na fase lipídica, dependendo das forças negativas ou positivas de interação, já que a membrana possui uma carga negativa superior (TULP et al., 2009).

Outro parâmetro reconhecidamente importante é a lipofilicidade, conforme demonstrado na

Figura 18. Os fármacos e compostos com valores de $\text{Log } P < 1,4$, obtidos no modelo PAMPA TGI, variante *Double-Sink*, não atravessaram a membrana lipídica. Através de uma correlação entre os dados obtidos de $\text{Log } P_e \times \text{Log } P$ (coeficientes de permeabilidade \times coeficiente de lipofilicidade), foi possível calcular o valor $R^2 = 0,6466$, para o ensaio PAMPA TGI, variante *Double-Sink*, que indicou que o aumento da lipofilicidade está correlacionado com o aumento da permeabilidade neste modelo.

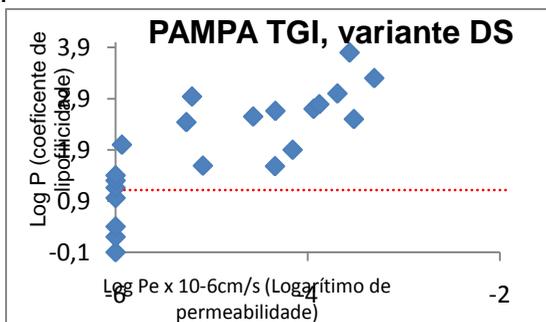


Figura 18: Efeito da lipofilicidade na permeabilidade dos fármacos/compostos avaliados no modelo PAMPA TGI, variante *Double-Sink*.

As amostras testadas não apresentaram altos índices de RM (dados não mostrados), exceto a digoxina, que, surpreendentemente, ficou retida na membrana lipídica em níveis superiores a 40%, dependendo do pH do meio (pH 5 - 57,3%; pH 6,2 - 43,0%; pH 7,4 - 55,1%) (Figura 19). Sabe-se que a retenção nas membranas está associada à lipofilicidade dos compostos, e a digoxina é um cardenolídeo com baixo coeficiente de lipofilicidade (Log P 1,3).

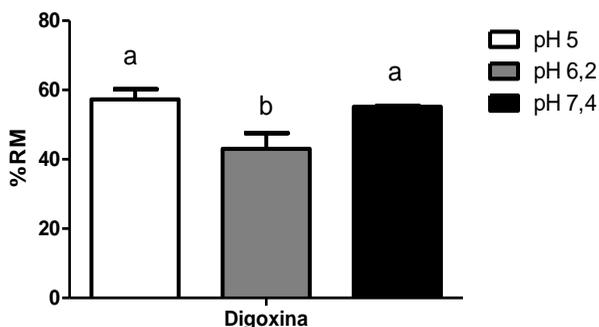


Figura 19: Retenção da digoxina na membrana lipídica do modelo PAMPA TGI, variante *Double-Sink*. Os valores estão expressos em porcentagem, e representam a média de três experimentos independentes. Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significantes (ANOVA/TUKEY $p < 0,05$).

Ainda com relação à digoxina, Richter e colaboradores (2009) avaliara sua permeabilidade através da variante PAMPA HDM, que também mimetiza a permeabilidade intestinal. Nesse experimento, a digoxina demonstrou baixa permeabilidade (P_{app} $0,62 \times 10^{-6}$ cm/s), pois os autores classificaram os compostos testados com valores de $P_{app} < 5 \times 10^{-6}$ cm/s como sendo de baixa permeabilidade. É importante ressaltar que eles não relataram o tempo de incubação de cada fármaco; eles apenas citaram que a incubação durou de 5 a 96h, dependendo do fluxo de cada fármaco através da membrana lipídica. Não obstante,

sabe-se que fluxos superiores a 20 h não são aconselhados (AVDEEF, 2003).

No presente trabalho, o maior tempo de incubação foi de 15 h e, neste período, não foi possível calcular o coeficiente de permeabilidade da digoxina.

Sabe-se que a absorção intestinal da digoxina ocorre, principalmente, por transporte ativo, através da ligação com a glicoproteína P (Pgp), mas também, em menor grau, pela via transcelular (transporte passivo) (AIBA et al., 2005; SUGANO et al., 2010). No entanto, neste trabalho, não foi possível observar a passagem desse composto pela membrana lipídica. Algumas de suas propriedades, como baixa lipofilicidade e solubilidade, podem ter interferido nesta determinação.

5.2.1.3 Galato de pentila

O galato de pentila (GP) apresentou alta permeabilidade no modelo PAMPA TGI, variante *Double-Sink*, cujos dados estão representados na Figura 20A. De acordo com a análise estatística realizada, não houve diferenças significativas de permeabilidade, nos três valores de pH avaliados (ANOVA/TUKEY $p < 0,05$). A correlação do Log P_e do GP com a infração da Regra de Lipinski é positiva, visto que o composto não infringiu enunciado algum e apresentou alta permeabilidade.

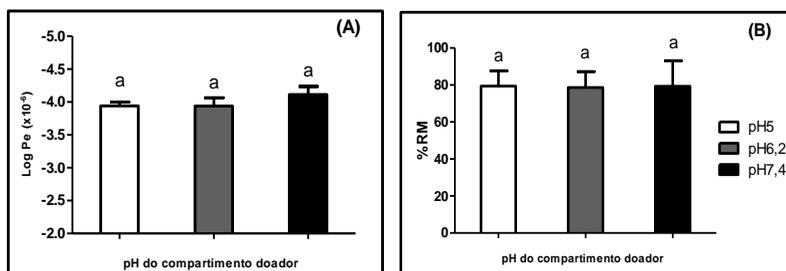


Figura 20: (A) Coeficientes de permeabilidade efetiva (Log P_e) do galato de pentila obtidos através do modelo PAMPA TGI, variante *Double-Sink*, em diferentes valores de pH (compartimento doador). (B) Dados de retenção do galato de pentila (%) na membrana lipídica no mesmo modelo. Os dados representam a média de três experimentos independentes. Letras diferentes referem-se a diferenças estatísticas significativas (ANOVA/TUKEY $p < 0,05$).

A retenção do GP na membrana lipídica foi em torno de 80%, nos três valores de pH testados (Figura 20B), demonstrando a capacidade que os grupamentos hidroxilas têm de se ligar aos fosfolipídios presentes na membrana lipídica. Dados semelhantes foram encontrados por Tammela e colaboradores (2004) e Ollila e colaboradores (2002), que demonstraram a retenção de alguns alquil galatos em membranas fosfolipídicas. Além disso, ambos os grupos correlacionaram os graus de retenção com o número de grupos hidroxilas dos compostos testados que interagem com a membrana.

Tammella e colaboradores (2004) avaliaram a permeabilidade intestinal de alquil galatos, através de células Caco-2. Os galatos de metila (GM), propila (GPR) e octila (GO) demonstraram um forte grau de afinidade com a membrana celular, e os resultados sugerem que, quanto maior a cadeia alquílica, maior a afinidade com os fosfolipídios, levando à diminuição da capacidade de penetrar a monocamada celular. Neste trabalho, o GO não conseguiu penetrar a monocamada celular e, em apenas 60 min, sua concentração no compartimento apical foi reduzida em 96%; para os GM e GPR, a redução de suas concentrações no compartimento apical foi mais lenta e muito similar (54 e 51%, respectivamente).

Ollila e colaboradores (2002) realizaram estudos de interação do GPR com o lipídio dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), através da cromatografia de membrana artificial não-covalente imobilizada, demonstrando um grau de afinidade moderado (21%) com o DPPC. A retenção observada ocorreu devido à formação de ligações de hidrogênio entre o GPR e os grupos polares das moléculas de lipídios na interface lipídeo/água.

O conjunto destes dados sugere um grau de retenção dos galatos, que varia de moderado a alto, nas diferentes membranas avaliadas. O GP (80% de RM) possui uma cadeia alquílica intermediária, quando comparado às dos alquil galatos testados por Tamella et al. (2004). Ainda que incipiente, a avaliação conjunta destes dados e dos aqui obtidos, pode sugerir que, conforme aumenta o número de átomos de carbono da

cadeia alquílica dos galatos, observa-se uma maior retenção dos mesmos nas membranas lipídicas.

5.2.2 Modelo PAMPA Pele

5.2.2.1 Fármacos

A Figura 21 apresenta os coeficientes de permeabilidade efetiva ($\text{Log } P_e$) dos fármacos para os quais foi possível calculá-los, usando o modelo PAMPA Pele. Os fármacos propranolol (Figura 21 A) e verapamil (Figura 21 D) só permearam no pH básico (pH 10). A furosemida (Figura 21 E) permeou nas condições de pH 2 e pH 5. A carbamazepina (Figura 21 B) permeou igualmente nas três situações testadas, assim como no modelo PAMPA TGI, variante *Double-sink*, o que corrobora a “Hipótese da partição/pH”, já que esse fármaco não ioniza, e não depende de um gradiente de pH.

