

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
ESTUDOS E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS

Tamires Guedes Caldeira

**Avaliação da solubilidade em equilíbrio e da permeabilidade *in vitro* da
eremantolida C**

Ouro Preto – Minas Gerais – Brasil

Abril de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
ESTUDOS E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS

**Avaliação da solubilidade em equilíbrio e da permeabilidade *in vitro* da
eremantolida C**

Tamires Guedes Caldeira

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Jacqueline de Souza

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Dênia Antunes Saúde Guimarães

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito para obtenção do Grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Ouro Preto – Minas Gerais – Brasil

Abril de 2015

C146a Caldeira, Tamires Guedes.
Avaliação da solubilidade em equilíbrio e da permeabilidade in vitro da
eremantolida C [manuscrito] / Tamires Guedes Caldeira. - 2015.
138f.: il.: grafs; tabs.

Orientador: Profª. Dra. Jacqueline de Souza.
Coorientador: Profª. Dra. Dênia Antunes Saúde-Guimarães.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de
Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas
(CiPharma).

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

1. Solubilidade. 2. Permeabilidade. 3. Eremantolida C. I. Souza, Jacqueline
de. II. Saúde-Guimarães, Dênia Antunes. III. Universidade Federal de Ouro
Preto. IV. Título

CDU: 615.451:582.998.16

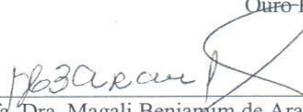


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia

ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA 99ª DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA ESCOLA DE
FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

1 Aos vinte e quatro dias do mês de abril de dois mil e quinze, sexta-feira, realizou-se, a
2 partir das 14 horas, na Sala 201 do Bloco de salas de Aulas, Campus UFOP, a sessão de
3 defesa de dissertação da candidata ao grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas,
4 Tamires Guedes caldeira intitulada: “Avaliação da solubilidade em equilíbrio e da
5 permeabilidade *in vitro* da eremantolida C”. A Banca Examinadora foi constituída
6 pelos, Prof. Dr. Cláudio Gouvea dos Santos (DEQUI/UFOP), Profa. Dra. Magali
7 Benjamin de Araújo (FCF/UNIFAL) e pela orientadora Profa. Dra. Jacqueline de
8 Souza. De acordo com o regulamento do Curso, a orientadora, Profa. Dra. Jacqueline
9 de Souza, presidente da banca, abriu a sessão, passando a palavra à candidata, que fez a
10 exposição do seu trabalho. Em seguida, foi realizada a arguição pelos examinadores na
11 ordem registrada acima, com a respectiva defesa da candidata. Finda a arguição, a
12 Banca Examinadora se reuniu, sem a presença da candidata, tendo deliberado pela sua
13 Approvação. Nada mais havendo para constar, lavrou-se a presente ata
14 por mim, Maria das Mercês Fortes da Silva Miranda, secretária do CiPharma, e fez-se a
15 leitura da presente ata que segue assinada pelos membros da Banca Examinadora e pela
16 Coordenadora do Curso.

Ouro Preto, 24 de abril de 2015.


Prof. Dra. Magali Benjamin de Araújo
FCF/UNIFAL


Prof. Dr. Cláudio Gouvea dos Santos
DEQUI/UFOP


Profa. Dra. Jacqueline de Souza
DEFAR/UFOP


Prof. Dra. Neila Márcia Silva Barcellos
Coordenadora do programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Neila Márcia Silva Barcellos
Coordenadora do Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas-CiPharma

AGRADECIMENTOS

À Deus por me conceder força e perseverança para trilhar todo esse caminho.

À Prof^a. Dr^a. Jacqueline pela oportunidade e confiança. Por ter me orientado de forma tão brilhante e ser muito mais que uma orientadora, uma verdadeira amiga. Obrigada pelo carinho e paciência.

À Prof^a. Dr^a. Dênia pela oportunidade, concedendo a eremantolida C purificada. Além da confiança e das contribuições durante o trabalho, sempre realizadas com muita competência, paciência e carinho.

À Prof^a. Dr^a. Neila Márcia Silva Barcellos pelas contribuições, amizade e carinho.

À Prof^a. Dr^a. Célia Maria Corrêa por toda a ajuda, paciência, amizade e carinho.

À Prof^a. Dr^a. Flávia Dias Marques Marinho pela disponibilidade e contribuições.

À Prof^a. Dr^a. Cristina Helena dos Reis Serra pela gentileza em me receber no Laboratório de Biodisponibilidade e Permeabilidade (LBP) – USP/SP para o acompanhamento dos estudos de permeabilidade *in vitro*.

À Patrícia Capelari pela paciência, amizade e por toda a ajuda, principalmente nos momentos mais difíceis do trabalho.

À equipe do LAPLAMED pelos ensinamentos e toda a ajuda.

À equipe do LBP – USP/SP, em especial André Dezani, Thaisa Marinho e Mônica Coquemala pela recepção e ensinamentos com os estudos de permeabilidade.

Às amigas do LCQ pelos momentos de descontração e pelas contribuições técnicas. Meus dias foram mais felizes com vocês: Patrícia, Janine, Lorena Arrunátegui, Lorena Ulhôa, Laryssa, Marina e Thaís. E as alunas de iniciação científica, em especial Lara, Carol e Laís.

Aos amigos que o mestrado me deu: Mônica, Walyson e Lucas.

Aos amigos que mesmo longe se fizeram tão presentes: Luiz, Macel, Thalles, Milena, Camila, Malu e Rafa. O apoio e a torcida de vocês foi fundamental.

À Juliana, amiga que mesmo longe, se fez tão presente me auxiliando em cada momento, com a troca de ideias, apoio e torcida.

Aos funcionários da Escola de Farmácia, técnicos e porteiros, que não mediram esforços para ajudar durante a execução do projeto.

Ao CiPharma que possibilitou o desenvolvimento de todo o trabalho.

À Anvisa, CAPES e Fapemig pelo suporte financeiro.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado e suporte financeiro.

Aos meus pais, Orival e Luzia, por abrir mão dos seus sonhos para acreditar nos meus.

Aos meus irmãos: Camilo, por ser meu apoio, meu ponto de equilíbrio, e Carol pelos momentos de descontração e ajuda.

À toda minha família pela torcida.

RESUMO

Os parâmetros de solubilidade e permeabilidade intestinal estão diretamente relacionados com a biodisponibilidade oral do fármaco. Baseada nessa relação o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) visa definir testes *in vitro* capazes de prever o comportamento *in vivo* dos medicamentos, o que é extremamente útil no processo de descoberta de novos fármacos. Nesse contexto, se encontra a eremantolida C (EREC), lactona sesquiterpênica e constituinte químico ativo da *Lychnophora trichocarpha* Spreng. (arnica brasileira), com comprovadas atividades farmacológicas e baixa toxicidade, o que levou ao interesse de se avaliar as suas características biofarmacêuticas e, conseqüentemente a sua aplicação como fármaco. Os primeiros dados, obtidos *in silico*, sugeriram que a EREC apresenta baixa solubilidade e alta permeabilidade, uma vez que exibe $c\text{LogS} = -3,83$ e $c\text{LogP}$ em torno de 2,00. Esses resultados estão em concordância com os encontrados na literatura para fármacos em geral, pois cerca de 85% destes têm valores de LogS entre -1 e -5, o que caracteriza a polaridade necessária para a solubilidade aquosa e o caráter lipofílico adequado para a passagem através da membrana. Além de $c\text{LogP}$ equiparável ao padrão de alta permeabilidade (metoprolol). Posteriormente foi desenvolvido e validado um método por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta a 267 nm para a quantificação da eremantolida C nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4). Embora tenham sido avaliados, os meios ácidos, FGSSE (pH 1,2) e tampão ácido clorídrico (pH 2,1), a EREC não apresentou estabilidade. O método se mostrou linear na faixa de concentração de 7,0-75,0 $\mu\text{g/mL}$ para os dois primeiros meios, e de 7,0-60,0 $\mu\text{g/mL}$ para o TF (pH 7,4), seletivo, preciso e exato. A avaliação da solubilidade e da permeabilidade *in vitro* veio a confirmar os dados obtidos *in silico*. A solubilidade da EREC, por meio da avaliação utilizando o método da agitação orbital em frasco, atingiu o equilíbrio em 32 horas apresentando valores de LogS de -4,13, -4,18 e -4,34 para os meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4), respectivamente. A permeabilidade por sua vez, foi avaliada por meio do ensaio em membrana artificial paralela (PAMPA), o qual possibilita o uso de pequenas quantidades de substância, sendo o método mais utilizado no processo de descoberta de novos fármacos. Por se tratar de um novo ensaio, foi necessária a validação dos métodos para a quantificação dos fármacos padrão de baixa e alta permeabilidade: furosemida e cloridrato de propranolol, e para a eremantolida C, em um novo intervalo linear. Todos se mostraram linear, seletivo, preciso e exato, dentro do intervalo proposto, para os meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4). Para a EREC foi encontrado o valor de permeabilidade efetiva de $30,4 \times 10^{-6}$ cm/s

o que confirma a sua alta permeabilidade, uma vez que apresentou resultado superior ao do cloridrato de propranolol ($9,23 \times 10^{-6}$ cm/s), fármaco utilizado como padrão de alta permeabilidade nos testes de PAMPA, nos quais foram utilizados o FISSE (pH 6,8) e o TF (pH 7,4) como compartimentos doador e receptor, respectivamente. Dessa forma, a medida da permeabilidade juntamente com a solubilidade permite prever a absorção gastrointestinal de substâncias candidatas a fármacos, como a eremantolida C.

Palavras-chave: Solubilidade, Permeabilidade, Eremantolida C, Sistema de Classificação Biofarmacêutica.

ABSTRACT

Solubility and intestinal permeability are directly related with the oral bioavailability of the drug. Based on this relation, the Biopharmaceutics Classification System (BCS) aims to set *in vitro* tests able to predict the *in vivo* behavior of the drugs, which is extremely useful in the process of new drug discovery. In this context, is the eremantholide C (EREC), sesquiterpene lactone and active chemical constituent of *Lychnophora trichocarpa* Spreng. (Brazilian Arnica), with proven pharmacological activities and low toxicity, which has led to interest in assessing their biopharmaceutical characteristics and its consequently application as a drug. The first data, obtained *in silico*, suggested that EREC presents low solubility and high permeability, since it exhibits $cLogS = -3,83$ and $cLogP$ around 2,00. These results are in agreement with the ones reported in the literature for drugs in general, because 85% of these have $LogS$ values between -1 and -5, which characterizes the polarity required for the water solubility and the suitable lipophilic character for passage through the membrane. Besides $clogP$ comparable to standard drug of high permeability (metoprolol). Posteriorly it was developed and validated a method for high performance liquid chromatography with detection by UV at 267 nm for quantification of the eremantholide C in media: TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4). Although they have been evaluated, the acids media, FGSSE (pH 1,2) and hydrochloric acid buffer (pH 2,1), the EREC not had stability. The method was linear over the concentration range of 7,0 to 75,0 mg/mL for the first two medias, and from 7,0 to 60,0 mg/mL for TF (pH 7,4), selective, precise and accurate. The evaluation of solubility and *in vitro* permeability came to confirm the data obtained *in silico*. The solubility of EREC, by using the shake-flask method, reached equilibrium in 32 hours, showing $LogS$ values of -4.13, -4.18 and -4.34 for the media: TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) and TF (pH 7,4), respectively. The permeability, in turn, was evaluated using the Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA), which enables the use of small quantities of substances, being the most widely used method in the new drug discovery process. Being a new test, was necessary to validate the methods to quantify the standards drugs of low and high permeability: furosemide and propranolol hydrochloride, and for the eremantholide C, in a new linear range. All showed linear, selective, precise and accurate, within the proposed range for media: FISSE (pH 6,8) and TF (pH 7,4). For EREC was found effective permeability value of $30,4 \times 10^{-6}$ cm/s, that confirms its high permeability, since it presented results higher than propranolol hydrochloride ($9,23 \times 10^{-6}$ cm/s), the drug used as standard of high permeability in PAMPA tests, which were used FISSE (pH 6,8) and TF (pH 7,4) as the donor and receiver

compartments, respectively. Thus, the measurement of permeability with the solubility can predict the gastrointestinal absorption of the candidate substances to drugs, such as eremantholide C.

Key-words: Solubility, Permeability, Eremantholide C, Biopharmaceutics Classification System

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1.1 - Equação de <i>Henderson-Hasselbalch</i> para compostos ácidos	35
Equação 2.1 - Equação para o cálculo da solubilidade de fármacos segundo o SCB	41
Equação 2.2 - Equação matemática para o cálculo da precisão	51
Equação 2.3 - Equação matemática para o cálculo da exatidão	51
Equação 2.4 - Equações matemáticas para o cálculo dos limites de detecção e quantificação	52
Equação 2.5 - Equações utilizadas para a extrapolação alométrica da dose de eremantolida C em um humano de 70,0 kg tomando-se como animal referência o camundongo (0,025 kg). Cálculo baseado na taxa metabólica basal (TMB)	77
Equação 3.1 - Fórmula para o cálculo de permeabilidade efetiva (P_{eff}) obtida nos ensaios de PAMPA	98
Equação 3.2 - Fórmula utilizada para o cálculo da quantidade de substância que fica retida na membrana	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Estrutura química da eremantolida C	31
Figura 1.2 - Demonstração da apresentação das duas formas possíveis da eremantolida C: forma não ionizada e forma ionizada	35
Figura 1.3 - Indicação do número de ligações doadoras e aceptoras de hidrogênio da molécula de eremantolida C	37
Figura 2.1 - Cromatograma obtido da eremantolida C em FISSE (pH 6,8) na concentração de 20,0 µg/mL utilizando fase móvel acetonitrila:água (60:40) – Condição 1	56
Figura 2.2 - Cromatograma obtido da eremantolida C em FISSE (pH 6,8) na concentração de 20,0 µg/mL utilizando fase móvel acetonitrila:água (50:50) – Condição 2	56
Figura 2.3 - Cromatograma obtido da eremantolida C em FISSE (pH 6,8) na concentração de 20,0 µg/mL utilizando fase móvel metanol:água eluição gradiente – Condição 3	57
Figura 2.4 - Cromatograma extraído por CLAE-DAD demonstrando o comprimento de onda em que a eremantolida C apresentou máximo de absorção	58
Figura 2.5 - Cromatograma obtido da eremantolida C em FGSSE (pH 1,2) na concentração de 20,0 µg/mL, empregando as condições cromatográficas definidas para a quantificação da eremantolida C nos meios biorrelevantes	59
Figura 2.6 - Cromatograma obtido da eremantolida C em tampão ácido clorídrico (pH 2,1) na concentração de 20,0 µg/mL, empregando as condições cromatográficas definidas para a quantificação da eremantolida C nos meios biorrelevantes	59
Figura 2.7 - Curvas analíticas para a avaliação da linearidade do método analítico de quantificação da eremantolida C em: (a) TA (pH 4,5); (b) FISSE (pH 6,8) e (c) TF (pH 7,4). Cada ponto representa a média das três repetições	61
Figura 2.8 - Gráficos de resíduos da regressão linear do método analítico de quantificação da eremantolida C em: (a) TA (pH 4,5), (b) FISSE (pH 6,8) e (c) TF (pH 7,4) após tratamento de <i>outliers</i>	62
Figura 2.9 - Cromatograma obtido após submissão da amostra de eremantolida C em TA (pH 4,5) na concentração de 20,0 µg/mL a 70,0°C (calor seco) durante 3 horas	65
Figura 2.10 - Cromatograma obtido após submissão da amostra de eremantolida C em FISSE (pH 6,8) na concentração de 20,0 µg/mL a 70,0°C (calor seco) durante 3 horas	65
Figura 2.11 - Cromatograma obtido após submissão da amostra de eremantolida C em TF (pH 7,4) na concentração de 20,0 µg/mL a 70,0°C (calor seco) durante 1 hora	65
Figura 2.12 - Perfil de solubilidade da nimesulida, obtido pelo método da agitação orbital em frasco miniaturizado, nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8)	73
Figura 2.13 - Perfil de solubilidade da eremantolida C nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4)	75
Figura 3.1 - Mecanismos de transporte de fármacos através da membrana intestinal	82

Figura 3.2 - Desenho esquemático do procedimento de avaliação da permeabilidade pelo método PAMPA	95
Figura 3.3 - Curvas analíticas para a avaliação da linearidade do método analítico de quantificação da furosemida em: (a) FISSE (pH 6,8) e (b) TF (pH 7,4), e do cloridrato de propranolol em (c) FISSE (pH 6,8) e (d) TF (pH 7,4). Cada ponto representa a média das três repetições	100
Figura 3.4 - Gráficos de resíduos da regressão linear do método analítico de quantificação da furosemida em: (a) FISSE (pH 6,8) e (b) TF (pH 7,4), após tratamento de <i>outliers</i>	102
Figura 3.5 - Gráficos de resíduos da regressão linear do método analítico de quantificação do cloridrato de propranolol em: (a) FISSE (pH 6,8) e (b) TF (pH 7,4), após tratamento de <i>outliers</i>	103
Figura 3.6 - Cromatogramas obtidos para a amostra de furosemida em FISSE (pH 6,8) na concentração de 0,165 mmol/L. Em (a) antes da exposição às condições drásticas e em (b) após submissão da amostra à 70,0°C (calor seco) durante 6 horas	105
Figura 3.7 - Cromatogramas obtidos para a amostra de furosemida em TF (pH 7,4) na concentração de 0,165 mmol/L. Em (a) antes da exposição às condições drásticas e em (b) após submissão da amostra à 70,0°C (calor seco) durante 6 horas	105
Figura 3.8 - Cromatogramas obtidos para a amostra de cloridrato de propranolol em FISSE (pH 6,8) na concentração de 0,165 mmol/L. Em (a) antes da exposição às condições drásticas e em (b) após submissão da amostra à 85,0°C (calor seco) durante 8 horas	106
Figura 3.9 - Cromatogramas obtidos para a amostra de cloridrato de propranolol em TF (pH 7,4) na concentração de 0,165 mmol/L. Em (a) antes da exposição às condições drásticas e em (b) após submissão da amostra à 85,0°C (calor seco) durante 8 horas.....	107
Figura 3.10 - Curvas analíticas para a avaliação da linearidade do método analítico de quantificação da eremantolida C em: (a) FISSE (pH 6,8) e (b) TF (pH 7,4). Cada ponto representa a média das três repetições	119
Figura 3.11 - Gráficos de resíduos da regressão linear do método analítico de quantificação da eremantolida C em: (a) FISSE (pH 6,8) e (b) TF (pH 7,4) após tratamento de <i>outliers</i> ...	120
Figura 3.12 - Cromatogramas obtidos para a amostra de eremantolida C em FISSE (pH 6,8) na concentração de 0,165 mmol/L. Em (a) antes da exposição às condições drásticas e em (b) após submissão da amostra à 70,0°C (calor seco) durante 1 hora.....	122
Figura 3.13 - Cromatogramas obtidos para a amostra de eremantolida C em TF (pH 7,4) na concentração de 0,165 mmol/L. Em (a) antes da exposição às condições drásticas e em (b) após submissão da amostra à 70,0°C (calor seco) durante 1 hora.....	122

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1 - Classificação dos fármacos segundo o SCB e fatores limitantes de absorção para cada classe	26
Quadro 1.2 - Classes de fármacos elegíveis à bioisenção de acordo com a Anvisa, EMA, FDA e OMS.....	27
Quadro 2.1 - Critérios de solubilidade para a elegibilidade quanto à bioisenção preconizados pela Anvisa, EMA, FDA e OMS	42
Quadro 2.2 - Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação da eremantolida C nos meios tamponados.....	58
Quadro 3.1 - Critérios de permeabilidade para a elegibilidade quanto à bioisenção preconizados pela Anvisa, EMA, FDA e OMS.....	83
Quadro 3.2 - Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação da furosemida nos meios tamponados	99
Quadro 3.3 - Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação do cloridrato de propranolol nos meios tamponados	99
Quadro 3.4 - Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação da eremantolida C nos meios tamponados.....	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Valores dos parâmetros físico-químicos preditos pelos programas computacionais Marvin [®] e Osiris Property Explorer [®] para a eremantolida C.....	34
Tabela 2.1 - Condições cromatográficas avaliadas no desenvolvimento do método analítico de quantificação da eremantolida C nos meios tamponados	49
Tabela 2.2 - Preparo das soluções diluídas nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) utilizadas na avaliação da linearidade do método de quantificação da eremantolida C ...	50
Tabela 2.3 - Condições experimentais utilizadas na miniaturização da técnica de solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frasco.....	53
Tabela 2.4 - Condições experimentais utilizadas para a avaliação da solubilidade em equilíbrio da eremantolida C pelo método da agitação orbital em frasco	54
Tabela 2.5 - Condições cromatográficas utilizadas por Henriques (2011) para a avaliação da estabilidade da eremantolida C.....	55
Tabela 2.6 - Eluição gradiente, utilizando os solventes metanol:água, avaliada para a quantificação da eremantolida C	56
Tabela 2.7 - Parâmetros cromatográficos: resolução, fator de cauda e tempo de retenção, obtidos nas três condições avaliadas	57
Tabela 2.8 - Parâmetros da regressão linear do método analítico de quantificação da eremantolida C em TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4). Coeficientes referentes à reta média das três repetições	61
Tabela 2.9 - Valores encontrados para as premissas dos resíduos da regressão linear, desvio da linearidade e significância da regressão, provenientes da análise das curvas analíticas obtidas para os meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).....	64
Tabela 2.10 - Precisão intradia e interdial do método de quantificação da eremantolida C no meio TA (pH 4,5) (n = 3)	66
Tabela 2.11 - Precisão intradia e interdial do método de quantificação da eremantolida C no meio FISSE (pH 6,8) (n = 3)	66
Tabela 2.12 - Precisão intradia e interdial do método de quantificação da eremantolida C no meio TF (pH 7,4) (n = 3)	67
Tabela 2.13 - Exatidão intradia e interdial do método de quantificação da eremantolida C no meio TA (pH 4,5) (n = 3)	67
Tabela 2.14 - Exatidão intradia e interdial do método de quantificação da eremantolida C no meio FISSE (pH 6,8) (n = 3)	68
Tabela 2.15 - Exatidão intradia e interdial do método de quantificação da eremantolida C no meio TF (pH 7,4) (n = 3)	68
Tabela 2.16 - Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) calculados para o método de quantificação da eremantolida C nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4)	69

Tabela 2.17 - Resultados de precisão e exatidão obtidos frente às variações dos parâmetros para a quantificação da eremantolida C em TA (pH 4,5) na concentração de 45,0 µg/mL	70
Tabela 2.18 - Resultados de precisão e exatidão obtidos frente às variações dos parâmetros para a quantificação da eremantolida C em FISSE (pH 6,8) na concentração de 45,0 µg/mL	70
Tabela 2.19 - Resultados de precisão e exatidão obtidos frente às variações dos parâmetros para a quantificação da eremantolida C em TF (pH 7,4) na concentração de 45,0 µg/mL.....	71
Tabela 2.20 - Avaliação da solubilidade em equilíbrio da nimesulida pelo método da agitação orbital em frasco (“ <i>shake-flask</i> ”) miniaturizado e padronizado por Monteiro (2014)	73
Tabela 2.21 - Avaliação do pH das soluções iniciais e finais do teste de solubilidade em equilíbrio da nimesulida pelo método da agitação orbital em frasco miniaturizado	74
Tabela 2.22 - Avaliação da solubilidade em equilíbrio da eremantolida C pelo método da agitação orbital em frasco (“ <i>shake-flask</i> ”).....	76
Tabela 2.23 - Avaliação do pH das soluções iniciais e finais do teste de solubilidade em equilíbrio da eremantolida C	76
Tabela 2.24 - Razão dose/solubilidade (D/S) da eremantolida C encontrada para os meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4), a partir da extrapolação alométrica de dose	78
Tabela 3.1 - Preparo das soluções diluídas nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) utilizadas na avaliação da linearidade do método de quantificação dos fármacos furosemida e cloridrato de propranolol.....	93
Tabela 3.2 - Condições avaliadas durante a padronização do ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela	96
Tabela 3.3 - Parâmetros da regressão linear do método analítico de quantificação da furosemida em FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4). Coeficientes referentes à reta média das três repetições	101
Tabela 3.4 - Parâmetros da regressão linear do método analítico de quantificação do cloridrato de propranolol em FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4). Coeficientes referentes à reta média das três repetições	101
Tabela 3.5 - Valores encontrados para as premissas dos resíduos da regressão linear, desvio da linearidade e significância da regressão, provenientes da análise das curvas analíticas obtidas para os fármacos furosemida e cloridrato de propranolol nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).....	104
Tabela 3.6 - Precisão intradia e interdia do método de quantificação da furosemida no meio FISSE (pH 6,8) (n = 3)	107
Tabela 3.7 - Precisão intradia e interdia do método de quantificação da furosemida no meio TF (pH 7,4) (n = 3)	108
Tabela 3.8 - Precisão intradia e interdia do método de quantificação do cloridrato de propranolol no meio FISSE (pH 6,8) (n = 3).....	108
Tabela 3.9 - Precisão intradia e interdia do método de quantificação do cloridrato de propranolol no meio TF (pH 7,4) (n = 3)	109

Tabela 3.10 - Exatidão intradia e interdia do método de quantificação da furosemida no meio FISSE (pH 6,8) (n = 3)	110
Tabela 3.11 - Exatidão intradia e interdia do método de quantificação da furosemida no meio TF (pH 7,4) (n = 3)	110
Tabela 3.12 - Exatidão intradia e interdia do método de quantificação do cloridrato de propranolol no meio FISSE (pH 6,8) (n = 3).....	110
Tabela 3.13 - Exatidão intradia e interdia do método de quantificação do cloridrato de propranolol no meio TF (pH 7,4) (n = 3)	111
Tabela 3.14 - Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) calculados para o método de quantificação da furosemida e do cloridrato de propranolol nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4)	112
Tabela 3.15 - Propriedades físico-químicas apresentadas pelos fármacos de furosemida e cloridrato de propranolol	112
Tabela 3.16 - Resultados de permeabilidade efetiva (P_{eff}) para os fármacos furosemida e cloridrato de propranolol, utilizando o meio TA (pH 4,5) como compartimento doador, solução lipídica a 5,0%, ausência de agitação e 15 horas de incubação.....	113
Tabela 3.17 - Resultados de permeabilidade efetiva (P_{eff}) para os fármacos furosemida e cloridrato de propranolol, utilizando o meio FISSE (pH 6,8) como compartimento doador, solução lipídica a 5,0%, ausência de agitação e 15 horas de incubação.....	114
Tabela 3.18 - Resultados de permeabilidade efetiva (P_{eff}) para a furosemida utilizando o meio FISSE (pH 6,8) como compartimento doador, solução lipídica a 5,0%, agitação de 50 rpm por 5 horas à 37°C	117
Tabela 3.19 - Resultados de permeabilidade efetiva (P_{eff}) para o cloridrato de propranolol utilizando o meio FISSE (pH 6,8) como compartimento doador, solução lipídica a 5,0%, agitação de 50 rpm por 5 horas à 37°C.....	117
Tabela 3.20 - Parâmetros da regressão linear do método analítico de quantificação da eremantolida C em FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4). Coeficientes referentes à reta média das três repetições	119
Tabela 3.21 - Valores encontrados para as premissas dos resíduos da regressão linear, desvio da linearidade e significância da regressão, provenientes da análise das curvas analíticas obtidas para a eremantolida C nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4)	121
Tabela 3.22 - Precisão intradia e interdia do método de quantificação da eremantolida C no meio FISSE (pH 6,8) (n = 3)	123
Tabela 3.23 - Precisão intradia e interdia do método de quantificação da eremantolida C no meio TF (pH 7,4) (n = 3)	124
Tabela 3.24 - Exatidão intradia e interdia do método de quantificação da eremantolida C no meio FISSE (pH 6,8) (n = 3)	124
Tabela 3.25 - Exatidão intradia e interdia do método de quantificação da eremantolida C no meio TF (pH 7,4) (n = 3)	125

Tabela 3.26 - Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) calculados para o método de quantificação da eremantolida C nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) 125

Tabela 3.27 - Resultados de permeabilidade efetiva (P_{eff}) para a eremantolida C utilizando como compartimento doador o meio FISSE (pH 6,8), solução lipídica a 5,0%, agitação de 50 rpm por 5 horas à 37,0°C 126

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de variância
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASP	Área superficial polar
b	Média das inclinações da curva analítica
C_i	Concentração das espécies ionizadas
C_u	Concentração das espécies não ionizadas
CI_{100}	Concentração que inibe 100% do crescimento celular
CL_{50}	Concentração letal para 50% das células
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo diodos
CMD	Concentração experimental média determinada
D/S	Razão dose/solubilidade
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DPa	Desvio padrão dos coeficientes lineares da curva analítica
DPR	Desvio padrão relativo
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EREC	Eremantolida C
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGSSE	Fluido gástrico simulado sem enzimas
FISSE	Fluido intestinal simulado sem enzimas
IAM	Membrana artificial imobilizada
IL-10	Interleucina 10
LAPLAMED	Laboratório de Plantas Medicinais
LD	Limite de detecção
LogD	Coefficiente de partição octanol/solvente tamponado
cLogP	Coefficiente de partição octanol/água calculado
LogP	Coefficiente de partição octanol/água
cLogS	Logaritmo da solubilidade (mol/L) calculado
LogS	Logaritmo da solubilidade (mol/L)

LQ	Limite de quantificação
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPA	Ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela
P_{eff}	Permeabilidade efetiva
Pgp	Glicoproteína P
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RMN	Ressonância magnética nuclear
rpm	Rotações por minuto
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
SE	Solução estoque
SEM	Solubilidade experimental média
SQR	Substância Química de Referência
TA	Tampão acetato
TF	Tampão fosfato
TMB	Taxa metabólica basal
TNF- α	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	22
OBJETIVOS	24
Objetivo geral.....	24
Objetivos específicos	24
CAPÍTULO I - AVALIAÇÃO <i>IN SILICO</i> DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA EREMANTOLIDA C	25
1.1 REVISÃO DA LITERATURA	26
1.1.1 Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB)	26
1.1.2 Métodos <i>in silico</i> para a avaliação das características físico-químicas de fármacos ...	28
1.1.3 Eremantolida C	29
1.2 MATERIAIS E MÉTODOS	33
1.2.1 Predição das características físico-químicas da eremantolida C utilizando programas computacionais	33
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
1.3.1 Predição das características físico-químicas da eremantolida C utilizando programas computacionais	34
1.4 CONCLUSÃO	38
CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE EM EQUILÍBRIO DA EREMANTOLIDA C PELO MÉTODO DA AGITAÇÃO ORBITAL EM FRASCO (“SHAKE-FLASK”)	39
2.1 REVISÃO DA LITERATURA	40
2.1.1 Solubilidade de fármacos	40
2.1.2 Solubilidade segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica.....	41
2.1.3 Métodos utilizados para a avaliação da solubilidade de fármacos	43
2.1.3.1 Método da agitação orbital em frasco (“ <i>shake-flask</i> ”).....	43
2.1.3.2 Titulação ácido-base	43
2.1.3.3 Diagrama de fases	43
2.1.3.4 Dissolução intrínseca	44
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	45
2.2.1 Materiais	45

2.2.1.1	Substância natural biologicamente ativa.....	45
2.2.1.2	Substância Química de Referência (SQR).....	46
2.2.1.3	Equipamentos e utensílios.....	46
2.2.1.4	Reagentes e solventes.....	47
2.2.2	Métodos.....	47
2.2.2.1	Preparo das soluções utilizadas no desenvolvimento e validação do método para quantificação da eremantolida C e na avaliação da sua solubilidade em equilíbrio	47
2.2.2.1.1	Preparo da solução estoque de eremantolida C	47
2.2.2.1.2	Preparo das soluções tampão	48
2.2.2.2	Desenvolvimento do método para quantificação da eremantolida C no fluido gástrico simulado sem enzimas - FGSSE (pH 1,2); tampão ácido clorídrico (pH 2,1); tampão acetato - TA (pH 4,5); fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato - TF (pH 7,4)	49
2.2.2.3	Validação do método analítico para quantificação da eremantolida C no tampão acetato - TA (pH 4,5), fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato - TF (pH 7,4)	49
2.2.2.3.1	Linearidade	50
2.2.2.3.2	Seletividade.....	50
2.2.2.3.3	Precisão.....	50
2.2.2.3.4	Exatidão	51
2.2.2.3.5	Limites de detecção e quantificação	52
2.2.2.3.6	Robustez	52
2.2.2.4	Miniaturização da técnica de solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frasco (“shake-flask”) adequando para a eremantolida C.....	52
2.2.2.5	Avaliação da solubilidade em equilíbrio da eremantolida C pelo método da agitação orbital em frasco (“shake-flask”)	53
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
2.3.1	Desenvolvimento do método para quantificação da eremantolida C no fluido gástrico simulado sem enzimas - FGSSE (pH 1,2); tampão ácido clorídrico (pH 2,1); tampão acetato - TA (pH 4,5); fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato - TF (pH 7,4)	55
2.3.2	Estabilidade da eremantolida C no fluido gástrico simulado sem enzimas (pH 1,2) e no tampão ácido clorídrico (pH 2,1)	58
2.3.3	Validação do método analítico para quantificação da eremantolida C no tampão acetato - TA (pH 4,5), fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato - TF (pH 7,4).....	60
2.3.3.1	Linearidade.....	60

2.3.3.2 Seletividade	64
2.3.3.3 Precisão	66
2.3.3.4 Exatidão.....	67
2.3.3.5 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)	69
2.3.3.6 Robustez.....	69
2.3.4 Miniaturização da técnica de solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frasco (“ <i>shake-flask</i> ”) adequando para a eremantolida C.....	72
2.3.5 Avaliação da solubilidade em equilíbrio da eremantolida C pelo método da agitação orbital em frasco (“ <i>shake-flask</i> ”)	74
2.4 CONCLUSÃO.....	79

CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE *IN VITRO* DA EREMANTOLIDA C PELO MÉTODO PAMPA

3.1 REVISÃO DA LITERATURA	81
3.1.1 Permeabilidade de fármacos	81
3.1.2 Permeabilidade segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica	83
3.1.3 Métodos utilizados para a avaliação da permeabilidade de fármacos	84
3.1.3.1 Métodos <i>in situ</i>	84
3.1.3.2 Métodos <i>in vitro</i> baseados em sistemas celulares e tecidos animais	85
3.1.3.2.1 Células Caco-2.....	85
3.1.3.2.2 Células MDCK	86
3.1.3.2.3 Ensaio <i>in vitro</i> com tecido invertido.....	86
3.1.3.2.4 Ensaio <i>in vitro</i> com tecido não-invertido.....	87
3.1.3.3 Métodos <i>in vitro</i> baseados em sistemas artificiais	87
3.1.3.3.1 Ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA)..	87
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	89
3.2.1 Materiais	89
3.2.1.1 Substância natural biologicamente ativa.....	89
3.2.1.2 Substâncias Químicas de Referência (SQR) e matérias-primas	89
3.2.1.3 Equipamentos e utensílios.....	89
3.2.1.4 Reagentes e solventes.....	90
3.2.2 Métodos.....	90
3.2.2.1 Padronização e validação do procedimento de avaliação da permeabilidade <i>in vitro</i> pelo método PAMPA.....	90

3.2.2.1.1	Preparo das soluções estoques dos fármacos padrão de baixa e alta permeabilidade: furosemida e cloridrato de propranolol.....	91
3.2.2.1.2	Preparo da solução de fosfatidilcolina.....	91
3.2.2.1.3	Preparo das soluções tampão	91
3.2.2.1.4	Validação do método analítico para quantificação dos fármacos padrão: furosemida e cloridrato de propranolol no fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato - TF (pH 7,4).....	92
3.2.2.1.4.1	Linearidade.....	92
3.2.2.1.4.2	Seletividade	93
3.2.2.1.4.3	Precisão	93
3.2.2.1.4.4	Exatidão.....	93
3.2.2.1.4.5	Limites de detecção e quantificação	94
3.2.2.1.5	Padronização do procedimento de avaliação da permeabilidade <i>in vitro</i> pelo método PAMPA.....	94
3.2.2.2	Avaliação da permeabilidade <i>in vitro</i> da eremantolida C pelo método PAMPA .	96
3.2.2.2.1	Preparo da solução estoque de eremantolida C	96
3.2.2.2.2	Preparo da solução de fosfatidilcolina.....	96
3.2.2.2.3	Validação do método analítico para quantificação da eremantolida C no fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato - TF (pH 7,4).....	96
3.2.2.2.4	Avaliação da permeabilidade <i>in vitro</i> da eremantolida C.....	97
3.2.2.3	Análise dos resultados.....	97
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
3.3.1	Padronização e validação do procedimento de avaliação da permeabilidade <i>in vitro</i> pelo método PAMPA.....	99
3.3.1.1	Validação do método analítico para quantificação dos fármacos padrão: furosemida e cloridrato de propranolol no fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato - TF (pH 7,4)	99
3.3.1.1.1	Linearidade	100
3.3.1.1.2	Seletividade	104
3.3.1.1.3	Precisão.....	107
3.3.1.1.4	Exatidão	109
3.3.1.1.5	Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	111
3.3.1.2	Padronização do procedimento de avaliação da permeabilidade <i>in vitro</i> pelo método PAMPA.....	112

3.3.1.3 Avaliação da permeabilidade <i>in vitro</i> da eremantolida C pelo método PAMPA	118
3.3.1.3.1 Validação do método analítico para quantificação da eremantolida C no fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato - TF (pH 7,4).....	118
3.3.1.3.1.1 Linearidade.....	118
3.3.1.3.1.2 Seletividade	121
3.3.1.3.1.3 Precisão	123
3.3.1.3.1.4 Exatidão.....	124
3.3.1.3.1.5 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)	125
3.3.1.3.2 Avaliação da permeabilidade <i>in vitro</i> da eremantolida C.....	126
3.4 CONCLUSÃO.....	128
CONCLUSÃO GERAL	129
REFERÊNCIAS	130

INTRODUÇÃO

A solubilidade de um fármaco ou de uma substância biologicamente ativa nos líquidos do trato gastrointestinal é fator primordial para sua absorção e atividade terapêutica. Os parâmetros de solubilidade e permeabilidade intestinal estão relacionados à biodisponibilidade do fármaco, que quando administrado por via oral, somente é absorvido se for capaz de permear através do lúmen intestinal, sendo que, apenas estará disponível para essa permeação se estiver solubilizado no meio (MARTINEZ; AMIDON, 2002).

