



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
ESCOLA DE FARMÁCIA



**Modelo *in vitro* de Permeabilidade em Membrana
Artificial Paralela para previsão da absorção fármacos**

Renata Rodrigues Lima

Ouro Preto
2017

Renata Rodrigues Lima

**Modelo *in vitro* de Permeabilidade em Membrana
Artificial Paralela para previsão da absorção fármacos**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como parte dos requisitos para
a obtenção do grau de Bacharel em
Farmácia ao curso de Farmácia da
Universidade Federal de Ouro Preto.

Orientadora: Profa. Dra. Jacqueline de
Souza

Co-orientadora: Doutoranda Débora Priscila
de Campos

Ouro Preto
2017

L732m Lima, Renata Rodrigues.
Modelo in vitro de permeabilidade em membrana artificial paralela para
previsão da absorção fármacos [manuscrito] / Renata Rodrigues Lima. - 2017.

60f.: il.: color; tabs; Quadros.

Orientador: Prof. Dr. Jacqueline de Souza.
Coorientador: MSc. Débora Priscila de Campos.

Monografia (Graduação). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de
Farmácia. Departamento de Farmácia.

1. Fármacos- Permeabilidade . 2. Fármaco- Absorção. 3. Ensaio PAMPA.
4. Candesartana cilexetila. I. Souza, Jacqueline de . II. Campos, Débora
Priscila de. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 615.1

Catálogo: ficha@sisbin.ufop.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

Escola de Farmácia

TERMO DE APROVAÇÃO

Modelo in vitro de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela para previsão da absorção fármacos

Trabalho de conclusão de Curso defendido por **RENATA RODRIGUES LIMA**, matrícula 12.2.2065 em 22 de agosto de 2017, e aprovado pela comissão examinadora:

Prof. Dra. Jacqueline de Souza
DEFAR/EF-UFOP, orientadora

Prof. Dra. Carmem Aparecida de Paula
DEACL-EF-UFOP

Prof. Dra. Neila Márcia Silva Barcellos
DEFAR-EF-UFOP

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por sempre me apoiarem e me concederem as melhores condições possíveis para ir atrás dos meus sonhos, vocês são incríveis!

Minha querida orientadora, uma grande mestra! Muito obrigada pelo carinho, dicas, conselhos você foi como mãe para mim.

Minha co-orientadora Débora, pelos conselhos, parceria, amizade e tempo dedicado.

Ao laboratório LCQ, em especial a Tamires pelo constante auxílio e dedicação.

A escola de Farmácia, que me acolheu e me preparou para o mundo. Grandes professores, grandes mestres.

Minha irmã gêmea Rachel, ser maravilhoso e inteligente que esteve sempre comigo.

Minha família, pelo apoio e por sempre acreditarem em mim.

Meus grandes amigos que cultivei nessa UFOP e fizeram meu curso maravilhoso, em especial Amanda, Amaia, Ana, Hortênsia, Letícia, Lucas, Rafael, Samara e Windson sem vocês a Farmácia não seria tão especial. Meu sincero obrigada.

Em especial, agradeço a minha querida amiga Juliana, obrigada pela amizade!

Ao PET Farmácia, que transformou minha vida.

Ao melhor CA que já existiu.

Agradeço ao MEC/FNDE e a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação pelas oportunidades cedidas ao longo do curso.

RESUMO

Para que ocorra a absorção de um fármaco administrado por via oral na sua forma farmacêutica sólida, é necessário que ocorra sua dissolução nos líquidos intestinais e permeação através das membranas do trato gastrointestinal (TGI). Diversos fatores fisiológicos e físico-químicos podem interferir no processo de permeação de um fármaco o que torna seu estudo importante para prever e correlacionar informações sobre a absorção e a biodisponibilidade. Para prever este comportamento, modelos foram desenvolvidos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* com a finalidade de determinar a permeabilidade de fármacos sempre buscando a melhor correlação possível com a permeação em humanos. O modelo *in vitro* de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA) demonstra grande versatilidade, baixo custo além de facilidade para a realização experimental. Este trabalho visa descrever as principais condições para o emprego do PAMPA como modelo de permeabilidade além de comparar as variações durante os procedimentos e os resultados obtidos por diferentes pesquisadores, além de produzir um material bibliográfico com as condições de um ensaio PAMPA para estudo da permeabilidade da candesartana cilexetila, um pró- fármaco utilizado na terapia anti-hipertensiva. Para tanto, foram realizadas buscas bibliográficas nas principais bases de dados de periódicos sobre artigos que utilizaram o modelo PAMPA na previsão da permeabilidade gastrointestinal de fármacos desde 1998.

Observou-se a existência de diversas variações no procedimento para realização do ensaio, com diferentes impactos na predição da permeabilidade e correlação com dados *in vivo*, como composição lipídica que simulará as membranas do TGI, o tipo de filtro utilizado, além da concentração do fármaco estudado e os valores de pH das soluções presentes nos compartimentos doadores e receptores. Com o presente estudo constatou-se que a camada aquosa estacionária (CAE) e a retenção de fármacos nas membranas são importantes parâmetros a serem avaliados por serem fatores limitantes durante execução do ensaio. Sendo necessária a prévia avaliação e seleção de todas as condições experimentais correlacionando-as com as características físico-químicas dos fármacos a serem estudados.

No presente trabalho indicou-se as principais condições de ensaio, utilizando o método PAMPA para o estudo de permeabilidade da candesartana cilexetila, pró fármaco empregado na terapia anti-hipertensiva.

Apesar da grande versatilidade ao método, o ensaio é limitado pois não prevê a permeação por mecanismos de transportes paracelulares e ativos. Além destes fatores há uma carência na literatura quanto a padronização do método o que pode comprometer a correlação dos dados obtidos com os dados encontrados *in vivo*.

Palavras-Chaves: Permeabilidade, ensaio PAMPA, Absorção, candesartana cilexetila.

ABSTRACT

For absorption of an orally administered drug in its solid dosage form to occur, its dissolution in the intestinal fluids and permeation through the membranes of the gastrointestinal tract (GIT) need to occur. Several physiological and physicochemical factors can interfere in the permeation process of a drug, which makes its study important to predict and correlate information on absorption and bioavailability. To predict this behavior, models were developed *in silico*, *in vitro* and *in vivo* in order to determine the permeability of drugs always seeking the best possible correlation with permeation in humans. The *in vitro* model of Permeability in Parallel Artificial Membrane (PAMPA) demonstrates great versatility, low cost and ease to experimental realization. This work aims to describe the main conditions for the use of PAMPA as a permeability model in addition to comparing the variations during the procedures and the results obtained by different researchers, as well as producing a bibliographical material with the conditions of a PAMPA test to study the permeability of candesartan cilexetil, a prodrug used in antihypertensive therapy. To do so, bibliographic searches were conducted in the main periodicals databases on articles that used the PAMPA model in the prediction of gastrointestinal drug permeability since 1998.

There were several variations in the procedure to perform the test, with different impacts on the prediction of permeability and correlation with *in vivo* data, such as lipid composition that will simulate the TGI membranes, the type of filter used, besides the concentration of the studied drug and the pH values of the solutions present in the donor and recipient compartments. With the present study it was verified that the unstirred water layer (UWL) and the retention of drugs in the membranes are important parameters to be evaluated because they are limiting factors during the execution of the test. It is necessary the previous evaluation and selection of all the experimental conditions correlating them with the physical-chemical characteristics of the drugs to be studied.

In the present work the main test conditions were indicated, using the PAMPA methodology for the permeability study of candesartan cilexetil, a drug indicated for antihypertensive therapy.

Despite the great versatility of the method, the assay is limited because it does not predict permeation by paracellular and active transport mechanisms. In addition to these factors there is a lack in the literature regarding standardization of the method which may compromise the correlations of the data obtained with *in vivo* data.

Keywords: Permeability, PAMPA assay, Absorption, candesartan cilexetil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1– Ilustração dos tipos de permeação de substâncias pelas membranas do TGI	23
Figura 2 – Ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA)	25
Figura 3 – Fórmula estrutural da candesartana.....	28
Figura 4 – Fórmula estrutural da candesartana cilexetila.	28
Figura 5 - Camada Aquosa Estacionária	36
Figura 6 – Guia para realização do PAMPA	47
Figura 7 – Comportamento do fármaco na presença de proteínas séricas	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados de permeabilidade efetiva de diferentes substâncias através de membranas compostas por três lipídeos e duas proporções.	31
Tabela 2 - Comparação da retenção em (%) em dois modelos com membranas lipídicas diferentes	34
Tabela 3 – Correlação (r^2) entre permeabilidade calculada em jejuno humano e PAMPA	43
Tabela 4 – Condições para o emprego do PAMPA no estudo de permeabilidade gastrointestinal a partir dos dados de 5 autores	45
Tabela 5 - Proposta de condições para realização do PAMPA utilizando a Candesartana Cilexetila.....	49
Tabela 6 – Resultados dos cálculos utilizando a equação de Henderson-Hasselbach	50

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB)	24
---	----

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Fórmula para o cálculo da Permeabilidade aparente.	33
Equação 2 - Fórmula para o cálculo da Permeabilidade efetiva e retenção nas membranas	33
Equação 3 - Equação de Henderson-Hasselbach	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μM	Micromolar
A	Área do filtro da placa PAMPA
ACB	Azul de Crescil Brilhante
ADME	Absorção, distribuição, metabolismo e excreção de fármacos
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
BHE	Barreira hematoencefálica
CC	Candesartana Cilexetila
C_D	Concentração no compartimento doador
CHO	Colesterol
DA	Ácido dodecilcarboxílico
<i>DS-PAMPA</i>	<i>Double-Sink PAMPA</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOPC	Dioleilfosfatidilcolina
FC	Fosfatidilcolina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FE	Fosfatidiletanolamina
FG	Fosfatidilglicerol
FI	Fosfatidilinositol
FS	Fosfatidilserina
Log P	Logaritmo do coeficiente de partição octanol/água
Log P_e	Logaritmo de Permeabilidade
PA	Ácido fosfatídico
P_e	Permeabilidade
Pgp	Glicoproteína P
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Constante de ionização
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
TGI	Trato gastrointestinal
UV	Ultravioleta
CAE	Camada aquosa estacionária
V_A	Volume do compartimento receptor
V_D	Volume do compartimento doador

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 Absorção de fármacos	17
3.1.1 Fatores fisiológicos que alteram a absorção	17
3.1.1.1 Posição do corpo durante a ingestão	17
3.1.1.2 Ausência de micro vilosidades absorptivas	17
3.1.1.3 pH do compartimento	18
3.1.1.4 Tempo de esvaziamento gástrico.....	18
3.1.1.5 Forma de administração.....	18
3.1.2 Fatores físico-químicos que interferem na absorção.....	18
3.2 Fisiologia do trato gastrointestinal.....	19
3.2.1 Morfologia das células intestinais.....	20
3.2.2 Caminho do fármaco pelo TGI.....	21
3.3 Permeabilidade de fármacos.....	22
3.3.1 Transporte através das membranas	22
3.4 Modelos de permeabilidade in silico, in vitro e in vivo	24
3.5 Ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA)	25
3.6 Candesartana cilexetila	27
4 MÉTODO	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 Principais condições para o emprego do PAMPA como modelo de permeabilidade.....	30
5.1.1.1. Integridade das membranas.....	32
5.1.1.2. Retenção nas membranas	32
5.1.2. Composição e tipos de filtros	34
5.1.3. Camada de água estacionária.....	35
5.1.4. Concentrações das amostras durante o ensaio e faixas de pH nos compartimentos doador e receptor.....	37

5.3 Condições de ensaio para determinação da permeabilidade por PAMPA de um fármaco escolhido: Candesartana cilexetila.	48
6 CONCLUSÃO	53
7 REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

Para que ocorra a absorção de fármacos a partir de formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral, é necessário que estes passem por processos de liberação para que ocorra sua solubilização e posterior permeação através das membranas do trato gastrointestinal.

Esta permeação está relacionada com características físico-químicas dos fármacos, tais como pKa, lipofilia, massa molecular, polimorfismo, entre outras. Podendo também ser influenciada pelas características fisiológicas, como a constituição das membranas, o conteúdo do TGI e a velocidade de esvaziamento gástrico.

Estão sendo realizados diversos estudos visando o desenvolvimento de métodos que substituam os ensaios *in vivo* por técnicas mais rápidas, menos onerosas e que não utilizem humanos. Nesta premissa alguns modelos foram propostos como computacionais (*in silico*) e modelos *in vitro* para o estudo da permeabilidade.

Para a obtenção de um método *in vitro* que possibilite associar estas informações e correlacionar com os resultados obtidos a partir de experimentos realizados em humanos, são propostos diversos modelos.

Dentre estes, é possível utilizar ensaios empregando células de adenocarcinoma de cólon humano (CACO-2), Mardin-Darby de rim canino (MDCK), entre outros. O modelo de membrana artificial paralela (PAMPA), idealizado por Kansy e colaboradores (1998) para determinação da permeabilidade transcelular passiva de fármacos, visa suprimir a dependência do cultivo celular, empregando um modelo totalmente *in vitro*, com o uso de lipídeos que procuram mimetizar as membranas biológicas.

O PAMPA vem sendo bastante empregado na triagem de moléculas candidatas a fármacos, ou seja, nas caracterizações de acordo com suas características de permeabilidade. Apesar de ser um método versátil e que permite a rápida determinação da permeabilidade, possui limitações para fármacos que são absorvidos por transporte paracelular e transporte ativo.

A importância do presente trabalho consiste em reunir as principais informações para a determinação da permeabilidade de fármacos utilizando PAMPA,

além das variáveis interferentes a aplicação do método e propor um roteiro para sua realização utilizando um fármaco previamente escolhido.

