

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

TAMIRES GUEDES CALDEIRA

**Potencial biofarmacêutico da eremantolida C: dissolução intrínseca e
perfusão intestinal *in situ* em ratos**

Ouro Preto – Minas Gerais – Brasil
Abril, 2019

TAMIRES GUEDES CALDEIRA

Potencial biofarmacêutico da eremantolida C: dissolução intrínseca e perfusão intestinal *in situ* em ratos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

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

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Dênia Antunes Saúde Guimarães

Ouro Preto – Minas Gerais – Brasil

Abril, 2019

C146a

Caldeira, Tamires Guedes.

Potencial biofarmacêutico da eremantolida C: dissolução intrínseca e perfusão intestinal in situ em ratos [manuscrito] / Tamires Guedes Caldeira. - 2019. 183f.: il.: color; graf.; tabs.

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

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Dênia Antunes Saúde-Guimarães.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

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

CDU: 615.45:582.998.

Catálogo: www.sisbin.ufop




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

Sessão de defesa da 17ª tese do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas a Tamires Guedes Caldeira com a defesa da tese intitulada: “Potencial biofarmacêutico da eremantolida C: Dissolução intrínseca e perfusão intestinal *in situ* em ratos”, avaliada e aprovada pela banca examinadora abaixo:

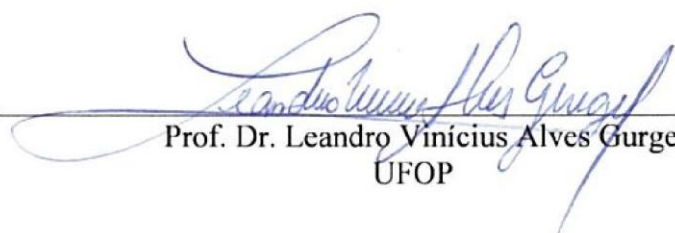
Ouro Preto, 17 de abril de 2019.



Profa. Dra. Clarice Madalena Bueno Rolim
UFSM



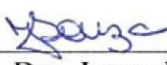
Profa. Dra. Isabela da Costa César
UFMG



Prof. Dr. Leandro Vinícius Alves Gurgel
UFOP



Prof. Dr. Cláudio Gouvea dos Santos
UFOP



Profa. Dra. Jacqueline de Souza
UFOP

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força e perseverança concedida para percorrer todo esse caminho.

Às minhas orientadoras:

À Jacque por ter acreditado em mim antes mesmo de eu acreditar. Por ser muito mais que uma orientadora. Por me tratar como filha e ser uma grande amiga ao longo desses 10 anos. Obrigada pela oportunidade de aprender com você, pela confiança, carinho e paciência.

À Dênia pela confiança, ensinamentos, paciência e pela amizade construída ao longo de todos esse anos.

Eu sou muito privilegiada por ter encontrado vocês na minha vida.

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

À Prof^a. Dr^a. Marival Bermejo e toda à sua equipe que me acolheram tão bem na Universidad Miguel Hernández e me proporcionaram a experiência de aprender coisas novas, desde de protocolos experimentais até a vivência de uma nova cultura.

À Prof^a. Dr^a. Sílvia Storpirtis e sua equipe pela gentileza em me receber no Laboratório de Estudos de Permeabilidade de Fármacos por meio de Culturas Celulares *in vitro* – USP/SP para treinamento e acompanhamento dos estudos de permeabilidade em células Caco-2.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Gonçalves pela gentileza em me receber no Laboratório de Controle de Qualidade do Departamento de Farmácia/UFMG para treinamento e acompanhamento dos estudos de permeabilidade em células Caco-2.

À Prof^a. Dr^a. Maria Irene Yoshida pela gentileza em me receber no Laboratório de Análise Térmica do Departamento de Química/UFMG para a realização das análises de calorimetria diferencial exploratória, além de me auxiliar na discussão dos resultados para compor a tese e o artigo científico.

Ao Prof. Dr. Wagner da Nova Mussel pela gentileza em me receber no Laboratório de Difração de Raios-X do Departamento de Química/UFMG para a realização das análises além de me auxiliar na discussão dos resultados para compor a tese e o artigo científico.

Ao Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos (DEFAR/UFOP) pela gentileza em ceder o microscópio óptico para a realização de análises.

Ao Prof. Dr. Ricardo Augusto Scholz Cipriano (DEGEO/UFOP) pelo auxílio nas primeiras análises de difração de raios-X.

Ao Centro de Microscopia da UFMG pelo fornecimento de equipamentos e suporte técnico para experimentos envolvendo microscopia eletrônica.

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde pela doação das Substâncias Químicas de Referência (SQRFB) utilizadas durante este trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Daniela Caldeira pela doação da azida sódica utilizada durante os experimentos de permeabilidade.

À Prof^a. Dr^a. Andrea Grabe por ceder o espaço para a manutenção dos animais até a execução dos experimentos de permeabilidade.

À equipe do Centro de Ciência Animal (CCA/UFOP) por sempre serem tão solícitos e atenderem prontamente aos pedidos realizados.

À equipe do Laboratório Multiusuário (CiPharma/UFOP): Patrícia Capelari, Renata Branquinho, Hygor Mezdari e Amanda Quaresma. Muito obrigada pela disponibilidade e pela amizade construída. Em especial à Amanda, que colocou a mão na massa comigo muitas vezes.

À Mirela Pena Fagundes pelo carinho e por sempre estar disponível a ajudar.

À equipe do LAPLAMED pelos ensinamentos, ajuda e todos os momentos de descontração. Especialmente à Marcela Carolina de Paula Michel Araújo, pela paciência e suporte.

À minha amada equipe do LCQ. Local onde construí amizades verdadeiras e que levarei pro resto da vida. Agradeço a todas as meninas que passaram pelo laboratório desde 2013, quando comecei minha caminhada no LCQ. São amigas que perduram até hoje e que sei que posso contar sempre. Cada uma, à sua maneira, me proporcionou dias de muita alegria e aprendizado.

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

Ao CiPharma e à UFOP que possibilitaram o desenvolvimento de todo o trabalho.

À Anvisa, CNPq, FAPEMIG e PROPP/UFOP pela suporte financeiro.

À CAPES pela concessão das bolsas de doutorado e doutorado sanduíche.

À Josi e Taís por me apoiarem e compartilharem comigo momentos além da UFOP.

À Juliana (Mags), que mesmo longe, se faz tão presente desde a graduação. Obrigada por me auxiliar em todos os momentos com troca de experiências, apoio e torcida.

Aos meus pais, Luzia e Orival, por nunca medirem esforços para me proporcionar um boa educação e me apoiarem de forma incondicional em todos os meus sonhos. Obrigada por entenderem todas as vezes que me ausentei.

Aos meus irmãos: Camilo por ser meu apoio, meu ponto de equilíbrio, e Carolina por compartilhar tanto os momentos de descontração quanto os de estresse profundo.

À toda minha família e amigos pela torcida e orações.

RESUMO

Solubilidade e permeabilidade são parâmetros fundamentais para promover a adequada biodisponibilidade oral de um fármaco ou substância biologicamente ativa. Baseado nisso, foi criado o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) com o intuito de definir testes *in vitro* capazes de prever o comportamento *in vivo* dos fármacos. No contexto do uso do SCB para o desenvolvimento de fármacos encontra-se a eremantolida C (EREC), uma lactona sesquiterpênica com comprovadas atividades antitumoral, anti-inflamatória, anti-hiperuricêmica e antiartrite gotosa, e baixa toxicidade. Considerando isso, o objetivo deste trabalho foi realizar a avaliação biofarmacêutica da eremantolida C, por meio da determinação da velocidade de dissolução intrínseca (VDI) e da permeabilidade empregando a perfusão intestinal *in situ* em ratos. Para isso, a eremantolida C foi isolada e purificada, o que possibilitou a validação do método analítico para sua quantificação por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE), aplicável aos estudos propostos. A VDI foi avaliada, após padronização da técnica, utilizando 100,0 mg de EREC, força e tempo de compressão de 1 tonelada e 1 minuto, respectivamente, 900 mL de meio tamponado a 37,0 °C sob velocidade de 100 e 250 rpm, com coleta de amostras a cada 30 minutos durante 8 horas. A VDI obtida para a EREC nos meios tampão acetato (pH 4,5), fluido intestinal simulado sem enzimas (pH 6,8) e tampão fosfato (pH 7,4) apresentou valores inferiores a 0,1 mg/min/cm², confirmando a baixa solubilidade obtida para a substância. Apesar dos resultados dos estudos de solubilidade não indicarem a presença de polimorfismo, cinco diferentes amostras de EREC foram submetidas às análises de difração de raios-X, calorimetria diferencial exploratória e microscopias óptica e eletrônica de varredura com o intuito de avaliar a presença de formas polimórficas. A partir das análises realizadas, a EREC não apresentou qualquer tipo de polimorfismo, clássico ou morfológico, não havendo, portanto, influência de transições cristalinas na solubilidade e, conseqüentemente, em sua classificação biofarmacêutica e processo de absorção oral. Com relação à permeabilidade, a perfusão intestinal *in situ* foi avaliada no intestino delgado completo de ratos Wistar por meio da introdução de 10,0 mL da solução de perfusão contendo as substâncias de interesse. Alíquotas de 200,0 µL foram coletadas a cada 5 minutos durante 30 minutos e encaminhadas para quantificação, possibilitando o cálculo da permeabilidade efetiva (P_{eff}) e a predição da fração absorvida (F_{abs}). O aciclovir (1,6 mg/mL) e o cloridrato de propranolol (0,32 mg/mL) foram empregados como fármacos padrão de baixa e alta permeabilidade, respectivamente, enquanto a permeabilidade da EREC foi avaliada frente às concentrações de 9,6 µg/mL, 96,0 µg/mL e 960,0 µg/mL, bem como, na presença de azida sódica 65,0 µg/mL. O aciclovir e o

cloridrato de propranolol apresentaram P_{eff} iguais a $1,09 \times 10^{-5} \pm 0,38 \times 10^{-5}$ cm/s ($F_{\text{abs}} = 19,6$ %) e $10,94 \times 10^{-5} \pm 1,67 \times 10^{-5}$ cm/s ($F_{\text{abs}} = 88,8$ %), respectivamente, confirmando a adequabilidade da técnica para a avaliação da permeabilidade. A EREC, por sua vez apresentou P_{eff} entre $7,28 \times 10^{-5} \pm 0,52 \times 10^{-5}$ cm/s e $7,81 \times 10^{-5} \pm 3,16 \times 10^{-5}$ cm/s, demonstrando F_{abs} igual a 79,0 %. Os valores de P_{eff} obtidos demonstraram sua alta permeabilidade e que o processo de absorção da EREC ocorre apenas pelo mecanismo passivo de permeação. Portanto, diante de todo o exposto, pode-se concluir que a eremantolida C pertence à classe II do SCB por apresentar baixa solubilidade e alta permeabilidade.

Palavras-chave: Eremantolida C, Solubilidade, Permeabilidade, Dissolução intrínseca, Perfusão intestinal *in situ*.

ABSTRACT

Solubility and permeability are fundamental parameters for promoting the adequate oral bioavailability of a drug or biologically active substance. Based on this, the Biopharmaceutics Classification System (BCS) was created in order to define *in vitro* tests able to predict the *in vivo* behavior of the drugs. In the context of the use of BCS for the development of drugs, there is the eremantholide C (EREC), a sesquiterpene lactone with proven antitumour, antiinflammatory and antihyperuricaemic activities and low toxicity. Considering this, the purpose of this work was to carry out the biopharmaceutics evaluation of the eremantholide C, using the determination of the intrinsic dissolution rate (IDR) and the permeability by *in situ* intestinal perfusion in rats. For this, eremantholide C was isolated and purified, which allowed the validation of analytical method for its quantification by high performance liquid chromatography (HPLC), applicable to the proposed studies. IDR was evaluated, after standardization of the technique, using 100.0 mg of EREC, force and time of compression of 1 tonne and 1 minute, respectively, 900 mL of buffer media at 37.0 °C and speed of 100 and 250 rpm, with sample collection every 30 minutes during 8 hours. IDR obtained for EREC in acetate buffer (pH 4.5), intestinal fluid simulated without enzymes (pH 6.8) and phosphate buffer (pH 7.4) showed values below 0.1 mg/min/cm², confirming the low solubility of the substance. Although the results from the solubility studies did not indicate the presence of polymorphism, five different EREC samples were submitted to X-ray diffraction, differential scanning calorimetry and optical microscopy and scanning electron microscopy analysis in order to evaluate the presence of polymorphic forms. From the analysis, the EREC did not present any type of polymorphism, classical or morphological. Therefore, there is no influence of crystalline transitions in the solubility and, consequently, in its biopharmaceutics classification and oral absorption process. Regarding the permeability, *in situ* intestinal perfusion was evaluated in the complete small intestine of Wistar rats by the introduction of 10.0 mL of the perfusion solution containing the substances. Aliquots of 200.0 µL were collected every 5 minutes during 30 minutes and sent for quantification, allowing the calculation of the effective permeability (P_{eff}) and the prediction of the absorbed fraction (F_{abs}). Acyclovir (1.6 mg/mL) and propranolol hydrochloride (0.32 mg/mL) were used as standard drugs of low and high permeability, respectively, while the permeability of EREC was evaluated using concentrations of 9.6 µg/mL, 96.0 µg/mL and 960.0 µg/mL, as well as in the presence of sodium azide 65.0 µg/mL. Acyclovir and propranolol hydrochloride showed P_{eff} equal to $1.09 \times 10^{-5} \pm 0.38 \times 10^{-5}$ cm/s ($F_{\text{abs}} = 19.6$ %) and $10.94 \times 10^{-5} \pm 1.67 \times 10^{-5}$ cm/s ($F_{\text{abs}} = 88.8$ %), respectively, confirming the suitability

of the technique to evaluate the permeability. EREC, in turn, presented P_{eff} between $7.28 \times 10^{-5} \pm 0.52 \times 10^{-5}$ cm/s and $7.81 \times 10^{-5} \pm 3.16 \times 10^{-5}$ cm/s, showing F_{abs} equal to 79.0 %. The P_{eff} values demonstrated its high permeability and that EREC absorption process occurs only by the passive mechanism of permeation. Therefore, it can be concluded that eremantholide C belongs to BCS class II because it presents low solubility and high permeability.

Key words: Eremantholide C, Solubility, Permeability, Intrinsic dissolution, Intestinal perfusion *in situ*

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1.1: Equação matemática para o cálculo da solubilidade de fármacos segundo o SCB	38
Equação 1.2: Equação matemática para o cálculo da precisão	55
Equação 1.3: Equação matemática para o cálculo da exatidão	55
Equação 1.4: Equações matemáticas para o cálculo dos limites de detecção e quantificação	56
Equação 1.5: Fórmula matemática utilizada para o cálculo da velocidade de dissolução intrínseca (VDI) da eremantolida C nos meios tamponados	58
Equação 1.6: Equações utilizadas para a extrapolação alométrica da dose de eremantolida C para um humano de 70,0 kg tomando-se como animal referência o camundongo (0,025 kg) e a dose de 25,0 mg/kg, bem como ratos Wistar (0,180 kg) e as doses 5,0 e 10,0 mg/kg. Cálculo baseado na taxa metabólica basal (TMB).....	96
Equação 2.1: Fórmula matemática utilizada para o cálculo da constante de reabsorção de água	128
Equação 2.2: Fórmula matemática utilizada para o cálculo da concentração experimental real do fármaco ou substância biologicamente ativa	128
Equação 2.3: Fórmula matemática utilizada para o cálculo da constante de velocidade de absorção	128
Equação 2.4: Fórmula matemática utilizada para o cálculo da permeabilidade efetiva	129
Equação 2.5: Fórmula matemática utilizada para a estimativa da fração absorvida em humanos	129

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1:** Estrutura química da eremantolida C com carbonos quirais assinalados (*) 43
- Figura 1.2:** Aparelho utilizado na determinação da velocidade de dissolução intrínseca 57
- Figura 1.3:** Espectro na região do infravermelho da eremantolida C purificada 64
- Figura 1.4:** Espectro de RMN de ^1H da eremantolida C purificada (CDCl_3 , 400 MHz) 65
- Figura 1.5:** Espectro de RMN de ^1H da eremantolida C purificada (CDCl_3 , 400 MHz), expansão da região em δ 0,8-2,2 65
- Figura 1.6:** Espectro de RMN de ^1H da eremantolida C purificada (CDCl_3 , 400 MHz), expansão da região em δ 2,2-4,3 66
- Figura 1.7:** Espectro de RMN de ^1H da eremantolida C purificada (CDCl_3 , 400 MHz), expansão da região em δ 4,8-6,4 66
- Figura 1.8:** Espectro COSY $^{-1}\text{H}-^1\text{H}$ da eremantolida C purificada (CDCl_3 , 400 MHz) 67
- Figura 1.9:** Espectro de RMN de ^{13}C da eremantolida C purificada (CDCl_3 , 100 MHz) 69
- Figura 1.10:** Subespectro DEPT da eremantolida C purificada (CDCl_3 , 100 MHz) 69
- Figura 1.11:** Espectro HSQC da eremantolida C purificada (CDCl_3 , 400 MHz) 70
- Figura 1.12:** Cromatograma obtido para avaliação do grau de pureza da eremantolida C purificada 72
- Figura 1.13:** Curvas analíticas médias ($n=3$) obtidas para a avaliação da linearidade do método analítico para quantificação da eremantolida C em: (A) TA (pH 4,5); (B) FISSE (pH 6,8) e (C) TF (pH 7,4) 73
- Figura 1.14:** Gráficos de resíduos da regressão linear do método analítico para quantificação da eremantolida C em: (A) TA (pH 4,5); (B) FISSE (pH 6,8) e (C) TF (pH 7,4). *Outliers* estão indicados em vermelho 75
- Figura 1.15:** Determinação da VDI da eremantolida C no meio FISSE (pH 6,8) a 37,0 °C e 100 rpm, utilizando 900 mL de meio. Em azul, vermelho e verde estão representados, respectivamente, as ampliações da parte inicial, mediana e final do gráfico obtido 81
- Figura 1.16:** Determinação da VDI da eremantolida C no meio FISSE (pH 6,8) a 37,0 °C e 100 rpm, utilizando 500 mL de meio. Em azul, vermelho e verde estão representados, respectivamente, as ampliações da parte inicial, mediana e final do gráfico obtido 82
- Figura 1.17:** Determinação da velocidade de dissolução intrínseca (VDI) da eremantolida C em 900 mL de meio FISSE (pH 6,8) a 37,0 °C utilizando 60 rpm. Em azul, vermelho e verde estão representados, respectivamente, as ampliações da parte inicial, mediana e final do gráfico obtido 84
- Figura 1.18:** Determinação da velocidade de dissolução intrínseca (VDI) da eremantolida C em 900 mL de meio FISSE (pH 6,8) a 37,0 °C utilizando 250 rpm. Em azul, vermelho e verde estão representados, respectivamente, as ampliações da parte inicial, mediana e final do gráfico obtido 85

Figura 1.19: Determinação da velocidade de dissolução intrínseca (VDI) da eremantolida C em 900 mL de meio FISSE (pH 6,8) a 37,0 °C sob 100 rpm durante 24 horas. Em azul, vermelho e verde estão representados, respectivamente, as ampliações da parte inicial, mediana e final do gráfico obtido.....	87
Figura 1.20: Determinação da velocidade de dissolução intrínseca (VDI) da eremantolida C em 900 mL de meio FISSE (pH 6,8) a 37,0 °C sob 100 rpm durante 72 horas. Em azul, vermelho e verde estão representados, respectivamente, as ampliações da parte inicial, mediana e final do gráfico obtido.....	88
Figura 1.21: Curvas médias obtidas para a determinação da velocidade de dissolução intrínseca da eremantolida C nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) a 100 rpm (n=3)..	90
Figura 1.22: Curvas médias obtidas para a determinação da velocidade de dissolução intrínseca da eremantolida C nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) a 250 rpm (n=3)..	91
Figura 1.23: Perfil de solubilidade da eremantolida C nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) (n=3) ..	94
Figura 1.24: Curvas DSC obtidas para EREC 1, EREC 2 e amostras de EREC cristalizadas após o estudo de dissolução intrínseca em tampão acetato (EREC pH 4,5), fluido intestinal simulado sem enzimas (EREC pH 6,8) e tampão fosfato (EREC pH 7,4).....	99
Figura 1.25: Difractogramas obtidos para EREC 1, EREC 2 e amostras de EREC cristalizadas após o estudo de dissolução intrínseca em tampão acetato (EREC pH 4,5), fluido intestinal simulado sem enzimas (EREC pH 6,8) e tampão fosfato (EREC pH 7,4).....	100
Figura 1.26: Fotomicrografias ópticas sob luz polarizada (ampliada 10 vezes) das amostras de EREC 1 e EREC 2, e fotomicrografias obtidas em MEV para as amostras de EREC 1, EREC 2, EREC pH 4,5, EREC pH 6,8 e EREC pH 7,4 (ampliada 300 vezes).....	102
Figura 2.1: Mecanismos de transporte de fármacos através da membrana intestinal	107
Figura 2.2: Cromatogramas obtidos para o aciclovir em FISSE (pH 6,8) na concentração de 100,0 µg/mL frente a diferentes condições cromatográficas.....	131
Figura 2.3: Espectro de absorção no ultravioleta extraído por CLAE-DAD demonstrando o comprimento de onda em que o aciclovir apresentou máximo de absorção, utilizando acetonitrila:água acidificada 0,1 % (3:97) como fase móvel.....	133
Figura 2.4: Cromatograma obtido para a solução de aciclovir em FISSE (pH 6,8) na concentração de 120,0 µg/mL. Em preto antes da exposição às condições drásticas e em azul após submissão da amostra a 70,0 ± 5,0 °C (calor seco) durante 30 horas	134
Figura 2.5: Cromatograma obtido para a solução de aciclovir em FISSE (pH 6,8) na concentração de 120,0 µg/mL. Em preto antes da exposição às condições drásticas e em azul após submissão da amostra à degradação alcalina, em temperatura ambiente, durante 24 horas	135
Figura 2.6: Cromatograma obtido para a solução de aciclovir em FISSE (pH 6,8) na concentração de 120,0 µg/mL. Em preto antes da exposição às condições drásticas e em azul após submissão da amostra à degradação ácida, em temperatura ambiente, durante 24 horas	135

Figura 2.7: Curva analítica média (n=3) obtida para a avaliação da linearidade do método analítico para quantificação do aciclovir em FISSE (pH 6,8), visando os estudos de perfusão intestinal <i>in situ</i>	136
Figura 2.8: Gráfico de resíduos da regressão linear do método analítico para quantificação do aciclovir em FISSE (pH 6,8). <i>Outliers</i> estão indicados em vermelho.....	137
Figura 2.9: Curva analítica média (n=3) obtida para a avaliação da linearidade do método analítico para quantificação do cloridrato de propranolol em FISSE (pH 6,8), visando os estudos de perfusão intestinal <i>in situ</i>	142
Figura 2.10: Gráfico de resíduos da regressão linear do método analítico para quantificação do cloridrato de propranolol em FISSE (pH 6,8). <i>Outliers</i> estão indicados em vermelho.....	143
Figura 2.11: Curvas analíticas médias (n=3) obtidas para a avaliação da linearidade do método analítico para quantificação da eremantolida C em FISSE (pH 6,8), visando os estudos de perfusão intestinal <i>in situ</i> . (A) Primeiro intervalo. (B) Segundo intervalo.....	146
Figura 2.12: Gráfico de resíduos da regressão linear do método analítico para quantificação da eremantolida C em FISSE (pH 6,8). (A) Primeiro intervalo. (B) Segundo intervalo. <i>Outliers</i> estão indicados em vermelho.....	147
Figura 2.13: Cromatogramas obtidos para o aciclovir em FISSE (pH 6,8) na concentração de 30,0 µg/mL (em azul) e para o lavado intestinal (preto)	150
Figura 2.14: Cromatogramas obtidos para o cloridrato de propranolol em FISSE (pH 6,8) na concentração de 20,0 µg/mL (em azul) e para o lavado intestinal (preto)	150
Figura 2.15: Cromatogramas obtidos para a eremantolida C em FISSE (pH 6,8) na concentração de 100,0 µg/mL (em azul) e para o lavado intestinal (preto)	151
Figura 2.16: Estruturas químicas do cloridrato de propranolol (a) e do aciclovir (b).....	153
Figura 2.17: Valores de permeabilidade efetiva (P_{eff}) obtidos para os fármacos padrão e a eremantolida C, a partir dos estudos de perfusão intestinal <i>in situ</i> (n=4-6)	155
Figura 2.18: Valores de permeabilidade efetiva (P_{eff}) obtidos para a eremantolida C nas três concentrações avaliadas e na presença de azida sódica, a partir dos estudos de perfusão intestinal <i>in situ</i> (n=4-6)	156

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 2.1: Descrição dos grupos experimentais utilizados na perfusão intestinal <i>in situ</i> em ratos para a determinação da permeabilidade da eremantolida C.....	127
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1: Classificação dos fármacos segundo o SCB, fatores limitantes de absorção e elegibilidade à bioisenção para cada classe	33
Quadro 1.2: Condições cromatográficas utilizadas para avaliação da pureza da eremantolida C, bem como para sua quantificação em meios tamponados (CALDEIRA <i>et al.</i> , 2017)	71
Quadro 1.3: Condições padronizadas para a avaliação da velocidade de dissolução intrínseca da eremantolida C nos meios tamponados TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).....	89
Quadro 2.1: Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação do aciclovir em FISSE (pH 6,8).....	133
Quadro 2.2: Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação do cloridrato de propranolol em FISSE (pH 6,8) (MONTEIRO, 2014).....	142

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Primeiro fracionamento cromatográfico para obtenção da eremantolida C.....	50
Tabela 1.2: Segundo fracionamento cromatográfico para obtenção da eremantolida C.....	51
Tabela 1.3: Terceiro fracionamento cromatográfico para obtenção da eremantolida C.....	51
Tabela 1.4: Quarto fracionamento cromatográfico para obtenção da eremantolida C.....	52
Tabela 1.5: 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 para quantificação da eremantolida C nos testes de dissolução intrínseca.....	54
Tabela 1.6: Condições avaliadas durante a padronização do método para determinação da velocidade de dissolução intrínseca.....	57
Tabela 1.7: Condições experimentais utilizadas para a avaliação da solubilidade em equilíbrio da eremantolida C pelo método da agitação orbital em frascos (CALDEIRA <i>et al.</i> , 2017)	59
Tabela 1.8: Faixas de fusão e valores de rotação específica obtidos para a eremantolida C purificada frente aos dados descritos na literatura.....	61
Tabela 1.9: Dados de deslocamento químico (δ) e constantes de acoplamento, J (Hz) obtidos a partir do espectro de RMN de ^1H da eremantolida C purificada (CDCl_3 , 400 MHz) e da eremantolida C obtida por Le Quesne e colaboradores (1978) (CDCl_3 , 300 MHz).....	68
Tabela 1.10: Dados de deslocamento químico (δ) obtidos a partir do espectro de RMN de ^{13}C da eremantolida C purificada (CDCl_3 , 100 MHz) e da eremantolida C obtida por Saúde e colaboradores (1998) (CDCl_3 , 300 MHz).....	71
Tabela 1.11: Parâmetros de linearidade do método para quantificação da eremantolida C nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) (n=3).....	74
Tabela 1.12: Valores encontrados para as premissas dos resíduos da regressão linear, significância da regressão e desvio da linearidade, provenientes das curvas analíticas obtidas para os meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).....	76
Tabela 1.13: Precisão intradia (n=3) e interdial (n=9) do método analítico para quantificação da eremantolida C meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).....	77
Tabela 1.14: Exatidão (%) do método analítico para quantificação da eremantolida C nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) (n=3).....	78
Tabela 1.15: Limites de detecção e quantificação calculados para o método analítico para quantificação da eremantolida C nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).....	79
Tabela 1.16: Parâmetros obtidos a partir das curvas médias para a determinação da velocidade de dissolução intrínseca da eremantolida C nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) a 100 rpm (n=3).....	90
Tabela 1.17: Parâmetros obtidos a partir das curvas médias para a determinação da velocidade de dissolução intrínseca da eremantolida C nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) a 250 rpm (n=3).....	91

Tabela 1.18: Resultados obtidos a partir da avaliação da solubilidade em equilíbrio da eremantolida C, em meios tamponados, utilizando o método da agitação orbital em frascos, em comparação com os valores obtidos por Caldeira e colaboradores (2017) (n=3)	95
Tabela 1.19: 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	96
Tabela 1.20: Valores de temperatura inicial (T_{onset}) e final (T_{peak}) de fusão encontrados para EREC 1, EREC 2, EREC pH 4,5, EREC pH 6,8 e EREC pH 7,4, bem como seus respectivos valores de calor de fusão ($\Delta H_{fusão}$)	99
Tabela 2.1: Condições cromatográficas avaliadas durante o desenvolvimento do método analítico para quantificação do aciclovir nos estudos de perfusão intestinal <i>in situ</i> em ratos	117
Tabela 2.2: Preparo das soluções diluídas em meio FISSE (pH 6,8) utilizadas na avaliação da linearidade do método analítico para quantificação do aciclovir nos estudos de perfusão intestinal <i>in situ</i> em ratos	119
Tabela 2.3: Preparo das soluções diluídas em meio FISSE (pH 6,8) utilizadas na avaliação da linearidade do método analítico para quantificação do cloridrato de propranolol nos estudos de perfusão intestinal <i>in situ</i> em ratos	121
Tabela 2.4: Preparo das soluções diluídas em meio FISSE (pH 6,8) utilizadas na avaliação da linearidade do método analítico para quantificação da eremantolida C nos estudos de perfusão intestinal <i>in situ</i> em ratos	123
Tabela 2.5: Descrição das condições cromatográficas encontradas na literatura para a quantificação do aciclovir.....	130
Tabela 2.6: Parâmetros cromatográficos: fator de cauda, tempo de retenção e fator de retenção obtidos nas seis condições avaliadas	132
Tabela 2.7: Valores encontrados para as premissas dos resíduos da regressão linear, significância da regressão e desvio da linearidade provenientes das curvas analíticas obtidas para a quantificação do aciclovir em FISSE (pH 6,8)	138
Tabela 2.8: Precisão intradia (n=3) e interdia (n=9) do método analítico para quantificação do aciclovir em FISSE (pH 6,8), visando os estudos de perfusão intestinal <i>in situ</i>	138
Tabela 2.9: Exatidão (%) do método analítico para quantificação do aciclovir em FISSE (pH 6,8), visando os estudos de perfusão intestinal <i>in situ</i> (n=3).....	139
Tabela 2.10: Resultados de precisão e exatidão obtidos para a determinação da robustez do método analítico para quantificação do aciclovir em FISSE (pH 6,8) (n=3)	141
Tabela 2.11: Valores encontrados para as premissas dos resíduos da regressão linear, significância da regressão e desvio da linearidade, provenientes das curvas analíticas obtidas para a quantificação do cloridrato de propranolol em FISSE (pH 6,8)	144
Tabela 2.12: Precisão intradia (n=3) e interdia (n=6) do método analítico para quantificação do cloridrato de propranolol em FISSE (pH 6,8), visando os estudos de perfusão intestinal <i>in situ</i>	144
Tabela 2.13: Exatidão (%) do método analítico para quantificação do cloridrato de propranolol em FISSE (pH 6,8), visando os estudos de perfusão intestinal <i>in situ</i> (n=3)	145

Tabela 2.14: Parâmetros de linearidade obtidos para o método de quantificação da eremantolida C em FISSE (pH 6,8) (n=3).....	146
Tabela 2.15: Valores encontrados para as premissas dos resíduos da regressão linear, significância da regressão e desvio da linearidade, provenientes das curvas analíticas obtidas para a quantificação da eremantolida C em FISSE (pH 6,8) no intervalo de 1,0 a 10,0 µg/mL	147
Tabela 2.16: Valores encontrados para as premissas dos resíduos da regressão linear, significância da regressão e desvio da linearidade, provenientes das curvas analíticas obtidas para a quantificação da eremantolida C em FISSE (pH 6,8) no intervalo de 10,0 a 100,0 µg/mL	148
Tabela 2.17: Precisão intradia (n=3) e interdia (n=6) do método analítico para quantificação da eremantolida C em FISSE (pH 6,8), visando os estudos de perfusão intestinal <i>in situ</i>	148
Tabela 2.18: Exatidão (%) do método analítico para quantificação do aciclovir em FISSE (pH 6,8), visando os estudos de perfusão intestinal <i>in situ</i> (n=3).....	149
Tabela 2.19: Valores da constante de velocidade de absorção (k_a) e permeabilidade efetiva (P_{eff}) obtidos para os fármacos padrão e a eremantolida C, a partir dos estudos de perfusão intestinal <i>in situ</i> (n=4-6)	154
Tabela 2.20: Valores preditos para a fração absorvida (F_{abs}) a partir dos dados de permeabilidade efetiva (P_{eff}) obtidos nos estudos de perfusão intestinal <i>in situ</i> para os fármacos padrão e para a eremantolida C (n=4-6)	157

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Área superficial do compacto (cm ²)
ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de variância
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASP	Área superficial polar
ASC	Área sob a curva
b	Inclinação da curva analítica
c	Concentração (µg/mL ou mg/mL)
C _e	Concentração experimental real
C _t	Concentrações remanescentes de fármaco ou substância biologicamente ativa no lúmen do segmento intestinal
CCD	Cromatografia em camada delgada
CI ₁₀₀	Concentração capaz de inibir 100% do crescimento celular
CLAE/DAD	Cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos
CL ₅₀	Concentração letal para 50% das células
CMD	Concentração média experimental determinada
COSY	Espectroscopia de correlação homonuclear
DAD	Arranjo de fotodiodos
dd	Dupleto duplo
ddd	Duplo dupleto duplo
DEPT	Intensificação da distorção por transferência de polarização
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPa	Desvio padrão dos coeficientes lineares da curva analítica
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DSC	Calorimetria diferencial exploratória
D/S	Razão dose/solubilidade
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EREC	Eremantolida C
EREC 1	Eremantolida C cristalizada em clorofórmio
EREC 2	Eremantolida C cristalizada em acetato de etila

EREC pH 4,5	Eremantolida C cristalizada após a determinação da velocidade de dissolução intrínseca em TA pH 4,5
EREC pH 6,8	Eremantolida C cristalizada após a determinação da velocidade de dissolução intrínseca em FISSE pH 6,8
EREC pH 7,4	Eremantolida C cristalizada após a determinação da velocidade de dissolução intrínseca em TF pH 7,4
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FISSE	Fluido intestinal simulado sem enzimas
FLU	Fluorescência
h	Comprimento/altura
HSQC	Correlação Heteronuclear de Quantum Simples
IL-10	Interleucina 10
J	Constante de acoplamento
k_a	Constante de velocidade de absorção
k_0	Constante de reabsorção de água
LD	Limite de detecção
cLogP	Coefficiente de partição octanol/água calculado
cLogS	Logaritmo da solubilidade (mol/L) calculado
LogS	Logaritmo da solubilidade (mol/L)
LQ	Limite de quantificação
m	Multiplete
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MPa	Megapascal
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPA	Ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela
PDSE	Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior
P_{eff}	Permeabilidade efetiva
P_{gp}	Glicoproteína P
r	Raio
R	Coefficiente de correlação
R^2	Coefficiente de determinação
RMN	Ressonância magnética nuclear
rpm	Rotações por minuto
s	Simpleto

sl	Simpleto largo
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
SEM	Solubilidade experimental média
SQR	Substância química de referência
t	Tripleto
TA	Tampão acetato
TF	Tampão fosfato
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
UV	Ultravioleta
V	Volume
V ₀	Volume da solução de perfusão introduzido no segmento intestinal no início do experimento
V _{final}	Volume da solução de perfusão medido ao final do experimento
V _t	Volume restante de água em cada tempo de coleta
VDI	Velocidade de dissolução intrínseca

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	28
OBJETIVOS	31
Objetivo geral	31
Objetivos específicos	31
CAPÍTULO I – DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE DE DISSOLUÇÃO INTRÍNSECA E AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DA EREMANTOLIDA C	32
1.1 REVISÃO DA LITERATURA	33
1.1.1 Sistema de Classificação Biofarmacêutica	33
1.1.2 Solubilidade	35
1.1.2.1 Solubilidade de fármacos	35
1.1.2.2 Solubilidade de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) ...	38
1.1.3 Eremantolida C	42
1.2 MATERIAL E MÉTODOS	47
1.2.1 Equipamentos e utensílios	47
1.2.2 Reagentes e solventes	48
1.2.3 Isolamento, caracterização físico-química e identificação estrutural da eremantolida C (EREC).....	48
1.2.3.1 Reveladores para cromatografia em camada delgada (CCD).....	48
1.2.3.2 Padrão de eremantolida C utilizado na cromatografia em camada delgada (CCD)	49
1.2.3.3 Coleta do material vegetal	49
1.2.3.4 Preparo do extrato clorofórmico	50
1.2.3.5 Fracionamentos cromatográficos	50
1.2.4 Avaliação da solubilidade da eremantolida C.....	52
1.2.4.1 Preparo da solução estoque A de eremantolida C	52
1.2.4.2 Preparo da solução estoque B de eremantolida C.....	53
1.2.4.3 Preparo das soluções tampão	53
1.2.4.4 Validação parcial 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) visando o estudo de dissolução intrínseca	54
1.2.4.4.1 Linearidade	54

1.2.4.4.2 Precisão	55
1.2.4.4.3 Exatidão	55
1.2.4.4.4 Limites de detecção e quantificação	55
1.2.4.5 Padronização do método de dissolução intrínseca para a avaliação da solubilidade da eremantolida C	56
1.2.4.6 Avaliação da solubilidade da eremantolida C pelo método de dissolução intrínseca.....	58
1.2.4.7 Avaliação da solubilidade em equilíbrio da eremantolida C pelo método da agitação orbital em frascos (“ <i>shake-flask</i> ”)	59
1.2.4.8 Análise estatística	59
1.2.5 Avaliação da presença de polimorfismo na eremantolida C.....	59
1.2.5.1 Calorimetria diferencial exploratória (<i>Differential scanning calorimetry</i> - DSC)	59
1.2.5.2 Difração de raios-X.....	60
1.2.5.3 Microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	60
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
1.3.1 Isolamento, caracterização físico-química e identificação estrutural da eremantolida C (EREC).....	61
1.3.2 Avaliação da solubilidade da eremantolida C.....	72
1.3.2.1 Validação parcial 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) visando o estudo de dissolução intrínseca	72
1.3.2.1.1 Linearidade	73
1.3.2.1.2 Precisão	76
1.3.2.1.3 Exatidão	77
1.3.2.1.4 Limites de detecção e quantificação	78
1.3.2.2 Padronização do método de dissolução intrínseca para a avaliação da solubilidade da eremantolida C	79
1.3.2.3 Avaliação da solubilidade da eremantolida C pelo método de dissolução intrínseca.....	89
1.3.2.4 Avaliação da solubilidade em equilíbrio da eremantolida C pelo método da agitação orbital em frascos (“ <i>shake-flask</i> ”)	94
1.3.3 Avaliação da presença de polimorfismo na eremantolida C.....	97
1.4 CONCLUSÕES.....	104

CAPÍTULO II – AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DA EREMANTOLIDA C POR MEIO DA TÉCNICA DE PERFUSÃO INTESTINAL *IN SITU* EM RATOS..... 105

2.1 REVISÃO DA LITERATURA	106
2.1.1 Permeabilidade de fármacos	106
2.1.2 Permeabilidade de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB)	107
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	115
2.2.1 Substâncias químicas de referência (SQR)	115
2.2.2 Equipamentos e utensílios	115
2.2.3 Reagentes e solventes	116
2.2.4 Desenvolvimento do método analítico para a quantificação do fármaco padrão de baixa permeabilidade, aciclovir, nos estudos de perfusão intestinal <i>in situ</i> em ratos	116
2.2.5 Validação do método analítico para quantificação do fármaco padrão de baixa permeabilidade, aciclovir, nos estudos de perfusão intestinal <i>in situ</i> em ratos	117
2.2.5.1 Preparo da solução estoque.....	117
2.2.5.2 Seletividade.....	117
2.2.5.3 Linearidade	118
2.2.5.4 Precisão.....	119
2.2.5.5 Exatidão	119
2.2.5.6 Limites de detecção e quantificação	119
2.2.5.7 Robustez	120
2.2.6 Validação parcial do método analítico para quantificação do fármaco de alta permeabilidade, cloridrato de propranolol, nos estudos de perfusão intestinal <i>in situ</i> em ratos	120
2.2.6.1 Preparo da solução estoque.....	120
2.2.6.2 Linearidade	121
2.2.6.3 Precisão.....	121
2.2.6.4 Exatidão	121
2.2.6.5 Limites de detecção e quantificação	122
2.2.7 Validação parcial do método analítico para quantificação da eremantolida C nos estudos de perfusão intestinal <i>in situ</i> em ratos.....	122
2.2.7.1 Preparo da solução estoque.....	122
2.2.7.2 Linearidade	122
2.2.7.3 Precisão.....	123
2.2.7.4 Exatidão	124

2.2.7.5 Limites de detecção e quantificação	124
2.2.8 Interferência do lavado intestinal na quantificação dos fármacos padrão e da eremantolida C nos estudos de perfusão intestinal <i>in situ</i> em ratos.....	124
2.2.9 Perfusão intestinal <i>in situ</i> em ratos	125
2.2.10 Análise dos resultados	127
2.2.11 Análise estatística	129
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	130
2.3.1 Desenvolvimento do método analítico para a quantificação do fármaco padrão de baixa permeabilidade, aciclovir, nos estudos de perfusão intestinal <i>in situ</i> em ratos	130
2.3.2 Validação do método analítico para quantificação do fármaco padrão de baixa permeabilidade, aciclovir, nos estudos de perfusão intestinal <i>in situ</i> em ratos	134
2.3.2.1 Seletividade.....	134
2.3.2.2 Linearidade	136
2.3.2.3 Precisão.....	138
2.3.2.4 Exatidão	139
2.3.2.5 Limites de detecção e quantificação	139
2.3.2.6 Robustez	140
2.3.3 Validação parcial do método analítico para quantificação do fármaco de alta permeabilidade, cloridrato de propranolol, nos estudos de perfusão intestinal <i>in situ</i> em ratos	141
2.3.3.1 Linearidade	142
2.3.3.2 Precisão.....	144
2.3.3.3 Exatidão	145
2.3.3.4 Limites de detecção e quantificação	145
2.3.4 Validação parcial do método analítico para quantificação da eremantolida C nos estudos de perfusão intestinal <i>in situ</i> em ratos.....	145
2.3.4.1 Linearidade	146
2.3.4.2 Precisão.....	148
2.3.4.3 Exatidão	149
2.3.4.4 Limites de detecção e quantificação	149
2.3.5 Interferência do lavado intestinal na quantificação dos fármacos padrão e da eremantolida C nos estudos de perfusão intestinal <i>in situ</i> em ratos.....	150
2.3.6 Perfusão intestinal <i>in situ</i> em ratos	151
2.4 CONCLUSÕES.....	159

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	160
REFERÊNCIAS	163
ANEXOS	174
ANEXO A – Certidão de cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado	175
ANEXO B – Resumo referente ao trabalho aprovado no Edital nº 19/2016 do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE)	177
ANEXO C – Cópia da aprovação do protocolo de procedimentos na CEUA.....	179
ANEXO D – Resumo do artigo publicado referente ao projeto desenvolvido no Doutorado Sanduíche.....	180
ANEXO E – Resumo expandido publicado em anais de congressos	181
ANEXO F – Resumo publicado na I Mostra da Pós-graduação no Encontro de Saberes 2018	182
ANEXO G – Resumo do artigo publicado referente ao projeto desenvolvido no Doutorado	183

INTRODUÇÃO

A caracterização biofarmacêutica permite avaliar os fatores físicos e físico-químicos relacionados ao fármaco, isoladamente e em sua forma farmacêutica, além de sua influência sobre os efeitos produzidos no organismo. Dessa forma, além de analisar aspectos de pureza e teor, permite a avaliação de parâmetros essenciais à liberação e absorção do fármaco, de forma a atingir o objetivo terapêutico pretendido (STORPIRTIS *et al.*, 1999).

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, permeabilidade intestinal e velocidade de dissolução estão relacionados à biodisponibilidade oral do fármaco, que somente passa pelo processo de absorção se for capaz de permear o lúmen intestinal, o que acontecerá apenas, se estiver solubilizado no meio (MARTINEZ; AMIDON, 2002).

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

A principal finalidade desse sistema é fornecer subsídio regulatório para as bioisenções, que consistem na substituição dos estudos *in vivo*, tais como bioequivalência e/ou biodisponibilidade relativa, por ensaios *in vitro*, que permitam conclusões sobre a solubilidade e permeabilidade dos fármacos. Além disso, o SCB também tem sido uma das ferramentas mais significativas no intuito de facilitar o desenvolvimento de novos produtos e assim, proporcionar a seleção de moléculas com potencial farmacológico (AMIDON *et al.*, 1995; MARTINEZ; AMIDON, 2002).

Dentre os métodos descritos para a determinação da solubilidade, o procedimento empregando a agitação orbital em frascos (“*shake-flask*”) vem sendo amplamente recomendado, pois permite a obtenção da razão dose/solubilidade (D/S), que corresponde à razão entre a maior dose administrada (ou disponível comercialmente) e a solubilidade da substância ativa. Dessa forma, um fármaco é considerado altamente solúvel quando apresenta razão D/S inferior ou igual a 250,0 mL em condições pré-definidas de temperatura e pH

(LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004; EMA, 2010; BRASIL, 2011; WHO, 2015; FDA, 2017).

Como método alternativo à agitação orbital em frascos, a dissolução intrínseca, permite inferir sobre possíveis problemas de biodisponibilidade, uma vez que além de apresentar valores de solubilidade por meio da determinação da velocidade de dissolução intrínseca, avalia também parâmetros termodinâmicos associados com transições de fase cristalina, indicando a presença de diferentes formas polimórficas (YU *et al.*, 2004; UNITED STATES, 2014).

A permeabilidade, por sua vez, pode ser definida utilizando diversos modelos, destacando-se: métodos *in vivo* que contemplam os estudos farmacocinéticos em animais ou seres humanos; métodos *in situ* que consistem da perfusão do fármaco em trechos do epitélio intestinal; métodos *ex-vivo*, que utilizam de segmentos de tecidos animais; métodos *in vitro* que podem ser subdivididos em modelos que empregam sistemas celulares, tais como cultura de células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2) ou de rim canino (MDCK; MDCK-MDR1), e aqueles baseados em 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 da permeabilidade dos fármacos. Sendo que, um fármaco para ser altamente permeável deve apresentar extensão de absorção, em humanos, igual ou superior a 85,0 % (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007; DEZANI, 2010; EMA, 2010; BRASIL, 2011; REIS, 2013; WHO, 2015; FDA, 2017).

Nesse contexto, a avaliação de características biofarmacêuticas de novas substâncias com atividades farmacológicas, dentre elas, compostos de origem natural, tem sido utilizada como uma ferramenta para a predição do comportamento *in vivo* dessas moléculas, avaliando seu potencial para se tornarem fármacos.

Portanto, surge como promissor candidato a fármaco, a eremantolida C (EREC), uma lactona sesquiterpênica e um dos constituintes químicos ativos da *Lychnophora trichocarpha* (arnica brasileira) que apresenta comprovadas atividades anti-inflamatória (FERRARI *et al.*, 2013), antitumoral (SAÚDE-GUIMARÃES; RASLAN; OLIVEIRA, 2014), anti-hiperuricêmica, antiartrite gotosa (SOUZA *et al.*, 2012) e tripanossomicida (OLIVEIRA *et al.*, 1996). Além disso, baixa toxicidade por não possuir na sua estrutura química o grupo α -metileno- γ -lactona (SAÚDE *et al.*, 1998) responsável por conferir toxicidade às lactonas sesquiterpênicas (KUPCHAN; EAKIN; THOMAS, 1971).

A primeira análise biofarmacêutica da eremantolida C foi realizada *in silico* e *in vitro*, utilizando o método da agitação orbital em frascos (“*shake-flask*”) e o ensaio em membrana

artificial paralela (PAMPA) para a avaliação da solubilidade e permeabilidade, respectivamente. Os resultados obtidos em todos os testes realizados sugeriram que esta substância possui baixa solubilidade e alta permeabilidade (CALDEIRA, *et al.*, 2017).

Visando complementar as informações biofarmacêuticas relativas à eremantolida C, fez-se necessário a avaliação da sua solubilidade por meio da determinação da velocidade de dissolução intrínseca, a qual permite inferir sobre possíveis problemas de biodisponibilidade e transições de fase cristalina, além de comparar a eficácia das duas técnicas para a análise da solubilidade no processo de descoberta de novos fármacos. E, a avaliação da permeabilidade utilizando a perfusão intestinal *in situ* em ratos, a qual possibilita melhor inter-relação com o comportamento da substância *in vivo*, fornecendo informações sobre a forma de absorção da eremantolida C e também se essa seria substrato para transportadores, tanto de influxo quanto de efluxo. Sendo que, estes últimos atuam levando as moléculas de volta ao lúmen intestinal, comprometendo assim, o processo de absorção (YU *et al.*, 2004; CALDEIRA *et al.*, 2018).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Realizar a avaliação biofarmacêutica da eremantolida C, substância de origem vegetal candidata a fármaco, por meio da determinação da velocidade de dissolução intrínseca e da permeabilidade empregando a perfusão intestinal *in situ* em ratos.

Objetivos específicos

- Realizar o isolamento da eremantolida C a partir do extrato clorofórmico das partes aéreas da *Lychnophora trichocarpa* (Spreng.) Spreng. ex Sch.Bip.
- Realizar caracterização físico-química e identificação estrutural da eremantolida C isolada.
- Padronizar e validar a técnica de determinação da velocidade de dissolução intrínseca.
- Avaliar a solubilidade da eremantolida C pelo método de dissolução intrínseca.
- Comparar os perfis de solubilidade obtidos, pelo método da agitação orbital em frascos, para duas amostras de eremantolida C provenientes de diferentes extrações.
- Avaliar a presença de polimorfismo na eremantolida C.
- Padronizar e validar a técnica de perfusão intestinal *in situ* em ratos.
- Avaliar a permeabilidade da eremantolida C por meio da técnica de perfusão intestinal *in situ* em ratos.
- Discutir sobre o potencial biofarmacêutico da eremantolida C.

CAPÍTULO I

DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE DE DISSOLUÇÃO INTRÍNSECA E AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DA EREMANTOLIDA C

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 Sistema de Classificação Biofarmacêutica

A relação entre o fármaco, a forma farmacêutica na qual ele está contido e a via pela qual é administrado determina a quantidade e com que velocidade esse fármaco entra na circulação sistêmica. Para que um fármaco realize sua atividade terapêutica é necessário que quantidade suficiente chegue ao sítio de ação e ali permaneça por tempo adequado para exercer o seu efeito farmacológico. Isso depende da via e da forma pelas quais o fármaco é administrado e da velocidade com que é liberado (ASHFORD, 2005a).

Apesar de inovações nos métodos de administração de fármacos, a via oral continua sendo a de escolha devido à conveniência, alta adesão e baixo custo. No entanto, fármacos administrados por via oral devem apresentar adequadas solubilidade nos líquidos do trato gastrointestinal e permeabilidade intestinal de forma a atingir com concentrações apropriadas o seu sítio de absorção (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007).

Neste contexto, em 1995 foi proposto o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), que correlaciona o comportamento *in vitro* do fármaco com o seu desempenho *in vivo*, de forma que a solubilidade e a permeabilidade são parâmetros fundamentais que controlam a velocidade e a extensão da absorção do fármaco (AMIDON *et al.*, 1995). Considerando estes dois parâmetros, quatro classes foram propostas pelo SCB para agrupar os fármacos, conforme mostrado no Quadro 1.1.

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

Classe	Solubilidade	Permeabilidade	Limitantes para a absorção	Elegível para bioisenção
I	Alta	Alta	Velocidade de dissolução ou de esvaziamento gástrico, caso a dissolução seja muito rápida	Sim (Anvisa*, EMA, FDA e OMS)
II	Baixa	Alta	Dissolução <i>in vivo</i>	Não
III	Alta	Baixa	Permeabilidade	Sim (EMA, FDA e OMS)
IV	Baixa	Baixa	Solubilidade e permeabilidade	Não

*Fármacos listados na Instrução Normativa nº 10 de 29 de setembro de 2016.

Fonte: AMIDON *et al.*, 1995; EMA, 2010; BRASIL, 2011; WHO, 2015; FDA, 2017.