O coeficiente de permeabilidade do naproxeno em pH 2 não pode ser calculado, devido à insolubilidade do mesmo neste pH, conforme já havia sido detectado quando da validação do método (pág. 69). O naproxeno apresentou um alto coeficiente de permeabilidade em pH 5 e não permeou em pH 10 (Figura 21 C).

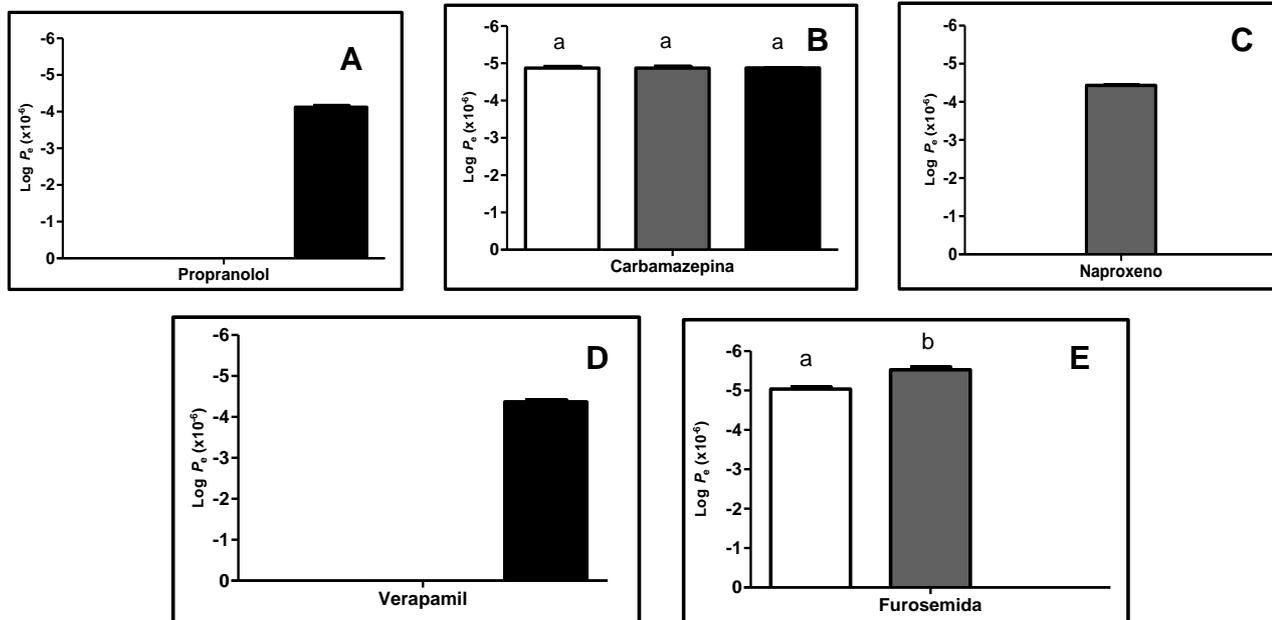


Figura 21: Coeficientes de permeabilidade efetiva ($\text{Log } P_e$) dos fármacos analisados, obtidos através do modelo PAMPA Pele, em diferentes valores de pH (compartimento doador) pH 2 pH 5 pH 10. Os dados representam a média de três experimentos independentes \pm DP. Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA/TUKEY $p < 0,05$).

Sinko e colaboradores (2009) avaliaram a permeabilidade do verapamil, utilizando a variante certramidas do modelo PAMPA Pele, e conseguiram calcular seus coeficientes de permeabilidade em pH 5,5 ($\text{Log } P_e -5,51\text{cm/s}$), o que não foi possível neste trabalho. O verapamil permeou apenas no pH 10. Esses dois modelos mimetizam a camada do estrato córneo da pele, porém as diferenças na composição das membranas lipídicas podem ter causado a variação desses dados. A membrana que possui certramidas apresenta uma característica mais polar do que a membrana OS/MI (óleo de silicone/miristato de isopropila), o que facilitou a permeação desse fármaco (a correlação entre as diferenças na composição da camada lipídica e entre a permeabilidade dos compostos será discutida na página 90).

Os fármacos hidroclorotiazida, atenolol e metoprolol não permearam através da fase lipídica OS/MI, ou não foram detectados no compartimento acceptor. No trabalho descrito por Ottaviani e colaboradores (2006) o fármaco atenolol não permeou através desta membrana, já os fármacos hidroclorotiazida e metoprolol não foram por eles avaliados.

O conjunto desses dados permite concluir que os fármacos avaliados no modelo PAMPA Pele possuem maior dificuldade em penetrar a membrana lipídica OS/MI por apresentarem uma natureza mais apolar, do que no modelo PAMPA TGI, variante *Double-Sink*. Portanto, faz-se necessário utilizar uma ampla faixa de pH para garantir que fármacos ácidos e básicos possam ser mensurados de forma adequada, já que fármacos ionizados apresentaram maior dificuldade em fornecer dados para calcular os coeficientes de permeabilidade neste modelo.

Ainda, com relação aos fármacos hidroclorotiazida e atenolol, que não permearam neste modelo, nem no PAMPA TGI, variante *Double-Sink*, pode-se discutir os fatores que podem ter afetado as condições experimentais que poderiam ter levado à esses resultados.

Primeiramente a insolubilidade desses fármacos pode induzir a erro, caso eles tivessem precipitado no compartimento doador; porém, isso foi verificado através dos dados disponíveis no programa SciFinder Scholar™ 2007, e nas concentrações

experimentais utilizadas nos diferentes valores de pH (2; 5; 6,2; 7,4 e 10) estes fármacos estavam devidamente solúveis para realização do experimento.

Outro fator a ser considerado foi o tempo de experimento de 15 h que é aconselhável para compostos com $\text{Log } P < 2$; foram realizadas leituras até 24 h após a formação do sanduíche, e não foi obtida concentração alguma detectável destes dois fármacos nas cavidades receptoras.

Ainda pode-se citar a baixa sensibilidade de detecção no espectrofotômetro de UV, no caso de baixíssimas concentrações no compartimento acceptor, principalmente para atenolol, que possui baixa absorção no UV (LQ 109,3 μM). No entanto, não foram realizadas leituras desses fármacos em outro equipamento analítico, com maior sensibilidade, e dessa forma detectar concentrações menores no compartimento acceptor (AVDEEF, 2005).

Por fim, a utilização de filtros hidrofóbicos, pode ter sido uma desvantagem neste estudo, já que essa condição tende a dificultar a permeabilidade de fármacos hidrofílicos, como é o caso do atenolol e da hidroclorotiazida, subestimando a permeabilidade e fornecendo resultados falso-negativos para esses fármacos (ZHU et al., 2002)

Com relação ao metoprolol, como foi discutido no item 5.2.1.1, este fármaco apresenta valores de permeabilidade bastante influenciados pela composição da fase lipídica, sendo que membranas neutras, como a lecitina de ovo e a membrana OS/MI, fazem com que ele apresente baixa permeabilidade (AVDEEF et al., 2006; SEO et al., 2006). As diferenças na permeabilidade do metoprolol através das membranas do PAMPA TGI, variante *Double-Sink* (20% de fosfolipídios) e PAMPA Pele (0% de fosfolipídios) podem ser comparadas analisando-se a correlação realizada por Avdeef e Tsinman (2006), onde com a variante *Double-Sink* (20% de fosfolipídios), obteve-se dados de permeabilidade 1000 vezes maiores do que com a variante HDM (0% de fosfolipídios). Esse dado pode ser justificado pela natureza mais polar da membrana com maior teor de fosfolipídios. As interações dipolo são mais negativas no sistema PAMPA HDM, similares aos do modelo PAMPA Pele, coerentes com seu caráter apolar.

Resumidamente, o solvente aquoso solubiliza moléculas polares, especialmente *zwitterions*⁴, formando fortes pontes de hidrogênio com o solvente. Tais moléculas necessitam quebrar essas ligações, a fim de entrar na membrana do PAMPA Pele (fase que apresenta apenas solventes orgânicos), e representa uma fonte menor de ligações de hidrogênio do que no PAMPA TGI, variante *Double-Sink* Assim, mais energia pode ser necessária para uma molécula polar penetrar na barreira do PAMPA Pele, em comparação com uma barreira que possui fortes interações de ligação com o fármaco. O teor de 20% de fosfolípidios facilita o processo de permeação, oferecendo uma fonte de compensação de ligações hidrogênio na membrana lipídica (TAM et al., 2010).