Este trabalho visa contribuir com informações no que remete ao estudo de permeabilidade utilizando o método PAMPA bem como suas variáveis baseando-se em pesquisas publicadas sobre o tema. Além da produção de um material referencial teórico para o cálculo da permeabilidade da candesartana cilexetila (CC), um pró-fármaco utilizado para o tratamento da hipertensão arterial e que faz parte dos temas estudados por nosso grupo de pesquisa.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Descrever as principais indicações para o modelo PAMPA e comparar as variações nos procedimentos aplicados a determinação da permeabilidade de fármacos.

2.2 Objetivos específicos

I- Descrever as principais condições para o emprego do PAMPA como modelo de permeabilidade.

II- Comparar as variáveis interferentes nos procedimentos e nos resultados de permeabilidade obtidos pelo PAMPA por diferentes pesquisadores.

III- Produzir um material bibliográfico sobre PAMPA a fim de ser utilizado como fonte de consulta.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Absorção de fármacos

Para que ocorra a absorção de um fármaco a partir de formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral, tais como, suspensões, comprimidos, drágeas e cápsulas, é necessário que ocorra a sua dissolução nos líquidos do trato gastrointestinal (TGI) e a sua permeação através das camadas ou membranas intestinais até a chegada à corrente sanguínea (AMIDON et al., 1995).

Os comprimidos são a forma farmacêutica sólida oral preferencial para administração, devido ao baixo custo e maior conforto ao paciente o que contribui para a adesão ao tratamento (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2007). Segundo Kansy e seus colaboradores (1998), a absorção de um fármaco é um dos principais fatores que irá determinar a sua biodisponibilidade.

3.1.1 Fatores fisiológicos que alteram a absorção

Diversos fatores fisiológicos podem retardar ou acelerar o processo de absorção no TGI de fármacos administradas via oral (YU et al., 1996).

3.1.1.1 Posição do corpo durante a ingestão

Segundo Ashford (2005) um destes fatores é a posição em que as formas farmacêuticas sólidas são ingeridas. A posição mais aconselhável é a vertical, que possibilita que o fármaco atravesse rapidamente o esôfago, de maneira oposta ao observado na posição horizontal ou sem auxílio de água em que é passível a ocorrência de adesão do fármaco ao esôfago e/ou retardo de sua chegada ao estômago.

3.1.1.2 Ausência de micro vilosidades absorptivas

Um dos fatores que limita a absorção de fármacos no estômago é a ausência das típicas vilosidades da membrana absorptiva intestinal que tem um papel

fundamental no aumento da superfície de contato das células absorptivas com o fármaco (ASHFORD, 2005).

3.1.1.3 pH do compartimento

O pH é outro ponto fundamental na limitação da absorção principalmente no estômago, onde o pH varia de 1-3,5 que devido à alta acidez pode degradar diversas formulações (MOURA, 2005). Um artifício farmacotécnico para evitar a degradação do fármaco durante sua passagem pelo estômago é o revestimento entérico, no qual, o comprimido é revestido com algum material, como polímeros, que são resistentes a acidez estomacal (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010).

3.1.1.4 Tempo de esvaziamento gástrico

O tempo de esvaziamento gástrico, que é o tempo que uma substância leva para atravessar o estômago será determinante no processo absorptivo de fármacos, já que esvaziamentos muito rápidos irão restringir o contato do fármaco com os líquidos do TGI e sua permeação (ASHFORD, 2005).

3.1.1.5 Forma de administração

Segundo Ashford (2003) o fármaco irá atingir mais rapidamente o intestino delgado, local onde há maior área para ocorrer absorção, se for ingerido em estado de jejum e administrado com água. Porém no estado alimentado, o fármaco tende a ficar mais tempo retido no estômago juntamente ao alimento. Logo, para ser absorvido, o fármaco deve estar dissolvido no conteúdo do TGI, ser estável no pH que será exposto e resistir a ação das diversas enzimas que estão envolvidas no processo da digestão, competindo com os alimentos pelos principais sítios de absorção (ASHFORD, 2005; WASHINGTON; WILSON, 2014).

3.1.2 Fatores físico-químicos que interferem na absorção

O processo de absorção de fármacos pode ser afetado pelas suas propriedades físico-químicas e também pelo tipo de forma farmacêutica em que está contido (YU; SHARGEL, 2015).

3.1.2.1 Fatores relacionados as propriedades físico-químicas dos fármacos

A absorção pode ser influenciada pelas características físico químicas dos fármacos, considerando que grande parte dos fármacos são ácidos ou bases fracas, as características de pH e pKa são fundamentais para a predição do comportamento do fármaco nos fluídos biológicos. A solubilidade, que é a quantidade de soluto que dissolverá em um solvente, também é uma propriedade importante no processo de absorção, sabe-se que a baixa solubilidade em meio aquoso representa um dos maiores problemas no desenvolvimento de formulações uma vez que o composto estudado precisa estar solúvel no meio para poder atravessar as membranas do TGI.

Outras propriedades, tais como estado cristalino, grau de hidratação e polimorfismo, que é a propriedade de um fármaco existir em uma ou mais conformações moleculares no estado sólido, podem também influenciar principalmente na solubilidade do fármaco, comprometendo também a absorção.

O coeficiente de partição octanol/água (logP) é um importante parâmetro na avaliação das características físico químicas dos fármacos, por permitir verificar a lipofilia dos compostos e prever sua capacidade de atravessar as membranas (STORPIRTIS et al., 2009).

3.1.2.2 Fatores relacionados a forma farmacêutica que interferem na absorção

Segundo Amidon (1995) os parâmetros que interferem na dissolução a partir da forma farmacêutica, solubilidade e a permeabilidade do fármaco são fundamentais para o controle e extensão da sua absorção.

Shargel e Yu (2012) discutem que a dissolução de um fármaco a partir de uma forma farmacêutica consiste no processo em que a substância sólida após sua desintegração é dissolvida em um solvente como nos líquidos presentes no trato gastrointestinal. Os fatores que irão afetar a dissolução de um fármaco em sua forma farmacêutica sólida incluem a natureza físico química da substância, as características dos seus excipientes e o método de fabricação (SHARGEL; YU, 2015, STORPIRTIS et al., 2009).

3.2 Fisiologia do trato gastrointestinal

O trato gastrointestinal é um complexo conjunto de órgãos que se inicia na cavidade oral até a anal, tem como principais funções a realização do trânsito de

alimentos por todo tubo digestivo, secreção de sucos digestivos e promoção da digestão de alimentos, além da absorção de nutrientes e eliminação de resíduos (HALL, 2012).

A parede do TGI é composta fundamentalmente por quatro principais camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa (ASHFORD, 2001; HALL, 2010).

A camada mucosa é a mais interna, sendo onde se encontram os enterócitos e células enteroendócrinas, responsáveis pela digestão, absorção e secreções que protegem e lubrificam o TGI (BALIMANE; HAN; CHONG, 2005, GUYTON, 2009, BERNE; LEVY, 2000).

A camada submucosa é rica em tecido conjuntivo frouxo, vasos linfáticos e vasos sanguíneos (BERNE; LEVY, 2000).

A camada muscular externa também chamada de própria está de modo longitudinal ao longo do tubo. A contração dessas camadas é responsável pela mistura e impulso do conteúdo que está sendo transportado até o próximo compartimento do TGI (BERNE; LEVY, 2000).

A camada serosa que reveste toda a superfície da parede do abdome além de ser responsável pela sustentação dos órgãos da cavidade possui células que secretam líquidos que auxiliam na lubrificação durante os movimentos do TGI (ASHFORD, 2001; BERNE; LEVY, 2000).

3.2.1 Morfologia das células intestinais

A função do intestino delgado na manutenção da homeostase do corpo se deve a sua capacidade absorptiva de nutrientes. No entanto, além de nutrientes, este órgão, está exposto a diversos outros compostos como fármacos, agentes tóxicos e micro-organismos. Em decorrência disto, o epitélio do intestino funciona como uma barreira complexa e seletiva com diversos mecanismos para proteger o organismo (ASHFORD, 2005).

O intestino delgado é formado por uma monocamada epitelial simples composta basicamente por enterócitos, células enteroendócrinas e células calciformes responsáveis pela expressão de diversos peptídeos entre eles o *trefoil*. (SNOECK; GODDEERIS; COX, 2005; THIM, 1997).

Os enterócitos são as células mais abundantes que compõem o revestimento do intestino delgado. Estas células epiteliais são hiperpolarizadas com junções

estreitas e proteínas que mantêm a polaridade celular e a integridade do epitélio (SNOECK; GODDEERIS; COX, 2005). A principal característica desse tipo de célula é a sua disposição em monocamadas que formam as microvilosidades que aumentam consideravelmente a superfície de revestimento do intestino delgado (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Esse tipo de célula absorptiva tem como uma das suas principais funções garantir a absorção de íons, água, nutrientes além de vitaminas e fármacos (MIRON; CRISTEA, 2012, BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

As células calciformes são responsáveis pela produção e manutenção do muco, por meio da síntese e produção de mucinas (SPECIAN; OLIVER, 1991). São também responsáveis pela expressão de peptídeos *trefoil* que além de fornecer proteção ao epitélio promovem a sua recuperação após alguma lesão (THIM, 1997).

Ahlman e Nilsson (2001) descreveram o intestino como o maior “órgão endócrino” do corpo. Além dos hormônios principais, secretina, gastrina e colecistocinina sabe-se que há mais de 30 outros descobertos e identificados no TGI. Alterações nas composições e estruturas das células intestinais podem comprometer a fisiologia da digestão (GUNAWARDENE; CORFE; STATON, 2011).

3.2.2 Caminho do fármaco pelo TGI

Após passar pela cavidade oral, o fármaco é encaminhado pelo esôfago até o estômago, este é um reservatório temporário responsável pela secreção de ácido clorídrico (HCl), muco e bicarbonato (HCO_3^-).

Devido ao estômago não possuir as típicas vilosidades que facilitam a absorção dos fármacos, ele não é considerado um órgão absorptivo. Porém o tempo de esvaziamento e as diferentes secreções que regulam o pH são importantes para limitar o processo de absorção do fármaco. O intestino delgado é o local no qual ocorre a maior parte da absorção das substâncias ingeridas, possui de 4-5 metros e devido a sua anatomia é dividido em duodeno, jejuno e íleo. O pH intestinal é propenso a variar entre 5,0 - 7,5 devido as diferentes condições quando em jejum e alimentado (ASHFORD, M., 2001).

O intestino delgado é altamente vascularizado e possui microvilosidades que aumentam a área de contato e conseqüentemente o tornam ideal para absorção dos nutrientes (ASHFORD, 2001, BERNE, LEVY; 2000). O intestino grosso é a porção final do TGI, não possui ampla área superficial como o intestino delgado, porém é

responsável pela absorção de íons e conseqüentemente de água, formação e armazenamento das fezes para expulsão (MEERVELD; JOHNSON; GRUNDY, 2017).

3.3 Permeabilidade de fármacos

Segundo Storpirtis et al. (2009, p.16).

“A permeabilidade é baseada indiretamente na extensão da absorção (fração absorvida da dose e não fração sistêmica) de um fármaco em humanos, e diretamente por meio da medida da velocidade de transferência de massa através da membrana intestinal humana”

A permeabilidade de um fármaco irá depender das barreiras fisiológicas do corpo humano, seus transportadores e das características físico-químicas do fármaco (GONÇALVES; SOUZA; STORPIRTIS, 2009).

3.3.1 Transporte através das membranas

A permeação de substâncias através das membranas do TGI é mediada por mecanismos complexos que irão promover a passagem do composto por diferentes caminhos de um compartimento para outro.

Os transportes passivos paracelular e transcelular, assim como os transportes ativos mediados por carreadores no sentido absorptivo ou secretório e o transporte por vesículas, como ilustrados na Figura 1, são os principais mecanismos envolvidos na permeação através das membranas celulares (BALIMANE; HAN; CHONG, 2005).

No transporte passivo não há gasto de energia, a molécula se move da área mais concentrada para a menos concentrada (YU; SHARGEL, 2015), no entanto, para que isto ocorra a molécula deverá estar solubilizada (NELSON E COX, 2006).

O transporte passivo é descrito pela lei de Fick, que é caracterizada pela relação entre a velocidade de difusão da substância de interesse e a sua concentração em dois compartimentos, sendo um doador e outro receptor, formando assim um gradiente de concentração (WASHINGTON; WASHINGTON; WILSON, 2014). O processo passivo transcelular depende da composição do soluto a ser permeado, este deve ser lipossolúvel para ter maior afinidade pela camada lipídica das células da membrana por onde ele permeia. O transporte passivo paracelular

ocorre através dos poros aquosos que estão nos espaços intercelulares entre duas células (GONÇALVES; SOUZA; STORPIRTIS, 2009, ASHFORD, 2005).