De acordo com as agências regulatórias, um fármaco é considerado altamente solúvel quando apresenta razão dose/solubilidade igual ou inferior a 250,0 mL a 37,0 °C sob condições pré-determinadas de pH, e altamente permeável quando a extensão da sua absorção é igual ou superior a 85,0 % (EMA, 2010; BRASIL, 2011; WHO, 2015; BRASIL, 2016b; FDA, 2017).

A principal finalidade do SCB é fornecer subsídio regulatório para as bioisenções, que consistem na substituição de testes *in vivo* de bioequivalência e/ou biodisponibilidade relativa por testes *in vitro* de solubilidade e permeabilidade. Esta substituição proporciona a redução de problemas éticos e burocráticos relacionados ao uso de sujeitos nos estudos de bioequivalência. Além disso, diminui o tempo do processo de desenvolvimento do medicamento, gerando alívio econômico e possibilitando maior número de opções terapêuticas para o serviço de saúde pública (LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004).

A aplicação de uma bioisenção baseada no SCB é restrita a substâncias medicamentosas altamente solúveis, com absorção humana conhecida, estáveis no trato gastrointestinal e que não apresentem índice terapêutico estreito. Além disso, os excipientes utilizados nas formas farmacêuticas não devem apresentar efeito significativo sobre a velocidade e extensão de absorção oral. No entanto, não é aplicável para formulações sublingual, bucal e de liberação modificada (YANG; YU, 2009; EMA, 2010; FDA, 2017).

Segundo a *Food and Drug Administration* (FDA), a *European Medicines Agency* (EMA) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) um fármaco é candidato à bioisenção quando se enquadra na classe I ou III e se apresenta sob a forma farmacêutica sólida oral de liberação imediata. Fármacos classe I, além de apresentarem altas solubilidade e permeabilidade, devem apresentar farmacocinética linear, estabilidade nos líquidos do trato gastrointestinal e estar contidos em formulações com dissolução rápida (no mínimo 85,0 % do fármaco é liberado em até 30 minutos) ou muito rápida (no mínimo 85,0 % do fármaco é liberado em até 15 minutos). Além disso, não devem conter em sua formulação excipientes que afetem a velocidade e extensão de absorção do fármaco. Fármacos classe III, por sua vez, além da alta solubilidade, farmacocinética linear e estabilidade no trato gastrointestinal devem apresentar dissolução muito rápida e a formulação do produto teste deve ser qualitativamente a mesma e quantitativamente muito semelhante à composição do referencial. Dessa forma, excipientes que podem afetar a biodisponibilidade são qualitativamente e quantitativamente os mesmos (EMA, 2010; WHO, 2015; FDA, 2017).

Embora o SCB tenha sido criado visando aplicações regulatórias, ele tem sido amplamente utilizado no processo de desenvolvimento de novos fármacos, sendo empregado na previsão do comportamento *in vivo* de substâncias a partir das características de solubilidade

e permeabilidade *in vitro*. Dessa forma, muitas moléculas são selecionadas por meio de triagem, evitando o desperdício de tempo e de custos com aquelas que não trarão bons resultados *in vivo* (LÖBENBERG; AMIDON, 2000; PEREIRA, 2011).

Ainda no contexto do desenvolvimento de fármacos, o SCB possibilita determinar a velocidade limitante no processo de absorção gastrointestinal. Desse modo, além da seleção de moléculas candidatas a fármacos, tem implicações na previsão e elucidação de interações alimentares, posologia, processo produtivo do medicamento, escolha de formulação, 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, a correta caracterização biofarmacêutica de novas substâncias pode resultar em fármacos com adequadas solubilidade, permeabilidade 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 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 e padronizados com o intuito de atender aos requisitos do SCB e assim permitir bioensaios 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; MONTEIRO, 2014; LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2015a; BRASIL, 2017b; CALDEIRA *et al.*, 2017).

1.1.2 Solubilidade

1.1.2.1 Solubilidade de fármacos

Solubilidade, em termos quantitativos, é definida como a concentração de soluto em uma solução saturada, na qual o soluto está em equilíbrio com o solvente, a uma determinada temperatura. Em termos qualitativos, a solubilidade pode ser definida como a interação

espontânea de duas ou mais substâncias para formar uma dispersão molecular homogênea (BABU; AREEFULLA; MALLIKARJUN, 2010; JATWANI *et al.*, 2012).

A solubilidade de um fármaco, por sua vez, é dada como a concentração máxima deste que se dissolve no solvente em condições específicas de temperatura, pH e pressão, comumente expressa como partes, percentagem e concentração em quantidade de matéria (BABU; AREEFULLA; MALLIKARJUN, 2010; JATWANI *et al.*, 2012).

Um fármaco para ser absorvido deve estar presente na forma de uma solução no local de absorção, uma vez que, apenas fármacos em solução podem ser absorvidos, distribuídos, metabolizados, excretados ou mesmo exercerem ação farmacológica. Dessa forma, a solubilidade é determinante no processo de absorção do fármaco ou substância biologicamente ativa, desempenhando um papel fundamental na sua biodisponibilidade (BABU; AREEFULLA; MALLIKARJUN, 2010; JATWANI *et al.*, 2012).

A solubilidade de um fármaco ou substância biologicamente ativa depende tanto das propriedades físico-químicas do soluto e do solvente, quanto de vários outros fatores como: pH, tamanho de partícula e polimorfismo (BABU; AREEFULLA; MALLIKARJUN, 2010).

pH

Considerando-se que a maioria dos fármacos são ácidos fracos ou bases fracas, o conhecimento do pH do meio/solvente e do pK_a do fármaco é fundamental para o desenvolvimento farmacotécnico, uma vez que, está diretamente relacionado com a solubilidade do fármaco e, conseqüentemente, com o processo de dissolução (BUENO; RECH, 2011).

Solventes que apresentam pH acima do pK_a , para ácidos fracos e, abaixo do pK_a , para bases fracas, demonstram solubilidade elevada, em um fator de 10, para cada unidade de pH. Dessa forma, ácidos fracos tendem a acumular-se em compartimentos com pH relativamente alcalinos e bases fracas em pH ácidos. Além disso, mudanças no pH por alterações ocorridas na formulação ou durante o processo de dissolução ao longo do trato gastrointestinal podem afetar o grau de ionização das moléculas do fármaco, que por sua vez influencia a sua solubilidade e sua capacidade de ser absorvido, alterando completamente a biodisponibilidade oral do fármaco. Porém, tal fato não deve ser avaliado de maneira isolada, pois não constitui o principal determinante do sítio de absorção de fármacos no trato gastrointestinal, devido à grande área de superfície de contato das microvilosidades intestinais, em comparação com a área reduzida de contato do estômago (AULTON, 2005; BUENO; RECH, 2011).

Tamanho de partícula/Área superficial

A granulometria de um pó está diretamente correlacionada à velocidade de dissolução. Quanto menor o diâmetro da partícula, maior a superfície de contato entre o sólido e o solvente, o que permite maior interação. Dessa forma, o conhecimento e o controle do tamanho das partículas são fundamentais para fármacos pouco solúveis (BUENO; RECH, 2011).

Presumindo-se que cada partícula de fármaco seja molhada de forma completa pelos líquidos gastrointestinais, a área superficial apresentada pelo fármaco será inversamente proporcional ao tamanho de suas partículas. Como consequência, quanto menor o tamanho de partícula, maior será a superfície de contato efetiva apresentada por uma determinada massa de fármaco e, conseqüentemente, maior será a sua velocidade de dissolução (ASHFORD, 2005b).

Vários fármacos apresentam biodisponibilidade oral aumentada com a redução do tamanho de partículas, entretanto esta redução pode também ser responsável por reações tóxicas (BUENO; RECH, 2011).

Polimorfismo

Polimorfismo é a capacidade de um fármaco existir em dois ou mais arranjos moleculares, podendo se apresentar na forma de solvatos, hidratos e amorfos. Solvatos são formas cristalinas que contêm ou não quantidades estequiométricas de um solvente, sendo denominados hidratos quando o solvente presente é a água. A forma amorfa, por sua vez, consiste em arranjos desordenados, não possuindo uma estrutura molecular definida (BUENO; RECH, 2011).

Em geral, a forma polimórfica de maior solubilidade apresenta a maior energia livre e, portanto, é menos estável e tem o menor ponto de fusão. A forma amorfa é mais solúvel em relação à respectiva forma cristalina, apesar dos solvatos e hidratos formarem compostos com solventes (AULTON, 2005; BUENO; RECH, 2011).

A ocorrência de formas polimórficas é relativamente comum, sendo que cerca de um terço dos compostos orgânicos apresenta esse fenômeno. Entretanto, a existência de formas polimórficas de um mesmo fármaco pode alterar as características físico-químicas, afetando diretamente o processo de síntese, a produção da forma farmacêutica, bem como, a qualidade e a biodisponibilidade do fármaco. Dessa forma, são de fundamental importância a identificação e a escolha do polimorfo adequado à atividade terapêutica, tanto na fase de desenvolvimento do produto como durante o período de comercialização (BUENO; RECH, 2011).

Diversos métodos têm sido aplicados para a avaliação do polimorfismo, dentre eles destacam-se:

- Espectrometria no infravermelho: promove a caracterização de polimorfos, uma vez que padrões de ligações de hidrogênio geralmente diferem entre as formas e os grupos funcionais afetados exibindo mudanças no espectro obtido (RODRÍGUEZ-SPONG *et al.*, 2004);

- Calorimetria diferencial exploratória (*Differential Scanning Calorimetry* – DSC): análise térmica sensível e frequentemente utilizada para caracterizar polimorfos, uma vez que quaisquer transições térmicas resultam na liberação ou absorção de energia (GIRON, 2003);

- Difração de raios-X: uma das técnicas mais importantes para a caracterização e quantificação de polimorfos. Materiais cristalinos ou policristalinos têm padrões característicos de difração de raios-X. O espaçamento interplanar e suas intensidades relativas são características e específicas para cada substância cristalina (GIRON, 2003).

- Microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV): promovem informações sobre o tamanho e a morfologia do cristal. Além disso, transições polimórficas podem ser acompanhadas por mudanças na birrefringência do cristal, de forma que mesmo reorganizações sutis na estrutura podem causar grandes alterações nas propriedades ópticas (RODRÍGUEZ-SPONG *et al.*, 2004).

1.1.2.2 Solubilidade de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB)

De acordo com as primeiras definições do SCB, um fármaco é considerado altamente solúvel quando a maior dose disponível comercialmente apresenta razão dose/solubilidade (Equação 1.1) inferior ou igual a 250,0 mL, em um intervalo de pH que varia de 1,0 a 8,0 à temperatura de $37,0 \pm 0,5$ °C (MARTINEZ; AMIDON, 2002).

A estimativa de volume de 250,0 mL é proveniente de protocolos de estudos de bioequivalência que prescrevem a administração de um medicamento em jejum com um copo contendo água para voluntários humanos (FDA, 2017).

Equação 1.1: Equação matemática para o cálculo da solubilidade de fármacos segundo o SCB.

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

Onde: D/S (mL) – razão dose/solubilidade

Dose (mg)* – maior dose disponível comercialmente ou maior dose administrada

Solubilidade (mg/mL) – solubilidade determinada experimentalmente

*Pode apresentar variação entre países

Segundo a FDA, agência regulatória americana, e a agência regulatória europeia, EMA, a solubilidade do fármaco deve ser determinada também à temperatura de 37,0 °C aceitando-se variação de $\pm 1,0$ °C, na faixa de pH que varia de 1,0 a 6,8. Devem ser analisadas soluções com distintos valores de pH de modo a definir com precisão a razão dose/solubilidade (D/S) do fármaco, podendo esta ser baseada nas características de ionização da substância em questão. Entretanto, para o cálculo da D/S, a FDA considera a maior dose disponível comercialmente, enquanto a EMA, realiza o cálculo utilizando a maior dose administrada de uma única vez (EMA, 2010; FDA, 2017).

Por sua vez, a OMS e a Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) preconizam para os estudos de solubilidade a faixa de pH que varia de 1,2 a 6,8, adotando os demais parâmetros conforme descritos anteriormente. E, assim como a EMA, utilizam para fins do cálculo de D/S a dose terapêutica única mais elevada (BRASIL, 2011; WHO, 2015).

Para fins de bioensação, a variação de pH de 1,0 a 6,8 para os estudos de solubilidade é adequada, uma vez que sob condições de jejum, a faixa de pH no trato gastrointestinal varia de 1,4 a 2,1 no estômago, 4,9 a 6,4 no duodeno, 4,4 a 6,6 no jejuno e 6,5 a 7,4 no íleo. Além disso, um fármaco leva geralmente cerca de 85 minutos para atingir o íleo e, no momento em que o atinge, a liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica provavelmente é completa, caso cumpram o critérios de dissolução rápida ou muito rápida (YU *et al.*, 2002).

Para a avaliação da solubilidade é preconizado pelas agências regulatórias a utilização do método da agitação orbital em frascos, conhecido como método do “*shake-flask*”. Entretanto, mediante justificativa que suporte a capacidade de preverem a solubilidade, métodos alternativos como, titulação ácido-base, diagrama de fases e dissolução intrínseca podem ser empregados (YU *et al.*, 2004; EMA, 2010; BRASIL, 2011; WHO, 2015; FDA, 2017).

Método da agitação orbital em frascos

O método da agitação orbital em frascos, mais conhecido como “*shake-flask*”, determina a solubilidade em equilíbrio de fármacos em soluções aquosas tamponadas com pH entre 1,2 e 6,8, preferencialmente 1,2; 4,5 e 6,8 (EMA, 2010; BRASIL, 2011; WHO, 2015; BRASIL, 2017b; FDA, 2017).

A amostra é adicionada em excesso ao meio tamponado e a suspensão resultante é agitada a $37,0 \pm 1,0$ °C durante um tempo definido. O objetivo é formar uma solução saturada, caracterizada pela observação de material excedente não dissolvido (MONTEIRO, 2014; BRASIL, 2017b).

Alíquotas são coletadas sucessivamente em tempos pré-definidos, com reposição de meio. As amostras são filtradas e quantificadas por método analítico previamente validado e indicativo de estabilidade (MONTEIRO, 2014; BRASIL, 2017b).

Para confirmação do equilíbrio entre as fases, a solubilidade deve ser constante em determinações realizadas em tempos consecutivos. As alíquotas coletadas durante o experimento ao serem somadas não devem ultrapassar 10 % do volume total de solução, devido à possibilidade de diluição ao realizar a reposição do volume retirado. Esse procedimento é necessário para manter a hidrodinâmica do sistema e a quantidade de fármaco acima do ponto de saturação (BRASIL, 2017b).

Além disso, para os estudos de solubilidade em equilíbrio algumas regras devem ser observadas: elevada pureza dos solventes; manutenção da temperatura constante durante todo o experimento e a saturação do meio (BRASIL, 2017b).

Titulação ácido-base

O emprego da titulação ácido-base com determinação potenciométrica, para as medições de solubilidade, se baseia na precipitação do soluto que resulta em mudança característica no meio da curva de titulação (GLOMME; MÄRZ; DRESSMAN, 2005).

Como titulante são utilizados ácidos ou bases padronizados, dos 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 mol/L, que visa aumentar a precisão das medições, por manter a força iônica constante ao longo do experimento. Um eletrodo de vidro é usado para controlar constantemente o valor de pH (o procedimento deve ser realizado no intervalo de pH compreendido entre 1,5 e 12,5). Além disso, normalmente, o recipiente de reação é regulado a 25,0 °C e uma camada de um gás inerte (geralmente, argônio) banha a superfície da solução, impedindo que o CO₂ da atmosfera influencie o valor do pH (AVDEEF, 2003; GLOMME; MÄRZ; DRESSMAN, 2005).

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. A mudança no valor de pK_a, causada pela presença do precipitado, é a base da determinação da solubilidade, ou seja, mudanças no pH da solução contendo o fármaco pode ocasionar na formação de precipitado devido à baixa solubilidade do composto (GLOMME; MÄRZ; DRESSMAN, 2005).

Fármacos ácidos pouco solúveis apresentam valor de pK_a aparente (pK_a do composto na presença de precipitado) maior que o pK_a verdadeiro, e bases fracamente solúveis apresentam valores de pK_a aparente menores que o verdadeiro. Grande diferença entre o valor

verdadeiro e o aparente indica a fraca solubilidade do composto (GLOMME; MÄRZ; DRESSMAN, 2005).

O método potenciométrico é econômico (é necessário aproximadamente 100 µg de um composto pouco solúvel) e capaz de criar um perfil de pH/solubilidade com uma determinação única, apesar disso limita-se à análise somente de compostos ionizáveis (GLOMME; MÄRZ; DRESSMAN, 2005).

Diagrama de fases

A determinação 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 demonstra apenas ligeira solubilidade, objetivando a obtenção de uma solução saturada dessa substância (BRASIL, 2010a).

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

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. O compacto não desintegrável utilizado é resultante da compressão do material a ser testado sob condições de pressão apropriadas (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 mg/min/cm² (ISSA; FERRAZ, 2011; UNITED STATES, 2014).

Esse método tem sido proposto, para determinação da solubilidade, como alternativa ao método da agitação orbital em frascos, 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).

Além disso, a determinação da velocidade de dissolução intrínseca 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 estão o uso de pequenas quantidades de substância, a determinação de parâmetros termodinâmicos associados com as transições de fase cristalina, investigação dos fenômenos de transferência de massa durante o processo de dissolução e efeitos do pH e tensoativos sobre a solubilização de fármacos (YU *et al.*, 2004; UNITED STATES, 2014).

Apesar disso, é necessária a padronização do ensaio, que pode ser influenciado por fatores relacionados a propriedades de estado sólido do fármaco, tais como estado cristalino, incluindo polimorfos e solvatos, bem como grau de cristalinidade, além da área superficial, condição hidrodinâmica e a composição do meio de dissolução, incluindo solvente (tipicamente água), presença de tensoativos, temperatura, viscosidade do fluido, pH e concentração do tampão (ISSA; FERRAZ, 2011; UNITED STATES, 2014).

1.1.3 Eremantolida C

O uso de plantas com fins medicinais é uma das práticas mais antigas para o tratamento, cura e prevenção de diversas doenças e por essa razão, continua sendo uma alternativa terapêutica e fonte promissora de fármacos em todo o mundo. No Brasil, parte da população ainda tem grande dependência de recursos naturais, com ênfase em plantas, para diversos fins, incluindo alimentos e fitomedicina (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; BENKO-ISEPPON; CROVELLA, 2010).

Estudos clínicos, farmacológicos e químicos de plantas utilizadas na medicina popular foram a base para medicamentos amplamente utilizados atualmente, como a aspirina, a digitoxina e a morfina. Entretanto, análise de dados mostra a importância atual do papel dos produtos naturais na descoberta de fármacos, os quais proporcionam novas opções para o tratamento de diversas enfermidades (BUTLER, 2004; NEWMAN; CRAGG, 2016).

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 45,4 % do total de 326 fármacos desenvolvidos entre 1981 e 2014 para o combate de doenças infecciosas, englobando assim, classes de antibacterianos, antivirais, antifúngicos e antiparasitários (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Nesse mesmo período, dos 174 fármacos antitumorais descobertos, 114 apresentavam origem natural, reforçando a importância desta, como fonte de cura de diversas doenças (NEWMAN; CRAGG, 2016).

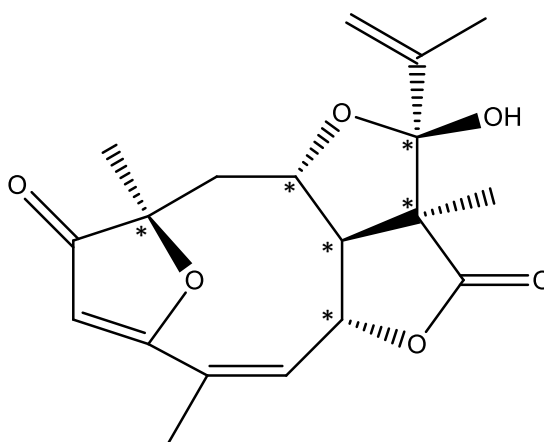
Nesse contexto de utilização popular de produtos naturais com fins medicinais pode-se citar plantas do gênero *Lychnophora* pertencentes à família Asteraceae. Típicas do cerrado brasileiro, com ocorrência em Minas Gerais, Goiás e Bahia, as espécies do gênero *Lychnophora* são conhecidas popularmente como “arnica”, “falsa arnica” ou “arnica da serra”, devido ao odor característico semelhante ao da espécie europeia *Arnica montana* L. (CERQUEIRA, 1987; SAÚDE *et al.*, 1998).

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 *et al.*, 1998).

O perfil fitoquímico do gênero é caracterizado pela ocorrência de sesquiterpenos, triterpenos, lactonas sesquiterpênicas, flavonoides, esteroides e poliacetilenos (BORELLA *et al.*, 1998; FERRAZ-FILHA, 2008). Especialmente, o estudo fitoquímico da espécie *Lychnophora trichocarpha* 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 (SAÚDE *et al.*, 1998).

A lactona sesquiterpênica eremantolida C (EREC) (Figura 1.1) tem sido fonte de estudos por apresentar atividades anti-inflamatória (FERRARI *et al.*, 2013), antitumoral (SAÚDE-GUIMARÃES; RASLAN; OLIVEIRA, 2014), anti-hiperuricêmica, antiartrite gotosa (SOUZA *et al.*, 2012) e tripanossomicida (OLIVEIRA *et al.*, 1996).

Figura 1.1: Estrutura química da eremantolida C com carbonos quirais assinalados (*).



Essa substância se apresenta na forma de cristais incolores e como diferencial não possui na sua estrutura química o grupo α -metileno- γ -lactona (SAÚDE *et al.*, 1998), responsável por

conferir toxicidade às demais lactonas sesquiterpênicas (KUPCHAN; EAKIN; THOMAS, 1971).

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

Com relação à atividade antitumoral, EREC mostrou ação 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. Os resultados obtidos com o tratamento tópico da inflamação utilizando pomadas de EREC a 1 % foram semelhantes aos da formulação padrão de diclofenaco gel a 1 %. Acredita-se que o mecanismo de ação da EREC na redução do edema de pata esteja relacionado com a 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 Souza e colaboradores (2012) com o intuito de promover uma nova base farmacológica para o tratamento da gota. A atividade anti-hiperuricêmica foi comprovada por meio da redução da hiperuricemia induzida por oxonato de potássio em camundongos Swiss, utilizando EREC 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) (SOUZA *et al.*, 2012).

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 (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 20,0 mg/kg e nenhum dos animais veio a óbito, não se observando também sinais de toxicidade geral (PAULA, 2012).

Dessa forma, pensando na potencialidade da eremantolida C vir a se tornar um fármaco, estudos de estabilidade da substância, visando estabelecer um prazo de validade para a sua utilização, bem como, a sua caracterização físico-química foram realizados.

A EREC armazenada em temperatura ambiente e em embalagem de vidro devidamente selada 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 apresenta degradação expressiva em condições neutras e oxidativas, nem quando é exposta à temperatura de 90,0 °C e à luz por curtos períodos de tempo (72 horas). Entretanto, a degradação ocorreu em meio alcalino e ácido (HENRIQUES *et al.*, 2017).

Com relação às características físico-químicas, a eremantolida C apresenta massa molar de 346,0 g/mol, área superficial polar de 82,06 Å² e pK_a calculado de 10,91. Além disso, apresenta 6 ligações aceptoras e 1 doadora de hidrogênio, as quais são responsáveis por possibilitar interações intermoleculares. Apesar disso, a eremantolida C possui um caráter altamente lipofílico, promovendo assim, a baixa solubilidade da substância em água e em meios tamponados (CALDEIRA *et al.*, 2017).

A primeira análise das características biofarmacêuticas da EREC sugeriu que esta substância possui baixa solubilidade e alta permeabilidade. Os resultados obtidos, empregando o método *in silico*, apresentaram valores para cLogS de -3,83 e cLogP de 2,00, valor comparável ao fármaco padrão de alta permeabilidade, metoprolol (CALDEIRA *et al.*, 2017).

Para os estudos de solubilidade em equilíbrio, as agências regulatórias recomendam que sejam usados, preferencialmente, os meios fluido gástrico simulado sem enzimas (pH 1,2), tampão acetato (pH 4,5) e fluido intestinal simulado sem enzimas (pH 6,8), entretanto a EREC apresenta instabilidade em meios extremamente ácidos. Diante disso, a baixa solubilidade da eremantolida C foi confirmada por meio da avaliação da solubilidade em equilíbrio utilizando o método da agitação orbital em frascos, no qual foram encontrados valores de LogS de -4,13, -4,18 e -4,34 para os meios tampão acetato (pH 4,5), fluido intestinal simulado sem enzimas (pH 6,8) e tampão fosfato (pH 7,4), respectivamente (CALDEIRA *et al.*, 2017).

A permeabilidade, por sua vez, foi avaliada utilizando o ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA). EREC apresentou permeabilidade efetiva de 30,40 x 10⁻⁶ cm/s, resultado indicativo de alta permeabilidade, uma vez que o valor obtido foi cerca de 3 vezes superior ao do cloridrato de propranolol (9,23 x 10⁻⁶ cm/s), fármaco utilizado no ensaio como padrão de alta permeabilidade (CALDEIRA *et al.*, 2017).

Uma vez descritas as potencialidades da eremantolida C por meio das suas atividades farmacológicas, baixa toxicidade, estabilidade, solubilidade e permeabilidade *in silico* e *in vitro*

comparáveis a fármacos consolidados no mercado, fez-se necessária a determinação da sua velocidade de dissolução intrínseca, inferindo sobre a presença de transição de fase cristalina e polimorfismo. Além disso, de sua permeabilidade por meio da perfusão intestinal *in situ* em ratos, visando confirmar o seu grau de permeação e identificar a presença de transporte ativo, fatores estes que estão diretamente correlacionados com a biodisponibilidade oral de um fármaco.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Equipamentos e utensílios

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

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

Balança analítica UX420H capacidade mínima 20,0 mg - Shimadzu

Bomba de vácuo MA 057/12 - Marconi

Calorímetro de Varredura Diferencial série DSC-60 - Shimadzu

Coletor automático Auto Plus - Hanson

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

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

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

Destilador - Cristófoli

Difratômetro de raios-X XRD-7000 - Shimadzu

Dissolutor Vision Elite 8 - Hanson

Espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier 640-IR - Varian

Estufa com circulação e renovação de ar MA035/5 - Marconi

Estufa de secagem e esterilização - Ethik

Equipamento de Ressonância Magnética Nuclear Ascend[™] 400 - Bruker, software TopSpin[®] 3.2

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 μ m de poro - Millipore

Micropipetas monocanal várias capacidades Pipetman[®] - Gilson

Microscópio eletrônico de varredura JSM-6360LV - Jeol

Microscópio óptico com câmara acoplada Scope.A1 Axio - Zeiss

Moinho de facas MA680 - Marconi

pHmetro - Hanna

Polarímetro digital automático Q760M2 - Quimis

Ponteiras plásticas

Prensa hidráulica - Isbec

Rotavapor R-210, bomba de vácuo V-700 e banho de aquecimento B-491 - Buchi

Sistema de purificação de água Direct-Q₃[®] - Millipore

Sistema de revestimento a alto vácuo MED 020 – BAL-TEC

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

1.2.2 Reagentes e solventes

Acetato de etila - Qhemis

Acetato de sódio triidratado - Vetec

Acetonitrila grau cromatográfico - JTBaker

Ácido acético glacial - Vetec

Ácido sulfúrico - Vetec

Água destilada

Água ultrapura

Anisaldeído - Vetec

Clorofórmio - Qhemis

Diclorometano - Qhemis

Fosfato de potássio monobásico - Neon

Hexano - Qhemis

Hidróxido de sódio - Vetec

Metanol - Qhemis

Metanol grau cromatográfico - JTBaker

Sílica gel 60 - Merck

Sílica gel 60G - Merck

Sulfato cérico - Vetec

1.2.3 Isolamento, caracterização físico-química e identificação estrutural da eremantolida C (EREC)

1.2.3.1 Reveladores para cromatografia em camada delgada (CCD)

Sulfato cérico

Foram pesados exatamente 42,0 g de sulfato cérico e transferidos para balão volumétrico de 1 L contendo aproximadamente 500,0 mL de água destilada e 28,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após adequada solubilização o volume foi completado com água destilada. A

solução reveladora foi aspergida em placa de vidro contendo sílica gel 60G, levada para estufa aquecida a 100 °C por 5 a 10 minutos e as manchas foram observadas na região espectral do visível.

Anisaldeído

Para o preparo da solução reveladora foram misturados 50,0 mL de ácido acético glacial com 2,5 mL de anisaldeído, e em seguida foram adicionados 425,0 mL de metanol e, lentamente, 25,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. A solução reveladora foi aspergida em placa de vidro contendo sílica gel 60G, levada para estufa aquecida a 100 °C por 5 a 10 minutos e as manchas foram observadas na região espectral do visível.

1.2.3.2 Padrão de eremantolida C utilizado na cromatografia em camada delgada (CCD)

A eremantolida C, sólido incolor com grau de pureza de 97,8 %, foi previamente isolada do extrato clorofórmico de *Lychnophora trichocarpha* (Spreng.) Spreng. ex Sch.Bip. e fornecida pela Prof. Dr^a. Dênia Antunes Saúde Guimarães, Laboratório de Plantas Medicinais (LAPLAMED), CiPharma/UFOP.

A substância fornecida, além de ser utilizada como padrão na CCD, foi empregada nas análises de calorimetria diferencial exploratória (DSC), difração de raios-X e microscopias óptica e eletrônica de varredura sob a denominação de EREC 2, com o intuito de avaliar a presença de polimorfismo na eremantolida C.

1.2.3.3 Coleta do material vegetal

Partes aéreas de *Lychnophora trichocarpha* (Spreng.) Spreng. ex Sch.Bip. foram coletadas em julho de 2015, em Ouro Preto, Minas Gerais (20° 23' 53" S; 43° 30' 42" W). As exsicatas encontram-se depositadas no herbário do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da UFOP, com o número de referência 20635.

A coleta foi realizada com a permissão do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA – número 49183-1).

A pesquisa científica está cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob o número AF50E17, conforme Anexo A.

1.2.3.4 Preparo do extrato clorofórmico

As partes aéreas de *Lychnophora trichocarpa* (Spreng.) Spreng. ex Sch.Bip. (2,8 kg) foram secas em estufa com circulação de ar a 37,0 °C e pulverizadas empregando moinho de facas. O material pulverizado foi submetido a extração por percolação com clorofórmio, empregando percolador de alumínio, até completa exaustão do material vegetal.

O solvente foi removido sob pressão reduzida a 40,0 °C para obtenção do extrato clorofórmico seco (165,24 g).

1.2.3.5 Fracionamentos cromatográficos

O extrato clorofórmico (165,24 g) foi submetido a cromatografia em coluna de filtração em sílica gel utilizando hexano, acetato de etila e metanol como eluentes, em ordem crescente de polaridade.

Foram coletadas frações de 500 mL verificando-se a presença da eremantolida C por comparação com o padrão da substância em CCD (hexano:acetato de etila, 60:40, v/v), utilizando sulfato cérico e anilsaldeído como reveladores.

A ordem de eluição, bem como o número de frações e a detecção de eremantolida C estão listados na Tabela 1.1.

Tabela 1.1: Primeiro fracionamento cromatográfico para obtenção da eremantolida C.

Eluente (%)	Frações	Detecção de eremantolida C
Hexano	-	F22-39
Hexano: Acetato de etila (90:10)	F1-10	
Hexano: Acetato de etila (80:20)	F11-25	
Hexano: Acetato de etila (50:50)	F26-39	
Metanol	-	

As frações nas quais foram detectadas a presença da eremantolida C, por análise por CCD (hexano:acetato de etila, 60:40, v/v), foram reunidas totalizando 49,23 g. Essa quantidade foi submetida a fracionamento cromatográfico utilizando coluna de sílica gel e os solventes hexano e acetato de etila, com eluição em ordem crescente de polaridade.

Foram coletadas frações de 30 mL verificando-se a presença da eremantolida C por comparação com o padrão da substância em CCD (hexano:acetato de etila, 60:40, v/v), utilizando os reveladores sulfato cérico e anilsaldeído.

A ordem de eluição, bem como o número de frações e a detecção de eremantolida C estão listados na Tabela 1.2.

Tabela 1.2: Segundo fracionamento cromatográfico para obtenção da eremantolida C.

Eluente (%)	Frações	Deteccção de eremantolida C
Hexano	F1-35	F170-233
Hexano: Acetato de etila (95:5)	F36-70	
Hexano: Acetato de etila (90:10)	F71-78	
Hexano: Acetato de etila (85:15)	F79-88	
Hexano: Acetato de etila (80:20)	F89-99	
Hexano: Acetato de etila (75:25)	F100-138	
Hexano: Acetato de etila (70:30)	F139-164	
Hexano: Acetato de etila (60:40)	F165-175	
Hexano: Acetato de etila (40:60)	F176-236	
Acetato de etila	F237-243	

As frações nas quais foram detectadas a presença da eremantolida C, por análise por CCD (hexano:acetato de etila, 60:40, v/v), foram reunidas resultando em um total de 29,43 g. Essa quantidade foi submetida a fracionamento cromatográfico utilizando coluna de sílica gel e os solventes hexano e acetato de etila, com eluição em ordem crescente de polaridade.

Foram coletadas frações de 25 mL verificando-se a presença da eremantolida C por comparação com o padrão da substância em CCD (hexano:acetato de etila, 60:40, v/v), utilizando os reveladores sulfato cérico e anilsaldeído.

A ordem de eluição, bem como o número de frações e a deteccção de eremantolida C estão listados na Tabela 1.3.

Tabela 1.3: Terceiro fracionamento cromatográfico para obtenção da eremantolida C.

Eluente (%)	Frações	Deteccção de eremantolida C
Hexano	-	F91-275
Hexano: Acetato de etila (95:5)	F1-10	
Hexano: Acetato de etila (90:10)	F11-20	
Hexano: Acetato de etila (85:15)	F21-30	
Hexano: Acetato de etila (80:20)	F31-40	
Hexano: Acetato de etila (75:25)	F41-80	
Hexano: Acetato de etila (70:30)	F81-279	
Hexano: Acetato de etila (65:35)	F280-289	
Hexano: Acetato de etila (60:40)	F290-299	
Acetato de etila	F300-309	

As frações nas quais foram detectadas a presença da eremantolida C, por análise por CCD (hexano:acetato de etila, 60:40, v/v), foram reunidas resultando em um total de 29,41 g. Essa quantidade foi submetida a fracionamento cromatográfico utilizando coluna de sílica gel e os solventes hexano, diclorometano e acetato de etila, com eluição em ordem crescente de polaridade.

Foram coletadas frações de 25 mL verificando-se a presença da eremantolida C por comparação com o padrão da substância em CCD (hexano:acetato de etila, 60:40, v/v), utilizando os reveladores sulfato cérico e anilsaldeído.

A ordem de eluição, bem como o número de frações e a detecção de eremantolida C estão listados na Tabela 1.4.

Tabela 1.4: Quarto fracionamento cromatográfico para obtenção da eremantolida C.

Eluente (%)	Frações	Detecção de eremantolida C
Hexano	-	
Hexano: Diclorometano (90:10)	F1-10	
Hexano: Diclorometano (80:20)	F11-20	
Hexano: Diclorometano (70:30)	F21-30	
Hexano: Diclorometano (60:40)	F31-40	
Hexano: Diclorometano (50:50)	F41-50	
Hexano: Diclorometano (40:60)	F51-60	
Hexano: Diclorometano (30:70)	F61-70	
Hexano: Diclorometano (20:80)	F71-80	
Hexano: Diclorometano (10:90)	F81-90	F151-160
Diclorometano	F91-100	
Diclorometano: Acetato de etila (95:5)	F101-110	
Diclorometano: Acetato de etila (90:10)	F111-120	
Diclorometano: Acetato de etila (80:20)	F121-130	
Diclorometano: Acetato de etila (70:30)	F131-140	
Diclorometano: Acetato de etila (60:40)	F141-167	
Diclorometano: Acetato de etila (50:50)	F168-202	
Diclorometano: Acetato de etila (25:75)	F203-212	
Acetato de etila	F214-223	

Após o processo de purificação empregando a cromatografia em coluna de sílica gel, as frações obtidas foram reunidas e encaminhadas para análise do ponto de fusão, rotação específica, espectroscopia no infravermelho, análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), além do grau de pureza por cromatografia a líquido de alta eficiência.

1.2.4 Avaliação da solubilidade da eremantolida C

1.2.4.1 Preparo da solução estoque A de eremantolida C

Foram pesados exatamente 10,0 mg da amostra contendo eremantolida C a 89,9 % (referente à EREC isolada neste trabalho e caracterizada conforme descrito no item 1.3.1) e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. O volume foi completado com metanol grau cromatográfico e a solução obtida apresentou concentração final de 1000,0 µg/mL. Para

quantificação correta da eremantolida C nos estudos de solubilidade, os resultados obtidos foram corrigidos quanto a pureza da amostra.

1.2.4.2 Preparo da solução estoque B de eremantolida C

Foram pesados exatamente 5,0 mg da amostra contendo eremantolida C a 89,9 % (referente à EREC isolada neste trabalho e caracterizada conforme descrito no item 1.3.1) e transferidos para balão volumétrico de 25 mL. O volume foi completado com metanol grau cromatográfico e a solução obtida apresentou concentração final de 200,0 µg/mL. Para quantificação correta da eremantolida C nos estudos de solubilidade, os resultados obtidos foram corrigidos quanto a pureza da amostra.

1.2.4.3 Preparo das soluções tampão

As soluções tampão foram preparadas de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (BRASIL, 2010a) e a Farmacopeia Americana 37ª Edição (UNITED STATES, 2014). As correções de pH, quando necessárias, foram realizadas utilizando 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 1 L. 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 1 L. 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 1 L. O volume foi completado com água ultrapura.

1.2.4.4 Validação parcial 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) visando o estudo de dissolução intrínseca

O método analítico para quantificação da eremantolida C nos meios tamponados TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) foi previamente desenvolvido e validado por pesquisadores do nosso grupo de pesquisa. Entretanto, a faixa de trabalho validada (7,0 a 75,0 µg/mL para TA e FISSE, e de 7,0 a 60,0 µg/mL para TF) é inadequada para a quantificação da eremantolida C nos estudos de dissolução intrínseca (CALDEIRA *et al.*, 2017).

Considerando isso, foi realizada a validação parcial do método analítico para quantificação da eremantolida C nos meios tamponados, TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4), de acordo com a resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 da Anvisa (BRASIL, 2017).

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

1.2.4.4.1 Linearidade

A análise da linearidade foi conduzida a partir da construção de curvas analíticas referentes a cada meio tamponado utilizando-se seis concentrações de eremantolida C que variaram na faixa de 0,1 µg/mL a 2,0 µg/mL.

A proporção de solvente orgânico empregado não foi superior a 10 % do volume total de solução, conforme diluições indicadas na Tabela 1.5. As determinações foram realizadas em triplicata.

Tabela 1.5: 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 para quantificação da eremantolida C nos testes de dissolução intrínseca.

Alíquota da solução estoque B* (mL)	Volume final da solução (mL)	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração corrigida (µg/mL)
0,025	50	0,1	0,09
0,025	10	0,5	0,45
0,040	10	0,8	0,72
0,060	10	1,2	1,08
0,075	10	1,5	1,35
0,100	10	2,0	1,80

*Solução estoque com concentração de 200,0 µg/mL

1.2.4.4.2 Precisão

A precisão foi analisada de duas formas: repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (interdia) (BRASIL, 2017).

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 (0,45 µg/mL), média (1,08 µg/mL) e alta (1,80 µg/mL), em triplicata.

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

A precisão foi calculada conforme a Equação 1.2, e não foram admitidos valores superiores a 5,0 % (TAVERNIERS; LOOSE; BOCKSTAELE, 2004).

Equação 1.2: Equação matemática para o cálculo da precisão.

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

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

1.2.4.4.3 Exatidão

A exatidão foi calculada de acordo com a fórmula matemática indicada na Equação 1.3, a partir de determinações em três níveis de concentração: baixa (0,45 µg/mL), média (1,08 µg/mL) e alta (1,80 µg/mL), para os três meios tamponados e em triplicata.

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

Equação 1.3: Equação matemática para o cálculo da exatidão.

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

1.2.4.4.4 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 1.4) que levam em consideração os coeficientes angulares e lineares das curvas analíticas obtidas.

Equação 1.4: Equações matemáticas para o cálculo dos limites de detecção e quantificação.

$$LD = \frac{DPa \times 3,3}{b} \qquad LQ = \frac{DPa \times 10}{b}$$

Onde: DPa – desvio padrão dos coeficientes lineares da curva analítica
b – inclinação da curva analítica

1.2.4.5 Padronização do método de dissolução intrínseca para a avaliação da solubilidade da eremantolida C

A padronização do método de dissolução intrínseca, para a avaliação da solubilidade da eremantolida C, foi proposta baseada em dados coletados na literatura.

Diante dessa busca, observou-se que as variáveis capazes de influenciar a velocidade de dissolução intrínseca são: volume de meio, velocidade de rotação e tempo total do experimento (YU *et al.*, 2004; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2012; UNITED STATES, 2014).

Estudos pilotos foram realizados com o intuito de analisar a influência dessas variáveis sobre a velocidade de dissolução intrínseca e definir as melhores condições para a avaliação da solubilidade da eremantolida C.

Primeiramente, 100,0 mg da amostra contendo eremantolida C foram transferidos para um aparelho que consiste numa matriz, um punção superior e uma placa de superfície inferior confeccionada de aço inoxidável (Figura 1.2), conhecido como aparelho de disco rotativo ou aparelho de “Wood” com 0,8 cm de diâmetro, resultando em uma área superficial de 0,50 cm².

Figura 1.2: Aparelho utilizado na determinação da velocidade de dissolução intrínseca.



A compressão foi realizada sob a força de 1 tonelada por 60 segundos, de forma que um compacto não desintegrável fosse formado.

A eremantolida C apresenta valores de solubilidade muito próximos nos três meios tamponados em questão, por isso, os estudos pilotos foram realizados apenas no FISSE (pH 6,8), desaerado em banho de ultrassom por 30 minutos.

A temperatura foi fixada a 37,0 °C, admitindo-se variações de 0,5 °C, a fim de mimetizar as condições do organismo. Houve variação do volume de meio, realizando-se os estudos em cubas contendo 500 e 900 mL de meio, sob as velocidades de rotação de 60, 100 e 250 rpm.

Alíquotas de 5,0 mL foram coletadas em tempos pré-determinados, com reposição de meio, e filtradas, utilizando unidades filtrantes em PVDF de 0,45 µm, diretamente para *vials* para posterior quantificação por método cromatográfico previamente validado.

A velocidade de dissolução intrínseca da eremantolida C foi determinada em 8, 24 e 72 horas.

Tabela 1.6: Condições avaliadas durante a padronização do método para determinação da velocidade de dissolução intrínseca.

Parâmetro	
Volume de meio (mL)	500 e 900
Velocidade de rotação (rpm)	60, 100 e 250
Tempo total do experimento (horas)	8, 24 e 72

1.2.4.6 Avaliação da solubilidade da eremantolida C pelo método de dissolução intrínseca

Após a padronização do método de dissolução intrínseca, as melhores condições para a avaliação da solubilidade da eremantolida C foram selecionadas.

100,0 mg da amostra contendo eremantolida C foram pesados e transferidos para o aparelho de disco rotativo ou aparelho de “Wood” com 0,8 cm de diâmetro. A compressão foi realizada sob a força de 1 tonelada por 60 segundos, de forma que um compacto não desintegrável com área superficial de 0,50 cm² fosse formado.

A velocidade de dissolução intrínseca (VDI) foi determinada em triplicata, utilizando 900 mL de cada meio tamponado a 37,0 °C sob duas velocidades de rotação: 100 rpm e 250 rpm.

Os meios tamponados empregados foram desaerados em banho de ultrassom durante 30 minutos, antes do uso.

Alíquotas de 5,0 mL foram coletadas, com subsequente reposição de meio, e filtradas, utilizando unidades filtrantes em PVDF de 0,45 µm, diretamente para *vials* para posterior quantificação por método cromatográfico previamente validado.

As coletas foram realizadas a cada 30 minutos, totalizando 8 horas de experimento e consequentemente, 16 amostras para análise.

Ao final do experimento, o cálculo da velocidade de dissolução intrínseca foi realizado correlacionando a quantidade de eremantolida C solubilizada no meio a cada intervalo de tempo com a área superficial do compacto, conforme descrito na Equação 1.5.

Equação 1.5: Fórmula matemática utilizada para o cálculo da velocidade de dissolução intrínseca (VDI) da eremantolida C nos meios tamponados.

$$VDI = \frac{V}{A} \frac{dc}{dt}$$

Onde: V – volume do meio de dissolução (mL)

c – concentração (µg/mL ou mg/mL)

t – tempo (minutos)

A – área superficial do compacto (cm²)

Fonte: YU *et al.*; 2004.

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

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

A avaliação da solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frascos foi realizada nos meios tamponados TA (4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) de acordo com as condições padronizadas por Caldeira e colaboradores (2017), as quais estão indicadas na Tabela 1.7.

Tabela 1.7: Condições experimentais utilizadas para a avaliação da solubilidade em equilíbrio da eremantolida C pelo método da agitação orbital em frascos (CALDEIRA *et al.*, 2017).

Quantidade de substância em excesso	1,0 mg
Volume de meio	10 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 em PVDF de 0,45 µm, diretamente para *vials* para posterior quantificação por método cromatográfico previamente validado (CALDEIRA *et al.*, 2017).

Curvas analíticas compreendendo o intervalo de 7,0 a 75,0 µg/mL (TA e FISSE) e 7,0 a 60,0 µg/mL (TF) foram preparadas a partir da solução estoque A de eremantolida C para cada dia do experimento possibilitando a quantificação da substância.

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

1.2.4.8 Análise estatística

A análise estatística, quando necessária, foi realizada utilizando o teste *t-Student*, empregando o GraphPad Prism[®] 5.01. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

1.2.5 Avaliação da presença de polimorfismo na eremantolida C

1.2.5.1 Calorimetria diferencial exploratória (*Differential scanning calorimetry* - DSC)

Amostras de eremantolida C cristalizadas em clorofórmio (EREC 1) e acetato de etila (EREC 2), bem como amostras provenientes da cristalização de eremantolida C após o estudo de dissolução intrínseca, denominadas EREC pH 4,5 (correspondente à eremantolida C cristalizada após a determinação da velocidade de dissolução intrínseca em TA pH 4,5), EREC

pH 6,8 (correspondente à eremantolida C cristalizada após a determinação da velocidade de dissolução intrínseca em FISSE pH 6,8) e EREC pH 7,4 (correspondente à eremantolida C cristalizada após a determinação da velocidade de dissolução intrínseca em TF pH 7,4) foram submetidas à análise térmica por calorimetria diferencial exploratória.

As amostras foram pesadas em cadinhos de alumínio, posteriormente fechados e submetidas a faixa de temperatura de 50,0 a 300,0 °C com razão de aquecimento de 10,0 °C/minuto sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50,0 mL/minuto.

1.2.5.2 Difração de raios-X

Amostras de eremantolida C cristalizadas em clorofórmio (EREC 1) e acetato de etila (EREC 2), bem como, amostras de EREC pH 4,5, EREC pH 6,8 e EREC pH 7,4 foram completamente secas, alocadas em suportes de alumínio e analisadas em difratômetro de raios-X utilizando uma fonte de raios-X de cobre no intervalo de 7,5° a 30° de 2Theta (2θ) à velocidade de 0,5 graus/minuto. Em todas as tomadas de dados foi empregado um monocromador de grafite, responsável pela filtragem do comprimento de onda utilizado.

1.2.5.3 Microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Amostras de eremantolida C cristalizadas em clorofórmio (EREC 1) e acetato de etila (EREC 2) foram alocadas em câmaras de Neubauer e submetidas a luz polarizada para a avaliação quanto a capacidade de refração sob a luz polarizada em microscópio óptico.

Além disso, EREC 1 e EREC 2, bem como, amostras de EREC pH 4,5, EREC pH 6,8 e EREC pH 7,4 foram fixadas em suportes (*stubs*) de metal com o auxílio de fita de carbono e submetidas a metalização com Au/Pd (espessura de 5 nm), com o intuito de possibilitar a análise morfológica das amostras por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1 Isolamento, caracterização físico-química e identificação estrutural da eremantolida C (EREC)

O processo de extração para isolamento e purificação da eremantolida C apresentou rendimento de 0,37 % (p/p), resultando, portanto, no montante de 10,27 g de EREC.

Na literatura é comumente relatado o isolamento da eremantolida C a partir do extrato etanólico de partes aéreas de *Lychnophora trichocarpa*. Entretanto, a percolação empregando clorofórmio como solvente extrator proporciona maior rendimento, quando comparado com etanol (0,20 %), para o isolamento e purificação da eremantolida C (SAÚDE-GUIMARÃES; RASLAN; OLIVEIRA, 2014).

Todas as condições estabelecidas no processo de obtenção da eremantolida C foram utilizadas com base no perfil cromatográfico apresentado pela substância na CCD, com o intuito de proporcionar o máximo de pureza à EREC.

Ainda com o objetivo de conferir maior pureza à eremantolida C obtida, foi empregada a cromatografia a líquido de alta eficiência semi-preparativa. Entretanto, este procedimento não proporcionou o aumento do grau de pureza da substância isolada, inviabilizando, portanto, a sua utilização.

Na Tabela 1.8 estão listadas as faixas de fusão e os valores de rotação específica encontrados para a EREC purificada em comparação com dados relatados na literatura.

Tabela 1.8: Faixas de fusão e valores de rotação específica obtidos para a eremantolida C purificada frente aos dados descritos na literatura.

Parâmetro	Valor obtido	Valor relatado
Faixa de fusão (°C)	234,7-241,6	229,0-230,0 (Le Quesne <i>et al.</i> , 1978)
Rotação específica*	$[\alpha]_D^{25} = -10,0^\circ$ (metanol) $[\alpha]_D^{25} = -52,6^\circ$ (clorofórmio)	$[\alpha]_D = -12,7^\circ$ (Le Quesne <i>et al.</i> , 1978)**

*A rotação específica foi analisada utilizando soluções da amostra contendo eremantolida C a 10,0 mg/mL

** Temperatura não mencionada pelo autor

O ponto de fusão é uma ferramenta analítica fundamental na caracterização físico-química da substância, sendo também um indicativo do seu grau de pureza (BRASIL, 2010a). A eremantolida C apresentou faixa de fusão comparável com os dados relatados na literatura. A variação na faixa de temperatura obtida é devida a diferença entre os graus de pureza apresentados pelas substâncias e por elas terem sido cristalizadas em diferentes solventes.

Substâncias impuras apresentam ampla faixa de fusão. Em geral, são observadas diferenças superiores a 3,0 °C entre a temperatura inicial e final de fusão. Dessa forma, pode-se inferir que a eremantolida C obtida neste trabalho apresenta um grau de pureza inferior à aquela obtida por Le Quesne e colaboradores (1978). Além disso, enquanto a eremantolida C obtida neste trabalho foi cristalizada em clorofórmio, a eremantolida C isolada por Le Quesne e colaboradores (1978) passou por um processo de recristalização em etanol.

A rotação específica é o ângulo através do qual o plano de polarização é girado quando a luz polarizada passa através de uma solução contendo a substância opticamente ativa dissolvida. As substâncias são descritas como dextrógiras (+) quando giram o plano de polarização no sentido horário e levógiras (-), quando giram o plano de polarização no sentido anti-horário (BRASIL, 2016a).

A rotação específica varia com a temperatura, o comprimento de onda da luz incidente, o solvente utilizado, a natureza da substância e sua concentração. Dessa forma, a temperatura deve ser ajustada com precisão de forma a não ocasionar erros de medição. Além disso, o solvente utilizado deve ser especificado uma vez que, solventes diferentes geram valores diferentes de rotação específica (BRASIL, 2016a).

A rotação específica da eremantolida C foi avaliada a 25,0 °C utilizando clorofórmio e metanol como solventes. O valor obtido para rotação específica da EREC em metanol foi muito próximo ao relatado por Le Quesne e colaboradores (1978), podendo-se atribuir a pequena diferença encontrada às condições experimentais estabelecidas (controle de temperatura, por exemplo).

Após análise do ponto de fusão e da rotação específica, a amostra de eremantolida C foi submetida a análise por espectroscopia no infravermelho, visando identificar grupos funcionais característicos de lactonas sesquiterpênicas do tipo furanoeliangolida.