5.2.2.2 Cardenólídeos

Os dados de permeabilidade dos cardenólídeos avaliados no modelo PAMPA Pele estão disponíveis na Tabela 7.

⁴ Composto químico eletricamente neutro, que possui cargas opostas em diferentes átomos.

Tabela 7: Coeficientes de permeabilidade efetiva ($\text{Log } P_e$) dos cardenólídeos avaliados através do modelo PAMPA Pele, em diferentes valores de pH (compartimento doador).

| CARDENOLÍDEOS | | $\text{Log } P_e \text{ (x } 10^{-6} \text{ cm/s)}$ | | |
|---------------|----------------------------------|---|-------------|------------|
| | | pH 2 | pH 5 | pH 10 |
| 1 | Digitoxigenina | -4,90±0,04 | -4,92±0,05 | -4,96±0,03 |
| 2 | Gitoxigenina | -5,61±0,30 | -5,73±0,11 | -6,00±0,19 |
| 3 | 8β-hidroxicigitoxigenina | NP | NP | NP |
| 4 | Digitoxigenina monodigitoxosídeo | -5,49±0,12 | -5,65±0,001 | -5,81±0,11 |
| 5 | Digitoxigenina bisdigitoxosídeo | NP | NP | NP |
| 6 | Glicoevatromonosídeo | NP | NP | NP |
| 7 | Glicogitorosídeo | NP | NP | NP |
| 8 | Digoxigenina bisdigitoxosídeo | NP | NP | NP |
| 9 | Digitoxina | NP | NP | NP |
| 10 | β-acetildigitoxina | NP | NP | NP |
| 11 | Digoxina | NP | NP | NP |
| 12 | Desacetil lanatosídeo C | NP | NP | NP |

Os dados representam a média de três experimentos independentes ±DP

NP: Não permeou, ou não permeou em quantidade suficiente para ser detectado.

Os cardenolídeos, gitoxigenina e digitoxigenina monodigitoxosídeo, apresentaram baixa permeabilidade através dessa membrana lipídica ($\text{Log } P_e$ maiores que $-5,3 \times 10^{-6} \text{cm/s}$). A digitoxigenina foi o único cardenolídeo que apresentou alta permeabilidade através da membrana que mimetiza a pele, e seu coeficiente de permeabilidade ($-4,93 \times 10^{-6} \text{cm/s}$ = média dos três pHs avaliados), pôde ser comparado aos da carbamazepina ($-4,86 \times 10^{-6} \text{cm/s}$ = média dos três pHs avaliados), fármaco de alta permeabilidade. Porém, pela classificação de Ottaviani, Martel e Carrupt (2006) (Tabela 8, item 5.2.2.4) tal composto foi considerado como sendo de baixa permeabilidade. Portanto, para aferir a classificação correta para esse composto, outros modelos de permeabilidade devem ser utilizados, como por exemplo, o modelo da câmara de Franz, que utiliza pele de animais, geralmente de suínos para realizar os experimentos de permeação.

Poucos estudos referentes à permeabilidade de cardenolídeos através da pele foram encontrados na literatura. Cairncross e Ackermann (1985) realizaram estudos preliminares com a digoxina através da pele de camundongos e da pele humana, e concluíram que a absorção percutânea *in vitro* da digoxina foi promissora e poderia-se desenvolver uma terapia clinicamente eficaz pela via transdérmica.

Em estudo posterior, o coeficiente de permeabilidade da digoxina, através da pele de camundongos, foi 36 vezes menor do que o encontrado por Cairncross e Ackermann (1985) como o coeficiente de permeabilidade obtido indicou baixa permeabilidade transdérmica, os autores sugeriram, a adição de promotores de penetração cutânea (MACHET et al., 1991).

Recentemente, uma patente depositada por Hartley (2008), descreveu algumas formulações tópicas em gel para o tratamento de infecções virais, contendo digoxina e/ou furosemida. Os efeitos antivirais da digoxina frente a vírus herpéticos foram promissores e, através de estudos de permeabilidade cutânea, em células de Franz, para as diferentes formulações desenvolvidas, foi possível selecionar a melhor formulação, chamada de Max Gel Digoxina (propilenoglicol, etanol e água, 50:40:10) pois sabe-se que estes compostos possuem baixa absorção transepidérmica, e necessitam de

promotores de permeação, como descrito por Machet e colaboradores (1991).

É importante destacar que a permeabilidade dos cardenólídeos pode ser afetada pelas suas propriedades físico-químicas, tais como, lipofilicidade e o peso molecular (PM). O PM parece ter sido um dos fatores limitantes para a permeabilidade dos cardenólídeos através do modelo PAMPA Pele. Os compostos com alto PM (>505) não permearam através deste modelo, o que não foi observado no modelo PAMPA TGI, variante *Double-Sink* (Tabela 6). Dados semelhantes foram obtidos no estudo de Avdeef e Tsinman (2006), quando grandes moléculas permearam mais facilmente a membrana do modelo PAMPA TGI, variante *Double-Sink*, em comparação a outros modelos testados (OTTAVIANI et al., 2007).

Os cardenólídeos que não atravessaram a barreira lipídica no PAMPA Pele, não apresentaram valores de RM significativos (>1%) (dados não mostrados).

O conjunto desses dados sugere que os cardenólídeos avaliados nesse modelo, assim como os fármacos discutidos no item 5.2.2.1, possuem maior dificuldade em penetrar a membrana lipídica OS/MI, do que no modelo PAMPA TGI, variante *Double-Sink*, o que pode ser observado nas tabelas 6 e 7, que contém os coeficientes de permeabilidade obtidos para os cardenólídeos nos dois modelos PAMPA, e verificar o menor grau de permeação desses compostos no PAMPA Pele.

5.2.2.3 Galato de pentila

Os coeficientes de permeabilidade efetiva do galato de pentila estão representados na Figura 22, onde pode-se constatar que ele apresentou alta permeabilidade através da membrana que mimetiza a pele humana, assim como aconteceu no modelo PAMPA TGI, variante *Double-Sink*. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os valores de pH 2 e 5, sendo que os coeficientes de permeabilidade foram superiores aos dos fármacos de alta permeabilidade, tais como carbamazepina (pH 2 e 5) e naproxeno (pH 5).

Neste ensaio, o GP não ficou retido na membrana (%RM<1), diferentemente do que aconteceu no modelo PAMPA TGI, variante *Double-Sink*, quando o composto ficou ~80% retido. Isto pode ter ocorrido devido à presença dos fosfolipídios da membrana lipídica dessa variante, cujos grupamentos hidroxilas interagiram com os grupos hidroxilas do GP, sendo que essa interação poderia ser a responsável pela alta retenção encontrada. No modelo PAMPA Pele, tal interação não ocorreu devido à ausência destes grupamentos nos componentes da membrana artificial (óleo de silicone e miristato de isopropila).

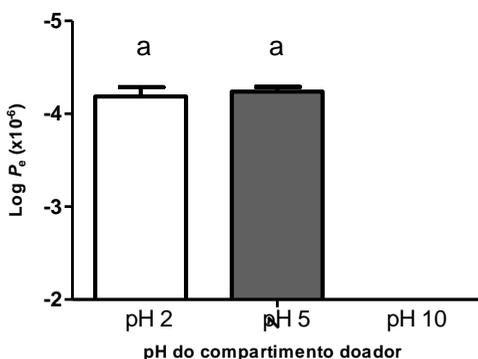


Figura 22: Coeficientes de permeabilidade efetiva ($\text{Log } P_e$) do galato de pentila, obtidos no modelo PAMPA Pele, em diferentes valores de pH (compartimento doador). Os dados representam a média de três experimentos independentes \pm DP. Letras diferentes significam diferenças estatísticas significativas (ANOVA/TUKEY, $p < 0,05$)

Tendo em vista os resultados obtidos, tanto no modelo PAMPA TGI, variante *Double-Sink*, como no modelo PAMPA Pele, e os obtidos por Kratz et al. (2008a,b) relativos à potencial atividade anti-HSV-1 e anti-HSV-2 do GP, pode-se concluir que este composto é um bom candidato para o desenvolvimento de formas farmacêuticas a serem testados como potenciais agentes anti-herpéticos. Kratz (2011) e Kelmann (2011) estão realizando seus doutoramentos com este objetivo. O primeiro autor complexou o GP com diferentes ciclodextrinas (ciclodextrinas originais (alfa, beta e gama) e ciclodextrinas modificadas (hidroxipropilbeta e metilbeta)), para aumentar a solubilidade

desse composto, o que foi obtido em maior grau utilizando as ciclodextrinas modificadas, especialmente a hidroxipropilbeta ciclodextrina. Para avaliar se a complexação desse composto também influenciaria nas suas atividades biológicas, foi analisada a citotoxicidade do GP e do GP complexado, em células Vero e GMK, e também a atividade antiviral frente aos vírus HSV-1 (cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333). Os resultados mostraram que não houve aumento da toxicidade e também não houve melhora da atividade antiviral.