Amidon e colaboradores propuseram o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) que representa uma das ferramentas mais importantes para o desenvolvimento de novos fármacos e formulações farmacêuticas. Esse sistema é fundamentado no princípio de que o controle da extensão e da velocidade de absorção de um fármaco, administrado por via oral, depende basicamente de três aspectos: a solubilidade do próprio fármaco, sua permeabilidade através das membranas biológicas e sua velocidade de dissolução a partir da forma farmacêutica (AMIDON et al., 1995).

A principal finalidade desse sistema é fornecer subsídio regulatório para as bioensaios, que consistem na substituição dos estudos *in vivo*, tais como biodisponibilidade e/ou bioequivalência, por ensaios *in vitro*, que permitam conclusões sobre a solubilidade e permeabilidade dos fármacos (DEZANI, 2010). Entretanto, o SCB também é largamente utilizado na predição de novos fármacos proporcionando a seleção de moléculas com potencial farmacológico.

Dentre os métodos descritos para determinação da solubilidade em equilíbrio, o procedimento empregando agitação orbital em frasco (“*shake-flask*”) vem sendo amplamente recomendado, pois permite a obtenção da razão dose/solubilidade (D/S), que corresponde à razão entre a maior dose prescrita e a solubilidade da substância ativa (FDA, 2000; LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004; EMA, 2010; BRASIL, 2011).

A permeabilidade por sua vez, pode ser definida utilizando diversos modelos, sendo os métodos *in vivo* que contemplem os estudos farmacocinéticos em animais ou seres humanos e alternativamente métodos *in vitro* baseados em sistemas celulares os preconizados para a avaliação (FDA, 2000).

Métodos *in vitro* para a determinação de permeabilidade, como o ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay* - PAMPA), também têm sido vastamente utilizados, pois permitem a avaliação direta da passagem do fármaco por difusão passiva, principal rota de transporte dos fármacos,

através das membranas do trato gastrointestinal. Esse ensaio apresenta como vantagem a não utilização de animais e a equiparação dos resultados aos obtidos por outros modelos para determinação da permeabilidade.

A avaliação da solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frasco e a avaliação da permeabilidade pelo ensaio PAMPA são muito utilizadas para a seleção de novas substâncias com atividades farmacológicas, avaliando a viabilidade dessas virem a se tornarem fármacos. Nesse contexto, essas avaliações podem ser realizadas para a predição do comportamento *in vivo* de compostos de origem vegetal com potencial farmacológico.

O uso de plantas com fins medicinais é uma das práticas mais antigas para o tratamento de doenças na humanidade e por essa razão, continua sendo uma alternativa terapêutica em todo o mundo. Dados da literatura demonstram a importância do papel dos produtos naturais na descoberta de fármacos, o que proporciona novas opções para o tratamento de diversas enfermidades (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Nesse contexto, pode-se citar a *Lychnophora trichocarpha* Spreng., conhecida popularmente como arnica brasileira, da qual isolou-se a lactona sesquiterpênica, eremantolida C, um dos constituintes químicos ativos que contribui para as várias atividades biológicas apresentadas por esta espécie vegetal. Trabalhos realizados anteriormente demonstraram que essa lactona sesquiterpênica apresentou atividades anti-inflamatória (FERRARI et al., 2013), antitumoral (SAÚDE-GUIMARÃES; RASLAN; OLIVEIRA, 2014), anti-hiperuricêmica, antiartrite gotosa (de SOUZA et al., 2012) e tripanossomicida (OLIVEIRA et al., 1996). Além disso, a eremantolida C não possui na sua estrutura química o grupo α -metileno- γ -lactona (SAÚDE; RASLAN; SOUZA FILHO, 1998), que confere toxicidade à substância (FERRARI, 2008).

Devido às atividades farmacológicas descritas e a baixa toxicidade surgiu o interesse em avaliar as características biofarmacêuticas da eremantolida C, verificando sua compatibilidade com os resultados encontrados para fármacos em geral, concluindo assim, sobre a potencialidade dessa molécula em se tornar um insumo farmacologicamente ativo.

Com o intuito de descrever melhor as características biofarmacêuticas da eremantolida C, este trabalho foi dividido em capítulos. As características de solubilidade e permeabilidade *in silico* serão apresentadas no Capítulo I, para posterior correlação com os dados encontrados nos ensaios de solubilidade em equilíbrio, pelo método da agitação orbital em frasco (Capítulo II), e de permeabilidade, pelo método PAMPA (Capítulo III).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a solubilidade em equilíbrio e a permeabilidade da eremantolida C isolada de *Lychnophora trichocarpa* Spreng..

Objetivos específicos

- Avaliar *in silico* as propriedades físico-químicas da eremantolida C.
- Desenvolver e validar um método analítico para a quantificação da eremantolida C nos estudos de solubilidade e permeabilidade.
- Propor miniaturização da técnica de solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frasco (“*shake-flask*”) adequando para a eremantolida C.
- Avaliar a solubilidade em equilíbrio da eremantolida C pelo método da agitação orbital em frasco (“*shake-flask*”).
- Padronizar e validar a técnica de avaliação da permeabilidade *in vitro* pelo método PAMPA.
- Avaliar a permeabilidade *in vitro* da eremantolida C pelo método PAMPA.

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO *IN SILICO* DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA EREMANTOLIDA C

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB)

Diversas pesquisas vêm sendo realizadas com a finalidade de definir testes *in vitro* capazes de prever o comportamento *in vivo* dos medicamentos. Estes objetivam reduzir os estudos de bioequivalência *in vivo*, já que esses são onerosos e demorados e, além disso, expõem sujeitos sadios a riscos advindos da administração de medicamentos e da coleta de amostras biológicas.

Nesse contexto, Amidon e colaboradores (1995) propuseram o SCB, que se baseia nas propriedades que estão diretamente relacionadas com a absorção de fármacos, principalmente solubilidade e permeabilidade. A partir dessas características, quatro classes foram propostas para a classificação de fármacos, conforme mostrado no Quadro 1.1.

Quadro 1.1: Classificação dos fármacos segundo o SCB e fatores limitantes de absorção para cada classe.

Classe	Solubilidade	Permeabilidade	Fatores Limitantes
I	Alta	Alta	Velocidade de dissolução ou de esvaziamento gástrico, caso a dissolução seja muito rápida
II	Baixa	Alta	Dissolução <i>in vivo</i>
III	Alta	Baixa	Permeabilidade
IV	Baixa	Baixa	Solubilidade e permeabilidade

Fonte: AMIDON et al., 1995.

Um fármaco é considerado altamente solúvel quando apresenta uma razão dose/solubilidade inferior ou igual a 250 mL em condições pré-definidas de temperatura e pH, e altamente permeável quando a extensão da sua absorção em humanos é igual ou superior a 90%, de acordo com a FDA, e de 85%, segundo EMA, OMS e Anvisa (FDA, 2000; WHO, 2006; EMA, 2010; BRASIL, 2011).

O principal objetivo do SCB é servir como subsídio regulatório para as bioisenções de novos medicamentos sob a forma farmacêutica sólida de administração oral e velocidade de liberação imediata. Proporcionando assim, a redução no tempo do processo de

desenvolvimento do medicamento, gerando alívio econômico, e possibilitando maior número de opções terapêuticas para o serviço público de saúde (LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004).

Apesar do grande avanço, ainda não há harmonização entre as várias agências regulatórias quanto aos critérios para a bioisenção. Algumas aceitam a bioisenção para mais de uma classe do SCB e/ou utilizam limites diferentes de classificação no que diz respeito às definições de solubilidade e permeabilidade (Quadro 1.2) (CRISTOFOLETTI et al., 2013).

Quadro 1.2: Classes de fármacos elegíveis à bioisenção de acordo com a Anvisa, EMA, FDA e OMS.

Anvisa Classe I*	EMA Classes I ¹ e III ²
FDA Classe I	OMS Classes I ¹ , II ³ e III ²

* Somente fármacos listados na Instrução Normativa nº 02 de 14 de março de 2013.

¹ Devem apresentar dissolução rápida.

² Devem apresentar dissolução muito rápida.

³ Devem apresentar dissolução rápida em pH 6,8.

Fonte: FDA 2000; WHO, 2006; EMA 2010; BRASIL, 2011.

Embora o SCB tenha sido destinado a aplicações regulatórias, ele pode auxiliar nos processos de desenvolvimento de fármacos, sendo empregado na previsão do seu comportamento *in vivo* a partir das características de solubilidade e permeabilidade. Muitas moléculas são classificadas por meio de triagem, e os candidatos promissores a novos fármacos passam por testes *in vitro* e posteriormente por testes *in vivo*. Esse procedimento de triagem possibilitado pelo SCB evita o desperdício de tempo e de custos com moléculas que não trarão bons resultados *in vivo* (LÖBENBERG; AMIDON, 2000; PEREIRA, 2011).

No contexto do desenvolvimento de fármacos, o SCB também fornece regras muito claras e de fácil aplicação para determinar a velocidade limitante no processo de absorção gastrointestinal do fármaco. Desse modo, tem implicações na seleção de moléculas candidatas a fármacos, previsão e elucidação de interações alimentares, posologia, processo produtivo do medicamento, escolha de formulação, incluindo adequação para a administração oral em formulações de liberação prolongada, bem como a possibilidade de correlação *in-vitro/in-vivo* no teste de dissolução de formulações sólidas (MARTINEZ; AMIDON, 2002; POLLI et al., 2004; LENNERNÄS; ABRAHAMSSON, 2005).

Dessa forma, é importante a consciência de que a caracterização biofarmacêutica adequada de novas substâncias pode, no futuro, resultar em fármacos com alta permeabilidade, solubilidade e velocidade de dissolução. Isto irá automaticamente aumentar a importância do SCB como ferramenta regulatória ao longo do tempo e auxiliar no registro de novos fármacos e medicamentos (LENNERNÄS; ABRAHAMSSON, 2005).

Além disso, em países em desenvolvimento, onde muitas vezes não há infraestrutura ampla e/ou adequada para a realização dos ensaios de bioequivalência, o emprego do SCB torna-se uma ferramenta importante para assegurar a comparação entre produtos farmacêuticos (BENET et al., 2008).

Nesse sentido, a fim de auxiliar na caracterização biofarmacêutica e ser um recurso aos ensaios de bioequivalência, inúmeros estudos de solubilidade e permeabilidade têm sido desenvolvidos com o intuito de atender aos requisitos do SCB e assim permitir bioisotípicas e/ou desenvolvimento de fármacos que atendam aos critérios de eficácia e segurança exigidos (KANSY; SENNER; GUBERNATOR, 1998; GLOMME; MÄRZ; DRESSMAN, 2005; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007; SOUZA et al., 2009; DEZANI, 2010; MONTEIRO, 2014).

1.1.2 Métodos *in silico* para a avaliação das características físico-químicas de fármacos

Os métodos *in silico* são baseados em programas computacionais e têm a capacidade de prever a absorção de substâncias, a partir de suas características de solubilidade e permeabilidade, com base no caráter lipofílico, no potencial de ligações de hidrogênio, no tamanho molecular e em propriedades quânticas, que tem o potencial para direcionar a síntese química e assim, auxiliar o processo de descoberta de fármacos (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

O desenvolvimento explosivo da informática nos últimos anos tem levado a grandes avanços nessa abordagem, e métodos para prever a absorção intestinal de fármacos *in silico* estão sendo desenvolvidos, pois tal modelo minimizaria o tempo consumido na síntese, bem como experimentos com milhares de compostos, caso estes não apresentassem características de permeabilidade intestinal adequadas, fator limitante para a biodisponibilidade oral de fármacos (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; STENBERG; LUTHMANN; ARTURSSON, 2000).

Para fornecer inferências precisas e confiáveis comparáveis com o processo que ocorre no organismo humano, o modelo *in silico* faz uso de descritores moleculares, que são

responsáveis por transformar as informações químicas fornecidas em dados numéricos relacionados com as características de absorção gastrointestinal do fármaco ou da nova substância em questão. Os descritores são classificados de acordo com sua abrangência sendo agrupados em quatro classes: 1D, que fornecem informações estruturais, como o número de ligações, de átomos e presença de grupos funcionais; 2D, que levam em consideração a conectividade entre os átomos, bem como a distância entre eles e, a conectividade e número de ligações passíveis de rotação; 3D, que associam a conectividade com as características tridimensionais de cada átomo, como o volume molecular e o raio de Van der Waals; e por fim, 4D, que representam a variedade espacial das moléculas ao apresentá-las em diferentes conformações, orientações, tautômeros, estereoisômeros ou estados de protonação (XUE; BAJORATH, 2000; FERNANDES, 2012; SJÖGREN, 2013).

Um dos métodos *in silico* mais utilizado para prever a absorção qualitativa é a “Regra dos Cinco” proposta por Lipinski e colaboradores (2001), pela qual alguns parâmetros devem ser avaliados para definir se uma substância apresenta bom grau de absorção quando administrada pela via oral. São eles: apresentar até cinco ligações doadoras de hidrogênio; até dez ligaçõesceptoras de hidrogênio; peso molecular inferior a 500 g/mol e cLogP inferior a 5. Caso dois ou mais desses limites sejam excedidos, o composto em questão muito provavelmente não será promissor como fármaco (LIPINSKI et al., 2001).

Apesar de ser uma técnica extremamente vantajosa no processo de descoberta de novos fármacos, o método *in silico* apresenta algumas desvantagens como o fato de não haver base de dados suficientemente adequada com informações confiáveis sobre estes; e de descrever as propriedades que são relevantes apenas para a rota transcelular passiva. Mesmo esse sendo o percurso predominante para a maioria dos fármacos, alguns são substratos de transportadores e, portanto fazem uso do mecanismo ativo de transporte, o qual não pode ser predito por programas computacionais (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; STENBERG; LUTHMAN; ARTURSSON, 2000).

1.1.3 Eremantolida C

O uso de plantas com fins medicinais é uma das práticas mais antigas para o tratamento de doenças na humanidade e por essa razão, continua sendo uma alternativa terapêutica em todo o mundo. Estudos clínicos, farmacológicos e químicos de fármacos tradicionais, provenientes predominantemente de plantas, foram a base da maior parte de medicamentos precursores como a aspirina, digitoxina, morfina, quinina e pilocarpina.

Entretanto, análise de dados mostra a importância do papel dos produtos naturais na descoberta de fármacos atualmente, o que proporciona novas opções para o tratamento de diversas enfermidades. (BUTLER, 2004; NEWMAN; CRAGG, 2012).

Os fármacos provenientes de produtos naturais, incluindo, os advindos de micro-organismos, plantas e, os que passaram por qualquer modificação semissintética, mas ainda mantêm sua origem natural, são responsáveis por 33,7% do total de 270 fármacos desenvolvidos entre 1981 e 2010 para o combate de doenças infecciosas, englobando assim, classes de antibacterianos, antivirais, antifúngicos e antiparasitários (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Nesse mesmo período, o número de fármacos oriundos de fontes naturais com atividades antitumorais foi expressivo. Dos 99 descobertos, 44 eram de origem natural, reforçando a importância desta, como fonte de cura de diversas doenças (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Nesse contexto de produtos naturais utilizados popularmente com fins medicinais pode-se citar plantas do gênero *Lychnophora* pertencentes à família Asteraceae. Esta família possui cerca de 2000 gêneros e mais de 20000 espécies cujos estudos conduziram a mais de 4000 novas substâncias (SAÚDE et al., 2002), e ainda continuam como fonte de compostos com promissoras atividades terapêuticas.

Típicas do cerrado brasileiro, com ocorrência principalmente em Minas Gerais, Goiás e Bahia, as espécies do gênero *Lychnophora* são conhecidas popularmente como “arnica”, “falsa arnica” ou “arnica da serra”, devido ao odor característico semelhante ao da espécie europeia *Arnica montana* L. (CERQUEIRA, 1987; SAÚDE, 1994).

Suas partes aéreas maceradas em preparações alcoólicas, hidroalcoólicas ou em cachaça, possuem emprego na medicina popular como analgésico, anti-inflamatório, descongestionante, no tratamento de reumatismos, contusões e picadas de insetos (SAÚDE, 1994).

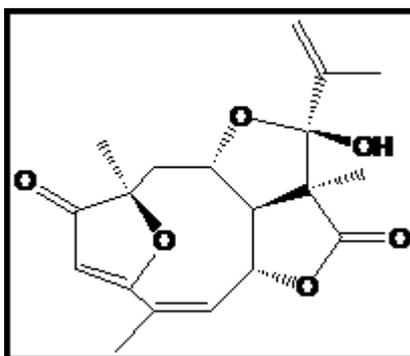
O perfil fitoquímico do gênero é caracterizado pela ocorrência de sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, lactonas sesquiterpênicas, flavonoides e esteroides e poliacetilenos. Entretanto, também já foram detectados açúcares, taninos e ácidos graxos de cadeia longa e seus ésteres (BORELLA et al., 1998; FERRAZ-FILHA, 2008).

Especialmente, o estudo fitoquímico da espécie *Lychnophora trichocarpha* Spreng. levou ao isolamento dos triterpenos friedelina, lupeol, α -amirina e β -amirina, dos esteroides β -sitosterol e estigmasterol e das lactonas sesquiterpênicas eremantolida C e licnofolida.

Açúcares redutores, hidrocarbonetos, ésteres graxos, flavonoides, outras lactonas sesquiterpênicas e saponinas também foram detectados (SAÚDE-GUIMARÃES, 1998).

A lactona sesquiterpênica eremantolida C (EREC) (Figura 1) tem sido fonte de estudos por apresentar atividades anti-inflamatória (FERRARI et al., 2013), antitumoral (SAÚDE-GUIMARÃES; RASLAN; OLIVEIRA, 2014), anti-hiperuricêmica, antiartrite gotosa (de SOUZA et al., 2012) e tripanossomicida (OLIVEIRA et al., 1996).

Figura 1.1: Estrutura química da eremantolida C.



Essa substância se apresenta na forma de cristais incolores e, como diferencial em relação a outras lactonas sesquiterpênicas isoladas, não possui na sua estrutura química o grupo α -metileno- γ -lactona (SAÚDE; RASLAN; SOUZA FILHO, 1998), grupo que confere toxicidade à substância (FERRARI, 2008).

A atividade tripanossomicida da eremantolida C foi determinada empregando uma solução da substância em DMSO seguida da incubação com sangue infectado, com formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, durante 4h. EREC foi capaz de inibir 100% do crescimento das cepas Y e CL, com concentrações de 3,6 e 14,4 mg/mL, respectivamente (OLIVEIRA et al., 1996).

Com relação à atividade antitumoral, EREC mostrou atividade significativa frente a 30 linhagens de células tumorais referentes a oito tipos de câncer, com valores de CI_{100} (concentração que inibe 100% do crescimento celular) entre 21,40 μ M e 53,70 μ M e mostrou valores de CL_{50} (concentração letal para 50% das células) entre 52,50 e 91,20 μ M para 21 linhagens de células tumorais (SAÚDE-GUIMARÃES; RASLAN; OLIVEIRA, 2014).

A atividade anti-inflamatória da eremantolida C foi avaliada *in vivo* pelo método do edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Os resultados obtidos com tratamentos tópicos com pomadas de eremantolida C a 1% foram semelhantes aos da formulação padrão de diclofenaco gel a 1%. Acredita-se que alguns dos mecanismos do efeito

da EREC na redução do edema de pata ocorram pela inibição da liberação da citocina pró-inflamatória TNF- α e pelo aumento da produção da citocina anti-inflamatória IL-10. (FERRARI et al., 2013).

A atividade anti-hiperuricêmica e anti-inflamatória por via oral da eremantolida C foi demonstrada por de Souza e colaboradores (2012) com o intuito de promover uma nova base farmacológica para o tratamento da artrite gotosa. A atividade anti-hiperuricêmica foi comprovada por meio da redução da hiperuricemia induzida por oxonato de potássio em camundongos Swiss, utilizando eremantolida C na dose de 25,0 mg/kg. Ainda por mecanismos não elucidados, uma vez que a EREC não foi capaz de inibir a xantina oxidase, enzima responsável pela metabolização de hipoxantina a xantina e desta a ácido úrico. A atividade anti-inflamatória por sua vez, foi demonstrada por meio da redução do edema de pata induzido por injeção de cristais de urato monossódico, apresentando valores equiparáveis ao controle positivo, indometacina (de SOUZA et al., 2012).

Além das atividades farmacológicas, houve também a avaliação da toxicidade aguda da EREC. Para isso, camundongos albinos receberam por via intraperitoneal doses da substância que variaram de 8×10^{-2} a 20 mg/kg e nenhum dos animais veio a óbito, não se observando também sinais de toxicidade geral (PAULA, 2012).

Dessa forma, já pensando na potencialidade da eremantolida C vir a se tornar um fármaco, Henriques (2011) realizou o estudo de estabilidade da substância, visando estabelecer um prazo de validade para a sua utilização.

A EREC armazenada em temperatura ambiente e em embalagem de vidro impermeável, pode ser utilizada, mantendo a segurança e eficácia de uso, por no mínimo 6 meses. Além disso, os resultados obtidos demonstraram que a substância não sofre degradação expressiva em condições neutras e oxidativas, nem quando é exposta à temperatura de 90,0°C e à luz por um período de 72 horas. Entretanto, a degradação ocorreu em meio alcalino e ácido (HENRIQUES, 2011).

Uma vez descritas as atividades farmacológicas e a estabilidade da eremantolida C, faz-se necessária sua descrição biofarmacêutica para avaliar as potencialidades dessa substância vir a se tornar um fármaco, já que, características relacionadas à biodisponibilidade oral serão avaliadas.

1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

1.2.1 Predição das características físico-químicas da eremantolida C utilizando programas computacionais

Para a predição das características físico-químicas da eremantolida C dois programas computacionais disponíveis na internet foram utilizados: Osiris Property Explorer[®] (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>) e Marvin[®] (<http://www.chemaxon.com/marvin/sketch/index.php>).

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1 Predição das características físico-químicas da eremantolida C utilizando programas computacionais

Programas computacionais utilizam características da estrutura molecular para a predição de parâmetros físico-químicos.

Descritores moleculares são os responsáveis por converter fórmulas matemáticas em parâmetros físico-químicos. As principais classes de descritores levam em conta informações como número de ligações e presença de funcionalidades, conectividade entre os átomos, volume molecular e as várias conformações adotadas pela substância, para a predição dessas características (XUE; BAJORATH, 2000).

A predição das características físico-químicas da eremantolida C foi analisada em dois programas computacionais disponíveis na internet: Marvin[®] e Osiris Property Explorer[®].

De acordo com aplicação dos programas computacionais Marvin[®] e Osiris Property Explorer[®], a eremantolida C apresenta baixa solubilidade e alta permeabilidade, além de outras características descritas na Tabela 1.1, que influenciam diretamente o processo de absorção oral do fármaco.

Tabela 1.1: Valores dos parâmetros físico-químicos preditos pelos programas computacionais Marvin[®] e Osiris Property Explorer[®] para a eremantolida C.

Parâmetro	Marvin [®]	Osiris Property Explorer [®]
Massa molecular	346,379 g/mol	346,0 g/mol
Área superficial polar	82,06 Å ²	82,06 Å ²
pKa	10,91	-
cLogS em água	-3,83*	-2,97
cLogP	2,00	1,80
cLogD	2,00**	-

* Mesmo valor encontrado para cLogS em pH 1,2; 4,5; 6,8 e 7,4.

**Valor de cLogD para a faixa de pH de 1,0-8,0.

Os valores encontrados para os parâmetros massa molecular e área superficial polar (ASP) se equiparam em ambos os programas computacionais utilizados.

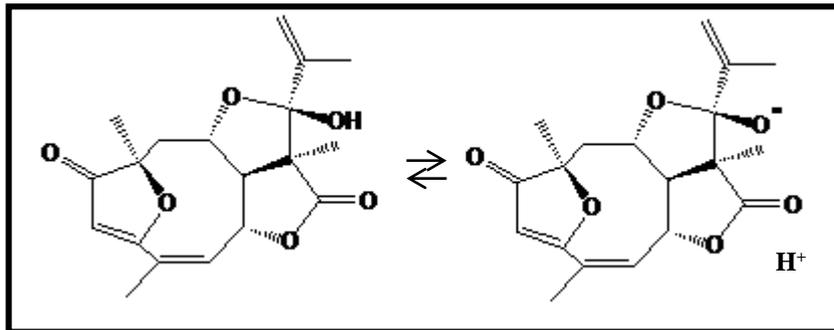
A área superficial polar é geralmente definida como a área associada com átomos de nitrogênio, oxigênio e os átomos de hidrogênio ligados a estes, e tem sido utilizada como um bom descritor de absorção intestinal, já que se correlaciona bem com o transporte passivo de substâncias (ERTL; ROHDE; SELZER, 2000; ÖSTERBERG; NORINDER, 2000).

A eremantolida C apresentou uma ASP calculada de $82,06 \text{ \AA}^2$, o que indica potencial de absorção moderado, uma vez que fármacos que são completamente absorvidos apresentam valores de ASP inferiores a $60,0 \text{ \AA}^2$ e aqueles com absorção inferior a 10%, apresentam valores de ASP superiores a $140,0 \text{ \AA}^2$ (PALM et al., 1997).

Alguns autores demonstraram que valores de ASP menores que $140,0 \text{ \AA}^2$ indicam biodisponibilidade oral superior a 20%. Esse critério tem sido utilizado como um recurso na seleção e identificação de substâncias candidatas a fármaco (LU et al., 2004), caso da eremantolida C.

O pKa por sua vez, está relacionado com o número de diferentes valores de pH a serem testados no ensaio de solubilidade (BUENO; RECH, 2011). A eremantolida C apresenta pKa de 10,91, podendo se apresentar de duas formas: ionizada e não ionizada (Figura 1.2).

Figura 1.2: Demonstração da apresentação das duas formas possíveis da eremantolida C: forma não ionizada e forma ionizada.



O grau de ionização de qualquer composto ácido em solução pode ser calculado a partir da equação de *Henderson-Hasselbalch* (Equação 1.1) se o valor de pKa da substância e o pH da solução forem conhecidos. Esses cálculos são extremamente úteis na determinação do grau de ionização do composto em várias partes do trato gastrointestinal e no plasma (AULTON, 2005), de forma a determinar o seu grau de absorção, já que este deve estar em solução, mas também deve ser capaz de permear a membrana gastrointestinal.

Equação 1.1: Equação de *Henderson-Hasselbalch* para compostos ácidos.

$$\text{pKa} = \text{pH} + \log \frac{C_u}{C_i}$$

Onde: C_u – concentração das espécies não ionizadas
 C_i – concentração das espécies ionizadas

A eremantolida C apresentou pKa superior à faixa de pH determinada para os estudos de solubilidade (1,2-6,8) e também ao pH plasmático (7,4). Em decorrência disso, não sofre qualquer influência na extensão de sua absorção devido ao seu grau de ionização no trato gastrointestinal, já que, em qualquer pH a ser testado se apresentará praticamente 100% na forma não ionizada. Isto é uma vantagem, uma vez que a passagem através da membrana se dá por substâncias na sua forma não ionizada.

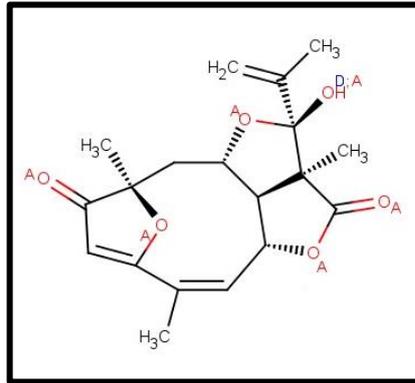
Outra questão primordial para a absorção é a solubilidade, que geralmente é expressa por LogS, onde S é a concentração do composto em mol/L de uma solução aquosa saturada em equilíbrio (JORGENSEN; DUFFY, 2002).

A eremantolida C apresentou valores de cLogS de -3,83 e -2,97, sendo o primeiro valor também encontrado para soluções com pH 1,2; 4,5; 6,8 e 7,4. Na prática, cerca de 85% dos fármacos têm valores de LogS entre -1 e -5, o que representa para a maioria dos fármacos uma junção entre a polaridade necessária para a solubilidade aquosa e o caráter lipofílico adequado para a passagem através da membrana (JORGENSEN; DUFFY, 2002). Considerando isso, a EREC apresenta potencial de absorção oral de acordo com a solubilidade.

Outro indicativo do bom grau de absorção de uma substância é a sua capacidade de atravessar a membrana intestinal, muitas vezes medida pelo coeficiente de partição (LogP), que é a capacidade que o composto tem de se particionar entre solventes de natureza lipídica (usado para mimetizar a membrana) e água, ou meio aquoso tamponado, neste caso, dado pelo LogD (ASHFORD, 2005).

Os valores tanto de cLogP: 2,00 e 1,80, quanto de cLogD: 2,00 apresentados indicam que a eremantolida C é uma substância de alta permeabilidade, uma vez que obedece a “regra dos 5” de Lipinski, apresentando um cLogP inferior a 5, peso molecular inferior a 500 g/mol e número de ligações doadoras de hidrogênio inferior a 5 e aceptoras de hidrogênio inferior a 10, conforme indicado na Figura 1.3 (LIPINSKI et al., 2001). Além disso, cLogP equiparável ao do metoprolol, o qual apresenta cLogP de 1,80 e é utilizado como fármaco padrão para estudos de permeabilidade. Valores de cLogP igual ou acima de 1,80 são indicativos de substâncias com alta permeabilidade (CRISTOFOLETTI et al., 2013).

Figura 1.3: Indicação do número de ligações doadoras e aceptoras de hidrogênio da molécula de eremantolida C.



Onde: **A** – ligações aceptoras de hidrogênio
D – ligações doadoras de hidrogênio

Portanto, de acordo com os dados expostos acima, espera-se encontrar valores para a solubilidade em equilíbrio da eremantolida C, utilizando o método da agitação orbital em frasco, em torno de 0,05 mg/mL, valor obtido a partir da conversão de cLogS, comprovando a sua baixa solubilidade. A qual foi possível devido comparação com fármacos classificados como de baixa solubilidade segundo o SCB: nimesulida (0,03 mg/mL) (MONTEIRO, 2014), sinvastatina (0,01 mg/mL) (LACERDA; LIONZO, 2011) e furosemida (0,03 mg/mL) (TAKÁCS-NOVÁK et al., 2013).

Além disso, espera-se comprovar a alta permeabilidade, por meio dos testes *in vitro* utilizando o método PAMPA, uma vez que os programas computacionais se baseiam em características lipofílicas da substância, e, portanto, na sua capacidade de atravessar a membrana intestinal de forma passiva.

1.4 CONCLUSÃO

Os dados encontrados *in silico* para a eremantolida C permitem inferir que esta substância candidata a fármaco possui características de baixa solubilidade e alta permeabilidade.

Entretanto, para a confirmação desses parâmetros e consequente classificação da EREC segundo as diretrizes do SCB, estudos *in vitro* de solubilidade, como o método da agitação orbital em frasco (“*shake-flask*”) para a determinação da solubilidade em equilíbrio e o ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA) para a determinação da permeabilidade, são necessários.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE EM EQUILÍBRIO DA EREMANTOLIDA C PELO MÉTODO DA AGITAÇÃO ORBITAL EM FRASCO (“*SHAKE-FLASK*”)

2.1 REVISÃO DA LITERATURA

2.1.1 Solubilidade de fármacos

A solubilidade é definida em termos quantitativos como a concentração do soluto em uma solução saturada a uma dada temperatura. Em termos qualitativos, pode ser definida como a interação espontânea de duas ou mais substâncias de modo a formar uma dispersão molecular homogênea. Já o conceito de solubilidade de um fármaco consiste na concentração máxima que este se dissolve no solvente sob condições específicas de temperatura, pH e pressão e pode ser expressa em partes, porcentagem, quantidade de matéria, molalidade e fração de volume (BABU; AREEFULLA; MALLIKARJUN, 2010; JATWANI et al., 2012).

A solubilidade do fármaco nos líquidos biológicos é um requisito importante para que este atinja a concentração desejada na circulação sistêmica e conseqüentemente promova a resposta farmacológica necessária. Dessa forma, a solubilidade desempenha um papel fundamental na biodisponibilidade, pois a absorção do fármaco só ocorre se ele estiver presente na forma de solução aquosa no local de absorção. Isto é verdade independentemente do mecanismo de absorção, seja difusão passiva ou transporte ativo, excetuando o caso de pinocitose, que é muito raro e só se aplica às vitaminas lipossolúveis A, D, E, K e alguns lipídeos (PANCHAGNULA; THOMAS, 2000; BABU; AREEFULLA; MALLIKARJUN, 2010; JATWANI et al., 2012).

Fármacos pouco solúveis em água, muitas vezes necessitam de doses elevadas de forma a atingir a concentração plasmática terapêutica após a administração oral. A baixa solubilidade em água é o principal problema encontrado no desenvolvimento de formulações, já que pode dificultar a geração de medicamentos com boa biodisponibilidade, a qual desempenha um papel essencial na disposição do fármaco, uma vez que a velocidade máxima de transporte passivo através da membrana biológica, a principal via para a absorção, é um produto da permeabilidade juntamente com a solubilidade (BABU; AREEFULLA; MALLIKARJUN, 2010; SAVJANI et al., 2012).

As propriedades físico-químicas do fármaco e/ou do solvente influenciam diretamente na solubilidade, sendo esta, variável de acordo com fatores, tais como (BABU; AREEFULLA; MALLIKARJUN, 2010):

- **temperatura:** a solubilidade pode ser elevada pelo aumento da temperatura do solvente;

- **pH:** o pH de uma substância está relacionado com o seu pKa e a concentração de suas formas ionizadas;

- **tamanho de partícula:** quanto menor o tamanho das partículas do soluto, maior a área superficial em relação ao volume do solvente, o que permite maior interação;

- **polimorfismo:** polimorfos diferentes podem apresentar variação do ponto de fusão. Uma vez que o ponto de fusão está relacionado com a solubilidade, polimorfos diferentes provavelmente apresentarão distintas solubilidades.

2.1.2 Solubilidade segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica

Segundo o SCB, um fármaco é considerado altamente solúvel quando a maior dose disponível comercialmente em um determinado país, submetida a uma faixa de pH que varia de 1,0 a 8,0 e a temperatura de $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$, apresenta razão dose/solubilidade inferior ou igual a 250 mL (MARTINEZ; AMIDON, 2002).

O cálculo é realizado de acordo com a Equação 2.1:

Equação 2.1: Equação para o cálculo da solubilidade de fármacos segundo o SCB.

$$D/S = \frac{\text{Dose (mg)}}{\text{Solubilidade (mg/mL)}}$$

Onde: D/S – razão dose/solubilidade em mL

Dose (mg)* – maior dose disponível comercialmente

Solubilidade (mg/mL) – solubilidade determinada experimentalmente

*Pode apresentar variação entre países

De acordo com a agência regulatória americana, *Food and Drug Administration* (FDA), o perfil de solubilidade do fármaco deve ser determinado também a temperatura de $37,0^\circ\text{C}$ aceitando-se variação de $\pm 1,0^\circ\text{C}$, na faixa de pH que varia de 1,0 a 7,5. Devem ser analisados solventes com distintos valores de pH de modo a definir com precisão a razão dose/solubilidade do fármaco, e esta pode ser baseada nas características de ionização da substância em questão (FDA, 2000).

Entretanto, segundo a EMA (*European Medicines Agency* - agência regulatória europeia), a Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e a OMS a faixa de pH na

qual a solubilidade deve ser avaliada é reduzida, conforme indicado no Quadro 2.1 (WHO, 2006; EMA, 2010; BRASIL, 2011).

Quadro 2.1: Critérios de solubilidade para a elegibilidade quanto à bioisenção preconizados pela Anvisa, EMA, FDA e OMS.

Anvisa Maior dose solúvel em volume menor ou igual a 250 mL, pH 1,2-6,8, 37,0 ± 1,0°C	EMA Maior dose solúvel em volume menor ou igual a 250 mL, pH 1,0-6,8, 37,0 ± 1,0°C
FDA Maior dose solúvel em volume menor ou igual a 250 mL, pH 1,0-7,5, 37,0 ± 1,0°C	OMS Maior dose solúvel em volume menor ou igual a 250 mL, pH 1,2-6,8, 37,0 ± 1,0°C

Fonte: FDA 2000; WHO, 2006; EMA 2010; BRASIL, 2011.

As variações de pH preconizadas pela EMA, Anvisa e OMS são mais recomendadas, pois relaciona-se melhor com o tempo de liberação do fármaco no trato gastrointestinal. Dessa forma, a faixa de 1,0 – 7,5 preconizada pelo FDA para estudos de solubilidade é uma exigência rigorosa e pode não ser necessária. Essa afirmativa pode ser feita, uma vez que sob condições de jejum, o intervalo de pH do trato gastrointestinal varia de 1,4 para 2,1 no estômago, 4,9 – 6,4 no duodeno, 4,4 – 6,6 no jejuno, e 6,5 – 7,4 no íleo. Além disso, geralmente leva cerca de 85 minutos para um fármaco atingir o íleo, e quando o atinge, a dissolução do medicamento é provavelmente completa, para aqueles que cumprem o critério de dissolução rápida, isto é, no mínimo 85% do fármaco deve dissolver-se em 30 minutos. Portanto, é viável a redução do intervalo de pH para a classificação da solubilidade segundo o SCB de 1,0 – 7,5 para 1,0 – 6,8 (YU et al., 2002; WHO, 2006).

Para a avaliação da solubilidade, o método da agitação orbital em frasco, conhecido como “*shake-flask*”, é citado pelas três agências regulatórias como o método de escolha, além disso, caso o fármaco em questão apresente solubilidade muito baixa, é o método mais confiável e utilizado. Entretanto, mediante justificativa, outros métodos capazes de prever a solubilidade em equilíbrio podem ser utilizados (FDA 2000; EMA, 2010; BRASIL, 2011; DOMANSKA et al, 2011).

2.1.3 Métodos utilizados para a avaliação da solubilidade de fármacos

2.1.3.1 Método da agitação orbital em frasco (“shake-flask”)

No método da agitação orbital em frasco, para a determinação a solubilidade em equilíbrio emprega-se no mínimo três condições de pH, geralmente, 1,2; 4,5 e 6,8. A amostra é adicionada em excesso ao meio em um frasco e a suspensão resultante é agitada a $37,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ durante um tempo definido. O objetivo é formar uma solução saturada, a qual é caracterizada pela observação de material excedente não dissolvido. Coletas sucessivas em tempos pré-determinados são realizadas de forma que se observe o estabelecimento do equilíbrio. A amostra é filtrada e a concentração do composto no filtrado é quantificada utilizando metodologia previamente validada (GLOMME; MÄRZ; DRESSMAN, 2005; BRASIL, 2011; MONTEIRO, 2014).