As duas regiões espectrais mais importantes que devem ser consideradas durante a análise dos espectros no infravermelho são as regiões de 4000 a 1300 cm^{-1} e de 900 a 650 cm^{-1} . A região de mais alta frequência é chamada de região dos grupos funcionais, enquanto que de 900 a 650 cm^{-1} observa-se absorções características de compostos aromáticos e heteroaromáticos (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

As bandas de absorção no infravermelho características da eremantolida C, conforme espectro apresentado na Figura 1.3, estão de acordo com as relatadas por Le Quesne e colaboradores (1978) e indicadas em:

- a) 1770 cm^{-1} – deformação axial da carbonila presente no anel lactônico.

Lactonas apresentam duas bandas de absorção características, provenientes das deformações axiais de C=O e C–O. A intensa vibração da deformação axial de C=O ocorre em frequências mais altas do que cetonas alifáticas saturadas (1715 cm^{-1}), uma vez que, há o aumento da constante de força da ligação carbonílica devido à capacidade do átomo de oxigênio adjacente atrair elétrons, gerando um efeito indutivo e provocando o deslocamento da banda para regiões de frequência mais elevadas (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

b) 1660 cm^{-1} – deformação axial de ligação dupla C=C presente no sistema C=CCO₂R. Alcenos não-conjugados, em geral, apresentam uma banda de absorção de intensidade moderada a fraca entre 1670 e 1640 cm^{-1} . O grau de substituição promove um aumento da frequência das bandas, isto é, alcenos monossustituídos absorvem em cerca de 1640 cm^{-1} , enquanto alcenos di ou trissustituídos apresentam bandas entre 1650 e 1670 cm^{-1} . Ademais, ligações duplas terminais apresentam maior intensidade quando comparadas a não-terminais (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

c) 1700 cm^{-1} – deformação axial correspondente à carbonila da cetona conjugada presente no sistema furanona.

A conjugação com uma ligação C=C aumenta a deslocalização de elétrons π de ambos os grupos insaturados. No grupo C=O, a deslocalização dos elétrons π reduz o caráter da ligação dupla e leva à absorção em menor número de onda quando comparada com cetonas alifáticas saturadas (1715 cm^{-1}) (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

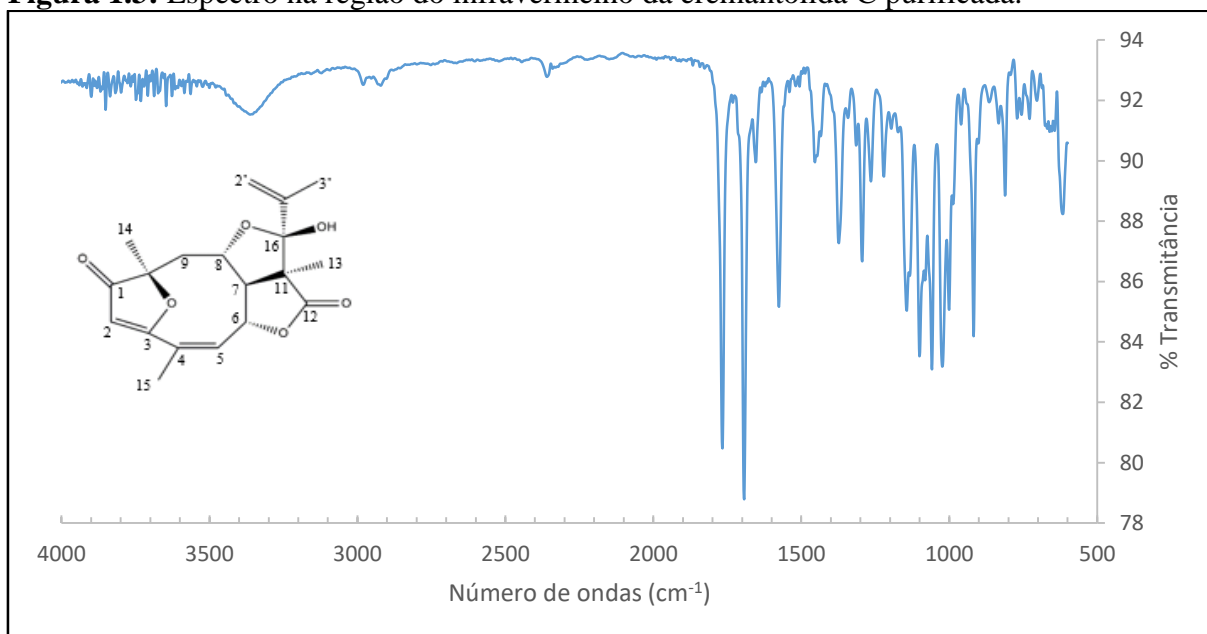
d) 1590 cm^{-1} – deformação axial de ligação dupla C=C do sistema C=COR furanona. As vibrações de deformação axial de ligações duplas de sistemas conjugados produzem duas bandas uma próxima de 1650 cm^{-1} e a outra de 1600 cm^{-1} . Somado a isso, a ligação C=C está conjugada com o grupo carbonila, o qual pode reduzir a localização da banda referente a C=C em cerca de 30 cm^{-1} (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

e) 3400 cm^{-1} – deformação axial da ligação O–H.

Grupamentos hidroxilas de álcoois e fenóis que não participam de ligações de hidrogênio absorvem fortemente em torno de 3600 cm^{-1} . Ligações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares ocasionam em bandas pouco intensas, largas e em frequências mais baixas do que aquelas de álcoois com hidroxilas livres (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

Demais bandas representam deformações axiais de ligações entre carbonos, indicando a presença de grupos metila e metileno.

Figura 1.3: Espectro na região do infravermelho da eremantolida C purificada.



Para a completa identificação estrutural da eremantolida C purificada foram obtidos espectros de RMN de ¹H, RMN de ¹³C, COSY -¹H-¹H, HSQC e DEPT.

Nas Figuras 1.4, 1.5, 1.6 e 1.7 estão representados os espectros de RMN de ¹H, bem como, suas expansões, obtidos para a eremantolida C.

Na Figura 1.8 está representado o espectro de correlação entre os hidrogênios presentes na molécula de eremantolida C, denominado COSY -¹H-¹H.

Figura 1.4: Espectro de RMN de ^1H da eremantolida C purificada (CDCl_3 , 400 MHz).

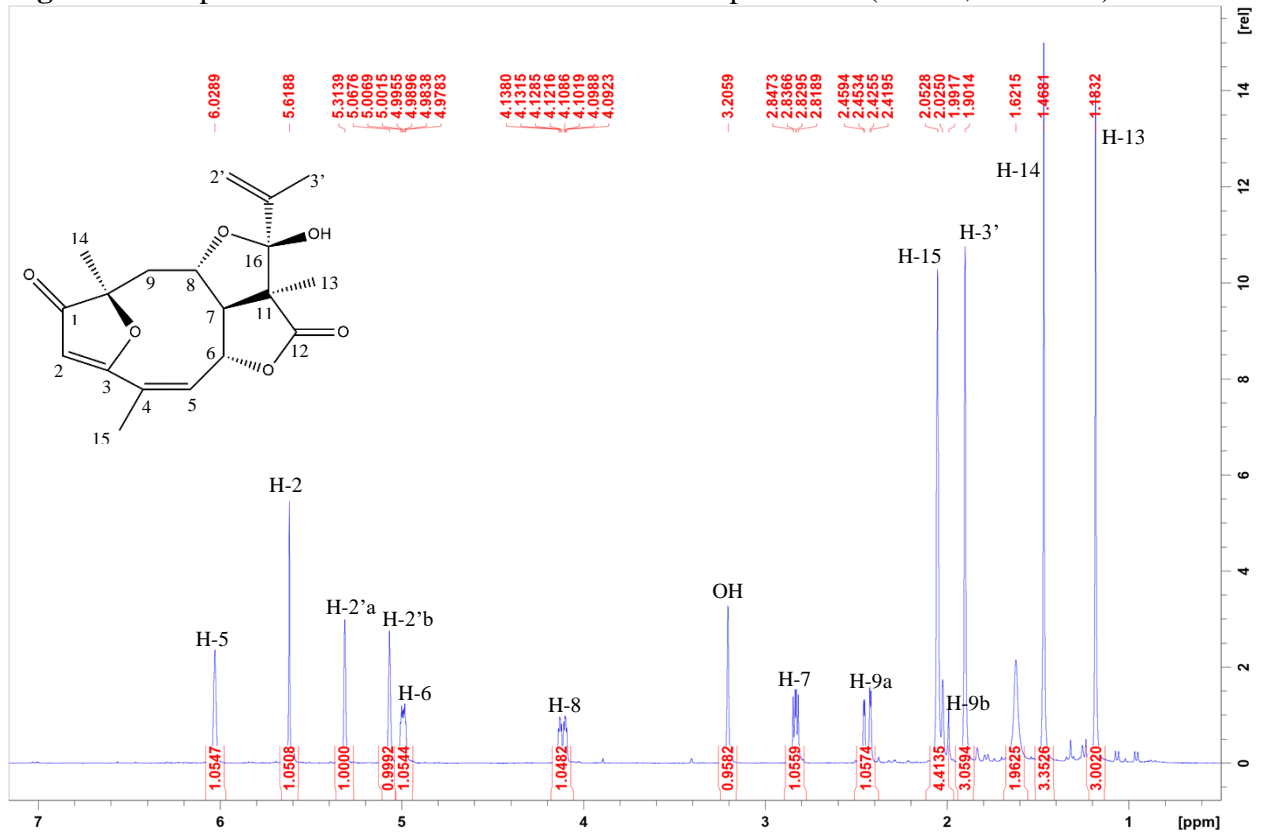


Figura 1.5: Espectro de RMN de ^1H da eremantolida C purificada (CDCl_3 , 400 MHz), expansão da região em δ 0,8-2,2.

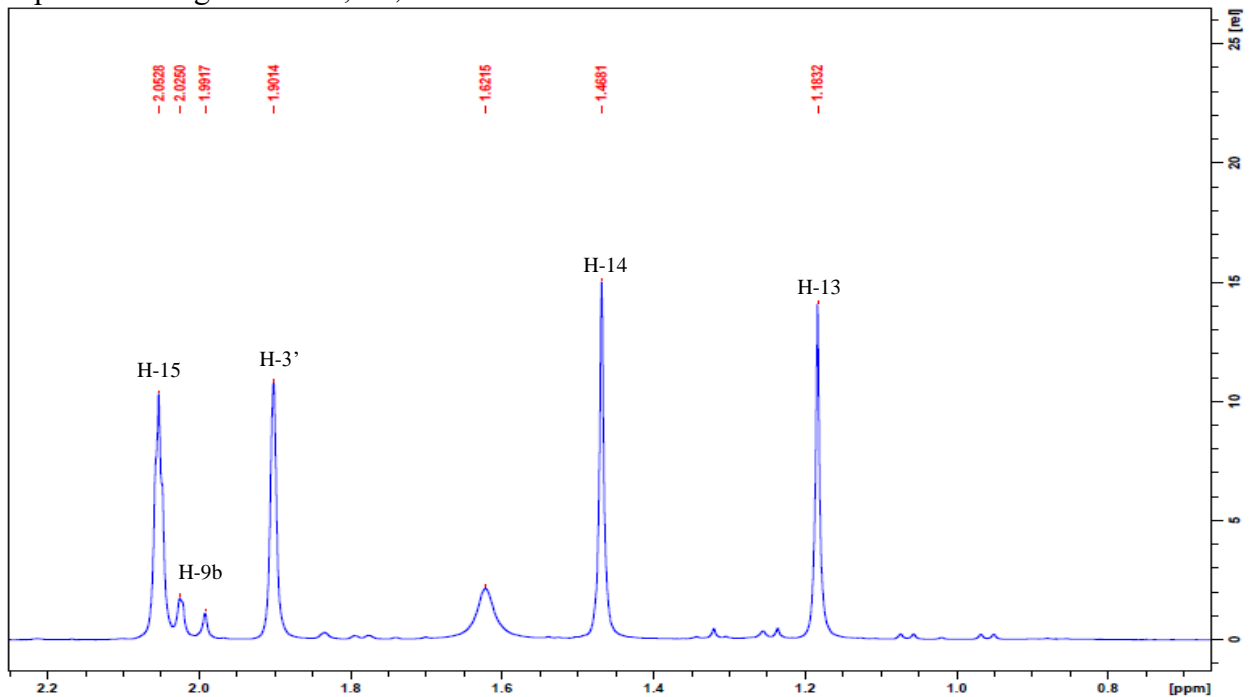


Figura 1.6: Espectro de RMN de ^1H da eremantolida C purificada (CDCl_3 , 400 MHz), expansão da região em δ 2,2-4,3.

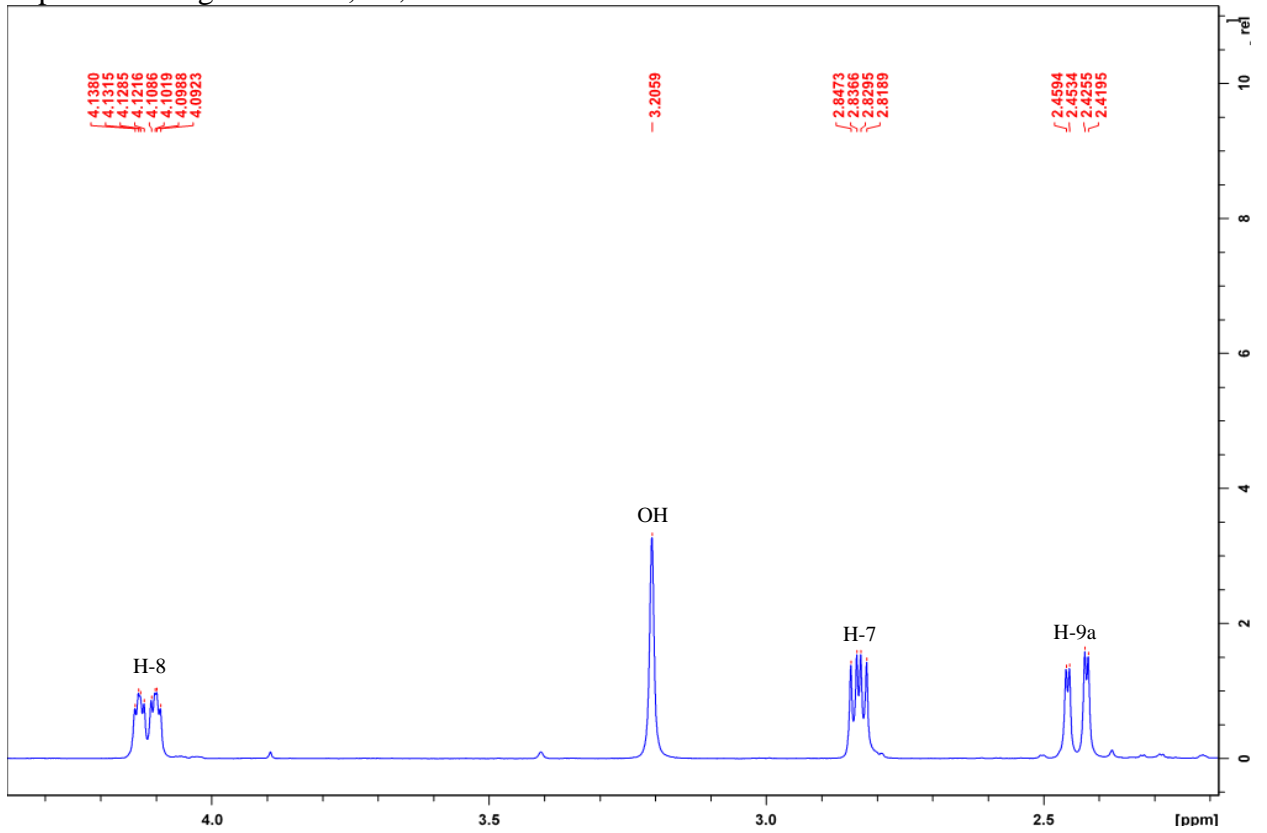


Figura 1.7: Espectro de RMN de ^1H da eremantolida C purificada (CDCl_3 , 400 MHz), expansão da região em δ 4,8-6,4.

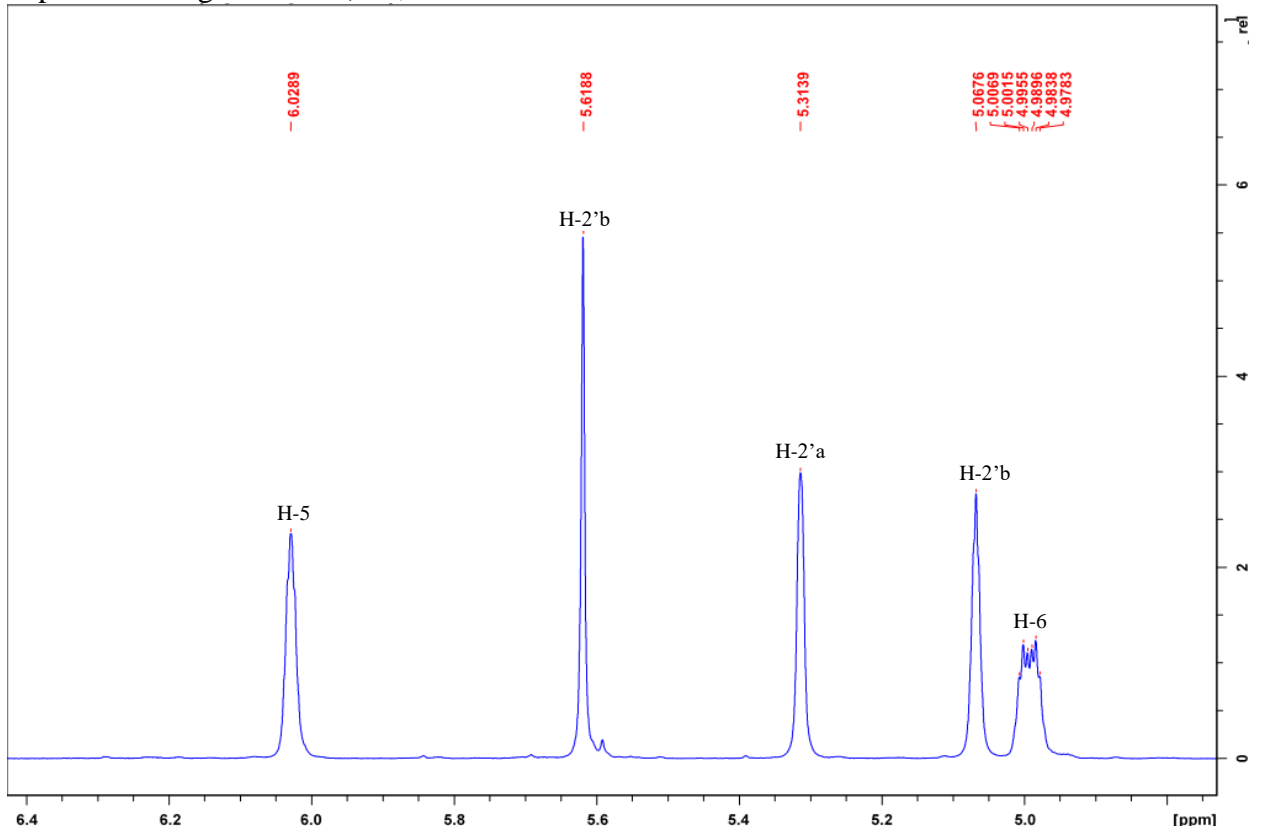
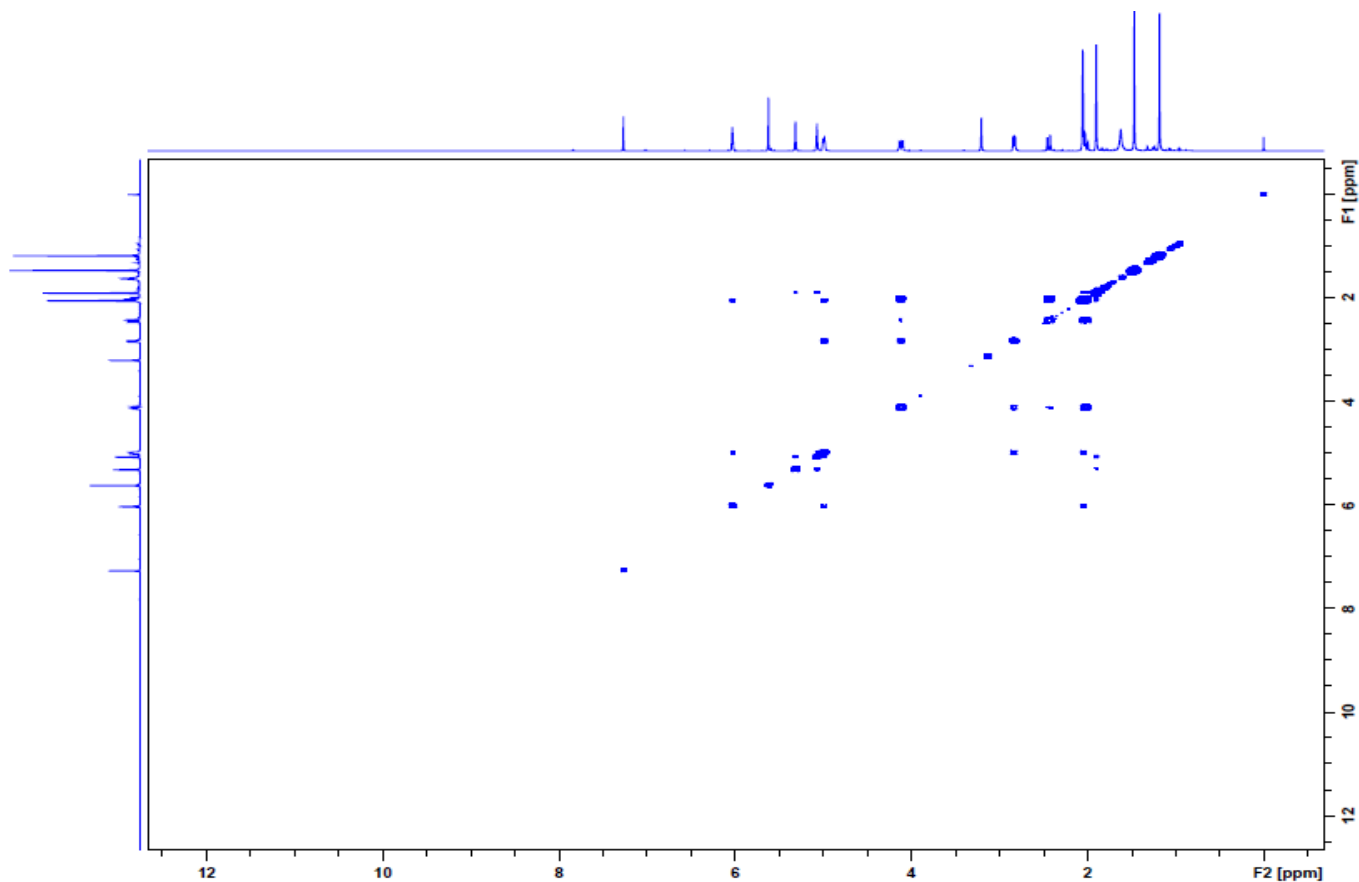


Figura 1.8: Espectro COSY ^1H - ^1H da eremantolida C purificada (CDCl_3 , 400 MHz).



O espectro de RMN de ^1H da eremantolida C purificada apresentou cinco simpletos. O primeiro deles com deslocamento em δ 5,61 (Figura 1.4 e 1.7), integrado para um hidrogênio, que foi atribuído a H-2, presente no sistema furanona, devido este estar localizado em um região de alta frequência frente aos demais e, portanto, ser considerado fortemente desblindado (efeito resultante da presença de um campo magnético induzido pela circulação de elétrons em torno do núcleo. Quanto menor a densidade de elétrons, mais desblindado está o hidrogênio). Além disso, não apresenta acoplamento com outros hidrogênios presentes na molécula (Figura 1.8).

Dentre os quatro simpletos restantes, três foram atribuídos a H-13 (δ 1,18), H-14 (δ 1,47) e H-3' (δ 1,90), todos integrados para três hidrogênios (Figura 1.4), que não apresentam acoplamentos com quaisquer outros hidrogênios pertencentes à molécula (Figura 1.8), sendo atribuídos portanto, aos grupos metila encontrados na eremantolida C.

Por fim, o simpleto em δ 3,21 foi atribuído ao grupo OH (Figura 1.4). Dependendo da concentração, o sinal da hidroxila em álcoois é encontrado entre δ 0,50 e 4,00. Mudanças de temperatura e solvente, além da formação de ligações de hidrogênio, também afetam o deslocamento químico. A formação de ligações de hidrogênio diminui a densidade eletrônica

ao redor do hidrogênio e, assim, promove o deslocamento para regiões de frequência mais elevadas (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 1.4) foram identificados dois simpletos largos. O primeiro em δ 2,05 atribuído a H-15. E, o segundo, em δ 5,31, atribuído a H-2'a, que em conjunto com o tripleto em δ 5,07 atribuído a H-2'b ($J = 1,7$ Hz) e o simpleto em δ 1,90 referente a H-3', indicaram a presença de um grupo isopropenila na molécula.

Ainda na Figura 1.4 foram identificados dupletos duplos, um deles em δ 2,82, atribuído a H-7, o qual apresentou acoplamentos com H-8 e H-6, com constante de 4,2 Hz e 7,0 Hz, respectivamente. O segundo, em δ 2,42-2,46, atribuído a H-9a ($J_{\text{H}8,9a} = 2,6$ Hz e $J_{\text{H}9a,9b} = 13,7$ Hz) e o terceiro em δ 2,02, atribuído a H-9b ($J_{\text{H}8,9b} = 11,8$ Hz e $J_{\text{H}9a,9b} = 13,7$ Hz). Diante disso, o duplo duplo duplo identificado em δ 4,09-4,14 foi atribuído a H-8 ($J = 2,6; 4,2; 11,8$ Hz).

Os multipletos em δ 4,98-5,01 e em δ 6,03, ambos integrados para um hidrogênio cada, foram atribuídos a H-6 e H-5, respectivamente. Estes multipletos são resultantes de acoplamentos entre H-6 com H-5, H-7 e H-13 e de H-5 com H-6, H-7 e H-13.

Os dados obtidos a partir dos espectros de RMN de ^1H da eremantolida C purificada, bem como, a comparação com os dados relatados na literatura, estão descritos na Tabela 1.9.

Tabela 1.9: Dados de deslocamento químico (δ) e constantes de acoplamento, J (Hz) obtidos a partir do espectro de RMN de ^1H da eremantolida C purificada (CDCl_3 , 400 MHz) e da eremantolida C obtida por Le Quesne e colaboradores (1978) (CDCl_3 , 300 MHz).

Hidrogênio	Dados encontrados δ (ppm)	Dados da literatura δ (ppm)
<i>H-2</i>	5,61; s	5,60; s
<i>H-5</i>	6,03; m	6,03; m
<i>H-6</i>	4,98-5,01; m	4,98; m
<i>H-7</i>	2,82; dd (4,2; 7,0)	2,83; dd
<i>H-8</i>	4,09-4,14; ddd (2,6; 4,2; 11,8)	4,12; ddd
<i>H-9a</i>	2,42-2,46; dd (2,6; 13,7)	2,43; dd
<i>H-9b</i>	2,02; dd (11,8; 13,7)	2,03; dd
<i>H-13</i>	1,18; s	1,35; s
<i>H-14</i>	1,47; s	1,45; s
<i>H-15</i>	2,05; sl	2,00; sl
<i>H-2'a</i>	5,31; sl	5,31; sl
<i>H-2'b</i>	5,07; t (1,7 Hz)	5,07; t
<i>H-3'</i>	1,90; s	1,90; s
<i>OH</i>	3,21; s	3,80; s

Com relação ao espectro de RMN de ^{13}C , deslocamentos químicos estão relacionados principalmente com a hibridação e com a eletronegatividade dos substituintes (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006). Diante disso, no caso específico da eremantolida C, carbonos

que apresentam ligações com oxigênio, bem como, aqueles que apresentam hibridização (sp^2), demonstram maiores deslocamentos químicos.

Nas Figuras 1.9, 1.10 e 1.11 estão demonstrados, respectivamente, o espectro de RMN de ^{13}C , o subspectro DEPT e o espectro HSQC obtidos para a eremantolida C purificada. Os espectros, bem como, os dados obtidos a partir das interpretações dos espectros de RMN de ^1H , foram analisados em conjunto para uma melhor interpretação e correta identificação da substância.

Figura 1.9: Espectro de RMN de ^{13}C da eremantolida C purificada (CDCl_3 , 100 MHz).

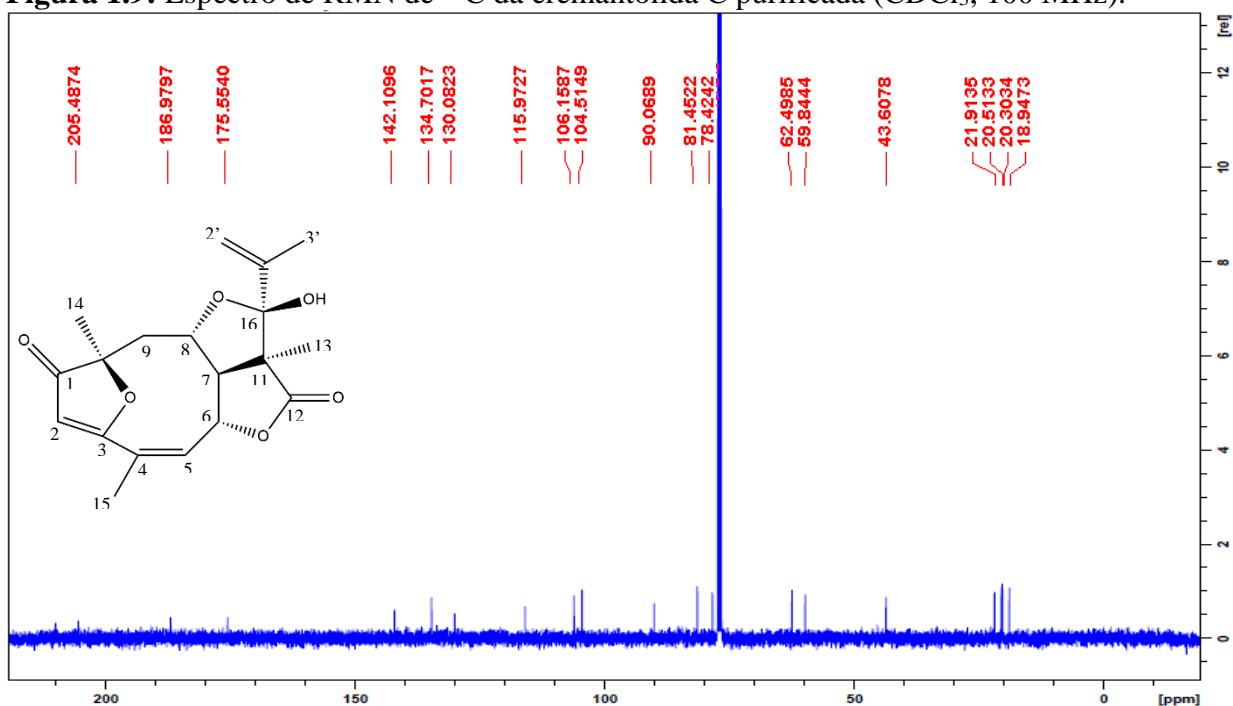


Figura 1.10: Subspectro DEPT da eremantolida C purificada (CDCl_3 , 100 MHz).

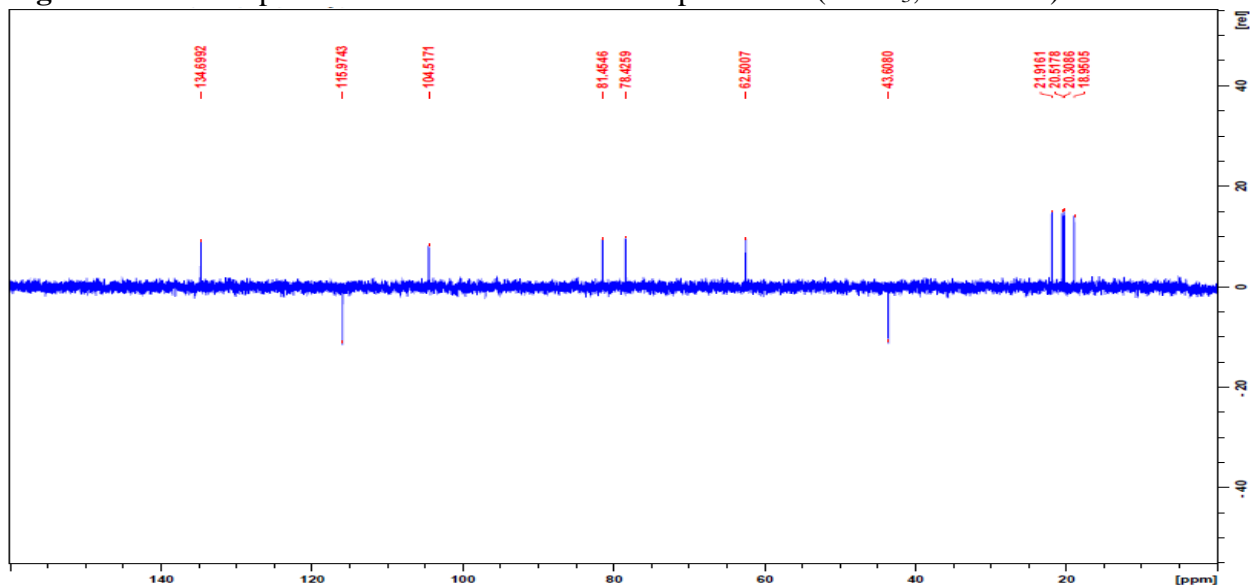
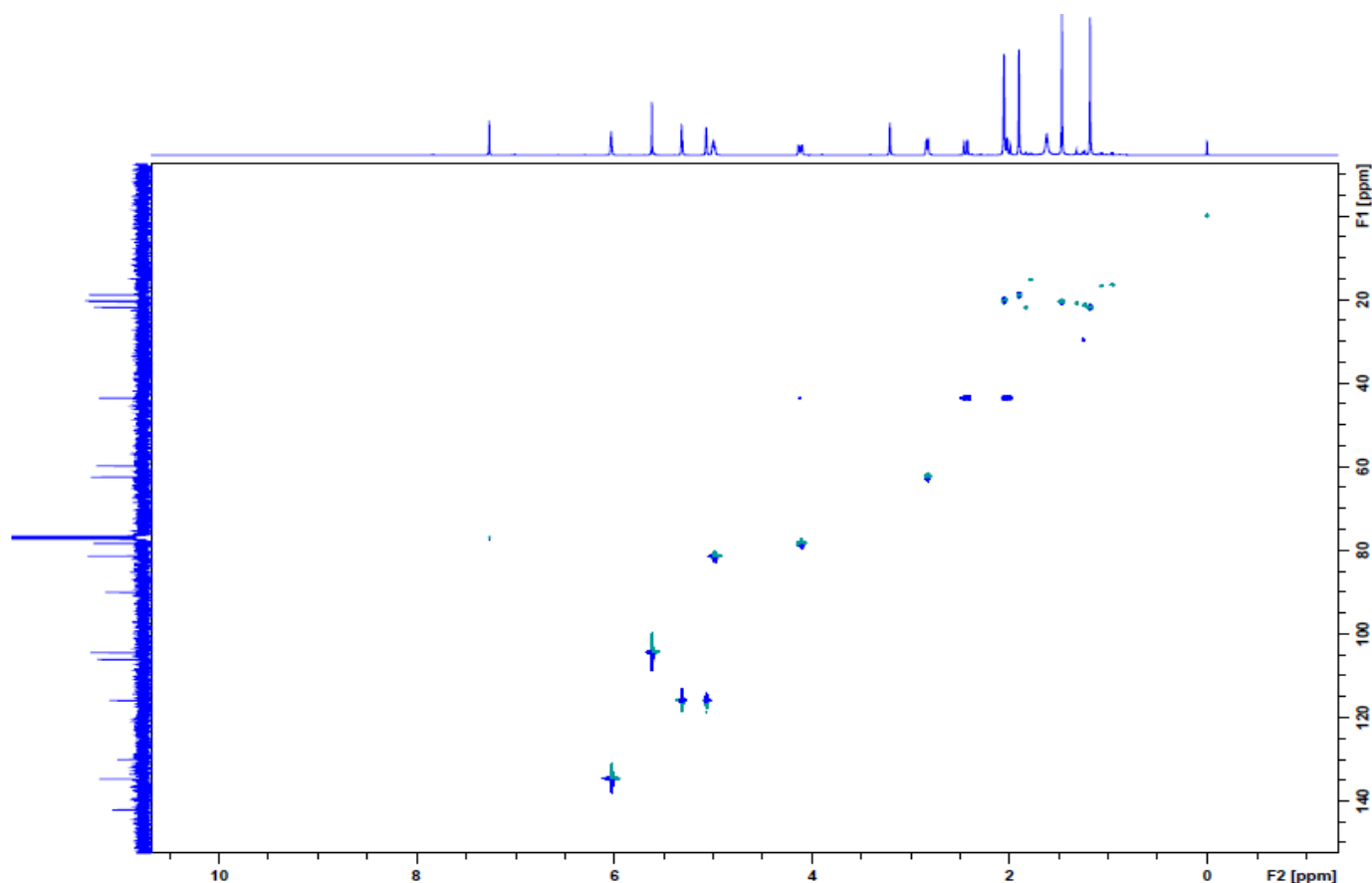


Figura 1.11: Espectro HSQC da eremantolida C purificada (CDCl₃, 400 MHz).



Os sinais em δ 205,49, δ 104,51 e δ 186,98 foram atribuídos aos carbonos C-1 (C=O), C-2 (=CH) e C-3 (=C-O), respectivamente, presentes no grupo furanona (SAÚDE *et al.*, 1998).

O subspectro de DEPT (intensificação da distorção por transferência de polarização) permite a determinação do número de hidrogênios diretamente ligados a um átomo de ¹³C, uma vez que, os sinais equivalentes a CH e CH₃ estão voltados para cima e aqueles correspondentes a CH₂, para baixo (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006). Conforme demonstrado na Figura 1.10, há dois grupamentos CH₂ na molécula de eremantolida C, um apresentando deslocamento químico em δ 115,97 correspondente a C-2', e o outro em δ 43,60 referente a C-9.

Em geral, no subspectro de DEPT, carbonos metínicos (CH) encontram-se em regiões de mais alta frequência quando comparados com carbonos metílicos (CH₃). Conforme indicado na Figura 1.10, a eremantolida C apresenta cinco carbonos metínicos e quatro carbonos metílicos.

Ademais o espectro de HSQC (correlação heteronuclear de quantum simples) foi fundamental para a elucidação estrutural da eremantolida C obtida, uma vez que, foi possível correlacionar as ligações entre carbono e hidrogênio.

Os dados obtidos a partir dos espectros de RMN de ^{13}C da eremantolida C purificada, bem como, a comparação com os dados relatados na literatura, estão descritos na Tabela 1.10.

Tabela 1.10: Dados de deslocamento químico (δ) obtidos a partir do espectro de RMN de ^{13}C da eremantolida C purificada (CDCl_3 , 100 MHz) e da eremantolida C obtida por Saúde e colaboradores (1998) (CDCl_3 , 300 MHz).

Carbono	Dados encontrados δ (ppm)	Dados da literatura δ (ppm)
<i>C-1</i>	205,49	205,89
<i>C-2</i>	104,51	106,09
<i>C-3</i>	186,98	187,98
<i>C-4</i>	130,08	142,22
<i>C-5</i>	134,70	134,77
<i>C-6</i>	81,45	81,46
<i>C-7</i>	62,50	52,88
<i>C-8</i>	78,42	78,37
<i>C-9</i>	43,60	43,46
<i>C-10</i>	90,07	90,24
<i>C-11</i>	59,84	62,53
<i>C-12</i>	175,55	175,72
<i>C-13</i>	21,91	21,94
<i>C-14</i>	20,51	20,48
<i>C-15</i>	20,30	20,30
<i>C-16</i>	106,16	104,54
<i>C-1'</i>	142,10	130,00
<i>C-2'</i>	115,97	115,80
<i>C-3'</i>	18,95	19,00

O grau de pureza da eremantolida C foi analisado por cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos (CLAE/DAD), utilizando solução da substância em metanol à concentração de 0,5 mg/mL.

As condições cromatográficas empregadas para tal teste e demais análises realizadas ao longo de todo o trabalho foram as propostas por Caldeira e colaboradores (2017) para quantificação da eremantolida C em meios tamponados (Quadro 1.2).

Quadro 1.2: Condições cromatográficas utilizadas para avaliação da pureza da eremantolida C, bem como para sua quantificação em meios tamponados (CALDEIRA *et al.*, 2017).

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

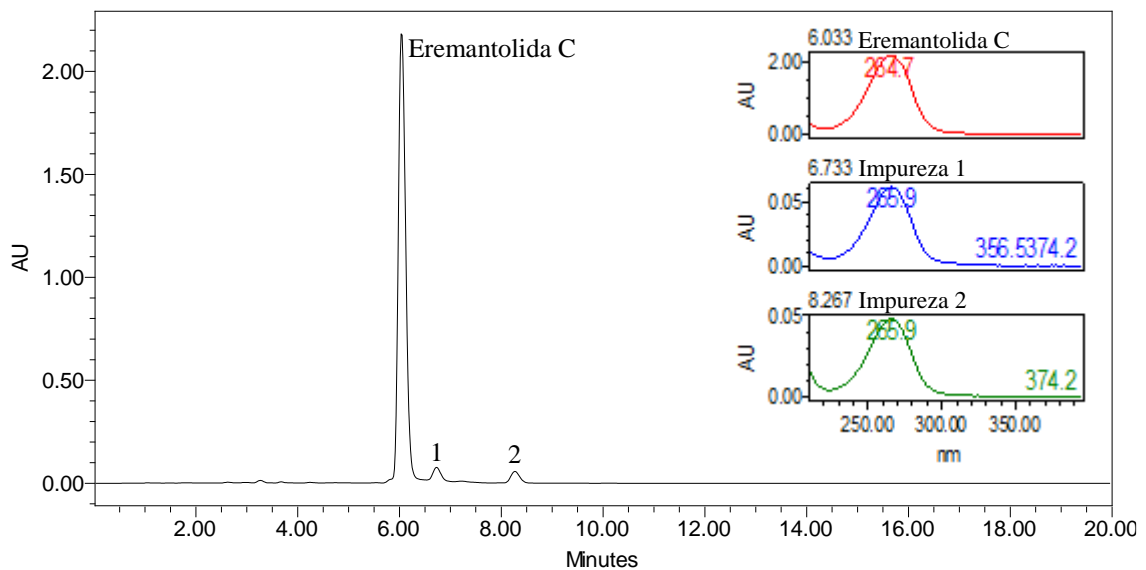
A eremantolida C, conforme demonstrado na Figura 1.12, apresentou tempo de retenção de 6,0 minutos com grau de pureza de 89,9 %.

A resolução, que mede a distância entre dois picos, sendo que quanto maior o seu valor, maior a distância entre os picos, foi calculada entre a eremantolida C e os dois picos de impurezas indicados pelos números 1 e 2 no cromatograma.

Para o pico 1 foi obtida resolução igual a 2,0, enquanto para o pico 2 foi obtida resolução igual a 6,0. Ambas as resoluções foram calculadas tomando como base o pico referente à eremantolida C.

Além disso, foi realizada a análise de pureza do pico correspondente à eremantolida C, e, observou-se um ângulo de pureza (1,009) inferior ao ângulo limite (1,328), indicando que não há qualquer coeluição com a eremantolida C no tempo de retenção de 6,0 minutos.

Figura 1.12: Cromatograma obtido para avaliação do grau de pureza da eremantolida C purificada.



Dessa forma, a quantificação da eremantolida C pode ser realizada de forma eficaz, sem qualquer interferência presente no material purificado, pelo método analítico proposto.

1.3.2 Avaliação da solubilidade da eremantolida C

1.3.2.1 Validação parcial 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) visando o estudo de dissolução intrínseca

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

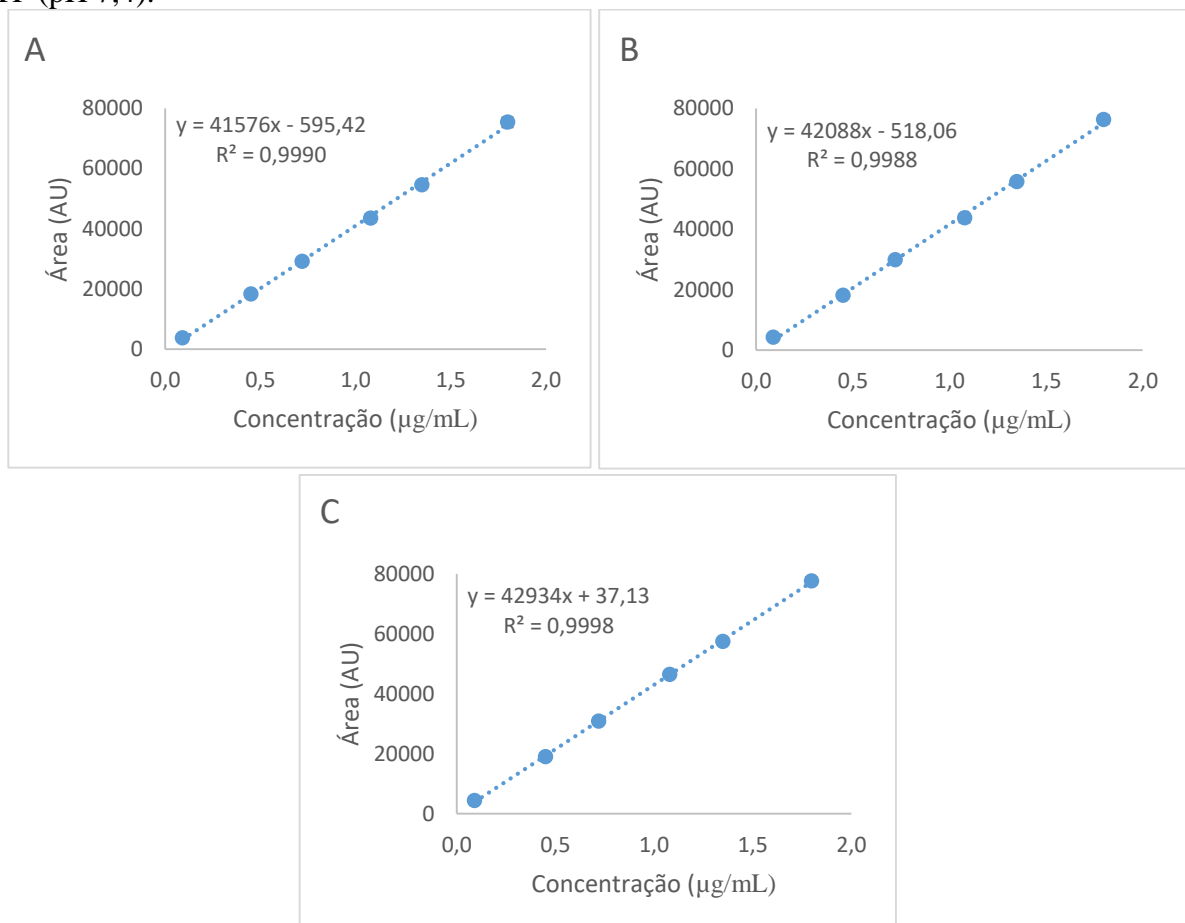
proposto. Sendo assim, para a validação do método analítico para quantificação da eremantolida C no TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) foram avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, precisão, exatidão e limites de detecção e quantificação.

1.3.2.1.1 Linearidade

A linearidade demonstra a capacidade de um método analítico gerar resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra, dentro de uma faixa de trabalho pré-determinada. Análises estatísticas e matemáticas, adotando um nível de significância de 5,0 %, devem ser realizadas de modo que o coeficiente de correlação (R) obtido seja superior a 0,9900 e o coeficiente angular, significativamente diferente de zero (BRASIL, 2017).

Na Figura 1.13 estão demonstradas as curvas analíticas médias obtidas a partir da análise da eremantolida C nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).

Figura 1.13: Curvas analíticas médias (n=3) obtidas para a avaliação da linearidade do método analítico para quantificação da eremantolida C em: (A) TA (pH 4,5); (B) FISSE (pH 6,8) e (C) TF (pH 7,4).



O método analítico para a quantificação da eremantolida C demonstrou linearidade dentro da faixa de trabalho de 0,09 a 1,80 µg/mL para os três meios tamponadas avaliados, pois apresentou coeficientes de correlação (R) e determinação (R²) superiores a 0,9900, e coeficientes angulares significativamente diferente de zero ($p < 0,0001$), conforme dados compilados na Tabela 1.11.

Tabela 1.11: Parâmetros de linearidade do método para quantificação da eremantolida C nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) (n=3).

Parâmetro	TA (pH 4,5)	FISSE (pH 6,8)	TF (pH 7,4)
<i>Linear</i>	-595,42 ± 227,35	-518,06 ± 310,76	37,13 ± 147,42
<i>Angular</i>	41576 ± 1001,71	42088 ± 676,28	42934 ± 724,23
<i>R</i>	0,9995	0,9994	0,9999
<i>R²</i>	0,9990	0,9988	0,9998

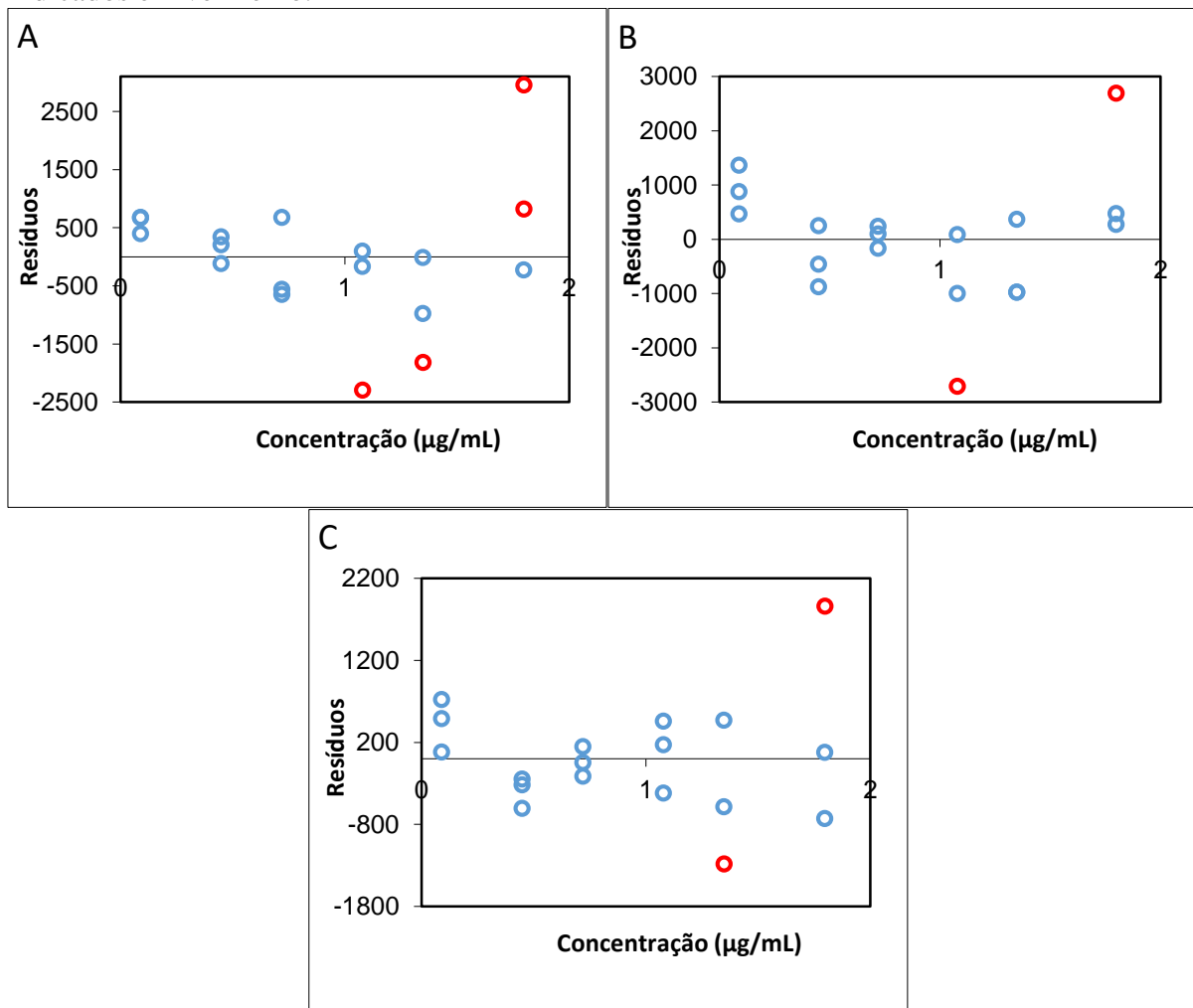
Além disso, foi realizada a análise estatística dos resíduos da regressão linear, bem como a análise das premissas relativas à regressão, a fim de posteriormente, verificar a adequação do ajuste ao modelo linear por meio da avaliação da significância da regressão e do desvio de linearidade, utilizando ANOVA.