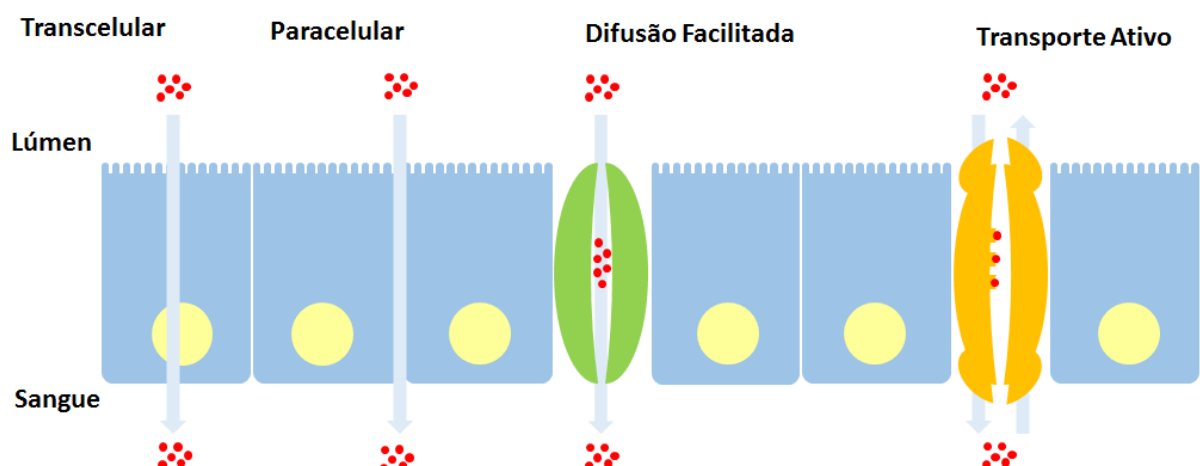
Há um tipo de transporte mediado por carreadores com gasto de energia geralmente ATP ou GTP, que é também denominado transporte ativo que ocorre normalmente contra o gradiente de concentração, o transportador possui especificidade pelo substrato. Este transporte via carreadores e transportadores inclui mecanismos de influxo e efluxo (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

No mecanismo de influxo, ou seja, o mecanismo de transporte no sentido absorptivo, ocorre a internalização de substâncias como aminoácidos, peptídeos, ânions e cátions orgânicos, além de nucleosídeos e outros nutrientes através de transportadores com o gasto de energia (TAKANO; YUMOTO; MURAKAMI, 2006). Como exemplo de transportadores de influxo têm-se o transportador de peptídeos (PepT1) responsável por transportar oligopeptídeos oriundos da dieta (SPANIER, 2013).

Já o mecanismo de efluxo que ocorre nas células epiteliais, é responsável pela secreção das substâncias das células epiteliais para o lúmen. É o processo inverso do que ocorre no mecanismo de influxo (GOLAN et al., 2009). Diversos transportadores já foram identificados e descritos principalmente da família ABC devido seu potencial para causar resistência a quimioterapia (FLETCHER et al., 2010).

Desta família, destaca-se a glicoproteína P (Pgp) que é amplamente estudada por agir como uma barreira biológica para expulsão de xenobióticos e substâncias tóxicas. Esse processo é um dos limitantes da biodisponibilidade oral de alguns fármacos (DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008; GOLAN et al., 2009).

Figura 1– Ilustração dos tipos de permeação de substâncias pelas membranas do TGI



3.4 Modelos de permeabilidade *in silico*, *in vitro* e *in vivo*

Com a percepção da importância de se determinar a solubilidade de fármacos em líquidos aquosos que simulem o pH do TGI, bem como, estudar sua permeabilidade perante as membranas do TGI, houve um avanço na classificação de moléculas de acordo com limites de solubilidade e permeabilidade. Estas informações puderam ser correlacionadas com o comportamento *in vivo* e conseqüentemente com a sua biodisponibilidade. Esta realidade possibilitou a proposição do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), Quadro 1, que aloca os fármacos em quatro classes de acordo com sua solubilidade e permeabilidade (AMIDON et al., 1995).

Quadro 1 - Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB)

Classe	Solubilidade	Permeabilidade
I	Alta	Alta
II	Baixa	Alta
III	Alta	Baixa
IV	Baixa	Baixa

Fonte: Adaptado de AMIDON et al., 1995.

A partir deste panorama diversos modelos foram propostos e desenvolvidos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* para a determinação da permeabilidade de fármacos.

Modelos *in silico* referem-se a métodos computacionais que estão se tornando populares nos últimos anos por estimarem a permeabilidade de uma substância empregando suas propriedades como lipofilia, ligações de hidrogênio, o tamanho da molécula e a força dipolo-dipolo (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Nos últimos anos o avanço da informática pode ser notado em todas as vertentes da pesquisa científica, os modelos computacionais surgiram como importante ferramenta na descoberta de novos fármacos assim, priorizando potenciais candidatos a serem sintetizados e estudados (MANLY et al., 1998).

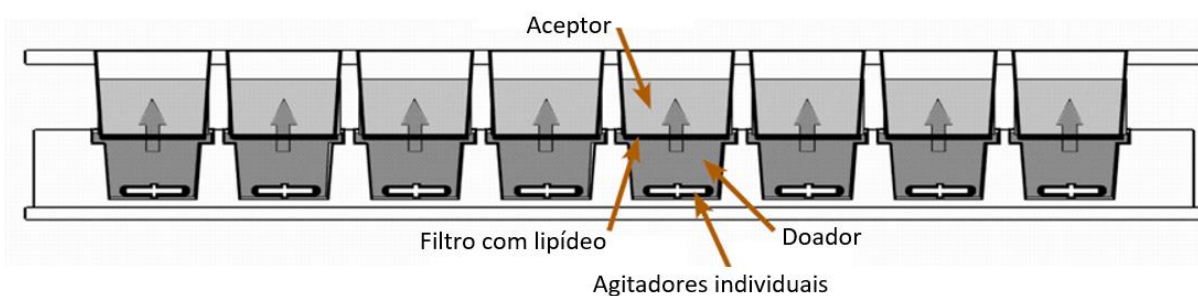
Como exemplo de modelo *in vivo*, realizado em humanos, para determinação da permeabilidade têm-se o ensaio Loc-I-Gut proposto Lennernäs e colaboradores em 1992. Este modelo é basicamente composto de um tubo de perfusão multicanal com aproximadamente 10 cm e dois balões oclusivos. O tubo é inserido na cavidade oral do voluntário devidamente anestesiado e atingindo a região do intestino delgado. O tempo de perfusão e análise é variável (LENNERNAS, 1992). Ao final do experimento, é possível quantificar a permeação de diferentes substâncias no segmento isolado do intestino delgado (KNUTSON, 2009).

Outras alternativas para determinação da permeabilidade consistem em ensaios artificiais *in vitro* como PAMPA, ou modelos utilizando diferentes culturas de células de adenocarcinoma de colón humano (CACO-2) além de células Madin-Darby de rim canino (MDCK) (KANSY, 1998; BALIMANE, 2000; SUGANO et al., 2001, AVDEEF et al., 2007).

3.5 Ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA)

A necessidade da descoberta de novos fármacos e de aperfeiçoar o processo de triagem de substâncias biologicamente ativas suscita a avaliação dos diferentes modelos para determinação da permeação (KANSY, 1998; LIU et al., 2003). O ensaio PAMPA, introduzido por Kansy e seus colaboradores em 1998 é um ensaio realizado *in vitro*, que além de rápido, reproduzível e de baixo custo se baseia principalmente nas características físico-químicas do fármaco a ser estudado para poder prever assim sua permeabilidade *in vivo*.

Figura 2 – Ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA)



Fonte: Adaptado Pion, 2017¹

¹ Disponível em: <https://pion-inc.com/Instrumentation/Permeability>

O modelo original, ilustrado na Figura 2, consiste em uma placa de micro titulação com 96 poços (KANSY, 1998; BALIMANE, 2005) nos quais são realizadas divisões por meio do acoplamento de outra placa, formando um compartimento doador que contém o analito a ser avaliado e um compartimento receptor contendo apenas meio tamponado, usualmente que mimetiza o pH sanguíneo e a osmolaridade fisiológica. Para solubilização do fármaco pode-se utilizar dimetilsulfóxido (DMSO) disperso em um tampão com o pH fisiológico escolhido. Entre os compartimentos doadores e receptores há um filtro, usualmente de fluoreto de polivinilideno (PVDF) hidrofóbico no qual deposita a membrana lipídica previamente solubilizada em solvente orgânico (geralmente n-dodecano) que no meio simulará a membrana do TGI. Após o término do tempo de incubação definido, quantifica-se o fármaco permeado e retido nas membranas (KANSY, 1998; ADVEEF, 2003; BALIMANE 2005; REIS, 2013).

Empregando este modelo é possível prever, *in vitro*, a permeação de um fármaco através das membranas lipídicas do TGI por processo de difusão passiva (ADVEEF, 2005).

Diversas variantes da técnica foram surgindo com o objetivo de determinar a permeabilidade passiva de substâncias em outros compartimentos além do TGI, como a simulação das membranas da região do cérebro para assim quantificar a permeabilidade de substâncias através das barreiras hematoencefálicas (BHE) (DI et al., 2003), bem como o “PAMPA-cutâneo” que simula as condições das membranas cutâneas permitindo detectar o transporte passivo pelas membranas da pele (MARKOVIC et al., 2012).

Atualmente, diversos ensaios são descritos na literatura com variações no método, desde alterações no tipo de suporte inerte que será impregnado pelo conteúdo lipídico, até mudanças na composição da membrana, modificações nas condições visando a não saturação do sistema (condições *sink*), alterações no pH dos compartimentos e no tempo de incubação durante o teste (FALLER, 2008).

Em 2002 Fischer e colaboradores sugeriram que o PAMPA pode ser responsável em breve pelo desaparecimento do CACO-2, visto ser um método totalmente *in vitro*, de baixo custo de operação, que permite a avaliação simultânea de um grande número de compostos, com uma demanda de volume de trabalho muito inferior ao requerido pelos ensaios *in vivo* e com uso de células, além de

possuir boa capacidade de predição da permeabilidade (KANSY; AVDEEF; FISCHER, 2004).

Por outro lado, apesar destas vantagens, o sistema possui limitações que podem ser cruciais na determinação da permeabilidade. Por ser um método totalmente *in vitro* limita-se à predição da permeabilidade passiva através das membranas. Substâncias cujo transporte se dá via transcelular ou são regidos por mecanismos de efluxo, podem ter sua permeabilidade calculada de forma ineficiente e ineficaz (LI et al., 2008; ADVEEF et al., 2007).

Outras características inerentes ao método que podem ocasionar a sua limitação são a camada aquosa estacionária, a retenção da substância nas membranas, a ruptura da membrana durante o ensaio, além de diferentes coeficientes de permeação da substância com a mudança da composição lipídica utilizada (AVDEEF; NIELSEN; TSINMAN, 2004, BALIMANE; HAN AND SAEHO CHONG, 2005).

3.6 Candesartana cilexetila

O ensaio PAMPA, permite calcular a permeabilidade efetiva de diversos fármacos e substâncias, dentre eles a Candesartana Cilexetila.

Campos e colaboradores realizaram em (2015) estudos *in silico* com fármacos antagonistas dos receptores de angiotensina II empregados no tratamento da hipertensão arterial objetivando selecionar dentre eles, um potencial anti-hipertensivo para ser alvo de estudos biofarmacêuticos, ou seja, ter sua solubilidade e permeabilidade determinadas e assim fomentar a avaliação da possibilidade de sua inclusão no Programa Farmácia Popular do Brasil. Dentre os fármacos analisados, os autores verificaram que a candesartana cilexetila demonstrou possuir maiores vantagens farmacológicas em relação aos demais como, maior potência e duração de ligação aos seus receptores, além de não interagir com alimentos, sendo assim escolhida.

A candesartana cilexetila é indicada para o tratamento de hipertensão leve, moderada e grave além de insuficiência cardíaca de tipo II e III (ATACAND, 1997). Comercializada sob forma de comprimidos de 8 mg ou 16 mg, a candesartana cilexetila (Figura 3), é um pró- fármaco que ao sofrer hidrólise durante a absorção no trato gastrointestinal, se converte em sua forma ativa, a candesartana (Figura 4).

Deste modo possui melhor biodisponibilidade comparada a sua forma ativa, a candesartana (FDA, 2002).

Avaliando às características físico químicas a candesartana cilexetila possui dois valores de pKa relatados: 5,3 e 6,0. Sua massa molecular é de 610,66 g/mol e a fórmula química $C_{33}H_{34}N_6O_6$ (HUSAIN et al., 2011; JAPAN, 2011).

Figura 3 – Fórmula estrutural da candesartana.

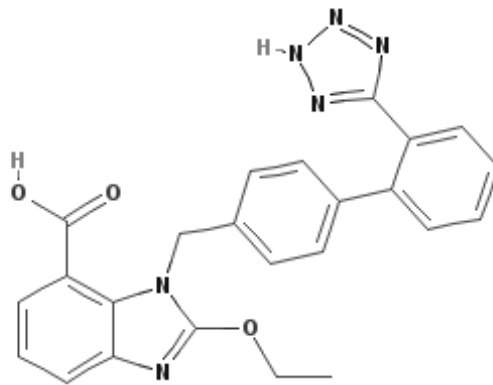
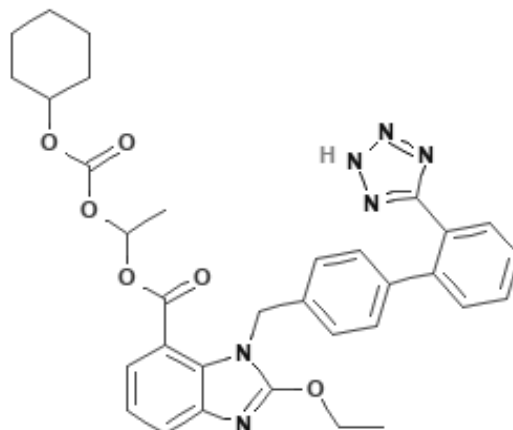


Figura 4 – Fórmula estrutural da candesartana cilexetila.



4 MÉTODO

4.1 Principais condições para o emprego do PAMPA como modelo de estudos de permeabilidade em fármaco

Foi realizada uma busca bibliográfica nas principais bases de dados: periódicos Capes, SciFinder e ScienceDirect sobre artigos que utilizam o modelo PAMPA para realização de testes de permeabilidade, utilizando as palavras chaves: Permeability, Absorption, PAMPA, PAMPA assay. Foram selecionados artigos que citam o emprego do método a partir de 1998. Estes artigos foram agrupados conforme alguns dos parâmetros utilizados, tais como, lipídeo empregado na formação de membrana, velocidade e forma de agitação das placas, tipo de filtro utilizado para reter o lipídeo.