A segunda autora está realizando a incorporação do GP em nanoemulsões lipídicas visando especificamente o preparo de formas farmacêuticas tópicas para o tratamento de manifestações herpéticas em pele e mucosas, os resultados obtidos ainda são preliminares.

5.2.2.4 Classificação da permeabilidade cutânea através do cálculo $CA_{(t)}/CD_{(0)}$

Geralmente, os resultados obtidos nos modelos PAMPA são expressos como coeficientes de permeabilidade efetiva ($\log P_e$ ou P_e). No entanto, para categorizar a classificação de permeabilidade do modelo PAMPA Pele, como descrito por Ottaviani e colaboradores (2006), os compostos devem ser inicialmente agrupados de acordo com os valores experimentais de retenção na membrana (%RM) e de permeabilidade [$\%CA_{(t)}/CD_{(0)}$ (Concentração aceptora no tempo t/ concentração doadora no tempo 0)], que constam na Tabela 8.

A partir destes dados e segundo estes autores, três classes foram sugeridas:

- CLASSE I (CI) – Baixa permeabilidade ($\%CA_{(t)}/CD_{(0)} < 20\%$ e valores de RM negligenciáveis);
- CLASSE II (CII)- Alta permeabilidade ($\%CA_{(t)}/CD_{(0)} > 20\%$ e $\%RM < 23\%$);
- CLASSE III (CIII)- Permeantes com alta retenção na membrana ($\%RM > 23\%$)

Tabela 8: Percentuais de permeabilidade dos fármacos/compostos avaliados no modelo PAMPA Pele, expressos através da relação $CA_{(t)}/CD_{(0)}$ e dos valores de retenção na membrana (RM).

| Classe* | Fármacos/ Compostos | $CA_{(t)}/CD_{(0)}$ (%) | RM (%) |
|---------|-------------------------------------|----------------------------|------------|
| CI | Digitoxigenina | 16,43 ±3,47 | <1 |
| | Gitoxigenina | 4,18±1,34 | 7,43±2,22 |
| | Digitoxigenina monodigitoxosídeo | 6,50±1,24 | 5,25±0,72 |
| CII | Carbamazepina | 22,7±2,12 | <1 |
| | Naproxeno | 48,36± 1,65 | <1 |
| | Propranolol | 56,17±0,01 | <1 |
| | Verapamil | 40,30 ±2,99 | <1 |
| | Galato de Pentila | 44,81 ± 1,10 | <1 |
| CIII | Furosemida | 10,39±0,85 | 24,64±3,02 |

Os dados representam a média de três experimentos independentes, ±DP. CA: concentração aceptora; CD: concentração doadora; RM: retenção na membrana.

*Segundo Ottaviani et al. (2006).

Os fármacos carbamazepina, naproxeno, propranolol, verapamil e o composto galato de pentila foram agrupados como sendo de Classe II (alta permeabilidade através da camada do estrato córneo). Já os três cardenólídeos testados foram enquadrados na Classe I (baixa permeabilidade). A furosemida foi o único fármaco de classe III, devido à sua retenção na membrana lipídica ter sido >23%.

No estudo de Ottaviani e colaboradores (2006), os valores percentuais de $CA_{(t)}/CD_{(0)}$ (%) dos fármacos propranolol e naproxeno foram similares, (respectivamente 43,4±1,5% e 37,2±1,0%), aos encontrados neste trabalho. No entanto, a RM do naproxeno por eles obtida (23,1%) o incorporou a CIII, diferentemente do que foi observado neste trabalho, onde ele foi classificado como CII, por não apresentar uma retenção expressiva na membrana lipídica (<1%). A alta lipofilicidade desse fármaco indicaria sua possível retenção na membrana

lipídica, porém, como foi observado no modelo PAMPA TGI, variante *Double-sink* (pág.80) e conforme descrito por outro autor, a RM desse fármaco pode não ocorrer (AVDEEF, 2003).

Esta classificação indica que os cardenólídeos incorporados à Classe I apresentam maior dificuldade para atravessar a membrana lipídica no modelo PAMPA Pele do que os fármacos (SCB) testados e o galato de pentila (CII), que apresentaram alta permeabilidade através da mesma.

5.3 Avaliação da integridade das membranas lipídicas

Após a conclusão dos experimentos de permeabilidade, foi determinada a integridade das membranas lipídicas, utilizando dois marcadores de baixa permeabilidade.

O corante *Lucifer Yellow* (LY) foi rejeitado pela membrana lipídica, apresentando valores de fluorescência aceitáveis no compartimento acceptor. Como pode ser observado na Figura 23, houve uma passagem maior do LY através da membrana que mimetiza a pele humana, quando comparado ao observado na membrana usada no modelo PAMPA TGI, variante *Double-Sink*. No entanto, esses valores não ultrapassaram em três vezes a fluorescência do branco, conforme estipulado no protocolo utilizado (MILLIPORE, 2005). O LY é transportado pela via paracelular e, por este motivo, os resultados obtidos eram esperados e demonstraram a integridade das membranas, visto que os modelos PAMPA mimetizam o transporte de fármacos pela via passiva transcellular e, por isso, deve ocorrer a completa rejeição deste marcador (KONSOULA et al., 2005; MILLIPORE, 2005).

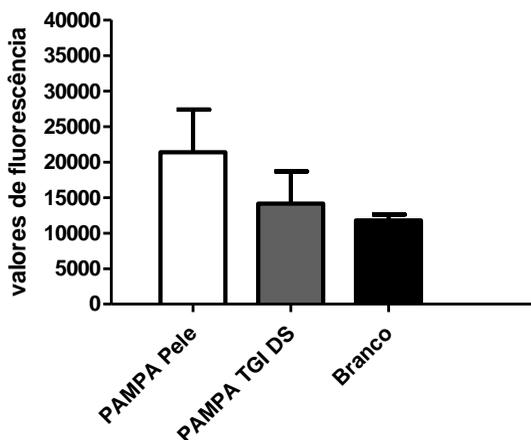


Figura 23: Valores de fluorescência do corante *Lucifer Yellow*, medidos após os experimentos dos modelos PAMPA Pele e PAMPA TGI, variante *Double-Sink*. Os dados representam a média de cinco experimentos independentes \pm DP.

Como pode ser observado na Figura 24, o corante azul de crescil brilhante (ACB) apresentou baixos índices de permeação pela membrana lipídica, após os experimentos PAMPA Pele, e os valores de absorvância ficaram dentro dos limites estipulados pelo protocolo utilizado (0,002 a 0,006 UA) (MILLIPORE, 2005). No entanto, na avaliação da integridade da membrana lipídica do modelo PAMPA TGI, variante *Double-Sink*, os valores de absorvância do ACB foram superiores aos estipulados pelo protocolo ($>0,012$ UA). Essa diferença pode ser explicada, visto que ele é um composto de baixa permeabilidade, mas exibe um comportamento diferente para cada membrana lipídica. É importante ressaltar que o protocolo da Millipore (2005) utiliza a DOPC como fase lipídica e, no presente trabalho, outras duas membranas diferentes foram utilizadas. Uma dessas barreiras continha lecitina de soja e a outra dois solventes orgânicos (óleo de silicone e miristato de isopropila), a aplicação desses dois modelos possibilitou observar diferentes valores de permeabilidade dos fármacos e compostos avaliados para cada membrana (ver itens 5.2.1 e 5.2.2), essa diferença se da possivelmente pela natureza de cada barreira lipídica utilizada

(polaridade da membrana, ver pág. 90). Assim, se forem consideradas as diferenças de permeabilidade observadas, espera-se que o ACB, obtenha uma maior permeação pela membrana lipídica de lecitina de soja, e menores valores de permeabilidade na membrana OS/MI, como pode ser observado na Figura 21. Portanto, mesmo que os valores de absorvância do ACB para o modelo TGI, variante *Double-sink* não ficaram dentro dos limites estipulados pelo protocolo ($<0,012$ UA) esses dados foram considerados.