A análise dos resíduos foi conduzida por meio do teste de resíduos padronizados *Jacknife*, com o intuito de verificar a presença de valores extremos ou discrepantes, denominados *outliers*. Valores extremos são definidos como observações de uma amostra tão separadas das demais que sugerem que possam pertencer a uma população diferente ou serem resultados provenientes de erros na medição, ou seja, são pontos discrepantes pertencentes à curva analítica que afetam diretamente a estimativa dos parâmetros da equação gerada (BURKE, 2001; SOUZA *et al.*, 2007).

Foram detectados quatro valores discrepantes (*outliers*) durante a análise dos resíduos da regressão linear para quantificação da eremantolida C no TA (pH 4,5), enquanto para os demais meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) foram detectados dois *outliers*, cumprindo portanto, com o limite de exclusão máximo de 22,2 % do total de valores originais e demonstrando que a distribuição e a qualidade dos dados estão adequadas ao objetivo proposto (BURKE, 2001; SOUZA *et al.*, 2007).

Os gráficos de resíduos obtidos após o tratamento de outliers, para os três meios tamponados, estão representados na Figura 1.14.

Figura 1.14: Gráficos de resíduos da regressão linear do método analítico para quantificação da eremantolida C em: (A) TA (pH 4,5); (B) FISSE (pH 6,8) e (C) TF (pH 7,4). *Outliers* estão indicados em vermelho.



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

- normalidade: avaliada de acordo com o teste de *Ryan-Joiner*, no qual é verificado se os resíduos seguem uma distribuição normal;
- homocedasticidade: avaliada pelo teste de *Brown-Forsythe* (ou *Levene* modificado), no qual é verificado se a variância dos resíduos da regressão não diferem entre si, ou seja, se apresentam uma variância constante;
- independência: avaliada pelo teste de *Durbin-Watson*, no qual é analisada a presença de autocorrelação entre os resíduos.

Após a avaliação das premissas, a significância da regressão, bem como o desvio da linearidade, foram analisados a partir do Teste F (ANOVA). Os resultados obtidos para os três

meios tamponados, adotando um nível de significância de 5,0 %, foram compilados na Tabela 1.12.

Tabela 1.12: Valores encontrados para as premissas dos resíduos da regressão linear, significância da regressão e desvio da linearidade, provenientes das curvas analíticas obtidas para os meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).

Parâmetro	TA (pH 4,5)	FISSE (pH 6,8)	TF (pH 7,4)
<u>Normalidade</u>			
<i>Valor encontrado</i>	0,9567	0,9767	0,9771
<i>Valor de referência</i>	Maior que 0,9351	Maior que 0,9411	Maior que 0,9411
<u>Homocedasticidade</u>			
<i>Valor encontrado</i>	0,3500	1,070	0,7930
<i>Valor de referência</i>	Menor que 2,179	Menor que 2,145	Menor que 2,145
<u>Independência</u>			
<i>Valor encontrado</i>	2,6579	1,6334	1,9825
<i>Valor de referência</i>	Entre 1,2517 e 2,7483	Entre 1,3701 e 2,6299	Entre 1,3701 e 2,6299
<u>Significância da regressão*</u>			
<i>F calculado</i>	32637,47	18224,27	46516,61
<i>F crítico</i>	4,7472	4,6001	4,6001
<u>Desvio da linearidade**</u>			
<i>F calculado</i>	0,5300	3,0740	1,4790
<i>F crítico</i>	3,8379	3,4781	3,4781

**F calculado* deve ser maior que *F crítico*.

** *F calculado* deve ser menor que *F crítico*.

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 de concentração compreendido entre 0,09 e 1,80 µg/mL, foi considerado linear, uma vez que, cumpriu com todos os requisitos necessários.

1.3.2.1.2 Precisão

A precisão avalia a proximidade entre os resultados obtidos por meio de testes com amostras preparadas conforme descrito no método analítico (BRASIL, 2017), e foi realizada em dois níveis: intradia (repetibilidade) e interdia (precisão intermediária).

Foram obtidas 9 determinações para a avaliação da precisão intradia e 27 determinações para a interdia, devido ter sido realizada em três dias diferentes.

Os valores de desvio padrão relativo (DPR%) para os meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) estão listados na Tabela 1.13.

Tabela 1.13: Precisão intradia (n=3) e interdia (n=9) do método analítico para quantificação da eremantolida C meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental média (µg/mL) (n=3)	Precisão (DPR%) Intradia	Concentração experimental média (µg/mL) (n=9)	Precisão (DPR%) Interdia
TA (pH 4,5)				
0,45	0,45	1,25	0,44	1,65
1,08	1,06	2,97	1,07	2,74
1,80	1,83	2,14	1,82	2,16
FISSE (pH 6,8)				
0,45	0,44	3,08	0,45	2,39
1,08	1,05	3,18	1,06	1,92
1,80	1,83	1,75	1,82	1,70
TF (pH 7,4)				
0,45	0,44	1,00	0,45	1,80
1,08	1,08	0,96	1,07	1,95
1,80	1,81	1,71	1,81	1,99

De acordo com a resolução RDC n° 166, de 24 de julho de 2017 da Anvisa, os critérios de aceitação para a precisão devem ser definidos baseados no objetivo e variabilidade intrínseca do método, bem como, na concentração de trabalho e do analito na amostra (BRASIL, 2017).

Nesses casos, segundo Taverniers; Loose e Bockstaele (2004), uma precisão mínima de 5,0 % deve ser requerida como critério de adequação e desempenho do método analítico à finalidade proposta (TAVERNIERS; LOOSE; BOCKSTAELE, 2004).

Considerando isso, o método analítico para a quantificação da eremantolida C, nos três meios tamponados, foi considerado preciso, uma vez que, os valores de DPR% encontrados tanto para a precisão intradia quanto para a interdia, para os três meios tamponados, foram inferiores a 5,0 %.

1.3.2.1.3 Exatidão

A exatidão de um método analítico representa o grau de concordância entre os resultados obtidos pelo método analítico, em relação a um valor aceito como verdadeiro (BRASIL, 2017).

A relação entre os valores obtidos para a concentração média experimental e as concentrações teóricas foi avaliada em três níveis: baixo, médio e alto, de forma que o intervalo proposto para a quantificação da eremantolida C fosse contemplado.

Na Tabela 1.14 estão compilados os valores encontrados para a exatidão do método analítico para quantificação da eremantolida C nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).

Tabela 1.14: Exatidão (%) do método analítico para quantificação da eremantolida C nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) (n=3).

Meio tamponado	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental média ($\mu\text{g/mL}$) (n=3)	Exatidão (%)
TA (pH 4,5)	0,45	0,45	100,75
	1,08	1,06	98,24
	1,80	1,83	101,58
FISSE (pH 6,8)	0,45	0,44	98,07
	1,08	1,05	97,34
	1,80	1,83	101,51
TF (pH 7,4)	0,45	0,44	97,96
	1,08	1,08	100,15
	1,80	1,81	100,52

Assim como para a precisão, os critérios de aceitação para a exatidão devem ser definidos baseados no objetivo e variabilidade intrínseca do método, bem como, na concentração de trabalho e do analito na amostra (BRASIL, 2017).

De acordo com Kumar e colaboradores (2012), os quais desenvolveram e validaram um método analítico para a quantificação do cloridrato de duloxetina, em meios tamponados, proveniente da realização de estudos de dissolução, um método é considerado exato, quando apresenta valores de exatidão compreendidos entre 95,0 e 105,0 % (KUMAR *et al.*, 2012).

Considerando isso, o método analítico para quantificação da eremantolida C, nos meios tamponados, foi considerado exato, uma vez que os valores obtidos para a exatidão se mantiveram dentro do intervalo limite de 95,0 a 105,0 % (KUMAR *et al.*, 2012).

1.3.2.1.4 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor concentração de substância que pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada, enquanto, o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade de analito que pode ser determinada com precisão e exatidão sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2017).

Os limites de detecção e quantificação já haviam sido estabelecidos por Caldeira (2017), entretanto, como foi contemplado um novo intervalo para quantificação da eremantolida C nos meios tamponados e segundo a RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, os limites devem ser calculados de acordo com a faixa de trabalho utilizada (BRASIL, 2017), novas determinações foram realizadas.

Os limites de detecção e quantificação calculados para os três meios tamponados, adotando o intervalo de quantificação que varia de 0,09 a 1,80 $\mu\text{g/mL}$, estão listados na Tabela 1.15.

Tabela 1.15: Limites de detecção e quantificação calculados para o método analítico para quantificação da eremantolida C nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).

Meio tamponado	LD ($\mu\text{g/mL}$)	LQ ($\mu\text{g/mL}$)
TA (pH 4,5)	0,02	0,05
FISSE (pH 6,8)	0,02	0,07
TF (pH 7,4)	0,01	0,03

Os valores encontrados para ambos os limites, nos três meios, indicam que o intervalo proposto para quantificação da eremantolida C é coerente, uma vez que o menor ponto da curva analítica (0,09 $\mu\text{g/mL}$) é superior ao limite de quantificação do método, dessa forma, todos os pontos da curva são quantificados com precisão e exatidão.

1.3.2.2 Padronização do método de dissolução intrínseca para a avaliação da solubilidade da eremantolida C

A velocidade de dissolução intrínseca (VDI) é influenciada por vários fatores internos e externos. Os fatores internos estão relacionados às propriedades do estado sólido do fármaco ou substância biologicamente ativa, e os fatores externos estão relacionados às condições hidrodinâmicas, tais como, composição e volume do meio de dissolução e velocidade de rotação (ISSA; FERRAZ, 2011; TSENG; PATEL; ZHAO, 2014).

Para a determinação da velocidade de dissolução intrínseca, o ideal é a obtenção de pelo menos 5 pontos de amostragem que apresentem relação linear, com um coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,95 (YU *et al.*, 2004; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2009; TSENG; PATEL; ZHAO, 2014). Como foram coletadas, cerca de 16 amostras para cada condição de padronização da técnica, a VDI foi calculada ao longo de toda a curva obtida. Além disso, o cálculo também foi realizado, na maioria dos casos, utilizando-se 5 pontos iniciais de coleta, bem como 5 pontos medianos e 5 pontos finais, com o intuito de analisar se diferentes porções dos perfis obtidos ocasionariam em diferentes classificações biofarmacêuticas da eremantolida C.

A padronização do método de dissolução intrínseca para a avaliação da solubilidade da eremantolida C foi realizada avaliando-se as seguintes variáveis: volume de meio, velocidade de rotação e tempo total do experimento, uma vez que, na literatura há relatos que os parâmetros quantidade de amostra, força e tempo de compressão não influenciam na determinação da velocidade de dissolução intrínseca tanto para substâncias altamente solúveis quanto para aquelas que apresentam baixa solubilidade (YU *et al.*, 2004; TSENG; PATEL; ZHAO, 2014).

A quantidade de amostra utilizada, nos estudos de dissolução intrínseca, varia entre 100,0 e 700,0 mg e está diretamente relacionada com o tamanho da matriz empregada para

formação do compacto, o qual, elimina a influência do tamanho das partículas e da molhabilidade sobre o comportamento de dissolução (BERGER *et al.*, 2007; HULSE; GRAY; FORBES, 2012; ZHOU *et al.*, 2014; ALSENZ *et al.*, 2016).

A determinação da VDI é uma medida de velocidade em vez de uma medida absoluta da solubilidade, sendo assim, a área superficial a partir da qual a dissolução ocorre deve ser conhecida e permanecer constante. Isto é conseguido comprimindo a amostra pura numa matriz contendo um orifício de diâmetro conhecido para produzir um disco com área superficial conhecida que não se desintegrará no meio de dissolução (YU *et al.*, 2004).

Diante disso, visando a utilização da menor quantidade possível de substância optou-se pela compressão de 100,0 mg de eremantolida C. Um compacto não desintegrável foi formado e permaneceu íntegro ao longo de todo o experimento, viabilizando portanto, o montante de amostra estabelecido para os estudos de dissolução intrínseca.

A força de compressão utilizada, também depende do diâmetro da matriz. Em geral, quanto maior o diâmetro, maior a força de compressão necessária para manter a dureza do compacto constante. No entanto, foi descrito que valores de força de compressão muito altos, por vezes, resultam em compactos frágeis que se fragmentam no meio de dissolução (YU *et al.*, 2004).

Na Farmacopeia Americana 40ª Edição é preconizado que a compressão seja realizada sob a força de 15 MPa durante 1 minuto, entretanto, condições de compressão alternativas podem ser empregadas de forma que, para uma determinada substância, a preparação do compacto, uma vez otimizada, deve ser padronizada para facilitar a comparação de diferentes amostras da mesma substância (UNITED STATES, 2017).

Na literatura estão descritas forças de 1 e 2 toneladas (195 e 390 MPa, respectivamente) e 600 a 5000 psi (4,13 a 34,42 MPa). Considerando isso, adotou-se a força de 1 tonelada para a compressão, devido esta ser a menor força a ser aplicada com precisão utilizando-se a prensa hidráulica disponível, durante 1 minuto, conforme estabelecido pela Farmacopeia Americana 40ª Edição (2017) e dados descritos na literatura (YU *et al.*, 2004; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2012; DEZANI *et al.*, 2013).

Os volumes de meio de 900 e 500 mL foram avaliados utilizando-se 100,0 mg de eremantolida C, comprimidas sob 1 tonelada durante 1 minuto, a 37,0 °C sob velocidade de 100 rpm. Amostras foram coletadas a cada 30 minutos durante 8 horas. Os resultados obtidos para a determinação da velocidade de dissolução intrínseca (VDI) da eremantolida C utilizando 900 mL e 500 mL de meio estão apresentados nas Figuras 1.15 e 1.16, respectivamente.

Figura 1.15: Determinação da VDI da eremantolida C no meio FISSE (pH 6,8) a 37,0 °C e 100 rpm, utilizando 900 mL de meio. Em azul, vermelho e verde estão representados, respectivamente, as ampliações da parte inicial, mediana e final do gráfico obtido.

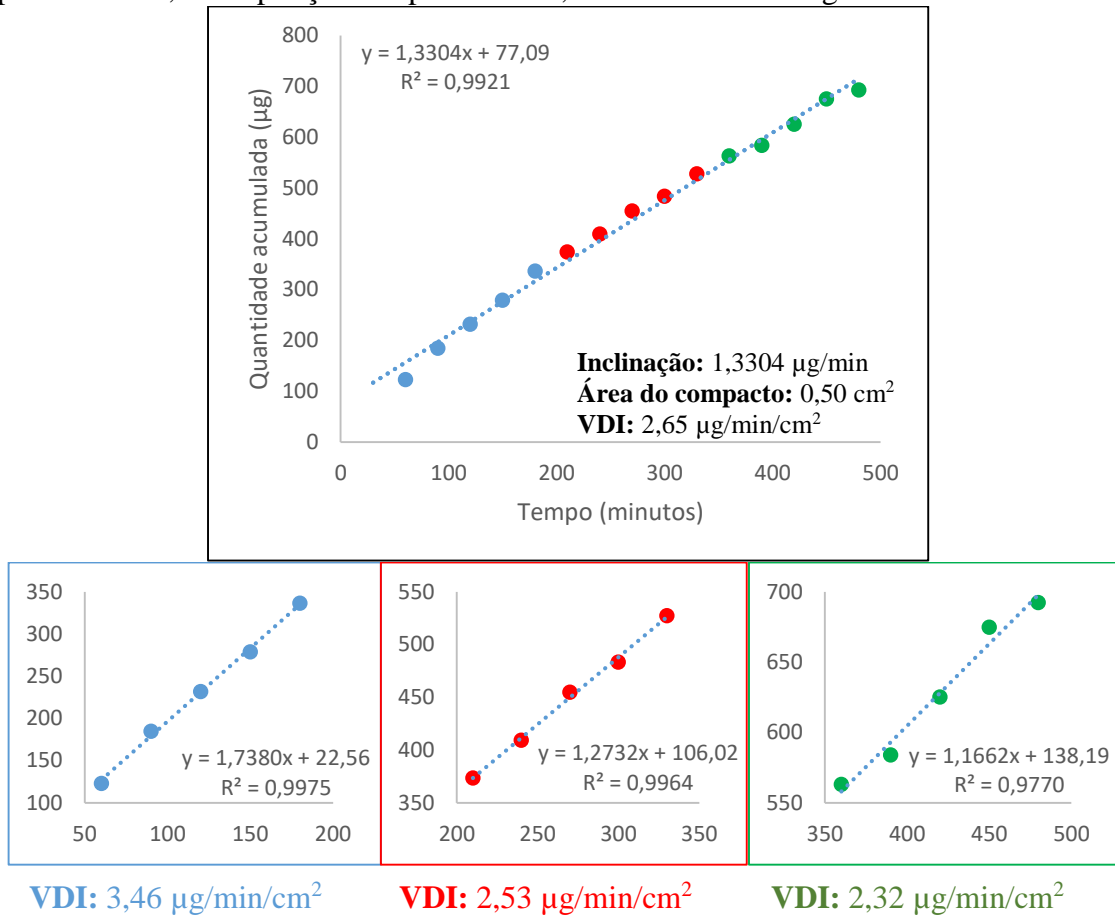
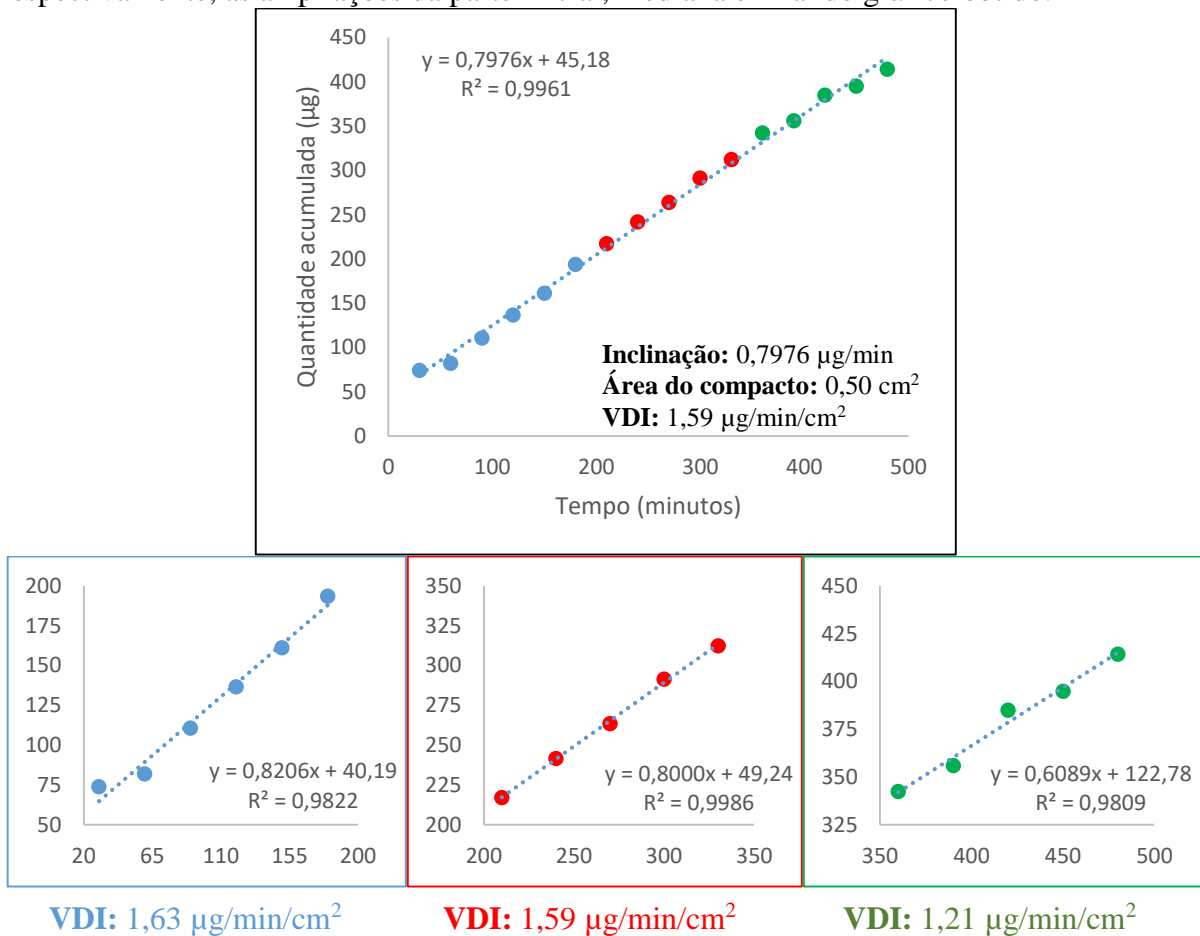


Figura 1.16: Determinação da VDI da eremantolida C no meio FISSE (pH 6,8) a 37,0 °C e 100 rpm, utilizando 500 mL de meio. Em azul, vermelho e verde estão representados, respectivamente, as ampliações da parte inicial, mediana e final do gráfico obtido.



Após análise estatística, utilizando o teste *t-Student*, verificou-se que os valores de VDI da eremantolida C empregando 900 mL e 500 mL apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

De acordo com Yu e colaboradores (2004), o método de dissolução intrínseca apresenta robustez e o volume do meio de dissolução, em geral, não exerce efeitos significativos na determinação da velocidade de dissolução intrínseca. Entretanto, por ser uma substância de baixa solubilidade em meios tamponados, a eremantolida C não cumpriu com as condições *sink* (condições de não saturação do meio) em ambos os volumes utilizados.

A condição *sink* não é um parâmetro limitante para a dissolução intrínseca, uma vez que, a solubilidade cinética é avaliada, podendo portanto, acarretar apenas no retardo da velocidade de dissolução devido à proximidade de saturação do meio (UNITED STATES, 2017).

Esse retardo de velocidade foi observado ao utilizar 500 mL de meio, devido à menor inclinação apresentada pela curva, ocasionando em uma VDI cerca de 1,5 vezes menor que

quando utilizado o volume de 900 mL. Considerando isso, visando otimizar a determinação da solubilidade pelo método de dissolução intrínseca, optou-se por fazer a análise da VDI da eremantolida C utilizando 900 mL de meio tamponado.

Com relação à velocidade de rotação, na Farmacopeia Americana 40ª Edição (2017) é preconizado o uso de 300 rpm para a avaliação da velocidade de dissolução intrínseca, porém valores dentro da faixa de 60 a 500 rpm são aceitos. A velocidade de dissolução depende da velocidade de rotação utilizada. Sendo que, em geral, o aumento da velocidade de rotação acarreta no aumento da velocidade de dissolução intrínseca. Entretanto, deve-se avaliar este parâmetro cuidadosamente, pois velocidades de agitação excessivas podem criar deformações na área superficial do compacto, ocasionando em resultados não lineares (UNITED STATES, 2017).

Na literatura são relatadas velocidades de agitação que variam de 15 a 250 rpm (YU *et al.*, 2004), no entanto, alguns autores como Yu e colaboradores (2004), Zhang e colaboradores (2012) e Zakeri-Milani e colaboradores (2009), padronizaram a determinação da VDI, utilizando a velocidade de rotação de 100 rpm. Dessa forma, a velocidade de dissolução intrínseca da eremantolida C foi avaliada utilizando-se três velocidades de rotação: uma baixa, 60 rpm (Figura 1.17); uma média, 100 rpm (Figura 1.15) e uma alta, 250 rpm (Figura 1.18).

Figura 1.17: Determinação da velocidade de dissolução intrínseca (VDI) da eremantolida C em 900 mL de meio FISSE (pH 6,8) a 37,0 °C utilizando 60 rpm. Em azul, vermelho e verde estão representados, respectivamente, as ampliações da parte inicial, mediana e final do gráfico obtido.

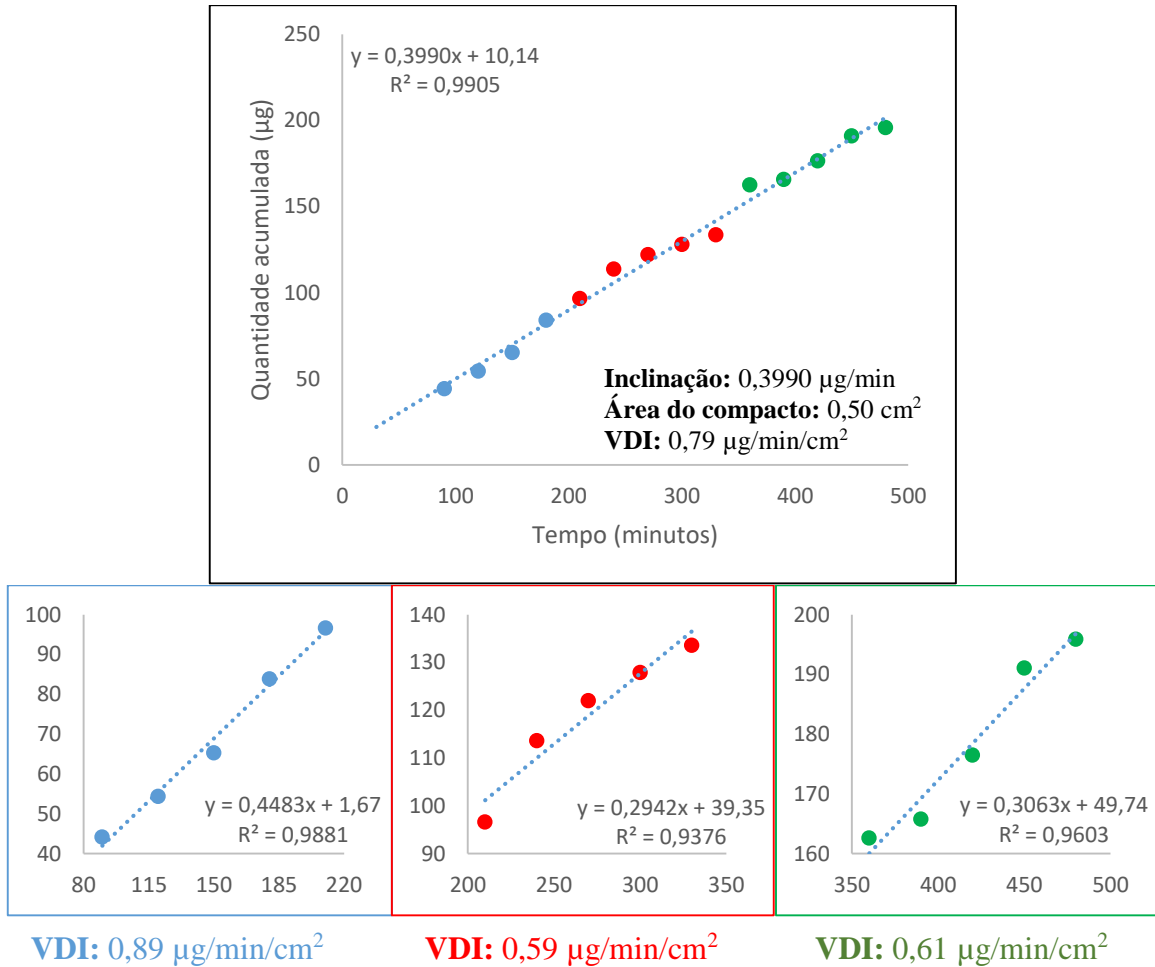
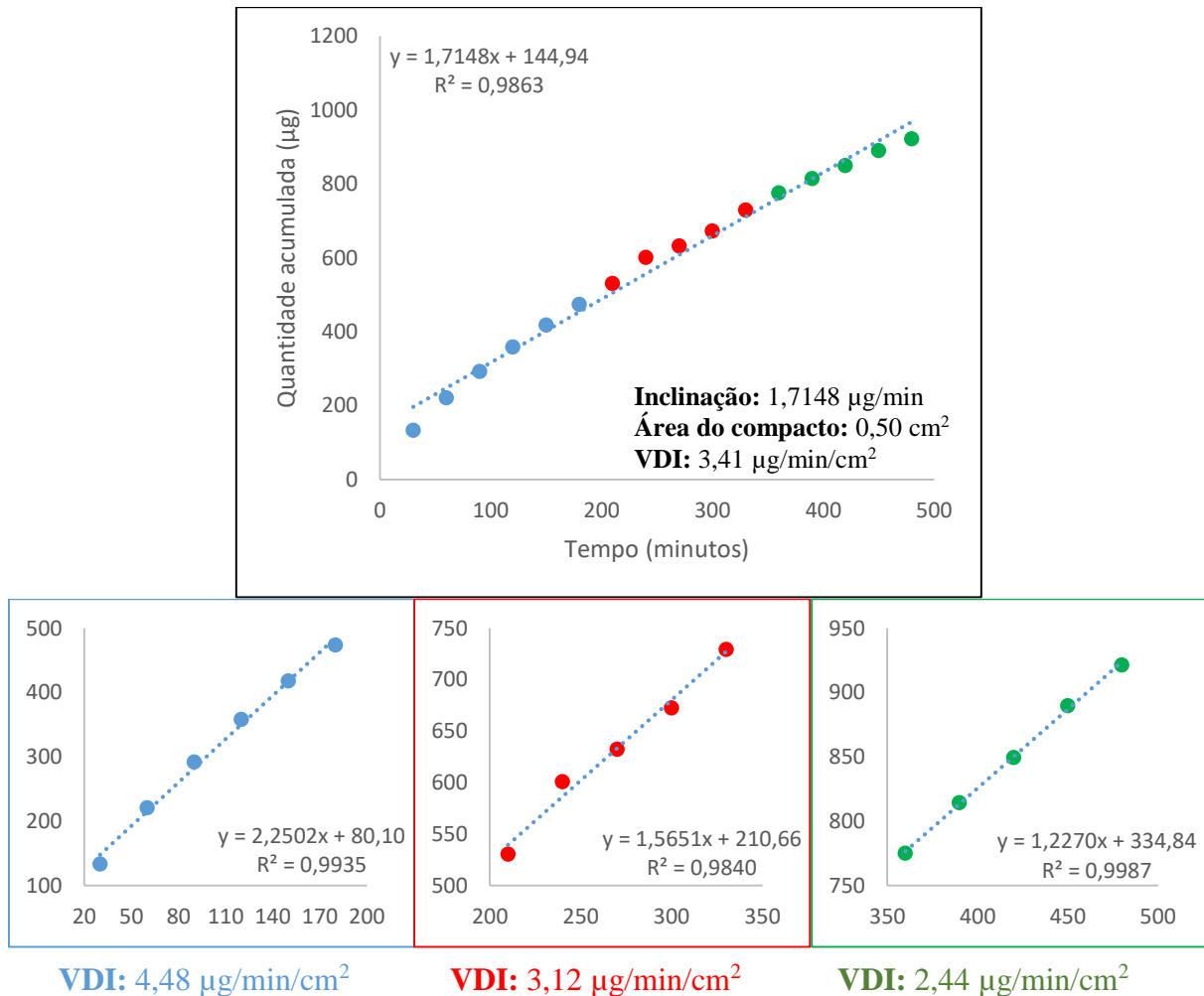


Figura 1.18: Determinação da velocidade de dissolução intrínseca (VDI) da eremantolida C em 900 mL de meio FISSE (pH 6,8) a 37,0 °C utilizando 250 rpm. Em azul, vermelho e verde estão representados, respectivamente, as ampliações da parte inicial, mediana e final do gráfico obtido.



A velocidade de rotação de 250 rpm foi aquela que demonstrou maior inclinação, e consequentemente maior VDI, pois quando a velocidade de agitação aumenta, a velocidade do fluido aumenta e, consequentemente, o cisalhamento na superfície de dissolução aumenta. Como resultado, a camada limite hidrodinâmica e a camada de difusão na superfície diminuem, e a VDI aumenta (TSENG; PATEL; ZHAO, 2014).

Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram observadas quando a velocidade de rotação de 60 rpm foi comparada com 100 e 250 rpm. Entretanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre 100 rpm e 250 rpm. Dessa forma, optou-se por realizar a determinação da velocidade de dissolução intrínseca da eremantolida C utilizando tanto 100 rpm quanto 250 rpm.

Por fim, o tempo total do experimento foi analisado.

Para fármacos pouco solúveis, a velocidade de dissolução intrínseca é, comumente, determinada ao longo de 8 horas, realizando-se coletas de alíquotas a cada 30 minutos (YU *et al.*; 2004; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2012). Entretanto por se tratar de uma substância nova, candidata a fármaco, optou-se por realizar a análise durante 72 horas, que foi o período utilizado para a avaliação da solubilidade em equilíbrio (CALDEIRA *et al.*, 2017) e 24 horas, a fim de avaliar o impacto do tempo na determinação da VDI.

Para tal, foram utilizadas as seguintes condições experimentais: 100,0 mg de eremantolida C, força e tempo de compressão de 1 tonelada e 1 minuto, respectivamente, 900 mL de meio FISSE (pH 6,8) a 37,0 °C sob 100 rpm.

Amostras foram coletadas a cada 30 minutos nas análises durante 8 e 24 horas, sendo este último com coletas a cada 30 minutos durante apenas as 8 primeiras horas e, posteriormente, uma coleta em 24 horas. Enquanto que para a análise realizada durante 72 horas, foram coletadas alíquotas a cada 3 horas. Os resultados obtidos para 8 horas de experimento estão demonstrados na Figura 1.15, enquanto que os resultados obtidos para 24 e 72 horas estão demonstrados nas Figuras 1.19 e 1.20, respectivamente.

Figura 1.19: Determinação da velocidade de dissolução intrínseca (VDI) da eremantolida C em 900 mL de meio FISSE (pH 6,8) a 37,0 °C sob 100 rpm durante 24 horas. Em azul, vermelho e verde estão representados, respectivamente, as ampliações da parte inicial, mediana e final do gráfico obtido.

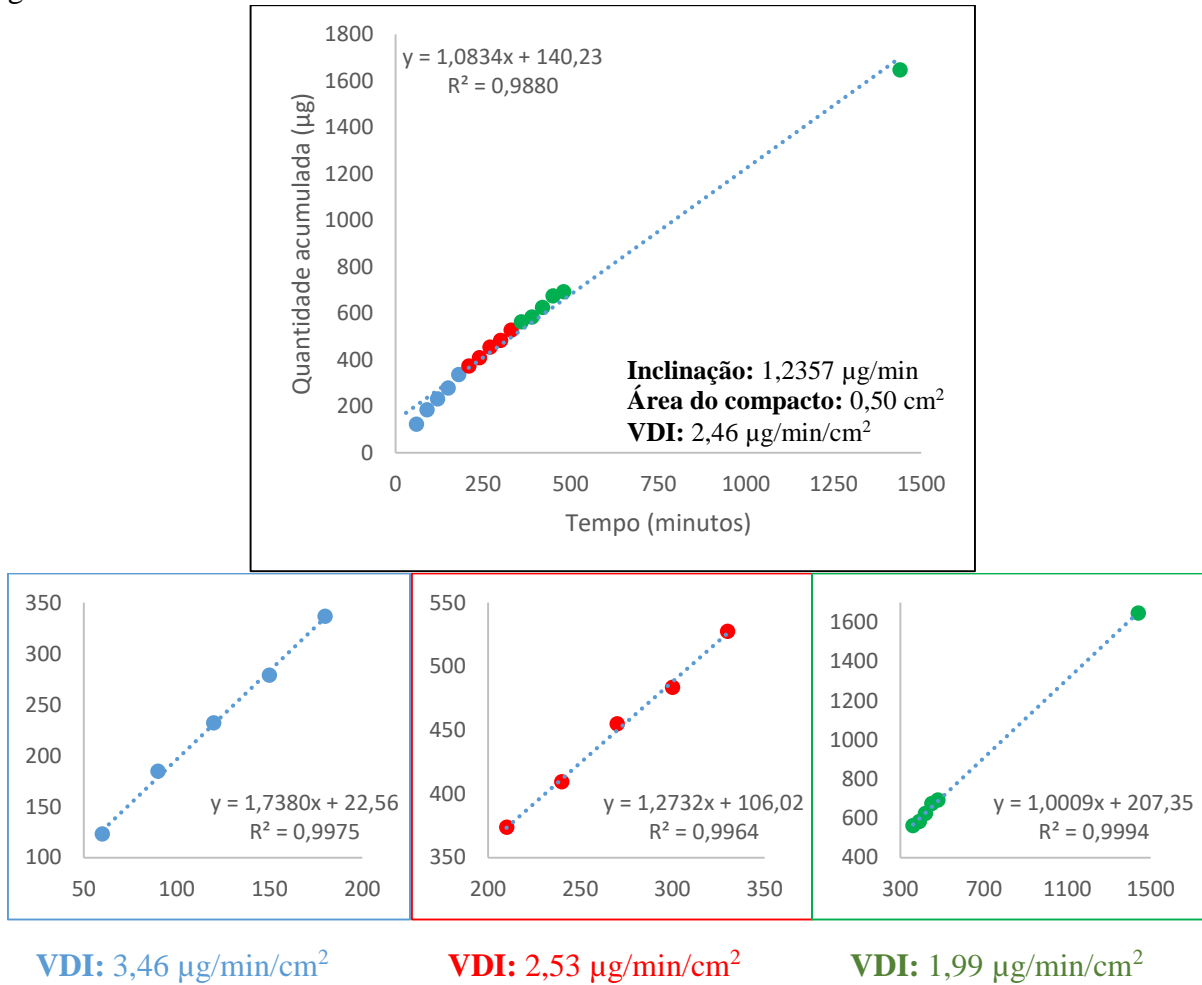
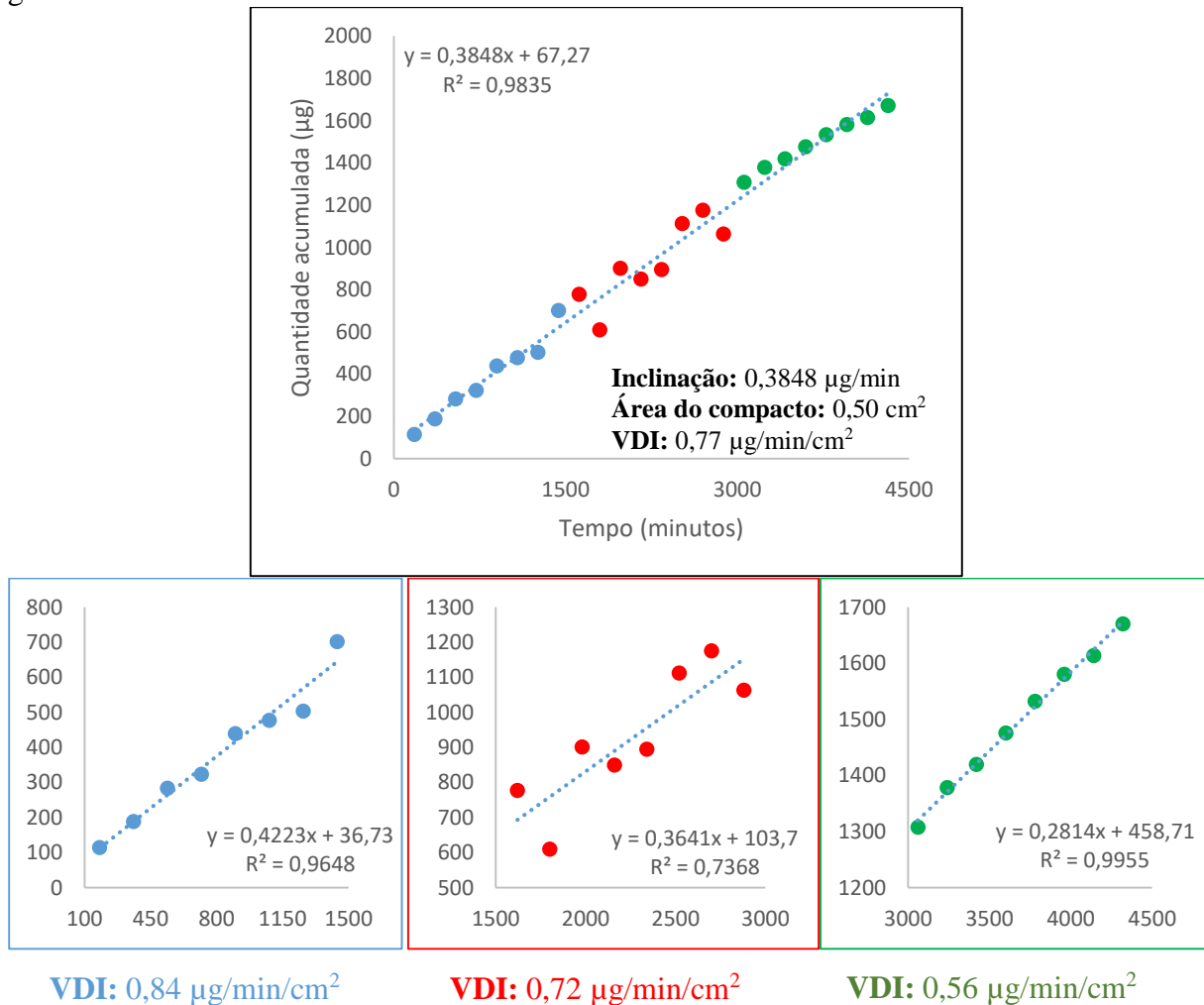


Figura 1.20: Determinação da velocidade de dissolução intrínseca (VDI) da eremantolida C em 900 mL de meio FISSE (pH 6,8) a 37,0 °C sob 100 rpm durante 72 horas. Em azul, vermelho e verde estão representados, respectivamente, as ampliações da parte inicial, mediana e final do gráfico obtido.



Conforme demonstrado, a condição de determinação da VDI na qual utilizou-se o tempo total de experimento de 72 horas, apresentou maior dispersão dos pontos na porção mediana do gráfico obtido (em vermelho) com coeficiente de determinação inferior a 0,95. Tal fato pode estar correlacionado com problemas analíticos durante as coletas e/ou processamento das amostras. No entanto, isso não é um problema para fins de padronização da técnica, uma vez que a análise totalizou 24 coletas e as porções inicial e final do gráfico apresentaram correlação linear com R^2 superior a 0,95.

Com relação ao tempo total de experimento, as análises realizadas em 24 e 72 horas apresentaram menores VDI quando comparadas com o período de 8 horas. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram observadas entre os três períodos utilizados para a determinação da VDI. Diante disso, o tempo total de experimento de 8 horas, por apresentar

o maior valor de VDI, foi o escolhido para a realização da determinação da velocidade de dissolução intrínseca da eremantolida C.

Em todos os perfis obtidos, foram observadas diferenças nos valores das inclinações obtidas durante as análises, no entanto, nenhuma capaz de mudar a classificação da solubilidade da eremantolida C.

O pH durante todas as análises realizadas se manteve constante e não foram observadas indicações de transições polimórficas, pois os gráficos obtidos se mostraram lineares ao longo de todo o experimento, não apresentando qualquer curvatura. Curvaturas positivas podem estar relacionadas com problemas analíticos, enquanto curvaturas negativas podem estar correlacionadas com transições cristalinas na superfície do compacto (ISSA, 2011).

Diante disso, as condições padronizadas para a avaliação da velocidade de dissolução intrínseca da eremantolida C em meios tamponados estão listadas no Quadro 1.3.

Quadro 1.3: Condições padronizadas para a avaliação da velocidade de dissolução intrínseca da eremantolida C nos meios tamponados TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).

<p>Quantidade de substância: 100,0 mg Força de compressão: 1 tonelada Tempo de compressão: 1 minuto Volume de meio: 900 mL Velocidade de rotação: 100 rpm e 250 rpm Tempo total do experimento: 8 horas</p>

1.3.2.3 Avaliação da solubilidade da eremantolida C pelo método de dissolução intrínseca

A velocidade de dissolução intrínseca da eremantolida C foi determinada nos três meios tamponados, TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4), utilizando as condições padronizadas listadas no Quadro 1.3.

Na Figura 1.21 e na Tabela 1.16 estão apresentados os resultados obtidos para a VDI da eremantolida C utilizando a velocidade de rotação de 100 rpm.

Figura 1.21: Curvas médias obtidas para a determinação da velocidade de dissolução intrínseca da eremantolida C nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) a 100 rpm (n=3).

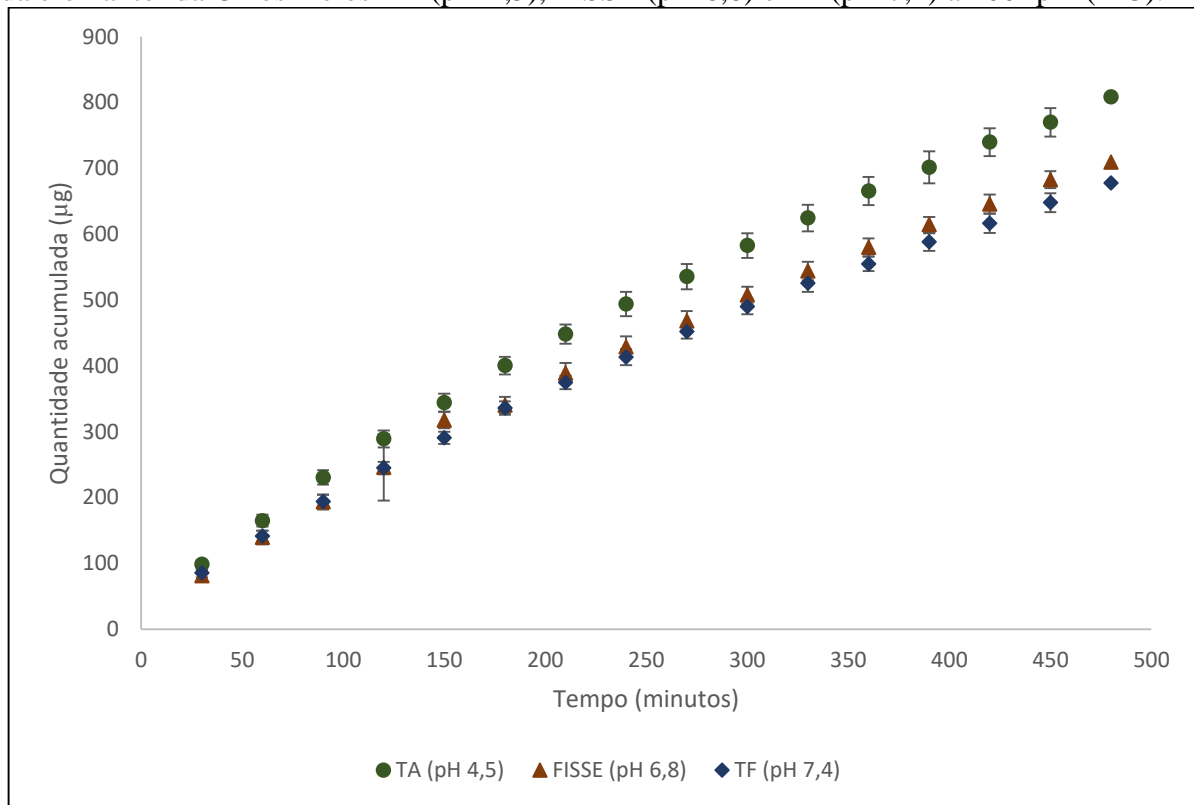


Tabela 1.16: Parâmetros obtidos a partir das curvas médias para a determinação da velocidade de dissolução intrínseca da eremantolida C nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) a 100 rpm (n=3).

Parâmetros	TA (pH 4,5)	FISSE (pH 6,8)	TF (pH 7,4)
<i>Inclinação (µg/min)</i>	1,5512 ± 0,0421	1,3742 ± 0,0127	1,2942 ± 0,0218
<i>Área do compacto (cm²)</i>	0,50		
<i>VDI (µg/min/cm²)</i>	3,08 ± 0,08	2,74 ± 0,03	2,58 ± 0,04
<i>VDI (mg/min/cm²)</i>	0,00308	0,00274	0,00258
<i>Coefficiente de determinação (R²)</i>	0,9896	0,9895	0,9899

Por sua vez, na Figura 1.22 e na Tabela 1.17 estão apresentados os resultados obtidos para a VDI da eremantolida C utilizando a velocidade de rotação de 250 rpm.

Figura 1.22: Curvas médias obtidas para a determinação da velocidade de dissolução intrínseca da eremantolida C nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) a 250 rpm (n=3).

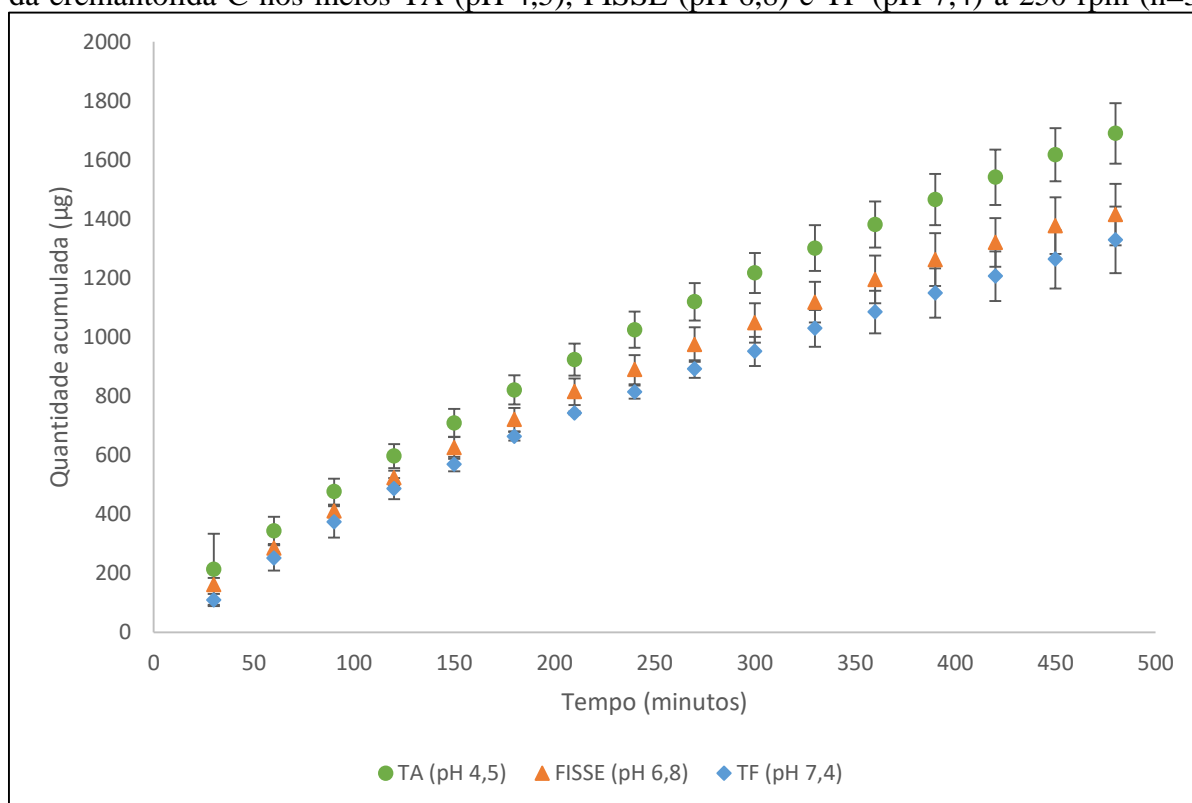


Tabela 1.17: Parâmetros obtidos a partir das curvas médias para a determinação da velocidade de dissolução intrínseca da eremantolida C nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) a 250 rpm (n=3).

Parâmetros	TA (pH 4,5)	FISSE (pH 6,8)	TF (pH 7,4)
<i>Inclinação (µg/min)</i>	3,2518 ± 0,2204	2,7659 ± 0,2246	2,5849 ± 0,3647
<i>Área do compacto (cm²)</i>	0,50		
<i>VDI (µg/min/cm²)</i>	6,47 ± 0,44	5,51 ± 0,45	5,15 ± 0,73
<i>VDI (mg/min/cm²)</i>	0,00647	0,00551	0,00515
<i>Coefficiente de determinação (R²)</i>	0,9916	0,9840	0,9828

De acordo com Yu e colaboradores (2004), uma substância é considerada altamente solúvel quando apresenta valores para VDI superiores a 0,1 mg/min/cm². Já para Zakeri-Milani e colaboradores (2009), um fármaco apresenta alta solubilidade quando a VDI é superior a 1,0 mg/min/cm². Essa discrepância nos valores de referência é observada devido às condições experimentais empregadas.