4.2 Obtenção de dados de permeabilidade ou correlação *in vivo* utilizando diferentes alterações no método PAMPA para o cálculo de permeabilidade intestinal

Visando obter as principais informações referentes as condições para emprego do PAMPA por diversos autores. A partir da revisão da literatura realizada como descrito em 4.1 as informações foram reunidas ou agrupadas em relação a utilização do PAMPA, relativas a: composição lipídica e tipos de filtros utilizados, retenção do fármaco na membrana, velocidade de agitação, tempo de incubação do experimento, temperatura, composição e pH dos meios utilizados nos compartimentos doadores e receptores, o volume do meio, além da interferência de proteínas séricas e transportadores de efluxo e a comparação desses resultados.

4.3 Material bibliográfico para realização do ensaio PAMPA utilizando o fármaco Candesartana cilexetila

Baseado nas informações obtidas, elaborou-se um material bibliográfico com as condições experimentais que possibilitariam os resultados de permeabilidade mais adequados à candesartana cilexetila.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Principais condições para o emprego do PAMPA como modelo de permeabilidade.

5.1.1 Composição das membranas lipídicas

O ensaio PAMPA idealizado por Kansy e colaboradores (1998), teve como inovação a presença de um filtro hidrofóbico impregnado com uma solução de lectina de ovo cuja concentração variou de 1% a 20%, com objetivo de simular as barreiras do TGI. A maioria dos fosfolipídios, por serem sólidos, não se dispersam nos filtros, uma solução é o uso de um solvente não polar para que ocorra essa dissolução. A maioria dos trabalhos utiliza hidrocarbonetos como solventes, um exemplo é o n-dodecano (KANSY; AVDEEF; FISCHER, 2004).

Sabe-se que as membranas celulares dos vários tecidos do organismo possuem composições lipídicas diferentes, Proulx (1991) relata que cerca de metade da composição das principais membranas do corpo humano é composta por fosfolipídios, que engloba predominantemente fosfatidilcolina (FC), fosfatidiletalona (FE), fosfatidilglicerol (FG) e fosfatidilserina (FS).

Criou-se assim uma relação entre a membrana lipídica que irá cobrir os filtros no ensaio PAMPA com a capacidade de simular as barreiras humanas para predição da permeabilidade, sendo possível adaptar o ensaio para predição da permeabilidade por outras vias além da gastrointestinal principalmente alterando a composição da membrana (SINKÓ et al., 2012).

A maioria dos autores estudados baseia-se em um sistema de membranas derivadas de fosfatidilcolina por ser a mais prevalente entre as membranas dos mamíferos (KANSY; AVDEEF; FISCHER, 2004).

Seo e colaboradores (2006) realizaram estudos para investigar o efeito da composição de fosfolipídios no transporte passivo de compostos usando o método do PAMPA. Para cada ensaio, as condições foram idênticas alterando apenas a composição dos lipídeos e o composto analisado. Cinco substâncias foram submetidas ao teste e os resultados encontrados estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados de permeabilidade efetiva de diferentes substâncias através de membranas compostas por três lipídeos e duas proporções.

Fosfolipídios*	Permeabilidade Metoprolol (\pm DP) x 10^6 (cm/s)	Permeabilidade Manitol (\pm DP) x 10^6 (cm/s)	Permeabilidade Ácido benzoico (\pm DP) x 10^6 (cm/s)	Permeabilidade Sacarose (\pm DP) x 10^6 (cm/s)	Ácido taurocólico (\pm DP) x 10^6 (cm/s)
FC18:1	0,103 (\pm 0,008)	0,0392 (\pm 0,0041)	0,120 (\pm 0,003)	0,0334 (\pm 0,0082)	0,0401(\pm 0,0052)
FC18:2	0,115 (\pm 0,008)	0,0390 (\pm 0,0021)	0,130 (\pm 0,010)	0,0373 (\pm 0,005)	0,0360(\pm 0,009)
FE18:1	1,2 (\pm 0,11)	0,0791 (\pm 0,0098)	1,11 (\pm 0,19)	0,0306 (\pm 0,0011)	0,0514(\pm 0,0010)
FE18:2	0,237 (\pm 0,022)	0,0523 (\pm 0,0054)	6,13 (\pm 0,23)	0,0310 (\pm 0,0023)	0,0421(\pm 0,0096)
FS18:1	1,78 (\pm 0,09)	0,105 (\pm 0,010)	0,182 (\pm 0,007)	0,0181 (\pm 0,0041)	0,0493(\pm 0,0064)
FS18:0/2	0,189 (\pm 0,009)	0,0468 (0,0064)	3,43 (\pm 0,16)	0,0172 (\pm 0,0006)	0,0462(\pm 0,0040)

FC = fosfatidilcolina

FE = fosfatidiletalona

FS = fosfatidilserina

*Fosfolipídio seguido pelo tamanho da cadeia e número de insaturações.

Segundo o autor e Adveef e colaboradores (2003) para ser considerado de alta permeabilidade $P_e > 2 \times 10^{-6}$ cm/s, assim avaliando-se os compostos estudados neste trabalho, o ácido benzoico e o metoprolol ambos demonstram alta permeabilidade porém de maneira pouco uniforme, é possível visualizar valores bem variados entre as diferentes membranas. Já o manitol, sacarose e ácido taurocólico apresentaram sempre baixa permeabilidade.

Apesar da influência da composição lipídica, percebe-se que a estrutura dos solutos é fundamental na permeação dos compostos pelas barreiras artificiais. O manitol assim como a sacarose, apresenta baixa massa molecular 182 g/mol e 342 g/mol respectivamente e suas permeabilidades praticamente não variaram em decorrência da alteração da composição lipídica da membrana.

O transporte de fármacos e substâncias pelas membranas do TGI é um complexo e dinâmico processo. Devido aos variados mecanismos que ocorrem durante a absorção no intestino, a predição *in vitro* da permeabilidade de substâncias utilizando um único método é dificultado (BALIMANE et al., 2000).

A composição das membranas escolhidas para realização do ensaio terá grande influência no resultado final do ensaio, sendo um fator fundamental na determinação da permeabilidade de um fármaco.

5.1.1.1. Integridade das membranas

A integridade das membranas é fundamental para certificar que o permeado durante o método não seja decorrente de danos a membrana garantindo a robustez do método (SCHNEIDER, 2011).

Diversos procedimentos podem ser utilizados para avaliar a integridade da membrana lipídica, o protocolo sugerido pela Millipore (2005) baseia-se na utilização de soluções marcadoras de permeabilidade contendo amarelo lúifer e azul cresil brilhante (ACB).

Ao seguir o protocolo, as placas doadoras devem conter ACB (que permeia pelas membranas intactas) e os lipídeos intactos irão rejeitar completamente o amarelo lúifer. Para a confirmação da integridade das membranas, deve-se realizar a leitura das placas em um leitor de fluorescência (excitação 425 nm e emissão 528 nm). Na situação, a baixa emissão de fluorescência no compartimento receptor comprova a ausência do amarelo lúifer e assim, a membrana está intacta para utilização no ensaio de PAMPA (MILLIPORE, 2005).

Outra forma de avaliar a integridade das membranas no PAMPA é a incubação com uma solução de manitol no compartimento doador. O manitol, assim como polietilenoglicol, dextran, inulin e amarelo lúifer é um marcador de baixa permeabilidade (VOLPE, 2010) que caso seja detectado no compartimento receptor após o período de incubação, indica que a membrana não está íntegra.

Avaliando a integridade das membranas antes e após a realização do experimento, é possível garantir que as frações permeadas não tenham sofrido influências, o que auxilia a eliminar uma fonte de erro durante a execução do ensaio.

5.1.1.2. Retenção nas membranas

Um dos problemas que concerne os modelos *in vitro* que avaliam a permeabilidade dos fármacos é a retenção dos compostos nas membranas que ocorre principalmente com compostos lipofílicos, em especial devido a afinidade destes pelas membranas (AVDEEF, 2001).

Este fenômeno costuma por vezes ser negligenciado ou ignorado durante a manutenção do ensaio, Kansy e colaboradores (1998) ao idealizarem e publicarem o ensaio, não realizaram nenhum cálculo para determinar se houve retenção nas membranas o que pode levar a detecção da permeabilidade com falhas.

O cálculo da permeabilidade aparente equação 1, leva em consideração que não há retenção de moléculas na membrana, ou seja, o soluto não é retido pelas membranas durante o processo de permeação (ADVEEF, 2004). No entanto, tal dado não condiz com a realidade, uma vez que a maioria dos compostos analisados são lipofílicos e podem de fato acumular nas membranas.

Equação 1 - Fórmula para o cálculo da Permeabilidade aparente.

$$P_a = -\frac{2.303 V_D}{At} \left(\frac{1}{1 + r_V} \right) \cdot \log_{10} \left[-r_V + (1 + r_V) \cdot \frac{C_D(t)}{C_D(0)} \right]$$

Onde P_a é o valor da permeabilidade aparente, r_V = razão entre os volumes do compartimento doador e do compartimento receptor (V_d/V_a). A = área da membrana que é de 0,3 cm², t = tempo de experimento; C_D = concentração em mol/mL no compartimento doador no tempo estimado.

Youdim e colaboradores (2003) estudaram as principais premissas que são negligenciadas durante os cálculos para estudo da permeabilidade, dentre elas a retenção de substâncias nas membranas. Os resultados do estudo possibilitaram elaborar a equação 2. Por meio desta equação é possível contabilizar a perda de massa para a membrana e com isso determinar se houve retenção de fármaco e se esta irá interferir no resultado do cálculo da permeabilidade.

Equação 2 - Fórmula para o cálculo da Permeabilidade efetiva e retenção nas membranas

$$P_e = -\frac{2.303V_D}{A(t - \tau_{LAG})} \left(\frac{1}{1 + r_V} \right) \cdot \log_{10} \left[-r_V + \left(\frac{1 + r_V}{1 - R} \right) \cdot \frac{C_D(t)}{C_D(0)} \right]$$

$$R = 1 - \frac{m_D(t)}{m_D(0)} - \frac{m_A(t)}{m_D(0)}$$

No qual

Onde P_e é o valor da permeabilidade efetiva, r_V = razão entre os volumes do compartimento doador e do compartimento receptor (V_d/V_a). A = área da membrana que é de 0,3 cm², C_D = concentração em mol/mL no compartimento doador. T_{LAG} = é

o tempo de equilíbrio necessário para saturar a membrana com o soluto, estimado em $(54 R_m + 1) \cdot 60s$.

A retenção dos fármacos nas membranas dos principais modelos *in vitro* torna-se um fator limitante para a determinação da permeabilidade de substâncias, uma vez que essa retenção não é algo esperado nas condições *in vivo*, já que na região do intestino delgado o sistema é dinâmico, não havendo concentração elevada do fármaco na membrana e possibilidade de *saturação in vivo*.

Visando reduzir a retenção de fármacos nas principais membranas testadas na literatura, Chen e colaboradores (2007) propuseram um novo tipo de membrana lipídica *tri-layer* que consiste em três camadas lipídicas (lipídeo, óleo e lipídeo) que, ao contrário do que se espera pelo aumento da concentração lipídica, houve redução das substâncias retidas nas membranas como se pode ver na tabela 2. Os autores atribuem o fato a redução no uso de solventes e a própria estrutura da membrana na qual a presença do óleo mimetizaria o interior das membranas biológicas o que manteria a robustez e estabilidade da mesma.

Tabela 2 - Comparação da retenção em (%) em dois modelos com membranas lipídicas diferentes

Fármaco	PAMPA 2% DOPC em Dodecano (%R)	Pampa Tri camada (%R)
Amitriptilina	53	27
Cetoconazol	62	32
Fenoxipiridina	69	39

Fonte: Adaptado de CHEN et al., 2008

5.1.2. Composição e tipos de filtros

Kansy (1998) idealizou o método utilizando um filtro hidrofóbico (PVDF) que é impregnado por componentes lipídicos dissolvidos em solventes orgânicos tais como n-dodecano, hexadecano e 1,9-decadieno.

A maioria dos autores utiliza o fluoreto de polivinilideno (PVDF) como um suporte que ao ser impregnado pelo conteúdo lipídico dissolvido em solvente orgânico, estará posicionado entre os compartimentos doador e receptor tendo como

função de filtro, realizando a retenção de fármacos durante o Ensaio PAMPA (Kansy, 1998). Segundo o fabricante (MILIPORE, 2003) o PVDF é um material resistente a solventes.

Para o ensaio PAMPA, esse material é utilizado sob formato de um filtro com poros de 0,45 μm e 115 μm de espessura (KANSY, 1998; MILIPORE, 2003). O filtro hidrofóbico é vantajoso uma vez que forma membranas estáveis e resistentes a excipientes e a agitação. A geometria dos poros desse material, porém, favorece a retenção de substâncias na membrana, sendo necessário um alto tempo de incubação que varia de 10 h até 15 h (KANSY; SENNER; GUUBERNATOR; 1998; ZHU; JIANG; CHEN; HAWNG, 2001).