2.1.3.2 Titulação ácido-base

O emprego da titulação ácido-base com determinação potenciométrica para as medições de solubilidade se baseia na precipitação do soluto que ocasiona mudança característica no meio da curva de titulação.

Como titulante são utilizados ácidos ou bases padronizadas, das quais volumes precisos são adicionados a uma solução contendo a substância de interesse, que deve ser ionizável. Além disso, no meio reacional são inseridas quantidades definidas de solução de KCl 0,15 M, que visa aumentar a precisão das medições. Um eletrodo de vidro é usado para controlar constantemente o valor de pH e, a partir dos resultados é traçada uma curva de titulação por meio da representação gráfica do valor de pH em função do volume consumido de ácido ou base (GLOMME; MÄRZ; DRESSMAN, 2005).

A mudança no valor de pKa causada pela presença do precipitado, é a base da determinação da solubilidade. Fármacos ácidos pouco solúveis apresentam um valor de pKa aparente maior que o pKa verdadeiro, e bases fracamente solúveis apresentam valores de pKa aparente menores que o verdadeiro. Grande diferença entre o valor verdadeiro e o aparente, indica a fraca solubilidade do composto (GLOMME; MÄRZ; DRESSMAN, 2005).

2.1.3.3 Diagrama de fases

A avaliação da solubilidade de um fármaco utilizando o diagrama de fases consiste na adição de porções crescentes de amostra a volumes constantes de solvente no qual a

substância analisada mostra apenas ligeira solubilidade, visando à obtenção de solução saturada dessa substância (BRASIL, 2010).

Uma vez promovido o equilíbrio do sistema, por agitação prolongada e temperatura constante, determina-se o conteúdo total de soluto em solução, geralmente por técnica gravimétrica. O diagrama de fases da solubilidade é traçado, plotando-se a composição da solução, em miligramas de soluto por gramas de solvente (eixo das ordenadas), pela composição do sistema, em miligramas de amostra adicionada por gramas de solvente (eixo das abscissas) (BRASIL, 2010).

2.1.3.4 Dissolução intrínseca

A dissolução intrínseca consiste na dissolução de uma substância ativa pura sob a forma de um compacto não desintegrável com área superficial fixa imerso em um meio líquido selecionado. Esta é uma importante ferramenta no processo de descoberta de novas moléculas com potencial terapêutico, pois permite inferir sobre possíveis problemas de biodisponibilidade. Como vantagens e aplicações da técnica cabe ressaltar o uso de pequenas quantidades de substância e a determinação de parâmetros termodinâmicos associados com as transições de fase cristalina, investigação dos fenômenos de transferência de massa durante o processo de dissolução, estudo de surfactantes e efeitos do pH sobre a solubilização de fármacos (YU et al., 2004; UNITED STATES, 2014).

A dissolução intrínseca é avaliada por meio da determinação da velocidade de dissolução utilizando a correlação da quantidade de massa de soluto que é solubilizada no meio de dissolução por unidade de tempo com a área superficial do compacto, originando assim, um resultado em $\text{mg}/\text{min}/\text{cm}^2$ (ISSA; FERRAZ, 2011; UNITED STATES, 2014).

Esse método tem sido proposto, para determinação da solubilidade, como alternativa ao método da agitação orbital em frasco, uma vez que os valores de velocidade de dissolução intrínseca podem ser utilizados para determinar a classe do fármaco de acordo com o SCB (YU et al., 2004; ISSA; FERRAZ, 2011).

Entretanto, é necessária a padronização do ensaio, que pode ser influenciado por fatores relacionados a propriedades de estado sólido do fármaco, área superficial, condição hidrodinâmica e composição dos meios de dissolução (ISSA; FERRAZ, 2011).

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Materiais

2.2.1.1 Substância natural biologicamente ativa

A eremantolida C, sólido incolor com ponto de fusão de 213,6°C - 215,0°C, foi previamente isolada do extrato clorofórmico de *Lychnophora trichocarpha* Spreng. e fornecida pela Prof. Dr^a. Dênia Antunes Saúde Guimarães, Laboratório de Plantas Mediciniais (LAPLAMED), CiPharma/UFOP, para a realização desse trabalho.

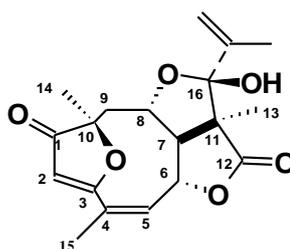
Para isso, partes aéreas de *Lychnophora trichocarpha* Spreng. foram coletadas (997,0 g), secas em estufa a 35,0°C e posteriormente pulverizadas. As partes aéreas pulverizadas foram extraídas com clorofórmio por percolação, à temperatura ambiente, até o completo esgotamento do material vegetal, seguida da eliminação do solvente sob pressão reduzida (58,61 g).

Sucessivos fracionamentos cromatográficos, utilizando coluna de sílica gel e solventes orgânicos com polaridades crescentes, bem como o procedimento de cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa, foram realizados com intuito de se obter a eremantolida C purificada (1,73 g).

Para a identificação estrutural da EREC purificada utilizou-se como recursos análises de espectrometria no infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN) e ponto de fusão, cujos dados se mostraram de acordo com aqueles publicados por Le Quesne et al. (1978), Bohlmann et al. (1980) e Saúde et al. (1998).

Dados físico-químicos e espectrométricos da EREC

Nomenclatura segundo a IUPAC: 6,9-epoxi-2H-1,4-dioxaciclodeca [c,d] pentaleno-2,7(4aH)-dioxano, 2a, 3, 5, 6, 11a, 11b-hexaidro-3-hidroxi-2a, 6, 10-trimetil-3-(1'-metiletenil)-2aR*, 3S*, 4aR*, 6S*, 10Z, 11aS*, 11bS*).



Obs: A numeração da molécula de EREC está de acordo com os dados de RMN de ¹H e ¹³C.

Cristais incolores, ponto de fusão: 213,6°C a 215,0°C. Literatura: 229,0-230,0°C (Le Quesne et al., 1978).

IV (KBr) ν máx. (cm^{-1}): 3450 (OH), 2900 (CH), 1770 (C=O de γ -lactona), 1700 (C=O de cetona conjugada), 1660 (C=C), 1590 (C=C do sistema C=COR furanona), 1450, 1370, 1350, 1320, 1270, 1220, 1200, 1150, 1100, 1060, 1040, 1000, 960, 920, 810, 730 (C=C) (BOHLMANN et al., 1980).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): 5,63 (s, H-2); 6,04-6,03 (m, H-5); 5,02-4,98 (m, H-6); 2,82 (dd, $J = 4,3; 7,1$ Hz, H-7); 4,09 (ddd, $J = 1,5; 4,2; 11,8$ Hz, H-8); 2,48 (dd, $J = 2,5; 13,6$ Hz, H-9a); 2,00 (dd, $J = 12,0; 13,5$ Hz, H-9b); 1,18 (s, H-13); 1,45 (s, H-14); 2,05 (t, $J = 1,9$ Hz, H-15); 5,31 (sl, H-2'a); 5,07 (t, $J = 1,6$ Hz); 1,91 (s, H-3'); 3,79 (s, OH) (LE QUESNE et al., 1978).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): 205,89 (C-1); 104,54 (C-2); 187,27 (C-3); 130,00 (C-4); 134,77 (C-5); 81,46 (C-6); 62,53 (C-7); 78,37 (C-8); 43,46 (C-9); 90,24 (C-10); 59,88 (C-11); 175,72 (C-12); 21,94 (C-13); 20,48 (C-14); 20,30 (C-15); 106,09 (C-16); 142,22 (C-1'); 115,80 (C-2'); 19,00 (C-3') (SAÚDE et al., 1998).

2.2.1.2 Substância Química de Referência (SQR)

Nimesulida SQR, fornecida pela Anvisa, proveniente da Farmacopeia Brasileira, lote 2049, teor de 99,8%.

2.2.1.3 Equipamentos e utensílios

Balança analítica AUX 220D capacidade mínima 1,0 mg - Shimadzu

Balança analítica AUX 220 capacidade mínima 10,0 mg - Shimadzu

Bomba de vácuo MA 057/12 - Marconi

Coluna cromatográfica C18 (150 x 4,6 mm; 3 μm) Luna[®] - Phenomenex

Coluna cromatográfica C18 (150 x 4,6 mm; 3,5 μm) Sunfire[®] - Waters

Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Alliance[®] Waters e2695 com detector UV/visível Waters 2489, software Empower versão 2

Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Alliance® Waters e2695 com detector DAD Waters 2996, software Empower versão 2

Destilador - Cristófoli

Estufa de secagem e esterilização modelo 315 SE – Fanem

Frascos de vidro âmbar com tampa de rosca e septo de borracha (*vials*) com capacidade de 2 mL - Waters

Incubadora Shaker KS 4000i control - IKA

Lavadora ultrassônica - Unique

Membrana filtrante em nylon 0,45 µm de poro - Millipore

Micropipetas monocal canal várias capacidades Pipetman® - Gilson

pHmetro - Hanna

Ponteiras plásticas

Sistema de purificação de água Direct-Q3® - Millipore

Unidade filtrante HV em PE com membrana durapore 0,45 µm - Millipore

2.2.1.4 Reagentes e solventes

Acetato de sódio triidratado - Vetec

Acetonitrila grau cromatográfico - JTBaker

Ácido acético glacial - Impex

Ácido clorídrico - Próquimios

Água ultrapura

Cloreto de potássio - Vetec

Cloreto de sódio - Neon

Fosfato de potássio monobásico - Vetec

Hidróxido de sódio - Vetec

Metanol grau cromatográfico - JTBaker

2.2.2 Métodos

2.2.2.1 Preparo das soluções utilizadas no desenvolvimento e validação do método para quantificação da eremantolida C e na avaliação da sua solubilidade em equilíbrio

2.2.2.1.1 Preparo da solução estoque de eremantolida C

Foram pesados exatamente 10,0 mg de eremantolida C e transferidos para balão volumétrico de 10,0 mL, completando-se o volume com metanol grau cromatográfico. A solução obtida apresentou concentração final de 1000 µg/mL de eremantolida C.

2.2.2.1.2 Preparo das soluções tampão

As soluções tampão foram preparadas de acordo com a Farmacopeia Americana 37ª Edição (UNITED STATES, 2014), e as correções de pH necessárias foram realizadas com soluções de HCl 1,0 mol/L e NaOH 1,0 mol/L.

Fluido gástrico simulado sem enzimas - FGSSE (pH 1,2):

Foram adicionados 2,0 g de cloreto de sódio e 7,0 mL de ácido clorídrico em balão volumétrico de 1000,0 mL contendo aproximadamente 500,0 mL de água ultrapura. A solução foi homogeneizada e o volume completado para 1000,0 mL com água ultrapura.

Tampão ácido clorídrico (pH 2,1):

Foram adicionados 250,0 mL da solução de cloreto de potássio 0,2 mol/L e 51,0 mL de ácido clorídrico 0,2 mol/L em balão volumétrico de 1000,0 mL. O volume foi completado com água ultrapura.

Tampão acetato - TA (pH 4,5):

Foram adicionados 2,99 g de acetato de sódio triidratado e 14,0 mL de ácido acético 2,0 mol/L em balão volumétrico de 1000,0 mL. O volume foi completado com água ultrapura.

Fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8):

Foram adicionados 250,0 mL da solução de fosfato de potássio monobásico 0,2 mol/L e 112,0 mL da solução de hidróxido de sódio 0,2 mol/L em balão volumétrico de 1000,0 mL. O volume foi completado com água ultrapura.

Tampão fosfato - TF (pH 7,4):

Foram adicionados 250,0 mL da solução de fosfato de potássio monobásico 0,2 mol/L e 195,5 mL da solução de hidróxido de sódio 0,2 mol/L em balão volumétrico de 1000,0 mL. O volume foi completado com água ultrapura.

2.2.2.2 Desenvolvimento do método para quantificação da eremantolida C no fluido gástrico simulado sem enzimas - FGSSE (pH 1,2); tampão ácido clorídrico (pH 2,1); tampão acetato - TA (pH 4,5); fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato - TF (pH 7,4)

Visando desenvolver um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) capaz de quantificar a eremantolida C no FGSSE (pH 1,2), tampão ácido clorídrico (pH 2,1), TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) adotou-se como referência o método desenvolvido e validado por Henriques (2011).

Três condições cromatográficas foram avaliadas, sendo que apenas o parâmetro fase móvel foi variado, conforme listado na Tabela 2.1. O critério de escolha foi baseado na resolução, no fator de cauda e tempo de retenção apresentados para cada uma das condições analisadas.

Tabela 2.1: Condições cromatográficas avaliadas no desenvolvimento do método analítico de quantificação da eremantolida C nos meios tamponados.

Detector: UV- 267 nm		
Coluna: C18 (150 x 4,6 mm; 3µm)		
Temperatura: 30,0°C		
Fluxo: 1,0 mL/minuto		
Volume de injeção: 25,0 µL		
Fase móvel		
Condição 1 Acetonitrila:Água (60:40)	Condição 2 Acetonitrila:Água (50:50)	Condição 3 Metanol:Água (gradiente)

2.2.2.3 Validação do método analítico para quantificação da eremantolida C no tampão acetato - TA (pH 4,5), fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato - TF (pH 7,4)

O método analítico para a quantificação da eremantolida C foi validado de acordo com a resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da Anvisa (BRASIL, 2003).

Os parâmetros linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação e robustez foram avaliados. Cálculos matemáticos e análises estatísticas foram realizadas com auxílio dos programas *Excel*[®] e *GraphPad Prism*[®] 5.01.

2.2.2.3.1 Linearidade

A análise da linearidade foi conduzida a partir da construção de curvas analíticas referentes a cada meio tamponado. Para os meios TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8) utilizou-se seis concentrações que variaram na faixa de 7,0 µg/mL a 75,0 µg/mL, enquanto para o meio TF (pH 7,4) utilizou-se cinco concentrações que variaram na faixa de 7,0 µg/mL a 60 µg/mL.

A proporção de solvente orgânico empregado não foi superior a 10,0% do volume total de solução, conforme diluições indicadas na Tabela 2.2, e as determinações foram realizadas em triplicata.

Tabela 2.2: Preparo das soluções diluídas nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) utilizadas na avaliação da linearidade do método de quantificação da eremantolida C.

Alíquota da SE* (mL)	Volume final da solução (mL)	Concentração (µg/mL)
0,014	2,0	7,0
0,030		15,0
0,060		30,0
0,090		45,0
0,120		60,0
0,150		75,0

* SE – Solução estoque de eremantolida C na concentração de 1000,0 µg/mL.

2.2.2.3.2 Seletividade

Para a avaliação da seletividade, soluções de eremantolida C nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4), na concentração de 20,0 µg/mL, foram colocadas em estufa, sendo expostas a calor seco de 70,0°C durante o período de 3 horas para os dois primeiros meios tamponados, e 1 hora para o meio TF (pH 7,4).

2.2.2.3.3 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados em uma série de medidas, e foi analisada de duas formas: repetibilidade (precisão intracorrida) e precisão intermediária (intercorrida) (BRASIL, 2003).

Ambas foram determinadas, para os meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4), em três níveis de concentração: baixa (15,0 µg/mL), média (45,0 µg/mL) e alta (75,0 µg/mL para os dois primeiros meios e 60,0 µg/mL para o TF), em triplicata.

A repetibilidade resultou em 9 determinações e a precisão intermediária, em 27 determinações, devido a necessidade de ser realizada em um mínimo de dois dias diferentes, sendo portanto, neste ensaio, realizada em três dias.

A precisão foi calculada conforme a equação matemática apresentada a seguir (Equação 2.2), e não foram admitidos valores superiores a 5,0% (BRASIL, 2003).

Equação 2.2: Equação matemática para o cálculo da precisão.

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100$$

Onde: DP – desvio padrão das concentrações experimentais determinadas
CMD – concentração média experimental determinada

2.2.2.3.4 Exatidão

Assim como a precisão, a exatidão deve ser calculada a partir de determinações em três níveis de concentração: baixa, média e alta, e em triplicata. Foram utilizadas as concentrações de 15,0; 45,0 e 75,0 µg/mL para os meios TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8), e as concentrações de 15,0; 45,0 e 60,0 µg/mL para o meio TF (pH 7,4).

A exatidão intracorrida e intercorrida foi determinada de acordo com a fórmula matemática indicada na Equação 2.3.

Os valores resultantes devem estar compreendidos na faixa de 95,0 a 105,0% (KUMAR et al., 2012).

Equação 2.3: Equação matemática para o cálculo da exatidão.

$$\text{EXATIDÃO} = \frac{\text{Concentração Média Experimental}}{\text{Concentração Teórica}} \times 100$$

2.2.2.3.5 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados utilizando os dados das curvas analíticas obtidas para a quantificação da eremantolida C nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).

O cálculo para os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foi realizado conforme as equações matemáticas a seguir (Equação 2.4) que levam em consideração os coeficientes angulares e lineares das curvas analíticas obtidas.

Equação 2.4: Equações matemáticas para o cálculo dos limites de detecção e quantificação.

$$LD = \frac{DPa \times 3}{b}$$

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{b}$$

Onde: DPa – desvio padrão dos coeficientes lineares da curva analítica
b – média das inclinações da curva analítica

2.2.2.3.6 Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações (RIBANI et al., 2004).

Sendo assim, a robustez do método analítico cromatográfico de quantificação da eremantolida C foi avaliada frente à variação dos seguintes parâmetros: volume de injeção, fluxo da fase móvel, temperatura do forno da coluna, comprimento de onda de detecção e proporção de solventes da fase móvel.

Cálculos da precisão e exatidão do método de quantificação da EREC na concentração de 45,0 µg/mL nos meios biorrelevantes: TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) foram realizados com o intuito de avaliar a robustez.

2.2.2.4 Miniaturização da técnica de solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frasco (“shake-flask”) adequando para a eremantolida C

A miniaturização da técnica de solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frasco (“shake-flask”) foi sugerida com base na padronização proposta por Monteiro (2014) para o fármaco de baixa solubilidade, nimesulida.

O intuito é adequar o procedimento para substâncias de baixa solubilidade que possuem poucas quantidades para a realização de testes dessa natureza.

Para isso utilizou-se o mínimo de meio biorrelevante possível e realizou-se os cálculos necessários para manter a proporção adequada de fármaco empregado para saturação dos meios tamponados, baseando-se em Monteiro (2014), conforme indicado na Tabela 2.3.

Tabela 2.3: Condições experimentais utilizadas na miniaturização da técnica de solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frasco.

Quantidade de nimesulida em excesso	0,6 mg
Volume de meio	10,0 mL
Temperatura	37,0°C
Velocidade de rotação	100 rpm
Alíquota coletada	150,0 µL
Tempo total do experimento	48 horas

As coletas foram realizadas em tempos pré-determinados e as alíquotas coletadas foram filtradas utilizando unidades filtrantes de 0,45 µm diretamente para os *vials* para posterior quantificação por método cromatográfico previamente validado. Curvas analíticas foram preparadas para cada meio biorrelevante, na faixa de concentração proposta por Monteiro (2014), para cada dia do experimento.

Houve avaliação do pH dos meios no início e no final do experimento.

2.2.2.5 Avaliação da solubilidade em equilíbrio da eremantolida C pelo método da agitação orbital em frasco (“shake-flask”)

A avaliação da solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frasco foi realizada pela primeira vez para a eremantolida C com o intuito de obter informações sobre a sua solubilidade ao longo do trato gastrointestinal, analisando o seu comportamento nos meios biorrelevantes TA (4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).

O experimento foi conduzido conforme as condições da Tabela 2.4.

Tabela 2.4: Condições experimentais utilizadas para a avaliação da solubilidade em equilíbrio da eremantolida C pelo método da agitação orbital em frasco.

Quantidade de substância em excesso	1,0 mg
Volume de meio	10,0 mL
Temperatura	37,0°C
Velocidade de rotação	100 rpm
Alíquota coletada	150,0 µL
Tempo total do experimento	72 horas

As coletas foram realizadas em tempos pré-determinados e as alíquotas coletadas foram filtradas utilizando unidades filtrantes de 0,45 µm diretamente para os *vials* para posterior quantificação por método cromatográfico previamente validado. Curvas analíticas foram preparadas para cada meio biorrelevante, na faixa de concentração proposta nesse trabalho, para cada dia do experimento.

Houve avaliação do pH dos meios no início e no final do experimento.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Desenvolvimento do método para quantificação da eremantolida C no fluido gástrico simulado sem enzimas - FGSSE (pH 1,2); tampão ácido clorídrico (pH 2,1); tampão acetato - TA (pH 4,5); fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato - TF (pH 7,4)

Henriques (2011) avaliou a estabilidade da eremantolida C em extrato etanólico de *Lychnophora trichocarpa* Spreng. e para isso utilizou as condições cromatográficas descritas na Tabela 2.5.

Tabela 2.5: Condições cromatográficas utilizadas por Henriques (2011) para a avaliação da estabilidade da eremantolida C.

Detector: DAD - λ 200 a 400 nm		
Coluna: C18 (150 x 4,6 mm; 3 μ m)		
Temperatura: 30,0°C		
Fluxo: 0,8 mL/minuto		
Volume de injeção: 10,0 μ L		
Fase móvel: Acetonitrila:Água (gradiente)		
Tempo (minutos)	% Acetonitrila	% Água
0 – 5	10	90
5 – 10	30	70
10 – 15	50	50
15 – 20	60	40
20 – 22	65	35
22 – 27	70	30
27 – 30	90	10
30 – 35	10	90

Por se tratar de um extrato etanólico, muitas outras substâncias estavam contidas na amostra, por isso a necessidade de um longo tempo de análise e o uso de eluição gradiente.

A eremantolida C, na condição proposta por Henriques, apresentou tempo de retenção de 16,8 minutos, eluindo na proporção de acetonitrila:água (60:40). Isto levou ao teste de duas condições isocráticas com esses solventes: acetonitrila:água (60:40) (Figura 2.1) e acetonitrila:água (50:50) (Figura 2.2). Além disso, testes com metanol:água (eluição gradiente - Tabela 2.6) foram realizados (Figura 2.3), já que a avaliação da pureza da substância ocorre utilizando essa fase móvel.

Tabela 2.6: Eluição gradiente, utilizando os solventes metanol:água, avaliada para a quantificação da eremantolida C.

Tempo (minutos)	% Metanol	% Água
0	70	30
10	85	15
15	95	5
20	70	30

A definição da fase móvel que foi utilizada para a quantificação da eremantolida C no FGSSE (pH 1,2), tampão ácido clorídrico (pH 2,1), TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) se deu comparando os parâmetros: resolução, fator de cauda e tempo de retenção (Tabela 2.7).

Os resultados obtidos para os parâmetros avaliados foram equiparáveis para os quatro meios tamponados nas três condições testadas.

Figura 2.1: Cromatograma obtido da eremantolida C em FISSE (pH 6,8) na concentração de 20,0 µg/mL utilizando fase móvel acetonitrila:água (60:40) – Condição 1.

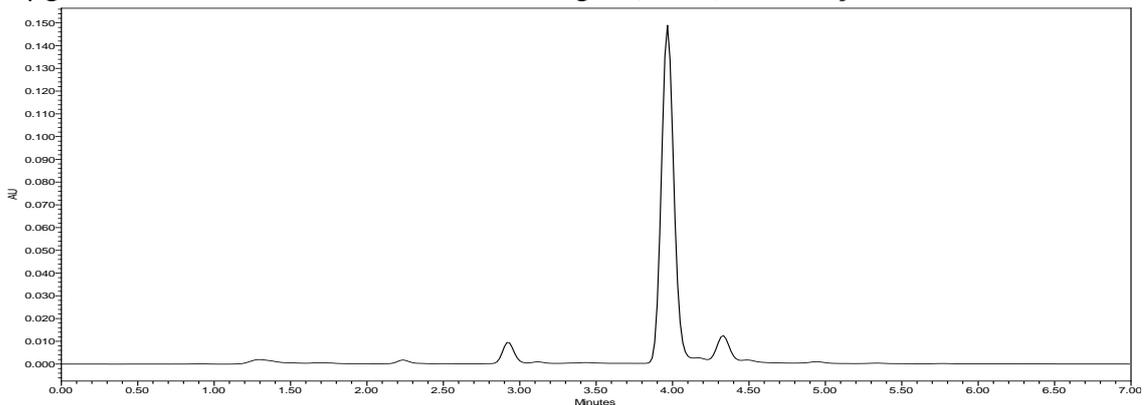


Figura 2.2: Cromatograma obtido da eremantolida C em FISSE (pH 6,8) na concentração de 20,0 µg/mL utilizando fase móvel acetonitrila:água (50:50) – Condição 2.

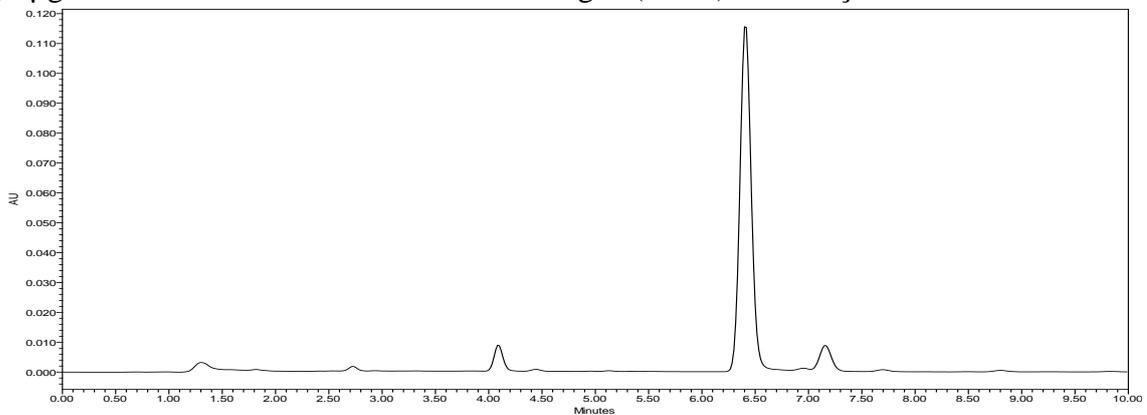


Figura 2.3: Cromatograma obtido da eremantolida C em FISSE (pH 6,8) na concentração de 20,0 µg/mL utilizando fase móvel metanol:água eluição gradiente – Condição 3.

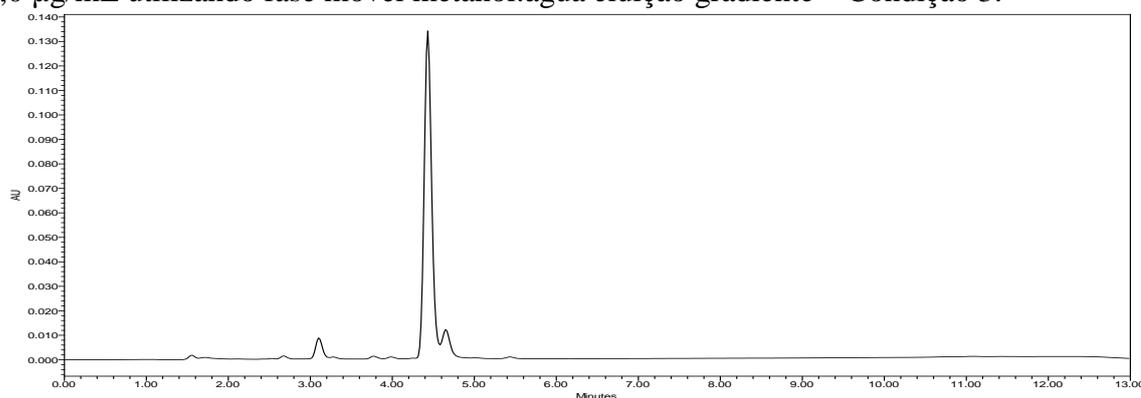


Tabela 2.7: Parâmetros cromatográficos: resolução, fator de cauda e tempo de retenção, obtidos nas três condições avaliadas.

Parâmetros	Condição 1	Condição 2	Condição 3
<i>Resolução</i>	1,6	2,2	0,6
<i>Fator de cauda</i>	0,7	1,0	1,5
<i>Tempo de retenção</i>	3,967	6,408	4,432

A resolução consiste na medida da distância entre dois picos adjacentes e quanto maior o seu valor, ou seja, quanto maior a distância entre os picos, melhor é a resolução (BRASIL, 2010).

O fator de cauda por sua vez, indica a simetria do pico, sendo que valores iguais a 1,0 indicam simetria total, e valores superiores ou inferiores indicam assimetria (BRASIL, 2010).

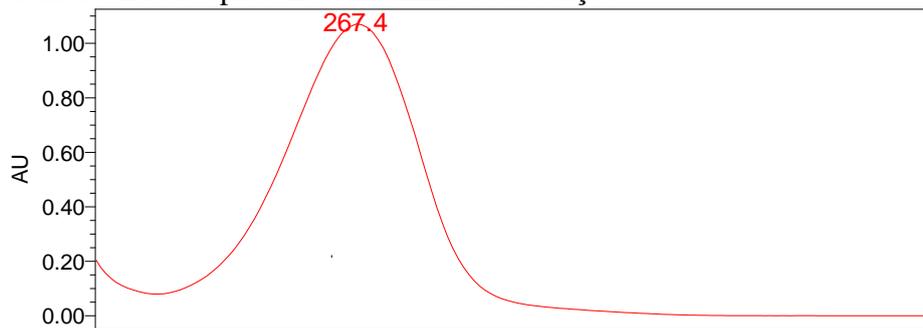
Com relação ao tempo de retenção tem-se que observar que, valores muito baixos não são adequados, pois se aproximam muito do tempo morto e isto pode gerar problemas na quantificação da substância de interesse. Entretanto, tempos de retenção muito longos, acarretam gasto excessivo de solvente e elevado tempo de análise de forma desnecessária. Todos os tempos apresentados são aceitáveis para o processo de quantificação da eremantolida C.

Uma vez definidos os parâmetros para as três condições, aquela que apresentou os melhores resultados foi a condição 2, com maior resolução entre os picos. Mesmo se tratando de uma substância purificada, algumas impurezas presentes em pequenas quantidades são aceitáveis uma vez que a obtenção de substâncias de origem natural com 100% de pureza é extremamente difícil. Entretanto, o fato do método fornecer picos bem resolvidos, e da eremantolida C se apresentar de forma majoritária, possibilitou o prosseguimento do trabalho com os estudos de solubilidade e permeabilidade. Além disso, a condição selecionada

proporcionou fator de cauda com valor igual a 1,0, indicando simetria total do pico da substância de interesse.

Por se tratar de uma substância purificada, optou-se pelo detector ultravioleta no comprimento de onda de 267 nm, para o qual a eremantolida C apresentou máximo de absorção (Figura 2.4).

Figura 2.4: Cromatograma extraído por CLAE-DAD demonstrando o comprimento de onda em que a eremantolida C apresentou máximo de absorção.



Visto isso, as condições cromatográficas de escolha para a quantificação da eremantolida C nos meios tamponados estão apresentadas no Quadro 2.2.

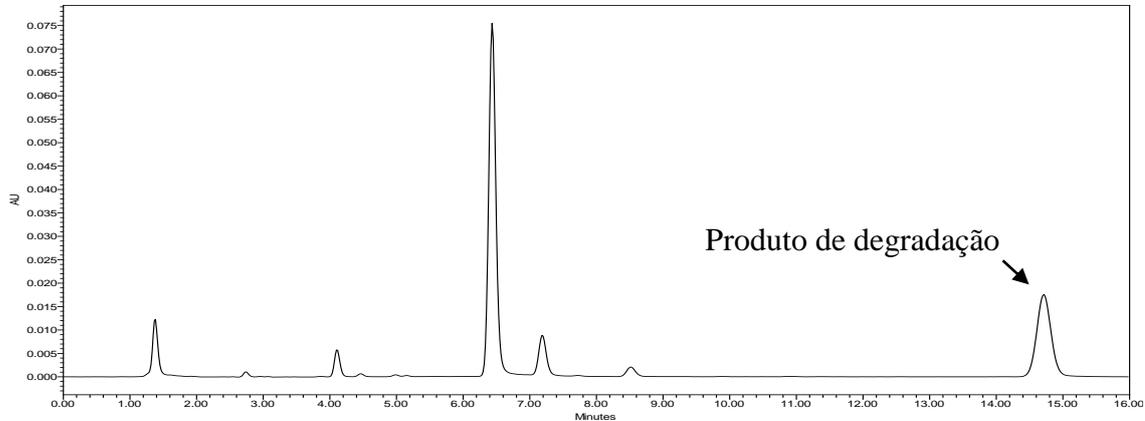
Quadro 2.2: Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação da eremantolida C nos meios tamponados.

Detector: UV- 267 nm
Coluna: C18 (150 x 4,6 mm; 3µm)
Temperatura: 30,0°C
Fluxo: 1,0 mL/minuto
Volume de injeção: 25,0 µL
Fase móvel: Acetonitrila:Água (50:50)

2.3.2 Estabilidade da eremantolida C no fluido gástrico simulado sem enzimas (pH 1,2) e no tampão ácido clorídrico (pH 2,1)

No período de desenvolvimento do método verificou-se que a eremantolida C não se apresentou estável no FGSSE (pH 1,2), em decorrência do aparecimento de um pico em 14,7 minutos, indicando a formação de um produto de degradação, logo após a quantificação de uma amostra na concentração de 20,0 µg/mL (Figura 2.5)

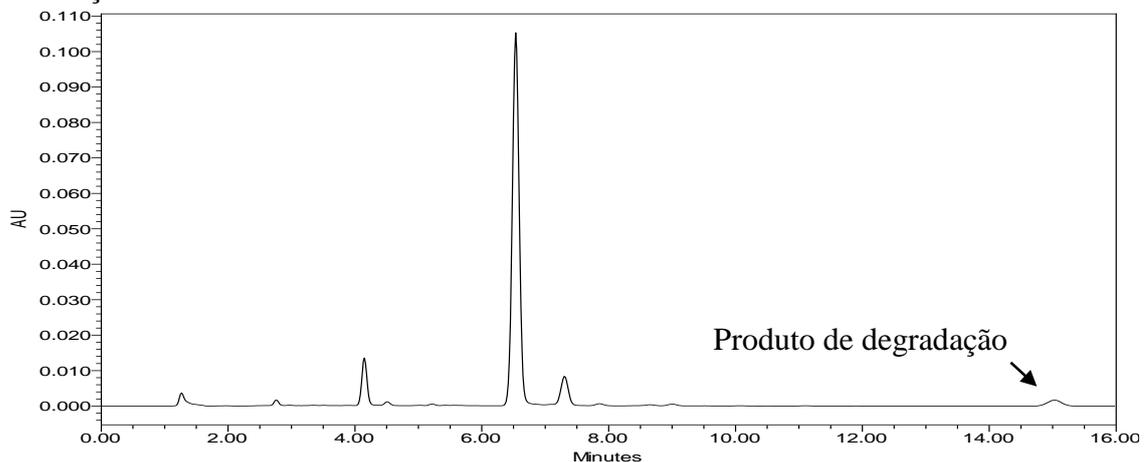
Figura 2.5: Cromatograma obtido da eremantolida C em FGSSE (pH 1,2) na concentração de 20,0 µg/mL, empregando as condições cromatográficas definidas para a quantificação da eremantolida C nos meios biorrelevantes.



Entretanto, a avaliação da solubilidade em equilíbrio de uma substância deve ser realizada em no mínimo três condições de pH, conforme preconizado pela RDC n° 37, de 3 de agosto de 2011 da Anvisa (BRASIL, 2011). Considerando-se que, sob condições de jejum, o pH no estômago varia de 1,4 a 2,1 (YU et al., 2002), optou-se pela avaliação da estabilidade da eremantolida C em tampão ácido clorídrico (pH 2,1), com o intuito de encontrar mais uma opção de meio tamponado para a realização dos testes de solubilidade em equilíbrio de forma que mimetizasse o pH estomacal.

Uma amostra na concentração de 20,0 µg/mL de eremantolida C foi preparada em tampão ácido clorídrico (pH 2,1) e levada imediatamente para quantificação e mais uma vez verificou-se a falta de estabilidade da substância, conforme mostrado na Figura 2.6.

Figura 2.6: Cromatograma obtido da eremantolida C em tampão ácido clorídrico (pH 2,1) na concentração de 20,0 µg/mL, empregando as condições cromatográficas definidas para a quantificação da eremantolida C nos meios biorrelevantes.



Dessa forma, verificou-se a inviabilidade de realizar experimentos de solubilidade em equilíbrio da eremantolida C em meios tamponados extremamente ácidos, como o FGSSE (pH 1,2) e o tampão ácido clorídrico (pH 2,1), devido a formação de produtos de degradação.

Esses resultados são extremamente úteis para orientar possíveis formulações farmacêuticas sólidas orais que venham a conter a eremantolida C, uma vez que, estas deverão apresentar um revestimento para resistir à ação do fluido estomacal, e impedir assim, a formação de produtos de degradação precocemente e a queda de concentração da substância, o que viriam a comprometer a eficácia e a segurança terapêutica.