Sob as mesmas condições de volume de meio e velocidade de rotação, os valores de VDI obtidos por Zakeri-Milani e colaboradores (2009), em sua maioria, foram mais elevados que os resultados obtidos por Yu e colaboradores (2004) para os mesmos fármacos. Tal fenômeno pode ser atribuído aos diferentes aparelhos de dissolução intrínseca utilizados. No caso do sistema de disco estacionário, empregado por Zakeri-Milani e colaboradores (2009), a

matriz contendo o compacto foi fixado no fundo da cuba de dissolução e o solvente, agitado durante o procedimento pelo aparelho pá. Por outro lado, no caso do sistema de disco rotativo, utilizado por Yu e colaboradores (2004), o aparelho contendo a matriz com o compacto foi submetido a um movimento de cisalhamento sobre o solvente estático. Sistemas de disco distintos ocasionam diferentes condições hidrodinâmicas, incluindo velocidade de fluido e taxa de cisalhamento. Em geral, o sistema de disco estacionário gera alta velocidade de fluido, resultando em maior dissolução e promovendo assim, valores de aceitação mais elevados quando comparado com o sistema de disco rotativo (VIEGAS *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2012).

Como o processo de determinação da velocidade intrínseca da eremantolida C foi realizado utilizando o sistema de disco rotativo ou aparelho de “Wood”, optou-se por classificar a eremantolida C conforme preconizado por Yu e colaboradores (2004).

Considerando isso, apesar da eremantolida C apresentar valores de velocidade de dissolução, nos três meios avaliados, quando submetida à rotação de 250 rpm cerca de 2 vezes superior quando submetida a rotação de 100 rpm, em ambos os casos, a EREC demonstrou valores de VDI inferiores a 0,1 mg/min/cm², comprovando sua baixa solubilidade e sendo portanto classificada como classe II ou IV segundo o SCB.

A determinação da velocidade de dissolução intrínseca é, na maioria das vezes, preferível para a avaliação de solubilidade de substâncias biologicamente ativas. A razão é que, assim como a permeabilidade, VDI é um parâmetro cinético em vez de um fenômeno de equilíbrio. Dessa forma, correlaciona-se melhor a velocidade de dissolução do fármaco com o seu comportamento *in vivo* (ZAKERI-MILANI *et al.*, 2009).

Deve-se lembrar que para fins de classificação da solubilidade, a dose é considerada, enquanto para a determinação da velocidade de dissolução intrínseca não há qualquer relação. Dessa forma, quando a dose é extremamente alta ou extremamente baixa, pode ocorrer uma discrepância entre a classificação da solubilidade segundo o SCB (utilizando o método da agitação orbital em frascos) e a VDI. Um composto pode ser classificado como altamente solúvel caso apresente solubilidade igual a 1,0 µg/mL e seja administrado sob dose igual ou inferior a 0,25 mg, embora seja provavelmente classificado como um composto de baixa solubilidade baseando-se na VDI. Por outro lado, um composto com a solubilidade de 4,0 mg/mL pode ser classificado como de baixa solubilidade, caso a dose administrada seja superior a 1000,0 mg, embora seja provavelmente considerado um composto altamente solúvel de acordo com a VDI (YU *et al.*, 2004; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2009).

Portanto, quando a dose é extremamente baixa, 1,0 mg ou menos, ou extremamente alta, superior a 1000,0 mg, devem-se tomar as devidas precauções quanto à classificação de solubilidade seguindo as diretrizes do SCB (YU *et al.*, 2004; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2009).

Ademais, os coeficientes de determinação e variação obtidos mantiveram-se dentro do preconizado (mínimo de 0,95 e máximo de 10,0 %, respectivamente), e, não foram observadas diferenças entre o pH inicial e final dos meios.

A determinação da velocidade de dissolução intrínseca além de possibilitar a classificação de fármacos de acordo com o SCB, é uma importante ferramenta no processo de descoberta de novas moléculas com potencial terapêutico, por permitir inferir sobre possíveis problemas de biodisponibilidade associados com transições de fase cristalina (YU *et al.*, 2004; UNITED STATES, 2014).

Transformações polimórficas podem ocorrer durante operações de micronização, moagem, granulação, secagem e compressão. O polimorfismo por compressão pode ser monitorado durante a determinação da velocidade de dissolução intrínseca, uma vez que, com o intuito de formar um compacto não desintegrável, a substância a ser analisada deve ser submetida a elevadas forças de compressão. Além disso, mudanças da forma cristalina podem ocorrer durante as medidas de velocidade de dissolução intrínseca (SINGHAL; CURATOLO, 2004; ZHANG *et al.*, 2004).

O maior efeito da velocidade de dissolução para fármacos que possuem polimorfismo é esperado para compostos com alta permeabilidade e baixa solubilidade, ou seja, compostos pertencentes à Classe II do SCB, cuja dose administrada permanecerá como uma suspensão durante o processo de absorção. Para solutos, nos quais se espera que a dose seja muito solúvel nos líquidos gastrointestinais (Classe I ou III), pode não haver diferenças na área sob a curva (ASC) da concentração plasmática em função do tempo dos polimorfos, pois a solubilidade não é o passo limitante no processo de absorção (SINGHAL; CURATOLO, 2004).

Portanto, a ordem de classificação da VDI de polimorfos correlaciona-se bem com a ordem de classificação de absorção oral, devido ao polimorfo mais estável apresentar menor VDI, levando a uma menor concentração de fármaco em solução disponível para absorção (SINGHAL; CURATOLO, 2004).

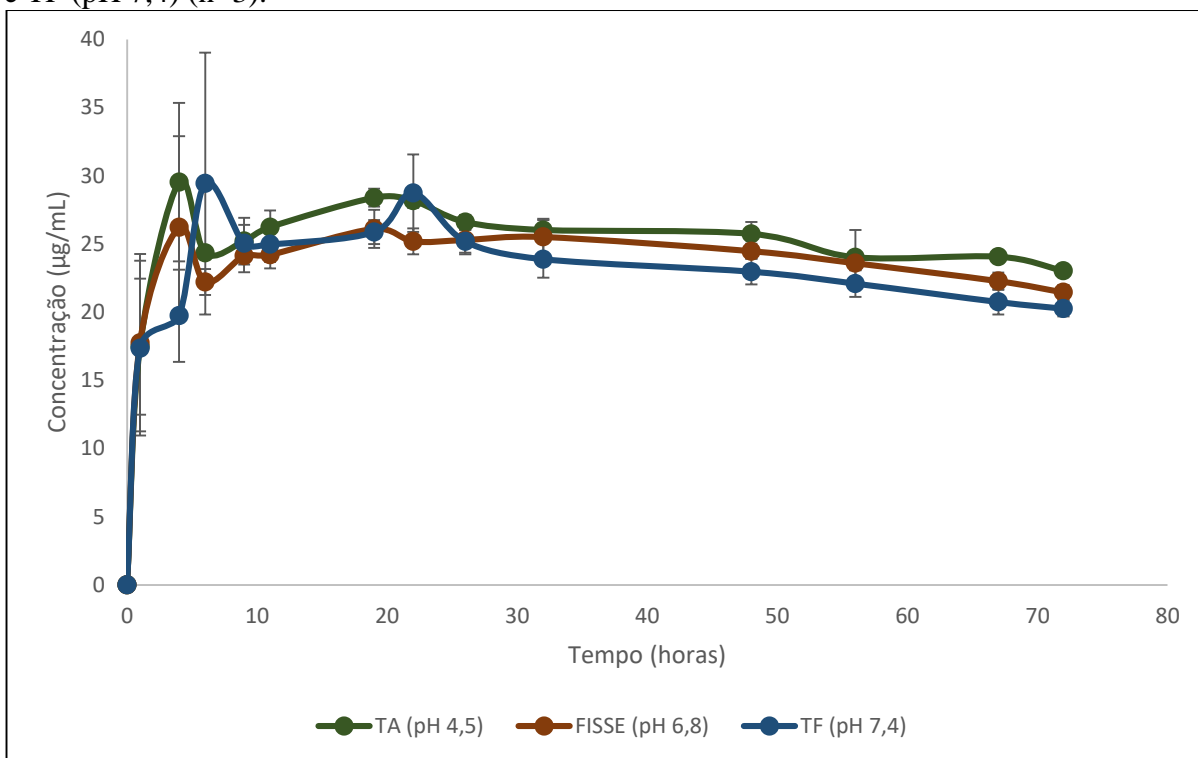
Não foram observadas indicações de transições polimórficas durante o experimento de dissolução intrínseca, uma vez que os gráficos obtidos apresentaram linearidade ao longo de todo o experimento, não mostrando qualquer tipo de curvatura. Entretanto, apesar disso, análises mais aprofundadas e direcionadas devem ser realizadas com o intuito de atestar a completa ausência de polimorfismo na eremantolida C.

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

A avaliação da solubilidade em equilíbrio da eremantolida C pelo método da agitação orbital em frascos foi realizada exatamente sob as mesmas condições propostas e padronizadas por Caldeira e colaboradores (2017), a fim de possibilitar a comparação dos perfis de solubilidade obtidos para as duas amostras de eremantolida C (utilizada por Caldeira e colaboradores (2017) e nos experimentos atuais). Além disso, correlacionar os resultados de solubilidade em equilíbrio e velocidade de dissolução intrínseca.

O perfil de solubilidade obtido para a eremantolida C nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) está representado na Figura 1.23.

Figura 1.23: Perfil de solubilidade da eremantolida C nos meios TA (pH 4,5), FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) (n=3).



O estudo foi realizado por um período de 72 horas e pode-se observar que a solubilidade atingiu o equilíbrio (a concentração de eremantolida C permaneceu constante), nos três meios, em 32 horas, tempo de equilíbrio também obtido por Caldeira e colaboradores (2017).

Os valores de solubilidade em equilíbrio foram bem próximos nos três meios tamponados, porém observou-se maior solubilidade para a eremantolida C no meio TA (pH 4,5) e menor, no meio TF (pH 7,4), conforme dados compilados na Tabela 1.18.

Tabela 1.18: Resultados obtidos a partir da avaliação da solubilidade em equilíbrio da eremantolida C, em meios tamponados, utilizando o método da agitação orbital em frascos, em comparação com os valores obtidos por Caldeira e colaboradores (2017) (n=3).

Meio tamponado	SEM (mg/mL)	LogS	Caldeira e colaboradores (2017)		p
			SEM (mg/mL)	LogS	
TA (pH 4,5)	0,026 ± 0,000	-4,12	0,025 ± 0,006	-4,13	0,83
FISSE (pH 6,8)	0,025 ± 0,001	-4,14	0,023 ± 0,004	-4,18	0,75
TF (pH 7,4)	0,024 ± 0,001	-4,16	0,016 ± 0,002	-4,33	0,58

SEM – solubilidade experimental média

LogS – logaritmo da solubilidade (mol/L)

$p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo

Os valores de solubilidade experimental média encontrados para a eremantolida C no presente trabalho foram bem próximos aos valores obtidos por Caldeira e colaboradores (2017), observando-se maior discrepância entre os resultados obtidos para o TF (pH 7,4). Apesar disso, não houve diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os resultados obtidos.

Ademais, não foram constatadas diferenças entre o pH inicial e final das soluções tamponadas empregadas durante o experimento.

A eremantolida C por estar em processo de avaliação das suas características físico-químicas, ainda não possui dose definida para a administração oral em humanos.

O cálculo da razão dose/solubilidade foi realizado por Caldeira e colaboradores (2017) a partir da extrapolação alométrica da dose de eremantolida C para um humano de 70,0 kg tomando-se como base a dose de 25,0 mg/kg de EREC administrada em camundongos Swiss (0,025 kg) para o tratamento da hiperuricemia (SOUZA *et al.*, 2012; CALDEIRA *et al.*, 2017).

Entretanto, um estudo recente demonstrou que a eremantolida C, quando administrada nas doses de 5,0 mg/kg e 10,0 mg/kg, foi capaz de reduzir a hiperuricemia induzida por oxonato de potássio em ratos Wistar (0,180 kg) devido à sua notável inibição da atividade da enzima xantina oxidase hepática e do seu efeito uricosúrico (BERNARDES *et al.*, 2019).

Diante disso, a extrapolação alométrica, para um humano de 70,0 kg, foi calculada utilizando as três doses de eremantolida C que demonstraram atividade anti-hiperuricêmica nos modelos animais (5,0, 10,0 e 25,0 mg/kg). Para tal, as equações descritas em Equação 1.6 foram empregadas.

Equação 1.6: Equações utilizadas para a extrapolação alométrica da dose de eremantolida C para um humano de 70,0 kg tomando-se como animal referência o camundongo (0,025 kg) e a dose de 25,0 mg/kg, bem como ratos Wistar (0,180 kg) e as doses 5,0 e 10,0 mg/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 (kg)

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, quando camundongos Swiss foram os animais referência para a determinação da dose. Enquanto que, quando ratos Wistar foram os animais referência para a determinação da dose, em um humano de 70,0 kg poderia ser administrado, por via oral, 78,0 ou 158,0 mg de eremantolida C, provenientes das doses de 5,0 e 10,0 mg/kg, respectivamente.

Considerando esses valores, realizou-se o cálculo da razão dose/solubilidade utilizando-se a menor e a maior dose a serem administradas, ou seja, 78,0 mg e 240,0 mg de eremantolida C. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 1.19.

Tabela 1.19: 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 tamponado	D/S (mL)		
	<i>Dose = 240,0 mg</i>	<i>Dose = 78,0 mg</i>	<i>Caldeira e colaboradores (2017)</i>
TA (pH 4,5)	9230,77	3000,00	9448,82
FISSE (pH 6,8)	9600,00	3120,00	10389,61
TF (pH 7,4)	10000,00	3250,00	15000,00

Apesar das diferentes doses utilizadas, a eremantolida C foi classificada como uma substância pouco solúvel por apresentar D/S superior a 250,0 mL, confirmando os dados obtidos na determinação da velocidade de dissolução intrínseca, e portanto, classificando a EREC como classe II ou IV segundo o SCB.

A velocidade e a extensão da absorção intestinal de uma substância pode ser afetada por diversas variáveis. A solubilidade de um fármaco ou substância biologicamente ativa, em especial, pode ser influenciada por vários fatores, dentre eles destacam-se: temperatura, pH do meio, tamanho de partícula e polimorfismo (BABU; AREEFULLA; MALLIKARJUN, 2010). Sendo que, para fármacos praticamente insolúveis e com alta permeabilidade (Classe II), a dissolução e a dose são os fatores críticos para a predição da velocidade e extensão de absorção (AVDEEF; TSINMAN, 2008).

A temperatura durante o experimento, bem como o pH dos meios, foram rigorosamente controlados ao longo de toda a análise, seguindo as condições padronizadas para a avaliação da solubilidade em equilíbrio da eremantolida C.

Com relação ao polimorfismo, em geral, formas polimórficas de maior solubilidade apresentam maior energia livre, e, portanto, baixos ponto de fusão e estabilidade (AULTON, 2005; BUENO; RECH, 2011).

Entretanto, como observado, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os valores de solubilidade em equilíbrio obtidos para as duas amostras de eremantolida C. Em geral, os polimorfos apresentam solubilidade diferente na ordem de 2 a 3 vezes, devido à diferença relativamente pequena na energia livre entre as formas polimórficas. Assim, um polimorfo de energia mais alta pode resultar em uma exposição sistêmica cerca de três vezes superior à forma polimórfica de baixa energia (SINGHAL; CURATOLO, 2004).

Apesar disso, análises mais aprofundadas e direcionadas foram realizadas com o intuito de atestar a completa ausência de polimorfismo na eremantolida C e confirmar que este não é um parâmetro capaz de influenciar a solubilidade e conseqüentemente, a biodisponibilidade oral da eremantolida C.

1.3.3 Avaliação da presença de polimorfismo na eremantolida C

A informação sobre a presença de polimorfismo em substâncias biologicamente ativas é essencial no processo de caracterização de novos fármacos e no desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas.

Por meio dos estudos de solubilidade em equilíbrio, utilizando o método de agitação orbital em frascos, e determinação da velocidade de dissolução intrínseca é possível inferir sobre a presença de polimorfismo pela diferença no grau de solubilidade e/ou presença de transições de fase cristalina. Esse tipo de análise é adequado para a avaliação e comparação de diferentes polimorfos e de fármacos na forma de sais, em particular durante a triagem de novas

substâncias, onde apenas quantidades limitadas de amostra estão disponíveis (HULSE; GRAY; FORBES, 2012).

O primeiro passo para avaliar a presença de polimorfismo foi cristalizar a substância utilizando diferentes solventes, incluindo aqueles utilizados nos passos finais de extração/cristalização (acetato de etila e clorofórmio, por exemplo) e os empregados durante a produção da forma farmacêutica ou processo de administração oral da substância (meios tamponados, por exemplo).

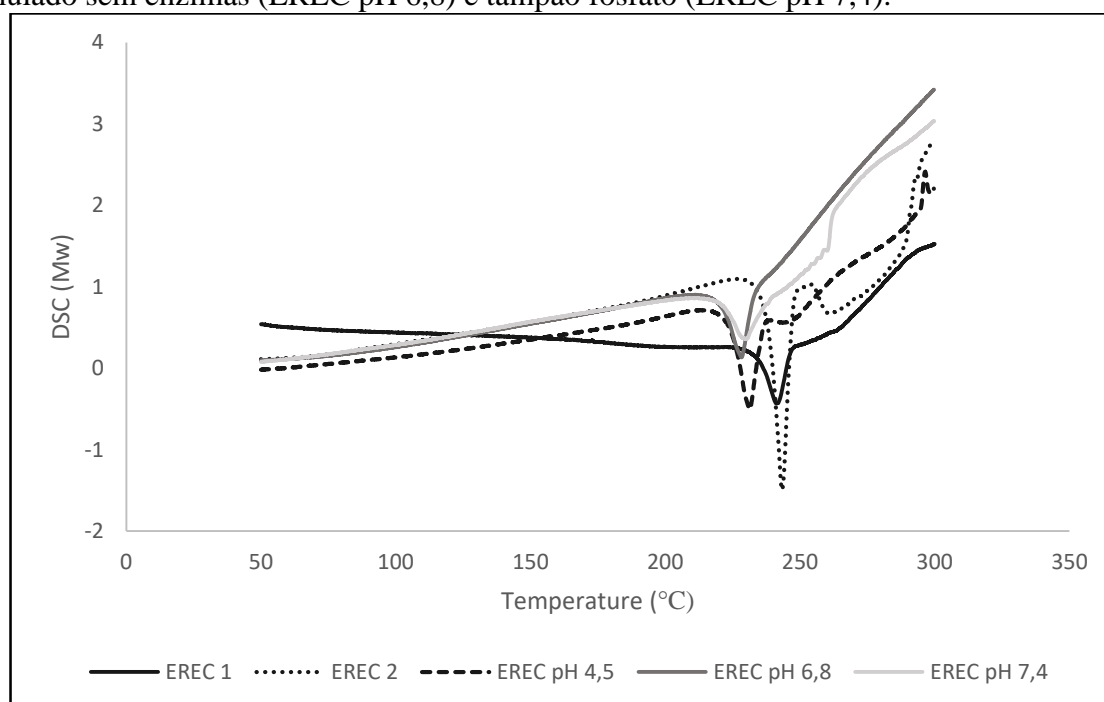
Diante disso, para a análise do polimorfismo, foram avaliadas amostras de eremantolida C cristalizadas em clorofórmio e acetato de etila, denominadas de EREC 1 e EREC 2, respectivamente. Amostras de eremantolida C provenientes da cristalização da substância após o estudo de dissolução intrínseca em tampão acetato (EREC pH 4,5), fluido intestinal simulado sem enzimas (EREC pH 6,8) e tampão fosfato (EREC pH 7,4) também foram analisadas.

Os sólidos produzidos devem ser analisados por difração de raios-X e pelo menos mais uma técnica comumente utilizada para a avaliação de polimorfismo, geralmente calorimetria diferencial exploratória (*Differential scanning calorimetry* – DSC). Se as análises demonstrarem que os sólidos avaliados são idênticos, não há polimorfismo.

A calorimetria diferencial exploratória é uma análise térmica sensível e frequentemente usada para caracterizar polimorfos, uma vez que quaisquer transições térmicas resultam na liberação ou absorção de energia. No entanto, fatores cinéticos durante o aquecimento podem gerar resultados falsos. Artefatos provenientes do manuseio da amostra e/ou da presença de impurezas também são responsáveis por interpretações equivocadas. Diante disso, a comparação dos resultados oriundos de diferentes métodos é fundamental para a identificação de formas polimórficas (GIRON, 2003).

Para identificar a presença de formas polimórficas, foram obtidas curvas DSC (Figura 1.24). Para todas as amostras de eremantolida C analisadas (EREC I, EREC II, EREC pH 4,5, EREC pH 6,8 e EREC pH 7,4) foi observado somente um único pico endotérmico. Duplicidade de pontos de fusão e eventos indicativos de transição cristalina não foram detectados, sugerindo portanto, que a eremantolida C não apresenta polimorfismo.

Figura 1.24: Curvas DSC obtidas para EREC 1, EREC 2 e amostras de EREC cristalizadas após o estudo de dissolução intrínseca em tampão acetato (EREC pH 4,5), fluido intestinal simulado sem enzimas (EREC pH 6,8) e tampão fosfato (EREC pH 7,4).



Diferenças no intervalo e no calor de fusão foram observadas (Tabela 1.20). Estas podem ser atribuídas ao grau de pureza, ao solvente em que a substância foi cristalizada e à diferença de cristalinidade das amostras. Impurezas diminuem o ponto de fusão e têm um efeito de ampliação na largura do pico, o qual foi comprovado, uma vez que EREC 2 possui pureza de 97,8 % e apresentou maior ponto de fusão e um pico endotérmico mais fino, quando comparada com as demais amostras (pureza de 89,9 %). Dessa forma, a análise de calorimetria diferencial exploratória não permite uma distinção entre polimorfos que apresentam pontos de fusão muito próximos (GIRON, 1995).

Tabela 1.20: Valores de temperatura inicial (T_{onset}) e final (T_{peak}) de fusão encontrados para EREC 1, EREC 2, EREC pH 4,5, EREC pH 6,8 e EREC pH 7,4, bem como seus respectivos valores de calor de fusão ($\Delta H_{\text{fusão}}$).

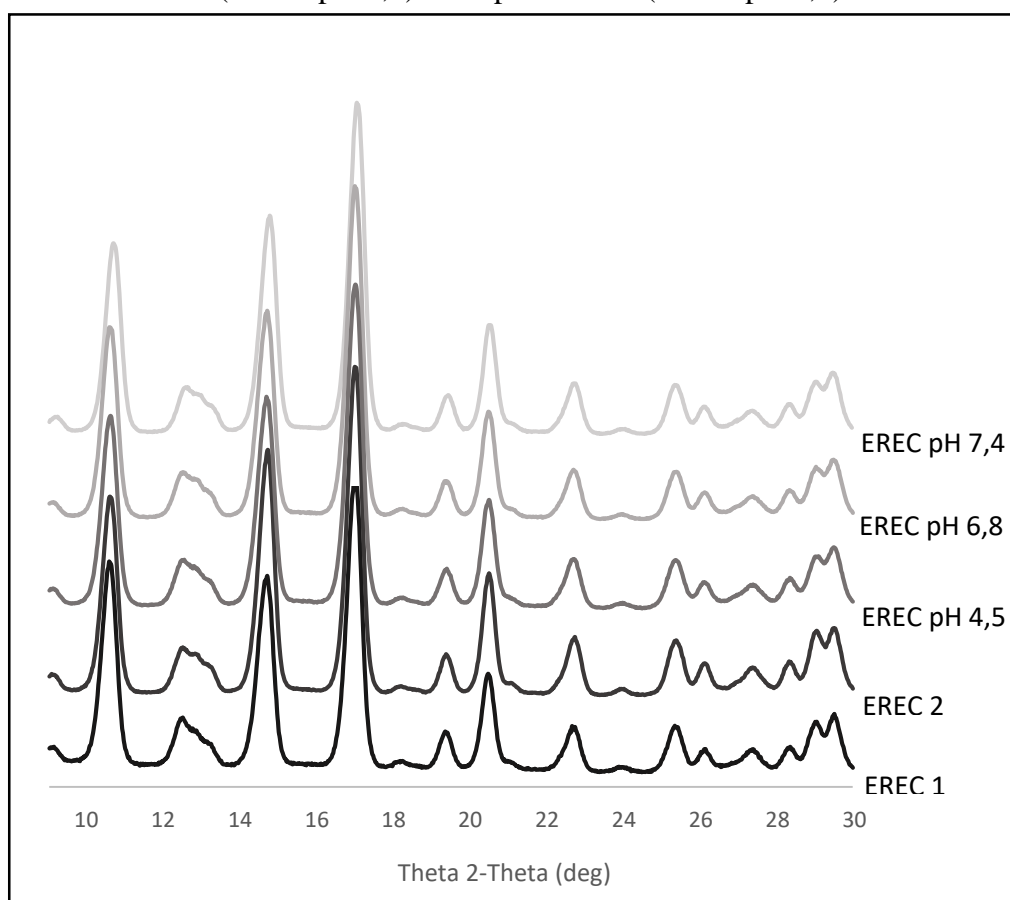
Amostras	T_{onset} (°C)	T_{peak} (°C)	$\Delta H_{\text{fusão}}$ (J/g)
EREC 1	234,7	241,6	45,7
EREC 2	238,6	243,7	68,7
EREC pH 4,5	225,9	231,5	41,6
EREC pH 6,8	222,5	228,5	62,9
EREC pH 7,4	224,0	230,0	46,8

Para confirmar a ausência de polimorfismo nas amostras de eremantolida C, foi realizada a difração de raios-X.

A difração de raios-X é uma das técnicas mais importantes para a caracterização e quantificação de polimorfos. Os materiais cristalinos ou policristalinos possuem padrões característicos de difração de raios-X. O espaçamento interplanar e suas intensidades relativas são características e específicas para cada substância cristalina. Como consequência de sua importância, o uso desta técnica é comum e essencial na caracterização dos polimorfos na área farmacêutica (GIRON, 2003).

A difração de raios-X de EREC 1 e EREC 2 não mostrou diferenças cristalográficas entre as amostras (Figura 1.25). Também não foram observadas diferenças cristalográficas entre EREC 1 e as amostras de EREC provenientes da determinação da velocidade de dissolução intrínseca após serem comprimidas a alta pressão e submetidas a estudos nos meios tamponados: tampão acetato (pH 4,5), fluido intestinal simulado sem enzimas (pH 6,8) e tampão fosfato (pH 7,4), denominadas EREC pH 4,5, EREC pH 6,8 e EREC pH 7,4, respectivamente (Figura 1.25).

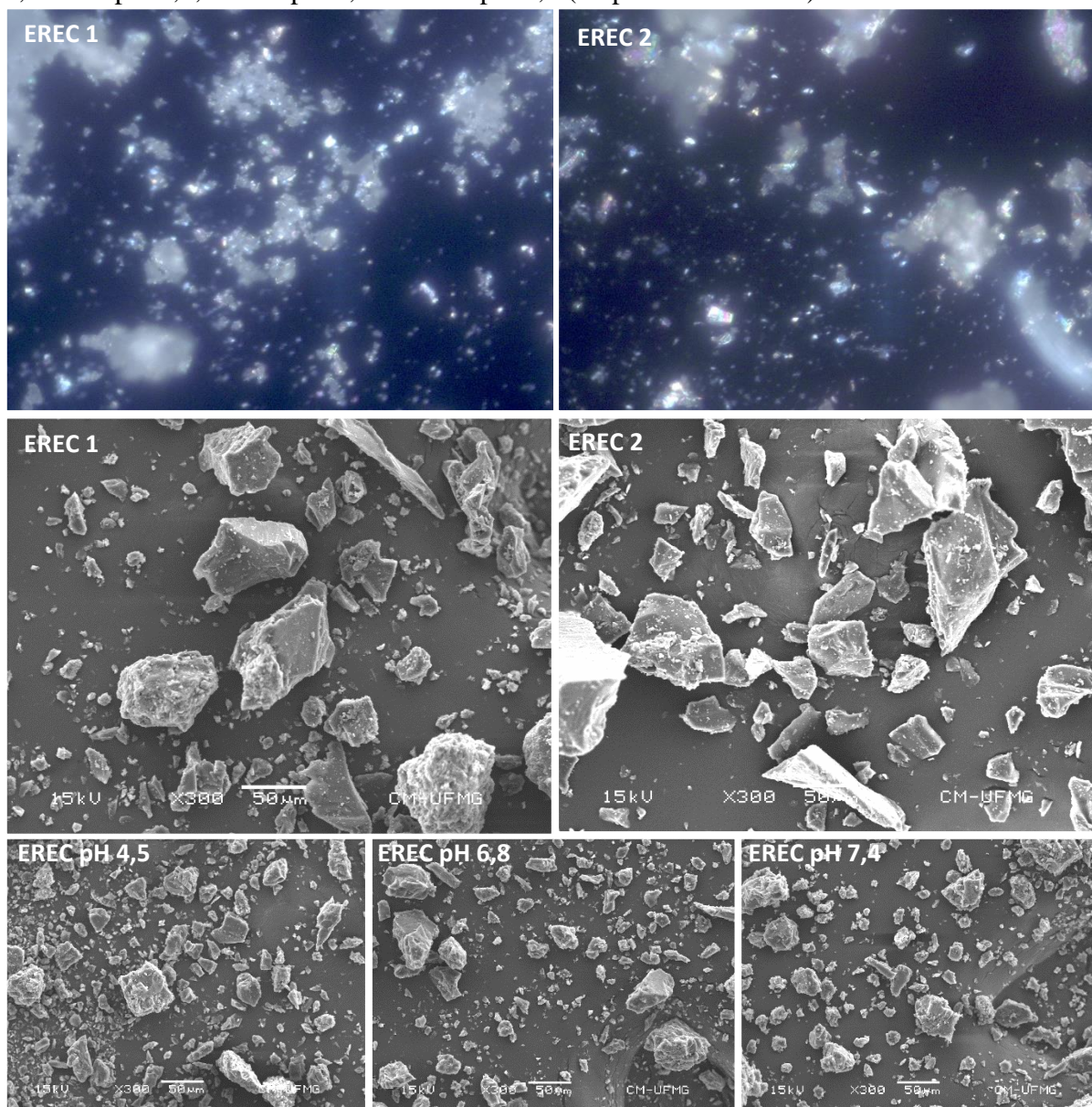
Figura 1.25: Difratomogramas obtidos para EREC 1, EREC 2 e amostras de EREC cristalizadas após o estudo de dissolução intrínseca em tampão acetato (EREC pH 4,5), fluido intestinal simulado sem enzimas (EREC pH 6,8) e tampão fosfato (EREC pH 7,4).



Alguns fármacos, como a sinvastatina, não apresentam o polimorfismo clássico, mas sim, o polimorfismo morfológico, cujo fármaco possui a mesma célula unitária, apresenta a mesma estabilidade, solubilidade e reatividade, porém difere em relação aos padrões cristalinos devido às interações do tipo soluto-solvente no processo de crescimento de cristais (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Diante dessa possibilidade, avaliou-se a morfologia dos cristais EREC 1, EREC 2, EREC pH 4,5, EREC pH 6,8 e EREC pH 7,4, sendo que os dois primeiros também foram avaliados em microscopia óptica, com o intuito de verificar características de cristalinidade.

EREC 1 e EREC 2 mostraram birrefringência sob luz polarizada, o que reforçou sua característica de cristalinidade. Em relação à morfologia, EREC 1, EREC 2, EREC pH 4,5, EREC pH 6,8 e EREC pH 7,4 não apresentaram morfologia definida, porém a forma dos cristais foi comum às cinco amostras analisadas (Figura 1.26).

Figura 1.26: Fotomicrografias ópticas sob luz polarizada (ampliada 10 vezes) das amostras de EREC 1 e EREC 2, e fotomicrografias obtidas em MEV para as amostras de EREC 1, EREC 2, EREC pH 4,5, EREC pH 6,8 e EREC pH 7,4 (ampliada 300 vezes).



A influência do polimorfismo na biodisponibilidade oral é considerada a mais importante consequência do fenômeno na área farmacêutica e ocorre quando há uma dependência entre a velocidade de dissolução *in vivo* e a velocidade de absorção. A concentração plasmática máxima (C_{max}) e o tempo necessário para obtê-la (t_{max}) são os principais impactos *in vivo* (SINGHAL; CURATOLO, 2004).

Foi estabelecido que polimorfos com grande diferença entre os valores de energia livre apresentam diferenças significativas no comportamento farmacocinético. Este fato se reflete na solubilidade, uma vez que a forma mais estável (menor energia livre) possui menor

solubilidade. Isso resulta, na maioria dos casos, em baixa velocidade de dissolução e, conseqüentemente, baixa velocidade de absorção (SINGHAL; CURATOLO, 2004).

Para substâncias com baixa solubilidade, como a eremantolida C, a dissolução *in vivo* é o fator limitante no processo de absorção. Desta forma, a caracterização físico-química e polimórfica torna-se fundamental. Considerando os resultados obtidos, não há formação de diferentes formas cristalinas para a eremantolida C durante a extração, cristalização, compressão e determinação da velocidade de dissolução intrínseca.

1.4 CONCLUSÕES

A eremantolida C foi isolada e purificada de forma eficaz a partir do extrato clorofórmico das partes aéreas de *Lychnophora trichocarpa* (Spreng.) Spreng. ex Sch.Bip., possibilitando a validação do método analítico para sua quantificação dentro da faixa de 0,09 a 1,80 µg/mL, visando os estudos de dissolução intrínseca.

A padronização do método para determinação da velocidade de dissolução intrínseca foi realizada de forma que as condições: 100,0 mg de eremantolida C, força de compressão de 1 tonelada, tempo de compressão de 1 minuto, 900 mL de meio a 37,0 °C sob 100 e 250 rpm, fossem utilizadas para a análise da solubilidade da eremantolida C nos meios tamponados: tampão acetato (pH 4,5), fluido intestinal simulado sem enzimas (pH 6,8) e tampão fosfato (pH 7,4).

A determinação da velocidade de dissolução intrínseca demonstrou que a eremantolida C apresenta baixa solubilidade, com VDI inferiores a 0,1 mg/min/cm². Esses resultados estão em concordância com os valores obtidos para a solubilidade em equilíbrio da eremantolida C, pelo método da agitação orbital em frascos, uma vez que ambos os métodos classificam essa lactona sesquiterpênica como classe II ou IV, segundo o SCB.

Apesar dos resultados dos estudos de solubilidade não indicarem a presença de polimorfismo, amostras de eremantolida C cristalizadas em clorofórmio (EREC 1) e acetato de etila (EREC 2), bem como aquelas provenientes da cristalização da substância após a determinação da velocidade de dissolução intrínseca nos meios tamponados (EREC pH 4,5), EREC pH 6,8 e EREC pH 7,4) foram submetidas à análises de difração de raios-X, calorimetria diferencial exploratória e microscopias óptica e eletrônica de varredura.

A partir das análises realizadas, a eremantolida C não apresentou qualquer tipo de polimorfismo, clássico ou morfológico, não havendo, portanto, influência de transições cristalinas na solubilidade e conseqüentemente em sua classificação biofarmacêutica e processo de absorção oral.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DA EREMANTOLIDA C POR MEIO DA TÉCNICA DE PERFUSÃO INTESTINAL *IN SITU* EM RATOS

2.1 REVISÃO DA LITERATURA

2.1.1 Permeabilidade de fármacos

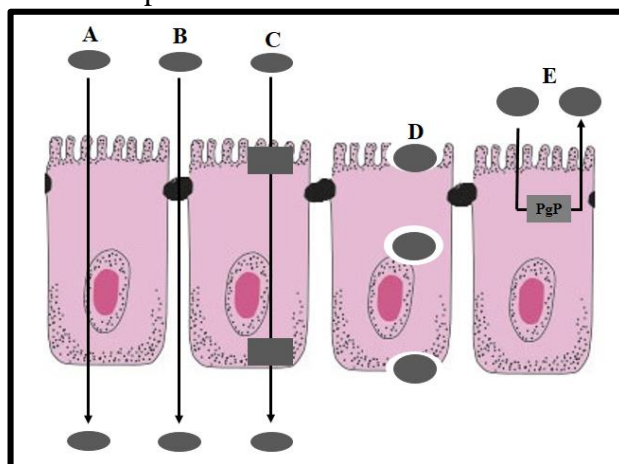
Permeabilidade intestinal é a medida da capacidade que um composto tem de atravessar a membrana biológica e pode variar conforme sua localização no trato gastrointestinal (GRASS, 1997).

O intestino delgado humano apresenta extensão de 2 a 6 metros e é dividido em três seções: duodeno, jejuno e íleo, que compreendem 5 %, 50 % e 45 % do comprimento total. A superfície do intestino delgado apresenta projeções, denominadas de vilosidades e/ou microvilosidades, capazes de aumentar potencialmente, em cerca de três vezes, a área para a digestão e absorção. Dessa forma, aproximadamente 90 % de toda a absorção no trato gastrointestinal ocorre nessa região (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; AVDEEF, 2003).

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, denominadas junções justapostas ou intercelulares, que são responsáveis pela união e aderência entre as células, e também participam do processo de permeação, uma vez que possuem poros e podem permitir que moléculas pequenas se difundam em solução aquosa, sendo portanto, a principal rota para absorção de pequenas moléculas hidrofílicas (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; AVDEEF, 2003).

Entretanto o transporte de fármacos ocorre de várias maneiras 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 de processos de endocitose, influxo e efluxo, mediados por transportadores, conforme indicados na Figura 2.1 (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Figura 2.1: Mecanismos de transporte de fármacos através da membrana intestinal.



(A) Transporte passivo transcelular (B) Transporte passivo paracelular (C) Transporte mediado por carreadores de membrana (D) Endocitose (E) Transporte mediado por carreadores de efluxo.

Fonte: Adaptado de GONÇALVES; SOUZA; STORPIRTIS, 2009.

A permeabilidade de substâncias é afetada por diversos fatores, os quais influenciam diretamente o processo de absorção intestinal e consequentemente, a biodisponibilidade oral.

Fatores fisiológicos relacionados ao trato gastrointestinal como tempo de esvaziamento gástrico e trânsito intestinal das diversas formas farmacêuticas, além de alterações como: mudança no pH gastrointestinal, presença de enzimas no lúmen, enfermidades, desordens fisiológicas e espessura da camada de água estacionária são parâmetros que devem ser levados em consideração, uma vez que, constituem barreiras para absorção do fármaco (ASHFORD, 2005a; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007; VOLPE, 2010).

As propriedades físico-químicas de uma substância farmacológica, tais como, massa molar e tamanho molecular, pK_a , caráter lipofílico, solubilidade e permeabilidade, em conjunto com fatores inerentes à forma farmacêutica sólida como, velocidade e extensão de desintegração e dissolução, além do uso de excipientes também são parâmetros essenciais para a biodisponibilidade oral do fármaco (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; VOLPE, 2010).

2.1.2 Permeabilidade de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB)

De acordo com o SCB um fármaco é altamente permeável quando apresenta biodisponibilidade absoluta sistêmica ou extensão de absorção em humanos igual ou superior a 85,0 % e não está associado a qualquer instabilidade no trato gastrointestinal (MARTINEZ; AMIDON, 2002; EMA, 2010; WHO, 2015; BRASIL, 2016b; FDA, 2017).

Segundo a FDA, EMA e OMS, a medida da permeabilidade baseia-se indiretamente na extensão da absorção, ou seja, na fração da dose absorvida, de um fármaco em seres humanos e, diretamente na medida da velocidade de transferência de massa através da membrana intestinal (EMA, 2010; WHO, 2015; FDA 2017).

Alternativamente, outros métodos, que não envolvem seres humanos, são capazes de prever a extensão da absorção do fármaco. São eles: perfusão intestinal *in vivo* ou *in situ* em humanos ou modelo animal adequado (geralmente, ratos) e métodos de permeabilidade *in vitro* utilizando tecidos intestinais ou monocamadas de células epiteliais (WHO, 2015; FDA 2017).

Em muitos casos, um único método para a avaliação da permeabilidade pode ser suficiente desde que: 1) a substância apresente biodisponibilidade absoluta igual ou superior a 85,0 %; 2) 85,0 % ou mais da quantidade de fármaco administrado seja excretado inalterado na urina; ou 3) 85,0 % ou mais da quantidade de fármaco administrado seja recuperado na urina na forma de metabólitos, desde que haja evidências da sua estabilidade no trato gastrointestinal (FDA, 2017).

Além de determinar a permeabilidade para fins regulatórios, os modelos de permeação podem auxiliar na seleção de candidatos a fármacos, em fases iniciais de descoberta e desenvolvimento, para estudos clínicos *in vivo*. Estes modelos servem como ferramentas no processo de tomada de decisão para evitar o investimento em estudos clínicos empregando moléculas que não possuem características farmacocinéticas adequadas para se tornar um fármaco (VOLPE, 2010).

Uma vez que a absorção de fármacos é um critério importante para a seleção de candidatos à bioislação e também na descoberta e desenvolvimento de fármacos, é necessário o detalhamento de métodos confiáveis para a triagem de novas moléculas e avaliação da permeabilidade intestinal (VOLPE, 2010).

Métodos *in silico*

Os métodos *in silico* são baseados em programas computacionais e têm recebido muita atenção nos últimos anos devido à capacidade de prever com precisão a absorção de fármacos e substâncias biologicamente ativas, a partir de características de solubilidade e permeabilidade, com base no caráter lipofílico, capacidade de realizar ligações de hidrogênio, no tamanho molecular, na área superficial polar e em propriedades quânticas (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Esse modelo preditivo direciona especificamente a síntese química, minimizando etapas extremamente demoradas, bem como evita estudos experimentais de milhares de compostos com prováveis problemas de absorção oral (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Um dos métodos *in silico* mais utilizados para a predição da absorção intestinal é a “Regra dos Cinco” proposta por Lipinski e colaboradores (2001), pela qual alguns parâmetros devem ser analisados com o intuito de definir se a substância a ser avaliada apresenta bom potencial de absorção por via oral. São eles: possuir até cinco ligações doadoras e dez aceptoras de hidrogênio, massa molecular inferior a 500 g/mol e cLogP inferior a 5. Caso dois ou mais desses limites sejam excedidos, a substância em questão muito provavelmente não será um fármaco promissor (LIPINSKI *et al.*, 2001).

Somado à “Regra dos Cinco” pode-se analisar a área de superfície polar (ASP). ASP é geralmente definida como a área associada a átomos de nitrogênio, oxigênio e átomos de hidrogênio ligados a estes, e tem sido usada como um bom descritor de absorção intestinal, uma vez que se correlaciona com o transporte passivo de substâncias. Fármacos são completamente absorvidos quando apresentam ASP inferior a $60,0 \text{ \AA}^2$, enquanto aqueles com ASP superior a $140,0 \text{ \AA}^2$ apresentam absorção limitada, sendo inferior a 10 % (PALM *et al.*, 1997; ERTL; ROHDE; SELZER, 2000; ÖSTERBERG; NORINDER, 2000).

Usando dados experimentais e um número variável de descritores moleculares (responsáveis por prever as características físico-químicas dos fármacos pelo método *in silico*), diferentes níveis de previsibilidade foram alcançados. Dessa forma, o método *in silico* é uma importante ferramenta empregada no rastreamento de substâncias com potencial de absorção oral (PRESS; GRANDI, 2008).

Métodos *in vitro* baseados em sistemas artificiais

Ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA)

O ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela, conhecido como PAMPA, foi proposto em 1998 com o intuito de prever a permeabilidade intestinal *in vitro* e ser mais uma ferramenta de alto rendimento para a triagem de moléculas potencialmente candidatas a fármaco (KANSY; SENNER; GUBERNATOR, 1998).

O ensaio consiste na utilização de duas placas de 96 poços, uma com a função de compartimento doador, na qual o fármaco estará solubilizado em solução tamponada, e a outra, como compartimento receptor, que recebe apenas solução tamponada com o intuito de mimetizar as condições sanguíneas. Entre elas há um filtro hidrofóbico que recebe impregnação lipídica com a finalidade de reproduzir as condições da membrana intestinal. Para a avaliação

da permeabilidade, um “sanduíche” é formado com a sobreposição das duas placas e levado para incubação em temperatura, agitação e tempo pré-determinados (KANSY; SENNER; GUBERNATOR, 1998; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

PAMPA indica o grau de permeação de substâncias através da membrana intestinal e fornece 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 não fazer o uso de animais ou culturas celulares e os resultados obtidos serem plenamente equiparáveis ao grau de absorção *in vivo* pela rota passiva transcelular (KANSY; SENNER; GUBERNATOR, 1998; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Portanto, apresenta como vantagens o fato de ser uma técnica simples com alto rendimento e baixo custo, podendo avaliar o grau de permeação de substâncias em uma ampla faixa de pH. E, como desvantagens a possibilidade de retenção de substâncias na membrana lipídica artificial e a não expressão de qualquer tipo de transporte ativo ou passivo paracelular. (VOLPE, 2010).

Métodos *in vitro* baseados em culturas celulares

Células Caco-2

As células Caco-2 são provenientes de adenocarcinoma do cólon humano e foram primeiramente isoladas por Fogh e Trempe em 1975 (FOGH; TREMPE, 1975).

Inicialmente, esse tipo celular foi utilizado na investigação de mecanismos tumorais de células cancerígenas e estudos sobre terapia antineoplásica (PINTO *et al.*, 1983). Entretanto, desde a década de 1980, as células Caco-2 tornaram-se uma ferramenta promissora para os estudos de permeabilidade de fármacos, pois quando cultivadas possuem a capacidade de se diferenciarem em células intestinais de absorção, 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 substâncias biologicamente ativas e fármacos (HILGERS; CONRADI; BURTON, 1990; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; SOUZA *et al.*, 2009; GONÇALVES *et al.*, 2012).

Devido à essas características, o modelo de cultura de células Caco-2 tem sido amplamente difundido para a determinação dos mecanismos de transporte intestinal de fármacos. Estudos têm demonstrado que a permeação de fármacos através dessas células está correlacionada com a porcentagem de fármacos absorvidos no organismo, tanto por difusão passiva quanto por transporte ativo (SOUZA *et al.*, 2009; BUENO; RECH, 2011).

No entanto, o uso de células Caco-2 para prever a permeabilidade intestinal possui algumas limitações, tais como, o longo período de 21 dias de incubação para a obtenção de células viáveis para o experimento e a diferença significativa de expressão de transportadores, principalmente a baixa expressão desses. Além disso, inconsistências experimentais como a escolha do pH dos compartimentos doador e receptor, a camada de água estacionária, a velocidade de agitação e o uso de co-solventes podem influenciar diretamente nos resultados obtidos (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; VOLPE, 2010; GONÇALVES *et al.*, 2012).

Células MDCK

As células *Madin-Darby* de rim canino (MDCK) são provenientes de uma linhagem celular do epitélio renal de cães e possuem a capacidade de se diferenciar, quando cultivadas, em células epiteliais colunares com junções justapostas semelhantes às células Caco-2 (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; SOUZA *et al.*; 2009).

Esse modelo foi inicialmente descrito por Cho e colaboradores (1989) e apresenta como grande vantagem, frente às células Caco-2, o curto período de incubação (3 dias) requerido para a obtenção de células viáveis para os estudos de permeabilidade, reduzindo assim o risco de contaminação microbiana e os custos relacionados ao estudo (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; SOUZA *et al.*; 2009).

Apesar disso, o fato de ser uma linhagem celular de origem canina e não intestinal acarreta na baixa atividade metabólica e inexistente ou baixa expressão de transportadores importantes no processo ativo de permeação, gerando, portanto, valores de permeabilidade incompatíveis com o grau de absorção *in vivo* (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008).

Visando melhorar esta limitação, no final da década de 1990 foi desenvolvida uma nova linhagem celular a partir da MDCK, por meio da incorporação do gene MDR1 humano, dando características de transporte de efluxo devido à maior expressão da glicoproteína P (Pgp) e outros carreadores responsáveis por esse tipo de transporte (GONÇALVES; SOUZA; STORPIRTIS, 2009; SOUZA *et al.*; 2009).

Dessa forma, assim como as células Caco-2, as células MDCK têm ampla utilização na predição do grau de absorção gastrointestinal de novas substâncias com potencial farmacológico.

Métodos ex vivo

Ensaio com tecido invertido

O ensaio com tecido invertido é capaz de avaliar a farmacocinética de absorção de fármacos, analisando tanto os mecanismos quanto a cinética dessa absorção. Consiste em utilizar porções do intestino de animais na sua forma invertida imerso em uma solução tamponada contendo o fármaco, com o intuito de avaliar o transporte da parte mucosa para a porção serosa. Dessa forma, é possível coletar informações tanto sobre o transporte passivo quanto sobre o transporte ativo dos fármacos (WILSON; WISEMAN, 1954; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; ALAM; AL-JENOABI; AL-MOHIZEA, 2011).

Informações relacionadas ao metabolismo do fármaco ou à conversão de pró-fármaco em fármaco nos segmentos gastrointestinais, transporte de efluxo, resistência a múltiplos medicamentos, interações medicamentosas e o impacto dos carreadores de efluxo na absorção de fármacos, também podem ser avaliadas (ALAM; AL-JENOABI; AL-MOHIZEA, 2011).

O modelo empregando tecido invertido apresenta como vantagens ampla área superficial para absorção e a presença da camada de muco. Além disso, requer pequenas quantidades de substância devido ao volume da amostra na porção serosa ser relativamente pequeno e o fármaco se acumular mais rapidamente. No entanto, a viabilidade do tecido é um dos parâmetros limitantes, devido à falta de fluxo sanguíneo e inervação. A viabilidade do tecido e a atividade metabólica do intestino, em condições fisiológicas, se mantem apenas por aproximadamente duas horas após a segmentação do tecido. Além disso, fatores relacionados aos animais (idade, sexo, espécie, dieta e estado patológico), ao segmento intestinal utilizado (duodeno, jejuno, íleo e cólon) e fatores experimentais, tais como, pH, temperatura e concentração de substância devem ser considerados (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; ALAM; AL-JENOABI; AL-MOHIZEA, 2011).

Ensaio com tecido não invertido

Pequenos segmentos de tecidos intestinais de animais são transferidos para dispositivos bicompartimentais adequados, geralmente câmaras de Ussing (fluxo horizontal) ou células de Franz (fluxo vertical), de modo que a porção mucosa fique voltada para o compartimento doador e a parte serosa para o compartimento receptor. A absorção é medida a partir do aparecimento do fármaco no lado seroso (USSING; ZERAHN, 1951; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

O ensaio com tecido não invertido é ideal para analisar o grau de absorção dos fármacos ao longo de todo o trato gastrointestinal, utilizando porções das várias regiões intestinais.

Também é possível realizar estudos com tecidos intestinais humanos, fornecendo assim um método para a comparação dos valores de permeabilidade entre as espécies (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

As quantidades de fármaco necessárias para o estudo são relativamente pequenas (da ordem de miligramas), possibilitando o uso do ensaio no processo de triagem de novas moléculas (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

No entanto, assim como o ensaio com tecido invertido, há falta de fornecimento sanguíneo e nervoso, perda rápida de viabilidade dos tecidos durante o experimento e mudanças na morfologia e funcionalidade dos transportadores durante o processo de cirurgia e montagem do aparato (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; VOLPE, 2010).

Método *in situ*

A perfusão intestinal *in situ* consiste na perfusão de solução tamponada contendo o fármaco através de segmentos intestinais canulados. Em geral, são utilizados segmentos intestinais de roedores, principalmente, ratos (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Além da determinação da permeabilidade, este método possibilita a análise da cinética de absorção de fármacos, uma vez que a absorção é avaliada com base no desaparecimento do fármaco do lúmen intestinal (DOLUISIO *et al.*, 1969).

Com o intuito de melhorar a previsão da permeabilidade e se aproximar da realidade do organismo humano, diversas variações da técnica de perfusão intestinal *in situ* têm sido desenvolvidas: perfusão intestinal de passagem simples (AMIDON *et al.*, 1981), recirculação de perfusato (VAN REES *et al.*, 1974), oscilação de perfusato (SCHURGERS e DE BLAEY, 1984) e método em circuito fechado ou Doluisio (DOLUISIO *et al.*, 1969). Dentre eles, a perfusão intestinal de passagem simples e o método em circuito fechado ou Doluisio possuem aplicação mais difundida (CALDEIRA *et al.*, 2018).