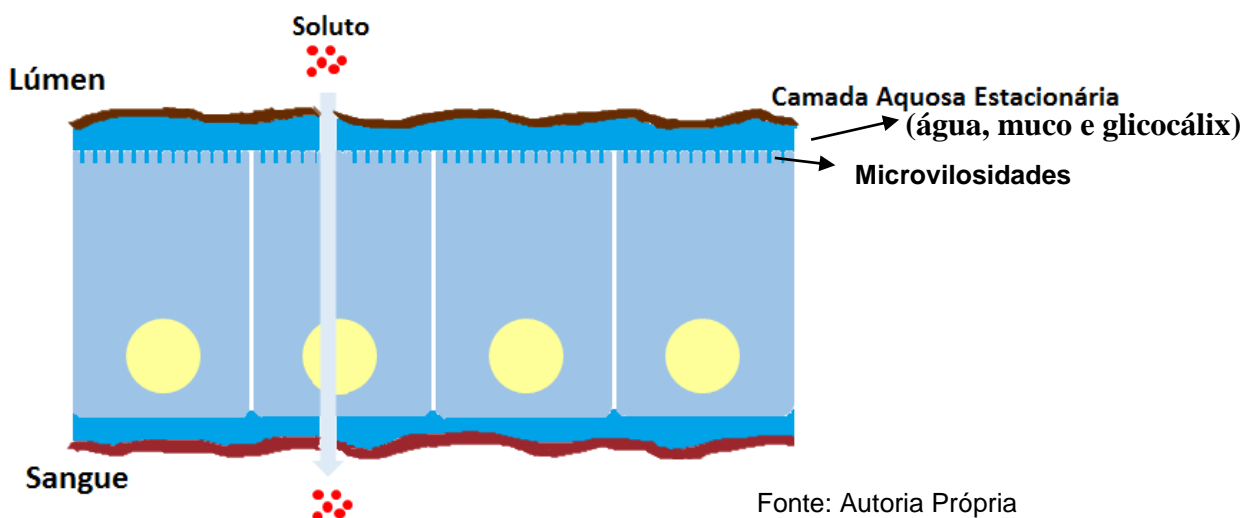
Zhu e colaboradores (2001) realizaram o ensaio alterando o tipo de filtro. Ao utilizar um de PVDF hidrofílico foi possível aumentar a permeação das substâncias e reduzir o tempo de incubação do ensaio para 2 horas. Já Whonsland e Faller (2000) utilizaram um filtro de policarbonato de tamanho 3 μm e 9-10 μm de espessura e cerca de 5-20% de porosidade com o tempo de incubação de 5 h. Apesar do filtro ser mais suscetível ao rompimento pelos solventes, o que torna a avaliação da integridade da membrana importante parâmetro, é vantajoso uma vez que os poros desse filtro são geometricamente bem definidos e a espessura curta da membrana permite um fluxo mais rápido da substância pela barreira e a retenção na membrana fica reduzida.

Atualmente, com o avanço da tecnologia e dos estudos do modelo PAMPA, o tempo de incubação para a conclusão do experimento utilizando um filtro hidrofóbico em condições pré-determinadas pode chegar até 30 minutos. Sendo assim, na literatura a grande parte dos autores estudados faz uso de filtros de PVDF hidrofóbicos devidos suas vantagens em relação a resistência do mesmo durante a permeação do fármaco estudado.

5.1.3. Camada de água estacionária

Além dos fatores inerentes a concentração e composição das membranas lipídicas, outro fator crucial que pode ser limitante para o ensaio PAMPA, é a camada de água estacionária a qual corresponde a uma camada de água, muco e glicocálix que está presente nas membranas *in vivo* e também nas adjacências das membranas de métodos *in vitro* (Figura 5) (ADVEEF, 2012).

Figura 5 - Camada Aquosa Estacionária



A camada aquosa estacionária (CAE) tem como característica certa rigidez, além ser uma barreira para processos de permeação como difusão passiva (THOMSON, et al., 1998).

O processo de difusão passiva de uma substância está relacionada com a difusão desta através das membranas e camada de água estacionária que localiza-se em ambos os lados da membrana. Como o soluto está sob efeito das leis dos processos de difusão, a agitação não irá influenciar na difusão de maneira direta (ADVEEF, 2012).

Diversos autores realizaram experimentos com intuito de quantificar a espessura dessa CAE, tanto *in vivo* quanto em modelos *in vitro*, principalmente por ser um processo limitante para permeação de compostos lipofílicos de baixo peso molecular (LOFTSSON, 2012). A partir desses resultados trabalharam em metodologias para reduzir a interferência desse processo nos estudos de permeabilidade.

Lennernas, (1998) detectou que a espessura da camada próxima do epitélio do TGI está na faixa de 30-100 μm principalmente devido ao peristaltismo e constantes movimentos intestinais. Enquanto no ensaio PAMPA sem agitação Adveef e colaboradores encontraram valores que variam de 1400-4000 μm . A agitação constante dessa CAE é importante para reduzir a espessura da camada aquosa, apesar de não eliminá-la totalmente, facilitando assim o processo de difusão

da substância pelas camadas lipídicas. Wohnsland e Faller (2001) por meio de agitações leves entre 50-100 rpm chegaram a uma espessura de 300 μm .

Adveef, Nilsen e Tsinman (2004) com auxílio de agitadores magnéticos, conseguiram reduzir a CAE utilizando rotações superiores a 600 rpm a uma espessura de 28 μm . Apesar de eficientes, os métodos de agitação possuem falhas, Adson e colaboradores (1995) notaram que a agitação do PAMPA pode ser ineficaz por agitar apenas um dos lados dos compartimentos.

Logo, durante a avaliação da permeabilidade *in vitro*, principalmente pelo modelo PAMPA, o efeito da CAE deve ser avaliada e corrigido caso contrário, a predição pode não condizer com as propriedades reais do substância analisada.

5.1.4. Concentrações das amostras durante o ensaio e faixas de pH nos compartimentos doador e receptor

Para avaliar o pH, Avdeef e colaboradores (2007) realizaram estudos com mais de 50 combinações de lipídeo e tampões utilizando 8 fármacos. Ao compilar os resultados, perceberam que o pH do compartimento doador foi fundamental no coeficiente de correlação.

Em condições cujo pH nos compartimentos doador e receptor foram iguais (por exemplo a 7,4) obteve-se coeficientes de determinação com metodologias *in vivo* com valores de $r^2 = 0,2$, enquanto em condições onde aplicou-se gradiente de pH, 6,5 e 7,4 para os compartimentos doador e receptor respectivamente o valor r^2 subiu para 0,5 e surpreendente nas condições de pH 5,0 no doador e 7,4 no receptor a correlação foi superior, apresentando $r^2 = 0,97$.

Nota-se ausência de mais estudos que permitam certificar que essa condição de pH seja a ideal para realização do teste, mas como o próprio autor afirma, a correlação pode diminuir com a inserção de novas moléculas para o estudo, principalmente se não forem incluídos fármacos cujo transporte não é apenas passivo ou até considerados fatores que limitem a permeabilidade de fármacos tais como a influência da CAE ou retenção de fármacos nas membranas.

Como já dito, o aumento da concentração de compostos lipofílicos na membrana lipídica será determinante no aumento na retenção de fármacos na membrana, principalmente fármacos lipofílicos. Uma alta concentração de fármaco

lipofílicos no compartimento doador pode ser um fator para saturação do sistema e retenção destes na membrana.

Os volumes utilizados nos compartimentos doador e receptores usualmente são os mesmos, variando de 150µl até 300µl. Adveef e Zhu em suas publicações omitiram os volumes de cada compartimento. Apesar disso, não é relatado nenhuma alteração significativa no ensaio por diferenças no volume em cada um dos poços.

A variação de pH no trato gastrointestinal está entre 1,7 e 8,0, enquanto o pH intracelular e da corrente sanguínea varia entre 7,2 e 7,4 (DRESSMAN et al., 1990; NEUHOFF et al., 2005). Aliado a esse conhecimento, sabe-se que a passagem de substâncias não carregadas pelas membranas lipídicas é mais facilitada que substâncias carregadas (SHORE et al., 1957)

Além de Kansy (1998), outros autores realizaram inicialmente o ensaio PAMPA utilizando condições onde o pH no compartimento doador e no receptor é o mesmo (ISO-pH). Sabe-se que, além de não simular adequadamente as condições do TGI, moléculas ionizáveis, por exemplo, são mais permeáveis quando estão na forma não carregada. As condições de ISO-pH podem desfavorecer a permeabilidade de algumas substâncias.

Gutknecht e Tosteson, (1973) constataram que podem ocorrer reações na CAE o que pode interferir drasticamente na difusão passiva de substâncias por membranas. Ruell e colaboradores (2003) realizaram estudos com ácidos e bases fracos e monopróticos avaliando diversas condições de ISO-pH no ensaio PAMPA. Os autores constataram que, apesar de usualmente utilizadas condições de pH 6,5 ou 7,4 estas não são as mais indicadas devido aos efeitos da CAE.

Atualmente com o avanço nos estudos do PAMPA, o uso de um gradiente de pH é comumente aplicado no método, também chamado de *Double Sink* PAMPA (DS-PAMPA) no qual para o compartimento doador o pH pode variar de 3,0 até 10,0 e no receptor usualmente o pH mantém-se em 7,4. Além de mimetizar as condições fisiológicas da permeação das substâncias pelo TGI, esse procedimento direciona compostos que são ácidos fracos com baixo pKa a permearem pelas membranas em condições de baixo pH e ao chegar no compartimento receptor, cujo pH é 7,4, estarão “presos” na forma carregada o que cria uma condição de não saturação virtual (ADVEEF, 2005).

Zhu e colaboradores (2002) ao compararem as vantagens do PAMPA em relação ao emprego de células Caco-2 pontuaram a ampla faixa de pH que o

PAMPA pode trabalhar, o que torna uma ferramenta versátil. Apesar dessas considerações, é evidente que se deve ter cautela na escolha da faixa de pH ideal para realizar o ensaio para não ocorrer interações principalmente com a CAE e a membrana além de solubilização inadequada do fármaco.

O efeito da agitação já foi estudado por vários autores e diversas alternativas foram desenvolvidas para realizar uma agitação mais eficiente. Sabe-se que a agitação reduz a espessura da CAE o que contribui para mimetizar as condições *in vivo* de permeabilidade de fármacos além de facilitar o transporte passivo pelas membranas (ADVEEF, 2003).

5.1.5. Formas e velocidade de agitação durante o PAMPA

A forma e a velocidade de agitação durante o estudo PAMPA variaram nos experimentos realizados por diferentes autores. Kansy (1998) inicialmente não propôs nenhum tipo de agitação já o guia proposto por Adveef (2007) indica que, se não houver agitação o tempo de experimento é amplamente superior. Reis, (2013) e Schneider, (2011) realizaram ensaios com tempos de incubação e agitação diferentes, mas ambos obtiveram resultados correlacionáveis uma vez que incubaram tempo suficiente para a permeação ocorrer e agitação adequada para a CAE não interferir muito no processo.

Para a determinação da permeabilidade pelo PAMPA, é fundamental que o fármaco avaliado esteja solubilizado no compartimento doador para que assim, atravesse as membranas pelo processo de difusão. Um problema nesse procedimento refere-se a fármacos pouco solúveis, que podem não solubilizar adequadamente no meio, uma solução para isso é o uso de algum co-solvente para facilitar a solubilização. Assim, Kansy e colaboradores (1998) no ensaio inicial utilizaram como co-solvente o DMSO e avaliando diversos trabalhos notou-se a constância por parte dos pesquisadores do uso de DMSO em concentrações nunca superiores a 5%, para que ocorra a solubilização do fármaco no compartimento doador (SUGANO et al., 2001; AVDEEF, et al., 2001; VIZSERÁLEK et al., 2003; GÁBOR et al., 2013).

Quando comparado ao estudo *in vitro* com uso de células, sabe-se que o uso de co-solventes, principalmente o DMSO, deve ser limitado devido suas propriedades tóxicas às células (TRIVEDI; KITABATAKE; DOI, 1990). Como o

PAMPA é totalmente artificial o seu uso pode ser numa concentração mais alta, no máximo 5%, mas com cautela, pois há carência de estudos em como o co-solvente pode interferir diretamente na permeabilidade do fármaco estudado no ensaio PAMPA (SUGANO et al., 2001).

Avdeef e colaboradores (2003) discutem que o aumento do conteúdo lipídico das membranas pode, diretamente, aumentar a retenção dos fármacos nas mesmas. Atrelado a esse dado, sabe-se que em condições fisiológicas essa retenção é reduzida, principalmente devido as condições dos compartimentos receptores onde naturalmente existe condições *sink* por conta do gradiente de pH além da presença de proteínas séricas.

Recomenda-se então o uso de proteínas séricas (como Albumina) ou outros compostos (como surfactantes) para simular essa condição e otimizar o transporte das substâncias correlacionando melhor com o que ocorre *in vivo*. Na Tabela 3, Reis (2013) utilizou ácido glicólico no compartimento receptor, que, quando presente neste, funciona mimetizando as proteínas séricas que ocorrem *in vivo* favorecendo o gradiente de concentração. Os autores que fizeram o uso de substâncias que simulem o papel das proteínas séricas, apontam bons resultados e boas correlações ao aliar com outras condições *sink* (ADVEEF, 2003).

Percebe-se assim, que o uso de co-solventes e proteínas séricas são fundamentais para melhorar a qualidade do ensaio e da permeabilidade calculada. Além disso a otimização do ensaio visando aproximar ao máximo um método *in vitro* com membranas artificiais às condições observadas *in vivo* aparenta ser um desafio. Há uma falta de padronização e muitas vezes diversas informações são negligenciadas o que pode comprometer o estudo.