2.3.3 Validação do método analítico para quantificação da eremantolida C no tampão acetato - TA (pH 4,5), fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato - TF (pH 7,4)

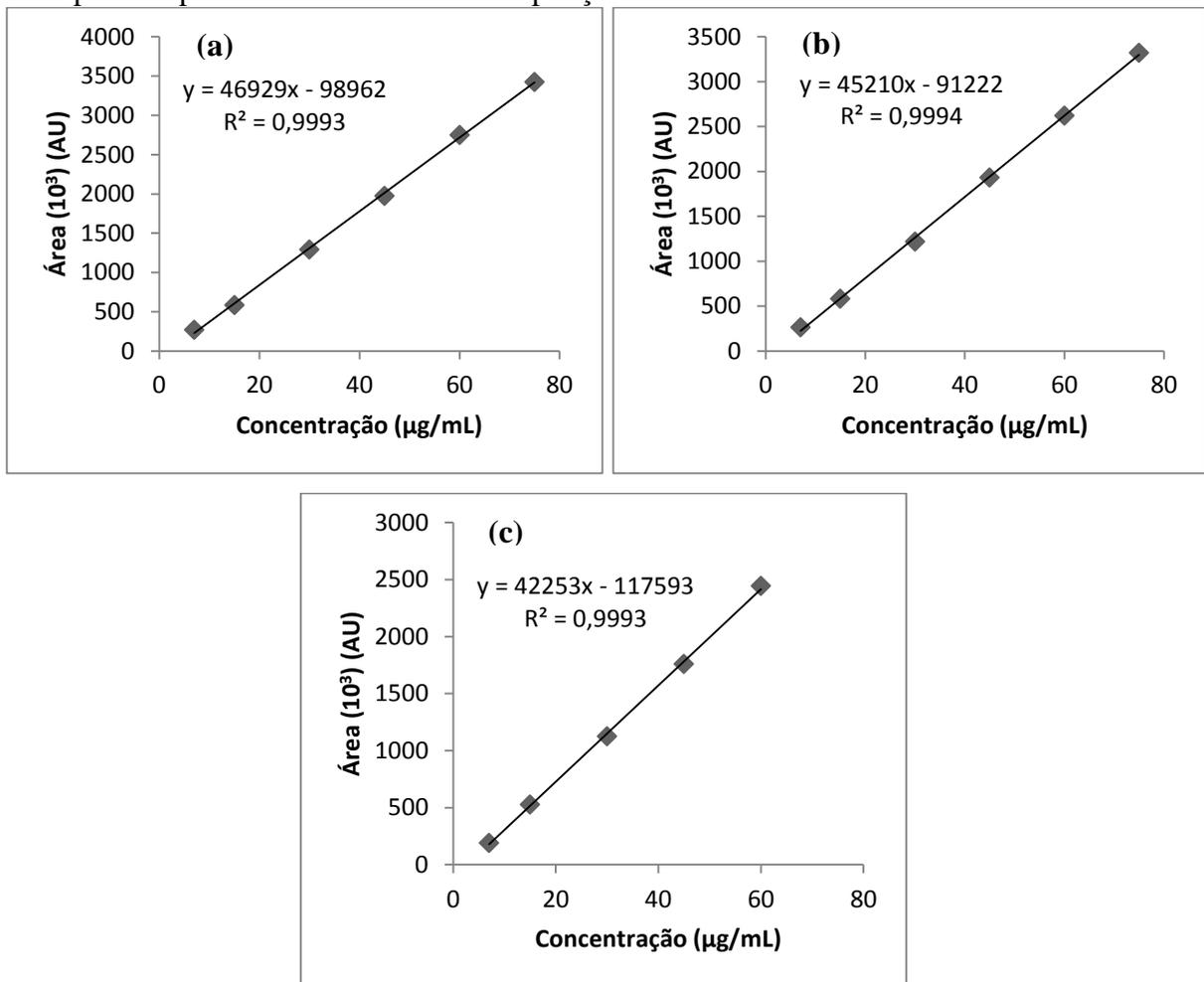
A validação de um método analítico tem como finalidade garantir que o método desenvolvido gere dados confiáveis e reprodutíveis, de forma que ele seja adequado ao objetivo proposto. Sendo assim, para a validação do método analítico de quantificação da eremantolida C no TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) foram avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação e robustez.

2.3.3.1 Linearidade

A linearidade demonstra que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração da amostra, dentro de um intervalo pré-determinado. Análises estatísticas e matemáticas devem ser realizadas de modo que o coeficiente de correlação mínimo aceitável seja de 0,99 (BRASIL, 2003).

Na Figura 2.7 estão demonstradas as curvas analíticas obtidas a partir da análise da eremantolida C nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).

Figura 2.7: Curvas analíticas para a avaliação da linearidade do método analítico de quantificação da eremantolida C em: (a) TA (pH 4,5); (b) FISSE (pH 6,8) e (c) TF (pH 7,4). Cada ponto representa a média das três repetições.



O método analítico mostrou-se linear tanto para a quantificação da eremantolida C em TA (pH 4,5) quanto em FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4), pois apresentou coeficientes de determinação (r^2) e correlação (r) superiores a 0,99, conforme demonstrado na Tabela 2.8.

Tabela 2.8: Parâmetros da regressão linear do método analítico de quantificação da eremantolida C em TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4). Coeficientes referentes à reta média das três repetições.

Parâmetro da regressão	TA (pH 4,5)	FISSE (pH 6,8)	TF (pH 7,4)
Coefficiente linear (a)	$-98962 \pm 2922,7$	$-91222 \pm 22938,4$	$-117593 \pm 11421,3$
Coefficiente angular (b)	$46929 \pm 837,0$	$45210 \pm 1363,7$	$42253 \pm 159,2$
Coefficiente de determinação (r^2)	0,9993	0,9994	0,9993
Coefficiente de correlação (r)	0,9996	0,9996	0,9996

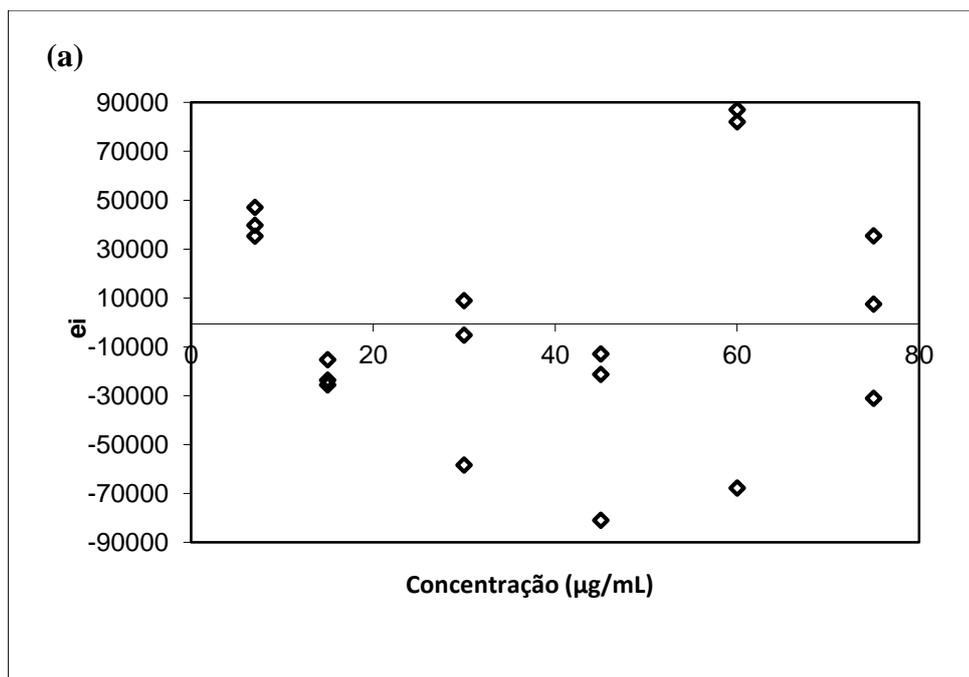
Além disso, com o intuito de complementar a análise da linearidade do método de quantificação da EREC nos três meios biorrelevantes em questão, foram realizadas a

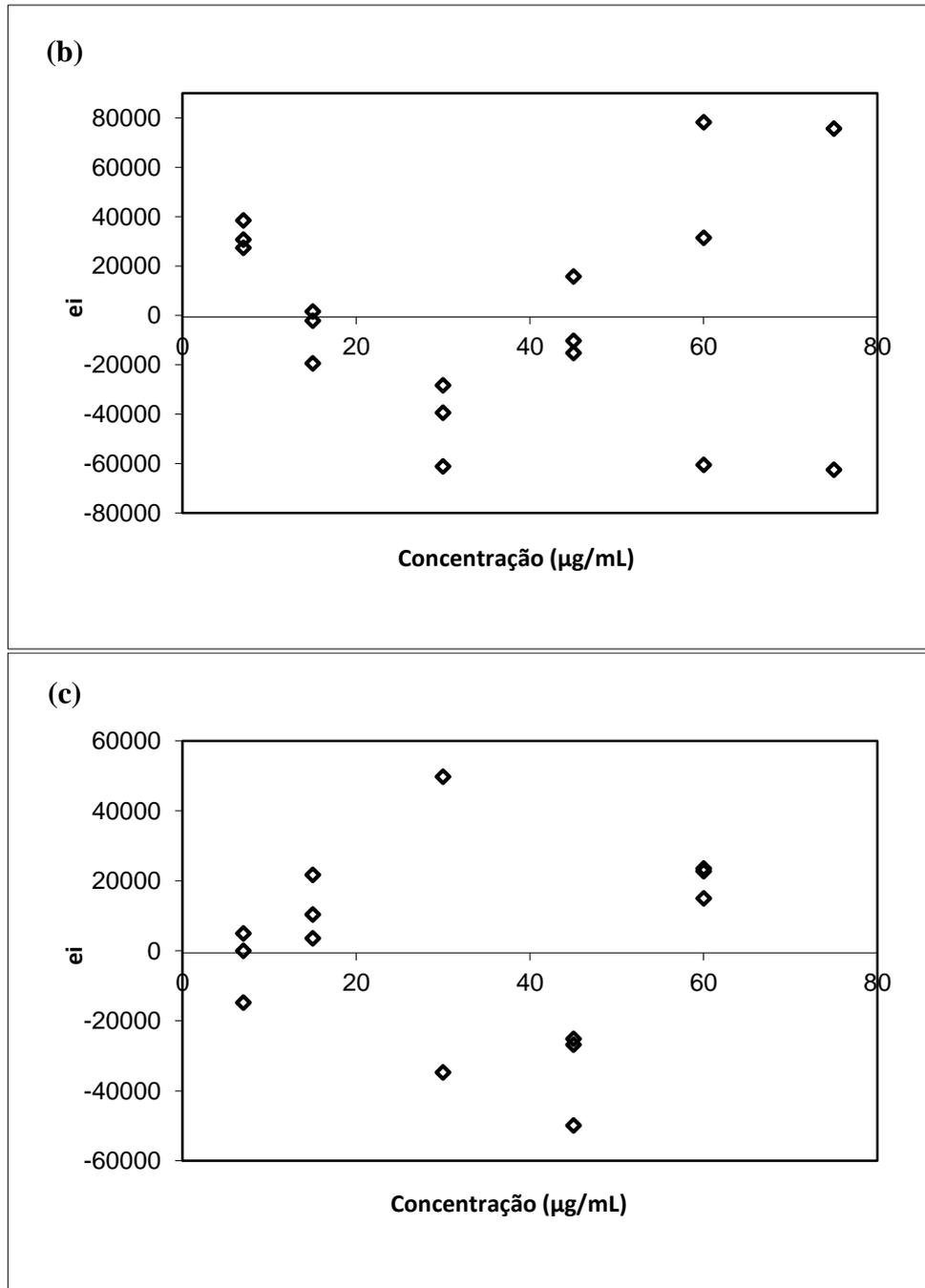
avaliação dos resíduos da regressão linear, bem como a análise das premissas relativas à regressão. Feito isso, testes para verificar a adequação do ajuste ao modelo linear por meio da significância da regressão e do desvio de linearidade foi avaliado utilizando a Análise de variância (ANOVA).

A avaliação dos resíduos da regressão linear foi conduzida por meio do teste padronizado de *Jackknife*. Dentre os três meios, foram detectados dois valores dispersos (“*outliers*”): um para o meio FISSE (pH 6,8) e um para o meio TF (pH 7,4). A exclusão de *outliers*, geralmente valores extremos que se encontram fora do intervalo proposto, poderia atingir no máximo 22,2% do total de dados originais (SOUZA et al., 2007).

Os gráficos de resíduos gerados para cada meio biorrelevante, após a exclusão dos *outliers*, encontra-se representado na Figura 2.8.

Figura 2.8: Gráficos de resíduos da regressão linear do método analítico de quantificação da eremantolida C em: (a) TA (pH 4,5), (b) FISSE (pH 6,8) e (c) TF (pH 7,4) após tratamento de *outliers*.





Durante a avaliação dos resíduos da regressão linear, as premissas que devem ser levadas em consideração são:

- **normalidade:** os resíduos assumem uma distribuição normal, assumindo uma disposição da curva de Gauss. Essa premissa é verificada por meio do teste de *Ryan-Joiner*;
- **homocedasticidade:** a variância apresentada pelos resíduos é constante. Essa premissa é verificada por meio do teste de *Brown-Forsythe*;
- **independência:** os resíduos devem ser independentes entre si, não havendo, portanto autocorrelação entre eles. Essa premissa é verificada por meio do teste de *Durbin-Watson*.

Após a avaliação das premissas, o desvio da linearidade e a significância da regressão também foram analisados utilizando a ANOVA. Todos os resultados obtidos para os três meios biorrelevantes foram compilados na Tabela 2.9.

Tabela 2.9: Valores encontrados para as premissas dos resíduos da regressão linear, desvio da linearidade e significância da regressão, provenientes da análise das curvas analíticas obtidas para os meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).

Avaliação	TA (pH 4,5)	FISSE (pH 6,8)	TF (pH 7,4)
<u>Normalidade</u>			
<i>Valor encontrado</i>	0,9873	0,9831	0,9847
<i>Valor de referência</i>	Maior que 0,9567	Maior que 0,9437	Maior que 0,9351
<u>Homocedasticidade</u>			
<i>Valor encontrado</i>	1,2700	1,4400	1,3400
<i>Valor de referência</i>	Menor que 2,1200	Menor que 2,1310	Menor que 2,1790
<u>Independência</u>			
<i>Valor encontrado</i>	1,6243	1,9650	2,0018
<i>Valor de referência</i>	Entre 1,3907 e 2,6093	Entre 1,3805 e 2,6195	Entre 1,3493 e 2,6507
<u>Desvio da linearidade</u>			
<i>Valor encontrado</i>	1,977	1,274	3,617
<i>Valor de referência</i>	Menor que 3,2592	Menor que 3,3567	Menor que 3,8625
<u>Significância da regressão</u>			
<i>Valor encontrado</i>	9511,65	8821,98	12336,18
<i>Valor de referência</i>	Maior que 4,4940	Maior que 4,5431	Maior que 4,7472

Após os dados expostos, o método para quantificação da eremantolida C nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) dentro do intervalo proposto foi considerado linear, uma vez que cumpriu com todos os requisitos necessários.

2.3.3.2 Seletividade

O método para a quantificação da eremantolida C nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) mostrou-se seletivo, uma vez que foi capaz de diferenciar a substância de interesse de outras substâncias, bem como dos seus produtos de degradação.

A comprovação da seletividade está indicada na Figura 2.9 para o meio TA (pH 4,5), na Figura 2.10 para o FISSE (pH 6,8) e na Figura 2.11 para o TF (pH 7,4).

Figura 2.9: Cromatograma obtido após submissão da amostra de eremantolida C em TA (pH 4,5) na concentração de 20,0 µg/mL a 70,0°C (calor seco) durante 3 horas.

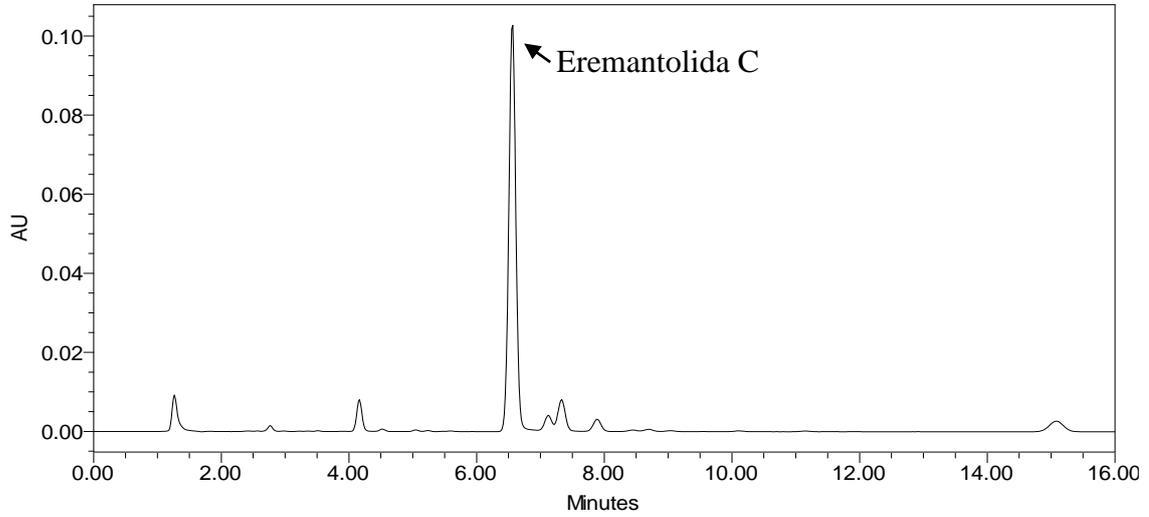


Figura 2.10: Cromatograma obtido após submissão da amostra de eremantolida C em FISSE (pH 6,8) na concentração de 20,0 µg/mL a 70,0°C (calor seco) durante 3 horas.

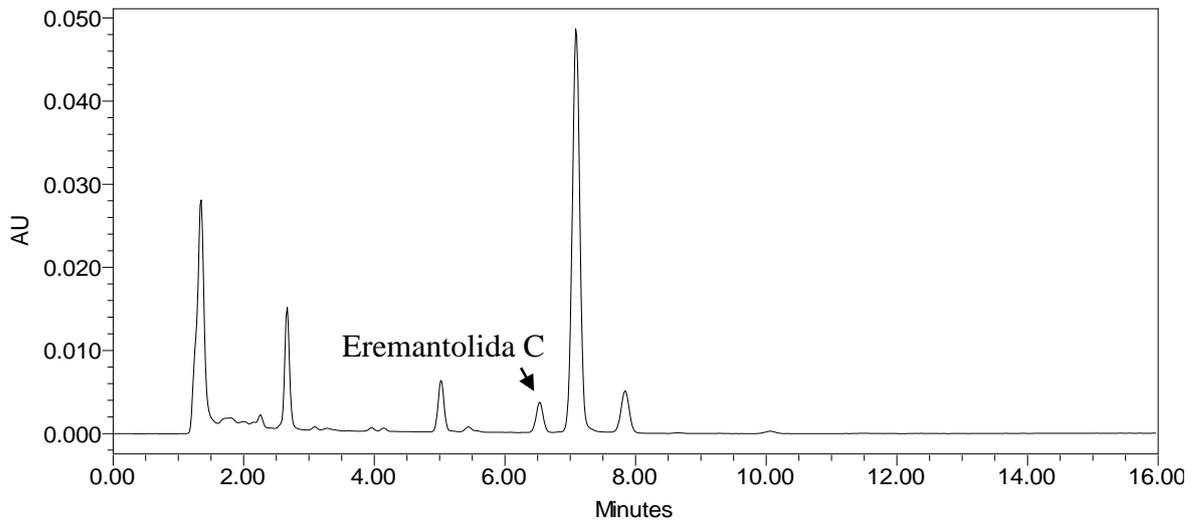
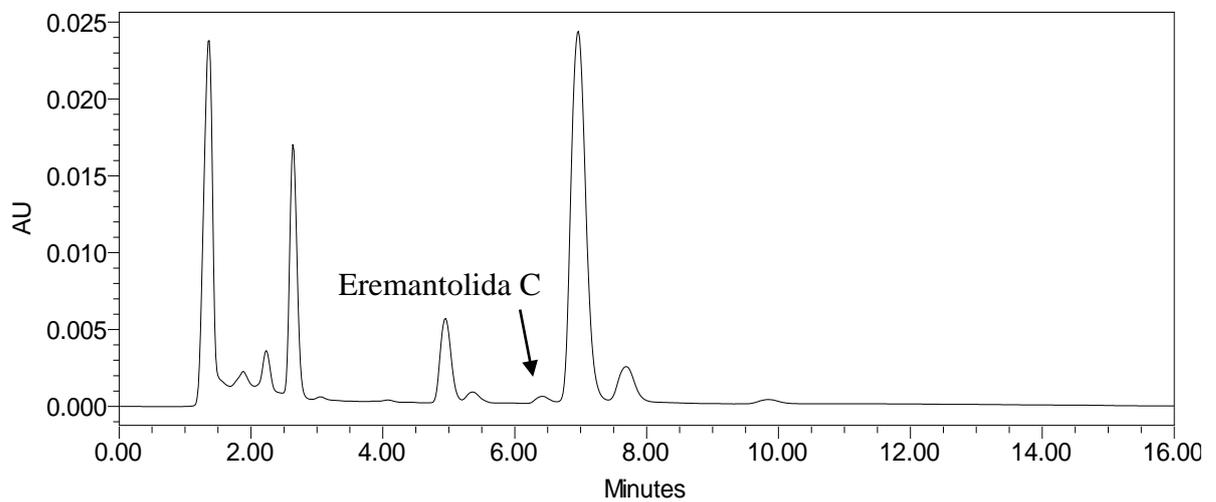


Figura 2.11: Cromatograma obtido após submissão da amostra de eremantolida C em TF (pH 7,4) na concentração de 20,0 µg/mL a 70,0°C (calor seco) durante 1 hora.



2.3.3.3 Precisão

A precisão intradia e interdia, em três dias diferentes, do método analítico foi avaliada e expressa por meio de valores de desvio padrão relativo (DPR%).

Os resultados referentes à precisão intradia e interdia para o meio TA (pH 4,5) estão apresentados na Tabela 2.10.

Tabela 2.10: Precisão intradia e interdia do método de quantificação da eremantolida C no meio TA (pH 4,5) (n = 3).

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental média (µg/mL)	DPR (%) Intradia/Interdia	
Resultados 1º dia			
15,0	14,54	0,80	2,88
45,0	44,18	1,79	
75,0	75,08	0,95	
Resultados 2º dia			
15,0	14,95	3,85	1,61
45,0	45,14	0,62	
75,0	76,49	1,24	
Resultados 3º dia			
15,0	14,70	3,42	2,04
45,0	44,20	1,52	
75,0	74,81	3,16	

Por sua vez, os resultados referentes à precisão intradia e interdia para os meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) estão apresentados nas Tabelas 2.11 e 2.12, respectivamente.

Tabela 2.11: Precisão intradia e interdia do método de quantificação da eremantolida C no meio FISSE (pH 6,8) (n = 3).

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental média (µg/mL)	DPR (%) Intradia/Interdia	
Resultados 1º dia			
15,0	14,92	1,66	3,39
45,0	44,73	0,82	
75,0	75,47	2,71	
Resultados 2º dia			
15,0	14,79	3,93	2,18
45,0	44,39	1,05	
75,0	75,70	0,14	
Resultados 3º dia			
15,0	15,21	4,60	1,43
45,0	42,77	0,40	
75,0	76,17	0,44	

Tabela 2.12: Precisão intradia e interdia do método de quantificação da eremantolida C no meio TF (pH 7,4) (n = 3).

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental média (µg/mL)	DPR (%) Intradia/Interdia	
Resultados 1º dia			
15,0	15,23	3,23	2,80
45,0	44,41	0,74	
60,0	60,64	0,18	
Resultados 2º dia			
15,0	15,06	2,76	1,20
45,0	43,49	1,06	
60,0	61,31	0,53	
Resultados 3º dia			
15,0	14,91	3,16	0,75
45,0	43,68	0,62	
60,0	61,21	0,92	

Os resultados encontrados para a precisão intradia e interdia estão de acordo com o preconizado pela RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da Anvisa (BRASIL, 2003), uma vez que apresentam valores de DPR% inferiores a 5,0%.

2.3.3.4 Exatidão

Assim como a precisão, a exatidão intradia e interdia foi avaliada, e os valores foram obtidos por meio da relação entre a concentração experimental média e a concentração teórica em três níveis de concentração: baixa, média e alta, que contemplam o intervalo linear.

Nas Tabelas 2.13, 2.14 e 2.15 estão apresentados os valores encontrados para a exatidão do método de quantificação da eremantolida C nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4), respectivamente.

Tabela 2.13: Exatidão intradia e interdia do método de quantificação da eremantolida C no meio TA (pH 4,5) (n = 3).

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental média (µg/mL)	Exatidão (%) Intradia/Interdia	
Resultados 1º dia			
15,0	14,54	96,94	98,20
45,0	44,18	98,18	
75,0	75,08	100,11	

(Continua)

(Continuação)

Resultados 2º dia			
15,0	14,95	99,64	98,90
45,0	45,14	100,30	
75,0	76,49	101,99	
Resultados 3º dia			
15,0	14,70	98,01	100,61
45,0	44,20	98,22	
75,0	74,81	99,75	

Tabela 2.14: Exatidão intradia e interdia do método de quantificação da eremantolida C no meio FISSE (pH 6,8) (n = 3).

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental média (µg/mL)	Exatidão (%) Intradia/Interdia	
Resultados 1º dia			
15,0	14,92	99,47	98,82
45,0	44,73	99,41	
75,0	75,47	100,63	
Resultados 2º dia			
15,0	14,79	98,58	97,70
45,0	44,39	98,65	
75,0	75,70	100,94	
Resultados 3º dia			
15,0	15,21	101,40	101,04
45,0	42,77	95,05	
75,0	76,17	101,56	

Tabela 2.15: Exatidão intradia e interdia do método de quantificação da eremantolida C no meio TF (pH 7,4) (n = 3).

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental média (µg/mL)	Exatidão (%) Intradia/Interdia	
Resultados 1º dia			
15,0	15,23	101,51	100,44
45,0	44,41	98,69	
60,0	60,64	101,06	
Resultados 2º dia			
15,0	15,06	100,41	97,47
45,0	43,49	96,65	
60,0	61,31	102,18	
Resultados 3º dia			
15,0	14,91	99,40	101,75
45,0	43,68	97,06	
60,0	61,21	102,01	

O método analítico para quantificação da eremantolida C nos meios biorrelevantes foi considerado exato, uma vez que apresentou exatidão intradia e interdia entre 95,0 e 105,0% (KUMAR et al., 2012).

2.3.3.5 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, enquanto que o limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração que pode ser quantificada com precisão e exatidão (BRASIL, 2003).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados a partir dos coeficientes angulares (b) e lineares (a) das curvas analíticas obtidas na avaliação do método de quantificação da eremantolida C nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4), e estão apresentados na Tabela 2.16.

Tabela 2.16: Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) calculados para o método de quantificação da eremantolida C nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).

Meio biorrelevante	LD ($\mu\text{g/mL}$)	LQ ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Tampão acetato (pH 4,5)</i>	0,19	0,62
<i>Fluido intestinal simulado sem enzimas (pH 6,8)</i>	1,52	5,07
<i>Tampão fosfato (pH 7,4)</i>	0,81	2,70

Os valores encontrados para ambos os limites, indicam que o intervalo proposto para a avaliação da linearidade está coerente, uma vez que o menor ponto da curva (7,0 $\mu\text{g/mL}$) é superior ao limite que o método é capaz de quantificar. Além disso, os valores para o LD foram inferiores ao LQ, indicando que o método é capaz de detectar valores bem mais baixos aos de quantificação.

2.3.3.6 Robustez

A robustez mede a capacidade de o método resistir a pequenas variações nos parâmetros analíticos, e assim, continuar oferecendo confiabilidade nos resultados gerados (BRASIL, 2003).

A robustez do método de quantificação da eremantolida C foi avaliada por meio de análises de amostras da substância na concentração de 45,0 $\mu\text{g/mL}$ nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4). Para isso, foram realizados os cálculos de precisão e exatidão

de forma que os valores encontrados deveriam ser inferiores a 5,0% para o primeiro parâmetro e estar compreendidos entre 95,0 e 105,0% para o segundo (BRASIL, 2003; KUMAR et al., 2012).

O método analítico foi submetido a cinco variações: volume de injeção, fluxo da fase móvel, temperatura do forno da coluna, comprimento de onda de detecção e proporção de solventes da fase móvel, com o intuito de verificar a sua sensibilidade.

Nas Tabelas 2.17, 2.18 e 2.19 estão apresentados os resultados obtidos de precisão e exatidão para os três meios biorrelevantes para cada variação a qual o método analítico foi submetido.

Tabela 2.17: Resultados de precisão e exatidão obtidos frente às variações dos parâmetros para a quantificação da eremantolida C em TA (pH 4,5) na concentração de 45,0 µg/mL.

Parâmetro	Variação	Precisão (DPR %)	Exatidão (%)
<i>Volume de injeção (µL)</i>	24,0	1,64	94,89
	25,0*	1,79	98,18
	26,0	1,39	102,58
<i>Fluxo da fase móvel (mL/minuto)</i>	0,9	2,78	110,63
	1,0*	1,79	98,18
	1,1	3,36	91,52
<i>Temperatura do forno da coluna (°C)</i>	29,0	3,38	99,86
	30,0*	1,79	98,18
	31,0	3,25	100,18
<i>Comprimento de onda de detecção (nm)</i>	266	3,31	99,59
	267*	1,79	98,18
	268	3,32	100,07
<i>Proporção da fase móvel ACN:Água (%)</i>	51:49	3,57	99,81
	50:50*	1,79	98,18
	49:51	3,55	100,07

* Condições utilizadas para quantificação da eremantolida C nos meios biorrelevantes. Em vermelho, valores que estão fora do preconizado.

Tabela 2.18: Resultados de precisão e exatidão obtidos frente às variações dos parâmetros para a quantificação da eremantolida C em FISSE (pH 6,8) na concentração de 45,0 µg/mL.

Parâmetro	Variação	Precisão (DPR %)	Exatidão (%)
<i>Volume de injeção (µL)</i>	24,0	0,44	91,36
	25,0*	0,82	99,41
	26,0	0,43	98,78
<i>Fluxo da fase móvel (mL/minuto)</i>	0,9	0,74	105,66
	1,0*	0,82	99,41
	1,1	0,62	87,42
<i>Temperatura do forno da coluna (°C)</i>	29,0	0,82	95,58
	30,0*	0,82	99,41
	31,0	0,65	95,59

(Continua)

(Continuação)

<i>Comprimento de onda de detecção (nm)</i>	266	0,57	95,08
	267*	0,82	99,41
	268	0,53	95,62
<i>Proporção da fase móvel ACN:Água (%)</i>	51:49	0,59	95,65
	50:50*	0,82	99,41
	49:51	0,67	95,94

* Condições utilizadas para quantificação da eremantolida C nos meios biorrelevantes. Em vermelho, valores que estão fora do preconizado.

Tabela 2.19: Resultados de precisão e exatidão obtidos frente às variações dos parâmetros para a quantificação da eremantolida C em TF (pH 7,4) na concentração de 45,0 µg/mL.

Parâmetro	Variação	Precisão (DPR %)	Exatidão (%)
<i>Volume de injeção (µL)</i>	24,0	0,69	92,81
	25,0*	0,74	98,77
	26,0	0,53	100,31
<i>Fluxo da fase móvel (mL/minuto)</i>	0,9	0,61	106,20
	1,0*	0,74	98,77
	1,1	0,51	87,48
<i>Temperatura do forno da coluna (°C)</i>	29,0	0,49	95,86
	30,0*	0,74	98,77
	31,0	0,71	95,81
<i>Comprimento de onda de detecção (nm)</i>	266	0,59	95,00
	267*	0,74	98,77
	268	0,61	95,98
<i>Proporção da fase móvel ACN:Água (%)</i>	51:49	0,96	95,80
	50:50*	0,74	98,77
	49:51	0,67	95,97

* Condições utilizadas para quantificação da eremantolida C nos meios biorrelevantes. Em vermelho, valores que estão fora do preconizado.

De acordo com os dados expostos, todos os valores encontrados para a precisão se encontraram abaixo de 5,0%, conforme o preconizado. Entretanto, duas variáveis implicaram diretamente na exatidão do método analítico de quantificação da eremantolida C nos meios biorrelevantes: volume de injeção e fluxo da fase móvel. Ambas necessitando, portanto de uma atenção especial para que dados confiáveis e reprodutíveis possam ser gerados durante a análise.

Dessa forma, o método de quantificação da eremantolida C pode ser considerado robusto para as variáveis: temperatura do forno da coluna, comprimento de onda de detecção e proporção de solventes da fase móvel.

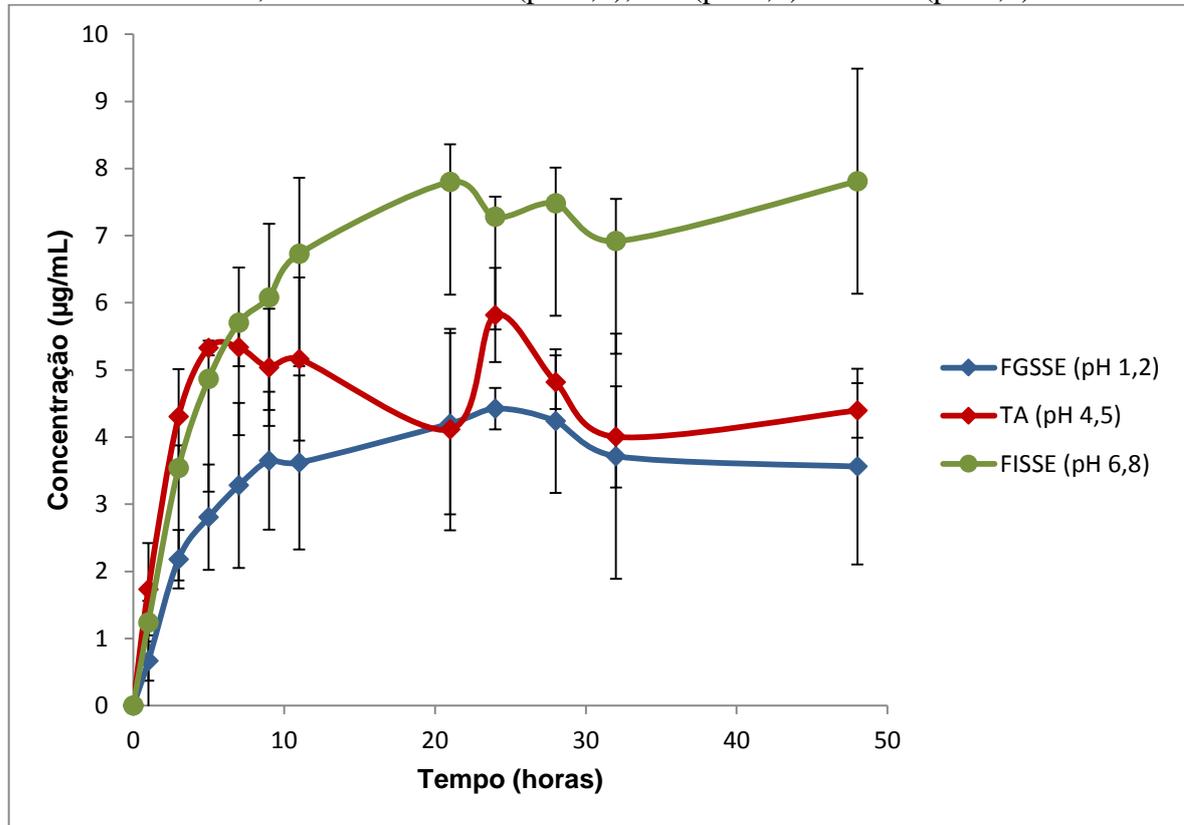
2.3.4 Miniaturização da técnica de solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frasco (“*shake-flask*”) adequando para a eremantolida C

A solubilidade é um dos parâmetros mais importantes a serem avaliados durante a seleção e otimização de novas substâncias candidatas a fármacos. Entretanto, geralmente, por estarem em processo de desenvolvimento, pequenas quantidades são sintetizadas e disponibilizadas para testes, havendo a necessidade de desenvolvimento de uma metodologia confiável, rápida e que faça uso de quantidades limitadas de substância (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; CHEN; VENKATESH, 2004; GLOMME; MÄRZ; DRESSMAN, 2005; DAI et al., 2008).

A miniaturização do método da agitação orbital em frasco surge como alternativa, uma vez que pode ser utilizado para todos os compostos e uma grande variedade de meios, apresentando alta precisão e rendimento (GLOMME; MÄRZ; DRESSMAN, 2005). Além disso, é a técnica citada pelas três agências regulatórias como de escolha para a avaliação da solubilidade e caso o fármaco em questão apresente solubilidade muito baixa, é o método mais confiável e utilizado (FDA 2000; EMA, 2010; BRASIL, 2011; DOMANSKA et al., 2011).

Baseada na padronização da solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frasco, proposta por Monteiro (2014), utilizando o fármaco de baixa solubilidade, nimesulida, considerou-se a possibilidade de miniaturização da técnica visando a avaliação da solubilidade em equilíbrio da eremantolida C, bem como de outras substâncias candidatas a fármacos. Na Figura 2.12 está indicado o perfil de solubilidade da nimesulida obtido pela miniaturização do método.

Figura 2.12: Perfil de solubilidade da nimesulida, obtido pelo método da agitação orbital em frasco miniaturizado, nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8).



Na Tabela 2.20 estão apresentados os dados de solubilidade encontrados para a nimesulida utilizando o método da agitação orbital em frasco miniaturizado, bem como, os dados encontrados por Monteiro (2014), a título de comparação das duas técnicas.

Tabela 2.20: Avaliação da solubilidade em equilíbrio da nimesulida pelo método da agitação orbital em frasco (“shake-flask”) miniaturizado e padronizado por Monteiro (2014).

Meio biorrelevante	Shake-flask miniaturizado			Shake-flask por Monteiro (2014)		
	SEM (mg/mL)	LogS (S: mol/L)	Tempo (horas)	SEM (mg/mL)	LogS (S: mol/L)	Tempo (horas)
FGSSE (pH 1,2)	0,0036	-4,93	9	0,0034	-4,95	7
TA (pH 4,5)	0,0053	-4,76	5	0,0064	-4,68	7
FISSE (pH 6,8)	0,0078	-4,59	21	0,0301	-4,01	10

SEM: Solubilidade experimental média (n=3); Tempo: tempo necessário para atingir o equilíbrio.

Os valores encontrados para a solubilidade experimental média (SEM) e consequentemente LogS, bem como o tempo para atingir o equilíbrio da nimesulida nos meios FGSSE (pH 1,2) e TA (pH 4,5) foram equiparáveis aos apresentados por Monteiro (2014). O perfil de solubilidade para o meio TA (pH 4,5) apresentou um desvio de solubilidade para os pontos T=21 e T=24, o que pode ser sugerido por algum erro por parte do

analista, uma vez que pequenas quantidades do fármaco são requeridas para o ensaio e a quantidade de volume coletado também é bem pequeno, o que acarreta em desvios e erros mais elevados.

A nimesulida para o FISSE (pH 6,8) mostra uma solubilidade dependente do pH, por apresentar um pKa igual a 6,4. Os valores encontrados para o método miniaturizado e o tradicional se diferem muito e isso pode ser justificado pelo fato de que a quantidade de matéria-prima a ser adicionada em solução é a etapa crítica para a análise de fármacos de baixa solubilidade (MONTEIRO, 2014).

A medida do pH das soluções saturadas no início e no final do experimento são utilizadas como indicativo de formação de produtos de degradação. Observou-se uma pequena variação de pH em todos os três meios, conforme apresentada na Tabela 2.21, evidenciando a possível formação de produtos de degradação, o que pode ser confirmado com o pequeno decaimento da concentração de nimesulida ao final do experimento.

Tabela 2.21: Avaliação do pH das soluções iniciais e finais do teste de solubilidade em equilíbrio da nimesulida pelo método da agitação orbital em frasco miniaturizado.