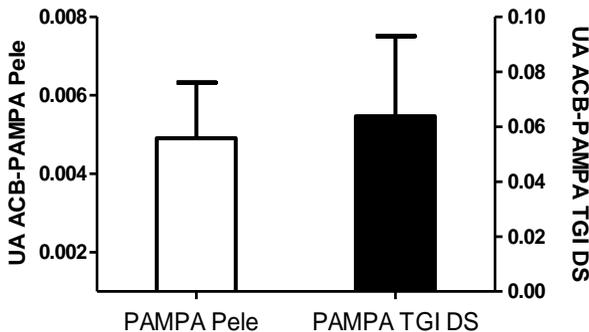


Figura 24: Unidades de Absorvância (UA) do corante azul de cresil brilhante (ACB), medidas após os experimentos dos modelos PAMPA Pele e PAMPA TGI, variante *Double-Sink*. Os dados representam a média de cinco experimentos independentes \pm DP.

Na avaliação da integridade das membranas lipídicas não foram mensuradas as concentrações doadoras iniciais e finais dos marcadores ACB e LY. Desta forma, não foi possível calcular os coeficientes de permeabilidade ($\text{Log } P_e \times 10^{-6} \text{ cm/s}$) para esses corantes, nem compará-los com os obtidos para os fármacos/compostos de baixa permeabilidade. Os resultados dos experimentos, nos quais o LY obteve valores de fluorescência três vezes maiores que a fluorescência do branco no compartimento aceptor, e o ACB obteve valores de absorvância superiores a 0,1, foram excluídos dos cálculos realizados.

6. CONCLUSÕES

- Foram desenvolvidas e validadas metodologias para o doseamento no UV de alguns fármacos do SCB, do composto galato de pentila e dos cardenolídeos utilizados na avaliação e adequação do ensaio de permeabilidade PAMPA. Os métodos apresentaram a confiabilidade requerida para um método analítico, sendo específicos, lineares, precisos e exatos, além de ser uma alternativa rápida, segura e de baixo custo.
- O galato de pentila em pH 10 e o naproxeno em pH 2 não atenderam às exigências necessárias da validação analítica por espectrofotometria no UV, e foram excluídos deste trabalho.
- Os modelos de permeabilidade *in vitro* PAMPA TGI, variante *Double-Sink* e PAMPA Pele foram implementados e validados no Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC, tendo sido possível calcular os coeficientes de permeabilidade efetiva ($\text{Log } P_e$) para os fármacos/compostos avaliados nos dois modelos.
- A aplicação do modelo PAMPA TGI, variante *Double-Sink* permitiu diferenciar corretamente os fármacos selecionados de alta e baixa permeabilidade, de acordo com o SCB, apesar de terem ocorrido algumas dificuldades para gerar os dados dos fármacos hidrofílicos. Os compostos galato de pentila e digitoxigenina mostraram alta permeabilidade, já os demais cardenolídeos apresentaram baixa permeabilidade.
- Os fármacos verapamil e propranolol e o composto galato de pentila apresentaram alta retenção na membrana lipídica no modelo PAMPA TGI, variante *Double-Sink*, mas mesmo assim os mesmos demonstraram alta permeabilidade.

- Ainda para o modelo PAMPA TGI, variante *Double-Sink*, foi possível correlacionar os dados de permeabilidade com as propriedades físico-químicas dos fármacos e compostos testados. Essas características, principalmente a lipofilicidade, têm grande influência na permeabilidade, o que foi confirmado neste estudo.
- Na avaliação da permeabilidade através do modelo PAMPA Pele, os fármacos carbamazepina, naproxeno, propranolol e verapamil atravessaram a membrana lipídica, e demonstraram alta permeabilidade. O fármaco furosemida apresentou baixa permeabilidade através da pele. Os fármacos atenolol, hidrocortizida e metoprolol não permearam através desta membrana.
- Apenas alguns cardenólídeos permearam através da membrana no modelo PAMPA Pele, e o galato de pentila apresentou alta permeabilidade. A retenção dos fármacos e compostos na membrana deste modelo não foi expressiva, diferentemente do que ocorreu no modelo PAMPA TGI, variante *Double-Sink*.
- Na avaliação da integridade das membranas lipídicas, após os experimentos dos dois modelos, ambas demonstraram estar uniformes e íntegras pela rejeição do corante *Lucifer Yellow* (LY). No modelo PAMPA Pele também foi demonstrada a uniformidade e integridade das membranas pela baixa passagem do corante Azul de Crescil Brilhante (ACB).

REFERÊNCIAS

- AIBA, T.; ISHIDA, K.; YOSHINAGA, M.; OKUNO, M.; HASHIMOTO, Y. Pharmacokinetic characterization of transcellular transport and drug interaction of digoxin in Caco-2 cell monolayers. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 1, p. 114-119, 2005.
- AKAMATSU, M.; FUJIKAWA, M.; NAKAO, K.; SHIMIZU, R. In silico prediction of human oral absorption based on QSAR analyses of PAMPA permeability. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, n. 11, p. 1845-1866, 2009.
- AMIDON, G. L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.
- ARTURSSON, P.; PALM, K.; LUTHMAN, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1-3, p. 27-43, 2001.
- ARUOMA, O. I.; MURCIA, A.; BUTLER, J.; HALLIWELL, B. Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 1880-1885, 1993.
- ASHLEY, J. J., BROWN, B. T.; OKITA G. T., WRIGH, S. E. . The Metabolites Cardiac Glycosides In Human Urine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 232, n. 1, p. 315-322, 1957.
- AVDEEF, A. Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state). **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 1, n. 4, p. 277-351, 2001.
- AVDEEF, A. **Absorption and drug development**. Hoboken: Wiley. 2003. 287 p.
- AVDEEF, A. The rise of PAMPA. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 1, n. 2, p. 325-42, 2005.

AVDEEF, A.; ARTURSSON, P.; NEUHOFF, S.; LAZOROVA, L.; GRASJO, J.; TAVELIN, S. Caco-2 permeability of weakly basic drugs predicted with the double-sink PAMPA pKa(flux) method. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, n. 4, p. 333-349, 2005.

AVDEEF, A.; BENDELS, S.; DI, L.; FALLER, B.; KANSY, M.; SUGANO, K.; YAMAUCHI, Y. PAMPA--critical factors for better predictions of absorption. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 11, p. 2893-2909, 2007.

AVDEEF, A.; KANSY, M.; BENDELS, S.; TSINMAN, K. Absorption-excipient-pH classification gradient maps: sparingly soluble drugs and the pH partition hypothesis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 33, n. 1, p. 29-41, 2008.

AVDEEF, A.; NIELSEN, P. E.; TSINMAN, O. PAMPA--a drug absorption in vitro model 11. Matching the in vivo unstirred water layer thickness by individual-well stirring in microtitre plates. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 22, n. 5, p. 365-374, 2004.

AVDEEF, A.; STRAFFORD, M.; BLOCK, E.; BALOGH, M. P.; CHAMBLISS, W.; KHAN, I. 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.; TESTA, B. Physicochemical profiling in drug research: a brief survey of the state-of-the-art of experimental techniques. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, n. 10, p. 1681-1689, 2002.

AVDEEF, A.; TSINMAN, O. PAMPA--a drug absorption in vitro model 13. Chemical selectivity due to membrane hydrogen bonding: in combo comparisons of HDM-, DOPC-, and DS-PAMPA models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. 1-2, p. 43-50, 2006.

BAGROV, A. Y.; SHAPIRO, J. I.; FEDOROVA, O. V. Endogenous cardiotoxic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. **Pharmacological Reviews**, v. 61, n. 1, p. 9-38, 2009.

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. **AAPS Journal**, v. 8, n. 1, p. 11-13, 2006.

BERMEJO, M.; AVDEEF, A.; RUIZ, A.; NALDA, R.; RUELL, J. A.; TSINMAN, O.; GONZALEZ, I.; FERNANDEZ, C.; SANCHEZ, G.; GARRIGUES, T. M.; MERINO, V. PAMPA--a drug absorption in vitro model 7. Comparing rat in situ, Caco-2, and PAMPA permeability of fluoroquinolones. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, n. 4, p. 429-441, 2004.

BERTOL, J. W. **Avaliação da atividade anti-herpética de cardenólídeos e derivados**. 2011. 186 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Curso de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

BIELAWSKI, K.; WINNICKA, K.; BIELAWSKA, A. Inhibition of DNA topoisomerases I and II, and growth inhibition of breast cancer MCF-7 cells by ouabain, digoxin and proscillaridin A. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 7, p. 1493-1497, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 899 de 2003 - **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, Diário Oficial da União: Brasília, DF, 29 de maio, 2003.

BRASIL. **Bulário Eletrônico Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. 2008. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/BularioEletronico>>. Acesso em: 14 de janeiro de 2011.

CAIRNCROSS, C.; ACKERMANN, C. Permeation of digoxin through skin in vitro. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 27, n., p. 361-362, 1985.

CARRARA, S.; REALI, V.; MISIANO, P.; DONDIO, G.; BIGOGNO, C. Evaluation of in vitro brain penetration: optimized PAMPA and MDCKII-MDR1 assay comparison. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 345, n. 1-2, p. 125-133, 2007.