Na perfusão intestinal de passagem simples, a solução do fármaco é perfundida, através de uma cânula, em 10-15 cm do segmento intestinal de interesse em um fluxo constante. As amostras são coletadas na região distal, na qual o intestino foi canulado, em tempos predeterminados (AMIDON *et al.*, 1981).

No método em circuito fechado ou Doluisio, o segmento intestinal é completamente isolado com duas cânulas no início e no final do segmento. A solução contendo o fármaco é então perfundida e amostras são coletadas em tempos predeterminados. Os resultados são altamente reprodutíveis e produzem valores de permeabilidade plenamente equiparáveis com aqueles calculados a partir da administração oral do fármaco em humanos. Além disso, a técnica

experimental é simples, utiliza equipamentos de laboratório prontamente disponíveis e pequeno volume de solução de perfusão (quando comparado à perfusão intestinal de passagem simples), uma vantagem quando apenas pequenas quantidades de compostos estão disponíveis (DOLUISIO *et al.*, 1969).

O diferencial do método de perfusão intestinal *in situ* para a avaliação da permeabilidade de fármacos é a presença de irrigação sanguínea e inervação, além da capacidade de depuração no local de absorção capaz de mimetizar as condições *in vivo*. Entretanto, algumas limitações são observadas como o fato da absorção estar correlacionada apenas com o desaparecimento do composto a partir do lúmen intestinal, desconsiderando portanto, qualquer metabolismo pré-sistêmico ou luminal presente. Além disso, alterações na camada de água estacionária e fluxo sanguíneo devido à manipulação cirúrgica do intestino, uso de anestesia, e em alguns casos, quantidades elevadas de substância e animais para a realização do teste, são parâmetros que devem ser considerados na escolha do método (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; VOLPE, 2010).

Nos últimos anos, a perfusão intestinal *in situ* com coleta de sangue ganhou foco em estudos de permeabilidade de substâncias. A canulação da veia mesentérica permite determinar o aparecimento dos compostos no sangue e é de grande utilidade, especialmente, quando se avalia a absorção de compostos submetidos ao metabolismo intestinal. Além disso, ratos expressam transportadores intestinais e enzimas do citocromo P450, o que permite o estudo da absorção intestinal de fármacos que são afetadas pelo metabolismo intestinal e pelos transportadores de efluxo. Para alguns compostos, é possível monitorar o aparecimento de metabólitos, provenientes do metabolismo intracelular, no meio de perfusão. Esses metabólitos podem atingir o lúmen intestinal por processos de transporte ativo ou passivo e servem como uma medida do metabolismo (STAPPAERTS *et al.*, 2015, DEZANI *et al.*, 2017).

Portanto, já sabendo do potencial de absorção por via oral da eremantolida C fez-se necessária a determinação da sua permeabilidade empregando a técnica de perfusão intestinal *in situ* em ratos, com o intuito de caracterizar de forma efetiva o mecanismo de permeação apresentado pela substância, incluindo a afinidade da molécula por transportadores, os quais apresentam impacto direto na quantidade de substância absorvida e conseqüentemente na sua biodisponibilidade oral.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Substâncias químicas de referência (SQR)

Aciclovir SQR, fornecida pela Anvisa, proveniente da Farmacopeia Brasileira, lote 1021, teor de 100,0 %.

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

2.2.2 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

Cânulas de vidro

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

Coluna cromatográfica C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm) - Macherey-Nagel

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

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

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

Destilador - Cristófoli

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

Lavadora ultrassônica - Unique

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

Micropipetas monocal canal várias capacidades Pipetman[®] - Gilson

pHmetro - Hanna

Ponteiras plásticas

Seringas plásticas várias capacidades

Sistema de purificação de água Direct-Q₃[®] - Millipore

Torneira de 3 vias - Mark Med[®]

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

Unidade filtrante Chromafil[®] PVDF-45/15 MS 0,45 µm - Macherey-Nagel

2.2.3 Reagentes e solventes

Acetonitrila grau cromatográfico - JTBaker

Ácido acético glacial - Vetec

Ácido clorídrico - Próquímios

Água destilada

Água ultrapura

Azida de sódio - Química moderna

Dimetilsulfóxido (DMSO) - Próquímios

Fosfato de potássio monobásico - Neon

Hidróxido de sódio - Vetec

Metanol grau cromatográfico - JTBaker

2.2.4 Desenvolvimento do método analítico para a quantificação do fármaco padrão de baixa permeabilidade, aciclovir, nos estudos de perfusão intestinal *in situ* em ratos

Visando desenvolver um método analítico por cromatografia a líquido de alta eficiência capaz de quantificar o aciclovir nos estudos de perfusão intestinal *in situ* em ratos, realizou-se uma busca na literatura acerca dos métodos analíticos descritos.

Dados de artigos científicos e monografias farmacopeicas foram compilados e as variações de composição (alterando-se tanto o componente aquoso quanto o componente orgânico) e proporção de fase móvel foram avaliadas.

Na Tabela 2.1 estão descritas as condições cromatográficas avaliadas durante o desenvolvimento do método analítico para quantificação do aciclovir nos estudos de perfusão intestinal *in situ* em ratos. O critério de escolha foi baseado no fator de cauda e no fator e tempo de retenção apresentados para cada uma das condições analisadas.

Tabela 2.1: Condições cromatográficas avaliadas durante o desenvolvimento do método analítico para quantificação do aciclovir nos estudos de perfusão intestinal *in situ* em ratos.

<i>Detector:</i> DAD			
<i>Coluna:</i> C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm) - Macherey-Nagel			
<i>Temperatura:</i> 30,0 °C			
<i>Fluxo:</i> 1,0 mL/minuto			
<i>Volume de injeção:</i> 25,0 µL			
<i>Fase móvel</i>			
<i>Condição 1</i> Acetonitrila:Água	<i>Condição 2</i> Acetonitrila:Água acidificada com ácido acético glacial 0,1 %	<i>Condição 3</i> Metanol:Água	<i>Condição 4</i> Metanol:Água acidificada com ácido acético glacial 0,1 %
<i>Proporção</i> (<i>Solvente orgânico:Solvente aquoso</i>) 5:95 e 3:97			

2.2.5 Validação do método analítico para quantificação do fármaco padrão de baixa permeabilidade, aciclovir, nos estudos de perfusão intestinal *in situ* em ratos

A validação do método analítico para quantificação do aciclovir, nos estudos de perfusão intestinal *in situ* em ratos, foi realizada de acordo com a resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 da Anvisa (BRASIL, 2017).

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

2.2.5.1 Preparo da solução estoque

Foram pesados exatamente 40,0 mg de aciclovir SQR e transferidos para balão volumétrico de 2 mL. O volume foi completado com DMSO e a solução obtida apresentou concentração final de 20,0 mg/mL.

2.2.5.2 Seletividade

A seletividade do método analítico para quantificação do aciclovir nos estudos de perfusão intestinal *in situ* foi avaliada frente às seguintes condições de degradação forçada: temperatura, hidrólise alcalina e hidrólise ácida.

Primeiramente, soluções de aciclovir em fluido intestinal simulado sem enzimas (pH 6,8), na concentração de 120,0 µg/mL, foram colocadas em estufa, sendo expostas a calor seco de 70,0 ± 5,0 °C durante o período de 30 horas.

A hidrólise alcalina, por sua vez, foi avaliada durante o período de 24 horas em temperatura ambiente. Para isso, a 100,0 µL da solução de aciclovir em DMSO, na concentração de 15,0 mg/mL, foram adicionados 100,0 µL do agente degradante NaOH 6,0 mol/L. A solução resultante foi mantida em temperatura ambiente, protegida da luz, durante 24 horas. Após esse período, a solução foi neutralizada com 100,0 µL de HCl 6,0 mol/L. Uma alíquota de 120,0 µL da solução resultante, após a neutralização, foi retirada e diluída em FISSE (pH 6,8), totalizando 5,0 mL de solução contendo aciclovir na concentração de 120,0 µg/mL.

Por fim, foi realizada a hidrólise ácida, seguindo o mesmo protocolo estabelecido para a hidrólise alcalina.

A 100,0 µL da solução de aciclovir em DMSO, na concentração de 15,0 mg/mL, foram adicionados 100,0 µL do agente degradante HCl 6,0 mol/L. A solução resultante foi mantida em temperatura ambiente, protegida da luz, durante 24 horas. Após esse período, a solução foi neutralizada com 100,0 µL de NaOH 6,0 mol/L. Uma alíquota de 120,0 µL da solução resultante após a neutralização foi retirada e diluída em FISSE (pH 6,8), totalizando 5,0 mL de solução contendo aciclovir na concentração de 120,0 µg/mL.

As determinações foram realizadas em triplicada e a seletividade foi atestada por meio da porcentagem de degradação do fármaco frente às condições avaliadas, bem como, pelo cálculo de pureza de pico.

2.2.5.3 Linearidade

A análise da linearidade foi conduzida a partir da construção de curvas analíticas no fluido intestinal simulado sem enzimas (FISSE pH 6,8) utilizando-se sete concentrações de aciclovir que variaram na faixa de 30,0 µg/mL a 200,0 µg/mL.

A proporção de DMSO empregada não foi superior a 1 % do volume total de solução, conforme diluições indicadas na Tabela 2.2. As determinações foram realizadas em triplicata.

Tabela 2.2: Preparo das soluções diluídas em meio FISSE (pH 6,8) utilizadas na avaliação da linearidade do método analítico para quantificação do aciclovir nos estudos de perfusão intestinal *in situ* em ratos.

Alíquota da solução estoque* (mL)	Volume final da solução (mL)	Concentração final (µg/mL)
0,075	50	30,0
0,025	10	50,0
0,040	10	80,0
0,060	10	120,0
0,075	10	150,0
0,090	10	180,0
0,100	10	200,0

*Solução estoque com concentração de 20,0 mg/mL

2.2.5.4 Precisão

A precisão foi analisada por repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (interdia).

Ambas foram determinadas para o aciclovir no meio FISSE (pH 6,8), em três níveis de concentração: baixa (30,0 µg/mL), média (120,0 µg/mL) e alta (200,0 µg/mL), 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 1.2 (página 53) e não foram admitidos valores superiores a 5,0 % (TAVERNIERS; LOOSE; BOCKSTAELE, 2004).

2.2.5.5 Exatidão

Assim como a precisão, a exatidão foi calculada a partir de determinações em três níveis de concentração: baixa (30,0 µg/mL), média (120,0 µg/mL) e alta (200,0 µg/mL), em triplicata, no meio FISSE (pH 6,8).

A exatidão foi determinada de acordo com a fórmula matemática indicada na Equação 1.3 (página 53) e os valores resultantes devem estar compreendidos na faixa de 95,0 a 105,0 % (KUMAR *et al.*, 2012).

2.2.5.6 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados conforme as equações matemáticas descritas em Equação 1.4 (página 53) que levam em consideração dados das curvas analíticas obtidas.

2.2.5.7 Robustez

A robustez do método analítico para a quantificação do aciclovir foi avaliada frente à variação dos seguintes parâmetros: composição e proporção de solventes da fase móvel, fluxo da fase móvel e temperatura do forno da coluna.

Cálculos de precisão e exatidão do método analítico, utilizando a concentração de 120,0 µg/mL de aciclovir no FISSE (pH 6,8), foram realizados com o intuito de avaliar a robustez.

2.2.6 Validação parcial do método analítico para quantificação do fármaco de alta permeabilidade, cloridrato de propranolol, nos estudos de perfusão intestinal *in situ* em ratos

O método analítico para quantificação do cloridrato de propranolol em meios tamponados, dentre eles, o FISSE (pH 6,8), foi previamente desenvolvido e validado por pesquisadores do nosso grupo de pesquisa (MONTEIRO, 2014).

Entretanto, a faixa de trabalho validada (40,0 µg/mL a 160,0 µg/mL), visando os estudos de solubilidade em equilíbrio empregando o método da agitação orbital em frascos, é inadequada para a quantificação do cloridrato de propranolol nos estudos de perfusão intestinal *in situ* em ratos (MONTEIRO, 2014). Ademais, o fato do cloridrato de propranolol apresentar alta solubilidade em meios tamponados possibilita a obtenção da solução estoque, contendo o fármaco, diretamente no FISSE (pH 6,8).

Diante disso, foi realizada a validação parcial do método analítico para quantificação do cloridrato de propranolol em FISSE (pH 6,8), de acordo com a RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 da Anvisa (BRASIL, 2017).

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

2.2.6.1 Preparo da solução estoque

Foram pesados exatamente 10,0 mg de cloridrato de propranolol, SQR e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. O volume foi completado com FISSE (pH 6,8) e a solução obtida apresentou concentração final de 1,0 mg/mL.

2.2.6.2 Linearidade

A análise da linearidade foi conduzida a partir da construção de curvas analíticas no fluido intestinal simulado sem enzimas (FISSE pH 6,8) utilizando-se sete concentrações de cloridrato de propranolol que variaram na faixa de 20,0 µg/mL a 140,0 µg/mL.

O preparo das soluções diluídas, em triplicata, foi realizado conforme descrito na Tabela 2.3.

Tabela 2.3: Preparo das soluções diluídas em meio FISSE (pH 6,8) utilizadas na avaliação da linearidade do método analítico para quantificação do cloridrato de propranolol nos estudos de perfusão intestinal *in situ* em ratos.

Alíquota da solução estoque* (mL)	Volume final da solução (mL)	Concentração final (µg/mL)
0,2	10	20,0
0,4	10	40,0
0,6	10	60,0
0,8	10	80,0
1,0	10	100,0
0,6	5	120,0
0,7	5	140,0

*Solução estoque com concentração de 1,0 mg/mL

2.2.6.3 Precisão

A repetibilidade (precisão intradia) e a precisão intermediária (interdia) foram determinadas para o cloridrato de propranolol no meio FISSE (pH 6,8), em três níveis de concentração: baixa (20,0 µg/mL), média (80,0 µg/mL) e alta (140,0 µg/mL), em triplicata.

A primeira resultou em 9 determinações, enquanto a precisão intermediária resultou em 18 determinações, por ter sido avaliada em dois dias distintos.

A precisão foi calculada conforme a equação matemática apresentada em Equação 1.2 (página 53) e não foram admitidos valores superiores a 5,0 % (TAVERNIERS; LOOSE; BOCKSTAELE, 2004).

2.2.6.4 Exatidão

A exatidão do método analítico para quantificação do cloridrato de propranolol nos estudos de perfusão intestinal *in situ* foi calculada a partir de determinações em três níveis de concentração: baixa (20,0 µg/mL), média (80,0 µg/mL) e alta (140,0 µg/mL), em triplicata, no meio FISSE (pH 6,8), e determinada de acordo com a fórmula matemática indicada na Equação 1.3 (página 53).

Para que um método analítico seja considerado exato, os valores obtidos devem estar compreendidos na faixa de 95,0 a 105,0 % (KUMAR *et al.*, 2012).

2.2.6.5 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados a partir dos dados referentes às curvas analíticas obtidas, conforme as equações matemáticas descritas em Equação 1.4 (página 53).

2.2.7 Validação parcial do método analítico para quantificação da eremantolida C nos estudos de perfusão intestinal *in situ* em ratos

O método analítico para quantificação da eremantolida C em meio tamponado FISSE (pH 6,8), visando os estudos de permeabilidade empregando o PAMPA, foi previamente desenvolvido e validado por pesquisadores do nosso grupo de pesquisa. Entretanto, a faixa de trabalho validada (0,01 mmol/L a 0,325 mmol/L, equivalente a 3,46 µg/mL a 112,45 µg/mL) é inadequada para a quantificação da eremantolida C nos estudos de perfusão intestinal *in situ* em ratos. Ademais, a porcentagem de DMSO empregada no PAMPA foi cinco vezes superior ao preconizado para os estudos de perfusão intestinal *in situ* (CALDEIRA *et al.*, 2017).

Considerando isso, foi realizada a validação parcial do método analítico para quantificação da eremantolida C em FISSE (pH 6,8), de acordo com a RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 da Anvisa (BRASIL, 2017).

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

2.2.7.1 Preparo da solução estoque

Foram pesados exatamente 22,2 mg da amostra contendo eremantolida C a 89,9 % (referente à EREC isolada neste trabalho e caracterizada conforme descrito no item 1.3.1 – Capítulo I) e transferidos para balão volumétrico de 2 mL. O volume foi completado com DMSO e a solução obtida apresentou concentração final de 10,0 mg/mL de eremantolida C.

2.2.7.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada para as duas faixas de trabalho utilizadas para a quantificação da eremantolida C nos estudos de perfusão intestinal *in situ*. Para isso, curvas analíticas no FISSE pH 6,8 foram construídas da seguinte forma:

- primeiro intervalo: seis concentrações de eremantolida C que variaram na faixa de 1,0 µg/mL a 10,0 µg/mL.

- segundo intervalo: seis concentrações de eremantolida C que variaram na faixa de 10,0 µg/mL a 100,0 µg/mL.

A proporção de DMSO empregada não foi superior a 1 % do volume total de solução, conforme diluições indicadas na Tabela 2.4. As determinações foram realizadas em triplicata.

Tabela 2.4: Preparo das soluções diluídas em meio FISSE (pH 6,8) utilizadas na avaliação da linearidade do método analítico para quantificação da eremantolida C nos estudos de perfusão intestinal *in situ* em ratos.

Alíquota da solução estoque* (mL)	Volume final da solução (mL)	Concentração final (µg/mL)
Primeiro intervalo		
0,020	200	1,0
0,020	100	2,0
0,030	50	3,0
0,025	50	2,0
0,035	50	7,0
0,050	50	10,0
Segundo intervalo		
0,050	50	10,0
0,075	50	15,0
0,030	10	30,0
0,045	10	45,0
0,075	10	75,0
0,100	10	100,0

*Solução estoque com concentração de 10,0 mg/mL

2.2.7.3 Precisão

A precisão foi analisada por repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (interdia).

Ambas foram determinadas para a eremantolida C no meio FISSE (pH 6,8), em três níveis de concentração: baixa, média e alta, em triplicata. Sendo 1,0 µg/mL, 5,0 µg/mL e 10,0 µg/mL para o primeiro intervalo de quantificação e 10,0 µg/mL, 45,0 µg/mL e 100,0 µg/mL para o segundo intervalo de quantificação.

Cada faixa de trabalho resultou em 9 determinações para a avaliação da precisão por repetibilidade e 18 determinações para a precisão intermediária, por ter sido avaliada em dois dias diferentes.

A precisão foi calculada conforme a equação matemática apresentada em Equação 1.2 (página 53) e não foram admitidos valores superiores a 5,0 % (TAVERNIERS; LOOSE; BOCKSTAELE, 2004).

2.2.7.4 Exatidão

A exatidão foi calculada a partir de determinações em três níveis de concentração: baixa, média e alta, em triplicata, no meio FISSE (pH 6,8). Sendo 1,0 µg/mL, 5,0 µg/mL e 10,0 µg/mL para o primeiro intervalo de quantificação e 10,0 µg/mL, 45,0 µg/mL e 100,0 µg/mL para o segundo intervalo de quantificação.

A exatidão foi determinada de acordo com a fórmula matemática indicada na Equação 1.3 (página 53) e os resultados obtidos devem estar compreendidos entre 95,0 a 105,0 % (KUMAR *et al.*, 2012).

2.2.7.5 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados, para cada intervalo de quantificação, conforme as equações matemáticas descritas em Equação 1.4 (página 53), levando em consideração dados das curvas analíticas obtidas para as duas faixas de trabalho empregadas.

2.2.8 Interferência do lavado intestinal na quantificação dos fármacos padrão e da eremantolida C nos estudos de perfusão intestinal *in situ* em ratos

Com o intuito de remover todo o conteúdo intestinal, o intestino delgado isolado, nos animais utilizados durante os estudos de perfusão intestinal *in situ*, foi lavado cuidadosamente com a solução de perfusão (fluido intestinal simulado sem enzimas) isenta de fármacos e/ou substância biologicamente ativa.

As soluções de perfusão, após o processo de lavagem, foram coletadas para cada animal, reunidas e homogeneizadas, resultando em um lavado intestinal único.

Alíquotas de 2,0 mL foram retiradas deste lavado intestinal, filtradas, utilizando unidades filtrantes em PVDF de 0,45 µm, diretamente para *vials* para posterior análise por método cromatográfico previamente validado.

Os cromatogramas obtidos, para as amostras do lavado intestinal, foram comparados com os cromatogramas obtidos para os fármacos padrão aciclovir e cloridrato de propranolol, bem como, para a eremantolida C, em FISSE (pH 6,8), com o intuito de verificar possíveis interferências no processo de quantificação das substâncias de interesse.

2.2.9 Perfusão intestinal *in situ* em ratos

A técnica de perfusão intestinal *in situ* em ratos foi empregada de acordo com o treinamento obtido e as atividades desenvolvidas ao longo do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE).

O projeto intitulado “*Determinação da permeabilidade utilizando modelo de perfusão intestinal in situ em ratos aplicado a moléculas biologicamente ativas*” foi desenvolvido sob orientação da Prof^a. Dr^a. Marival Bermejo na Universidad Miguel Hernández, Alicante – Espanha (Anexo B).

A proposta do estudo foi aplicar a técnica de perfusão intestinal *in situ* em ratos para a determinação da permeabilidade da digoxina. Pois, além da impossibilidade de remessa para o exterior da eremantolida C, a digoxina é um fármaco proveniente de origem natural amplamente utilizado na terapêutica para o tratamento da insuficiência cardíaca congestiva, que não apresentava, até o momento, dados conclusivos sobre a permeabilidade em membrana do trato gastrointestinal.

O trabalho desenvolvido durante o PDSE proporcionou a publicação do artigo científico intitulado “*Determination of intestinal permeability using in situ perfusion model in rats: Challenges and advantages to BCS classification applied to digoxin*” na *International Journal of Pharmaceutics* (Anexo D). Além disso, possibilitou a implementação do protocolo experimental relativo à técnica de perfusão intestinal *in situ* em ratos, no Laboratório de Controle de Qualidade, CiPharma/UFOP, para a avaliação da permeabilidade da eremantolida C.

Ratos Wistar machos pesando entre 250 e 300 g foram fornecidos pelo Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e utilizados para a avaliação da perfusão intestinal *in situ* seguindo todas as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFOP sob o número de protocolo 2018/07 (Anexo C).

A permeabilidade efetiva da eremantolida C foi determinada ao longo de todo o intestino delgado utilizando o método de perfusão intestinal em circuito fechado ou método de Doluisio (DOLUISIO *et al.*, 1969).

Para isso foram preparadas soluções de perfusão contendo eremantolida C em fluido intestinal simulado sem enzimas (pH 6,8) nas concentrações de 9,6 µg/mL, 96,0 µg/mL e 960,0 µg/mL, bem como solução de perfusão contendo eremantolida C em fluido intestinal simulado sem enzimas (pH 6,8) na concentração de 9,6 µg/mL na presença de azida sódica 65,0 µg/mL.

O cloridrato de propranolol 0,32 mg/mL e o aciclovir 1,6 mg/mL, ambos preparados em fluido intestinal simulado sem enzimas, foram utilizados como fármacos padrão de alta e baixa permeabilidade, respectivamente.

As soluções de perfusão utilizadas ao longo do experimento apresentaram proporção de DMSO não superior a 1 % do volume total (apenas soluções contendo eremantolida C e aciclovir) e foram mantidas a 37,0 °C até o momento do uso.

Ratos Wistar machos foram contidos manualmente e anestesiados com injeção intraperitoneal de uma mistura contendo cetamina-xilazina (90 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente). Após completa sedação, os animais foram alocados sobre placas cirúrgicas em decúbito dorsal e os membros foram fixados à placa por fita adesiva. Com o intuito de manter o animal anestesiado durante todo o experimento, uma suplementação com um terço da dose inicial da mistura contendo cetamina-xilazina foi administrada por via intraperitoneal aos 25 minutos de experimento.

Uma incisão na linha média abdominal foi realizada para a exposição do intestino delgado completo (aproximadamente 100 cm). O ducto biliar foi identificado e ligado para evitar a liberação de sais biliares no lúmen intestinal. Pequenas incisões com o ângulo de 45° foram realizadas nas extremidades do segmento intestinal, de modo a preservar ao máximo a irrigação sanguínea e inervação local. Cânulas de vidro foram introduzidas em ambas as extremidades e fixadas utilizando fios de nylon.

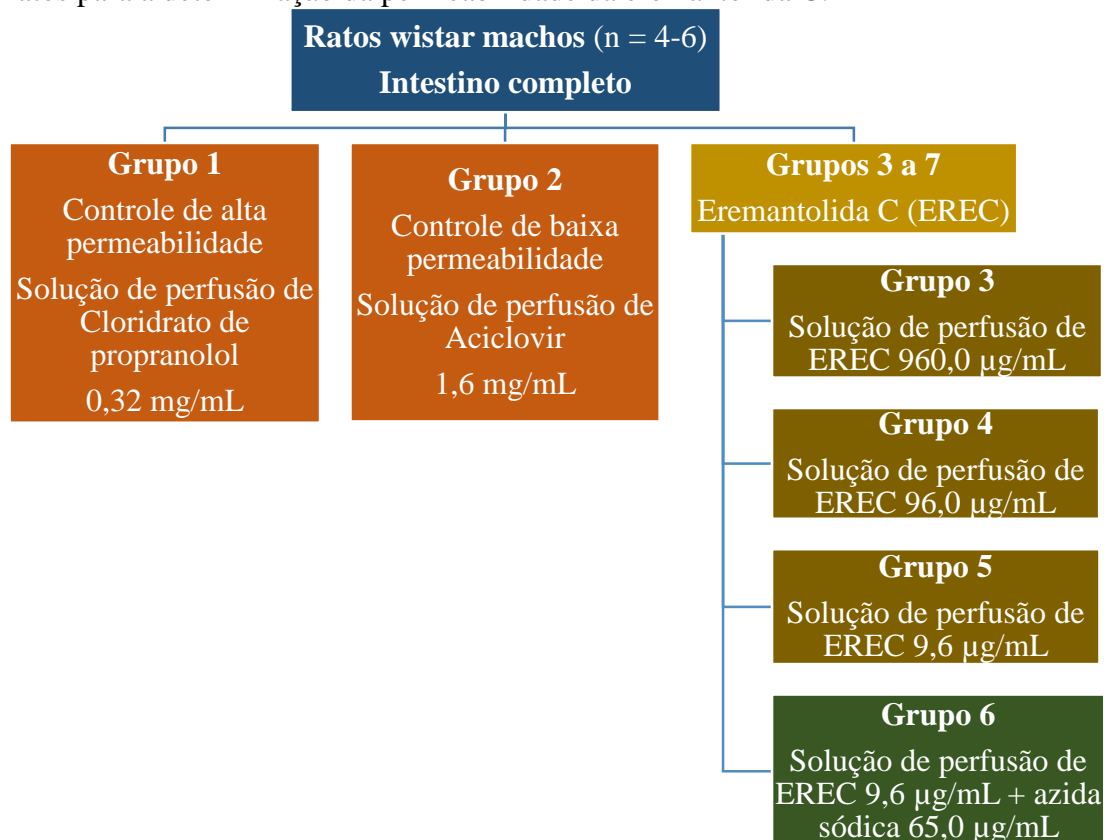
Para remover todo o conteúdo intestinal, o intestino delgado isolado foi lavado cuidadosamente com a solução de perfusão (fluido intestinal simulado sem enzimas) isenta de fármacos e/ou substância biologicamente ativa. Após completa remoção do conteúdo intestinal, seringas conectadas a torneiras de três vias foram acopladas às cânulas e 10,0 mL da solução de perfusão contendo o fármaco ou a substância biologicamente ativa foi introduzida diretamente no segmento intestinal. Alíquotas de 200,0 µL da solução de perfusão foram coletadas a cada 5 minutos durante 30 minutos, alternando-se a extremidade da coleta.

Ao final do experimento, os animais ainda anestesiados, foram eutanasiados pela administração por via intraperitoneal de sobredosagem da associação de cetamina-xilazina (270 mg/kg e 30 mg/kg, respectivamente).

As amostras das soluções de perfusão coletadas foram filtradas em unidades filtrantes em PVDF de 0,45 µm e levadas para quantificação por método cromatográfico previamente validado. Além disso, a solução de perfusão restante no intestino foi coletada para avaliar o grau de absorção de água apresentado pelo animal.

No Fluxograma 2.1 está descrito os grupos experimentais utilizados na perfusão intestinal *in situ* em ratos para a determinação da permeabilidade da eremantolida C.

Fluxograma 2.1: Descrição dos grupos experimentais utilizados na perfusão intestinal *in situ* em ratos para a determinação da permeabilidade da eremantolida C.



2.2.10 Análise dos resultados

Para o cálculo de permeabilidade efetiva, alguns parâmetros devem ser levados em consideração.

Primeiramente, é necessário realizar o cálculo de reabsorção de água apresentada pelo animal. A reabsorção de água foi caracterizada como um processo aparente de ordem zero e a constante de reabsorção de água (k_0) foi calculada conforme descrito na Equação 2.1 (MARTIN-VILLODRE *et al.*, 1986; LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2015b; CALDEIRA *et al.*, 2018).

Equação 2.1: Fórmula matemática utilizada para o cálculo da constante de reabsorção de água.

$$k_0 = \frac{V_0 - V_{final}}{t_{final}}$$

Onde: V_0 – volume da solução de perfusão introduzido no segmento intestinal no início do experimento;

V_{final} – volume da solução de perfusão medido ao final do experimento;

t_{final} – tempo total do experimento (30 minutos).

O valor de k_0 foi usado para estimar o volume restante de água em cada tempo de coleta (V_t). Assim, a concentração experimental (C_e) foi corrigida em cada tempo de coleta usando a Equação 2.2 (MARTIN-VILLODRE *et al.*, 1986; BERMEJO *et al.*, 1999; TUGCU-DEMIROZ *et al.*, 2014; LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2015b; CALDEIRA *et al.*, 2018).

Equação 2.2: Fórmula matemática utilizada para o cálculo da concentração experimental real do fármaco ou substância biologicamente ativa.

$$C_t = C_e \cdot \frac{V_t}{V_0}$$

Onde: C_t – concentração do fármaco ou substância biologicamente ativa na ausência de reabsorção de água no tempo t ;

C_e – concentração experimental real;

V_t – volume restante de água em cada tempo de coleta;

V_0 – volume da solução de perfusão introduzido no segmento intestinal no início do experimento.

* Valores corrigidos de C_t foram usados para calcular os coeficientes da velocidade de absorção

A constante de velocidade de absorção (k_a) foi determinada por análise da regressão não linear das concentrações remanescentes de fármaco ou substância biologicamente ativa no lúmen do segmento intestinal (C_t) *versus* tempo, conforme indicado na Equação 2.3 (MARTIN-VILLODRE *et al.*, 1986; LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2015b; CALDEIRA *et al.*, 2018).

Equação 2.3: Fórmula matemática utilizada para o cálculo da constante de velocidade de absorção.

$$C_t = C_0 \cdot e^{-k_a \cdot t}$$

A partir do valor obtido para a constante de velocidade de absorção (k_a) foi possível calcular a permeabilidade efetiva (P_{eff}) utilizando a Equação 2.4 (TUGCU-DEMIROZ *et al.*, 2014; LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2015b; CALDEIRA *et al.*, 2018).

Equação 2.4: Fórmula matemática utilizada para o cálculo da permeabilidade efetiva.

$$P_{\text{eff}} = \frac{k_a \cdot r}{2}$$

Onde: k_a – constante de velocidade de absorção;
 r – raio do segmento intestinal.

O raio foi calculado considerando o segmento intestinal como um cilindro (Volume = $\pi r^2 h$). A estimativa foi feita admitindo-se 100,0 cm para o comprimento e utilizando o volume da solução de perfusão introduzida no segmento intestinal no início do experimento (10,0 mL).

Os valores encontrados para a permeabilidade efetiva permitem estimar a fração do fármaco ou substância biologicamente ativa que é absorvida em humanos, empregando a Equação 2.5 (LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2015b).

Equação 2.5: Fórmula matemática utilizada para a estimativa da fração absorvida em humanos.

$$F_{\text{abs}} = 1 - e^{-P_{\text{eff}} \frac{2}{r} \cdot t}$$

Onde: P_{eff} – permeabilidade efetiva em cm/s;
 r – raio do segmento intestinal em cm;
 t – tempo total do experimento em segundos.

2.2.11 Análise estatística

O tratamento estatístico dos resultados foi realizado utilizando análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, empregando o GraphPad Prism® 5.01. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Desenvolvimento do método analítico para a quantificação do fármaco padrão de baixa permeabilidade, aciclovir, nos estudos de perfusão intestinal *in situ* em ratos

Na Farmacopeia Brasileira 5ª Edição e na Farmacopeia Americana 40ª Edição é preconizado que o aciclovir seja quantificado por cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção no ultravioleta (254 nm) utilizando como fase móvel uma mistura de água e ácido acético glacial (100:0,1) (BRASIL, 2010b; UNITED STATES, 2017).

Os artigos científicos compilados a partir de bases de dados, por sua vez, apresentaram maior variabilidade quanto às condições cromatográficas empregadas para a quantificação do aciclovir. As informações encontradas estão descritas na Tabela 2.5.

Tabela 2.5: Descrição das condições cromatográficas encontradas na literatura para a quantificação do aciclovir.

Referência	Parâmetro					
	Coluna	Fase móvel	Fluxo (mL/minuto)	Volume de injeção (µL)	Temperatura (°C)	Deteção
1 e 2	C18 250 x 4,6 mm; 5,0 a 10,0 µm	Água:Ácido acético glacial (100:0,1)	3,0	20,0	-	UV-254 nm
3	C18 250 x 4 mm; 5,0 µm	ACN:Água (5:95), pH 3,1	1,0	20,0	25,0	UV-290 nm
4	C8 250 x 4 mm; 5,0 µm	ACN:Acetato de amônio 0,05 mol/L (1:99)	1,0	100,0	20,0	UV-252 nm
5	C8 50 x 1 mm; 1,8 µm	Metanol:Água (95:5)	0,3	3,0	40,0	Massas
6	C18 150 x 3,9 mm; 4,0 µm	Metanol:Fosfato dissódico 0,01 mol/L contendo octanosulfonato de sódio 0,01 mol/L (7:93), pH 2,8	1,0	130,0	40,0	UV-250

Referências: (1) BRASIL, 2010b; (2) UNITED STATES, 2017; (3) FERNÁNDEZ; BARCIA; NEGRO, 2009; (4) JALÓN *et al.*, 2002; (5) SCHIMEK *et al.*, 2018; (6) SWART; HUNDT; GROENEWALD, 1994.

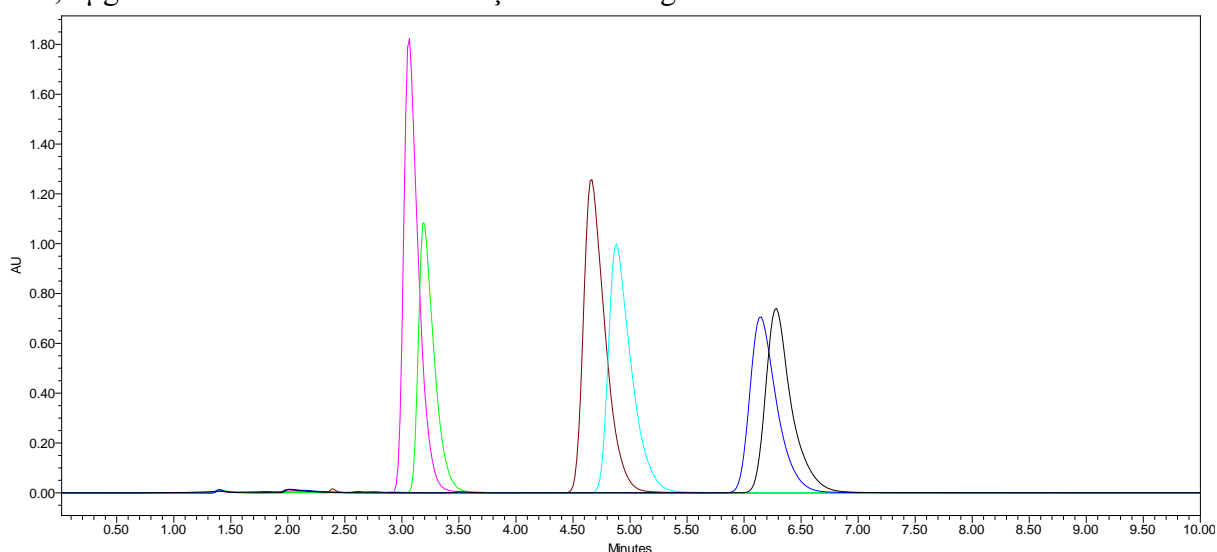
A partir dos dados compilados de artigos científicos e monografias farmacopeicas verificou-se que, em geral, a quantificação do aciclovir era realizada utilizando cromatografia

a líquido de alta eficiência empregando fase móvel composta por água, acidificada ou não, e um solvente orgânico.

Diante disso, durante o desenvolvimento do método analítico para a quantificação do aciclovir em FISSE (pH 6,8) utilizou-se misturas contendo: metanol:água; metanol:água acidificada 0,1 %; acetonitrila:água e acetonitrila:água acidificada 0,1 %.

Os cromatogramas obtidos frente às condições cromatográficas avaliadas estão descritos na Figuras 2.2.

Figura 2.2: Cromatogramas obtidos para o aciclovir em FISSE (pH 6,8) na concentração de 100,0 µg/mL frente a diferentes condições cromatográficas.



Em: rosa – Acetonitrila:Água acidificada 0,1 % (5:95)
verde – Acetonitrila:Água (5:95)
marrom – Acetonitrila:Água acidificada 0,1 % (3:97)
azul claro – Acetonitrila:Água (3:97)
azul escuro – Metanol:Água acidificada 0,1 % (5:95)
preto – Metanol:Água (5:95)

A escolha da fase móvel a ser utilizada para a quantificação do aciclovir nos estudos de perfusão intestinal *in situ* foi atribuída à análise dos parâmetros fator de cauda, tempo de retenção e fator de retenção (Tabela 2.6).

Tabela 2.6: Parâmetros cromatográficos: fator de cauda, tempo de retenção e fator de retenção obtidos nas seis condições avaliadas.

Fase móvel Proporção	Metanol:Água 5:95		Metanol:Água acidificada 0,1 % *	
Parâmetros				
<i>Fator de cauda</i>	1,75		1,75	
<i>Tempo de retenção</i>	6,2 minutos		6,1 minutos	
<i>Fator de retenção</i>	3,43		3,36	
Fase móvel Proporção	Acetonitrila:Água 5:95 3:97		Acetonitrila:Água acidificada 0,1 % *	
Parâmetros				
<i>Fator de cauda</i>	1,25	1,75	1,0	1,5
<i>Tempo de retenção</i>	3,1 minutos	4,9 minutos	3,0 minutos	4,6 minutos
<i>Fator de retenção</i>	1,21	2,50	1,14	2,29

* O ácido acético glacial foi utilizado para a acidificação da fase aquosa.

O tempo de retenção em cromatografia é característico da substância analisada, entretanto não é exclusivo, podendo, portanto, apresentar variabilidade devido ao uso de diferentes solventes e reagentes, e ainda, entre equipamentos. Considerando isso, além da análise do tempo é necessário avaliar o fator de retenção (BRASIL, 2010a).

O fator de retenção é a razão entre a quantidade da substância com afinidade pela fase estacionária e a quantidade com afinidade pela fase móvel. O cálculo é realizado correlacionando o tempo de retenção e o tempo morto. Dessa forma, quanto maior a afinidade da substância pela fase estacionária maior o seu fator de retenção (BRASIL, 2010a). Idealmente, as análises cromatográficas devem ser realizadas sob condições que proporcionam fatores de retenção na faixa de 1 a 5 (SKOOG *et al.*, 2006).

O fator de cauda indica a simetria do pico e apresenta valor igual a 1 quando o pico é perfeitamente simétrico. A medida que o pico se torna assimétrico, os valores para este fator tendem a aumentar (BRASIL, 2010).

A fase móvel composta tanto por metanol:água quanto por metanol:água acidificada 0,1 % forneceram adequados tempo e fator de retenção, entretanto observa-se o maior fator de cauda dentre todas as condições avaliadas, indicando portanto, que essa condição cromatográfica acarreta em picos assimétricos, o que pode gerar interpretações errôneas durante a avaliação da quantificação.

Quando há troca do solvente orgânico para acetonitrila, há melhora de todos os parâmetros cromatográficos.

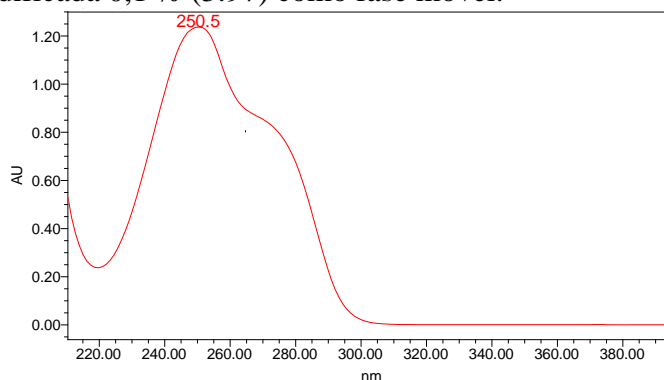
Acetonitrila:água acidificada 0,1 % (5:95) foi a composição de fase móvel que apresentou a melhor simetria de pico, com o fator de cauda igual a 1. Entretanto, demonstrou tempo de

retenção de 3,0 minutos, valor mais próximo ao tempo morto, o qual não é adequado, pois pode ocasionar em problemas na quantificação da substância de interesse devido à presença de possíveis interferentes.

Diante disso, optou-se por escolher a fase móvel composta por acetonitrila:água acidificada 0,1 % (3:97). Apesar de demonstrar um fator de cauda de 1,5, apresentou tempo e fator de retenção iguais a 4,6 minutos e 2,29, respectivamente.

O espectro no ultravioleta foi então extraído a partir da análise por detector de fotodiodos, com o intuito de selecionar o comprimento de onda em que o aciclovir apresentou máximo de absorção, e assim, proporcionar a maior sensibilidade possível ao método analítico durante a quantificação da substância nos estudos de perfusão intestinal *in situ* (Figura 2.3).

Figura 2.3: Espectro de absorção no ultravioleta extraído por CLAE-DAD demonstrando o comprimento de onda em que o aciclovir apresentou máximo de absorção, utilizando acetonitrila:água acidificada 0,1 % (3:97) como fase móvel.



Os demais parâmetros cromatográficos fixados foram definidos com base na coleta de dados realizada.

Diante de todo o exposto, as condições cromatográficas escolhidas para a quantificação do aciclovir em meio FISSE (pH 6,8), visando os estudos de perfusão intestinal *in situ*, estão apresentados no Quadro 2.1.

Quadro 2.1: Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação do aciclovir em FISSE (pH 6,8).

Detector: DAD – 250 nm
Coluna: C18 (150 x 4,6 mm; 5µm)
Temperatura: 30,0°C
Fluxo: 1,0 mL/minuto
Volume de injeção: 25,0 µL
Fase móvel: Acetonitrila:Água acidificada 0,1 % (3:97)

2.3.2 Validação do método analítico para quantificação do fármaco padrão de baixa permeabilidade, aciclovir, nos estudos de perfusão intestinal *in situ* em ratos

A validação de um método analítico é realizada com o intuito de garantir a geração de dados confiáveis e reprodutíveis para atender a um objetivo proposto.

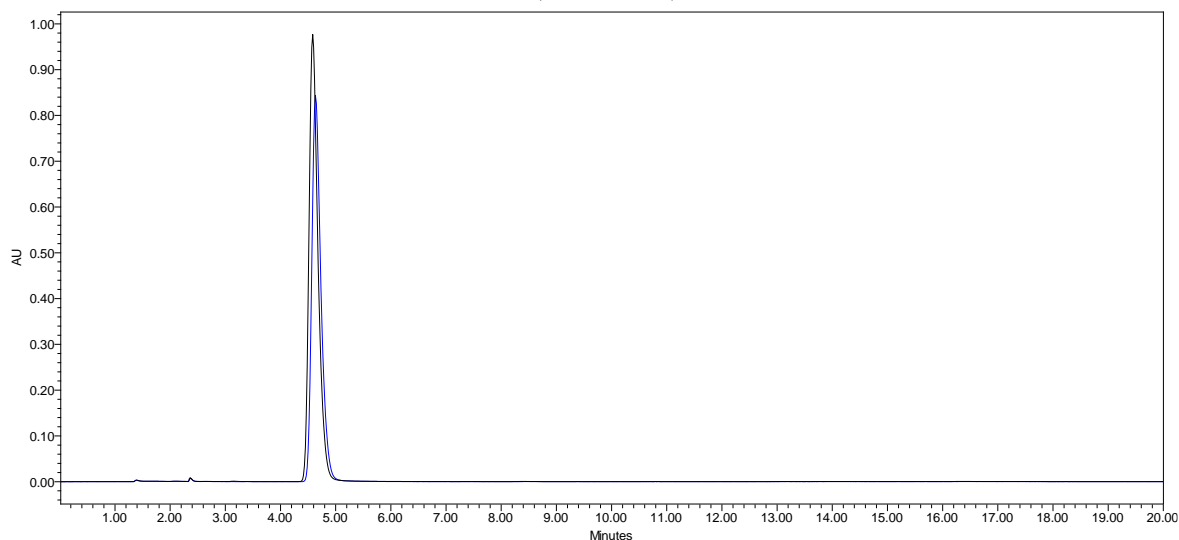
Dessa forma, a validação do método analítico para a quantificação do aciclovir em meio FISSE (pH 6,8), visando os estudos de perfusão intestinal *in situ*, foi realizada avaliando-se os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação e robustez.

2.3.2.1 Seletividade

Um método analítico é considerado seletivo quando demonstra capacidade de identificar e/ou quantificar o analito de interesse, de forma inequívoca, na presença de demais componentes que podem estar presentes na amostra, tais como, impurezas, diluentes e componentes da matriz (BRASIL, 2017).

A comprovação da seletividade do método analítico frente ao calor seco de $70,0 \pm 5,0$ °C durante 30 horas está indicada na Figura 2.4.

Figura 2.4: Cromatograma obtido para a solução de aciclovir em FISSE (pH 6,8) na concentração de $120,0 \mu\text{g/mL}$. Em preto antes da exposição às condições drásticas e em azul após submissão da amostra a $70,0 \pm 5,0$ °C (calor seco) durante 30 horas.



Conforme observado, houve decaimento médio de 12,64 % da concentração do fármaco em solução. Apesar disso, picos secundários provenientes da formação de produtos de degradação não foram detectados.

A análise de pureza de pico resultou em um ângulo de pureza (0,079) inferior ao ângulo limite (0,276), indicando que não há qualquer coeluição com o aciclovir nas condições cromatográficas estabelecidas.

Por sua vez, na Figura 2.5 e na Figura 2.6 estão indicadas a seletividade do método analítico frente às condições de degradação alcalina e ácida, respectivamente.

Figura 2.5: Cromatograma obtido para a solução de aciclovir em FISSE (pH 6,8) na concentração de 120,0 µg/mL. Em preto antes da exposição às condições drásticas e em azul após submissão da amostra à degradação alcalina, em temperatura ambiente, durante 24 horas.

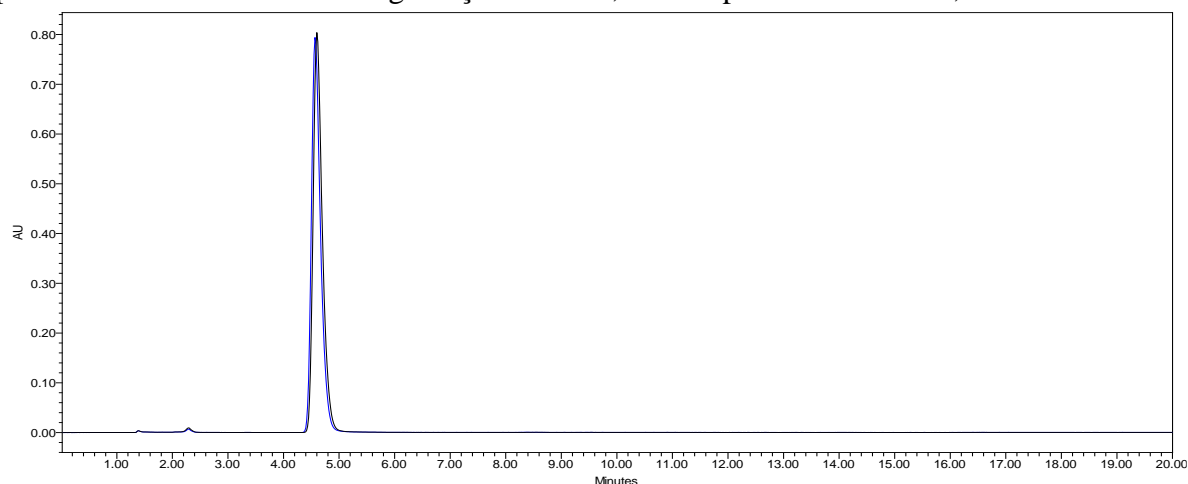
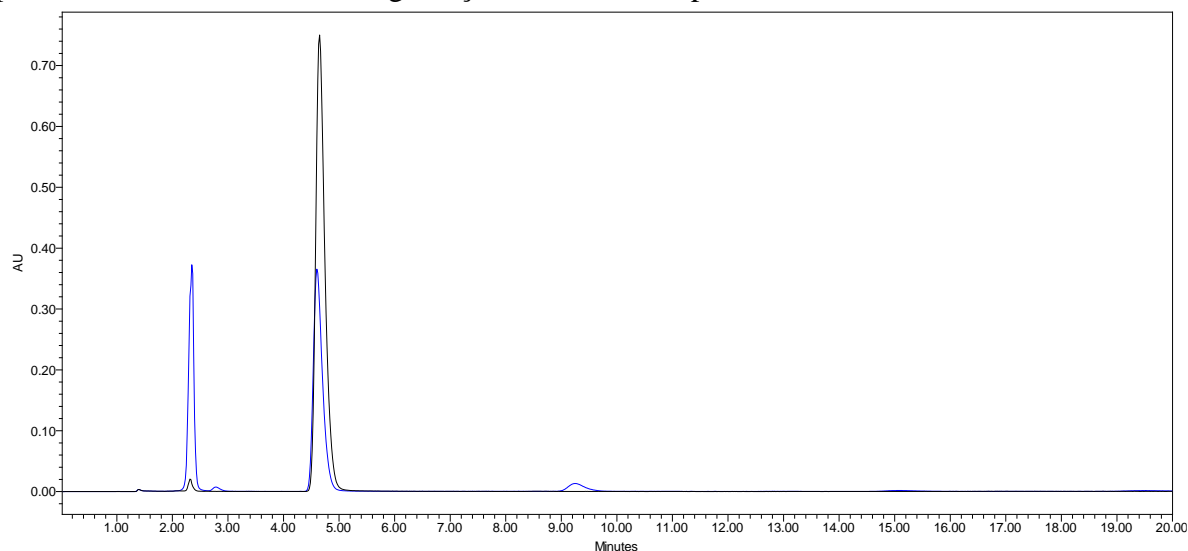


Figura 2.6: Cromatograma obtido para a solução de aciclovir em FISSE (pH 6,8) na concentração de 120,0 µg/mL. Em preto antes da exposição às condições drásticas e em azul após submissão da amostra à degradação ácida, em temperatura ambiente, durante 24 horas.



Conforme demonstrado, houve decaimento médio de 2,58 % da concentração do fármaco em solução frente às condições de degradação alcalina e 51,42 % frente à degradação ácida, observando-se a formação de picos secundários somente nesta segunda condição.

Assim como para a temperatura, a seletividade do método analítico foi atestada por meio da análise de pureza de pico. Tanto para condições de degradação ácida, quanto para condições de degradação alcalina, os ângulos de pureza obtidos para o aciclovir: 0,073 e 1,527, respectivamente, foram inferiores aos valores de ângulos limites calculados (0,280 para a degradação ácida e 1,988 para a degradação alcalina).