5.2 Resultados de experimentos utilizando o método PAMPA

Quando avaliado os resultados apresentados por Seo e colaboradores (2006) na Tabela 1, observa-se que, apesar dos ácidos taurocólico e benzoico serem ambos ácidos fracos, eles apresentaram comportamentos diferentes em relação a suas permeabilidades efetivas. O ácido taurocólico não teve variação significativa entre os resultados da permeabilidade nas diferentes membranas, ao contrário do ocorrido com o ácido benzoico, onde a variação da permeabilidade efetiva foi significativamente expressiva com as diferentes composições lipídicas. Os autores

sugerem que, com o aumento das insaturações nas cadeias acila, a membrana tende a torna-se mais fluída e por isso, o ácido benzoico pode ser sensível a essa alteração na fluidez se comparado ao ácido taurocólico, é possível observar que com o aumento das insaturações nas cadeias acila houve um aumento na permeabilidade do ácido benzoico.

A partir das informações extraídas, percebe-se que a permeabilidade do Metoprolol, que é uma base fraca, sofreu influência com a mudança da composição lipídica da membrana. Os autores, ao contrário do esperado, como ocorreu com o ácido benzoico, observaram que aumento das insaturações nas cadeias graxas reduziram a permeabilidade do metoprolol, uma possível hipótese para este fato é a formação de pares iônicos, uma vez que o metoprolol é um cátion que, em pH 6, possui $pK_a = 9,86$. Membranas carregadas com uma carga negativa neutralizariam a carga do metoprolol facilitando sua permeação pelas barreiras lipídicas, como observado no PS18:1.

Avaliando os resultados apresentados, percebe-se que a composição lipídica pode ser um dos fatores que irá influenciar a permeabilidade efetiva de substâncias quando submetidas ao PAMPA. Outros trabalhos na literatura reforçam essa ideia, ilustrado na tabela 4, o estudo de Adveef (2003) é um exemplo de como variações na composição da membrana lipídica podem ser pontos críticos para determinação da permeabilidade. Este autor realizou o estudo da permeabilidade de 32 compostos utilizando cerca de 50 composições lipídicas diferentes afim de levantar informações que possam detectar a influência da composição da membrana lipídica na permeabilidade de fármacos.

Na tabela 4 também é possível verificar a composição das membranas utilizadas pelo autor, a concentração dos lipídeos em cada um dos métodos, o uso de condições de não saturação (sink) para realização do método além da correlação desses dados obtidos com os resultados extraídos na literatura com metodologia *in vivo*.

Por ser complexo e dinâmico o mecanismo de permeação de substâncias pelo TGI, realizar ensaios que predizem a permeabilidade *in vivo* utilizando composição lipídica que tem características muito distantes das composições naturais podem apresentar erros de correlação. Como Adveef demonstrou na tabela 3, no ensaio número 2, 3 e 4 onde empregou como membranas lipídeos comuns da

rotina, o azeite de oliva, o octanol e dodecano respectivamente, que os resultados da correlação são praticamente inexpressivos.

A condição de não saturação, pode se dar de duas maneiras, a primeira é por meio do uso de proteínas séricas ou tensoativos no compartimento receptor que se ligam ao fármaco lipofílico e favorecem o gradiente de concentração em direção a esse compartimento (ADVEEF, 2012). A segunda maneira de se aplicar uma condição *sink* para o ensaio PAMPA é usando um gradiente de concentração do compartimento doador para o receptor com objetivo de manter o fármaco permeado no compartimento receptor (ADVEEF, 2003).

Adveef e colaboradores (2003) demonstraram que a mudança não apenas do lipídeo utilizado, mas também na concentração que será aplicado são pontos cruciais na correlação das permeabilidades. Observando o modelo 11 na tabela 3 em que é utilizada uma complexa mistura de FC, FE, FS, FI e colesterol que além de difícil para obtenção, o resultado final obteve uma correlação *in vivo/in vitro* similar quando utilizado apenas lectina ovo.

As correlações mais adequadas *in vitro* com os resultados obtidos *in vivo* pertenceram aos experimentos utilizando membranas compostas de lectina soja a 20%, onde o autor faz o uso de condições *sink*.

Além de considerar a composição lipídica para a realização do ensaio PAMPA os quais as características se assemelhem com as membranas biológicas, o custo de obtenção desse lipídeo não pode ser desprezado, o que justifica o uso de lectina soja de diversas maneiras com objetivo de se encontrar a melhor condição de ensaio com essa membrana.

Apesar da escolha do lipídeo mais adequado ao método seja fundamental para realização do ensaio e obtenção de resultados que tenham boas correlações com os dados obtidos *in vivo*, outros fatores devem ser considerados e corrigidos. O autor direcionou o estudo para membranas de lectina soja testando múltiplas variáveis e efetuando correções como a CAE afim de obter a melhor correlação possível.

Tabela 3 – Correlação (r^2) entre permeabilidade calculada em jejuno humano e PAMPA

Número	Tipo de membrana	Composição da membrana	pH_{Don}/pH_{Recep}	Sem Sink	Com Sink
1	Neutra	2% DOPC	7,4	0,33	0,53
1A		2% DOPC + 0,5% Cho	7,4	0,61	Turvo
2		100% Óleo de olivia	7,4	0,36	-
3		100% Octanol	7,4	0,01	-
4		100% Dodecano	7,4	0,32	-
5	2 Componentes	2% DOPC + 0,6% DA	7,4	-	0,53
6	aniônicos	2% DOPC + 1,1% DA	7,4	0,58	0,61
7		2%DOPC + 0,6% PA	7,4	0,53	0,61
8		2%DOPC + 1,1% PA	7,4	0,6	0,33
9		2%DOPC + 0,6% PG	7,4	0,52	0,1
10		2%DOPC + 1,1% PG	7,4	0,55	0,25
11	5 componentes	0,8% PC + 0,8 PE + 0,2% PS + 0,2% PI + 1% Cho	7,4	0,79	Turvo
12	aniônicos	10% PC ovo (Avanti)	7,4	0,6	0,22
13	Extratos de Lectina	10% PC ovo + 0,5% Cho (Avanti)	7,4	0,47	Turvo
14	aniônicos	10% PC soja (Sigma)	7,4	0,6	0,17
15		10% PC soja + 0,5% Cho (Sigma)	7,4	0,65	0,57
16		10% PC soja	7,4	0,58	0,48
17		20% PC soja	7,4	0,62	0,55
18		20%PC soja + 0,5% Cho	7,4	0,65	0,63
19		35% PC soja	7,4	0,56	0,42
20		50% PC soja	7,4	0,58	0,36
21		68% PC soja	7,4	-	-
22		74% PC soja	7,4	0,29	0,04
24	Iso-pH	20% PC soja	6,5/6,5	-	0,77
25		20% PC soja	5,0/5,0	-	0,86
26		20% PC soja	6,5/7,4	-	0,52
27		20% PC soja	6,0/7,4	-	0,72
28		20% PC soja	5,5/7,4	-	0,89
29	Gradiente-pH (CAE	20% PC soja	5,0/7,4	-	0,97
30	corrigida)	20% PC soja	4,5/7,4	-	0,95

DOPC: 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-fosfatidilcolina (também chamado dioleifosfatidilcolina)

CHO: Colesterol

DA: Ácido dodecilcarboxílico

PA: Ácido fosfatídico

PG: Fosfatidilglicerol

PE: Fosfatidiletalona

PS: Fosfatidilserina

PI: Fosfatidilinositol

PC: Fosfatidilcolina (também chamada de Lectina)

Fonte: Adaptado de ADVEEF e colaboradores (2007)

Diversos autores realizaram diferentes ensaios PAMPA cujo método diferia não apenas na membrana como também em outras condições. Di e colaboradores (2003) adaptaram o método PAMPA para a predição da permeabilidade fármacos através das barreiras hematoencefálicas, como uma alternativa a outros métodos

mais caros e trabalhosos. Uma das principais características do ensaio é a mudança da composição da membrana lipídica, uma vez que utilizando extratos lipídicos cerebrais foi possível aprimorar a predição da penetração na barreira hematoencefálica.

Sinkó e colaboradores (2012) com objetivo de encontrar um modelo de fácil padronização, alta reprodutibilidade e custo benefício superior que metodologias *ex vivo* para estimar a penetração de um fármaco através das barreiras da pele, que que conhecidamente apresenta uma composição e comportamentos diferenciados de outras membranas biológicas, propuseram o ensaio PAMPA utilizando cetramidas sintéticas que são análogas a cetramidas presentes no estrato córneo. O autor demonstrou que o PAMPA é uma ótima ferramenta, com custo benefício adequado e com boa correlação para estudo de permeabilidade para fármacos e cosméticos.

Segundo Di e colaboradores (2003) e os dados compilados por Sinkó e colaboradores (2012), percebe-se que é possível adaptar o PAMPA para obter coeficientes de correlação aceitáveis. A mudança da membrana lipídica é um fator crucial para a determinação da permeabilidade, sendo um dos principais fatores para ser alterados quando se deseja realizar o método focando na permeabilidade por outras vias de administração.

Uma das vantagens do PAMPA são as diversas variações permitidas pelo ensaio que podem surtir efeitos desejados para o cálculo de permeabilidade, porém isso também pode ser um problema. Diversas variantes do método que apareceram na literatura não são padronizadas e somente os investigadores do método, podem dar maior certeza de um ensaio otimizado (ADVEEF, 2007). Galinis (2007) levantou diversos questionamentos sobre o ensaio PAMPA principalmente pautados na falta de dados seguros para extrapolar os resultados *in vitro* para *in vivo*, além de duras críticas as condições do ensaio como o tempo e faixas de pH. Guiado por estes questionamentos, Adveef e colaboradores (2007) propuseram um guia, figura 6, para orientar a realização do ensaio e responder a todos os questionamentos ao método.

Tabela 4 – Condições para o emprego do PAMPA no estudo de permeabilidade gastrointestinal a partir dos dados de 5 autores

Tipo de Membrana	Solvente	Concentração	Volume	pH (doador)	pH (receptor)	Agitação	Temperatura	Tempo de Incubação	Referência
1-20% Lectina	Dodecano, Hexadecano, 1,9-decadieno	250µM-500µM	100-200µl	6,5	6,5	-	-	15h	KANSY; SENNER; GUBERNATOR, 1998
20% (p/v) mistura de Lectina	Dodecano	50µM	-	Entre 3 e 10	7,4*	pION Gut-Box (49-622rpm)	23±1°C	4h	ADVEEF et al., 2004
1% Lectina ovo	Dodecano	100µM-200µM	-	5,5-7,4	5,5-7,4	Orbital Shaking	Temperatura ambiente	2h	ZHU; JIANG; CHEN; HWANG, 2002
10% FC + CHO 0,5%	N-dodecano	250µM	300µl	4,5/6,0 - 7,4/9,0	7,4*	Orbital Shaking (100rpm)	37°C	5h ou 15h	REIS, 2013
20% Lectina soja	Dodecano	150µM	300µl	5,0 - 6,2 e 7,4	7,4	Orbital Shaking (300rpm)	21 ± 2°C	1h, 4h ou 15h	SCHNEIDER, 2011

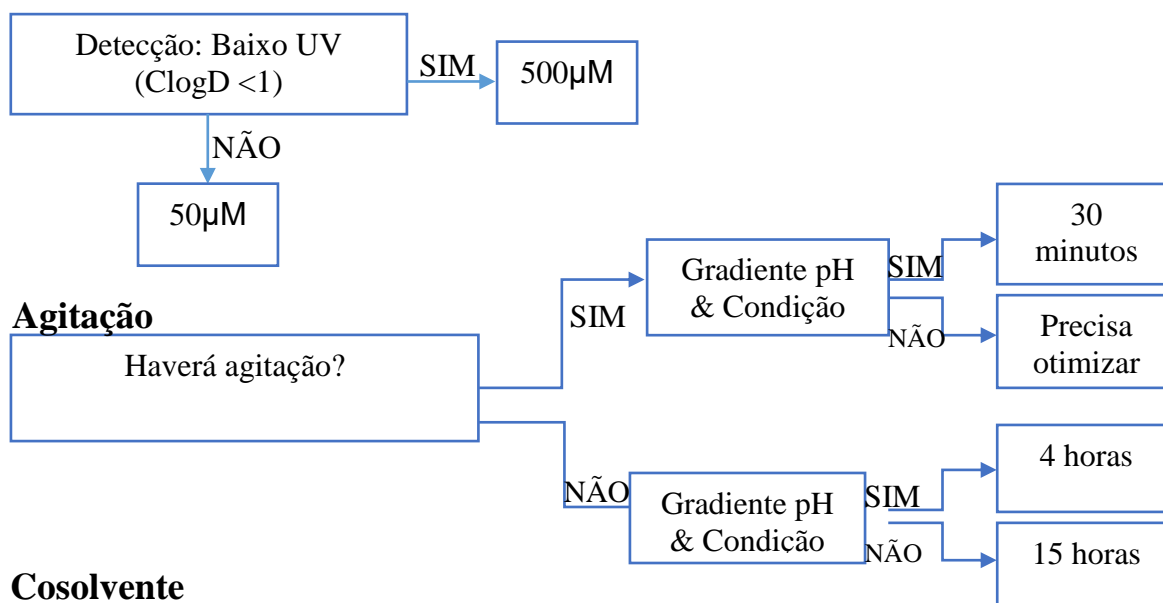
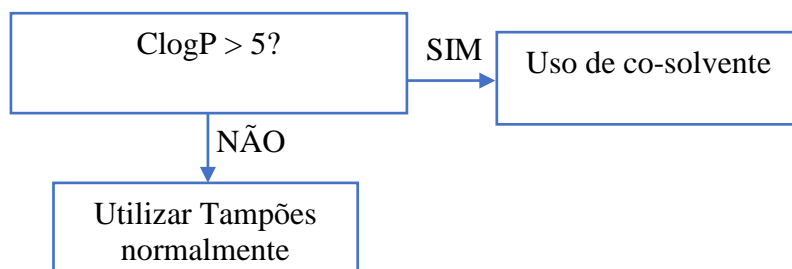
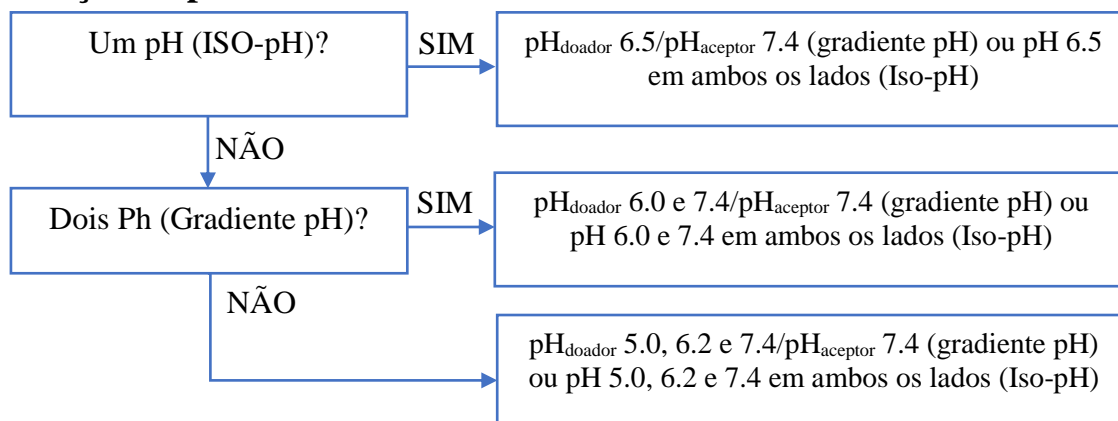
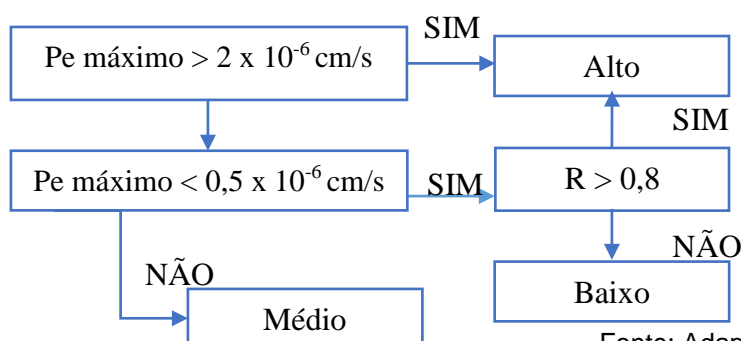
Apesar do guia de sugestões proposto na Figura 6 a literatura apresenta diversos trabalhos com condições experimentais do ensaio PAMPA bem distintas e com características próprias do estudo. Na tabela 3 estão melhor demonstradas as condições empregadas nos trabalhos realizados por 5 diferentes autores com as respectivas metodologias para determinação e cálculo da permeabilidade.