CHEN, K. **PAMPA: Novel BD Gentest™ Pre-coated PAMPA Plate System with High Caco-2 and Human Absorption Predictability**. 2008. Disponível em: <Erro! A referência de hiperlink não é válida.>. Acesso em: 17 de julho de 2010.

CHEN, X.; MURAWSKI, A.; PATEL, K.; CRESPI, C. L.; BALIMANE, P. V. A novel design of artificial membrane for improving the PAMPA model. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 7, p. 1511-1520, 2008.

DAGENAIS, C.; AVDEEF, A.; TSINMAN, O.; DUDLEY, A.; BELIVEAU, R. P-glycoprotein deficient mouse in situ blood-brain barrier permeability and its prediction using an in combo PAMPA model. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 2, p. 121-137, 2009.

DEFERME, S.; ANNAERT, P.; AUGUSTIJNS, P. **Drug Absorption Studies. In situ, in vitro and in silico models**. New York: Springer, v.VII. 2008. 182-215 p.

DI, L.; KERNS, E. H.; FAN, K.; MCCONNELL, O. J.; CARTER, G. T. High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 3, p. 223-232, 2003.

DODSON, A. W.; TAYLOR, T. J.; KNIPE, D. M.; COEN, D. M. Inhibitors of the sodium potassium ATPase that impair herpes simplex virus replication identified via a chemical screening approach. **Virology**, v. 366, n. 2, p. 340-348, 2007.

DONG, J. G., J.; AKRITOPOULOU-ZANZE, I.; KAWAMURA, A.; NAKANISHI, K.; BEROVA, N. Theoretical and Experimental CD of Conformationally Flexible Complex Molecules—Application to

Ouabain Pentanaphthoate and Analogs. **Chirality**, v. 11, n. 9, p. 707-721, 1999.

EGER, I. **Potencial quimioterapêutico de diferentes derivados do ácido gálico para o tratamento da infecção pelo trypanosoma cruzi: Avaliação in vitro e in vivo**. 2010. 105 p. (Doutorado em Biotecnologia) - Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

EHRHARDT, C.; KIM, K.-J. **Drug Absorption Studies. In situ, In vitro and in silico models**. New York: Springer, v.VII. 2008. 696 p.

EL MAGHRABY, G. M.; BARRY, B. W.; WILLIAMS, A. C. Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, n. 4-5, p. 203-222, 2008.

FALLER, B. Artificial membrane assays to assess permeability. **Current Drug Metabolism**, v. 9, n. 9, p. 886-892, 2008.

FDA. **Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation**. 2001. Disponível em:<<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>>. Acesso em: maio de 2009.

FLATEN, G. E.; BUNJES, H.; LUTHMAN, K.; BRANDL, M. Drug permeability across a phospholipid vesicle-based barrier 2. Characterization of barrier structure, storage stability and stability towards pH changes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. 4, p. 336-343, 2006.

FLATEN, G. E.; DHANIKULA, A. B.; LUTHMAN, K.; BRANDL, M. Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier: a novel approach for studying passive diffusion. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 1, p. 80-90, 2006.

FLATEN, G. E.; LUTHMAN, K.; VASSKOG, T.; BRANDL, M. Drug permeability across a phospholipid vesicle-based barrier 4. The effect of tensides, co-solvents and pH changes on barrier integrity and on drug permeability. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, n. 2-3, p. 173-180, 2008.

FLATEN, G. E.; SKAR, M.; LUTHMAN, K.; BRANDL, M. Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier: 3. Characterization of drug-membrane interactions and the effect of agitation on the barrier integrity and on the permeability. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 30, n. 3-4, p. 324-332, 2007.

FLORENCE, A. T.; ATWOOD, D. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**: Ed. da Universidade de São Paulo. 2003. 711 p.

GALINIS-LUCIANI D; NGUYEN L; M., Y. Is PAMPA a Useful Tool for Discovery? **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 11, p. 2886-2896, 2007.

GOTO, A.; YAMADA, K.; ISHII, M.; SUGIMOTO, T. Does digoxin-like immunoreactivity really represent the natriuretic hormone? **Nephron**, v. 54, n. 1, p. 99-100, 1990.

HAMLIN, J. M.; BLAUSTEIN, M. P.; BOVA, S.; DUCHARME, D. W.; HARRIS, D. W.; MANDEL, F.; MATHEWS, W. R.; LUDENS, J. H. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 14, p. 6259-6263, 1991.

HARTLEY, C. **Anti-Viral Topical Gel Formulations containing a diuretic such as furosemide and/or a cardiac glycoside such as digoxin** US 2008/0220066 A1. 2008.

HARTLEY, C.; HARTLEY, M.; PARDOE, I.; KNIGHT, A. Ionic Contra-Viral Therapy (ICVT); a new approach to the treatment of DNA virus infections. **Archives of Virology**, v. 151, n. 12, p. 2495-2501, 2006.

HORISBERGER, J.-D. Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. **Physiology**, v. 19, n., p. 377-387, 2004.

ICH. **International Conference on Harmonization. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**. 2005.

Disponível em:<www.ich.org/UrlGrpServer.html>. Acesso em: maio de 2009.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. DOQ-CGCRE-008. 2003.

JOHANSSON, S.; LINDHOLM, P.; GULLBO, J.; LARSSON, R.; BOHLIN, L.; CLAESON, P. Cytotoxicity of digitoxin and related cardiac glycosides in human tumor cells. **Anticancer Drugs**, v. 12, n. 5, p. 475-483, 2001.

JUNGERSTED, J. M.; HELLGREN, L. I.; JEMEC, G. B.; AGNER, T. Lipids and skin barrier function--a clinical perspective. **Contact Dermatitis**, v. 58, n. 5, p. 255-262, 2008.

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.

KELLARD, L.; ENGELSTEIN, M. Automation of cell-based and noncell-based permeability assays. **Journal of the Association for Laboratory Automation**, v. 12, n. 2, p. 104-109, 2007.

KELMANN, R. **Dados de estabilidade do galato de pentila**. [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <rekelman@yahoo.com.br> 28 jan. 2011.

KELMANN, R. **Estudos de formulação, permeação cutânea e atividade anti-herpética de formas farmacêuticas nanoemulsionadas contendo galato de pentila**. 2011. (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

KERNS, E. H.; DI, L. **Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods**. California: Elsevier. 2008. 526 p.

KERNS, E. H.; DI, L.; PETUSKY, S.; FARRIS, M.; LEY, R.; JUPP, P. 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.

KITAGAWA, S.; NABEKURA, T.; KAMIYAMA, S.; TAKAHASHI, T.; NAKAMURA, Y.; KASHIWADA, Y.; IKESHIRO, Y. Effects of alkyl gallates on P-glycoprotein function. **Biochemical Pharmacology**, v. 70, n. 8, p. 1262-1266, 2005.

KONSOULA, R.; BARILE, F. A. Correlation of in vitro cytotoxicity with paracellular permeability in Caco-2 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 19, n. 5, p. 675-684, 2005.

KRATZ, J. **Influência da complexação de fármacos para uso oral com ciclodextrinas: estudo da permeabilidade in vitro**. 2011. (Doutorado em Farmácia) - Programa de Pós Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

KRATZ, J. M.; ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R.; KOLLING, D. J.; LEAL, P. C.; CIRNE-SANTOS, C. C.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J.; RYBALA, E.; BERGSTRÖM, T.; FRUGULHETTI, I. C. P. P.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. Anti-HSV-1 and anti-HIV-1 activity of gallic acid and pentyl gallate. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 437-442, 2008.

KRATZ, J. M.; ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R.; LEAL, P. C.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; TRYBALA, E.; BERGSTRÖM, T.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. Evaluation of anti-HSV-2 activity of gallic acid and pentyl gallate. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 5, p. 903-907, 2008.

KREIS, W.; HENSEL, A.; STUHLEMMER, U. Cardenolides biosynthesis in foxglove. **Planta Medica**, v. 64, n., p. 491-499, 1998.

KUBO, I.; FUJITA, K.; NIHEI, K. Anti-Salmonella activity of alkyl gallates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 23, p. 6692-6696, 2002.

KUBO, I.; MASUOKA, N.; HA, T. J.; SHIMIZU, K.; NIHEI, K. Multifunctional antioxidant activities of alkyl gallates. **Open Bioactive Compounds Journal**, v. 3, n., p. 1-11, 2010.

KULIKOV, A.; EVA, A.; KIRCH, U.; BOLDYREV, A.; SCHEINER-BOBIS, G. Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, n. 7, p. 1691-1702, 2007.