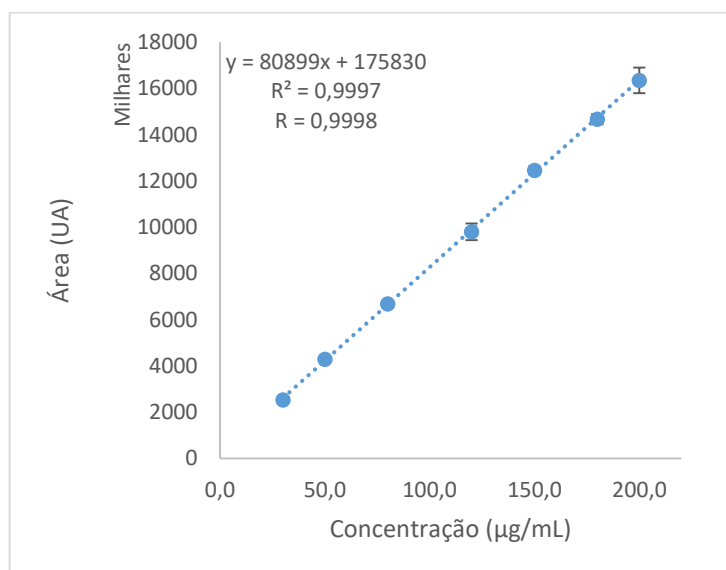
Diante disso, o método para a quantificação do aciclovir em meio FISSE (pH 6,8) mostrou-se seletivo, uma vez que houve decaimento da concentração do fármaco e/ou aparecimento de picos secundários (indicativo de formação de produtos de degradação) após as condições extremas a qual foi submetido. Ademais, todos os valores para os ângulos de pureza obtidos foram inferiores aos seus respectivos ângulos limites, demonstrando que no tempo de retenção de 4,6 minutos ocorre apenas a eluição do fármaco de interesse, aciclovir.

2.3.2.2 Linearidade

A linearidade do método analítico para a quantificação do aciclovir nos estudos de perfusão intestinal *in situ* foi determinada utilizando análises estatísticas e matemáticas de modo que o coeficiente de correlação (R) obtido seja superior a 0,9900 e o coeficiente angular, significativamente diferente de zero (BRASIL, 2017).

Na Figura 2.7 está demonstrada a curva analítica média obtida a partir da análise do aciclovir em meio FISSE (pH 6,8).

Figura 2.7: Curva analítica média (n=3) obtida para a avaliação da linearidade do método analítico para quantificação do aciclovir em FISSE (pH 6,8), visando os estudos de perfusão intestinal *in situ*.



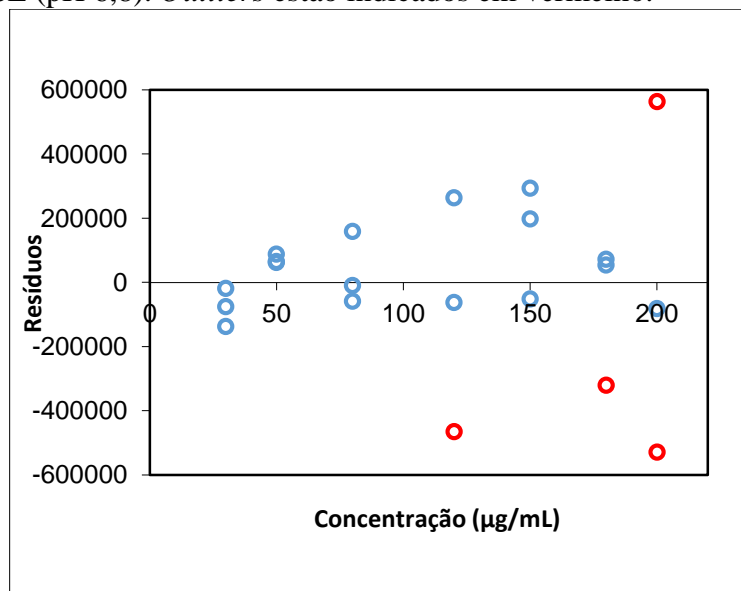
O método analítico para a quantificação do aciclovir demonstrou linearidade dentro da faixa de trabalho de 30,0 a 200,0 $\mu\text{g/mL}$, pois apresentou coeficientes de correlação (R) e determinação (R^2) superiores a 0,9900, e coeficiente angular ($175830 \pm 121148,50$) significativamente diferente de zero ($p < 0,0001$).

Além disso, foi realizada a análise estatística dos resíduos da regressão linear, bem como a análise das premissas relativas à regressão, a fim de posteriormente, verificar a adequação do ajuste ao modelo linear por meio da avaliação da significância da regressão e do desvio de linearidade, utilizando ANOVA.

A análise dos resíduos foi conduzida por meio do teste de resíduos padronizados *Jackknife*, no qual o número de valores extremos ou discrepantes, denominados *outliers*, deve corresponder no máximo a 22,2 % do total de valores originais das curvas analíticas (SOUZA *et al.*, 2007).

Durante a análise dos resíduos da regressão linear para quantificação do aciclovir em FISSE (pH 6,8) foram detectados quatro valores extremos, conforme representação gráfica na Figura 2.8, indicando que a distribuição e a qualidade dos dados estão adequadas ao objetivo proposto (BURKE, 2001; SOUZA *et al.*, 2007).

Figura 2.8: Gráfico de resíduos da regressão linear do método analítico para quantificação do aciclovir em FISSE (pH 6,8). *Outliers* estão indicados em vermelho.



As premissas normalidade, homocedasticidade e independência foram avaliadas de acordo com os testes de *Ryan-Joiner*, *Brown-Forsythe* e *Durbin-Watson*, respectivamente, visando verificar a distribuição normal, a variância constante e a independência entre os resíduos.

Após a avaliação das premissas, a significância da regressão, bem como o desvio da linearidade, foram analisados a partir do Teste F (ANOVA). Os resultados obtidos, adotando um nível de significância de 5,0 %, foram compilados na Tabela 2.7.

Tabela 2.7: Valores encontrados para as premissas dos resíduos da regressão linear, significância da regressão e desvio da linearidade provenientes das curvas analíticas obtidas para a quantificação do aciclovir em FISSE (pH 6,8).

Parâmetro	Valor de referência	Valor encontrado
Normalidade	Maior que 0,9437	0,9822
Homocedasticidade	Menor que 2,131	1,5300
Independência	Entre 1,3805 e 2,6195	1,8201
	F calculado	F crítico
Significância da regressão*	23040,16	4,5431
Desvio da linearidade**	1,1220	3,3258

**F calculado* deve ser maior que *F crítico*.

** *F calculado* deve ser menor que *F crítico*.

Após os dados expostos, o método para quantificação do aciclovir em FISSE (pH 6,8), dentro do intervalo de 30, a 200,0 µg/mL, foi considerado linear, uma vez que, cumpriu com todos os requisitos necessários.

2.3.2.3 Precisão

A precisão foi realizada em dois níveis: intradia (repetibilidade) e interdía (precisão intermediária) com o intuito de avaliar a proximidade entre os resultados obtidos para as amostras preparadas conforme descrito no método analítico (BRASIL, 2017).

Foram obtidas 9 determinações para a avaliação da precisão intradia e 27 determinações para a interdía, devido esta última ter sido realizada em três dias diferentes.

Os valores de desvio padrão relativo (DPR%) estão listados na Tabela 2.8.

Tabela 2.8: Precisão intradia (n=3) e interdía (n=9) do método analítico para quantificação do aciclovir em FISSE (pH 6,8), visando os estudos de perfusão intestinal *in situ*.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental média (µg/mL) (n=3)	Precisão (DPR%) Intradia	Concentração experimental média (µg/mL) (n=9)	Precisão (DPR%) Interdia
30,0	29,04	2,53	29,00	2,47
120,0	118,91	3,80	118,63	3,02
200,0	199,80	3,40	200,51	3,11

Os critérios de aceitação para a precisão devem ser definidos baseados nos seguintes critérios: objetivo e variabilidade intrínseca do método e concentração de trabalho e do analito na amostra (BRASIL, 2017).

Para esses casos, uma precisão mínima de 5,0 % deve ser requerida como critério de adequação e desempenho do método analítico à finalidade proposta (TAVERNIERS; LOOSE; BOCKSTAELE, 2004).

Diante disso, os valores de DPR% encontrados, tanto para a precisão intradia quanto para a interdia, foram inferiores a 5,0 %, atestando portanto, a precisão do método analítico para quantificação do aciclovir.

2.3.2.4 Exatidão

A relação entre os valores obtidos para a concentração média experimental e as concentrações teóricas foi avaliada em três níveis: baixo, médio e alto, de forma que o intervalo proposto para a quantificação do aciclovir fosse contemplado.

Na Tabela 2.9 estão compilados os valores encontrados para a exatidão do método analítico para quantificação do aciclovir em FISSE (pH 6,8).

Tabela 2.9: Exatidão (%) do método analítico para quantificação do aciclovir em FISSE (pH 6,8), visando os estudos de perfusão intestinal *in situ* (n=3).

Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental média ($\mu\text{g/mL}$) (n=3)	Exatidão (%)
30,0	29,04	96,80
120,0	118,91	99,09
200,0	199,80	99,90

Os critérios de aceitação para a exatidão são os mesmos requeridos para a precisão, sendo um método considerado exato, quando apresenta valores de exatidão compreendidos entre 95,0 e 105,0 % (KUMAR *et al.*, 2012).

O método analítico para quantificação do aciclovir nos estudos de perfusão intestinal *in situ* foi considerado exato, uma vez que os valores obtidos para a exatidão se mantiveram dentro do intervalo limite de 95,0 a 105,0 % (KUMAR *et al.*, 2012).

2.3.2.5 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) do método analítico, ou seja, a menor concentração de aciclovir que o método é capaz de detectar, porém, não necessariamente quantificar, foi de 4,49 $\mu\text{g/mL}$. Enquanto que a menor quantidade de aciclovir que pode ser determinada com precisão

e exatidão sob as condições experimentais estabelecidas (limite de quantificação) foi de 14,98 µg/mL.

Os valores encontrados para ambos os limites indicam que o intervalo proposto para quantificação do aciclovir em FISSE (pH 6,8) está de acordo com a finalidade proposta, uma vez que o menor ponto da curva analítica (30,0 µg/mL) é superior ao limite de quantificação calculado, indicando, portanto, que todos os pontos da curva são quantificados com precisão e exatidão.

2.3.2.6 Robustez

A robustez indica a capacidade que um método analítico tem de resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas, e assim, continuar oferecendo confiabilidade nos resultados gerados (BRASIL, 2017).

A robustez do método analítico para quantificação do aciclovir em FISSE (pH 6,8) foi determinada por meio de análises de amostras do fármaco na concentração de 120,0 µg/mL. 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 (TAVERNIERS; LOOSE; BOCKSTAELE, 2004; KUMAR *et al.*, 2012).

O método analítico foi avaliado diante de quatro variáveis: temperatura do forno da coluna, fluxo da fase móvel e composição e proporção de solventes da fase móvel, com o intuito de verificar a sua sensibilidade.

Na Tabela 2.10 estão apresentados os resultados obtidos de precisão e exatidão para cada variação a qual o método analítico foi submetido.

Tabela 2.10: Resultados de precisão e exatidão obtidos para a determinação da robustez do método analítico para quantificação do aciclovir em FISSE (pH 6,8) (n=3).

Parâmetro	Variação	Precisão (DPR%)	Exatidão (%)
<i>Temperatura</i> (°C)	29	3,47	99,40
	31	3,50	98,62
<i>Fluxo</i> (mL/minuto)	0,9	3,44	109,75
	1,1	3,55	89,41
<i>Proporção da fase móvel</i> Acetonitrila:Água acidificada 0,1 % (%)	2:98	3,53	98,47
	4:96	3,46	98,73
<i>Composição da fase móvel</i> Acetonitrila:Água acidificada (3:97)	Água acidificada 0,09 %	3,69	98,54
	Água acidificada 0,11 %	3,63	98,65

Em vermelho, valores que estão fora do limite preconizado.

De acordo com a RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 da Anvisa, o impacto das variações propostas nos resultados obtidos deve ser avaliado com os mesmos critérios utilizados para a exatidão (BRASIL, 2017). Diante disso, observou-se que uma diminuição ou um aumento do fluxo da fase móvel ocasionou na perda de exatidão do método analítico. Este parâmetro, portanto, deve ser rigorosamente controlado durante a quantificação do aciclovir em FISSE (pH 6,8), de modo a gerar dados confiáveis e reprodutíveis durante a análise.

Para os demais parâmetros: temperatura do forno da coluna, proporção e composição da fase móvel o método analítico foi considerado robusto.

2.3.3 Validação parcial do método analítico para quantificação do fármaco de alta permeabilidade, cloridrato de propranolol, nos estudos de perfusão intestinal *in situ* em ratos

A validação parcial do método analítico para a quantificação do cloridrato de propranolol em FISSE (pH 6,8), visando os estudos de perfusão intestinal *in situ*, foi realizada por meio da análise dos seguintes parâmetros: linearidade, precisão, exatidão e limites de detecção e quantificação, utilizando as condições cromatográficas descritas no Quadro 2.2 (MONTEIRO, 2014).

Quadro 2.2: Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação do cloridrato de propranolol em FISSE (pH 6,8) (MONTEIRO, 2014).

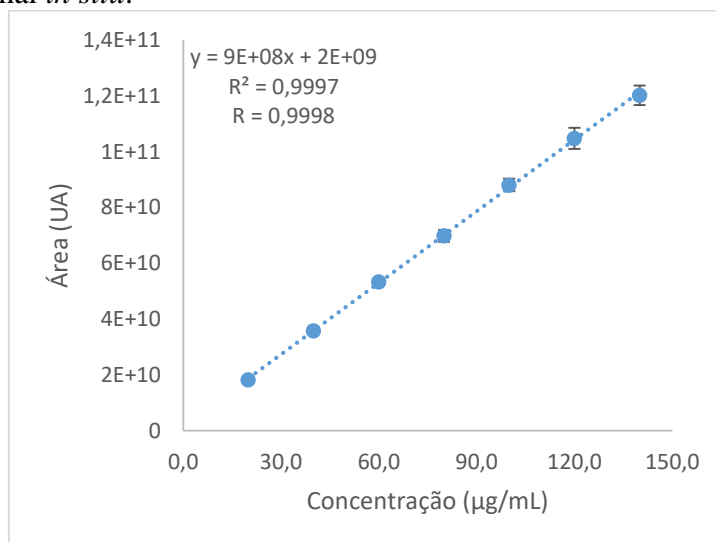
Detector: FLU- Excitação: 290 nm/Emissão: 358 nm
Coluna: C18 (50 x 4,6 mm; 5 μ m)
Temperatura: 25,0°C
Fluxo: 1,0 mL/minuto
Volume de injeção: 8,0 μ L
Fase móvel: Acetonitrila:Tampão fosfato 40 mmol/L (28:72)

2.3.3.1 Linearidade

A linearidade do método analítico para quantificação do cloridrato de propranolol em FISSE (pH 6,8) foi determinada por meio de análises estatísticas e matemáticas do coeficiente de correlação (R) e do coeficiente angular. O primeiro deve apresentar valor superior a 0,9900, enquanto o segundo, ser significativamente diferente de zero (BRASIL, 2017).

Na Figura 2.9 está demonstrada a curva analítica média obtida a partir da quantificação do cloridrato de propranolol em FISSE (pH 6,8).

Figura 2.9: Curva analítica média (n=3) obtida para a avaliação da linearidade do método analítico para quantificação do cloridrato de propranolol em FISSE (pH 6,8), visando os estudos de perfusão intestinal *in situ*.



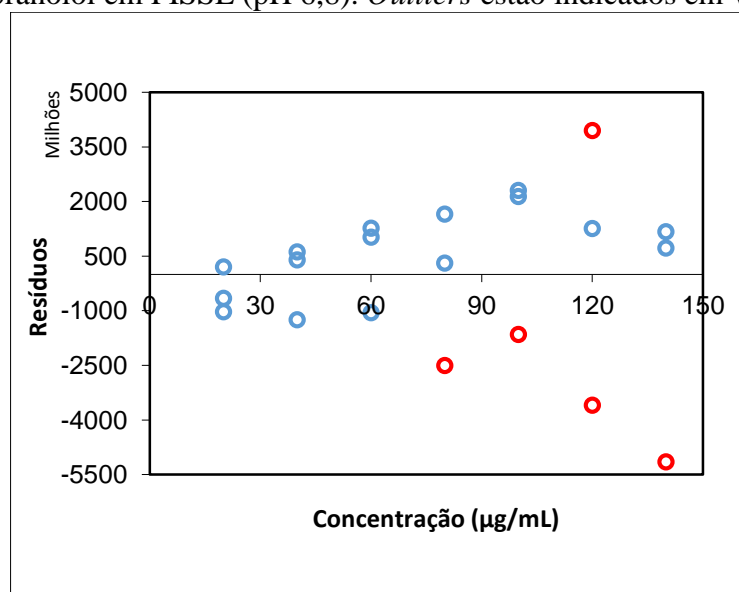
O método analítico para a quantificação do cloridrato de propranolol em FISSE (pH 6,8) apresentou linearidade para a faixa de trabalho que variou de 20,0 a 140,0 μ g/mL, uma vez que, exibiu coeficientes de correlação (R) e determinação (R^2) superiores a 0,9900, e coeficientes angulares ($2,0 \times 10^9 \pm 3,0 \times 10^8$) significativamente diferente de zero ($p < 0,0001$).

Além disso, para uma análise completa da linearidade do método analítico, foi realizada a análise estatística dos resíduos da regressão linear, bem como a avaliação das premissas relativas à regressão. Em seguida, a adequação do ajuste ao modelo linear foi verificado por meio da avaliação da significância da regressão e do desvio de linearidade.

A partir do teste de resíduos padronizados *Jacknife* (SOUZA *et al.*, 2007) foram detectados cinco *outliers*, conforme representação gráfica na Figura 2.10, cumprindo portanto, com o critério de exclusão máximo de 22,2 % para o total de valores originais das curvas analíticas.

Diante disso, o intervalo proposto para a quantificação do cloridrato de propranolol foi considerado adequado, uma vez que foi detectada a qualidade dos dados obtidos (BURKE, 2001; SOUZA *et al.*, 2007).

Figura 2.10: Gráfico de resíduos da regressão linear do método analítico para quantificação do cloridrato de propranolol em FISSE (pH 6,8). *Outliers* estão indicados em vermelho.



As premissas da regressão linear normalidade, homocedasticidade (variância constante) e independência foram avaliadas de acordo com os testes de *Ryan-Joiner*, *Brown-Forsythe* e *Durbin-Watson*, respectivamente. Enquanto a análise da significância da regressão e do desvio da linearidade foram avaliados empregando o Teste F (ANOVA). Em todas as análises realizadas adotou-se um nível de significância de 5,0 %.

Os resultados obtidos, provenientes da análise das curvas analíticas obtidas para a quantificação do cloridrato de propranolol em FISSE (pH 6,8), foram compilados na Tabela 2.11.

Tabela 2.11: Valores encontrados para as premissas dos resíduos da regressão linear, significância da regressão e desvio da linearidade, provenientes das curvas analíticas obtidas para a quantificação do cloridrato de propranolol em FISSE (pH 6,8).

Parâmetro	Valor de referência	Valor encontrado
Normalidade	Maior que 0,9411	0,9789
Homocedasticidade	Menor que 2,1450	0,2310
Independência	Entre 1,3701 e 2,6299	2,0162
	F calculado	F crítico
Significância da regressão*	23207,11	4,6001
Desvio da linearidade**	1,0750	3,4817

**F calculado* deve ser maior que *F crítico*.

** *F calculado* deve ser menor que *F crítico*.

Após todos os resultados expostos, o método analítico para quantificação do cloridrato de propranolol em FISSE (pH 6,8), adotando-se a faixa de trabalho de 20,0 a 140,0 µg/mL, foi considerado linear.

2.3.3.2 Precisão

A precisão foi realizada em dois níveis: intradia (repetibilidade) e interdia (precisão intermediária). Foram obtidas 9 determinações para a avaliação da precisão intradia e 18 determinações para a interdia (realizada em dois dias distintos).

Os valores de desvio padrão relativo (DPR%) calculados visando a análise da precisão do método analítico para quantificação do cloridrato de propranolol em FISSE (pH 6,8) estão listados na Tabela 2.12.

Tabela 2.12: Precisão intradia (n=3) e interdia (n=6) do método analítico para quantificação do cloridrato de propranolol em FISSE (pH 6,8), visando os estudos de perfusão intestinal *in situ*.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental média (µg/mL) (n=3)	Precisão (DPR%) Intradia	Concentração experimental média (µg/mL) (n=6)	Precisão (DPR%) Interdia
20,0	19,41	3,82	19,23	4,11
80,0	79,78	3,10	79,88	3,30
140,0	138,72	2,97	138,23	3,28

Os valores de DPR% encontrados, tanto para a precisão intradia quanto para a interdia, foram inferiores a 5,0 % (TAVERNIERS; LOOSE; BOCKSTAELE, 2004), atestando, portanto, a precisão do método analítico para a quantificação do cloridrato de propranolol nos estudos de perfusão intestinal *in situ*.

2.3.3.3 Exatidão

A determinação da exatidão do método analítico para a quantificação do cloridrato de propranolol foi realizada em três níveis de concentração: baixo (20,0 µg/mL), médio (80,0 µg/mL) e alto (140,0 µg/mL), a partir da análise do grau de concordância entre os resultados obtidos em comparação com um valor aceito como verdadeiro.

Na Tabela 2.13 estão compilados os valores encontrados para a exatidão do método analítico para quantificação do cloridrato de propranolol em FISSE (pH 6,8).

Tabela 2.13: Exatidão (%) do método analítico para quantificação do cloridrato de propranolol em FISSE (pH 6,8), visando os estudos de perfusão intestinal *in situ* (n=3).

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental média (µg/mL) (n=3)	Exatidão (%)
20,0	19,41	97,07
80,0	79,78	99,73
140,0	138,72	99,09

O método analítico para quantificação do cloridrato de propranolol nos estudos de perfusão *in situ* foi considerado exato, pois os valores obtidos para a exatidão se mantiveram dentro do intervalo limite de 95,0 a 105,0 % (KUMAR *et al.*, 2012).

2.3.3.4 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (menor concentração de substância capaz de ser detectada) e quantificação (menor concentração de substância que pode ser determinada com precisão e exatidão) calculados para o método analítico de quantificação do cloridrato de propranolol em FISSE (pH 6,8) apresentaram valores de 1,20 µg/mL e 3,99 µg/mL, respectivamente.

Esses valores indicam que a faixa de trabalho utilizada para a quantificação do cloridrato de propranolol nos estudos de perfusão intestinal *in situ* é adequada, uma vez que, todos os sete pontos da curva analítica apresentam valores superiores ao limite de quantificação, sendo todos portanto, quantificados de forma precisa e exata.

2.3.4 Validação parcial do método analítico para quantificação da eremantolida C nos estudos de perfusão intestinal *in situ* em ratos

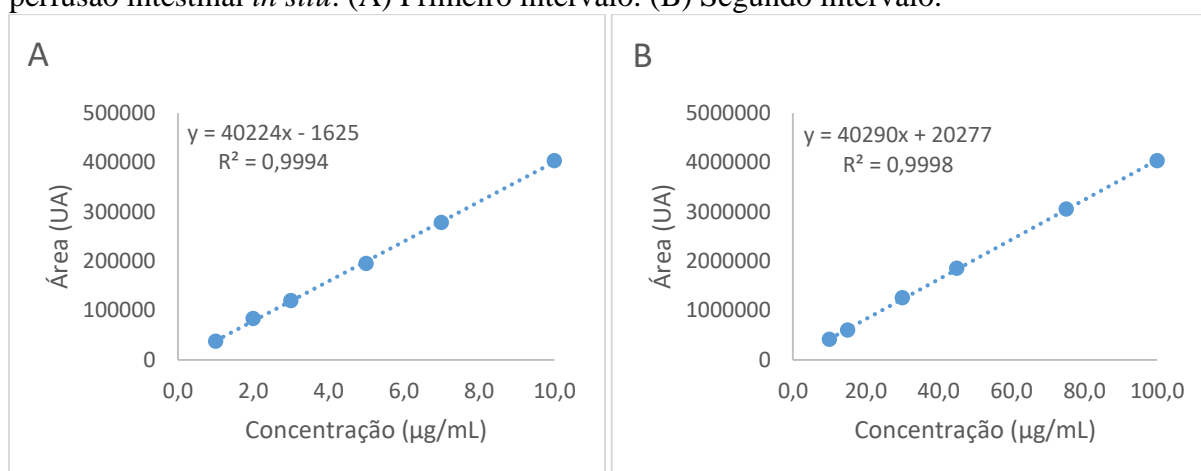
A validação parcial do método analítico para a quantificação da eremantolida C em FISSE (pH 6,8), visando os estudos de perfusão intestinal *in situ*, foi realizada por meio da análise dos seguintes parâmetros: linearidade, precisão, exatidão e limites de detecção e quantificação, utilizando as condições cromatográficas descritas no Quadro 1.2 (página 69).

2.3.4.1 Linearidade

A linearidade do método analítico para quantificação da eremantolida C em FISSE (pH 6,8) foi atestada para as duas faixas utilizadas nos estudos de perfusão intestinal *in situ* por meio de análises estatísticas e matemáticas dos coeficientes de correlação (R) (deve ser superior a 0,9900) e angular (deve ser significativamente diferente de zero) (BRASIL, 2017).

Na Figura 2.11 estão demonstradas as curvas analíticas médias obtidas para os dois intervalos utilizados na quantificação da eremantolida C em FISSE (pH 6,8).

Figura 2.11: Curvas analíticas médias (n=3) obtidas para a avaliação da linearidade do método analítico para quantificação da eremantolida C em FISSE (pH 6,8), visando os estudos de perfusão intestinal *in situ*. (A) Primeiro intervalo. (B) Segundo intervalo.



O método analítico para a quantificação da eremantolida C demonstrou linearidade para as duas faixas de trabalho utilizadas: 1,0 a 10,0 µg/mL (primeiro intervalo) e 10,0 a 100,0 µg/mL (segundo intervalo), pois apresentou coeficientes de correlação (R) e determinação (R^2) superiores a 0,9900, e coeficientes angulares significativamente diferentes de zero ($p < 0,0001$), conforme dados compilados na Tabela 2.14.

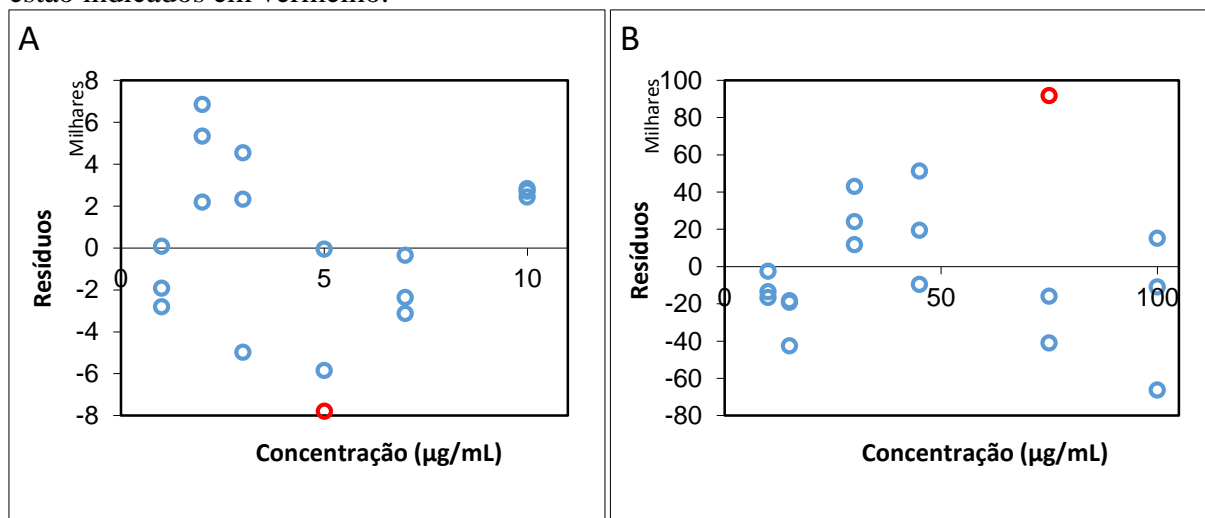
Tabela 2.14: Parâmetros de linearidade obtidos para o método de quantificação da eremantolida C em FISSE (pH 6,8) (n=3).

Parâmetro	Primeiro intervalo	Segundo intervalo
Linear	$-1625 \pm 1410,45$	$20777 \pm 7876,78$
Angular	$40224 \pm 39,11$	$40290 \pm 637,64$
R	0,9997	0,9999
R^2	0,9994	0,9998

A análise dos resíduos foi conduzida por meio do teste de resíduos padronizados *Jacknife* (SOUZA *et al.*, 2007). Foram detectados um total de dois valores dispersos, sendo um atribuído ao primeiro intervalo e o outro, ao segundo intervalo, cumprindo portanto com o

critério de exclusão máximo de 22,2 % do total de valores originais, conforme representação gráfica na Figura 2.12.

Figura 2.12: Gráfico de resíduos da regressão linear do método analítico para quantificação da eremantolida C em FISSE (pH 6,8). (A) Primeiro intervalo. (B) Segundo intervalo. *Outliers* estão indicados em vermelho.



Após a avaliação das premissas, normalidade, homocedasticidade e independência utilizando os testes de *Ryan-Joiner*, *Brown-Forsythe* e *Durbin-Watson*, respectivamente, a significância da regressão, bem como o desvio da linearidade, foram analisados a partir do Teste F por ANOVA.

Os resultados obtidos para os dois intervalos empregados na quantificação da eremantolida C em FISSE (pH 6,8), adotando-se um nível de significância de 5,0 %, foram compilados nas Tabela 2.15 e 2.16, respectivamente.

Tabela 2.15: Valores encontrados para as premissas dos resíduos da regressão linear, significância da regressão e desvio da linearidade, provenientes das curvas analíticas obtidas para a quantificação da eremantolida C em FISSE (pH 6,8) no intervalo de 1,0 a 10,0 µg/mL.

Parâmetro	Valor de referência	Valor encontrado
Normalidade	Maior que 0,9437	0,9852
Homocedasticidade	Menor que 2,1310	1,7500
Independência	Entre 1,3805 e 2,6195	1,8534
	F calculado	F crítico
Significância da regressão*	23034,50	4,5431
Desvio da linearidade**	1,1050	3,3258

**F calculado* deve ser maior que *F crítico*.

** *F calculado* deve ser menor que *F crítico*.

Tabela 2.16: Valores encontrados para as premissas dos resíduos da regressão linear, significância da regressão e desvio da linearidade, provenientes das curvas analíticas obtidas para a quantificação da eremantolida C em FISSE (pH 6,8) no intervalo de 10,0 a 100,0 µg/mL.

Parâmetro	Valor de referência	Valor encontrado
Normalidade	Maior que 0,9437	0,9907
Homocedasticidade	Menor que 2,1310	0,5780
Independência	Entre 1,3804 e 2,6195	1,8540
	F calculado	F crítico
Significância da regressão*	30070,45	4,5431
Desvio da linearidade**	3,2350	3,3567

*F calculado deve ser maior que F crítico.

** F calculado deve ser menor que F crítico.

Após os dados expostos, o método para quantificação da eremantolida C em FISSE (pH 6,8), visando os estudos de perfusão *in situ*, utilizando as duas faixas de trabalho propostas, foi considerado linear, uma vez que, cumpriu com todos os requisitos necessários.

2.3.4.2 Precisão

A precisão foi realizada em dois níveis: intradia (repetibilidade) e interdia (precisão intermediária) com o intuito de avaliar a proximidade entre os resultados obtidos.

Para ambos os intervalos, foram obtidas 9 determinações para a avaliação da precisão intradia e 18 determinações para a interdia, por ter sido realizada em dois dias diferentes.

Os valores de desvio padrão relativo (DPR%) para as duas faixas de trabalho de quantificação da eremantolida C em FISSE (pH 6,8) estão listados na Tabela 2.17.

Tabela 2.17: Precisão intradia (n=3) e interdia (n=6) do método analítico para quantificação da eremantolida C em FISSE (pH 6,8), visando os estudos de perfusão intestinal *in situ*.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental média (µg/mL) (n=3)	Precisão (DPR%) Intradia	Concentração experimental média (µg/mL) (n=6)	Precisão (DPR%) Interdia
Primeiro intervalo				
1,0	0,96	3,82	0,96	3,01
5,0	4,89	2,04	4,98	2,85
10,0	10,07	0,05	10,06	1,14
Segundo intervalo				
10,0	9,73	1,91	9,78	1,31
45,0	45,51	1,66	45,56	1,48
100,0	99,49	1,04	99,78	1,40

Os valores de DPR% encontrados tanto para a precisão intradia quanto para a interdia, para os dois intervalos empregados, foram inferiores a 5,0 % (TAVERNIERS; LOOSE;

BOCKSTAELE, 2004), atestando portanto, a precisão do método analítico para quantificação da eremantolida C nos estudos de perfusão intestinal *in situ*.

2.3.4.3 Exatidão

A relação entre os valores obtidos para a concentração média experimental e as concentrações teóricas foi avaliada em três níveis: baixo, médio e alto, de forma que os dois intervalos propostos para a quantificação da eremantolida C em FISSE (pH 6,8) fosse contemplado.

Na Tabela 2.18 estão compilados os valores encontrados para a exatidão do método analítico para quantificação da eremantolida C em FISSE (pH 6,8), visando os estudos de perfusão intestinal *in situ*.

Tabela 2.18: Exatidão (%) do método analítico para quantificação do aciclovir em FISSE (pH 6,8), visando os estudos de perfusão intestinal *in situ* (n=3).

Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental média ($\mu\text{g/mL}$) (n=3)	Exatidão (%)
Primeiro intervalo		
1,0	0,96	96,14
5,0	4,89	97,73
10,0	10,07	100,66
Segundo intervalo		
10,0	9,73	97,30
45,0	45,51	101,12
100,0	99,49	99,49

O método analítico para quantificação da eremantolida C em FISSE (pH 6,8), utilizando ambas as faixas de trabalho empregadas, foi considerado exato, uma vez que os valores obtidos para a exatidão se mantiveram dentro do intervalo limite de 95,0 a 105,0 % (KUMAR *et al.*, 2012).

2.3.4.4 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados para ambos os intervalos de quantificação empregados, pois segundo a RDC nº166, de 24 de julho de 2017 da Anvisa, os limites devem ser calculados de acordo com a faixa de trabalho utilizada (BRASIL, 2017).

Diante disso, o primeiro intervalo utilizado para a quantificação da eremantolida C nos estudos de perfusão intestinal *in situ* apresentou LD e LQ iguais a 0,11 $\mu\text{g/mL}$ e 0,35 $\mu\text{g/mL}$,

respectivamente. Já o segundo intervalo, apresentou LD igual a 0,59 $\mu\text{g/mL}$ e LQ igual a 1,96 $\mu\text{g/mL}$.

Os valores encontrados para ambos os limites indicam que as duas faixas de trabalho propostas para quantificação da eremantolida C em FISSE (pH 6,8) são coerentes, uma vez que todos os pontos das curvas analíticas empregadas são quantificados com precisão e exatidão.

2.3.5 Interferência do lavado intestinal na quantificação dos fármacos padrão e da eremantolida C nos estudos de perfusão intestinal *in situ* em ratos

Análises cromatográficas do lavado intestinal, isento de fármacos ou substância biologicamente ativa, foram realizadas com o intuito de verificar a interferência deste na quantificação dos fármacos padrão, aciclovir e cloridrato de propranolol, e da eremantolida C.

Nas Figuras 2.13, 2.14 e 2.15 estão apresentadas os perfis cromatográficos do lavado intestinal isento de qualquer substância e dos fármacos padrão, aciclovir e cloridrato de propranolol, e da eremantolida C em FISSE (pH 6,8), respectivamente.

Figura 2.13: Cromatogramas obtidos para o aciclovir em FISSE (pH 6,8) na concentração de 30,0 $\mu\text{g/mL}$ (em azul) e para o lavado intestinal (preto).

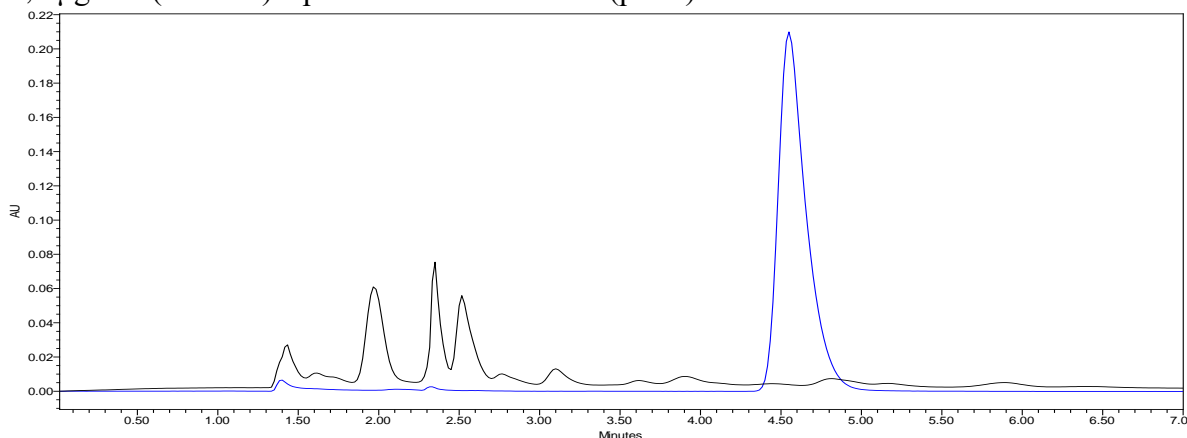


Figura 2.14: Cromatogramas obtidos para o cloridrato de propranolol em FISSE (pH 6,8) na concentração de 20,0 $\mu\text{g/mL}$ (em azul) e para o lavado intestinal (preto).

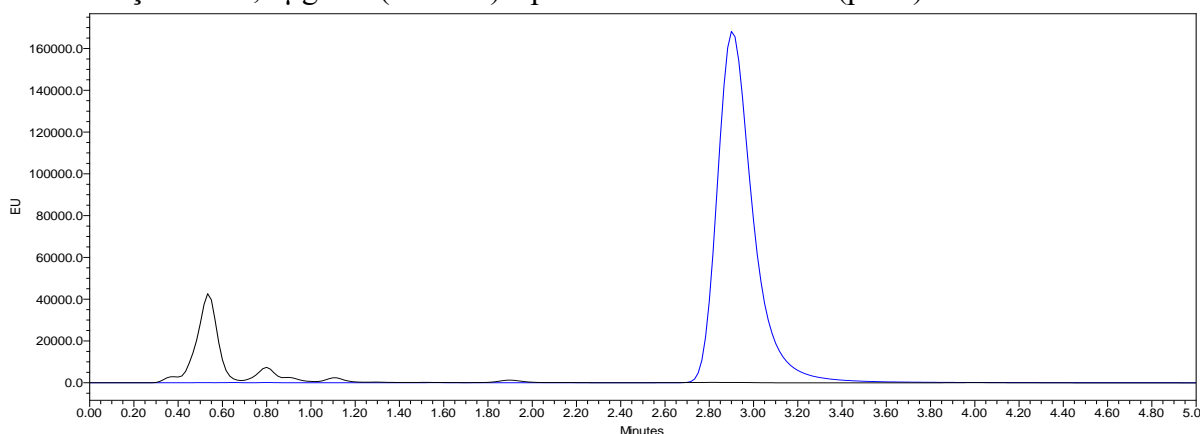
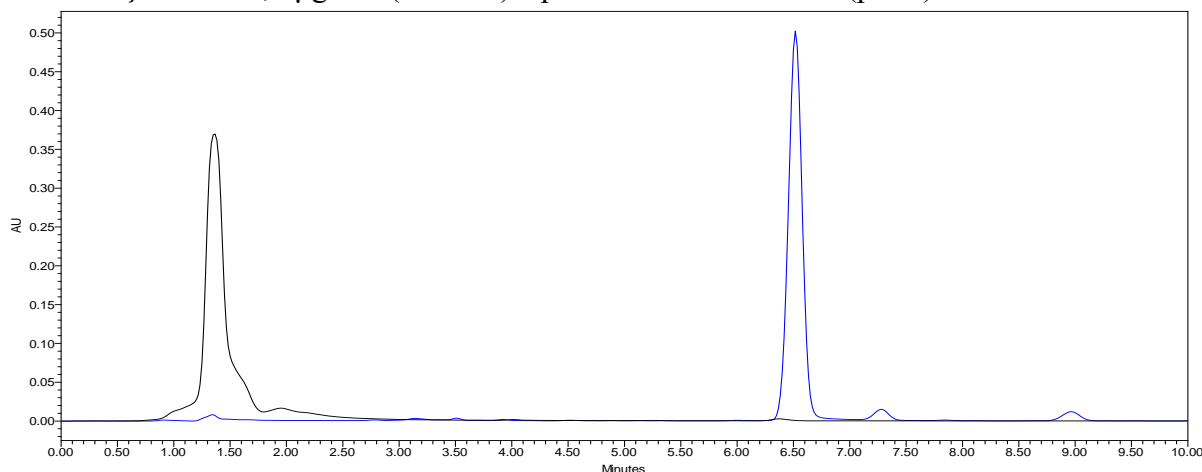


Figura 2.15: Cromatogramas obtidos para a eremantolida C em FISSE (pH 6,8) na concentração de 100,0 µg/mL (em azul) e para o lavado intestinal (preto).



Conforme observado, o lavado intestinal coletado durante os estudos de perfusão intestinal *in situ*, não ocasionou qualquer interferência na quantificação dos fármacos padrão, aciclovir e cloridrato de propranolol, bem como na quantificação da substância biologicamente ativa, eremantolida C.

Apesar do seguimento intestinal canulado passar por um processo de limpeza minucioso antes da realização da perfusão intestinal *in situ*, resíduos de muco e de alimentos ainda podem estar presentes. Além disso, impurezas provenientes do meio tamponado utilizado podem interferir no processo de quantificação, tornando-se, portanto, necessária a análise do lavado intestinal coletado.

Não foi observada eluição de pico proveniente do lavado intestinal no mesmo tempo de retenção das substâncias de interesse. Essa ausência de coeluição possibilitou a quantificação do aciclovir, cloridrato de propranolol e eremantolida C empregando os métodos analíticos previamente validados de forma segura e eficaz.

2.3.6 Perfusão intestinal *in situ* em ratos

A eremantolida C é uma lactona sesquiterpênica com caráter altamente lipofílico, por apresentar cLogP igual a 2,00 e permeabilidade efetiva, em PAMPA, de $30,40 \times 10^{-6}$ cm/s, valor cerca de 3 vezes superior ao padrão de alta permeabilidade cloridrato de propranolol ($9,23 \times 10^{-6}$ cm/s) (CALDEIRA *et al.*, 2017).

O ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA) remete apenas a permeabilidade passiva apresentada pela substância, uma vez que, apenas a rota passiva transcelular é avaliada a partir desse experimento (KANSY; SENNER; GUBERNATOR, 1998; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Diante disso, já sabendo do potencial de absorção por via oral, através do mecanismo de permeação passivo transcelular, da eremantolida C, fez-se necessária a avaliação dos demais processos de absorção que ocorrem no organismo, com o intuito de caracterizar de forma efetiva o mecanismo de permeação. Isso inclui a avaliação da afinidade da molécula por transportadores, verificando assim, se essa seria substrato para transportadores de influxo e/ou efluxo, os quais apresentam impacto direto na quantidade de substância absorvida e consequentemente na sua biodisponibilidade oral.

A permeabilidade de um fármaco ou substância biologicamente ativa, visando a classificação biofarmacêutica, deve ser definida com base na fração da dose absorvida da substância em seres humanos ou medições da velocidade de transferência de massa através da membrana intestinal humana. Alternativamente, podem ser utilizados outros sistemas capazes de prever a extensão da absorção do fármaco, dentre eles destaca-se a perfusão intestinal *in situ* em ratos (FDA, 2017).

Uma etapa crítica observada durante o uso da perfusão intestinal *in situ*, visando a classificação de permeabilidade, é a adequação da técnica ao objetivo proposto. Para comprovar a adequabilidade do método, uma relação hierárquica, utilizando fármacos modelo, deve ser estabelecida entre os valores experimentais de permeabilidade e os dados de extensão da absorção do fármaco em seres humanos. Além disso, dependendo da variabilidade do estudo, um número suficiente de animais é requerido para fornecer uma estimativa confiável da permeabilidade do fármaco (geralmente, um mínimo de três por grupo). Esta relação deve permitir uma diferenciação precisa entre fármacos de baixa e alta permeabilidade intestinal (FDA, 2017).

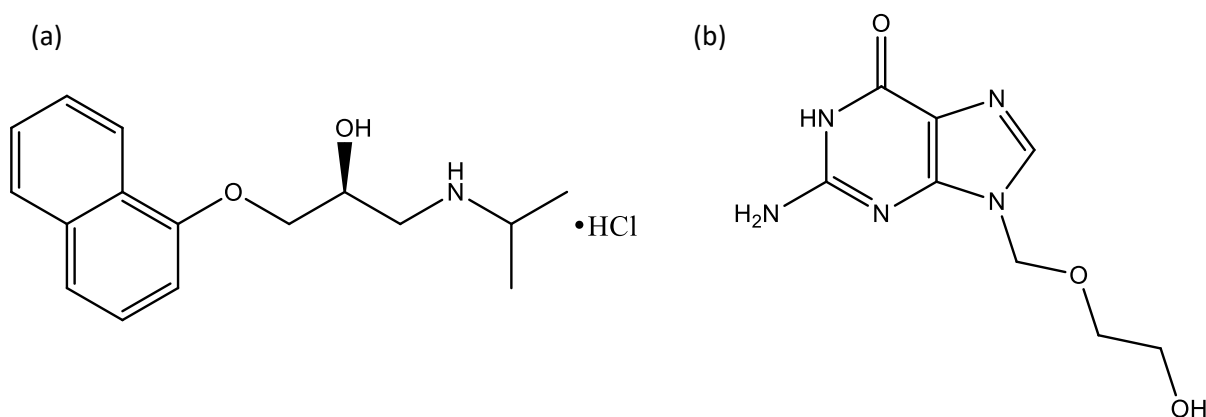
Com o intuito de verificar a adequabilidade do sistema de perfusão intestinal *in situ*, foram utilizados como fármacos padrão, de alta e baixa permeabilidade, o cloridrato de propranolol e o aciclovir, respectivamente. Ambos estão contidos na lista de fármacos padrão, para estudos de permeabilidade, fornecida no guia “*Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System*” estabelecido pela FDA, no qual consta que o cloridrato de propranolol apresenta uma fração absorvida superior a 85,0 % e o aciclovir inferior a 50,0 % (FDA, 2017).

O cloridrato de propranolol (Figura 2.16a) é um fármaco anti-hipertensivo da classe dos β -bloqueadores que apresenta altas solubilidade e permeabilidade, sendo portanto, classificado como classe I de acordo com o SCB. Ademais, é quase completamente absorvido após

administração oral, demonstrando fração absorvida em humanos superior a 90,0 % (VOGELPOEL *et al.*, 2004).

O aciclovir (Figura 2.16b), por sua vez, é um fármaco antiviral utilizado no tratamento e profilaxia de episódios iniciais e recorrentes de herpes genital e labial e para o tratamento do quadro agudo de herpes zoster. Apresenta alta solubilidade e baixa permeabilidade (classe III, de acordo com o SCB), demonstrando fração absorvida, em humanos, que varia entre 10,0 e 30,0 % (ARNAL *et al.*, 2008).

Figura 2.16: Estruturas químicas do cloridrato de propranolol (a) e do aciclovir (b).



Os valores obtidos para a constante da velocidade de absorção bem como, os valores obtidos para a permeabilidade efetiva, para os fármacos padrão aciclovir e cloridrato de propranolol estão descritos na Tabela 2.19.

Os resultados obtidos demonstram que a técnica de perfusão intestinal *in situ* empregada é adequada para a avaliação da permeabilidade de fármacos e substâncias biologicamente ativas, uma vez que a alta e a baixa permeabilidade foram confirmadas para o cloridrato de propranolol e o aciclovir, respectivamente.

Considerando isso, a permeabilidade da eremantolida C foi avaliada por meio da perfusão intestinal *in situ* em ratos. Os valores obtidos para a constante de velocidade de absorção e para a permeabilidade efetiva, estão apresentados na Tabela 2.19.

Tabela 2.19: Valores da constante de velocidade de absorção (k_a) e permeabilidade efetiva (P_{eff}) obtidos para os fármacos padrão e a eremantolida C, a partir dos estudos de perfusão intestinal *in situ* (n=4-6).

Substância Concentração	k_a (min^{-1})	P_{eff} (cm/s)
<i>Aciclovir</i> 1,6 mg/mL	$0,007 \pm 0,002$	$1,09 \times 10^{-5} \pm 0,38 \times 10^{-5}$
<i>Cloridrato de propranolol</i> 0,32 mg/mL	$0,073 \pm 0,011$	$10,94 \times 10^{-5} \pm 1,67 \times 10^{-5}$
<i>EREC</i> 9,6 $\mu\text{g/mL}$	$0,052 \pm 0,021$	$7,81 \times 10^{-5} \pm 3,16 \times 10^{-5}$
<i>EREC</i> 96,0 $\mu\text{g/mL}$	$0,051 \pm 0,010$	$7,71 \times 10^{-5} \pm 1,48 \times 10^{-5}$
<i>EREC</i> 960,0 $\mu\text{g/mL}$	$0,049 \pm 0,003$	$7,28 \times 10^{-5} \pm 0,52 \times 10^{-5}$
<i>EREC + Azida sódica</i> 9,6 $\mu\text{g/mL}$ + 65,0 $\mu\text{g/mL}$	$0,049 \pm 0,009$	$7,31 \times 10^{-5} \pm 1,29 \times 10^{-5}$

A constante de velocidade de absorção (k_a) é o parâmetro que regula a velocidade na qual um composto é absorvido sob condições padronizadas e reproduzíveis, e está condicionada a fatores característicos da técnica, tais como, área superficial da membrana, pH da solução de perfusão, temperatura e agitação, bem como a parâmetros inerentes ao fármaco, como, caráter lipofílico e massa molar (LOZOYA-AGULLO, 2015b). Dessa forma, quanto maior a k_a , maior será a quantidade de substância que atravessa a membrana intestinal.

Conforme observado, o cloridrato de propranolol apresentou o maior valor de k_a e consequentemente o maior valor de permeabilidade efetiva. O aciclovir, por sua vez, exibiu os menores valores de k_a e P_{eff} .

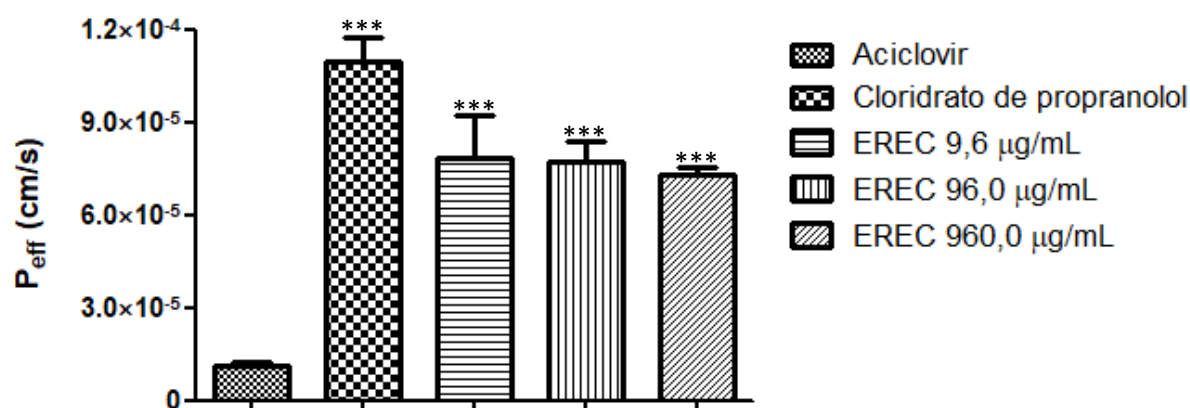
A concentração proposta para a avaliação da permeabilidade para ambos os fármacos padrão, bem como para a eremantolida C foi calculada considerando a razão dose/solubilidade, ou seja, foi obtida a razão entre a maior dose do fármaco que pode ser administrada de uma única vez com a quantidade de água, geralmente prescrita, para a administração de um medicamento (250,0 mL). Para o cloridrato de propranolol foi considerado 80,0 mg (VOGELPOEL *et al.*, 2004), 400,0 mg para o aciclovir (ARNAL *et al.*, 2008) e 240,0 mg para a eremantolida C (CALDEIRA *et al.*, 2017).