A concentração entre os autores variou de 50 μM até valores de 500 μM , avaliando o guia apresentado na figura 6, quando a substância analisada possui poucos grupos cromóforos para serem lidos no UV deve se utilizar concentrações maiores ou outras formas de detecção, caso contrário, baixas concentrações podem ser utilizadas. Além disso, é necessário avaliar a solubilidade da substância em estudo nos modelos propostos já que fármacos poucos solúveis não serão permeados pela membrana adequadamente.

Sabe-se que a temperatura corporal do organismo humano está em torno de 37°C. Poucos autores destacaram a influência desta para os ensaios *in vitro* com o PAMPA. Vizserálek e colaboradores (2014) realizaram estudos com PAMPA TGI, PAMPA SKIN e PAMPA BBB variando temperatura de ensaio entre 15°C e 55°C de 7 fármacos, os pesquisadores perceberam que a temperatura interfere diretamente na permeabilidade intrínseca dos fármacos sendo um ponto negligenciado por vários autores ao correlacionar os dados *in vitro* com a permeabilidade obtida por dados *in vivo*. Com as constantes melhorias no ensaio para predição da permeabilidade *in vitro* algumas limitações do método PAMPA ainda são intransponíveis. O PAMPA por ser um ensaio totalmente artificial não consegue prever a permeabilidade de fármacos ou substâncias que atravessam as membranas por mecanismos não passivos. Se o mecanismo de transporte não é bem elucidado a análise pode gerar resultados que não condizem com a realidade do fármaco.

É bem difundido a influência da glicoproteína-P na biodisponibilidade de fármacos, sendo um fator limitante no processo de absorção *in vivo*. Um experimento que elucidava essa interferência foi realizado por Woodcock e colaboradores (1992) que ao utilizar um polissorbato 60 (Cremophor) notou a inibição dessa proteína de efluxo e o aumento da concentração de daunorubicina que é conhecidamente um substrato PgP.

Figura 6 – Guia para realização do PAMPA

Concentração**Cosolvente****Seleção do pH****Potencial Absortivo**

Fonte: Adaptado de Adveef e colaboradores (2007)

Assim, o PAMPA apesar de versátil tem suas limitações da predição da permeabilidade principalmente devido a processos *in vivo* que não são reprodutíveis nesse método.

Balimane e colaboradores (2006) sugerem o uso do PAMPA como ferramenta inicial para pesquisa e triagem e o Caco-2 para detectar os potenciais fármacos candidatos por conseguir mimetizar esse transporte ativo mostrando que, apesar da boa predictibilidade, o modelo PAMPA ainda é limitado.

5.3 Condições de ensaio para determinação da permeabilidade por PAMPA de um fármaco escolhido: Candesartana cilexetila.

Segundo dados da literatura a biodisponibilidade absoluta da candesartana (forma ativa da candesartana cilexetila) após a administração da forma farmacêutica sólida por via oral está entre 15% e 40% (ISRAILI, 2000; GLEITER; MORIKE, 2002).

Segundo as agências regulatórias (OMS, 2006; EMEA, 2008; FDA, 2015) são considerados de alta permeabilidade os fármacos com biodisponibilidade igual ou superior a 85%. Com base nestes dados, a candesartana cilexetila é considerada um fármaco de baixa permeabilidade.

Relatos da literatura indicam que a candesartana cilexetila é substrato para a Pgp. Gurunath e colaboradores (2014) realizaram estudos utilizando coelhos para prever a permeabilidade da CC e a possível interferência deste transportador na sua absorção. Os experimentos possibilitaram constatar que ao bloquear o transportador Pgp há um aumento na absorção deste pró-fármaco, o que sugere que a CC é substrato para esta proteína de efluxo. Assim, é importante salientar que, fármacos substratos para Pgp não são ideais para estudo em PAMPA, uma vez que este não consegue prever o comportamento *in vivo* do fármaco.

Além de tais fatores, a CC é um pró-fármaco que possui baixa solubilidade (5×10^{-11} µg/L), em meio aquoso (ZULAL; LAKSHMI, 2014) o que também é limitante para sua absorção. Outra característica importante, segundo os dados da literatura é a alta ligação a proteínas plasmáticas (>99%).

Em relação as características físico-químicas da CC dados de pKa e cLogP são encontrados na literatura sendo, pKa = 6,0, cLogP = 7,10 (CAGIGAL, 2001; CAMPOS et al., 2016).

A partir destes dados iniciais, é possível propor um método para determinação da permeabilidade efetiva da CC através do PAMPA, Tabela 5.

Cagigal e colaboradores (2001) determinaram que o coeficiente de partição da CC em meios com diferentes valores de pH (1,1, 6,9 e 8,9) é superior a 1000, o que justifica seu alto caráter hidrofóbico e a necessidade de utilizar condições de não saturação do sistema, considerando que a membrana possui uma alta concentração lipídica.

Co-solventes e o uso de proteínas séricas ou algum mimetizador do papel dessas proteínas, como tensoativos, no compartimento doador e receptor respectivamente serão fundamentais para contribuir na solubilização deste fármaco e manutenção da condição de não saturação.

Tabela 5 - Proposta de condições para realização do PAMPA utilizando a Candesartana Cilexetila

Membrana	20% (p/v) lectina soja
Solvente	Dodecano
Co-Solvente	DMSO
Concentração	250 uM
Volume	300 uL
pH(Doador)	5,0-5,5-6,0
pH(Receptor)	7,4
Agitação	100 rpm
Temperatura	37°C
Tempo de Incubação	30min

Para determinar a concentração ideal, deve-se ter em mente três fatores: 1) se há o risco de alta retenção nas membranas, 2) se o fármaco é solúvel no meio tamponado e 3) se é um cromóforo forte o suficiente para ser lido no espectrofotômetro. Apesar da possibilidade da leitura espectrofotométrica o fármaco escolhido possui baixa solubilidade sendo necessário o uso de métodos mais sensíveis para a quantificação do permeado.

Outro fator importante a ser considerado é a temperatura. A maioria dos autores utiliza temperatura ambiente (tabela 3) e como já demonstrado, a temperatura é um importante fator que pode interferir no PAMPA, assim, a temperatura sugerida é a de 37°C que mimetiza as condições *in vivo*.

Em condições *in vivo*, o pH do estômago em jejum está em torno de 1,7 enquanto os valores de pH no intestino delgado variam de 6,6 até 7,5 nas regiões proximais e distais, respectivamente e o pH sanguíneo está em torno de 7,4 (EVANS et al., 1998).

A variação do pH é fundamental para determinar qual a melhor condição para que o fármaco, na sua forma não ionizada, atravesse a membrana. Empregando equação de Henderson-Hasselbach (Equação 3), percebe-se que os valores de pH 5,0, 5,5 e 6,0 são os mais adequados para simular o gradiente que ocorre no TGI além de auxiliarem a CC, um ácido fraco ($pK_a = 6,0$) a permear pelas membranas.

Equação 3 - Equação de Henderson-Hasselbach

$$pH = pKa + \log \left(\frac{[A^-]}{HA} \right)$$

Para identificar o pH ideal para realização do ensaio PAMPA, foram aplicados os três valores de pH sugeridos na Equação 3 e calculada a proporção entre as espécies ionizadas e não ionizadas para a CC em cada uma das condições. Os resultados obtidos a partir do cálculo estão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultados dos cálculos utilizando a equação de Henderson-Hasselbach

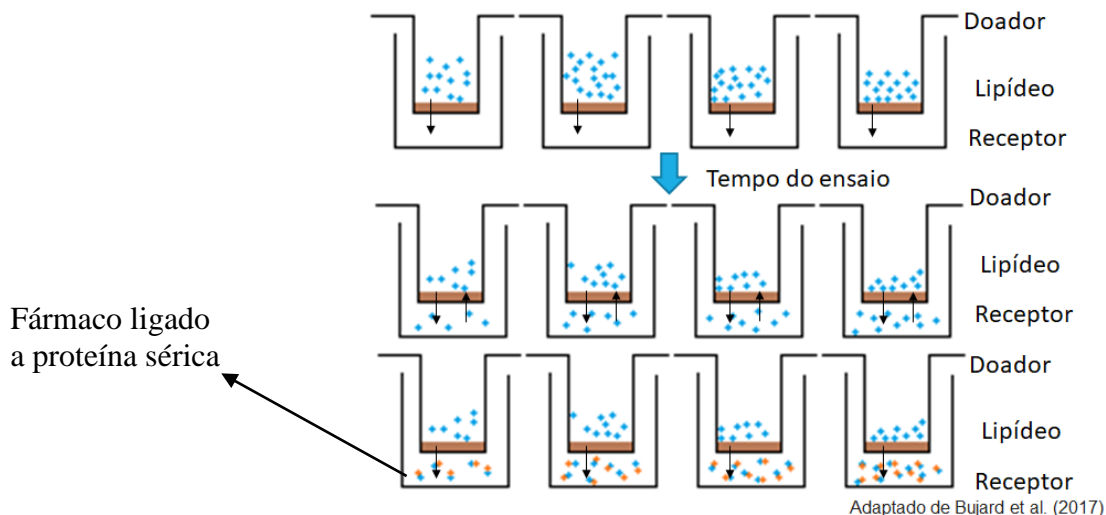
pH	pKa	Correlação $\left(\frac{[CC^-]}{[CC]} \right)$
5,0	6,0	0,1
5,5	6,0	0,3162
6,0	6,0	1
7,4	6,0	25,12

Ao realizar os cálculos, nota-se que em pH 5,0 há maior concentração de espécies não ionizadas no compartimento doador, espécies não ionizadas terão afinidade pela membrana lipídica o que favorece a permeação da CC do compartimento doador para o compartimento receptor se comparado nos meios com pH 5,5 E 6,0. Nestes a elevada concentração de espécies ionizadas dificultaria a difusão do fármaco pela membranas, por haver repulsão entre as espécies ionizadas e a membrana lipídica.

Após a permeação da substância a partir do compartimento doador para o compartimento receptor cujo pH simula as condições sanguíneas. Neste pH definido como 7,4, de acordo com a equação de Henderson-Hasselbach, há uma alta concentração de espécies ionizadas, desta forma dificultaria a difusão passiva através das membranas lipofílicas do compartimento receptor para o doador, mantendo o fármaco retido no receptor favorecendo o gradiente de concentração do doador para o receptor.

Apesar da alta concentração de lipídeos na membrana favorecerem a retenção do fármaco, propõe-se realizar o cálculo da permeabilidade efetiva, quantificando a possível retenção de uma parte do fármaco, além do ensaio ser proposto utilizando-se de condições de não saturação, que é relacionada ao gradiente de pH e o uso de proteínas séricas no compartimento receptor, ambas tem o objetivo de aprimorar o cálculo da permeabilidade e aproximar o máximo possível dos resultados obtidos nas condições *in vivo*.

Figura 7 – Comportamento do fármaco na presença de proteínas séricas



Por fim, para a detecção do fármaco, pode utilizar a cromatografia a líquido de alta eficiência com detector de UV ou espectrômetro de massa, uma vez que esse segundo detector oferece uma análise mais seletiva e sensível para a determinação da permeabilidade pelo PAMPA (LIU et al., 2003).