Meio biorrelevante	pH inicial	pH final
<i>Fluido gástrico simulado sem enzimas (pH 1,2)</i>	1,20	1,05
<i>Tampão acetato (pH 4,5)</i>	4,50	4,41
<i>Fluido intestinal simulado sem enzimas (pH 6,8)</i>	6,80	6,73

A miniaturização do método da agitação orbital em frasco é um procedimento possível, rápido e confiável para a avaliação da solubilidade de uma ampla variedade de compostos, em especial, substâncias candidatas a fármacos, que possuem poucas quantidades disponibilizadas para testes.

Entretanto, por se tratar de uma técnica miniaturizada e que, portanto requer pequenas quantidades de substâncias (etapa crítica para substâncias de baixa solubilidade) e pequenos volumes coletados, deve-se ter um cuidado maior no planejamento dos experimentos a fim de evitar grandes desvios e erros.

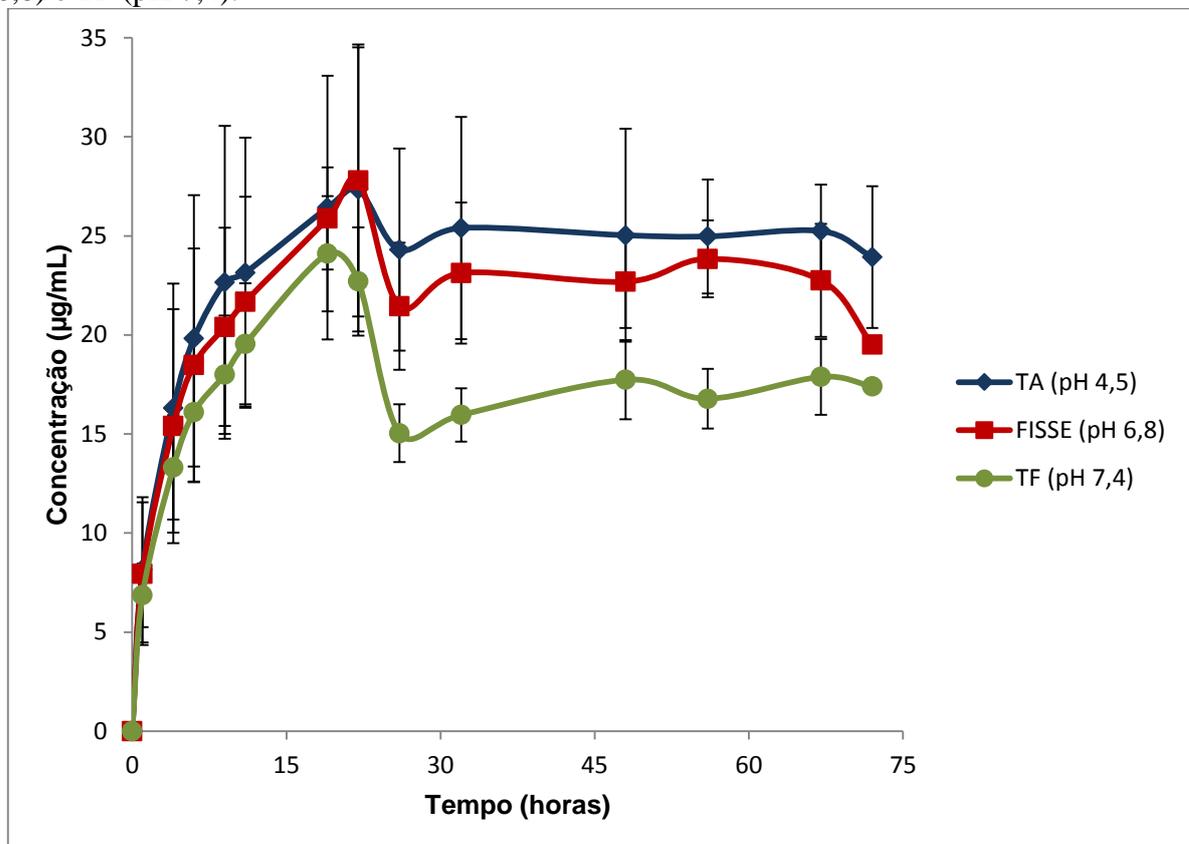
2.3.5 Avaliação da solubilidade em equilíbrio da eremantolida C pelo método da agitação orbital em frasco (“shake-flask”)

A eremantolida C por ser candidato a fármaco com comprovadas atividades anti-inflamatória, anti-hiperuricêmica, antiartrite gotosa, antitumoral e tripanossomicida, necessita da caracterização biofarmacêutica, com avaliações acerca de suas propriedades de

solubilidade e permeabilidade. Estas possibilitam analisar o seu grau de absorção no organismo e conseqüentemente a sua biodisponibilidade oral, fator crucial para a eficácia terapêutica de um fármaco.

A avaliação da solubilidade em equilíbrio da eremantolida C, pelo método da agitação orbital em frasco, foi realizada pela primeira vez com o intuito de definir o comportamento dessa substância ao longo de todo o trato gastrointestinal e os resultados obtidos estão representados na Figura 2.13.

Figura 2.13: Perfil de solubilidade da eremantolida C nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).



Por se tratar de uma substância nova, candidata a fármaco, o estudo de solubilidade em equilíbrio foi realizado por um período de 72 horas (ZHOU et al., 2007) e para três meios diferentes: TA (pH 4,5), FISSE (6,8) e TF (pH 7,4).

A Anvisa preconiza preferencialmente os meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (6,8) (BRASIL, 2011). Entretanto, a eremantolida C não apresentou estabilidade em meios extremamente ácidos como o FGSSE (pH 1,2) e o tampão ácido clorídrico (pH 2,1). Além disso, o intuito é avaliar o seu comportamento ao longo de todo o trato gastrointestinal,

abrangendo uma faixa de pH extensa, capaz de mimetizar desde o estômago (pH 1,2) até a porção final do intestino delgado (pH 7,4) (YU et al., 2002).

O equilíbrio foi atingido em 32 horas para os três meios biorrelevantes em questão. Variações no perfil de solubilidade foram observados para os três meios biorrelevantes, de forma mais discreta no TA (pH 4,5), no qual a EREC apresentou maior valor de solubilidade, e de forma mais pronunciada no TF (pH 7,4), onde o menor valor de solubilidade foi observado, conforme dados apresentados na Tabela 2.22. Isto sugere, que o comportamento da eremantolida C pode ser dependente do pH, apresentando melhores valores de solubilidade em equilíbrio para os meios TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8).

Tabela 2.22: Avaliação da solubilidade em equilíbrio da eremantolida C pelo método da agitação orbital em frasco (“*shake-flask*”).

Meio biorrelevante	SEM (mg/mL)	LogS (S: mol/L)	Tempo (horas)
TA (pH 4,5)	0,0254	-4,13	32
FISSE (pH 6,8)	0,0231	-4,18	32
TF (pH 7,4)	0,0160	-4,33	32

SEM: Solubilidade experimental média (n=3); Tempo: tempo necessário para atingir o equilíbrio.

A avaliação do pH dos meios biorrelavantes foi realizada no início e no final do experimento a fim de detectar a formação de produtos de degradação, uma vez que estes induzem a mudança de pH do meio. Na Tabela 2.23 estão indicadas pequenas variações de pH nos meios o que demonstra a formação de produtos de degradação. Isto pode ser confirmado pelo discreto decaimento da concentração de eremantolida C ao final do experimento de solubilidade em equilíbrio.

Tabela 2.23: Avaliação do pH das soluções iniciais e finais do teste de solubilidade em equilíbrio da eremantolida C.

Meio biorrelevante	pH inicial	pH final
Tampão acetato (pH 4,5)	4,50	4,52
Fluido intestinal simulado sem enzimas (pH 6,8)	6,80	6,77
Tampão fosfato (pH 7,4)	7,40	7,38

Diante dos resultados obtidos, a eremantolida C foi classificada como uma substância de baixa solubilidade, confirmando os dados estimados *in silico*.

A avaliação da solubilidade em equilíbrio da EREC no meio TF (pH 7,4), incomumente incluído nos estudos de solubilidade, foi extremamente importante pois possibilitou uma completa análise da extensão do comportamento dessa substância ao longo

de todo o trato gastrointestinal, auxiliando no processo de elucidação das características biofarmacêuticas do candidato a fármaco. Pois, caso a eremantolida C esteja contida em uma formulação que não se enquadra nos critérios de dissolução rápida, ou seja, não tenha no mínimo 85% de substância dissolvida em até 30 minutos, pode atingir o íleo na sua forma ainda não solubilizada (YU et al., 2002).

A eremantolida C por estar em processo de avaliação das suas características físico-químicas, ainda não possui uma dose definida para a administração oral em humanos. Visando a análise da solubilidade segundo as diretrizes do SCB, através do cálculo da razão dose/solubilidade (D/S), a extrapolação alométrica da dose de eremantolida C foi proposta para um humano de 70,0 kg tomando-se como base a dose de 25,0 mg/kg de EREC administrada a camundongos Swiss (0,025 kg), animal referência utilizado no estudo da atividade anti-hiperuricêmica, seguindo as equações descritas em Equação 2.5.

Equação 2.5: Equações utilizadas para a extrapolação alométrica da dose de eremantolida C em um humano de 70,0 kg tomando-se como animal referência o camundongo (0,025 kg). Cálculo baseado na taxa metabólica basal (TMB).

TMB do animal referência (TMB_{ref})

$$TMB_{ref} = K \times M^{0,75}$$

TMB do animal alvo (TMB_{alvo})

$$TMB_{alvo} = K \times M^{0,75}$$

$$Dose = \frac{Dose\ total\ do\ animal\ referência\ (mg)}{TMB_{ref}} \times TMB_{alvo}$$

Onde: TMB – taxa metabólica basal

K – constante dos grandes grupos taxonômicos (mamíferos placentários = 70)

M – massa corporal

Fonte: FREITAS; CARREGARO, 2013.

De acordo com os cálculos realizados, a dose extrapolada para um ser humano de 70,0 kg possibilitaria a administração de 240,0 mg de eremantolida C, por via oral, para o tratamento da hiperuricemia. Considerando esse valor, foi possível o cálculo da razão dose/solubilidade (D/S), o que veio a confirmar a baixa solubilidade da EREC segundo as diretrizes do SCB, uma vez que esta apresentou D/S muito superior ao valor preconizado de 250 mL, conforme demonstrado na Tabela 2.24.

Tabela 2.24: Razão dose/solubilidade (D/S) da eremantolida C encontrada para os meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4), a partir da extrapolação alométrica de dose.

Meio biorrelevante	D/S (mL)
<i>TA (pH 4,5)</i>	9448,82
<i>FISSE (pH 6,8)</i>	10389,61
<i>TF (pH 7,4)</i>	15000,00

2.4 CONCLUSÃO

O método proposto para a quantificação da eremantolida C nos meios biorrelevantes TA (4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (7,4) mostrou-se linear, seletivo, preciso, exato e robusto para as variáveis: temperatura do forno da coluna, comprimento de onda de detecção e proporção de solventes da fase móvel, sendo críticas as condições cromatográficas: volume de injeção e fluxo da fase móvel.

A miniaturização do método de agitação orbital em frasco utilizando o fármaco de baixa solubilidade, nimesulida, foi possível. Há a necessidade, assim como no método convencional, de minimizar o excesso de fármaco a ser acrescentado no meio. Entretanto, a miniaturização é um ganho para substâncias candidatas a fármacos, principalmente as de origem natural, uma vez que pequenas quantidades serão requeridas e o método oferecerá a mesma confiabilidade, rapidez e rendimento.

A solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frasco por sua vez, veio confirmar os dados obtidos *in silico* para a solubilidade da eremantolida C: baixa solubilidade. Indicando resultado de D/S, a partir da dose extrapolada para humanos, bem superior ao preconizada pelo SCB.

CAPÍTULO III

AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE *IN VITRO* DA EREMANTOLIDA C PELO MÉTODO PAMPA

3.1 REVISÃO DA LITERATURA

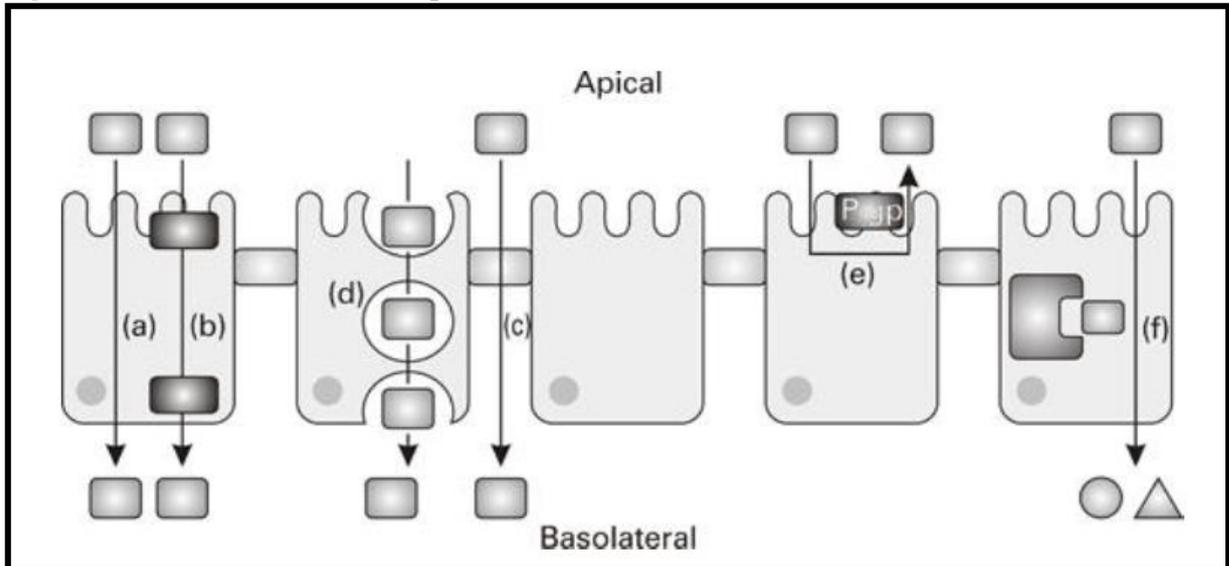
3.1.1 Permeabilidade de fármacos

Apesar de enormes inovações nos métodos de administração de fármacos terem sido propostas nos últimos anos, a via oral ainda permanece como preferida. Isto ocorre em virtude da sua conveniência, baixo custo e elevada adesão do paciente em comparação com técnicas alternativas. No entanto, compostos destinados a essa administração devem ter adequadas solubilidade aquosa e permeabilidade intestinal a fim de atingir devidas concentrações terapêuticas na circulação sistêmica (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007).

A permeabilidade intestinal é a capacidade que o composto tem de atravessar a membrana biológica e pode variar conforme sua localização no trato gastrointestinal. Sendo o duodeno, porção inicial do intestino delgado, o responsável por aproximadamente 90% de toda a absorção (GRASS, 1997; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

O transporte de fármacos através da membrana intestinal é um processo complexo e dinâmico. Os enterócitos são as células intestinais responsáveis pela maior parte da absorção de nutrientes e de fármacos nessa região. Entre os enterócitos existem junções, que são responsáveis pela união e aderência entre as células, e também participam do procedimento de permeação, já que esta é a principal rota de pequenas moléculas hidrofílicas. Entretanto o transporte de fármacos ocorre em vários percursos em paralelo e os mecanismos mais comuns de permeação se dão através dos enterócitos ou das junções intercelulares por difusão passiva, procedimentos nomeados de transcelular e paracelular, respectivamente. Além disso, processos mediados por transportadores, tanto de influxo quanto de efluxo, e endocitose, também são comuns (Figura 3.1) (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Figura 3.1: Mecanismos de transporte de fármacos através da membrana intestinal.



(a) Transporte passivo transcelular; (b) transporte mediado por carreadores de membrana; (c) transporte passivo paracelular; (d) transporte vesicular. Nas letras (e) e (f) estão representados dois mecanismos que impedem a absorção intestinal, nomeados respectivamente por: transporte mediado por carreadores de excreção e enzimas metabolizadoras.

Fonte: GONÇALVES; SOUZA; STORPIRTIS, 2009.

A permeabilidade de substâncias é afetada por diversos fatores, dentre eles, podem ser citados: fatores fisiológicos relacionados ao trato gastrointestinal, características físico-químicas do fármaco e influência da forma farmacêutica e seus excipientes (ASHFORD, 2005; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007).

Dentre os fatores fisiológicos destacam-se o tempo de esvaziamento gástrico e o trânsito intestinal das diversas formas farmacêuticas. O primeiro é mais lento em presença de alimento, e o segundo menos afetado pelas condições alimentares. Além disso, alterações como: mudança no pH gastrointestinal, presença de enzimas no lúmen, estados de doença, distúrbios fisiológicos e espessura da camada de água estacionária são parâmetros que devem ser levados em consideração, uma vez que, todos constituem barreiras para absorção do fármaco e conseqüentemente para promover uma boa biodisponibilidade (ASHFORD, 2005; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007).

Com relação ao fármaco, as propriedades físico-químicas são as principais determinantes da permeabilidade intestinal. Isto inclui o peso e tamanho molecular, pKa, caráter lipofílico e a solubilidade, que, juntamente com a permeabilidade, são parâmetros essenciais para a biodisponibilidade oral (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Fatores inerentes às formas farmacêuticas sólidas, administradas por via oral, tais como, velocidade e extensão de desintegração e dissolução, além do uso de excipientes que

influenciam na velocidade e/ou extensão de absorção, também devem ser levados em consideração (ASHFORD, 2005; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007).

3.1.2 Permeabilidade segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica

De acordo com o SCB, um fármaco é considerado altamente permeável, quando apresenta extensão de absorção superior ou igual a 90% e não exibe qualquer instabilidade documentada no trato gastrointestinal (MARTINEZ; AMIDON, 2002).

O limite, para fármacos de alta permeabilidade, preconizado pelo FDA está em concordância com o estabelecido por Martinez e Amidon (2002), ou seja, o grau de absorção apresentado deve ser superior ou igual a 90% (FDA, 2000).

Segundo o FDA (2000), a medida de permeabilidade baseia-se indiretamente na extensão da absorção (fração da dose absorvida) do fármaco em humanos e diretamente nas medições da velocidade de transferência de massa através da membrana intestinal. Alternativamente, métodos *in vitro* de cultura de células epiteliais, podem ser utilizados (FDA, 2000).

Por sua vez, é preconizado pela EMA, Anvisa e OMS que um fármaco é considerado de alta permeabilidade quando apresenta grau de absorção superior ou igual a 85%. A EMA, assim como o FDA, também defende estudos de biodisponibilidade absoluta ou balanço de massas para a determinação da extensão de absorção (WHO, 2006; EMA, 2010; BRASIL, 2013).

Os critérios para a elegibilidade quanto à bioisenção preconizados por cada agência regulatória estão reunidos no Quadro 3.1 apresentado a seguir.

Quadro 3.1: Critérios de permeabilidade para a elegibilidade quanto à bioisenção preconizados pela Anvisa, EMA, FDA e OMS.

Anvisa Absorção superior ou igual a 85%	EMA Absorção superior ou igual a 85%
FDA Absorção superior ou igual a 90%	OMS Absorção superior ou igual a 85%

Fonte: FDA 2000; WHO, 2006; EMA 2010; BRASIL, 2013.

Juntamente com a solubilidade, a permeabilidade é um parâmetro importante para a classificação segundo o SCB e no limite de absorção de fármacos, principalmente, das classes III e IV. No entanto, ao contrário da solubilidade, a correção da permeabilidade por meio de formulação é extremamente difícil e raramente bem sucedida (FALLER, 2008).

Na literatura há relatos de excipientes que alteram a motilidade intestinal, influenciando o tempo do trânsito gastrointestinal e conseqüentemente a absorção de fármacos. O trânsito de um fármaco pelo trato gastrointestinal determina o período em que este ficará em contato com o seu local de absorção. Uma vez alterado, pode acarretar em redução da biodisponibilidade oral do fármaco, comprometendo a sua eficácia (YU et al, 2002; OLIVEIRA; MANZO, 2009). Dessa forma, a permeabilidade almejada ainda é melhor obtida por meio da otimização da própria molécula (FALLER, 2008).

O conhecimento em relação à permeabilidade de um fármaco, bem como de seus mecanismos de absorção, constitui etapa fundamental na determinação da via de administração e no desenvolvimento de uma formulação farmacêutica. Visto isso, para a determinação e caracterização da permeabilidade seguindo as diretrizes do SCB, diversos modelos têm sido empregados. Os mais difundidos são: métodos *in vivo* que contemplem os estudos farmacocinéticos em animais ou seres humanos; métodos *in situ*, que consistem da perfusão do fármaco em determinados trechos do epitélio intestinal; métodos *in vitro* que são subdivididos em àqueles baseados em sistemas celulares, tais como segmentos de tecidos animais e cultura celulares, e os que utilizam de sistemas artificiais, exemplificados pelo ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA); e por fim, métodos *in silico*, que empregam programas computacionais para a previsão de permeabilidade dos fármacos (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; FDA, 2000; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007; DEZANI, 2010; REIS, 2013).

3.1.3 Métodos utilizados para a avaliação da permeabilidade de fármacos

3.1.3.1 Métodos *in situ*

Perfusão *in situ*, de segmentos intestinais de roedores, é frequentemente usada para estudar a permeabilidade e cinética de absorção de fármacos (GRASS, 1997; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

O método consiste na perfusão da solução de fármaco, preparada em tampão fisiológico, através de segmentos intestinais canulados. A absorção é avaliada com base no

desaparecimento do fármaco a partir do lúmen intestinal (GRASS, 1997; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

A maior vantagem do sistema *in situ* em comparação com as técnicas *in vitro* é a presença de circulação sanguínea e do sistema nervoso nos animais experimentais. No entanto, possui como desvantagens o fato do método se basear no desaparecimento do composto a partir do lado do lúmen intestinal como indicativo de permeabilidade. Este fenômeno nem sempre representa a real absorção do fármaco para a circulação sistêmica, uma vez que, vários são os compostos que passam por metabolismo pré-sistêmico ou na luz intestinal. Também são fatores que constituem desvantagens para a técnica, as variações devido às condições hidrodinâmicas e devido à manipulação do intestino combinado com a anestesia (o que acarreta em mudança significativa do fluxo sanguíneo), bem como o elevado custo devido ao grande número de animais para obter dados de absorção significativos (GRASS, 1997; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

3.1.3.2 Métodos *in vitro* baseados em sistemas celulares e tecidos animais

3.1.3.2.1 Células Caco-2

As células Caco-2 são provenientes de adenocarcinoma de cólon humano e possuem a capacidade de se diferenciarem em células intestinais de absorção durante a cultura celular, adquirindo características como: microvilosidades, enzimas de hidrólise, transportadores de íons, peptídeos e açúcares, além de realizar tanto o transporte passivo quanto alguns tipos de transporte ativo de fármacos. (HILGERS; CONRADI; BURTON, 1990; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; SOUZA et al., 2009; GONÇALVES et al., 2012).

Apesar das grandes vantagens descritas, estudos de permeabilidade utilizando células Caco-2 apresentam algumas desvantagens, tais como, a demora em se obter células viáveis para a realização dos testes, pois é necessário um período de 21 dias de incubação, o que acaba gerando também um aumento do risco de contaminação microbiana; a diferença significativa entre os níveis de expressão de transportadores das células Caco-2 e do intestino humano, já que, foram observados testes em que fármacos que são bem absorvidos *in vivo* apresentaram baixa permeabilidade *in vitro*, quando avaliadas pelo sistema celular. São relatados também problemas correlacionados com a camada de água estacionária formada, a seleção do pH dos meios doadores e receptores e o uso de co-solventes (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007; GONÇALVES; SOUZA; STORPIRTIS, 2009; GONÇALVES et al., 2012).

Apesar dessas limitações, o método baseado em células Caco-2 é um dos modelos de cultura celular intestinal mais utilizado no momento, pois é capaz de fornecer tanto informações acerca do transporte passivo quanto do transporte por carreadores, gerando informações valiosas na predição da permeabilidade de novas substâncias candidatas a fármacos (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007).

3.1.3.2.2 Células MDCK

As células *Madin-Darby* de rim canino (MDCK), como o próprio nome já diz é proveniente de rim canino e possuem a capacidade de se diferenciarem em células colunares, com junções semelhantes às formadas por células Caco-2. Apresentando como grande vantagem, a necessidade de um curto período de tempo (três dias) para se tornarem aptas ao estudo de permeabilidade, reduzindo assim o risco de contaminação microbiana e os custos relativos ao estudo (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Apesar disso, o fato de serem provenientes de origem não intestinal, acarreta na expressão reduzida ou inexistente de alguns transportadores de fármacos, gerando falsos resultados de permeabilidade, quando comparados com o grau de absorção apresentado *in vivo* (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007).

Visando contornar essa deficiência de transportadores, uma linhagem celular modificada foi desenvolvida, a MDCK-MDR1, na qual um gene humano, MDR1, foi incorporado à linhagem celular, dando características de transporte de secreção devido a uma maior expressão da glicoproteína P (Pgp) e outros carreadores responsáveis por esse tipo de transporte (GONÇALVES; SOUZA; STORPIRTIS, 2009).

Assim como as células Caco-2, as células MDCK apresentam diversas limitações, entretanto, é um recurso extremamente útil para a predição da absorção de novas substâncias candidatas a fármacos.

3.1.3.2.3 Ensaio *in vitro* com tecido invertido

O ensaio com tecido invertido utiliza porções de intestino de animais, geralmente ratos, na sua forma invertida, que é imerso em uma solução tampão contendo o fármaco, com o intuito de avaliar o transporte da porção mucosa para a parte serosa. Dessa forma, fornecendo informações tanto sobre o transporte ativo, quanto sobre o transporte passivo de fármacos (GRASS, 1997; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007).

Esse modelo tem como vantagem adicional sobre outros métodos *in vitro*, o fato do volume de amostra no lado seroso ser relativamente pequeno levando ao acúmulo mais rápido de fármacos, necessitando assim, de pequenas quantidades para o teste. Entretanto, devido à ausência de suprimento sanguíneo e inervação, esses tecidos apresentam reduzida viabilidade. Além disso, a inversão do tecido pode acarretar alterações morfológicas, e conseqüentemente comprometer o grau de absorção apresentado no estudo (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007).

3.1.3.2.4 Ensaio *in vitro* com tecido não-invertido

Segmentos de tecidos intestinais de animais são dispostos entre aparatos bicompartimentais, um doador e outro receptor, geralmente, câmaras de Ussing (horizontal) ou células de Franz (vertical), de modo que o lado mucoso fique voltado para o compartimento doador e a porção serosa, para o compartimento receptor. A absorção é baseada no aparecimento do fármaco no lado seroso a partir do desaparecimento no lado mucoso (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007).

As desvantagens desse método são comuns às outras técnicas que utilizam tecidos animais: ausência de circulação sanguínea e inervação, além da rápida perda de viabilidade dos tecidos durante o estudo devido alterações morfológicas (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Apesar disso, é extremamente útil na predição da permeabilidade de fármacos em processo de descoberta, uma vez que requer pequenas quantidades do composto, e é capaz de expressar ambos os transportes, ativo e passivo (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DEZANI, 2010).

3.1.3.3 Métodos *in vitro* baseados em sistemas artificiais

3.1.3.3.1 Ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA)

O ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela, PAMPA, foi proposto por Kansy, Senner e Gubernator (1998) e consiste na estimativa da absorção passiva de moléculas por meio da avaliação da sua permeabilidade através do processo transcelular, já que não há expressão de transportadores e/ou processo de metabolismo.

O método consiste na formação de um “sanduíche” empregando duas placas. Uma funciona como o compartimento doador, na qual a substância a ser avaliada está solubilizada

em tampão, e a outra, como o compartimento receptor, que recebe apenas solução tampão para mimetizar as condições sanguíneas. Entre elas, um filtro recebe impregnação lipídica dando origem a uma membrana com a finalidade de reproduzir a mucosa intestinal, por onde a substância migrará por difusão passiva (KANSY; SENNER; GUBERNATOR, 1998; REIS, 2013).

O uso de placas de 96 poços juntamente com a determinação rápida de propriedades de permeabilidade relacionadas com a via passiva de absorção torna esse sistema um modelo muito interessante para avaliação de um grande número de substâncias. Além disso, pode produzir informações sobre o caráter lipofílico, o estado de ionização e a solubilidade do composto, de forma rápida e com baixo custo. Somado a isso, existe ainda o fato de ser uma técnica menos trabalhosa, que não faz o uso de animais e/ou culturas celulares e os resultados obtidos são plenamente equiparáveis aos demais modelos (KANSY; SENNER; GUBERNATOR, 1998; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

O fato de se conhecer a permeabilidade de uma substância por difusão passiva também possibilita a realização de modificações estruturais a fim de otimizar essa permeabilidade, uma tarefa mais fácil quando comparada ao processo de otimização de afinidade pelo transportador, em se tratando de transporte ativo. Os compostos obtidos após este processo podem ser rapidamente submetidos a um estudo empregando o modelo PAMPA para avaliar se ocorreu alguma alteração na permeabilidade, já que apenas pequenas quantidades do composto são requeridas (KERNS et al., 2004).

Dessa forma, o PAMPA é considerado um método ideal para avaliação da absorção durante o período exploratório e de descoberta de novos fármacos (KERNS et al., 2004).

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Materiais

3.2.1.1 Substância natural biologicamente ativa

A eremantolida C, sólido incolor com ponto de fusão de 213,6°C - 215,0°C foi previamente isolada do extrato clorofórmico de *Lychnophora trichocarpha* Spreng. e fornecida pela Prof. Dr^a. Dênia Antunes Saúde Guimarães, Laboratório de Plantas Medicinais (LAPLAMED), CiPharma/UFOP, para a realização deste trabalho.

3.2.1.2 Substâncias Químicas de Referência (SQR) e matérias-primas

Furosemida SQR, fornecida pela Anvisa, proveniente da Farmacopeia Brasileira, lote 1002, teor de 100,0%.

Furosemida matéria-prima, proveniente da Attivos Magistrais, lote AFU02103F2, teor de 100,0%, validade 31/01/2015.

Cloridrato de propranolol SQR, fornecido pela Anvisa, proveniente da Farmacopeia Brasileira, lote 1005, teor de 100,1%.

Cloridrato de propranolol matéria-prima, proveniente da Fagron, lote M130113, validade 29/01/2017.

3.2.1.3 Equipamentos e utensílios

Balança analítica AUX 220D capacidade mínima 1,0 mg - Shimadzu

Balança analítica AUX 220 capacidade mínima 10,0 mg - Shimadzu

Bomba de vácuo MA 057/12 - Marconi

Coluna cromatográfica C18 (150 x 4,6 mm; 3 µm) Atlantis T3[®] - Waters

Coluna cromatográfica C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm) Symmetry[®] - Waters

Coluna cromatográfica C18 (50 x 4,6 mm; 5 µm) - Varian

Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Alliance[®] Waters e2695 com detector UV/visível Waters 2489 e Fluorescência Waters 2475, software Empower versão 2

Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Alliance[®] Waters e2695 com detector DAD Waters 2996, software Empower versão 2

Destilador - Cristófoli

Estufa de secagem e esterilização modelo 315 SE - Fanem

Frascos de vidro âmbar com tampa de rosca e septo de borracha (*vials*) com capacidade de 2 mL - Waters

Incubadora Shaker KS 4000i control - IKA

Lavadora ultrassônica - Unique

Membrana filtrante em nylon 0,45 µm de poro - Millipore

Micropipetas monocal canal várias capacidades Pipetman® - Gilson

pHmetro - Hanna

Placa Multiscreen® IP, membrana imobilizada em PVDF 0,45 µm transparente não estéril com 96 poços - Millipore

Placa Multiscreen® com 96 poços receptora de fármacos - Millipore

Ponteiras plásticas

Sistema de purificação de água Direct-Q₃® - Millipore

Unidade filtrante HV em PE com membrana durapore 0,45 µm - Millipore

3.2.1.4 Reagentes e solventes

Acetato de sódio triidratado - Vetec

Acetonitrila grau cromatográfico - JTBaker

Ácido acético glacial - Impex

Água ultrapura

Dimetilsulfóxido (DMSO) - Próquimios

Dodecano - Sigma-Aldrich

Fosfatidilcolina de ovo (Lipoid E PC S®) - Lipoid

Fosfato de potássio monobásico - Vetec

Hidróxido de sódio - Vetec

Metanol grau cromatográfico - JTBaker

3.2.2 Métodos

3.2.2.1 Padronização e validação do procedimento de avaliação da permeabilidade *in vitro* pelo método PAMPA

A padronização e a validação do procedimento de avaliação da permeabilidade *in vitro* pelo método PAMPA foram propostas baseadas em dados coletados na literatura.

Foram utilizados fármacos como padrões de baixa e alta permeabilidade, comumente empregados em estudos de permeabilidade por PAMPA, selecionados a partir de estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Controle de Qualidade do CiPharma/UFOP que já apresentavam métodos para quantificação por CLAE previamente desenvolvidos.

Com relação à execução do ensaio, foi realizada uma busca na literatura das condições utilizadas com maior frequência, como: a composição da membrana, quantidade de lipídeo impregnado, tempo de incubação, presença ou ausência de agitação das placas e pH dos compartimentos doadores (KANSY; SENNER; GUBERNATOR, 1998; AVDEEF, 2003; REIS, 2013).

3.2.2.1.1 Preparo das soluções estoques dos fármacos padrão de baixa e alta permeabilidade: furosemida e cloridrato de propranolol

Foram pesados exatamente 33,0 mg e 25,9 mg das substâncias químicas de referência (SQR) dos fármacos furosemida e cloridrato de propranolol, respectivamente, e transferidos para balões volumétricos de 10,0 mL distintos, completando-se o volume com DMSO, resultando em soluções estoques na concentração de 10,0 mmol/L.

3.2.2.1.2 Preparo da solução de fosfatidilcolina

Foram pesados exatamente 100,0 mg e 20,0 mg de fosfatidilcolina de ovo e transferidos para balões volumétricos de 2,0 mL distintos, completando-se o volume com dodecano. Foram obtidas soluções lipídicas com concentrações de 5,0% e 1,0% (p/v), respectivamente.

3.2.2.1.3 Preparo das soluções tampão

As soluções tampão foram preparadas de acordo com a Farmacopeia Americana 37^a Edição (UNITED STATES, 2014), e as correções de pH necessárias foram realizadas com soluções de HCl 1,0 mol/L e NaOH 1,0 mol/L.

Tampão acetato - TA (pH 4,5):

Foram adicionados 2,99 g de acetato de sódio triidratado e 14,0 mL de ácido acético 2,0 mol/L em balão volumétrico de 1000,0 mL. O volume foi completado com água ultrapura.

Fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8):

Foram adicionados 250,0 mL da solução de fosfato de potássio monobásico 0,2 mol/L e 112,0 mL da solução de hidróxido de sódio 0,2 mol/L em balão volumétrico de 1000,0 mL. O volume foi completado com água ultrapura.

Tampão fosfato - TF (pH 7,4):

Foram adicionados 250,0 mL da solução de fosfato de potássio monobásico 0,2 mol/L e 195,5 mL da solução de hidróxido de sódio 0,2 mol/L em balão volumétrico de 1000,0 mL. O volume foi completado com água ultrapura.

3.2.2.1.4 Validação do método analítico para quantificação dos fármacos padrão: furosemida e cloridrato de propranolol no fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato - TF (pH 7,4)

O método analítico para a quantificação dos fármacos furosemida e cloridrato de propranolol foi validado de acordo com a resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da Anvisa (BRASIL, 2003).

Os parâmetros linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação foram avaliados. Cálculos matemáticos e análises estatísticas foram realizadas com auxílio dos programas *Excel*[®] e *GraphPad Prism*[®] 5.01.

3.2.2.1.4.1 Linearidade

Para a análise da linearidade foram construídas curvas analíticas referentes a cada meio tamponado, utilizando-se nove concentrações na faixa de 0,010 mmol/L a 0,325 mmol/L. A proporção de DMSO empregada não foi superior a 5,0% do volume total de solução, conforme diluições indicadas na Tabela 3.1, e as determinações foram realizadas em triplicata.

Tabela 3.1: Preparo das soluções diluídas nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) utilizadas na avaliação da linearidade do método de quantificação dos fármacos furosemida e cloridrato de propranolol.

Alíquota da SE* (mL)	Volume final da solução (mL)	Concentração (mmol/L)
0,010	10,0	0,010
0,025	5,0	0,050
0,019	2,0	0,095
0,025	2,0	0,125
0,033	2,0	0,165
0,039	2,0	0,195
0,046	2,0	0,230
0,054	2,0	0,270
0,065	2,0	0,325

* SE – Solução estoque dos fármacos na concentração de 10,0 mmol/L.

3.2.2.1.4.2 Seletividade

Para a avaliação da seletividade, soluções de furosemida e cloridrato de propranolol nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4), na concentração de 0,165 mmol/L, foram colocadas em estufa. As primeiras foram expostas a calor seco de 70,0°C durante o período de 6 horas, e as soluções de cloridrato de propranolol, por sua vez, foram expostas a calor seco de 85,0°C durante o período de 8 horas.

3.2.2.1.4.3 Precisão

A precisão foi analisada por repetibilidade (precisão intracorrída) e precisão intermediária (intercorrída).

Ambas foram determinadas para a furosemida e o cloridrato de propranolol nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4), em três níveis de concentração: baixa (0,095 mmol/L), média (0,165 mmol/L) e alta (0,230 mmol/L), em triplicata.

A repetibilidade resultou em 9 determinações e a precisão intermediária, em 27 determinações, por ter sido avaliada em três dias diferentes.

A precisão foi calculada conforme a equação matemática apresentada em Equação 2.2 (página 51) e não foram admitidos valores superiores a 5,0% (BRASIL, 2003).

3.2.2.1.4.4 Exatidão

Assim como a precisão, a exatidão intracorrida e intercorrida foi calculada a partir de determinações em três níveis de concentração: baixa, média e alta, e em triplicata. Para ambos os fármacos foram utilizadas as concentrações de 0,095; 0,165 e 0,230 mmol/L nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).

A exatidão foi determinada de acordo com a fórmula matemática indicada na Equação 2.3 (página 51) e os valores resultantes devem estar compreendidos na faixa de 95,0 a 105,0% (KUMAR et al., 2012).

3.2.2.1.4.5 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados conforme as equações matemáticas descritas em Equação 2.4 (página 52) que levam em consideração dados da curva analítica obtida.