LEAL, P. C.; MASCARELLO, A.; DERITA, M.; ZULJAN, F.; NUNES, R. J.; ZACCHINO, S.; YUNES, R. A. Relation between lipophilicity of alkyl gallates and antifungal activity against yeasts and filamentous fungi. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 6, p. 1793-1796, 2009.

LEE, S. H.; PARK, H. H.; KIM, J. E.; KIM, J. A.; KIM, Y. H.; JUN, C. D.; KIM, S. H. Allose gallates suppress expression of pro-inflammatory cytokines through attenuation of NF-kappaB in human mast cells. **Planta Medica**, v. 73, n. 8, p. 769-773, 2007.

LENNERNAS, H. Human intestinal permeability. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 4, p. 403-410, 1998.

LENTZ, K. A.; HAYASHI, J.; LUCISANO, L. J.; POLLI, J. E. Development of a more rapid, reduced serum culture system for Caco-2 monolayers and application to the biopharmaceutics classification system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 200, n. 1, p. 41-51, 2000.

LI, C.; NAIR, L.; LIU, T.; LI, F.; PICHARDO, J.; AGRAWAL, S.; CHASE, R.; TONG, X.; USS, A. S.; BOGEN, S.; NJOROGE, F. G.; MORRISON, R. A.; CHENG, K. C. Correlation between PAMPA permeability and cellular activities of hepatitis C virus protease inhibitors. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, n. 5, p. 1186-1197, 2008.

LI, Y. J.; HE, X.; LIU, L. N.; LAN, Y. Y.; WANG, A. M.; WANG, Y. L. Studies on chemical constituents in herb of Polygonum orientale. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 30, n. 6, p. 444-446, 2005.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews.**, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, 1997.

LIU, H.; SABUS, C.; CARTER, G. T.; DU, C.; AVDEEF, A.; TISCHLER, M. 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.

LOFTSSON, T.; KONRADSDOTTIR, F.; MASSON, M. Development and evaluation of an artificial membrane for determination of drug availability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 326, n. 1-2, p. 60-68, 2006.

LOPEZ-LAZARO, M.; PASTOR, N.; AZRAK, S. S.; AYUSO, M. J.; AUSTIN, C. A.; CORTES, F. Digitoxin inhibits the growth of cancer cell lines at concentrations commonly found in cardiac patients. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 11, p. 1642-1645, 2005.

MACHET, L.; VAILLANT, V.; PINTON, J.; BESNARD, J. C.; BRETEAU, M.; COCHELIN, N.; LORETTE, G. Percutaneous administration of digoxin across hairless mouse skin and human skin in vitro. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 72, n. 1, p. R1-R4, 1991.

MALAKOUTIKHAH, M.; TEIXIDO, M.; GIRALT, E. Toward an optimal blood-brain barrier shuttle by synthesis and evaluation of peptide libraries. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 16, p. 4881-4889, 2008.

MARTEL, S. **PAMPA Skin Doubt**. [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <Sophie.Martel@unige.ch> 26, maio 2010.

MASUNGI, C.; MENSCH, J.; VAN DIJCK, A.; BORREMANS, C.; WILLEMS, B.; MACKIE, C.; NOPPE, M.; BREWSTER, M. E. Parallel

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

MENSCH, J.; JAROSKOVA, L.; SANDERSONB, W.; MELISC, A.; MACKIEC, C.; VERRECKA, G.; BREWSTERA, M. E.; AUGUSTIJNSD, P. Application of PAMPA-models to predict BBB permeability including efflux ratio, plasma protein binding and physicochemical parameters **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, n. 1-2, p. 182-197, 2010.

MENSCH, J.; MELIS, A.; MACKIE, C.; VERRECK, G.; BREWSTER, M. E.; AUGUSTIJNS, P. Evaluation of various PAMPA models to identify the most discriminating method for the prediction of BBB permeability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 74, n. 3, p. 495-502, 2010.

MENSCH, J.; NOPPE, M.; ADRIAENSEN, J.; MELIS, A.; MACKIE, C.; AUGUSTIJNS, P.; BREWSTER, M. E. Novel generic UPLC/MS/MS method for high throughput analysis applied to permeability assessment in early Drug Discovery. **Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 847, n. 2, p. 182-187, 2007.

MILLIPORE. **Membrane Integrity test for Lipid-PAMPA Artificial Membranes, Protocolo (PC1545EN00)**. 2005. Disponível em: <<http://www.millipore.com/catalogue/module/c7702#2>>. Acesso em: jan. de 2010.

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.

MOFFAT, A. C.; JACKSON, J. V.; MOSS, M. S.; WIDDOP, B. **Clarke's Isolation and Identification of Drugs**. London: The pharmaceutical Press. 1986

MORAIS, M. C.; LUQMAN, S.; KONDRATYUK, T. P.; PETRONIO, M. S.; REGASINI, L. O.; SILVA, D. H.; BOLZANI, V. S.; SOARES, C. P.; PEZZUTO, J. M. Suppression of TNF-alpha induced NFkappaB

activity by gallic acid and its semi-synthetic esters: possible role in cancer chemoprevention. **Natural Products Research**, v. 24, n. 18, p. 1758-1765, 2010.

MUELLER, P.; RUDIN, D. O.; TIEN, H. T.; WESCOTT, W. C. Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. **Nature**, v. 194, n. 9, p. 979-80, 1962.

NACHTRNANN, F. S., H.; FREI, R. W. Ultraviolet Derivatization of Digitalis Glycosides as 4-Nitrobenzates for Liquid Chromatographic Trace Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 1576-1579, 1976.

NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 9, p. 318-326, 2000.

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.

NIHEI, K.; NIHEI, A.; KUBO, I. Rational design of antimicrobial agents: antifungal activity of alk(en)yl dihydroxybenzoates and dihydroxyphenyl alkanoates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 22, p. 3993-3996, 2003.

OLLILA, F.; HALLING, K.; VUORELA, P.; VUORELA, H.; SLOTTE, J. P. Characterization of flavonoid--biomembrane interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 399, n. 1, p. 103-108, 2002.

OOSTENDORP, R. L.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. M. The biological and clinical role of drug transporters at the intestinal barrier **Cancer Treatment Reviews**, v. 35, n. 2, p. 137-147 2009.

OTTAVIANI, G.; MARTEL, S.; CARRUPT, P. A. Parallel artificial membrane permeability assay: a new membrane for the fast prediction of passive human skin permeability. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 13, p. 3948-3954, 2006.

OTTAVIANI, G.; MARTEL, S.; CARRUPT, P. A. In silico and in vitro filters for the fast estimation of skin permeation and distribution of new chemical entities. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 4, p. 742-748, 2007.

OW, Y. Y.; STUPANS, I. Gallic acid and gallic acid derivatives: effects on drug metabolizing enzymes. **Current Drug Metabolism**, v. 4, n. 3, p. 241-248, 2003.

PEREIRA RANGEL, L.; FRITZEN, M.; YUNES, R. A.; LEAL, P. C.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; FERREIRA-PEREIRA, A. Inhibitory effects of gallic acid ester derivatives on *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance protein Pdr5p. **FEMS Yeast Research**, v. 10, n. 3, p. 244-251, 2010.

PRASSAS, I.; DIAMANDIS, E. P. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 11, p. 926-935, 2008.

PRESS, B.; DI GRANDI, D. Permeability for intestinal absorption: Caco-2 assay and related issues. **Current Drug Metabolism**, v. 9, n. 9, p. 893-900, 2008.

QAZZAZ, H. M.; CAO, Z.; BOLANOWSKI, D. D.; CLARK, B. J.; VALDES, R., JR. De novo biosynthesis and radiolabeling of mammalian digitalis-like factors. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 3, p. 612-620, 2004.

RAGHAVENDRA, P. B.; SREENIVASAN, Y.; RAMESH, G. T.; MANNA, S. K. Cardiac glycoside induces cell death via FasL by activating calcineurin and NF-AT, but apoptosis initially proceeds through activation of caspases. **Apoptosis**, v. 12, n. 2, p. 307-318, 2007.

RAHIMTOOLA, S. H.; TAK, T. The use of digitalis in heart failure. **Current Problems in Cardiology**, v. 21, n., p. 781-853, 1996.

RATES, S. M. K.; BRIDI, R. Heterosídeos cardioativos. In: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., et al (Ed.). **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. Porto

Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFGRS / Ed. da UFSC, 2003, p.685-710.

RICHTER, O. V.; GLAVINAS, H.; KRAJCSI, P.; LIEHNER, S.; ZECH, B. S. K. A novel screening strategy to identify ABCB1 substrates and inhibitors. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 379, n. 1, p. 11-26, 2009.