Durante a determinação da permeabilidade de um fármaco ou substância biologicamente ativa, visando a classificação biofarmacêutica, o processo de permeação pode ocorrer apenas pelo mecanismo de transporte passivo. Isto ocorre quando a permeabilidade *in vivo* ou *in situ* medida, em modelo animal adequado, independe da dose administrada, ou seja, quando a ausência da dependência da permeabilidade é detectada ao utilizar 0,01, 0,1 e 1 vezes

a maior dose, disponível comercialmente ou administrada de uma única vez, dissolvida em 250,0 mL do fluido de perfusão (FDA, 2017).

Considerando isso, a permeabilidade da eremantolida C foi avaliada utilizando concentrações de 9,6 µg/mL, 96,0 µg/mL e 960,0 µg/mL. Para as três concentrações foram obtidos valores de permeabilidade efetiva muito próximos não se observando diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre elas (Figura 2.17). Indicando, portanto, que o processo de absorção da EREC ocorre apenas pelo mecanismo passivo de permeação.

Figura 2.17: Valores de permeabilidade efetiva (P_{eff}) obtidos para os fármacos padrão e a eremantolida C, a partir dos estudos de perfusão intestinal *in situ* (n=4-6).



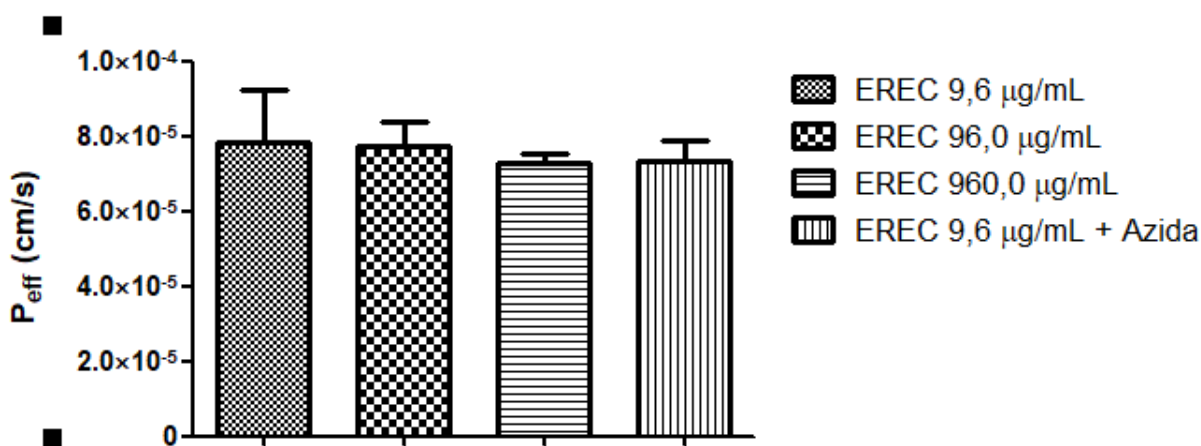
*** $p < 0,0001$ em comparação com o aciclovir.

Entretanto, a fim de confirmar a ausência de dependência da permeabilidade em função da dose, realizou-se a perfusão intestinal *in situ* da eremantolida C na concentração de 9,6 µg/mL em presença de azida sódica 65,0 µg/mL.

A azida sódica é um inibidor metabólico não específico que produz diminuição nos níveis de ATP devido à interferência no transporte de elétrons na matriz mitocondrial. Portanto, como o mecanismo de transporte ativo no modelo animal rato é dependente de ATP, a azida sódica é capaz de inibir tanto o transporte por influxo, quanto por efluxo, de substâncias, resultando apenas na permeabilidade passiva do fármaco (VALENZUELA *et al.*, 2001; FERNANDEZ-TERUEL *et al.*, 2005).

Os resultados obtidos para a permeabilidade efetiva da eremantolida C em presença de azida sódica, bem como a comparação com os demais valores de P_{eff} adquiridos para as três diferentes concentrações de EREC, estão descritos na Tabela 2.19 e na representação gráfica apresentada na Figura 2.18.

Figura 2.18: Valores de permeabilidade efetiva (P_{eff}) obtidos para a eremantolida C nas três concentrações avaliadas e na presença de azida sódica, a partir dos estudos de perfusão intestinal *in situ* (n=4-6).



Conforme observado, não houve diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os valores de permeabilidade efetiva obtidos para as três concentrações de eremantolida C avaliadas (9,6 µg/mL, 96,0 µg/mL e 960,0 µg/mL) e na presença de azida sódica, confirmando assim, que o processo de absorção da eremantolida C ocorre apenas pelo mecanismo passivo de permeação, não se observando qualquer afinidade por transportadores de influxo e efluxo presentes na membrana intestinal.

Zakeri-Milani e colaboradores (2009) avaliaram a permeabilidade de treze fármacos, englobando tanto substâncias altamente permeáveis quanto aquelas que apresentam baixa permeabilidade, por meio da técnica de perfusão intestinal de passagem simples (ZAKERI-MILANI *et al.*, 2009). Como a técnica de perfusão intestinal de passagem simples é plenamente correlacionável com a perfusão em circuito fechado (LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2015b), os dados obtidos por Zakeri-Milani e colaboradores foram utilizados como referência.

De acordo com Zakeri-Milani e colaboradores (2009), fármacos que apresentam valores de P_{eff} superiores a $5,09 \times 10^{-5}$ cm/s em ratos e $4,70 \times 10^{-5}$ cm/s em humanos, demonstram F_{abs} maiores que 85,0 %. Dessa forma, esses valores foram definidos como os pontos de corte para a classificação de substâncias altamente permeáveis (ZAKERI-MILANI *et al.*, 2009).

Os valores de P_{eff} obtidos para a eremantolida C foram superiores ao ponto de corte estabelecido (ZAKERI-MILANI *et al.*, 2009). Ademais, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre a permeabilidade efetiva obtida para o cloridrato de propranolol e a obtida para a eremantolida C, nas três concentrações avaliadas (Figura 2.18). Diante disso, a eremantolida C foi considerada uma substância biologicamente ativa altamente permeável.

Entretanto, as agências regulatórias preconizam que a permeabilidade seja classificada de acordo com a fração absorvida da substância medicamentosa em humanos (EMA, 2010; WHO, 2015; BRASIL, 2016b; FDA, 2017). Considerando isso, a fração absorvida da eremantolida C, bem como a dos fármacos padrão (também com o intuito de verificar a adequabilidade da técnica de perfusão intestinal *in situ* em ratos) foram preditas para humanos a partir dos valores de permeabilidade efetiva determinados experimentalmente (Tabela 2.20).

Tabela 2.20: Valores preditos para a fração absorvida (F_{abs}) a partir dos dados de permeabilidade efetiva (P_{eff}) obtidos nos estudos de perfusão intestinal *in situ* para os fármacos padrão e para a eremantolida C (n=4-6).

Substância	F_{abs} (%)
Aciclovir	19,6
Cloridrato de Propranolol	88,8
Eremantolida C	79,0

As frações absorvidas preditas para o aciclovir e para o cloridrato de propranolol confirmaram que a técnica de perfusão intestinal *in situ*, da maneira que foi executada, está adequada para a determinação da permeabilidade efetiva de fármacos e/ou substâncias biologicamente ativas.

A eremantolida C, por sua vez, apresentou fração absorvida de 79,0 %, indicando que esta substância, de acordo com os critérios descritos no guia publicado pela FDA em 2017, apresenta permeabilidade moderada (FDA, 2017). Lembrando que, para fins de classificação biofarmacêutica, a eremantolida C é considerada altamente permeável.

A perfusão intestinal *in situ* em ratos representa uma ferramenta experimental eficiente e confiável nas previsões da fração absorvida de fármacos em humanos, bem como permite a classificação de fármacos em concordância com o SCB, a verificação da presença de absorção dependente do segmento intestinal, mecanismos de permeabilidade e interações medicamentosas relacionadas à absorção (LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2015b).

Os transportadores de membrana podem ser os principais determinantes dos perfis farmacocinéticos, de segurança e eficácia dos fármacos, pois controlam a absorção e o efluxo de compostos fundamentais, como açúcares, aminoácidos, nucleotídeos, íons inorgânicos e fármacos (ESTUDANTE *et al.*, 2013).

Os transportadores de membrana são expressos nas membranas luminal e/ou basolateral de enterócitos, hepatócitos, células epiteliais tubulares renais e outros importantes tecidos de barreira, incluindo a barreira hematoencefálica e a barreira placentária (ESTUDANTE *et al.*, 2013).

A eremantolida C apresentando absorção somente pela via passiva de permeação, provavelmente não apresentará interações medicamentosas com fármacos e alimentos em nível de transportador intestinal, uma vez que foi demonstrado que ela não é substrato para qualquer transportador presente no lúmen intestinal de ratos.

2.4 CONCLUSÕES

Métodos analíticos foram desenvolvidos e/ou validados por cromatografia a líquido de alta eficiência de maneira eficaz com o intuito de possibilitar a quantificação do aciclovir e do cloridrato de propranolol, fármacos padrão de baixa e alta permeabilidade, respectivamente, bem como a quantificação da eremantolida C, nos estudos de perfusão intestinal *in situ* em ratos.

A técnica de perfusão intestinal *in situ* em ratos foi padronizada e validada, uma vez que, a adequabilidade da técnica foi verificada e confirmada por meio do uso dos fármacos padrão de baixa e alta permeabilidade.

O aciclovir, apresentou baixa permeabilidade, conforme o esperado, com valores de permeabilidade efetiva de $1,09 \times 10^{-5} \pm 0,38 \times 10^{-5}$ e fração absorvida predita de 19,6 %. Enquanto o cloridrato de propranolol por sua vez, apresentou valores de permeabilidade efetiva igual a $10,94 \times 10^{-5} \pm 1,67 \times 10^{-5}$ e fração absorvida predita de 88,8 %.

Diante disso, a eremantolida C foi confirmada como uma substância altamente permeável apresentando valores de permeabilidade efetiva de $7,81 \times 10^{-5} \pm 3,16 \times 10^{-5}$, $7,71 \times 10^{-5} \pm 1,48 \times 10^{-5}$ e $7,28 \times 10^{-5} \pm 0,52 \times 10^{-5}$, referente às doses de 9,6 µg/mL, 96,0 µg/mL e 960,0 µg/mL, além de fração absorvida predita de 79,0 %. Ademais, o seu mecanismo de absorção ocorre exclusivamente pela forma passiva de permeação, uma vez que, não foi observada a relação de dependência entre a dose administrada e os valores de permeabilidade efetiva encontrados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A eremantolida C apresentou solubilidade em equilíbrio, bem como, velocidade de dissolução intrínseca comparável a muitos fármacos de baixa solubilidade disponíveis no mercado atualmente, tais como, nimesulida 0,03 mg/mL, sinvastatina 0,01 mg/mL, furosemida 0,03 mg/mL e griseofulvina (0,002 mg/mL/cm²) (YU *et al.*, 2004; CALDEIRA *et al.*, 2017).

A baixa solubilidade já era esperada para a eremantolida C, uma vez que a substância possui caráter fracamente ácido com pK_a igual a 10,91, valor superior à faixa de pH apresentada pelas soluções tamponadas utilizadas durante os estudos de solubilidade. Dessa forma, nos líquidos gastrointestinais, a EREC se apresentará praticamente 100 % na sua forma não ionizada, resultando na sua baixa solubilidade (CALDEIRA *et al.*, 2017).

Além disso, apesar de apresentar 6 ligações aceptoras e 1 doadora de hidrogênio (as quais possibilitam a formação de interações intermoleculares), a eremantolida C apresenta caráter altamente lipofílico, o que também proporciona a baixa solubilidade à substância (CALDEIRA *et al.*, 2017).

Entretanto, é sabido que compostos pouco solúveis apresentam problemas de biodisponibilidade oral relacionados à solubilidade e à dissolução. A velocidade de dissolução é diretamente proporcional à solubilidade dos fármacos, sendo assim, fármacos com baixa solubilidade apresentam baixa velocidade de dissolução e, portanto, em geral, demonstram problemas na biodisponibilidade oral (BABU; AREEFULLA; MALLIKARJUN, 2010).

Atualmente, existem inúmeras técnicas, relatadas na literatura, utilizadas para aumentar a solubilidade de fármacos fracamente solúveis. As técnicas escolhidas devem levar em consideração alguns aspectos, tais como, propriedades do fármaco, natureza dos excipientes a serem selecionados e natureza da forma farmacêutica pretendida (SAVJANI; GAJJAR; SAVJANI, 2012).

Modificações químicas na molécula da eremantolida C não são indicadas, pois podem implicar na perda de atividade e/ou aumento da toxicidade da molécula, os quais deveriam ser avaliados novamente em estudos pré clínicos, visando verificar a geração ou não de efeitos inesperados no organismo. Além disso, a EREC apresenta boa permeabilidade e, enquanto a solubilidade é um parâmetro que pode ser melhorado com o auxílio de excipientes ou técnicas de produção, a correção da permeabilidade por meio de formulação é extremamente difícil e raramente bem sucedida (FALLER, 2008).

Dessa forma, com o intuito de reduzir o impacto da baixa solubilidade no processo de absorção da substância e, conseqüentemente, na sua biodisponibilidade oral, alguns recursos podem ser usados, tais como:

- o uso de co-solventes: a solubilidade geralmente pode ser aumentada pela adição de um solvente miscível em água em que a substância apresente boa solubilidade (ex: polietilenoglicol, propilenoglicol e etanol) (JATWANI *et al.*, 2012);

- micronização: a redução do tamanho de partícula aumenta a solubilidade e a velocidade de dissolução, uma vez que permite maior interação devido à maior superfície de contato entre o sólido e o solvente. O processo envolve a redução do tamanho da partícula da substância em 1 a 10 μm . A griseofulvina é um exemplo de fármaco que obteve melhora na solubilidade com a micronização (JATWANI *et al.*, 2012);

- uso de tensoativos: os tensoativos são de natureza anfipática, o que significa que apresentam uma extremidade polar e uma extremidade não polar. Quando um tensoativo (ex: tween-80, laurilsulfato de sódio, polietilenoglicol, propilenoglicol) é colocado em água ocorrerá a formação de micelas. As cadeias hidrofóbicas formam o núcleo da micela e são protegidas do ambiente aquoso pela camada circundante composta de grupos hidrofílicos, que servem para manter a solubilidade no meio aquoso (JATWANI *et al.*, 2012);

- complexação com ciclodextrinas: ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos usados para melhorar a solubilidade em meios aquosos, promovendo o aumento da molhabilidade e da velocidade de dissolução e, conseqüentemente, da biodisponibilidade oral de fármacos (JATWANI *et al.*, 2012).

Deve-se enfatizar que quando uma formulação for proposta para a administração oral da eremantolida C, será necessário avaliar a compatibilidade da substância biologicamente ativa com os componentes da formulação. Combinações de técnicas diferentes e complementares, como DSC, difração de raios-X, espectrometria no infravermelho e microscopia são amplamente recomendadas, pois a aplicação de apenas uma técnica pode gerar resultados falsos ou inconclusivos, devido às limitações apresentadas por cada uma delas. Os resultados obtidos para a EREC frente a estas técnicas, apresentados neste trabalho, são fundamentais para a comparação do seu comportamento na formulação proposta.

Com relação à presença de formas polimórficas, substâncias com potencial farmacológico devem gerar dados sobre o polimorfismo antes do início dos principais estudos clínicos. A partir da análise realizada, a eremantolida C não apresentou polimorfismo clássico nem polimorfismo morfológico. Além disso, EREC apresentou valores de solubilidade inferiores àqueles preconizados, visando a classificação biofarmacêutica, tanto para a

velocidade de dissolução intrínseca quanto para solubilidade em equilíbrio, não sendo observadas diferenças da ordem de 2 a 3 vezes nas medidas de solubilidade para as amostras avaliadas. Em alguns casos, essas diferenças nas medidas de solubilidade, acarretam distintas classificações biofarmacêuticas para diferentes amostras da mesma substância biologicamente ativa.

A perfusão intestinal *in situ*, por sua vez, proporcionou informações importantes sobre o processo de absorção da eremantolida C. Além de comprovar a alta permeabilidade da substância, confirmou que o seu processo de permeação ocorre apenas de forma passiva, não havendo qualquer interação da substância com transportadores de influxo e/ou efluxo. Dessa forma, a biodisponibilidade oral da eremantolida C não dependerá da afinidade da substância por transportadores e, interações medicamentosas com outros fármacos e alimentos, em nível de transportador intestinal, podem ser descartadas.

Diante de todo o exposto, a eremantolida C, por apresentar baixa solubilidade e alta permeabilidade, é uma substância biologicamente ativa pertencente à classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica.

Além disso, as comprovadas atividades farmacológicas apresentadas para a eremantolida C, enfatizando suas propriedades anti-inflamatória e anti-hiperuricêmica, a baixa toxicidade e as características de solubilidade e permeabilidade (fundamentais para uma boa absorção oral) comparáveis a vários fármacos presentes no mercado atualmente, demonstram que esta substância possui os requisitos necessários para o desenvolvimento de um medicamento com ação na inflamação e hiperuricemia, a ser administrado por via oral.

REFERÊNCIAS

- ALAM, M. A.; AL-JENOABI, F. I.; AL-MOHIZEA, A. M. Everted gut sac model as a tool in pharmaceutical research: limitations and applications. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Belfast, v. 64, p. 326-336, 2011.
- ALSENZ, J.; HAENEL, E.; ANEDDA, A.; DU CASTEL, P.; CIRELLI, G. Miniaturized INtrinsic DISSolution Screening (MINDISS) assay for preformulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Odense, v. 87, p. 3-13, 2016.
- 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*, Baltimore, v. 12, p. 413-420, 1995.
- AMIDON, G. E.; HO, N. F. H.; FRENCH, A. B.; HIGUCHI, W. I. Predicted absorption rates with simultaneous bulk fluid flow in the intestinal tract. *Journal of Theoretical Biology*, Ann Arbor, v. 89, p. 195-210, 1981.
- ARNAL, J. GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, I.; BERMEJO, M.; AMIDON, G. L.; JUNGINGER H. E.; KOOP, S.; MIDHA, K. K.; SHAH, V. P.; STAVCHANSKY, S.; DRESSMAN, J. B.; BARENDIS, D. M. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: acyclovir. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Lawrence, v. 97, n. 12, p. 5061-5073, 2008.
- ASHFORD, M. Introdução à biofarmácia. In: AULTON, M. E. *Delineamento de Formas Farmacêuticas*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005a. p. 225-228.
- ASHFORD, M. Biodisponibilidade – fatores físico-químicos e relacionados à forma farmacêutica. In: AULTON, M. E. *Delineamento de Formas Farmacêuticas*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005b. p. 245-263.
- AULTON, M. Dissolução e solubilidade. In: AULTON, M. E. *Delineamento de Formas Farmacêuticas*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 32-47.
- AVDEEF, A. *Absorption and drug development: solubility, permeability and charge state*. New Jersey: Wiley-Interscience, 2003. 287p.
- AVDEEF, A.; TSINMAN, O. Miniaturized rotating disk intrinsic dissolution rate measurement: effects of buffer capacity in comparisons to traditional Wood's apparatus. *Pharmaceutical Research*, Baltimore, v. 25, n. 11, p. 2613-2627, 2008.
- BABU, V. R.; AREEFULLA, S. H.; MALLIKARJUN, V. Solubility and dissolution enhancement: an overview. *Journal of Pharmacy Research*, Mohali, 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*, London, v. 44, p. 301-312, 2000.

BENKO-ISEPPON, A. M.; CROVELLA, S. Ethnobotanical bioprospection of candidates for potential antimicrobial drugs from Brazilian Plants: state of art and perspectives. *Current Protein and Peptide Science*, Gainesville, v. 11, p.189-194, 2010.

BENET, L. Z.; AMIDON, G. L.; BARENDTS, 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*, Baltimore, v. 52, n. 3, p. 483-488, 2008.

BERGER, C. M.; TSINMAN, O.; VOLOBOY, D.; LIPP, D.; STONES, S.; AVDEEF, A. Technical Note: Miniaturized intrinsic dissolution rate (Mini-IDR™) measurement of griseofulvin and carbamazepine. *Dissolution Technologies*, Hockessin, p. 39-41, 2007.

BERMEJO, M.; MERINO, V.; GARRIGUES, T. M.; DELFINA, J. M. P.; MULET, A.; VIZET, P.; TROUILLER, G.; MERCIER, C. Validation of a biophysical drug absorption model by the PATQSAR system. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Lawrence, v. 88, n. 4, p. 398-405, 1999.

BERNARDES, A. C. F. P. F.; COELHO, G. B.; ARAÚJO, M. C. P. M.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. *In vivo* anti-hyperuricemic activity of sesquiterpene lactones from *Lychnophora* species. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Florianópolis. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.12.008>

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*, Richmond, v. 26, p. 671-676, 1998.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, 25 de julho de 2017a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia Brasileira – Segundo Suplemento*. Brasília: Anvisa, 2017b. p. 86-89.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia Brasileira – Primeiro Suplemento*. Brasília: Anvisa, 2016a. p. 18-20.

BRASIL. Instrução Normativa nº 10, de 29 de setembro de 2016. 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, 30 de setembro de 2016b.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 37, 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, 2010a. v.1, 524p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia Brasileira*. Brasília: Anvisa, 2010b. v.2, 853p.

BUENO, M. M.; RECH, N. Insumos Farmacêuticos – Aspectos Técnicos Científicos e Regulatórios. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M. N. *Biofarmacotécnica*. São Paulo: Guanabara Koogan, 2011. p. 204-211.

BURKE, S. Missing values, outliers, robust statistics & non-parametric methods. *LC.GC Europe Online Supplement*. p. 19-24, 2001.

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

CALDEIRA, T. G.; RUIZ-PICAZO, A.; LOZOYA-AGULLO, I.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, M.; SOUZA, J.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, I.; BERMEJO, M. Determination of intestinal permeability using *in situ* perfusion model in rats: Challenges and advantages to BCS classification applied to digoxin. *International Journal of Pharmaceutics*, Lille, v. 551, p. 148-157, 2018.

CALDEIRA, T. G.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; DEZANI, A. B.; SERRA, C. H. R.; SOUZA, J. *In silico* and *in vitro* prediction of gastrointestinal absorption from potential drug eremantholide C. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Belfast, v. 69, p. 1468-1476, 2017.

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*, Campinas, v. 39, p. 551-553, 1987.

CHO, M. J.; THOMPSON, D. P.; CRAMER, C. T.; VIDMAR, T. J.; SCIESZKA, J. F. The Madin Darby canine kidney (MDCK) epithelial cell monolayer as a model cellular transport barrier. *Pharmaceutical Research*, Baltimore, v. 6, n. 1, p. 71-77, 1989.

DEFERME, S.; ANNAERT, P.; AUGUSTIJNS, P. In vitro screening models to assess intestinal drug absorption and metabolism. In: EHRHARDT, C.; KIM, K. J. *Drug Absorption Studies: In Situ, In Vitro and In Silico Models*. Switzerland: Springer, 2008. p. 182-215.

DEZANI, T. M.; DEZANI, A. B.; SILVA, M. M. C.; SERRA, C. H. R. *In situ* intestinal perfusion in rodents: future perspectives for application on absorption studies and classification of drugs. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, Sharjah, v. 17, p. 746-757, 2017.

DEZANI, A. B.; PEREIRA, T. M.; CAFFARO, A. M.; REIS, J. M.; SERRA, C. H. R. Equilibrium solubility versus intrinsic dissolution: characterization of lamivudine, stavudine and zidovudine for BCS classification. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, São Paulo, v. 49, n. 4, p. 853-863, 2013.

DEZANI, André Bersani. *Avaliação in vitro da solubilidade e permeabilidade da lamivudina e zidovudina. Aplicações na Classificação Biofarmacêutica*. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

DOLUISIO, J. T.; BILLUPS, N. F.; DITTERT, L. W.; SUGITA, E. T.; SWINTOSKY, J. V. Drug absorption I: an *in situ* rat gut technique yielding realistic absorption rates. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Lawrence, v. 58, p. 1196-1200, 1969.

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 22 de junho de 2017.

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*, Washington, v. 43, n. 20, p. 3714-3717, 2000.

ESTUDANTE, M.; MORAIS, J. G.; SOVERAL, G. BENET, L. Z. Intestinal drug transporters: an overview. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Salt Lake City, v. 65, p. 1340-1356, 2013.

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

FDA – Food and Drug Administration. Guidance for Industry: waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a Biopharmaceutics Classification System. Rockville: FDA, 2017. Disponível em:
<https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070246.pdf> Acesso em 10 de janeiro de 2018.

FERNÁNDEZ, M.; BARCIA, E.; NEGRO, S. Development and validation of a reverse phase liquid chromatography method for the quantification of rasagiline mesylate in biodegradable PLGA microspheres. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Boadilla del Monte, v. 49, p. 1185-1191, 2009.

FERNANDEZ-TERUEL, C.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, I.; CASABÓ, V. G.; RUIZ-GARCIA, A.; BERMEJO, M. Kinetic modelling of the intestinal transport of sarafloxacin. Studies *in situ* in rat and *in vitro* in Caco-2 cells. *Journal of Drug Targeting*, Doha, v. 13, p. 199-212, 2005.

FERRAZ-FILHA, Zilma Schimith. *Avaliação das atividades biológicas de espécies do gênero Lychnophora (arnicas) e estudo fitoquímico do extrato ativo de Lychnophora staavioides Mart..* 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2008.

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 trichocarpa* Spreng. (Brazilian arnica). *Phytotherapy Research*, Nápoles, v. 27, p. 384-389, 2013.

FOGH, J.; TREMPER, G. New human tumor cell lines. In: FOGH, J. *Human tumor cells in vitro*. New York: Plenum, 1975. p. 115-141.

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

GIRON, D. Thermal analysis and calorimetric methods in the characterisation of polymorphs and solvates. *Thermochimica Acta*, Rostock, v. 248, p. 1-59, 1995.

GIRON, D. Monitoring of polymorphism – from detection to quantification. *Engineering in Life Sciences*, Dresden, v. 3, p. 103-112, 2003.

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*, Lawrence, 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*, Toronto, v. 33, p. 316-323, 2012.

GONÇALVES, J. E.; SOUZA, J.; STORPIRTIS, S. Avaliação da permeabilidade de fármacos empregando cultura celulares. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M. N. *Biofarmacotécnica*. São Paulo: Guanabara Koogan, 2011. p. 204-211.

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

HENRIQUES, B. O.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; CALDEIRA, T. G.; SOUZA, J. Development and validation of a stability indicating method for quantification of the sesquiterpene lactone eremantholide C from *Lychnophora trichocarpa* (Brazilian arnica). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Florianópolis, v. 27, p. 502-509, 2017.

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*, Baltimore, v. 7, n. 9, p. 902-910, 1990.

HULSE, W. L.; GRAY, J.; FORBES, R. T. A discriminatory intrinsic dissolution study using UV area imaging analysis to gain additional insights into the dissolution behaviour of active pharmaceutical ingredients. *International Journal of Pharmaceutics*, Lille, v. 434, p. 133– 139, 2012.

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

ISSA, Michele Georges. *Avaliação do impacto do diferentes variáveis no ensaio de dissolução intrínseca de metronidazol*. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

JALÓN, E. G.; CAMPANERO, M. A.; YGARTUA, P.; SANTOYO, S. HPLC determination of acyclovir in skin layers and percutaneous penetration samples. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, Ridgefield, v. 25, n. 20, p. 3187-3197, 2002.

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 and Research*, Jhansi, v. 3, n. 4, p. 942-956, 2012.

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*, Washington, v. 41, n. 7, p.1007-1010, 1998.

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*, Athens, v. 8, n. 3, p. 236-246, 2012.

KUPCHAN, S. M.; EAKIN, M. A.; THOMAS, A. M. Tumor inhibitors. 69. Structure-cytotoxicity relationships among the sesquiterpene lactones. *Journal of Medicinal Chemistry*, Washington, v. 14, n. 12, p. 1147-1152, 1971.

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*, [s.l.], 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*, Belfast, 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*, Regensburg, 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*, Salt Lake City, 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*, Regensburg, v. 50, p. 3-12, 2000.

LOZOYA-AGULLO, I.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, I.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, M.; MERINO-SANJUÁN, M.; BERMEJO, M. *In situ* perfusion model in rat colon for drug absorption studies: comparison with small intestine and Caco-2 cell model. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Lawrence, v. 104, p. 3136-3145, 2015a.

LOZOYA-AGULLO, I.; ZUR, M.; WOLK, O.; BEIG, A.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, I.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, M.; MERINO-SANJUÁN, M.; BERMEJO, M.; DAHAN, A. In-situ intestinal rat perfusions for human Fabs prediction and BCS permeability class determination: investigation of the single-pass vs. the Doluisio experimental approaches. *International Journal of Pharmaceutics*, Lille, v. 480, p. 1-7, 2015b.

MARTIN-VILLODRE, A.; DELFINA, J. M. P.; MORENO, J.; PEREZ-BUENDIA, D.; MIRALLES, J.; COHADO, E. F.; SFINCHEZ-MOYANO, E.; POZO, A. Studies on the reliability of a bihyperbolic functional absorption model. I. ring-substituted anilines. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, New York, v. 14, n. 6, 1986.

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

MONTEIRO, Patrícia Fernanda. *Solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frascos: padronização e definição dos fármacos controle*. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, Columbus, v. 79, p. 629-661, 2016.

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*, Nápoles, v. 10, p. 292-295, 1996.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L.; MUSSEL, W. N.; VIANNA-SOARES, C. D.; PIANETTI, G. A. Análise térmica aplicada à caracterização da sinvastatina em formulações farmacêuticas. *Química Nova*, São Paulo, v. 33, n. 8, p. 1653-1657, 2010.

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*, East Lansing, 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*, Baltimore, v. 14, n. 5, p. 568-571, 1997.

PAULA, Danielle Cristiane Corrêa de. *Atividade cardiovascular in vivo do extrato etanólico de Lychnophora trichocarpa Spreng.*. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2012.

PEREIRA, Thaisa Marinho. *Avaliação da solubilidade e da permeabilidade intestinal de fármacos antirretrovirais. Aplicações na Classificação Biofarmacêutica*. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

PINTO, M.; ROBINE, S.; APPAY, M. D. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biology of the cell*, Paris, v. 47, p. 323-330, 1983.

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*, Lawrence, v. 93, n. 6, p. 1375-1381, 2004. PRESS, B.; GRANDI, D. D. Permeability for intestinal absorption: Caco-2 assay and related issues. *Current Drug Metabolism*, Princeton, v. 9, p. 893-900, 2008.

REIS, Juliana Mazza. *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*. 2013. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

RODRÍGUEZ-SPONG, B.; PRICE, C. P.; JAYASANKAR, A.; MATZGER, A. J.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Salt Lake City, v. 56, p. 241-274, 2004.

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

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*, Florianópolis, v. 16, n. 2, p. 275-282, 2014.

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

SCHIMEK, D.; RAML, R.; FRANCESCONIB, K. A.; BODENLENZ, M.; SINNER, F. Quantification of acyclovir in dermal interstitial fluid and human serum by ultra-high-performance liquid chromatography- high resolution tandem mass spectrometry for topical bioequivalence evaluation. *Biomedical Chromatography*, Athens, v. 32, n. 6, p. 1-7, 2018.

SCHURGERS, N.; DE BLAEY, C. J. Effect of pH, buffer concentration and buffer composition on the absorption of theophylline from the small intestine of the rat. *International Journal of Pharmaceutics*, Lille, v. 19, p. 283-295, 1984.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006.

SINGHAL, D.; CURATOLO, W. Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Salt Lake City, v. 56, p. 335-347, 2004.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. *Fundamentos de Química Analítica*. 8 ed. São Paulo: Thomson, 2006.

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*, Lawrence, 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*, São Paulo, 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*, Campinas, v. 27, n. 4, p. 823-836, 2007.

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 trichocarpa* in gouty arthritis: anti-hyperuricemic and anti-inflammatory effects of its extract, fraction and constituents. *Journal of Ethnopharmacology*, Pretoria, v. 142, n. 3, p. 845-850, 2012.

STAPPAERTS, J.; BROUWERS, J.; ANNAERT, P.; AUGUSTIJNS, P. *In situ* perfusion in rodents to explore intestinal drug absorption: challenges and opportunities. *International Journal of Pharmaceutics*, Lille, v. 478, p. 665-681, 2015.

STORPIRTIS, S.; OLIVEIRA, P. G.; RODRIGUES, D.; MARANHO, D. Considerações biofarmacotécnicas relevantes na fabricação de medicamentos genéricos: fatores que afetam a dissolução e a absorção de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 1-16, 1999.

SWART, K. J.; HUNDT, H. K. L.; GROENEWALD, A. M. Automated high-performance liquid chromatographic method for the determination of acyclovir in plasma. *Journal of Chromatography A*, Ames, v. 663, p. 65-69, 1994.

TAVERNIERS, I.; LOOSE, M. D.; BOCKSTAELE, E. V. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry*, Ontario, v. 23, n. 8, p. 535-552, 2004.

TSENG, Y. C.; PATEL, M.; ZHAO, Y. Determination of intrinsic dissolution rate using miniaturized rotating and stationary disk systems. *Dissolution Technologies*, Hockessin, p. 24-29, 2014.

TUGCU-DEMIROZ, F.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, I.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, M.; BERMEJO, M. Validation of phenol red versus gravimetric method for water reabsorption correction and study of gender differences in Doluisio's absorption technique. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Odense, v. 62, p. 105-110, 2014.

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

UNITED STATES. United States Pharmacopeia, 40 ed., The United States Pharmacopeial Convention: Rockville, 2017.

USSING, H. H.; ZERAHN, K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiologica Scandinavica*, Berlim, v. 23, p. 110-127, 1951.

VALENZUELA, B.; NÁCHER, A.; CASABÓ, V. G.; MARTÍN-VILLODRE, A. The influence of active secretion processes on intestinal absorption of salbutamol in the rat. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Regensburg, v. 52, p. 31-37, 2001.

VAN REES, H.; DE WOLFF, F. A.; NOACH, E. L. The influence of diphenylhydantoin on intestinal glucose absorption in the rat. *European Journal of Pharmacology*, Utrecht, v. 28, p. 310-315, 1974.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VIEGAS, T. X.; CURATELLA, R. U.; WINKLE, L. L. V.; BRINKER, G. Measurement of intrinsic drug dissolution rates using two types of apparatus. *Pharmaceutical Technology*, London, v. 25, p. 44-53, 2001.

VOGELPOEL, H.; WELINK, J.; AMIDON, G. L.; JUNGINGER, H. E.; MIDHA, K. K.; MÖLLER, H.; OLLING, M.; SHAH, V. P.; BARENDIS, 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*, Lawrence, v. 93, n. 8, p. 1945-1956, 2004.

VOLPE, D. A. Application of method suitability for drug permeability classification. *The AAPS Journal*, Arlington, v. 12, n. 4, p. 670-678, 2010.

YANG, Y.; YU, L. X. Oral drug absorption, evaluation, and prediction. In: QIU, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, G.; YU, L.; MANTRI, R. V. *Developing solid oral dosage forms*. Cambridge: Academic Press, 2009. p. 289-308.

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*, Lille, 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*, Baltimore, v. 19, n. 7, p. 921-925, 2002.

WHO – WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Forty-ninth report. Geneva, 2015. Disponível em:
http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/expert_committee/WHO_TRS_992_web.pdf Acesso em 22 de junho de 2017.

WILSON, T. H.; WISEMAN, G. The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface. *The Journal of Physiology*, La Jolla, v. 123, p. 116-125, 1954.

ZAKERI-MILANI, P.; BARZEGAR-JALALI, M.; AZIMI, M.; VALIZADEH, H. Biopharmaceutical classification of drugs using intrinsic dissolution rate (IDR) and rat intestinal permeability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Regensburg, v. 73, p. 102–106, 2009.

ZHANG, J.; LIU, D.; HUANG, Y.; GAO, Y.; QIAN, S. Biopharmaceutics classification and intestinal absorption study of apigenin. *International Journal of Pharmaceutics*, Lille, v. 436, p. 311–317, 2012.

ANEXOS

ANEXO A – Certidão de cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado



Ministério do Meio Ambiente

CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão

Cadastro nº AF50E17

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **AF50E17**
 Usuário: **UFOP**
 CPF/CNPJ: **23.070.659/0001-10**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso:
 Pesquisa Científica **Bioprospecção** **Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Lychnophora trichocarpha

Título da Atividade: **Avaliação biofarmacêutica da eremantolida C obtida de Lychnophora trichocarpha Spreng.**

Equipe

Jacqueline de Souza	UFOP
Tamires Guedes Caldeira	UFOP
Dênia Antunes Saúde Guimaraes	UFOP
Cristina Helena dos Reis Serra	USP
André Bersani Dezani	USP
Dâmaris Lagnier Rodrigues de Lacerda	UFOP
Lais Fernandes	UFOP
Wagner da Nova Mussel	UFMG
Maria Irene Yoshida	UFMG

Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi **Divulgação online em repositório da UFOP de tr** divulgado:

Identificação do meio onde foi **artigo científico publicado no Journal of Pharm** divulgado:

Identificação do meio onde foi **Resumos publicados em anais de congresso** divulgado:

Identificação do meio onde foi **Resumos publicados em anais de congresso** divulgado:

Data do Cadastro: **05/11/2018 23:12:31**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético

Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **10:50** de **25/02/2019**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

ANEXO B – Resumo referente ao trabalho aprovado no Edital nº 19/2016 do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE)

Determinação da permeabilidade utilizando modelo de perfusão in situ em ratos aplicado a moléculas biologicamente ativas

A solubilidade e a permeabilidade intestinal, bem como a dissolução do fármaco a partir da forma farmacêutica, são parâmetros que estão diretamente relacionados à biodisponibilidade oral. O processo de absorção, para que se observe o efeito terapêutico desejado, ocorre apenas se o fármaco for capaz de permear o lúmen intestinal, o que depende da solubilização deste nos meios do trato gastrointestinal. A permeabilidade pode ser determinada utilizando diversos modelos, divididos em quatro grupos: métodos *in vivo*; *in situ*; *in vitro* e *in silico*. Os métodos *in vivo* contemplam os estudos farmacocinéticos em animais ou seres humanos. Os métodos *in situ* consistem da perfusão do fármaco em determinados trechos do epitélio intestinal. Os métodos *in vitro* podem ser subdivididos em modelos que empregam sistemas celulares, tais como segmentos de tecidos animais e cultura de células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2) ou de rim canino (MDCK; MDCK-MDR1), e aqueles baseados em sistemas artificiais, exemplificados pelo ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA). E, por fim, os métodos *in silico* que empregam programas computacionais para a previsão de permeabilidade dos fármacos. No processo de descoberta de novos fármacos, a utilização do método PAMPA permite a rápida determinação de propriedades de permeabilidade relacionadas com a via passiva de absorção, o que torna esse modelo adequado para triagem de um grande número de substâncias. Por sua vez, o método baseado em sistemas celulares, principalmente àquele proveniente da cultura de células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2), tem sido amplamente recomendado para avaliação da permeabilidade, por expressar características das células intestinais. Entretanto, após esse período exploratório e de descobrimento de características de transporte, a avaliação da permeabilidade pelo método *in situ* é importante para agregar informações sobre o processo de absorção, uma vez que há a presença de circulação sanguínea e do sistema nervoso nos animais em experimentação, fatores que influenciam diretamente no processo. Além de analisar a cinética de absorção da substância biologicamente ativa. Diante disso, a proposta do estudo é aplicar o modelo *in situ* de perfusão em ratos para a determinação da permeabilidade da digoxina, um fármaco proveniente de origem natural amplamente utilizado na terapêutica para o tratamento da insuficiência cardíaca congestiva, que não apresenta, entretanto, dados conclusivos sobre seu grau de permeação no organismo. Esta proposta é viável em decorrência da disponibilidade comercial da substância e

do grupo de pesquisa já ter desenvolvido um método cromatográfico para sua quantificação, o qual poderá ser utilizado como ponto de partida para a quantificação do fármaco nos estudos de perfusão. Com as atividades propostas são previstos resultados com relevância científica, uma vez que a digoxina se inclui em um grupo de substâncias antigas e largamente utilizadas, porém na literatura há poucos relatos de estudos de permeabilidade empregando a posologia comumente prescrita. Dentro da ampla perspectiva de divulgação do conhecimento adquirido, o modelo será usado para outras substâncias biologicamente ativas, dentre elas, a eremantolida C. A eremantolida C é de origem natural e as limitações inerentes à Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015, reguladas pelo Decreto nº 8.772, de 11 de maio de 2016, que prevê o acesso ao patrimônio genético, não permite o envio do material para outro país até que seja fornecido pelo Ministério do Meio Ambiente, instrumentos que permitam o estudo de produtos naturais brasileiros fora do Brasil.

Palavras-chave: Permeabilidade, Método *in situ*, Digoxina, Eremantolida C.

ANEXO C – Cópia da aprovação do protocolo de procedimentos na CEUA**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro – ICEB-II, Sala 29

35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil

Fone (31) 3559 -1368 Fax: (31) 3559-1370

Email: ceua@propp.ufop.br**OFÍCIO CEUA N.º. 074/2018, de 8 de maio de 2018****Ilustríssimo(a) Senhor(a)****Professor(a) Doutor(a) Jacqueline de Souza****CIPHARMA/UFOP**

Senhor(a) Pesquisador(a),

Estamos enviando o certificado de aprovação do protocolo n.º. **2018/07**, intitulado **“Avaliação da perfusão intestinal da eremantolida C em ratos wistar”**.

2. Atendendo ao art. 6º, IX, da Resolução Normativa CONCEA n.º 1, de 09.07.2010, solicitamos que encaminhe a CEUA/UFOP o relatório final do projeto, após executá-lo, conforme modelo do *site* da CEUA.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª Paula Melo de Abreu Vieira
Coordenadora da CEUA/UFOP.

ANEXO D – Resumo do artigo publicado referente ao projeto desenvolvido no Doutorado Sanduíche

International Journal of Pharmaceutics 551 (2018) 148–157



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm



Determination of intestinal permeability using *in situ* perfusion model in rats: Challenges and advantages to BCS classification applied to digoxin



Tamires Guedes Caldeira^{a,b,1}, Alejandro Ruiz-Picazo^{a,1}, Isabel Lozoya-Agullo^a,
Dênia Antunes Saúde-Guimarães^c, Marta González-Álvarez^a, Jacqueline de Souza^b,
Isabel González-Álvarez^{a,*}, Marival Bermejo^a

^a Department of Engineering, Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology Area, Universidad Miguel Hernández de Elche, Alicante, Spain

^b Laboratório de Controle de Qualidade, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

^c Laboratório de Plantas Mediciniais, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Intestinal absorption

In situ perfusion

Digoxin

Permeability

Biopharmaceutic Classification System

ABSTRACT

The purpose of this work was to describe the closed loop *in situ* perfusion method in rats and to compare the difficulties and advantages with other methods proposed by regulatory agencies for BCS classification and finally to illustrate its application to evaluate the permeability of digoxin at relevant clinical concentrations. Digoxin was evaluated at two concentration levels: 1.0 µg/ml (with and without sodium azide 65.0 µg/ml) and 6.0 µg/ml. These concentrations correspond to the ratio of the highest dose strength (0.25 mg) and the highest single dose administered (1.5 mg) and the 250 ml of water. *In situ* closed loop perfusion studies in rats were performed in the whole small intestine and also in duodenum, jejunum and ileum segments to evaluate the relevance of P-gp secretion in the overall permeability. A kinetic modelling approach involving passive permeation and efflux transport mechanism allowed the estimation of the passive diffusional component and the Michaelis-menten parameters. The estimated K_m value demonstrated that at clinical luminal concentrations the efflux process is not saturated and then it could be inhibited by other drugs, excipients or food components leading to the already reported clinical drug-drug and drug-food interactions. The present data confirms from a mechanistic point of view these interactions.

ANEXO E – Resumo expandido publicado em anais de congressos

Congresso: 11th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology

Determination of the permeability using in situ perfusion model in rat applied to biologically active molecules: digoxin

Tamires Guedes Caldeira^{1,2}; Alejandro Ruiz-Picazo¹, Jacqueline de Souza²; Dênia Antunes Saúde Guimarães²; Marta González-Álvarez¹; Isabel González-Álvarez¹; Marival Bermejo¹

¹ Pharmacokinetics and Pharmaceutical Technology. Miguel Hernandez University, Spain isabel.gonzalez@umh.es.

² Laboratório de Controle de Qualidade. Universidade Federal de Ouro Preto, Brazil

INTRODUCTION

Digoxin, cardiac glycoside, has the capacity to increase the contractile force of the myocytes, and therefore is a common drug used in the treatment of conditions in which compromised myocardial contractility. Digoxin has a narrow therapeutic window and in order to obtain an adequate response and avoid toxicity the oral dosage can vary from 0.25 mg to 1.5 mg for young individuals with higher body weight and normal renal function. The objective of the study was the assessment of the existence and the relevance of the secretion mechanism when this drug is orally administered at intestinal concentrations close to the expected after administration of the clinical relevant dose

METHODS

The techniques employed to obtain the models used for this work were described previously by Gonzalez-Alvarez et al. (1). The determination of the intestinal Permeability coefficient was made by a method of perfusion in situ without recirculation described by Doluisio and adapted to our experimental conditions. The animals used were male Wistar rats weighting between 270-300 grams. The absorption rate coefficients (k_a) of the compounds were determined by nonlinear regression analysis of the remaining concentrations in the intestinal lumen (C_t) vs. time:

$$C_t = C_0 \times e^{-k_a t}$$

These absorption rate coefficients were then transformed into permeability values using the relationship:

$P_{app} = k_a \times R/2$, where R is the effective radius of the intestinal segment, calculated from the area/volume relationship considering a 2 mL volume and the segment length in each rat.

Experiments were performed at 1mcg/mL which corresponds to 0.25mg/250 mL

RESULTS

The results of our study showed that Digoxin presented a transporter dependent absorption. The studies in the different segments of rat gastrointestinal tract showed a lower permeability (due to higher secretion activity) in the distal portion in consistency with the reported higher expression of P-gp in rat ileum. The pH of the perfusion solutions was the same in all the segments thus the differences in permeability can be assigned to the different expression level of the transporter.

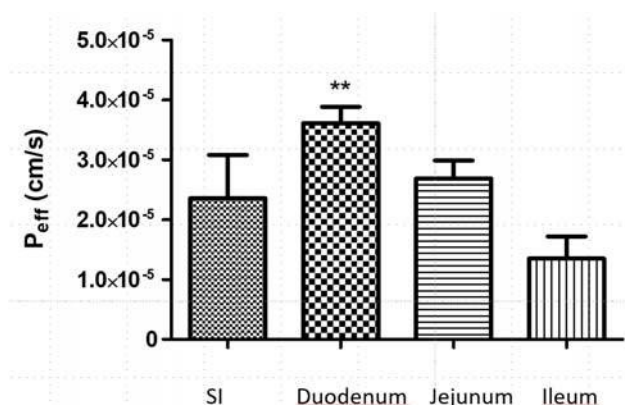


Figure 1 Permeability values of digoxin in different rat intestinal segments.

CONCLUSION

Digoxin is substrate of a secretion transporter which is not saturated at the clinical relevant concentration.

Digoxin permeability at the clinical concentration in rats is lower than the metoprolol one (data not shown) nevertheless it is enough to provide a complete oral fraction absorbed.

REFERENCES

- González-Alvarez I, Fernández-Teruel C, CasabóAlós VG, Garrigues TM, Polli JE, Ruiz-García A, Bermejo M. Biopharm Drug Dispos. 2007 Jul;28(5):22939.

ANEXO F – Resumo publicado na I Mostra da Pós-graduação no Encontro de Saberes 2018

Encontro de Saberes 2018 - I Mostra de Pós Graduação

Determinação da velocidade de dissolução intrínseca (VDI) como suporte na avaliação da presença de polimorfismo na eremantolida C



TAMIRES GUEDES CALDEIRA (Autor), DENIA ANTUNES SAUDE GUIMARAES (Co-Orientador), DAMARIS LAIGNIER RODRIGUES DE LACERDA (Co-Autor), Wagner da Nova Mussel (Co-Autor), Maria Irene Yoshida (Co-Autor), JACQUELINE DE SOUZA (Orientador)

Solubilidade é um parâmetro fundamental para promover a absorção oral de um fármaco. Por meio da determinação da velocidade de dissolução intrínseca (VDI) é possível avaliar a solubilidade de um fármaco e inferir sobre a presença de transição de fase cristalina e polimorfismo. Diferentes polimorfos podem apresentar distintos graus de solubilidade e de biodisponibilidade oral. A eremantolida C (EREC), uma lactona sesquiterpênica presente na espécie *Lychnophora trichocarpa*, com promissora atividade farmacológica e baixa toxicidade, tem potencial para uma adequada absorção oral. Assim, este trabalho objetivou determinar a VDI da EREC visando inferir sobre a presença de transição cristalina, bem como avaliar indiretamente, a ocorrência de polimorfismo. Para isso, a EREC foi isolada e cristalizada em clorofórmio (EREC I) e acetato de etila (EREC II). A VDI foi avaliada utilizando 100 mg de EREC I, força de compressão de 1 tonelada por 1 minuto, 900mL de meios tamponados (pH 4,5; pH 6,8 e pH 7,4) à 37°C sob 100 rpm, com amostragem a cada 30 minutos durante 8 horas. Para avaliar a presença de polimorfismo, amostras de EREC foram submetidas às análises de ponto de fusão, pureza, calorimetria exploratória diferencial (DSC), difração de raios X (DRX), microscopia ótica e eletrônica de varredura. EREC I apresentou faixa de fusão de 234,7-241,6°C e 89,9% de pureza. EREC II apresentou faixa de fusão de 238,6-243,7°C e 97,8% de pureza. EREC I apresentou VDI inferior a 0,1 mg/min/cm², nos três meios, confirmando sua baixa solubilidade. Além disso, não foram observadas transições de fase cristalina. Na DSC, um único pico endotérmico foi obtido para as amostras de EREC. A DRX não mostrou diferenças cristalográficas entre as amostras. EREC I e EREC II apresentaram birrefringência e morfologia indefinida. Assim, EREC não apresenta qualquer tipo de polimorfismo, não observando-se influência na sua solubilidade, e conseqüentemente, na sua biodisponibilidade oral e eficácia terapêutica.

Instituição de Ensino: Universidade Federal de Ouro Preto

Orgão de Fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Polymorphic characterization and implications on biopharmaceutics properties of potential anti-inflammatory drug candidate eremantholide C from *Lychnophora trichocarpa* (Brazilian Arnica)

Tamires G. Caldeira^a , Dênia A. Saúde-Guimarães^a, Dâmaris L. R. De Lacerda^a, Wagner Da Nova Mussel^b, Maria Irene Yoshida^b and Jacqueline De Souza^a 

^aEscola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil and ^bDepartamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Keywords

differential scanning calorimetry; eremantholide C; intrinsic dissolution; polymorphism; solubility; X-ray powder diffraction

Correspondence

Tamires G. Caldeira, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Campus Universitário Morro do Cruzeiro, 35400-000 Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil
E-mail: tg.caldeira@yahoo.com.br

Received October 9, 2018

Accepted January 25, 2019

doi: 10.1111/jpp.13080

Abstract

Objectives To perform the polymorphic and physicochemical characterization of the potential anti-inflammatory drug, eremantholide C (EREC), as well as to evaluate the influence of these characteristics on its biopharmaceutics classification.

Methods Eremantholide C was obtained from chloroformic extract of *Lychnophora trichocarpa* and crystallized in two distinct solvents: chloroform (EREC 1) and ethyl acetate (EREC 2). To evaluate the polymorphism, EREC samples were submitted to melting point, purity, infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry (DSC), X-ray powder diffraction, optical microscopy and scanning electron microscopy analysis. In addition, EREC samples crystallized after intrinsic dissolution study were submitted to DSC and X-ray powder diffraction analysis.

Key findings EREC 1 showed fusion at 234.7–241.6 °C, while EREC 2 showed fusion at 238.6–243.7 °C. No polymorphic transitions were observed during the intrinsic dissolution experiment. A single sharp endothermic peak was obtained for the EREC samples. X-ray diffraction showed no crystallographic differences between the EREC samples. EREC 1 and EREC 2 showed birefringence under polarized light and indefinite morphology; however, the shape of the crystals was common to the two samples.

Conclusions Eremantholide C does not present classical or morphological polymorphism; therefore, there is no influence of crystalline transitions in the solubility and consequently in its biopharmaceutics classification and oral absorption process.