3.2.2.1.5 Padronização do procedimento de avaliação da permeabilidade *in vitro* pelo método PAMPA

A padronização da técnica se deu por meio da avaliação das diversas variáveis que podem influenciar nos resultados obtidos. Por isso, estudos pilotos foram realizados com o intuito de analisar a influência dessas variáveis sobre os resultados e definir as melhores condições para a avaliação da permeabilidade *in vitro* pelo método PAMPA.

Soluções estoques das matérias-primas, furosemida e cloridrato de propranolol, foram preparadas em DMSO na concentração de 20,0 mmol/L. Com o intuito de obter-se soluções diluídas dos fármacos nos meios TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8), na concentração de 250,0 µmol/L, alíquotas de 125,0 µL foram transferidas para balões volumétricos distintos de 10,0 mL e completados com os meios TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8), respectivamente.

Os ensaios foram executados utilizando como compartimento receptor, placas de 96 poços, que receberam 300,0 µL de solução TF (pH 7,4) em cada poço, com o finalidade de mimetizar o pH sanguíneo. Como compartimento doador, foram empregadas placas de 96 poços apresentando em sua base um filtro hidrofóbico composto de PVDF com 125,0 µm de espessura e tamanho de poro de 0,45 µm. Assim, como o compartimento receptor, o compartimento doador, recebeu 300,0 µL de solução, entretanto, contendo os fármacos diluídos nos meios TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8). A membrana foi obtida por meio de

impregnação lipídica de 5,0 μL , por poço, da solução de fosfatidilcolina a 5,0% e 1,0% (p/v). Tomando-se o cuidado de não encostar a ponteira no filtro.

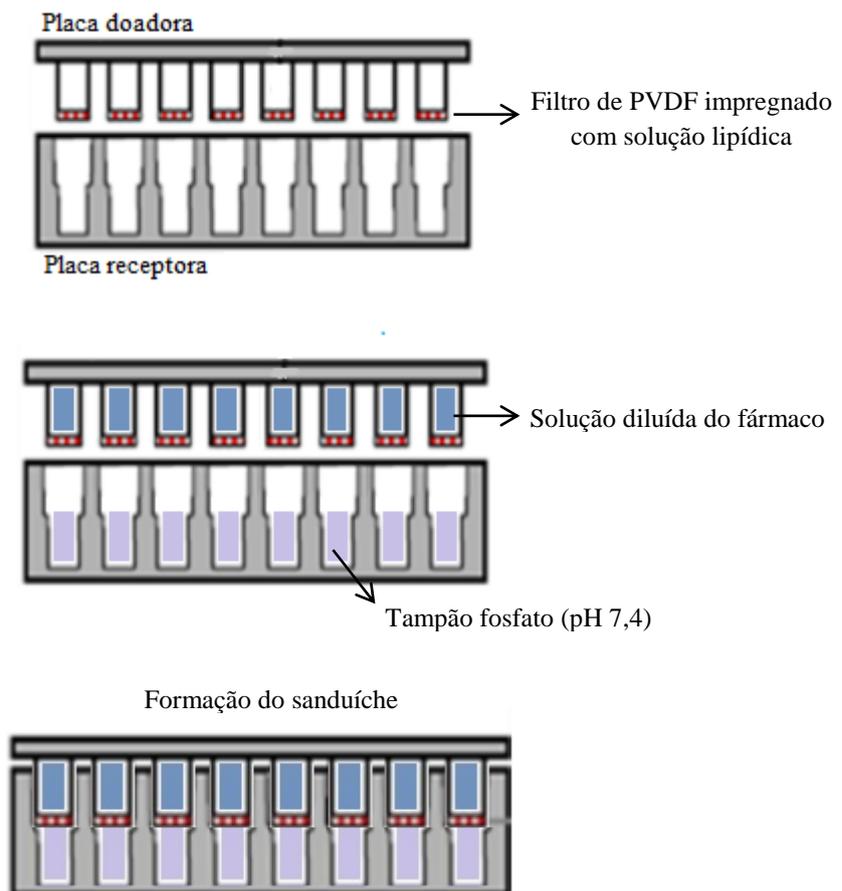
Após a formação do “sanduíche” foi colocado um papel de filtro umedecido com água ultrapura em cima da placa doadora, sob a tampa, para evitar a evaporação dos meios.

A temperatura de incubação foi de 37,0°C. A agitação, quando presente, foi de 50 rpm, e, para isso, uma incubadora do tipo “*shaker*” foi utilizada. Dois períodos foram avaliados: 5 e 15 horas.

Após o período de incubação, alíquotas de 150,0 μL foram coletadas em ambos os compartimentos, filtradas utilizando unidades filtrantes de 0,45 μm para *vials*, e levadas para a quantificação de fármaco permeado, por método cromatográfico previamente validado.

A Figura 3.2 representa o procedimento esquemático do ensaio e a Tabela 3.2 resume as condições avaliadas durante a padronização do ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela.

Figura 3.2: Desenho esquemático do procedimento de avaliação da permeabilidade pelo método PAMPA.



Fonte: Adaptado de CHEN et al., 2008.

Tabela 3.2: Condições avaliadas durante a padronização do ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela.

Variável		
<i>Meio biorrelevante do compartimento doador</i>	TA (pH 4,5)	FISSE (pH 6,8)
<i>Composição da solução lipídica</i>	5,0%	1,0%
<i>Agitação</i>	Ausência	50 rpm
<i>Tempo de incubação</i>	5 horas	15 horas

Após a avaliação das variáveis, aquelas que proporcionaram as melhores condições para o ensaio foram escolhidas e a padronização foi conduzida em triplicata.

3.2.2.2 Avaliação da permeabilidade *in vitro* da eremantolida C pelo método PAMPA

3.2.2.2.1 Preparo da solução estoque de eremantolida C

Foram pesados exatamente 34,6 mg de eremantolida C e transferidos para balão volumétrico de 10,0 mL. Completou-se o volume com DMSO, resultando em solução estoque na concentração de 10,0 mmol/L.

3.2.2.2.2 Preparo da solução de fosfatidilcolina

Foram pesados exatamente 100,0 mg de fosfatidilcolina de ovo e transferidos para balão volumétrico de 2,0 mL. Completou-se o volume com dodecano, resultando em solução lipídica à concentração de 5,0% (p/v).

3.2.2.2.3 Validação do método analítico para quantificação da eremantolida C no fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato - TF (pH 7,4)

O processo de validação do método analítico para quantificação da eremantolida C no FISSE (pH 6,8) e no TF (7,4) se deu seguindo o procedimento anteriormente descrito para a validação do método analítico de quantificação dos fármacos padrão nos meios biorrelevantes. Utilizando, portanto, a mesma faixa de linearidade, bem como o mesmo preparo das soluções diluídas para a avaliação da linearidade, precisão e exatidão.

A seletividade por sua vez, foi avaliada empregando solução de eremantolida C nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4), na concentração de 0,165 mmol/L, após exposição a calor seco de 70,0°C durante o período de 1 hora.

Os limites de detecção e quantificação também foram calculados.

3.2.2.2.4 Avaliação da permeabilidade *in vitro* da eremantolida C

Após a padronização do procedimento de avaliação da permeabilidade *in vitro* pelo método PAMPA, as melhores condições para a execução do ensaio foram selecionadas.

Uma solução diluída de eremantolida C em FISSE (pH 6,8) na concentração de 250,0 µmol/L foi preparada a partir da transferência de 125,0 µL da solução estoque de EREC a 20,0 mmol/L em DMSO para um balão de 10,0 mL.

O ensaio foi conduzido utilizando placas de 96 poços como compartimento receptor, na qual, cada poço recebeu 300,0 µL de solução TF (pH 7,4). E, placas de 96 poços apresentando em sua base um filtro hidrofóbico composto de PVDF com 125,0 µm de espessura e tamanho de poro de 0,45 µm, como compartimento doador, na qual cada poço recebeu 300,0 µL de solução diluída de eremantolida C em FISSE (pH 6,8).

Cada filtro foi impregnado com 5,0 µL de solução lipídica composta por fosfatidilcolina a 5,0% em dodecano, a fim de mimetizar a membrana intestinal.

Formado o “sanduíche”, um papel de filtro umedecido com água ultrapura foi colocado em cima da placa doadora, sob a tampa, para evitar a evaporação. A placa foi incubada a 37,0°C, sob agitação de 50 rpm, utilizando uma incubadora do tipo “*shaker*”, durante o período de 5 horas.

Após o período de incubação, alíquotas de 150,0 µL foram coletadas em ambos os compartimentos, filtradas utilizando unidades filtrantes de 0,45 µm para *vials*, e levadas para a quantificação da substância permeada, por método cromatográfico previamente validado.

3.2.2.3 Análise dos resultados

A avaliação da permeabilidade ocorreu por meio do cálculo da permeabilidade efetiva (P_{eff}), utilizando a Equação 3.1.

Equação 3.1: Fórmula para o cálculo de permeabilidade efetiva (P_{eff}) obtida nos ensaios de PAMPA.

$$P_{\text{eff}} = -\frac{2,303 V_D}{A (t - \tau_{\text{ss}}) \varepsilon_a} \cdot \left(\frac{1}{1 + r_v} \right) \cdot \log_{10} \left[1 - \frac{1 + r_v^{-1}}{1 - R_M} \cdot \frac{C_A(t)}{C_D(0)} \right]$$

Onde: V_D – volume do compartimento doador; A – área da membrana ($0,3 \text{ cm}^2$); t – tempo de incubação da placa em segundos; τ_{ss} – tempo necessário para saturar a membrana estimado em: $(54R_M+1)60\text{s}$; ε_a – porosidade aparente do filtro de PVDF (0,76) (NIELSEN; AVDEEF, 2004); r_v – razão do volume dos compartimentos doador e receptor; $C_A(t)$ e $C_D(0)$ – concentrações em mol/mL das amostras presentes no compartimento receptor ao final do ensaio e no compartimento doador no tempo zero, respectivamente. Fonte: AVDEEF, 2003; REIS, 2013.

Por se tratar de permeabilidade efetiva, é necessário calcular a quantidade de substância retida na membrana, que deve apresentar resultados compreendidos entre 0 e 1. Para isso, utilizou-se a Equação 3.2, descrita a seguir.

Equação 3.2: Fórmula utilizada para o cálculo da quantidade de substância que fica retida na membrana.

$$R_M = 1 - \left(\frac{m_D(t)}{m_D(0)} \right) - \left(\frac{m_A(t)}{m_D(0)} \right)$$

Onde: concentrações em mol/mL das amostras presentes nos compartimentos doador e receptor nos tempos inicial e final do ensaio. Fonte: AVDEEF, 2003.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Padronização e validação do procedimento de avaliação da permeabilidade *in vitro* pelo método PAMPA

3.3.1.1 Validação do método analítico para quantificação dos fármacos padrão: furosemida e cloridrato de propranolol no fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato - TF (pH 7,4)

A validação de um método analítico tem como finalidade garantir que este gere dados confiáveis e reprodutíveis, de forma que ele seja adequado ao objetivo proposto.

Dessa forma, a validação do método analítico para a quantificação da furosemida nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) foi baseada no desenvolvimento promovido por Reis (2014), utilizando as condições cromatográficas descritas no Quadro 3.2.

Quadro 3.2: Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação da furosemida nos meios tamponados.

<p>Detector: UV- 280 nm Coluna: C18 (150 x 4,6 mm; 5µm) Temperatura: 25,0°C Fluxo: 1,0 mL/minuto Volume de injeção: 20,0 µL Fase móvel: Acetonitrila:Água:Ácido acético concentrado a 1% (40:60:1)</p>
--

Enquanto a validação do método analítico para a quantificação do cloridrato de propranolol, nos mesmos meios, foi fundamentada no desenvolvimento proposto por Monteiro (2014), utilizando as condições cromatográficas descritas no Quadro 3.3.

Quadro 3.3: Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação do cloridrato de propranolol nos meios tamponados.

<p>Detector: FLU- Excitação: 290 nm/Emissão: 358 nm Coluna: C18 (50 x 4,6 mm; 5µm) Temperatura: 25,0°C Fluxo: 1,0 mL/minuto Volume de injeção: 8,0 µL Fase móvel: Acetonitrila:Tampão fosfato 40 mmol/L (28:72)</p>

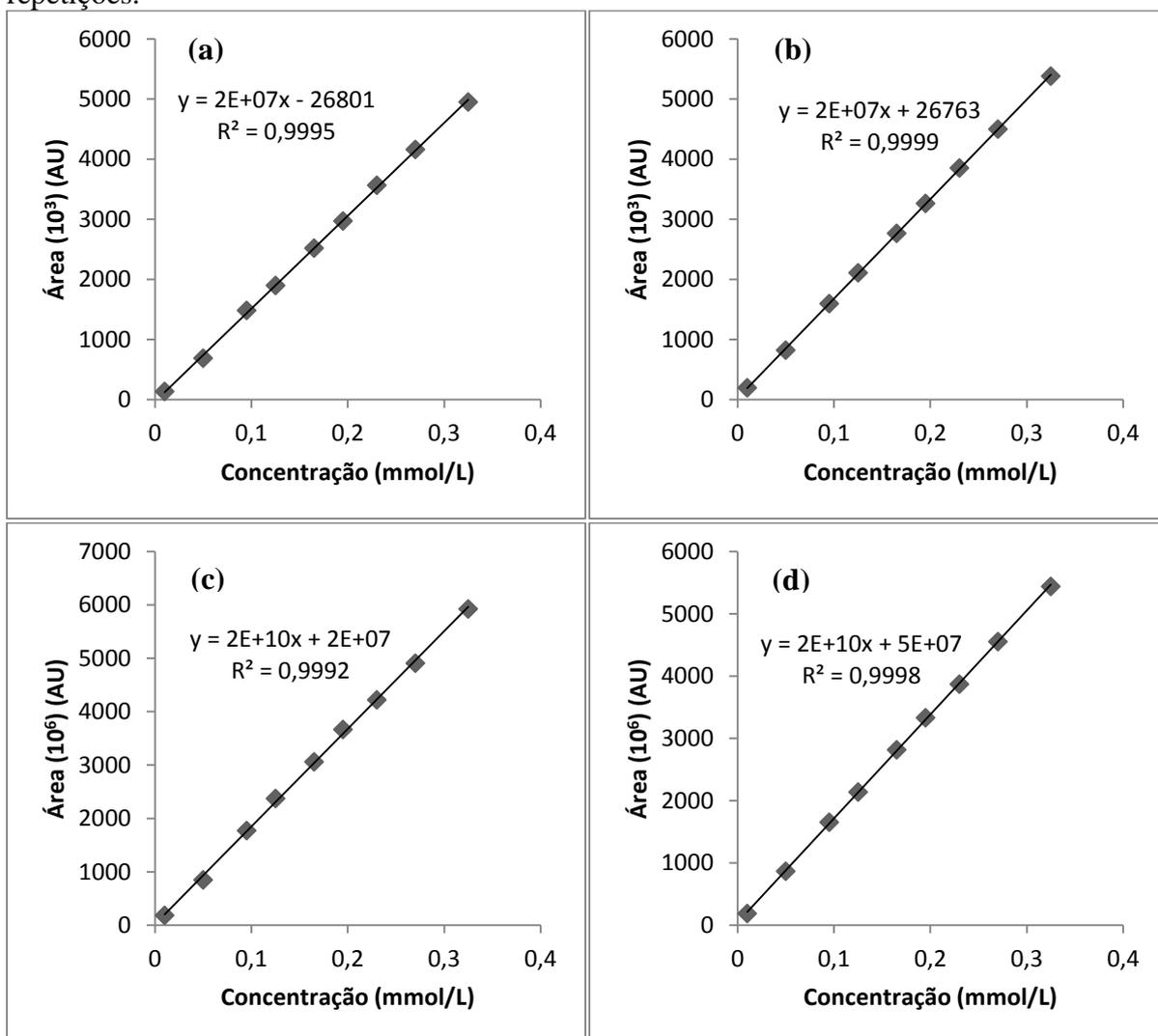
Em ambos os procedimentos foram avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, seletividade, precisão, exatidão e limites de detecção e quantificação.

3.3.1.1.1 Linearidade

A linearidade é conferida a um método analítico caso este apresente coeficiente de correlação (r) superior a 0,99 (BRASIL, 2003).

Na Figura 3.3 estão demonstradas as curvas analíticas obtidas a partir da análise dos fármacos furosemida e cloridrato de propranolol nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).

Figura 3.3: Curvas analíticas para a avaliação da linearidade do método analítico de quantificação da furosemida em: (a) FISSE (pH 6,8) e (b) TF (pH 7,4), e do cloridrato de propranolol em (c) FISSE (pH 6,8) e (d) TF (pH 7,4). Cada ponto representa a média das três repetições.



Nas Tabelas 3.3 e 3.4 estão compilados os dados referentes às curvas analíticas médias nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4), da furosemida e do cloridrato de propranolol, respectivamente.

Tabela 3.3: Parâmetros da regressão linear do método analítico de quantificação da furosemida em FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4). Coeficientes referentes à reta média das três repetições.

Parâmetro da regressão	FISSE (pH 6,8)	TF (pH 7,4)
<i>Coeficiente linear (a)</i>	26801 ± 4731,5	26763 ± 21149,8
<i>Coeficiente angular (b)</i>	1,54x10 ⁷ ± 115524,2	1,66x10 ⁷ ± 128185,6
<i>Coeficiente de determinação (r²)</i>	0,9995	0,9999
<i>Coeficiente de correlação (r)</i>	0,9997	0,9999

Tabela 3.4: Parâmetros da regressão linear do método analítico de quantificação do cloridrato de propranolol em FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4). Coeficientes referentes à reta média das três repetições.

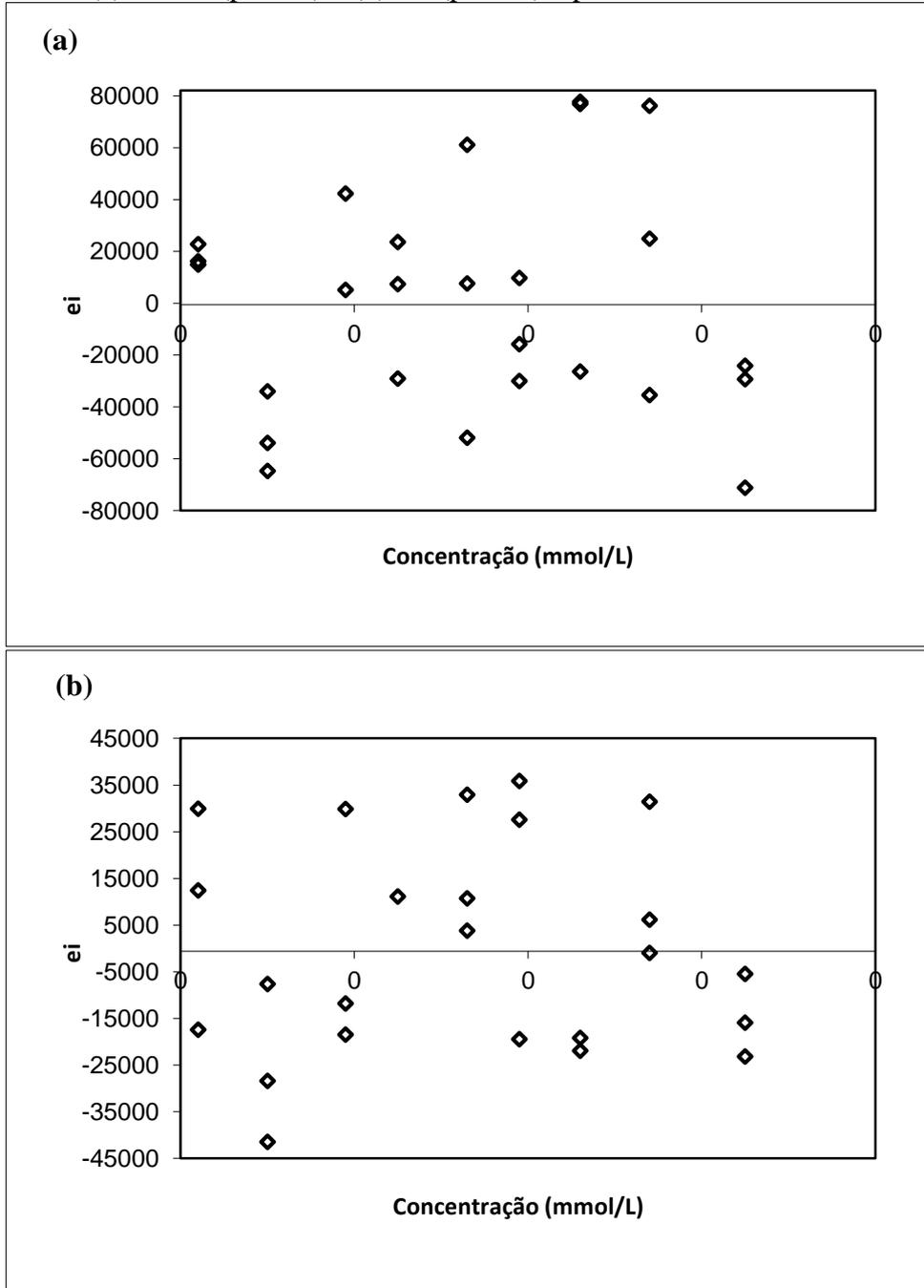
Parâmetro da regressão	FISSE (pH 6,8)	TF (pH 7,4)
<i>Coeficiente linear (a)</i>	1,88x10 ⁷ ± 9,74x10 ⁶	4,72x10 ⁷ ± 2,30x10 ⁷
<i>Coeficiente angular (b)</i>	1,83x10 ¹⁰ ± 1,85x10 ⁸	1,67x10 ¹⁰ ± 1,53x10 ⁸
<i>Coeficiente de determinação (r²)</i>	0,9992	0,9998
<i>Coeficiente de correlação (r)</i>	0,9995	0,9998

Ambos os métodos de quantificação para os fármacos apresentaram coeficientes de correlação superior a 0,99, conferindo linearidade aos métodos (BRASIL, 2003).

Além disso, a análise da linearidade foi complementada pela análise dos resíduos da regressão linear, a qual foi conduzida por meio do teste de resíduos padronizado de *Jackknife*.

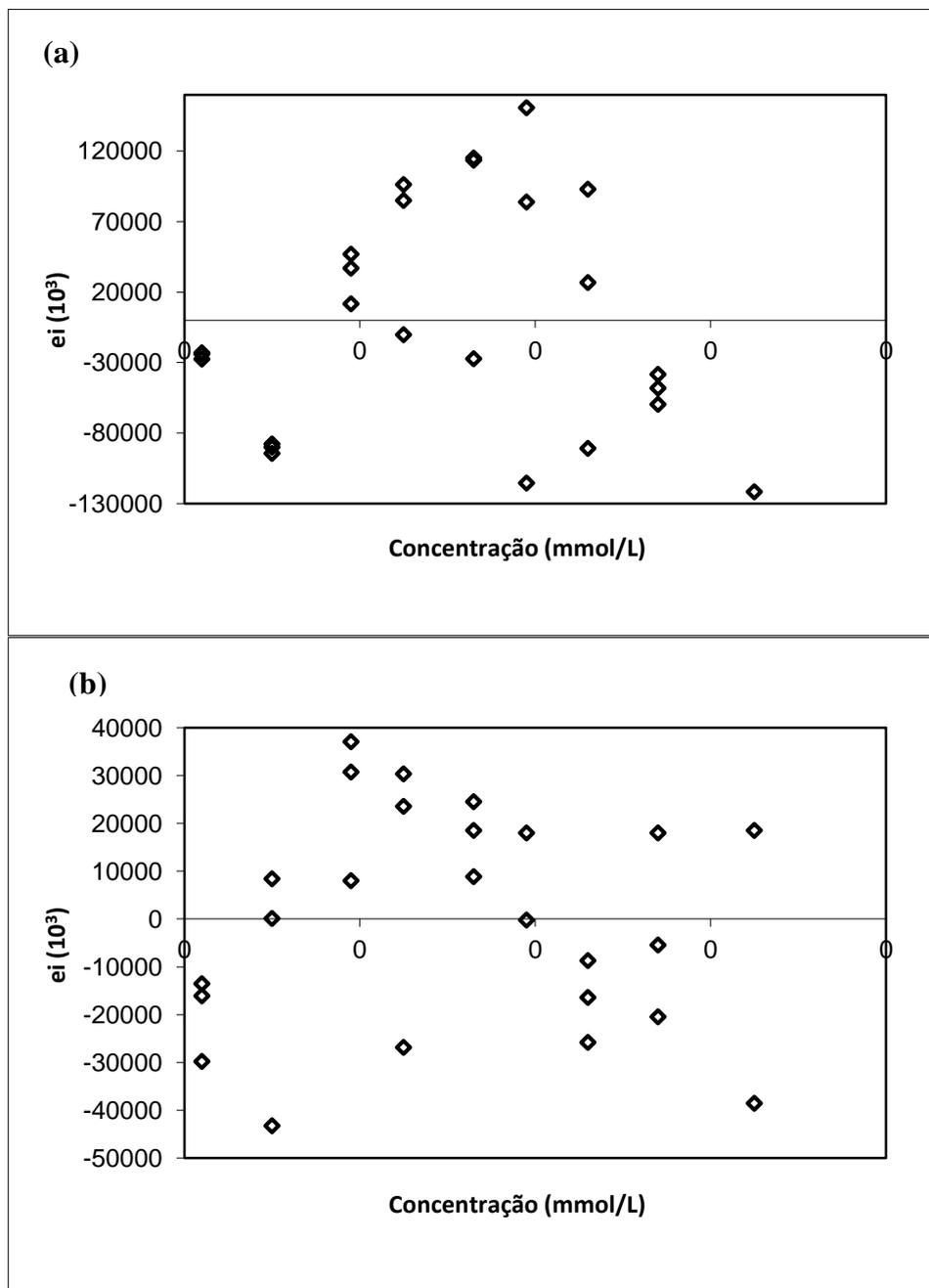
Foram detectados quatro valores dispersos (“*outliers*”) durante a análise dos resíduos da regressão linear para o método de quantificação da furosemida nos meios biorrelevantes, um no FISSE (pH 6,8) e três no TF (pH 7,4), resultando nos gráficos representados na Figura 3.4.

Figura 3.4: Gráficos de resíduos da regressão linear do método analítico de quantificação da furosemida em: (a) FISSE (pH 6,8) e (b) TF (pH 7,4), após tratamento de *outliers*.



Já para o cloridrato de propranolol foram encontrados um total de quatro *outliers* durante a análise dos resíduos da regressão linear, dois no FISSE (pH 6,8) e dois no TF (pH 7,4), gerando os gráficos representados na Figura 3.5.

Figura 3.5: Gráficos de resíduos da regressão linear do método analítico de quantificação do cloridrato de propranolol em: (a) FISSE (pH 6,8) e (b) TF (pH 7,4), após tratamento de *outliers*.



A exclusão de *outliers*, valores extremos que se encontram fora do intervalo do intervalo proposto, poderia atingir no máximo 22,2% do total de dados originais (SOUZA et al., 2007). E, portanto, esse critério foi cumprido para os métodos analíticos de quantificação em questão.

Feito isso, realizou-se a análise das premissas: normalidade, homocedasticidade e independência, relativas à regressão. Seguido de testes para verificar a adequação do ajuste ao

modelo linear por meio da significância da regressão e do desvio de linearidade utilizando a ANOVA. Todos os resultados obtidos para os dois fármacos foram resumidos na Tabela 3.5.

Tabela 3.5: Valores encontrados para as premissas dos resíduos da regressão linear, desvio da linearidade e significância da regressão, provenientes da análise das curvas analíticas obtidas para os fármacos furosemida e cloridrato de propranolol nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).

Avaliação	Furosemida		Cloridrato de propranolol	
	FISSE (pH 6,8)	TF (pH 7,4)	FISSE (pH 6,8)	TF (pH 7,4)
<u>Normalidade</u>				
Valor encontrado	0,9806	0,9735	0,9797	0,9855
Valor de referência	Maior que 0,9672	Maior que 0,9651	Maior que 0,9662	Maior que 0,9662
<u>Homocedasticidade</u>				
Valor encontrado	0,7630	0,2210	1,5500	1,1100
Valor de referência	Menor que 2,0640	Menor que 2,0740	Menor que 2,0690	Menor que 2,0690
<u>Independência</u>				
Valor encontrado	1,8190	2,2599	1,6933	1,7266
Valor de referência	Entre 1,4616 e 2,5384	Entre 1,4458 e 2,5542	Entre 1,4539 e 2,5461	Entre 1,4539 e 2,5461
<u>Desvio da linearidade</u>				
Valor encontrado	2,2160	2,0020	2,3750	1,9400
Valor de referência	Menor que 2,6143	Menor que 2,7066	Menor que 2,6572	Menor que 2,6572
<u>Significância da regressão</u>				
Valor encontrado	30668,57	127137,32	10109,63	114313,52
Valor de referência	Maior que 4,2597	Maior que 4,3010	Maior que 4,2793	Maior que 4,2793

Após análise de todos os dados expostos, o método de quantificação dos fármacos padrão de baixa e alta permeabilidade, furosemida e cloridrato de propranolol, nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4), dentro do intervalo proposto, foi considerado linear, uma vez que cumpriu com todos os requisitos necessários.

3.3.1.1.2 Seletividade

O método para a quantificação da furosemida nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) mostrou-se seletivo, uma vez que houve decaimento da concentração do fármaco após as condições extremas a qual foi submetida.

A comprovação da seletividade está indicada na Figura 3.6 para o FISSE (pH 6,8) e na Figura 3.7 para o TF (pH 7,4).

Figura 3.6: Cromatogramas obtidos para a amostra de furosemida em FISSE (pH 6,8) na concentração de 0,165 mmol/L. Em (a) antes da exposição às condições drásticas e em (b) após submissão da amostra à 70,0°C (calor seco) durante 6 horas.

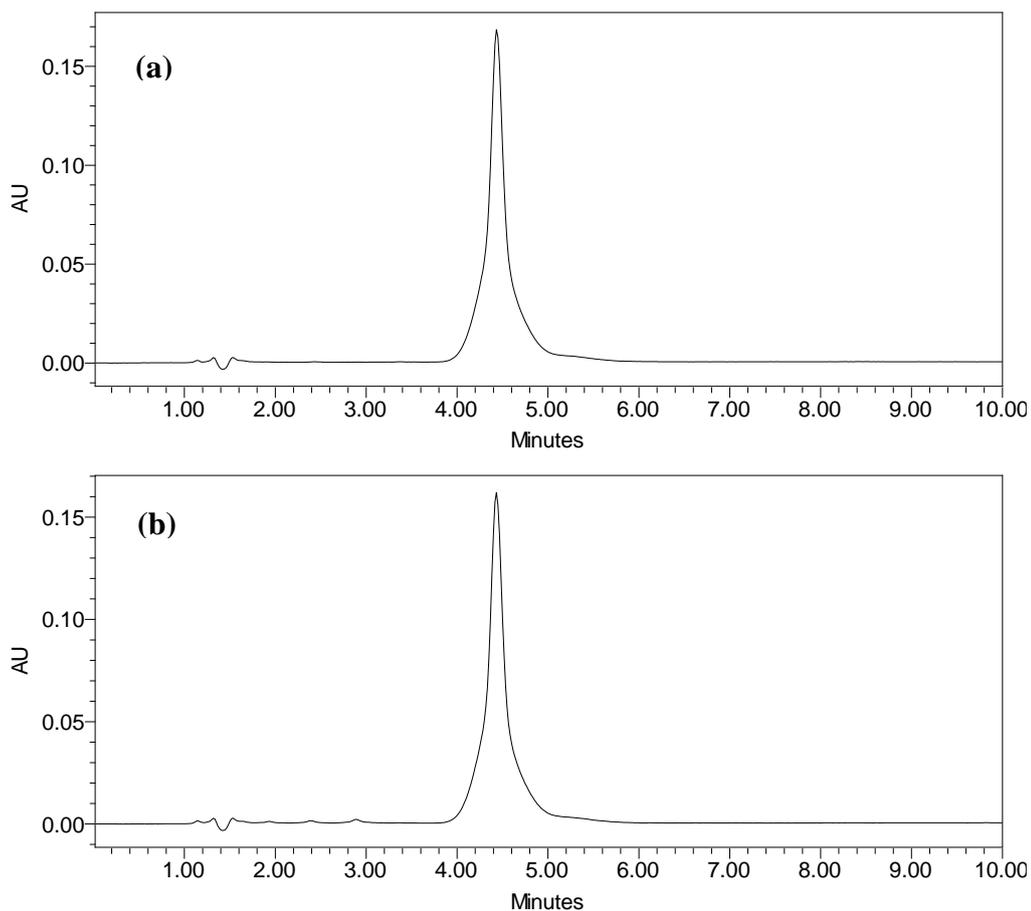
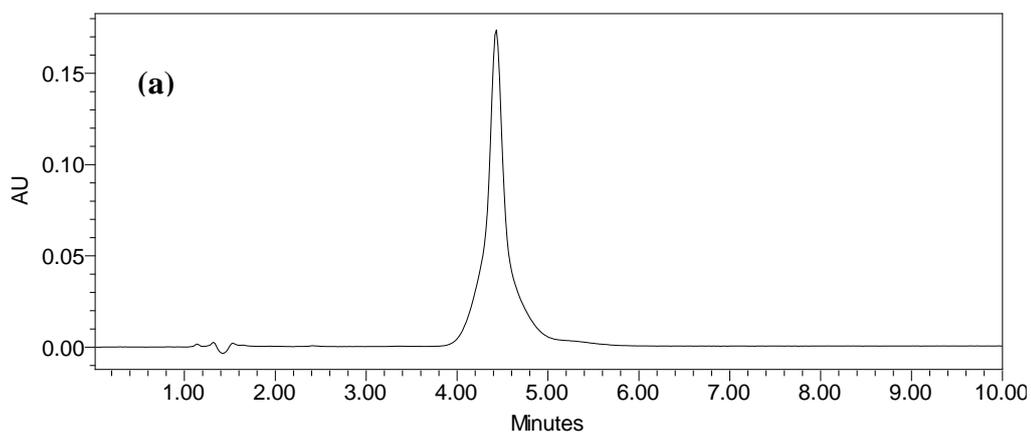
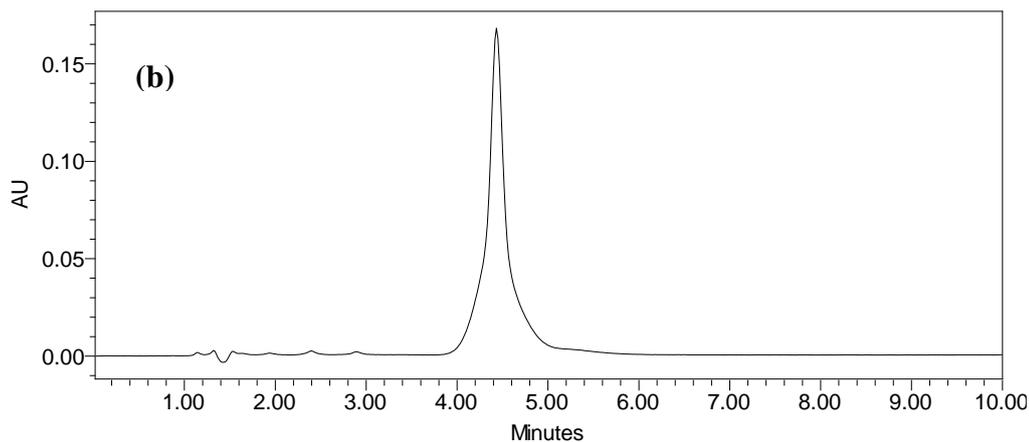


Figura 3.7: Cromatogramas obtidos para a amostra de furosemida em TF (pH 7,4) na concentração de 0,165 mmol/L. Em (a) antes da exposição às condições drásticas e em (b) após submissão da amostra à 70,0°C (calor seco) durante 6 horas.





O método para a quantificação do cloridrato de propranolol no FISSE (pH 6,8) e no TF (pH 7,4) também mostrou-se seletivo, já que além do decaimento da concentração do fármaco após as condições extremas a qual foi submetida, houve a formação de produtos de degradação, conforme pode ser constatado nas Figuras 3.8 e 3.9 para os meios FISSE e TF, respectivamente.

Figura 3.8: Cromatogramas obtidos para a amostra de cloridrato de propranolol em FISSE (pH 6,8) na concentração de 0,165 mmol/L. Em (a) antes da exposição às condições drásticas e em (b) após submissão da amostra à 85,0°C (calor seco) durante 8 horas.