RUELL, J. A.; TSINMAN, K. L.; AVDEEF, A. PAMPA--a drug absorption in vitro model. 5. Unstirred water layer in iso-pH mapping assays and pKa(flux)--optimized design (pOD-PAMPA). **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, n. 4-5, p. 393-402, 2003.

RUELL, J. A.; TSINMAN, O.; AVDEEF, A. Acid-base cosolvent method for determining aqueous permeability of amiodarone, itraconazole, tamoxifen, terfenadine and other very insoluble molecules. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 5, p. 561-565, 2004.

SAVI, L. A.; LEAL, P. C.; VIEIRA, T. O.; ROSSO, R.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; BARARDI, C. R.; SIMOES, C. M. Evaluation of anti-herpetic and antioxidant activities, and cytotoxic and genotoxic effects of synthetic alkyl-esters of gallic acid. **Arzneimittelforschung**, v. 55, n. 1, p. 66-75, 2005.

SAWADA, G. A.; BARSUHN, C. L.; LUTZKE, B. S.; HOUGHTON, M. E.; PADBURY, G. E.; HO, N. F.; RAUB, T. J. Increased lipophilicity and subsequent cell partitioning decrease passive transcellular diffusion of novel, highly lipophilic antioxidants. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 288, n. 3, p. 1317-1326, 1999.

SCHNEIDER, G.; BARINGHAUS, K.-H. **Molecular design: concepts and applications**. Frankfurt: Wiley-VCH. 2008. 257 p.

SCHNEIDER, R.; WRAY, V.; NIMTZ, M.; LEHMANN, W. D.; KIRCH, U.; ANTOLOVIC, R.; SCHONER, W. Bovine adrenals contain, in addition to ouabain, a second inhibitor of the sodium pump. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 2, p. 784-92, 1998.

- SEO, P. R.; TEKSIN, Z. S.; KAO, J. P.; POLLI, J. E. Lipid composition effect on permeability across PAMPA. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, n. 3-4, p. 259-268, 2006.
- SHIBATA, H.; KONDO, K.; KATSUYAMA, R.; KAWAZOE, K.; SATO, Y.; MURAKAMI, K.; TAKAISHI, Y.; ARAKAKI, N.; HIGUTI, T. Alkyl gallates, intensifiers of beta-lactam susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 549-555, 2005.
- SHORE, P. A.; BRODIE, B. B.; HOGBEN, C. A. The gastric secretion of drugs: a pH partition hypothesis. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 119, n. 3, p. 361-369, 1957.
- SINKO, B.; KOKOSI, J.; AVDEEF, A.; TAKACS-NOVAK, K. A PAMPA study of the permeability-enhancing effect of new ceramide analogues. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, n. 11, p. 1867-1874, 2009.
- SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, R. Amostragem, Padronização e Calibração. In: (Ed.). **Fundamentos de Química Analítica**, 2006, p.163-210.
- STOLL, V. A. K., W.; WARTBURG, A. Die Kristallisation der Desacetyl-ianatoside A und B (Purpureaglykoside A und B). **Helvetica Chimica Acta**, v. 37, n. 4, p. 1134-1148, 1954.
- SU, C. T.; HSU, J. T.; HSIEH, H. P.; LIN, P. H.; CHEN, T. C.; KAO, C. L.; LEE, C. N.; CHANG, S. Y. Anti-HSV activity of digitoxin and its possible mechanisms. **Antiviral Research**, v. 79, n. 1, p. 62-70, 2008.
- SUGANO, K.; HAMADA, H.; MACHIDA, M.; USHIO, H. 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**, v. 6, n. 3, p. 189-196, 2001.

SUGANO, K.; HAMADA, H.; MACHIDA, M.; USHIO, H.; SAITOH, K.; TERADA, K. Optimized conditions of bio-mimetic artificial membrane permeation assay. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 228, n. 1-2, p. 181-188, 2001.

SUGANO, K.; KANSY, M.; ARTURSSON, P.; AVDEEF, A.; BENDELS, S.; DI, L.; ECKER, G. F.; FALLER, B.; FISCHER, H.; GEREBTZOFF, G.; LENNERNAES, H.; SENNER, F. Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n., p. 597-614, 2010.

SUGANO, K.; TAKATA, N.; MACHIDA, M.; SAITOH, K.; TERADA, K. Prediction of passive intestinal absorption using bio-mimetic artificial membrane permeation assay and the paracellular pathway model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 241, n. 2, p. 241-251, 2002.

TAM, K. Y.; AVDEEF, A.; TSINMAN, O.; SUN, N. The permeation of amphoteric drugs through artificial membranes--an in combo absorption model based on paracellular and transmembrane permeability. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 392-401, 2010.

TAMMELA, P.; LAITINEN, L.; GALKIN, A.; WENNBERG, T.; HECZKO, R.; VUORELA, H.; SLOTTE, J. P.; VUORELA, P. Permeability characteristics and membrane affinity of flavonoids and alkyl gallates in Caco-2 cells and in phospholipid vesicles. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 425, n. 2, p. 193-199, 2004.

TASKOVA, R. M.; GOTFREDSEN, C. H.; JENSEN, S. R. Chemotaxonomic markers in Digitalideae (Plantaginaceae). **Phytochemistry**, v. 66, n. 12, p. 1440-1447, 2005.

TEKSIN, Z. S.; HOM, K.; BALAKRISHNAN, A.; POLLI, J. E. Ion pair-mediated transport of metoprolol across a three lipid-component PAMPA system. **Journal of Controlled Release**, v. 116, n. 1, p. 50-57, 2006.

TEKSIN, Z. S.; SEO, P. R.; POLLI, J. E. Comparison of drug permeabilities and BCS classification: three lipid-component PAMPA

system method versus Caco-2 monolayers. **The AAPS Journal**, v. 12, n. 2, p. 238-241, 2010.

TESTA, B.; KRÄMER, S. D.; WUNDERLI-ALLENSPACH, H.; FOLKERS, G. **Pharmacokinetic Profiling in Drug Research**. Switzerland. 2006.

THOMPSON, M.; KRULL, U. J.; WORSFOLD, P. J. The structure and electrochemical properties of a polymer-supported lipid biosensor. **Analytica Chimica Acta**, v. 117, n., p. 133-145, 1980.

TSINMAN, O.; TSINMAN, K.; SUN, N.; AVDEEF, A. Physicochemical Selectivity of the BBB Microenvironment Governing Passive Diffusion-Matching with a Porcine Brain Lipid Extract Artificial Membrane Permeability Model. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 2, p. 337-363, 2010.

TULP, I.; SILD, S.; MARAN, U. Relationship Between Structure and Permeability in Artificial Membranes: Theoretical Whole Molecule Descriptors in Development of QSAR Models. **QSAR Combinatorial Science**, v. 28, n. 8, p. 811-814, 2009.

TYMIAK, A. A.; NORMAN, J. A.; BOLGAR, M.; DIDONATO, G.; LEE, H.; PARKER, W. L.; LO, L. C.; BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; HABER, E.; HAUPERT, G. T. Physico-chemical characterization of a ouabain isomer isolated from bovine hypothalamus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n., p. 8189-8193, 1993.

UOZAKI, M.; YAMASAKI, H.; KATSUYAMA, Y.; HIGUCHI, M.; HIGUTI, T.; KOYAMA, A. H. Antiviral effect of octyl gallate against DNA and RNA viruses. **Antiviral Research**, v. 73, n. 2, p. 85-91, 2007.

VELURI, R.; SINGH, R. P.; LIU, Z.; THOMPSON, J. A.; AGARWAL, R.; AGARWAL, C. Fractionation of grape seed extract and identification of gallic acid as one of the major active constituents causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 7, p. 1445-1453, 2006.

VENKATESH, G.; RAMANATHAN, S.; MANSOR, S. M.; NAIR, N. K.; SATTAR, M. A.; CROFT, S. L.; NAVARATNAM, V. Development and validation of RP-HPLC-UV method for simultaneous determination of buparvaquone, atenolol, propranolol, quinidine and verapamil: a tool for the standardization of rat in situ intestinal permeability studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 4, p. 1546-51, 2007.

WALTER, E.; JANICH, S.; ROESSLER, B. J.; HILFINGER, J. M.; AMIDON, G. L. HT29-MTX/Caco-2 cocultures as an in vitro model for the intestinal epithelium: in vitro-in vivo correlation with permeability data from rats and humans. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 10, p. 1070-6, 1996.

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. 923-30, 2001.

XIANG, T. X.; ANDERSON, B. D. Substituent contributions to the transport of substituted p-toluic acids across lipid bilayer membranes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 83, n. 10, p. 1511-1518, 1994.

YOU DIM, K. A.; AVDEEF, A.; ABBOTT, N. J. In vitro trans-monolayer permeability calculations: often forgotten assumptions. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 21, p. 997-1003, 2003.

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