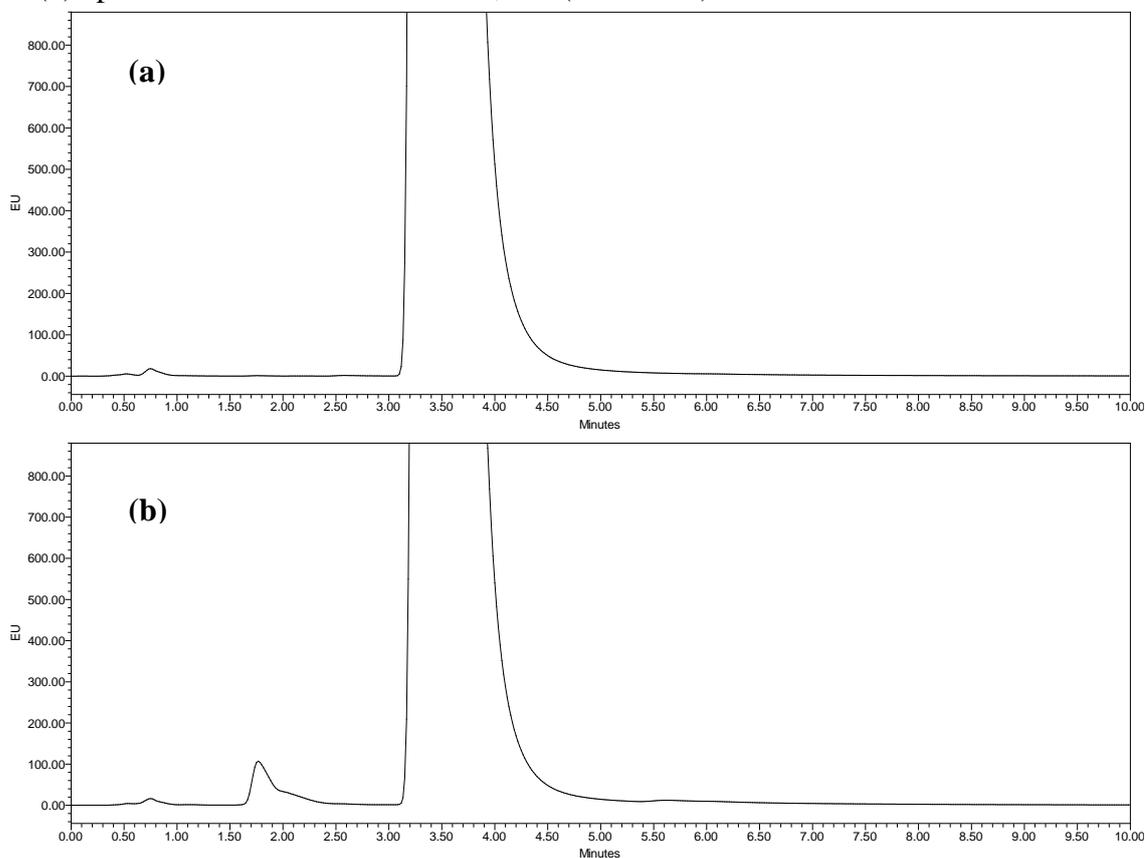
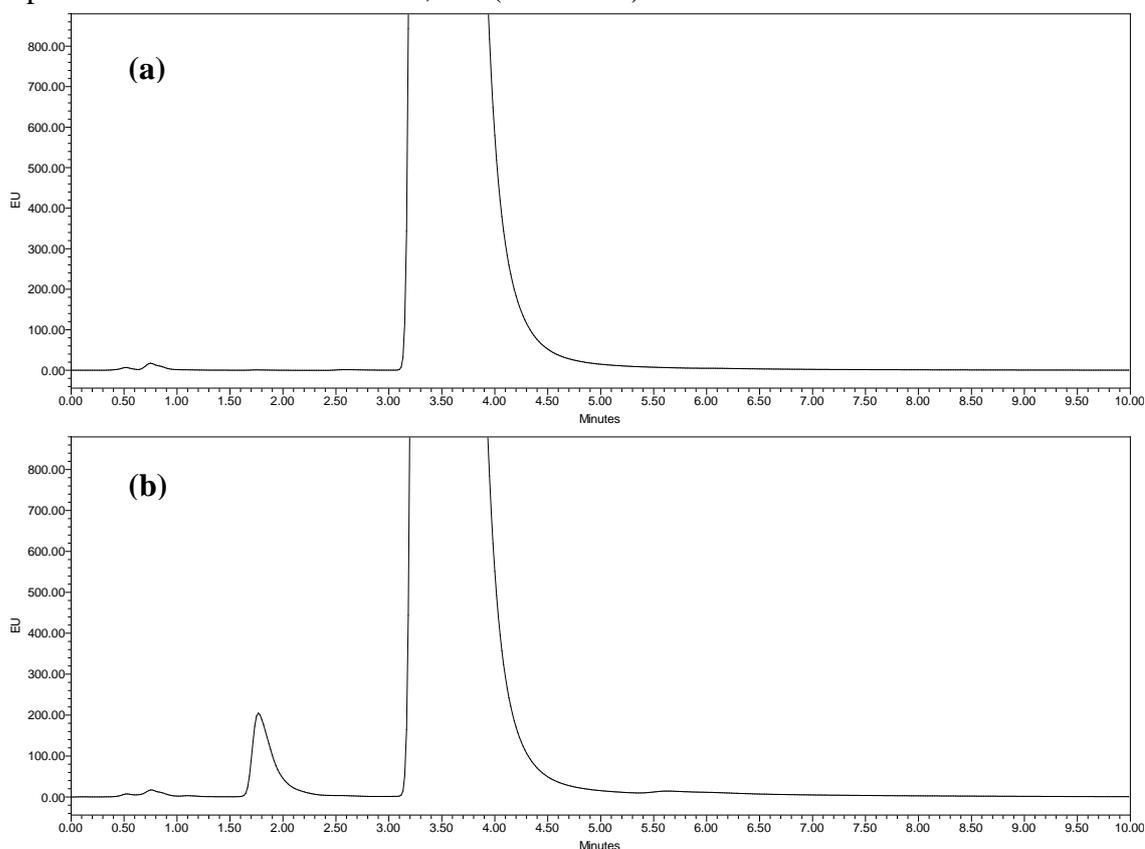


Figura 3.9: Cromatogramas obtidos para a amostra de cloridrato de propranolol em TF (pH 7,4) na concentração de 0,165 mmol/L. Em (a) antes da exposição às condições drásticas e em (b) após submissão da amostra à 85,0°C (calor seco) durante 8 horas.



3.3.1.1.3 Precisão

A precisão intradia e interdia, em três dias diferentes, do método analítico foi avaliada e expressa por meio de valores de desvio padrão relativo (DPR%) para ambos os fármacos.

Os resultados referentes à precisão intradia e interdia para a furosemida nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) estão apresentados nas Tabelas 3.6 e 3.7, respectivamente.

Tabela 3.6: Precisão intradia e interdia do método de quantificação da furosemida no meio FISSE (pH 6,8) (n = 3).

Concentração teórica (mmol/L)	Concentração experimental média (mmol/L)	DPR (%) Intradia/Interdia	
Resultados 1º dia			
0,095	0,098	3,30	2,39
0,165	0,165	2,22	
0,230	0,233	1,67	

(Continua)

(Continuação)

Resultados 2º dia			
0,095	0,097	2,60	2,16
0,165	0,162	2,31	
0,230	0,230	1,46	
Resultados 3º dia			
0,095	0,097	1,97	1,21
0,165	0,168	0,28	
0,230	0,232	0,47	

Tabela 3.7: Precisão intradia e interdia do método de quantificação da furosemida no meio TF (pH 7,4) (n = 3).

Concentração teórica (mmol/L)	Concentração experimental média (mmol/L)	DPR (%) Intradia/Interdia	
Resultados 1º dia			
0,095	0,095	1,67	1,62
0,165	0,166	0,55	
0,230	0,231	2,04	
Resultados 2º dia			
0,095	0,095	0,73	0,72
0,165	0,165	0,57	
0,230	0,229	0,97	
Resultados 3º dia			
0,095	0,096	0,72	0,49
0,165	0,166	1,10	
0,230	0,228	1,35	

Por sua vez, os resultados referentes à precisão intradia e interdia para o cloridrato de propranolol nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) estão apresentados nas Tabelas 3.8 e 3.9, respectivamente.

Tabela 3.8: Precisão intradia e interdia do método de quantificação do cloridrato de propranolol no meio FISSE (pH 6,8) (n = 3).

Concentração teórica (mmol/L)	Concentração experimental média (mmol/L)	DPR (%) Intradia/Interdia	
Resultados 1º dia			
0,095	0,096	2,81	1,91
0,165	0,166	2,78	
0,230	0,230	2,76	
Resultados 2º dia			
0,095	0,097	1,04	2,18
0,165	0,170	2,65	
0,230	0,233	2,20	

(Continua)

(Continuação)

Resultados 3º dia			
0,095	0,097	1,99	1,92
0,165	0,167	0,60	
0,230	0,231	0,64	

Tabela 3.9: Precisão intradia e interdia do método de quantificação do cloridrato de propranolol no meio TF (pH 7,4) (n = 3).

Concentração teórica (mmol/L)	Concentração experimental média (mmol/L)	DPR (%) Intradia/Interdia	
Resultados 1º dia			
0,095	0,096	0,95	0,87
0,165	0,166	0,29	
0,230	0,229	0,22	
Resultados 2º dia			
0,095	0,096	0,97	0,88
0,165	0,167	0,96	
0,230	0,228	1,23	
Resultados 3º dia			
0,095	0,096	0,89	0,93
0,165	0,168	0,99	
0,230	0,230	1,26	

Os resultados encontrados para a precisão intradia e interdia para ambos os fármacos estão de acordo com o preconizado pela RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da Anvisa (BRASIL, 2003), uma vez que apresentam valores de DPR% inferiores a 5,0%.

3.3.1.1.4 Exatidão

Assim como a precisão, a exatidão intradia e interdia foi avaliada para três concentrações dos fármacos, baixa, média e alta, de forma que contemplasse o intervalo linear.

Nas Tabelas 3.10 e 3.11 estão apresentados os valores encontrados para a exatidão do método de quantificação da furosemida nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4), respectivamente.

Tabela 3.10: Exatidão intradia e interdia do método de quantificação da furosemida no meio FISSE (pH 6,8) (n = 3).

Concentração teórica (mmol/L)	Concentração experimental média (mmol/L)	Exatidão (%) Intradia/Interdia	
Resultados 1º dia			
0,095	0,098	103,05	102,33
0,165	0,165	100,07	
0,230	0,233	101,15	
Resultados 2º dia			
0,095	0,097	102,23	100,11
0,165	0,162	98,45	
0,230	0,230	100,21	
Resultados 3º dia			
0,095	0,097	101,71	100,74
0,165	0,168	101,81	
0,230	0,232	100,86	

Tabela 3.11: Exatidão intradia e interdia do método de quantificação da furosemida no meio TF (pH 7,4) (n = 3).

Concentração teórica (mmol/L)	Concentração experimental média (mmol/L)	Exatidão (%) Intradia/Interdia	
Resultados 1º dia			
0,095	0,095	99,70	97,50
0,165	0,166	100,35	
0,230	0,231	100,44	
Resultados 2º dia			
0,095	0,095	100,02	100,47
0,165	0,165	100,26	
0,230	0,229	99,67	
Resultados 3º dia			
0,095	0,096	101,52	99,99
0,165	0,166	100,80	
0,230	0,228	98,92	

Já os valores encontrados para a exatidão do método de quantificação do cloridrato de propranolol nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) estão apresentados nas Tabelas 3.12 e 3.13, respectivamente.

Tabela 3.12: Exatidão intradia e interdia do método de quantificação do cloridrato de propranolol no meio FISSE (pH 6,8) (n = 3).

Concentração teórica (mmol/L)	Concentração experimental média (mmol/L)	Exatidão (%) Intradia/Interdia	
Resultados 1º dia			
0,095	0,096	100,96	101,69
0,165	0,166	100,80	
0,230	0,230	99,91	

(Continuação)

Resultados 2º dia			
0,095	0,097	101,62	101,78
0,165	0,170	103,06	
0,230	0,233	101,45	
Resultados 3º dia			
0,095	0,097	102,50	100,60
0,165	0,167	101,47	
0,230	0,231	100,45	

Tabela 3.13: Exatidão intradia e interdia do método de quantificação do cloridrato de propranolol no meio TF (pH 7,4) (n = 3).

Concentração teórica (mmol/L)	Concentração experimental média (mmol/L)	Exatidão (%) Intradia/Interdia	
Resultados 1º dia			
0,095	0,096	101,43	101,14
0,165	0,166	100,65	
0,230	0,229	99,65	
Resultados 2º dia			
0,095	0,096	100,76	101,33
0,165	0,167	101,51	
0,230	0,229	99,36	
Resultados 3º dia			
0,095	0,096	101,25	99,68
0,165	0,168	101,82	
0,230	0,230	100,01	

O método analítico para quantificação de ambos os fármacos nos meios biorrelevantes foi considerado exato, uma vez que apresentou exatidão intradia e interdia entre 95,0 e 105,0% (KUMAR et al., 2012).

3.3.1.1.5 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados a partir dos coeficientes angulares (b) e lineares (a) das curvas analíticas obtidas na avaliação do método de quantificação dos fármacos, furosemida e cloridrato de propranolol, nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4), e estão apresentados na Tabela 3.14.

Tabela 3.14: Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) calculados para o método de quantificação da furosemida e do cloridrato de propranolol nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).

Meio biorrelevante	Furosemida		Cloridrato de propranolol	
	LD (mmol/L)	LQ (mmol/L)	LD (mmol/L)	LQ (mmol/L)
<i>FISSE (pH 6,8)</i>	0,0009	0,0031	0,0016	0,0053
<i>TF (pH 7,4)</i>	0,0038	0,0128	0,0041	0,0138

Os valores encontrados para os limites de detecção e quantificação indicaram que o intervalo proposto para a quantificação de ambos os fármacos nos meios biorrelevantes em questão está coerente.

3.3.1.2 Padronização do procedimento de avaliação da permeabilidade *in vitro* pelo método PAMPA

Os fármacos furosemida e cloridrato de propranolol são comumente utilizados como padrões de baixa e alta permeabilidade, respectivamente em estudos de permeabilidade.

A furosemida é um fármaco anti-hipertensivo da classe dos diuréticos de alça, classificado como classe IV segundo o SCB (GRANERO et al., 2010). Enquanto o cloridrato de propranolol, também um fármaco anti-hipertensivo, mas da classe dos β -bloqueadores é classificado como classe I segundo o SCB (VOGELPOEL et al., 2004). Na Tabela 3.15 estão listadas as propriedades físico-químicas apresentadas por cada um deles.

Tabela 3.15: Propriedades físico-químicas apresentadas pelos fármacos de furosemida e cloridrato de propranolol.

Propriedade	Furosemida	Cloridrato de propranolol
<i>Peso molecular</i>	330,0	259,0
<i>pKa</i>	3,9	9,0
<i>LogP</i>	0,74	2,65
<i>Fração absorvida em humanos (%)</i>	60,0	90,0

Fonte: GRANERO et al., 2010; KASIM et al., 2004; VOGELPOEL et al., 2004.

O fato de apresentarem classificações diferentes de acordo com o SCB e possuírem métodos de quantificação em meios biorrelevantes já desenvolvidos e consolidados levou a utilização da furosemida como fármaco padrão de baixa permeabilidade e do cloridrato de propranolol como fármaco padrão de alta permeabilidade.

O primeiro parâmetro avaliado para a padronização do método de avaliação da permeabilidade *in vitro* utilizando PAMPA foi o pH do meio do compartimento doador. Sabe-

se que o trato gastrointestinal apresenta uma variação de pH muito extensa, variando desde o pH 1,0 no estômago até o pH 8,0 na porção final do intestino grosso (AVDEEF, 2003).

Entretanto, como exposto anteriormente, fármacos que cumprem com o critério de dissolução rápida são absorvidos antes de atingir o íleo e, portanto não há necessidade da avaliação do seu comportamento no pH dessa região (YU et al., 2002). Pensando nisso, é preconizado pelas agências regulatórias a avaliação da solubilidade em um mínimo de três meios diferentes que englobem a faixa de pH de 1,2-6,8 (BRASIL, 2011; EMA, 2010).

Uma vez que a padronização do teste visa a avaliação da permeabilidade *in vitro* da eremantolida C e esta não apresenta estabilidade em meios extremamente ácidos, como o FGSSE (pH 1,2), optou-se pela avaliação dos meios TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8) como compartimentos doadores, pois além dos fármacos padrão apresentarem estabilidade nos meios, assim como a eremantolida C, é na porção inicial do intestino (duodeno-jejuno) que ocorre a maior parte da absorção de fármacos (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; OLIVEIRA; MANZO, 2009).

O TA (pH 4,5) foi o primeiro meio do compartimento doador avaliado, utilizando-se solução lipídica a 5,0% de fosfatidilcolina em dodecano, 15 horas de incubação sem agitação à 37,0°C. O compartimento receptor era composto pelo meio TF (pH 7,4), que foi fixo a todos os ensaios, uma vez que o intuito é mimetizar o pH sanguíneo. Os resultados de permeabilidade efetiva (P_{eff}) encontrados para ambos os fármacos estão compilados na Tabela 3.16.

Tabela 3.16: Resultados de permeabilidade efetiva (P_{eff}) para os fármacos furosemida e cloridrato de propranolol, utilizando o meio TA (pH 4,5) como compartimento doador, solução lipídica a 5,0%, ausência de agitação e 15 horas de incubação.

Concentração experimental média (mol/mL) \pm DP		P_{eff} (cm/s)
<i>Furosemida</i>		
<i>Compartimento doador</i>	<i>Compartimento receptor</i>	
$2,06 \times 10^{-7} \pm 0,54$	$0,20 \times 10^{-7} \pm 0,19$	$2,39 \times 10^{-6}$
<i>Cloridrato de Propranolol</i>		
<i>Compartimento doador</i>	<i>Compartimento receptor</i>	
$2,23 \times 10^{-7} \pm 0,18$	$0,23 \times 10^{-7} \pm 0,16$	$2,53 \times 10^{-6}$

Para a avaliação do meio FISSE (pH 6,8) como compartimento doador utilizou-se as mesmas condições descritas anteriormente, e os resultados de permeabilidade efetiva (P_{eff}) encontrados para ambos os fármacos estão demonstrados na Tabela 3.17.

Tabela 3.17: Resultados de permeabilidade efetiva (P_{eff}) para os fármacos furosemida e cloridrato de propranolol, utilizando o meio FISSE (pH 6,8) como compartimento doador, solução lipídica a 5,0%, ausência de agitação e 15 horas de incubação.

Concentração experimental média (mol/mL) \pm DP		P_{eff} (cm/s)
<i>Furosemida</i>		
<i>Compartimento doador</i>	<i>Compartimento receptor</i>	
$2,12 \times 10^{-7} \pm 0,11$	$0,006 \times 10^{-7} \pm 0,004$	$0,07 \times 10^{-6}$
<i>Cloridrato de Propranolol</i>		
<i>Compartimento doador</i>	<i>Compartimento receptor</i>	
$1,94 \times 10^{-7} \pm 0,08$	$0,41 \times 10^{-7} \pm 0,009$	$5,25 \times 10^{-6}$

Como pode ser observado, os valores encontrados para ambos os fármacos foram muito próximos entre si, ao utilizar o meio TA (pH 4,5) como compartimento doador, indicando a inviabilidade deste, como compartimento doador nos ensaios de permeabilidade *in vitro* pelo método PAMPA. Entretanto, uma expressiva diferença entre a P_{eff} calculada para a furosemida e o cloridrato de propranolol foi verificada no meio FISSE (pH 6,8). Isto pode ser explicado pelo grau de ionização dos fármacos e a formação da camada de água estacionária, uma vez que não houve agitação das placas neste ensaio.

A furosemida possui um pKa de 3,9, e em meios com pH acima desse valor apresenta um certo grau de ionização, o qual dificulta o processo de permeação, uma vez que a passagem através da membrana se dá por moléculas em sua forma não ionizada. No meio TA (pH 4,5), o grau de ionização da furosemida é de 75,0% o que justificou o valor de $2,28 \times 10^{-6}$ cm/s encontrado para a P_{eff} , pois ainda há moléculas do fármaco não ionizados capazes de atravessar a membrana e fornecer esse valor, razoavelmente bom, para fármacos de baixa permeabilidade. No entanto, no meio FISSE (pH 6,8), a furosemida se apresenta praticamente 100,0% na sua forma ionizada, o que justificou a redução drástica dos valores de permeabilidade efetiva.

O cloridrato de propranolol por sua vez, não apresenta esse tipo de problema uma vez que possui um pKa de 9,0 e portanto, somente acima desse valor exibirá formas ionizáveis. Porém, como observado, mostrou valores de permeabilidade equiparáveis ao da furosemida

ao utilizar como compartimento doador o meio TA (pH 4,5). Esse fenômeno tem sido relatado na literatura. Avdeef (2003), demonstrou que em meios com pH igual a 5,5 a furosemida e o cloridrato de propranolol apresentaram valores para permeabilidade efetiva muito próximos. Segundo Reis (2013) a permeabilidade efetiva apresentada pela furosemida em TA (pH 4,5), como compartimento doador, foi superior a do cloridrato de propranolol.

Acredita-se que essa baixa permeabilidade encontrada para o cloridrato de propranolol em ambos os ensaios esteja relacionada com a camada de água estacionária formada. O cloridrato de propranolol é um fármaco altamente lipofílico, sendo 40 vezes mais lipofílico que o metoprolol, fármaco padrão de alta permeabilidade, e por isso, a presença de uma espessa camada de água estacionária, pode diminuir o grau de permeação desse fármaco. Geralmente em PAMPA, a espessura da camada de água estacionária é estimada em 1462 μm , enquanto no trato gastrointestinal esse valor varia de 30 a 100 μm (REIS; SINKÓ; SERRA, 2010; AVDEEF; NIELSEN; TSINMAN, 2004). Algo que não acontece com a furosemida, pois além dela ser de baixa permeabilidade, sua absorção se dá principalmente pela rota paracelular (GONÇALVES; SOUZA; STORPIRTIS, 2009).

Além da inviabilidade do uso do meio TA (pH 4,5) como compartimento doador, optando-se então pelo meio FISSE (pH 6,8), há a necessidade de agitação ao sistema visando a redução da camada de água estacionária e conseqüentemente, fornecer o máximo de permeação dos fármacos em questão.

Na literatura há vários relatos sobre o método PAMPA, mas nenhum consenso sobre a velocidade de agitação a qual as placas devem ser submetidas. A finalidade da agitação é mimetizar o trato gastrointestinal e muitos autores indicam apenas que esta deve ser suave. Zhu e colaboradores (2002) avaliaram a permeabilidade de 93 fármacos pelo método PAMPA, relacionando-a com as características físico-químicas que influem no processo de absorção. Para isso, utilizou como compartimento doador, meio tamponado a pH 5,5, filtro de PVDF com impregnação lipídica de 5,0 μL de uma solução a 1,0% de fosfatidilcolina em dodecano. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por duas horas sob agitação suave.

Outro estudo, visando analisar a permeabilidade de microemulsões contendo o ginsenosídeo Rg1 (componente natural da *Panax notoginseng*) pelo método PAMPA, utilizou placas contendo filtro de PVDF com impregnação lipídica de 10,0 μL de uma solução a 10,0% de fosfatidilcolina em dodecano. Como compartimentos doador e receptor, TF (pH 7,4). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por duas horas sob agitação de 50 rpm (HAN et al., 2009).

Como o intuito é mimetizar as condições do organismo humano, optou-se por realizar o ensaio sob agitação suave de 50 rpm, promovendo assim, o máximo de absorção dos fármacos devido à diminuição da camada de água estacionária formada. O tempo do experimento foi reduzido para 5 horas, pois uma vez promovida a agitação do sistema, o processo de permeabilidade tende a ser acelerado, e caso o experimento seja prolongado, a quantificação dos fármacos nos compartimentos doador e receptor pode se tornar inviável devido a possibilidade de ocorrência do equilíbrio entre os sistemas. Em PAMPA, normalmente o tempo de incubação deve estar compreendido entre 3 e 12 horas (AVDEEF, 2003).

Com relação à composição lipídica da membrana, a finalidade é aproximar-se ao máximo da composição da membrana intestinal. Um estudo visando identificar a composição lipídica da membrana intestinal de ratos detectou que a sua maior parte é composta por fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, sendo as duas juntas responsáveis por cerca de 70,0% de toda a composição (FORSTNER; TANAKA; ISSELBACHER, 1968). Unindo a isso, o fato de Kansy, Senner e Gubernator (1998) preconizarem para os ensaios PAMPA uma composição lipídica de membrana contendo uma solução de lecitina de ovo (vale lembrar, que a lecitina de ovo é composta em sua maior parte por fosfatidilcolina) variando de 1,0 a 20,0% de concentração em solvente orgânico, geralmente dodecano, para a padronização foram testadas 3 concentrações de soluções lipídicas: 10,0%, 5,0% e 1,0%. Entretanto somente foi possível a realização do experimento para as últimas duas soluções uma vez que, a amostra com 10,0% não apresentou solubilidade adequada impossibilitando a sua impregnação no filtro.

Os resultados obtidos para os ensaios de PAMPA utilizando os fármacos furosemida e cloridrato de propranolol sob as condições: compartimento doador contendo meio FISSE (pH 6,8), compartimento receptor contendo meio TF (pH 7,4), agitação de 50 rpm, tempo de incubação de 5 horas à 37,0°C e filtros com impregnação lipídica de 5,0 µL de soluções a 5,0% e 1,0% de fosfatidilcolina em dodecano estão apresentados nas Tabelas 3.18 e 3.19, respectivamente.

Tabela 3.18: Resultados de permeabilidade efetiva (P_{eff}) para a furosemida utilizando o meio FISSE (pH 6,8) como compartimento doador, solução lipídica a 5,0%, agitação de 50 rpm por 5 horas à 37°C.

Concentração experimental média (mol/mL) \pm DP		P_{eff} (cm/s)
<i>Solução lipídica a 5%</i>		
<i>Compartimento doador</i>	<i>Compartimento receptor</i>	
$2,48 \times 10^{-7} \pm 0,13$	$0,004 \times 10^{-7} \pm 0,006$	$0,12 \times 10^{-6}$
<i>Solução lipídica a 1%</i>		
<i>Compartimento doador</i>	<i>Compartimento receptor</i>	
$2,33 \times 10^{-7} \pm 0,30$	$0,006 \times 10^{-7} \pm 0,005$	$0,19 \times 10^{-6}$

Tabela 3.19: Resultados de permeabilidade efetiva (P_{eff}) para o cloridrato de propranolol utilizando o meio FISSE (pH 6,8) como compartimento doador, solução lipídica a 5,0%, agitação de 50 rpm por 5 horas à 37°C.

Concentração experimental média (mol/mL) \pm DP		P_{eff} (cm/s)
<i>Solução lipídica a 5%</i>		
<i>Compartimento doador</i>	<i>Compartimento receptor</i>	
$2,03 \times 10^{-7} \pm 0,20$	$0,25 \times 10^{-7} \pm 0,06$	$9,23 \times 10^{-6}$
<i>Solução lipídica a 1%</i>		
<i>Compartimento doador</i>	<i>Compartimento receptor</i>	
$2,14 \times 10^{-7} \pm 0,25$	$0,27 \times 10^{-7} \pm 0,03$	$9,37 \times 10^{-6}$

Como esperado a presença de agitação melhorou a permeabilidade efetiva do cloridrato de propranolol, já que a camada de água estacionária foi diminuída e a permeação favorecida. Já com relação à furosemida, não houve diferença pronunciada entre o grau de permeação, isso pode ser justificado pelo seu grau de ionização no meio FISSE (pH 6,8) e também pelo fato de grande parte da absorção desse fármaco ser devido ao processo de permeação paracelular (GONÇALVES; SOUZA; STORPIRTIS, 2009), o qual não é representado pelo ensaio PAMPA. De forma semelhante a outros grupos de pesquisa, o ideal seria o uso de mais de um marcador de baixa permeabilidade (REIS, 2013).

Com relação à composição lipídica da membrana, não houve diferença pronunciada entre os valores de permeabilidade efetiva encontrados para ambos os fármacos, utilizando-se soluções de fosfatidilcolina a 5,0% e 1,0%. Como o intuito é representar ao máximo as

condições da membrana gastrointestinal, optou-se então por padronizar o teste empregando soluções de fosfatidilcolina a 5,0%.

Considerando todos os ensaios realizados, o método PAMPA foi padronizado da seguinte forma: compartimento doador contendo meio FISSE (pH 6,8) e compartimento receptor contendo TF (pH 7,4). Filtro impregnado com 5,0 µL de solução lipídica de fosfatidilcolina a 5,0% em dodecano. Agitação de 50 rpm, durante 5 horas à 37°C.

3.3.1.3 Avaliação da permeabilidade *in vitro* da eremantolida C pelo método PAMPA

3.3.1.3.1 Validação do método analítico para quantificação da eremantolida C no fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato - TF (pH 7,4)

Visando garantir confiabilidade e reprodutibilidade ao método desenvolvido para a quantificação da eremantolida C nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4), os parâmetros linearidade, seletividade, precisão, exatidão e limites de detecção e quantificação foram avaliados. E, para isso, utilizaram-se as condições cromatográficas descritas no Quadro 3.4.

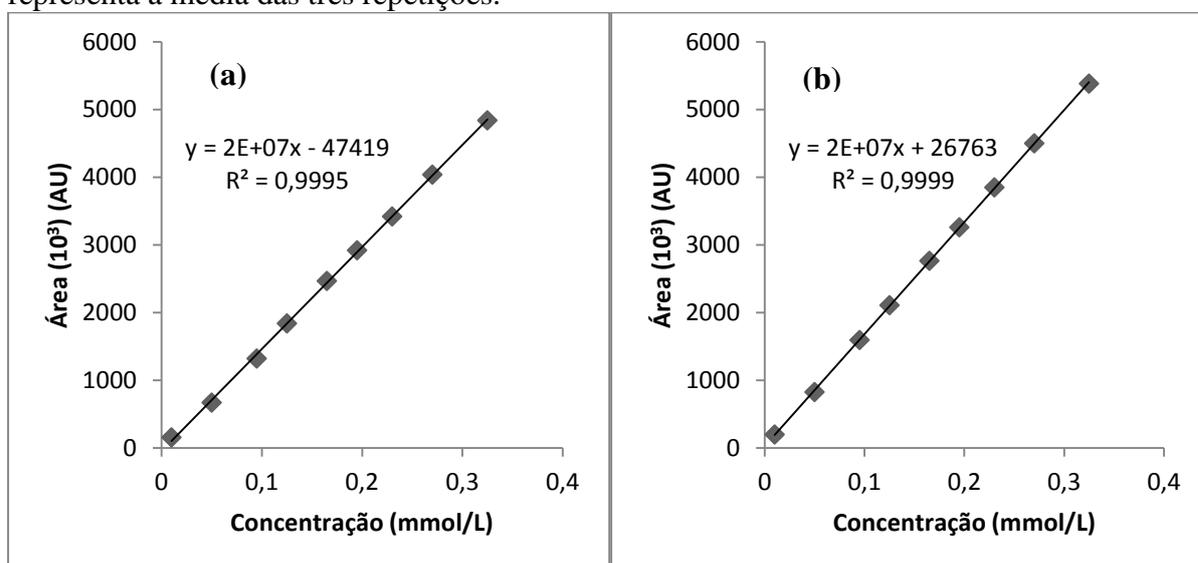
Quadro 3.4: Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação da eremantolida C nos meios tamponados.

<p>Detector: UV- 267 nm Coluna: C18 (150 x 4,6 mm; 3µm) Temperatura: 30,0°C Fluxo: 1,0 mL/minuto Volume de injeção: 25,0 µL Fase móvel: Acetonitrila:Água (50:50)</p>

3.3.1.3.1.1 Linearidade

O método analítico é considerado linear quando este apresenta coeficiente de correlação (r) superior a 0,99 (BRASIL, 2003). A seguir, na Figura 3.10, estão representadas as curvas analíticas obtidas a partir da avaliação da eremantolida C nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).

Figura 3.10: Curvas analíticas para a avaliação da linearidade do método analítico de quantificação da eremantolida C em: (a) FISSE (pH 6,8) e (b) TF (pH 7,4). Cada ponto representa a média das três repetições.



Na Tabela 3.20 estão compilados todos os dados referentes à curva analítica média da eremantolida C nos meios biorrelevantes em questão.

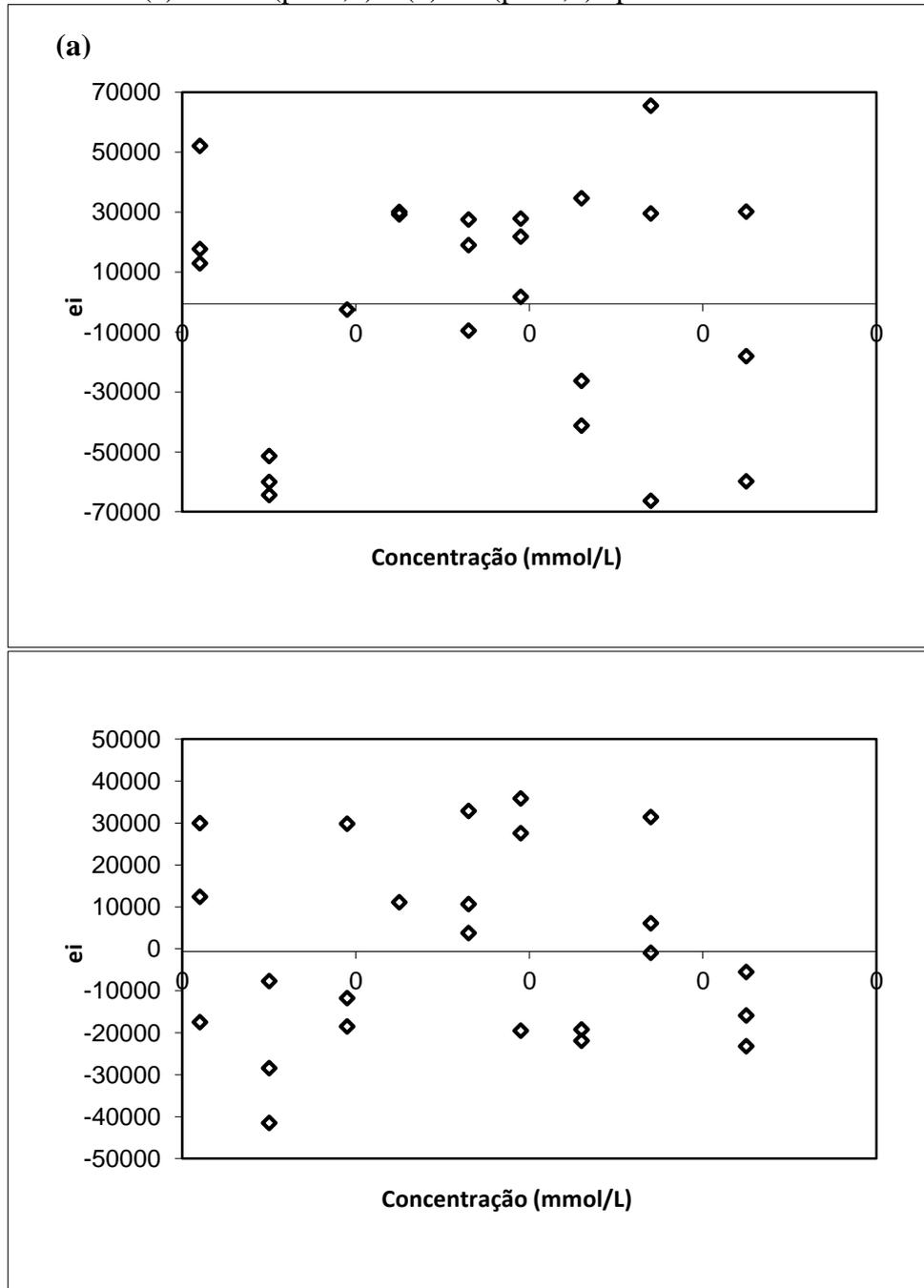
Tabela 3.20: Parâmetros da regressão linear do método analítico de quantificação da eremantolida C em FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4). Coeficientes referentes à reta média das três repetições.

Parâmetro da regressão	FISSE (pH 6,8)	TF (pH 7,4)
Coeficiente linear (a)	$-47419 \pm 27241,5$	$26763 \pm 21149,8$
Coeficiente angular (b)	$1,51 \times 10^7 \pm 167393,2$	$1,66 \times 10^7 \pm 128185,6$
Coeficiente de determinação (r^2)	0,9995	0,9999
Coeficiente de correlação (r)	0,9997	0,9999

Como demonstrado, ambos os métodos de quantificação apresentaram coeficientes de correlação superior a 0,99, conferindo linearidade aos métodos. Além disso, para complementar a avaliação da linearidade, foi realizada a análise dos resíduos da regressão linear, bem como das premissas relativas à regressão: normalidade, homocedasticidade e independência.

A análise de resíduos foi conduzida por meio do teste padronizado de *Jacknife* e seis valores dispersos (“outliers”) foram detectados durante a análise dos resíduos da regressão linear para o método de quantificação da eremantolida C, três no meio FISSE (pH 6,8) e três no meio TF (pH 7,4), originando os gráficos representados na Figura 3.11.

Figura 3.11: Gráficos de resíduos da regressão linear do método analítico de quantificação da eremantolida C em: (a) FISSE (pH 6,8) e (b) TF (pH 7,4) após tratamento de *outliers*.



A exclusão de *outliers* poderia atingir no máximo 22,2% do total de dados originais (SOUZA et al., 2007). E, portanto, esse critério foi cumprido para os métodos analíticos de quantificação em questão.

As premissas de que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal, são homocedásticos e independentes, foram confirmadas, garantindo uma aplicação da ANOVA

para a estimativa do desvio da linearidade e da significância da regressão. Todos os resultados obtidos foram resumidos na Tabela 3.21.

Tabela 3.21: Valores encontrados para as premissas dos resíduos da regressão linear, desvio da linearidade e significância da regressão, provenientes da análise das curvas analíticas obtidas para a eremantolida C nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).

Avaliação	FISSE (pH 6,8)	TF (pH 7,4)
<u>Normalidade</u>		
<i>Valor encontrado</i>	0,9606	0,9735
<i>Valor de referência</i>	Maior que 0,9569	Maior que 0,9651
<u>Homocedasticidade</u>		
<i>Valor encontrado</i>	0,5330	0,2330
<i>Valor de referência</i>	Menor que 2,074	Menor que 2,1790
<u>Independência</u>		
<i>Valor encontrado</i>	1,7516	2,2599
<i>Valor de referência</i>	Entre 1,4458 e 2,5542	Entre 1,3641 e 2,6359
<u>Desvio da linearidade</u>		
<i>Valor encontrado</i>	1,957	2,002
<i>Valor de referência</i>	Menor que 2,7066	Menor que 2,7066
<u>Significância da regressão</u>		
<i>Valor encontrado</i>	33836,82	127137,32
<i>Valor de referência</i>	Maior que 4,3010	Maior que 4,3010

Após análise de todos os dados expostos, o método de quantificação da eremantolida C nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) dentro do intervalo proposto foi considerado linear, uma vez que cumpriu com todos os requisitos necessários.

3.3.1.3.1.2 Seletividade

O método para a quantificação da eremantolida C nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) mostrou-se seletivo, já que além do decaimento da concentração da substância após as condições extremas a qual foi submetida, houve a formação de produtos de degradação, conforme pode ser constatado nas Figuras 3.12 e 3.13 para os meios FISSE e TF, respectivamente.

Figura 3.12: Cromatogramas obtidos para a amostra de eremantolida C em FISSE (pH 6,8) na concentração de 0,165 mmol/L. Em (a) antes da exposição às condições drásticas e em (b) após submissão da amostra à 70,0°C (calor seco) durante 1 hora.

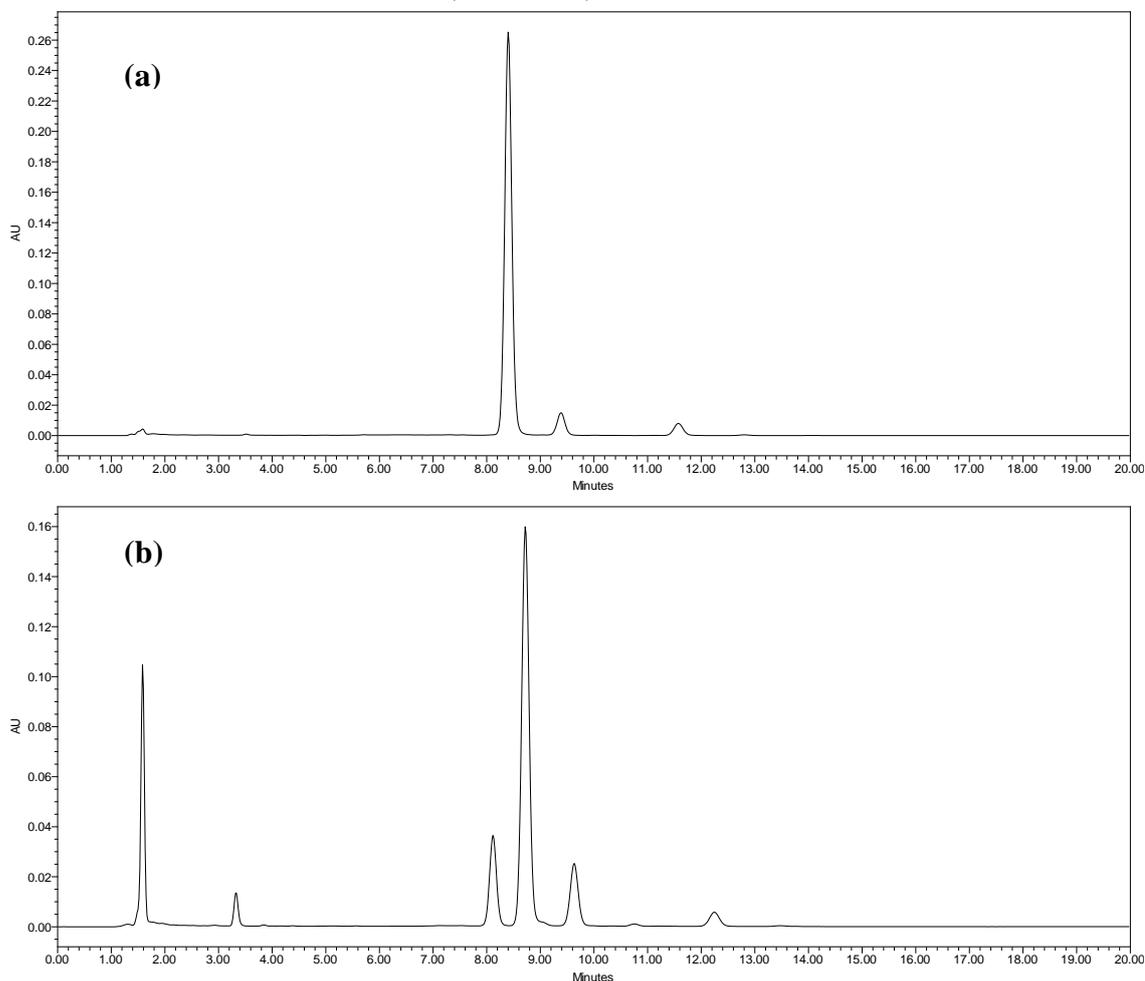
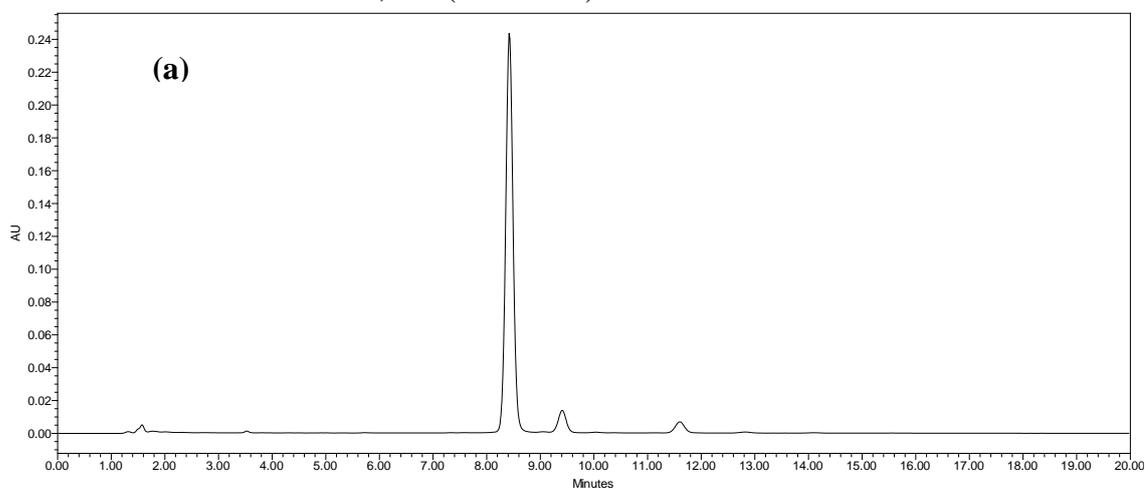
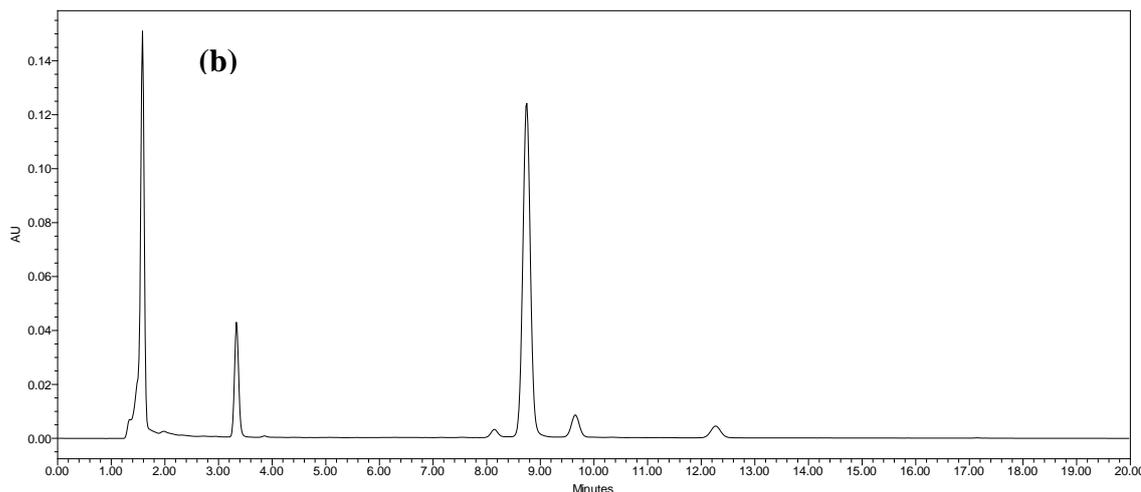


Figura 3.13: Cromatogramas obtidos para a amostra de eremantolida C em TF (pH 7,4) na concentração de 0,165 mmol/L. Em (a) antes da exposição às condições drásticas e em (b) após submissão da amostra à 70,0°C (calor seco) durante 1 hora.





3.3.1.3.1.3 Precisão

A precisão intradia e interdia, em três dias diferentes, foi avaliada para o método de quantificação da eremantolida C, e expressa por meio de valores de desvio padrão relativo (DPR%).

Os resultados referentes à precisão intradia e interdia para a eremantolida C nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) estão apresentados nas Tabelas 3.22 e 3.23, respectivamente.

Tabela 3.22: Precisão intradia e interdia do método de quantificação da eremantolida C no meio FISSE (pH 6,8) (n = 3).

Concentração teórica (mmol/L)	Concentração experimental média (mmol/L)	DPR (%) Intradia/Interdia	
Resultados 1º dia			
0,095	0,091	4,99	4,13
0,165	0,167	0,77	
0,230	0,230	1,16	
Resultados 2º dia			
0,095	0,097	0,60	1,10
0,165	0,166	1,74	
0,230	0,229	3,03	
Resultados 3º dia			
0,095	0,096	2,61	2,17
0,165	0,168	0,50	
0,230	0,233	2,46	

Tabela 3.23: Precisão intradia e interdia do método de quantificação da eremantolida C no meio TF (pH 7,4) (n = 3).

Concentração teórica (mmol/L)	Concentração experimental média (mmol/L)	DPR (%) Intradia/Interdia	
Resultados 1º dia			
0,095	0,095	1,67	2,03
0,165	0,166	0,55	
0,230	0,231	2,04	
Resultados 2º dia			
0,095	0,095	0,73	1,33
0,165	0,165	0,57	
0,230	0,229	0,97	
Resultados 3º dia			
0,095	0,097	2,62	2,41
0,165	0,167	2,36	
0,230	0,232	4,06	

Os resultados encontrados para a precisão intradia e interdia estão de acordo com o preconizado pela RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da Anvisa (BRASIL, 2003), uma vez que apresentaram valores de DPR% inferiores a 5,0%.

3.3.1.3.1.4 Exatidão

Assim como a precisão, a exatidão intradia e interdia foi avaliada para concentrações baixa, média e alta da eremantolida C, de forma que contemplasse o intervalo linear.

Nas Tabelas 3.24 e 3.25 estão apresentados os valores encontrados para a exatidão intradia e interdia do método de quantificação da eremantolida C nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4), respectivamente.

Tabela 3.24: Exatidão intradia e interdia do método de quantificação da eremantolida C no meio FISSE (pH 6,8) (n = 3).

Concentração teórica (mmol/L)	Concentração experimental média (mmol/L)	Exatidão (%) Intradia/Interdia	
Resultados 1º dia			
0,095	0,091	95,56	99,52
0,165	0,167	100,99	
0,230	0,230	99,89	
Resultados 2º dia			
0,095	0,097	102,12	100,95
0,165	0,166	100,35	
0,230	0,229	99,56	

(Continua)

(Continuação)

Resultados 3º dia			
0,095	0,096	100,70	100,23
0,165	0,168	101,52	
0,230	0,233	101,23	

Tabela 3.25: Exatidão intradia e interdia do método de quantificação da eremantolida C no meio TF (pH 7,4) (n = 3).

Concentração teórica (mmol/L)	Concentração experimental média (mmol/L)	Exatidão (%) Intradia/Interdia	
Resultados 1º dia			
0,095	0,095	99,70	100,69
0,165	0,166	100,35	
0,230	0,231	100,44	
Resultados 2º dia			
0,095	0,095	100,02	100,61
0,165	0,165	100,26	
0,230	0,229	99,67	
Resultados 3º dia			
0,095	0,097	102,34	100,39
0,165	0,167	101,21	
0,230	0,232	101,05	

Por apresentar tanto a exatidão intradia quanto a interdia entre 95,0 e 105,0% (KUMAR et al., 2012), o método analítico para quantificação da eremantolida C nos meios biorrelevantes foi considerado exato.

3.3.1.3.1.5 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados a partir dos coeficientes angulares (b) e lineares (a) das curvas analíticas obtidas na avaliação do método de quantificação da eremantolida C nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4), e estão apresentados na Tabela 3.26.

Tabela 3.26: Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) calculados para o método de quantificação da eremantolida C nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).

Meio biorrelevante	LD (mmol/L)	LQ (mmol/L)
<i>Fluido intestinal simulado sem enzimas (pH 6,8)</i>	0,0054	0,0181
<i>Tampão fosfato (pH 7,4)</i>	0,0038	0,0128

Os valores encontrados para ambos os limites indicam que o intervalo proposto para a quantificação da eremantolida C nos meios biorrelevantes em questão está coerente com a proposta de aplicação.

3.3.1.3.2 Avaliação da permeabilidade *in vitro* da eremantolida C

A eremantolida C é uma lactona sesquiterpênica com caráter lipofílico, e a sua alta permeabilidade *in silico* foi confirmada pela avaliação *in vitro* utilizando o método PAMPA.

Na Tabela 3.27 estão apresentados os resultados encontrados para a permeabilidade efetiva (P_{eff}) da eremantolida C de acordo com as condições padronizadas anteriormente para a avaliação da permeabilidade *in vitro* utilizando o método PAMPA.

Tabela 3.27: Resultados de permeabilidade efetiva (P_{eff}) para a eremantolida C utilizando como compartimento doador o meio FISSE (pH 6,8), solução lipídica a 5,0%, agitação de 50 rpm por 5 horas à 37,0°C.

Concentração experimental média (mol/mL) \pm DP		P_{eff} (cm/s)
Compartimento doador	Compartimento receptor	
$1,38 \times 10^{-7} \pm 0,03$	$0,52 \times 10^{-7} \pm 0,04$	$30,4 \times 10^{-6}$

Como observado, a P_{eff} da eremantolida C foi cerca de três vezes superior à encontrada para o fármaco padrão de alta permeabilidade, cloridrato de propranolol, que apresentou P_{eff} igual a $9,23 \times 10^{-6}$ cm/s.

Isto sugere que o processo de absorção da eremantolida C ocorra principalmente pelo processo passivo transcelular, uma vez que, este é o meio de permeação mimetizado pelo ensaio PAMPA. O transporte passivo transcelular é caracterizado pela passagem de substância através da membrana e para que isso ocorra, o composto deve ser suficientemente lipofílico e possuir moderado peso molecular (GONÇALVES; SOUZA; STORPIRTIS, 2009), características que justificam a alta permeabilidade *in vitro* apresentada pela EREC.

O ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela tem sido amplamente utilizado no processo de descoberta de novos fármacos, principalmente para substâncias de origem natural. Avdeef e colaboradores (2001) avaliaram a permeabilidade de cinco cavalactonas provenientes da *Piper methysticum* Forst. (conhecida popularmente como kava-kava) por meio da técnica de membrana artificial imobilizada (IAM), na qual um “sanduíche” foi formado com duas placas, uma doadora e outra receptora, contendo TF (7,4), separadas por um filtro impregnado com uma solução a 2,0% de dioleoilfosfatidilcolina em dodecano.

Todas as cavalactonas em questão apresentaram valores de permeabilidade efetiva entre $23,4 \times 10^{-6}$ e $44,7 \times 10^{-6}$, os quais as conferiram alta permeabilidade, devido comparação com os fármacos padrão de alta permeabilidade aplicados ao estudo.

Também já foram descritos estudos de permeabilidade para isoflavonas utilizando o método PAMPA. Com os compartimentos doador e receptor apresentando tampão fosfato e a membrana sendo composta por uma solução lipídica de fosfatidilcolina a 1,0% em dodecano. Apenas duas das quatro isoflavonas avaliadas apresentaram alta permeabilidade (VENZKE et al., 2013).

Entretanto, uma das principais preocupações na investigação de substâncias naturais candidatas a fármacos é que muitas destas com potentes atividades biológicas *in vitro* são incapazes de gerar boa atividade *in vivo* devido a sua má solubilidade, baixa permeabilidade e/ou pouca estabilidade (RUAN, 2006).

Estudos na literatura têm relatado que grande parte das substâncias naturais isoladas que possuem atividades biológicas não chega a fármaco devido a sua baixa permeabilidade. Ruan e colaboradores (2006) avaliaram a permeabilidade de treze substâncias de origem natural utilizando o ensaio *in vitro* com tecido não-invertido e constatou, que destas, apenas duas apresentavam alta permeabilidade e potencialidade de absorção por via oral.

A eremantolida C, apesar de apresentar baixa solubilidade em meios biorrelevantes, a qual não limita a sua biodisponibilidade oral, pois é comparável a vários fármacos que estão hoje no mercado, com um LogS entre -1 e -5, caracterizando a polaridade necessária para a solubilidade (JORGENSEN; DUFFY, 2002), exibe alta permeabilidade, um dos fatores mais críticos na definição da biodisponibilidade oral de fármacos, o que, portanto a torna um potencial candidato a fármaco.

Considerando isso, a alta permeabilidade apresentada pela eremantolida C no PAMPA combinada com a sua solubilidade, atividades farmacológicas e baixa toxicidade, demonstram a sua importância como potencial candidato a fármaco e assim, mais uma nova opção terapêutica para o tratamento de diversas enfermidades. Porém, mais estudos são necessários, de modo que seja proposta uma formulação adequada para a administração oral dessa substância, proporcionando sua máxima biodisponibilidade, e conseqüentemente máxima eficácia terapêutica.

3.4 CONCLUSÃO

As condições propostas para a validação do ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA) foram adequadas, uma vez que possibilitou observar diferença significativa entre os valores de permeabilidade efetiva (P_{eff}) encontrados para os fármacos padrão de baixa e alta permeabilidade: furosemida e cloridrato de propranolol. Além disso, a validação dos métodos para a quantificação dos fármacos nos meios biorrelevantes FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) mostrou linearidade, seletividade, precisão e exatidão, dentro do intervalo empregado.

Assim como para os fármacos padrão, o método desenvolvido para a quantificação da eremantolida C nos ensaios de permeabilidade, apresentou linearidade, seletividade, precisão e exatidão dentro do intervalo proposto.

A padronização possibilitou a avaliação da permeabilidade *in vitro* da eremantolida C, o que veio a confirmar os dados obtidos *in silico*: alta permeabilidade, apresentando valor de P_{eff} cerca de três vezes superior ao encontrado para o cloridrato de propranolol.

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram as seguintes conclusões:

- A avaliação *in silico* da eremantolida C sugeriu que esta substância apresenta baixa solubilidade e alta permeabilidade.

- Visando os estudos de solubilidade em equilíbrio, o método proposto para a quantificação da eremantolida C nos meios biorrelevantes TA (4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (7,4) mostrou-se linear, seletivo, preciso, exato e robusto para as variáveis: temperatura do forno da coluna, comprimento de onda de detecção e proporção de solventes da fase móvel.

- A miniaturização do método de agitação orbital em frasco foi adequada, pois os valores de solubilidade obtidos foram próximos aos encontrados utilizando o método convencional, o que permitiu a avaliação da solubilidade em equilíbrio da eremantolida C por essa técnica.

- A baixa solubilidade encontrada *in silico* para eremantolida C foi confirmada por meio da avaliação da solubilidade em equilíbrio utilizando o método da agitação orbital em frasco. Os valores de razão D/S foram muito superiores a 250 mL, conforme preconizado pelas agências regulatórias.

- Visando os estudos de permeabilidade utilizando a técnica PAMPA, os métodos propostos para a quantificação dos fármacos padrão: furosemida e cloridrato de propranolol, bem como da eremantolida C, nos meios biorrelevantes FISSE (6,8) e TF (7,4) mostraram-se lineares, seletivos, precisos e exatos dentro do intervalo proposto.

- A padronização do método PAMPA foi obtida utilizando os fármacos padrão de baixa e alta permeabilidade: furosemida e cloridrato de propranolol, e as seguintes condições experimentais: compartimento doador contendo meio FISSE (pH 6,8) e compartimento receptor contendo TF (pH 7,4); filtro impregnado com 5,0 µL de solução lipídica de fosfatidilcolina a 5,0% em dodecano; agitação de 50 rpm, durante 5 horas à 37°C.

- A alta permeabilidade encontrada *in silico* para eremantolida C foi confirmada por meio da avaliação da permeabilidade *in vitro* utilizando o método PAMPA, apresentando P_{eff} igual a $30,4 \times 10^{-6}$, ou seja, cerca de três vezes superior ao do cloridrato de propranolol ($9,23 \times 10^{-6}$).

Considerando todo o exposto acima, pode-se concluir que a medida da permeabilidade juntamente com a solubilidade permite prever a absorção gastrointestinal de substâncias candidatas a fármacos, como a eremantolida C.

REFERÊNCIAS

- AMIDON, G. L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research*. v. 12, p. 413-420, 1995.
- ASHFORD, M. O trato gastrointestinal – fisiologia e absorção de fármacos. In ____ Delineamento de Formas Farmacêuticas. 2 ed. Artmed. p. 229-244, 2005.
- ASHFORD, M. Biodisponibilidade – fatores físico-químicos e relacionados à forma farmacêutica. In ____ Delineamento de Formas Farmacêuticas. 2 ed. Artmed. p. 245-263, 2005.
- AULTON, M. Propriedades das soluções. In ____ Delineamento de Formas Farmacêuticas. 2 ed. Artmed. p. 48-55, 2005.
- 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, p. 365-374, 2004.
- AVDEEF, A. Absorption and drug development: solubility, permeability and charge state. Wiley-Interscience, 2003. 287p.
- 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, p. 271-280, 2001.
- BABU, V. R.; AREEFULLA, S. H.; MALLIKARJUN, V. Solubility and dissolution enhancement: an overview. *Journal of Pharmacy Research*. v. 3, n. 1, p. 141-145, 2010.
- 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, p. 301-312, 2000.
- BENET, L. Z.; AMIDON, G. L.; BARENDIS, D. M.; LENNERNÄS, H.; POLLI, J. E.; SHAH, V. P.; STAVCHANSKY, S. A.; YU, L. X. The use of BDDCS in classifying the permeability of marketed drugs. *Pharmaceutical Research*. v. 52, n. 3, p. 483-488, 2008.
- BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; ROBINSON, H.; KING, R. M. Caryophyllene derivatives and a heliangolide from *Lychnophora* species. *Phytochemistry*. v. 19. p. 2381-2385, 1980.
- BORELLA, J. C.; LOPES, J. L. C.; VICHNEWSKI, W.; CUNHA, W. R.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones, triterpenes and flavones from *Lychnophora ericoides* and *Lychnophora pseudovillosissima*. *Biochemical Systematics and Ecology*. v. 26, p. 671-676, 1998.
- BRASIL. Instrução Normativa IN nº 02, de 14 de março de 2013. Determina a publicação da “Lista de fármacos candidatos à bioisenção baseada no sistema de classificação

biofarmacêutica (SCB)” e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 5 de março de 2013.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº37, de 3 de agosto de 2011. “Dispõe sobre o guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência e dá outras providências.” Diário Oficial da União, Brasília, 2 de agosto de 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia Brasileira*. Brasília: Anvisa, 2010. v.1, 524p.

BRASIL. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.” Diário Oficial da União, Brasília, 2 de junho de 2003.

BUENO, M. M.; RECH, N. Insumos Farmacêuticos – Aspectos Técnicos Científicos e Regulatórios. In _____. *Biofarmacotécnica*. Guanabara Koogan. p. 204-211, 2011.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products*. v. 67, n. 12, p. 2141-2153, 2004.

CERQUEIRA, M. B. S.; SOUZA, J. T.; JÚNIOR, R. A.; PEIXOTO, A. B. F. Ação analgésica do extrato bruto aquoso liofilizado do caule e folhas de *Lychnophora ericoides* Mart. *Ciência e Cultura*. v. 39; p. 551-553, 1987.

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.

CHEN, X. Q.; VENKATESH, S. Miniature device for aqueous and non-aqueous solubility measurements during drug discovery. *Pharmaceutical Research*. v. 21, n. 10, 2004.

CRISTOFOLETTI, R.; CHIANN, C.; DRESSMAN, J. B.; STORPIRTIS, S. A comparative analysis of biopharmaceutics classification system and biopharmaceutics drug disposition classification system: a cross-sectional survey with 500 bioequivalence studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 102, n. 9, p. 3136-3144, 2013.

DAI, W. G.; POLLOCK-DOVE, C.; DONG, L. C.; LI, S. Advanced screening assays to rapidly identify solubility-enhancing formulations: High-throughput, miniaturization and automation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 60. p. 657-672, 2008.

DEZANI, A. B. *Avaliação in vitro da solubilidade e permeabilidade da lamivudina e zidovudina. Aplicações na Classificação Biofarmacêutica*. São Paulo, 2010. 141p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – Universidade de São Paulo.

DOMANSKA, U.; POBUDKOWSKA, A.; PELCZARSKA, A.; ZUKOWSKI, L. Modelling, solubility and pKa of five sparingly soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 403, p. 115-122, 2011.

EMA-EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Guideline on the investigations of bioequivalence. London, 2010. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf> Acesso em 23 de junho de 2013.

ERTL, P.; ROHDE, B.; SELZER, P. Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *Journal of Medicinal Chemistry*. v. 43, n. 20, p. 3714-3717, 2000.

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

FDA Guidance for Industry: waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms base on a biopharmaceutics classification system. Rockville: FDA, p. 1-13, 2000. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070246.pdf>> Acesso em 23 de junho de 2013.

FERNANDES, M. B. *Permeabilidade in vitro e in silico de análogos à nifuroxazida com atividade potencial frente a cepas multirresistentes de Staphylococcus aureus*. São Paulo, 2012. 228p. Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – Universidade de São Paulo.

FERRAZ-FILHA, Z. S. *Avaliação das atividades biológicas de espécies do gênero Lychnophora (arnicas) e estudo fitoquímico do extrato ativo de Lychnophora staavioides Mart.*. Ouro Preto, 2008. 135p. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Ouro Preto.

FERRARI, F. C.; FERREIRA, L. C.; SOUZA, M. R.; GRABE-GUIMARÃES, A.; PAULA, C. A.; REZENDE, S. A.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. Anti-inflammatory sesquiterpene lactones from *Lychnophora trichocarpha* Spreng. (Brazilian arnica). *PTR. Phytotherapy Research*. v. 27, p. 384-389, 2013.

FERRARI, F. C. *Estudo fitoquímico da fração acetato de etila, avaliação da atividade anti-inflamatória in vitro e in vivo e da toxicidade em camundongos de Lychnophora trichocarpha Spreng.*. Ouro Preto, 2008. 118p. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Ouro Preto.

FORSTNER, G. G.; TANAKA K.; ISSELBACHER, K. J. Lipid composition of the isolated rat intestinal microvillus membrane. *Biochemical Journal*. v. 109, p. 51-59, 1968.

FREITAS, G. C.; CARREGARO, A. B.; Aplicabilidade da extrapolação alométrica em protocolos terapêuticos para animais selvagens. *Ciência Rural*. v. 43, n. 2, p. 297-304, 2013.

GLOMME, A.; MÄRZ, J.; DRESSMAN, J. B. Comparison of a miniaturized shake-flask solubility method with automated potentiometric acid/base titrations and calculated solubilities. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 33, n. 1, p. 1-16, 2005.

GONÇALVES, J. E.; FERNANDES, M. B.; CHIANN, C.; GAI, M. N.; SOUZA, J.; STORPIRTIS, S. Effect of pH, mucin and bovine serum on rifampicin permeability through Caco-2 cells. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*. v. 33, p. 316-323, 2012.

GONÇALVES, J. E.; SOUZA, J.; STORPIRTIS, S. Avaliação da permeabilidade de fármacos empregando cultura celulares. In _____ Biofarmacotécnica. Guanabara Koogan. p. 204-211, 2009.

GRANERO, G. E.; LONGHI, M. R.; MORA, M. J.; JUNGINGER, H. E.; MIDHA, K. K.; SHAH, V. P.; STAVCHANSKY, S.; DRESSMAN, J. B.; BARENDT, D. M. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: furosemide. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 99, n. 6, p. 2544-2556, 2010.

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

HAN, M.; FU, S.; GAO, J. Q.; FANG, X. L. Evaluation of intestinal absorption of ginsenoside Rg1 incorporated in microemulsion using parallel artificial membrane permeability assay. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. v. 32, n. 6, p. 1069-1074, 2009.

HENRIQUES, B. O. *Avaliação da estabilidade do extrato etanólico de Lychnophora trichocarpa Spreng. e da eremantolida C.* Ouro Preto, 2011. 97p. Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Ouro Preto.

HILGERS, A. R.; CONRADI, R. A.; BURTON, P. S. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharmaceutical Research*. v. 7, n. 9, p. 902-910, 1990.

ISSA, M. G.; FERRAZ, H. G. Intrinsic dissolution as a tool for evaluating drug solubility in accordance with the biopharmaceutics classification system. *Dissolution Technologies*. p. 6-13, 2011.

JATWANI, S.; RANA, A. C.; SINGH, G.; AGGARWAL, G. An overview on solubility enhancement techniques for poorly soluble drugs and solid dispersion as an eminent strategic approach. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 3, n. 4, p. 942-956, 2012.

JORGENSEN, W. L.; DUFFY, E. M. Prediction of drug solubility from structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 54, p. 355-366, 2002.

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.

KASIM, N. A.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO, M.; LENNERNÄS, H.; HUSSAIN, A. S.; JUNGINGER, H. E.; STAVCHANSKY, S. A.; MIDHA, K. K.; SHAH, V. P.; AMIDON, G. L. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Molecular Pharmaceutics*. v. 1, n. 1, p. 85-96, 2004.

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.

KUMAR, N.; SANGEETHA, D.; REDDY, P. S.; REDDY, A. M. Development and validation of a dissolution test for delayed release capsule formulation of duloxetine hydrochloride. *Current Pharmaceutical Analysis*. v. 8, n. 3, p. 236-246, 2012.

LACERDA, D. S.; LIONZO, M. Aspectos atuais da biodisponibilidade de fármacos com baixa solubilidade: um enfoque sobre a sinvastatina. *Infarma*. v. 24, n. 5/6, p. 3-9, 2011.

LE QUESNE, P. W.; LEVERY, S. B.; MENACHERY, M. D.; BRENNAN, T. F.; RAFFAUF, R. F. Novel modified germacranolides and other constituents of *Eremanthus elaeagnus* Achultz-Bip. (Compositae). *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I*, p. 1572-1580, 1978.

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

LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J. B. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization model list of essential medicines according to the biopharmaceutics classification system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v. 58, p. 265-278, 2004.

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, p. 3-26, 2001.

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

LU, J. J.; CRIMIN, K.; GOODWIN, J. T.; CRIVORI, P.; ORRENIUS, C.; XING, L.; TANDLER, P. J.; VIDMAR, T. J.; AMORE, B. M.; WILSON, A. G. E.; STOUTEN, P. F. W.; BURTON, P. S. Influence of molecular flexibility and polar surface area metrics on oral bioavailability in the rat. *Journal of Medicine Chemistry*. v. 47, n. 24, p. 6104-6107, 2004.

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

MARVIN SKETCH PROGRAM®. Disponível em:
<<http://www.chemaxon.com/marvin/sketch/index.php>> Acesso em 11 de agosto de 2014.

MONTEIRO, P. F. *Solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frascos: padronização e definição dos fármacos controle*. Ouro Preto, 2014. 138p. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Ouro Preto.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*. v. 75, p. 311-335, 2012.

NIELSEN, P. E.; AVDEEF, A. PAMPA – a drug absorption *in vitro* model 8. Apparent filter porosity and the unstirredwater layer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 22, p. 33-41, 2004.

OLIVEIRA, M. E.; MANZO, R. H. O Sistema de Classificação Biofarmacêutica e as bioisencões. In _____ Biofarmacotécnica. Guanabara Koogan. p. 187-203, 2009.

OLIVEIRA, A. B.; SAÚDE, D. A.; PERRY, K. S. P.; DUARTE, D. S.; RASLAN, D. S.; BOAVENTURA, M. A. D.; CHIARI, E. Trypanocidal sesquiterpenes from *Lychnophora* species. *Phytotherapy Research*. v. 10, p. 292-295, 1996.

OSIRIS PROPERTY EXPLORER®. Disponível em:

<<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/php>> Acesso em 11 de agosto de 2014.

ÖSTERBERG, T.; NORINDER, U. Prediction of polar surface area and drug transport processes using simple parameters and PLS statistics. *Journal of Chemical Information and Modeling*. v. 40, n. 6, p. 1408-1411, 2000.

PALM, K.; STENBERG, P.; LUTHMAN, K.; ARTURSSON, P. Polar molecular surface properties predict the intestinal absorption of drugs in humans. *Pharmaceutical Research*. v. 14, n. 5, p. 568-571, 1997.

PANCHAGNULA, R.; THOMAS, N. S. Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 201, p. 131-150, 2000.

PAULA, D. C. C. *Atividade cardiovascular in vivo do extrato etanólico de Lychnophora trichocarpa Spreng.*. Ouro Preto, 2012. 97p. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Ouro Preto.

PEREIRA, T. M. *Avaliação da solubilidade e da permeabilidade intestinal de fármacos antirretrovirais. Aplicações na Classificação Biofarmacêutica*. São Paulo, 2011. 151p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

POLLI, J. E.; YU, L. X.; COOK, J. A.; AMIDON, G. L.; BORCHARDT, R. T.; BURNSIDE, B. A.; BURTON, P. S.; CHEN, M. L.; CONNER, D. P.; FAUSTINO, P. J.; HAWI, A. A.; HUSSAIN, A. S.; JOSHI, H. N.; KWEI, G.; LEE, V. H. L.; LESKO, L. J.; LIPPER, R. A.; LOPER, A. E.; NERURKAR, S. G.; POLLI, J. W.; SANVORDEKER, D. R.; TANEJA, R.; UPPOOR, R. S.; VATTIKONDA, C. S.; WILDING, I.; ZHANG, G. Summary workshop report: biopharmaceutics classification system—implementation challenges and extension opportunities. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 93, n. 6, p. 1375-1381, 2004.

REIS, A. C. C. *Desenvolvimento e validação de método analítico adequado a estudos biofarmacêuticos relativos à furosemida*. Ouro Preto, 2014. 80p. Trabalho de conclusão de curso – Universidade Federal de Ouro Preto.

REIS, J. M. *Utilização de PAMPA como ferramenta para predizer a fração de absorção in vivo de fármacos e sua correlação com a taxa de metabolização in vitro*. São Paulo, 2013. 157p. Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

REIS, J. M.; SINKÓ, B.; SERRA, C. H. R. Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) - Is it better than Caco-2 for human passive permeability prediction? *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. v. 10, p. 1071-1076, 2010.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*. v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RUAN, L. P.; CHEN, S.; YU, B.; ZHU, D. N.; CORDELL, G. A.; QIU, S. X. Prediction of human absorption of natural compounds by the non-everted rat intestinal sac model. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 41, p. 605-610, 2006.

SAÚDE, D. A.; BARRERO, A. F.; OLTRA, J. E.; JUSTICIA, J.; RASLAN, D. S.; SILVA, E. A. Atividade antibacteriana de furanoelíngólidos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 12, n. 1, p. 7-10, 2002.

SAÚDE, D. A.; RASLAN, D. S.; SOUZA FILHO, J. D.; OLIVEIRA, A. B. Constituents from the aerial parts of *Lychnophora trichocarpha*. *Fitoterapia*. v. 69, p. 90-91, 1998.

SAÚDE, D. A. *Estudo químico e atividade tripanossomicida de Lychnophora trichocarpha Spreng*. Belo Horizonte, 1994. 136p. Dissertação de mestrado – Departamento de Química – Universidade Federal de Minas Gerais.

SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; RASLAN, D. S.; OLIVEIRA, A. B. *In vitro* antitumor activity of sesquiterpene lactones from *Lychnophora trichocarpha*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. v. 16, n. 2, p. 275-282, 2014.

SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. *Transformações químicas, microbiológicas e atividades biológicas de lactonas sesquiterpênicas*. Belo Horizonte, 1998. Tese de doutorado – Departamento de Química – Universidade Federal de Minas Gerais.

SAVJANI, K. T.; GAJJAR, A. K.; SAVJANI, J. K. Drug solubility: importance and enhancement techniques. *International Scholarly Research Network Pharmaceutics*. v. 2012, 2012.

SJÖGREN, E.; WESTERGREN, J.; GRANT, I.; HANISCH, G.; LINDFORS, L.; LENNERNÄS, H.; ABRAHAMSSON, B.; TANNERGREN, C. In silico predictions of gastrointestinal drug absorption in pharmaceutical product development: Application of the mechanistic absorption model GI-Sim. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 49, p. 679-698, 2013.

SOUZA, J.; BENET, L. Z.; HUANG, Y.; STORPIRTIS, S. Comparison of bidirectional lamivudine and zidovudine transport using MDCK, MDCK-MDR1, and Caco-2 cell monolayers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 98, n. 11, 2009.

SOUZA, J.; FREITAS, Z. M. F.; STORPIRTIS, S. Modelos *in vitro* para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v. 43, n. 4, p. 515-527, 2007.

SOUZA, S. V. C.; LIMA, J. A.; TEODORO, J. C.; JUNQUEIRA, R. G. Validação intralaboratorial de método quantitativo para determinação múltipla de resíduos de avermectinas em leite bovino por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 27, n. 4, p. 823-836, 2007.

de SOUZA, M. R.; de PAULA, C. A.; REZENDE, M. L. P.; GRABE-GUIMARÃES, A.; de SOUZA FILHO, J. D.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. Pharmacological basis for use of *Lychnophora trichocarpha* in gouty arthritis: anti-hyperuricemic and anti-inflammatory effects of its extract, fraction and constituents. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 142, n. 3, p. 845-850, 2012.

STENBERG, P.; LUTTMAN, K.; ARTURSSON, P. Virtual screening of intestinal drug permeability. *Journal of Controlled Release*. v. 65, p. 231-243, 2000.

TAKÁCS-NOVÁK, K.; SZÖKE, V.; VÖLGYI, G.; HORVÁTH, P.; AMBRUS, R.; SZABÓ-RÉVÉSZ, P. Biorelevant solubility of poorly soluble drugs: Rivaroxaban, furosemide, papaverine and niflumic acid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v. 83, p. 279-285, 2013.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, 37 ed., United States Pharmacopeial Convention: Rockville, 2014.

VENZKE, D.; CARVALHO, F. K.; RUANI, A. P.; OLIVEIRA, A. S.; BRIGHENTE, I. M. C.; MICKE, G. A.; BARISON, A.; PIZZOLATTI, M. G. PAMPA permeability, acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of pyranoisoflavones from *Polygala molluginifolia* (Polygalaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*. v. 24, n. 12, p. 1991-1997, 2013.

VOGELPOEL, H.; WELINK, J.; AMIDON, G. L.; JUNGINGER, H. E.; MIDHA, K. K.; MÖLLER, H.; OLLING, M.; SHAH, V. P.; BARENDTS, D. M. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms based on biopharmaceutics classification system (BCS) literature data: verapamil hydrochloride, propranolol hydrochloride, and atenolol. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 93, n. 8, p. 1945-1956, 2004.

XUE, L.; BAJORATH, J. Molecular descriptors in chemoinformatics, computational combinatorial chemistry, and virtual screening. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. v. 3, p. 363-372, 2000.

YU, L. X.; CARLIN, A. S.; AMIDON, G. L.; HUSSAIN, A. S. Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 270, p. 221-227, 2004.

YU, L. X.; AMIDON, G. L.; POLLI, J. E.; ZHAO, H.; MEHTA, M. U.; CONNER, D. P.; SHAH, V. P.; LESKO, L. J.; CHEN, M. L.; LEE, V. H. L.; HUSSAIN, A. S. Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. *Pharmaceutical Research*. v. 19, n. 7, p. 921-925, 2002.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Technical Report Series, nº 937, 2006. Annex 8 – Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for WHO Model List of Essential Medicines immediate-release, solid oral dosage forms. Disponível em:

<http://apps.who.int/prequal/info_general/documents/TRS937/WHO_TRS_937__annex8_eng.pdf> Acesso em 03 de agosto de 2014.

ZHOU, L.; YANG, L.; TILTON, S; WANG, J. Development of a high throughput equilibrium solubility assay using miniaturized shake-flask method in early drug discovery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 96, n. 11, p. 3052-3071, 2007.

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 Medicinal Chemistry*. v. 37, p. 399-407, 2002.