Apesar de sugerir um método para aplicação do PAMPA, outros estudos são fundamentais para determinar a influência dos parâmetros na permeabilidade efetiva para o pró-fármaco escolhido.

6 CONCLUSÃO

Foi possível mapear as principais condições para o emprego do PAMPA como modelo de permeabilidade e detectar que a escolha adequada da composição lipídica, tipo de filtro utilizado, além da concentração do fármaco estudado e o pH dos meios serão fundamentais para a obtenção de dados de permeabilidade. Com o presente estudo constatou-se que a CAE e a retenção de fármacos nas membranas lipídicas utilizadas podem ser fatores limitantes para o resultado da permeabilidade e correlação com os dados obtidos *in vivo*.

Neste trabalho foi possível propor condições adequadas para estudo da permeabilidade da candesartana cilexetila utilizando o ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela e verificar que os possíveis interferentes para realização do ensaio com este fármaco podem comprometer o resultado e a correlação com o comportamento da candesartana cilexetila *in vivo*.

O ensaio PAMPA é uma técnica viável, simples e versátil e tem sido amplamente estudado na literatura devido ao seu potencial em prever a permeabilidade de uma substância através das membranas do TGI. Assim o presente trabalho contribuiu para propor padronização do ensaio e indicar as limitações da técnica para determinação de determinadas substâncias que não são permeadas por transportes transcelulares.

7 REFERÊNCIAS

Ahlman H, Nilsson. **The gut as the largest endocrine organ in the body.** Ann Oncol 2001;12 Suppl 2: S63-8. 10.1093/annonc/12.suppl_2.S63

AMIDON, G. L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. **A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability.** Pharmaceutical Research, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.

ARTURSSON, P., & KARLSSON, J (1991). **Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells.** Biochemical and Biophysical Research Communications, 175, 880-885.

ASHFORD, M. **Gastrointestinal tract: physiology and drug absorption.** Pharmaceutics. In: Michael E. Aulton BPharm. Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design. 2 ed., Churchill Livingstone, 2001.

AVDEEF A, STRAFFORD M, BLOCK E, BALOGH MP, CHAMBLISS W, KHAN I. **Drug absorption *in vitro* model: filter-immobilized artificial membranes.** 2. Studies of the permeability properties of lactones in Piper methysticum Forst. Eur J Pharm Sci. 2001;14(4):271-80.

AVDEEF, Alex et al. **PAMPA—critical factors for better predictions of absorption.** Journal of Pharmaceutical Sciences, [s.l.], v. 96, n. 11, p.2893-2909, nov. 2007. Elsevier BV.

AVDEEF, Alex; NIELSEN, Per e; TSINMAN, Oksana. **PAMPA—a drug absorption *in vitro* model.** European Journal Of Pharmaceutical Sciences, [s.l.], v. 22, n. 5, p.365-374, ago. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2004.04.009>.

BALIMANE, P. V., HAN, Y. H. & CHONG, S. H. **Current industrial practices of assessing permeability and P-glycoprotein interaction.** AAPS Journal 8, e1-e13, 2005.

BALIMANE, P.V.; CHONG,S; MORRISON, R.A. **Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption.** Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, v.44, p301-312,2000.

BEN TRIVEDI A, KITABATAKE N, DOI E. **Toxicity of dimethyl sulfoxide as a solvent in bioassay system with HeLa cells evaluated colorimetrically with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide.** Agric Biol Chem. 1990;54(11):2961-6.

BERNE, R. B, LEVY, M. N. **Tratado De Fisiologia Humana.** 4 Ed. Rj. Guanabara Koogan, 2000.

BREIER A, BARANČÍK M, SULOVÁ Z, UHRÍK B. **P-glycoprotein--implications of metabolism of neoplastic cells and cancer therapy.** *Curr Cancer Drug Targets.* 2005;5(6):457-68.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica** 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2007. 1821 p.

BUJARD, Alban et al. HDM-PAMPA to predict gastrointestinal absorption, binding percentage, equilibrium and kinetics constants with human serum albumin and using 2 end-point measurements. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 97, p.143-150, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2016.11.001>.

Cagigal E, González L, Alonso RM, Jiménez RM. **pK(a) determination of angiotensin II receptor antagonists (ARA II) by spectrofluorimetry.** *J Pharm Biomed Anal.* 2001;26(3):477-86.

CAMPOS, D.P., ARRUNÁTEGUI, L.B., BARCELLOS, N.M.S. , SOUZA, J. **Computational models and their participation in biopharmaceutical studies of antihypertensives** 10th International Congress of Pharmaceutical Sciences, Ribeirão Preto, Brazil, September 5-9 2015.

CHEN, Xiaoxi et al. A Novel Design of Artificial Membrane for Improving the PAMPA Model. **Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 25, n. 7, p.1511-1520, 10 jan. 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-007-9517-8>.

DEFERME, S.; ANNAERT, P.; AUGUSTIJNS, P. **In vitro screening models to assess intestinal drug absorption and metabolism.** In: EHRHARDT, C.; KIM, K.-J.,eds. *Drug Absorptions studies: in situ, in vitro and in silico models.* New York: Springer, 2008. P.182-215 (Biotechnology: Pharmaceutical Aspects. v.7)

DRESSMAN JB, BERARDI RR, DERMENTZOGLOU LC, ET AL. **Upper gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women.** *Pharm Res.* 1990;7(7):756-61.

EVANS, D. F., PYE, G., BRAMLEY, R., CLARK, A. G., DYSON, T. J., & HARDCASTLE, J. D (1988). **Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects.** *Gut*, 29(8), 1035–1041.

FALLER, B. **Artificial Membrane Assay to Asses Permeability.** Novartis Institutes for BioMedical Research, 2008, 9, 886-892.

FUMIYOSHI Y, MITSURU H. **In silico Approaches for Predicting ADME properties of Drugs.** *Drug Metab Pharmacokinet.* 2004;19:327–38.

G.L. AMIDON, H. LENNERNAS, V.P SHAH AND J.R. CRISON. **A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability,** *Pharm. Res.*, 12, 413 (1995).

GLEITER CH, MORIKE KE. **Clinical pharmacokinetics of candesartan.** Clin Pharmacokinet 2002; 41: 7–17

GOLAN, David E. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GONÇALVES, J.E.; SOUZA, J.; STORPIRTIS, S. - **Avaliação da Permeabilidade de Fármacos Empregando Culturas Celulares.** In: Storpirtis, S.; Gonçalves, J.E.; Chiann, C.; Gai, M.N. – Biofarmacotécnica – Coleção Ciências Farmacêuticas. Ed. Guanabara Koogan, cap. 19, p. 204 – 211, 2.009.

GUNAWARDENE, Ashok R.; CORFE, Bernard M.; STATON, Carolyn A.. Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract. **International Journal Of Experimental Pathology**, [s.l.], v. 92, n. 4, p.219-231, 25 abr. 2011. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2613.2011.00767.x>.

GURUNATH S, NANJWADE BK, PATILA PA. **Enhanced solubility and intestinal absorption of candesartan cilexetil solid dispersions using everted rat intestinal sacs.** Saudi Pharm J. 2014;22(3):246-57.

GUTKNECHT J, TOSTESON DC. **Diffusion of weak acids across lipid bilayer membranes: effects of chemical reactions in the unstirred layers.** Science. 1973;182(4118):1258-61.

HALL JE. **Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology.** Elsevier Health Sciences; 2010.

HUSAIN, A. et al. A Review on candesartan: pharmacological and pharmaceutical profile. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, n. 10, p.12-17, 2011.

ISRAILI ZH. **Clinical pharmacokinetics of angiotensin II (AT1) receptor blockers in hypertension.** J Hum Hypertens 2000; 14(Suppl 1): S73–S86

JUNQUEIRA, L.C.U. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** 11ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524p.

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

KNUTSON, T. et al. Increased Understanding of Intestinal Drug Permeability Determined by the LOC-I-GUT Approach Using Multislice Computed Tomography. **Molecular Pharmaceutics**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.2-10, 2 fev. 2009. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/mp800145r>.

JAPAN. **Japanese Pharmacopoeia**. 16. ed. Ministry of Health, Labour and Welfare, 2011.

LENNERNÄS H, AHRENSTEDT O, HÄLLGREN R, KNUTSON L, RYDE M, PAALZOW LK. **Regional jejunal perfusion, a new *in vivo* approach to study oral drug absorption in man**. *Pharm Res*. 1992;9(10):1243-51.

LIPINSKI, T., LOMBARDO, F., DOMINY, B., & FEENEY, P (1997). **Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings**. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23, 3 ± 25.

LIU H, SABUS C, CARTER GT, DU C, AVDEEF A, TISCHLER M. ***In vitro* permeability of poorly aqueous soluble compounds using different solubilizers in the PAMPA assay with liquid chromatography/mass spectrometry detection**. *Pharm Res*. 2003;20(11):1820-6.

LOFTSSON T. **Drug permeation through biomembranes: cyclodextrins and the unstirred water layer**. *Pharmazie*. 2012;67(5):363-70.

LUNDQUIST, P.; ARTURSSON, P.. Oral absorption of peptides and nanoparticles across the human intestine: Opportunities, limitations and studies in human tissues. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 106, p.256-276, nov. 2016. Elsevier BV.

MARKOVIC, Bojan D. et al. **A PAMPA Assay as Fast Predictive Model of Passive Human Skin Permeability of New Synthesized Corticosteroid C-21 Esters**. *Molecules*, [s.l.], v. 17, n. 12, p.480-491, 5 jan. 2012. MDPI AG

MARTINS, JOÃO PAULO A. AND FERREIRA, MÁRCIA M. C. **QSAR modeling: um novo pacote computacional open source para gerar e validar modelos QSAR**. *Quím. Nova*[online]. 2013, vol.36, n.4 [cited 2016-06-20], pp.554-560. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422013000400013&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0100-4042. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422013000400013>.

MEERVELD, Beverley Greenwood-van; JOHNSON, Anthony C.; GRUNDY, David. **Gastrointestinal Physiology and Function. Gastrointestinal Pharmacology**, [s.l.], p.1-16, 2017. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/164_2016_118.

MILLIPORE.PC1545EN00. **Membrane integrity test for lipid-PAMPA artificial membranes**. 2005. Disponível em: http://www.emdmillipore.com/Web-US-Site/en_CA/-/USD/ShowDocument-File?ProductSKU=MM_NF-C7702&DocumentId=201306.10677.ProNet&DocumentType=TI&Language=EN&Country=NF&Origin=PDP Acesso: 24 jul. 2017.

MIRON, N.; CRISTEA, V. Enterocytes: active cells in tolerance to food and microbial antigens in the gut. **Clinical & Experimental Immunology**, [s.l.], v. 167, n. 3, p.405-412, 30 jan. 2012. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04523.x>.

MOURA, E. **Tecnologia de Obtenção de Revestimento Aquoso Gastro resistente para Comprimidos de Bisacodil 5mg – Pré-formulação e Desenvolvimento do Processo de Revestimento**. 2005. 63 p. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

NELSON, D.L; COX, M.M. **Lehninger – Princípios de Bioquímica**, 4ed., W.H Freeman, 2006. 1009p.

POHL, Peter; SAPAROV, Sapar M.; ANTONENKO, Yuri N. The Size of the Unstirred Layer as a Function of the Solute Diffusion Coefficient. **Biophysical Journal**, [s.l.], v. 75, n. 3, p.1403-1409, set. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0006-3495\(98\)74058-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0006-3495(98)74058-5).

POHLE, Thorsten; DOMSCHKE, Wolfram. Gastric function measurements in drug development. **British Journal Of Clinical Pharmacology**, [s.l.], v. 56, n. 2, p.156-164, 31 jul. 2003. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2125.2003.01935.x>.

RUELL JA, TSINMAN KL, AVDEEF A. **PAMPA--a drug absorption *in vitro* model. 5. Unstirred water layer in iso-pH mapping assays and pKa(flux)--optimized design (pOD-PAMPA)**. Eur J Pharm Sci. 2003;20(4-5):393-402.

SCHNEIDER, NAIRA FERNANDA ZANCHETT; PADUA, R. ; KREIS, W. ; BRAGA, F. C. ; SIMÕES, C. M. O. **Standardization and application of PAMPA assay (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) to cardenolides permeability evaluation**. In: III International Symposium on Drug Discovery, 2013, Araraquara. III International Symposium on Drug Discovery, 2013.

SEO PR, TEKSIN ZS, KAO JP, POLLI JE. **Lipid composition effect on permeability across PAMPA**. Eur J Pharm Sci. 2006;29(3-4):259-68.

SHARGEL L, YU A. **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**, Seventh Edition. McGraw-Hill Education / Medical; 2015.

SHARGEL, L., PONG, S., YU, A., 2015. **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**. 6ed., McGraw-Hill Education, 2012.

SINKÓ, Bálint et al. Skin–PAMPA: A new method for fast prediction of skin penetration. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 45, n. 5, p.698-707, abr. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2012.01.01.1>.

SNOECK, VEERLE; GODDEERIS, BRUNO; COX, ERIC. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. **Microbes And Infection**, [s.l.], v. 7, n. 7-8, p.997-1004, jun. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2005.04.003>.

SPANIER, BRITTA. **Transcriptional and functional regulation of the intestinal peptide transporter PEPT1**. The Journal Of Physiology, [s.l.], v. 592, n. 5, p.871-879, 24 set. 2013. Wiley-Blackwell.

STORPIRTIS, S.; et al. **Biofarmacotécnica**. 1 ed. Editora Guanabara Koogan, 2009.

STORPIRTIS, S.; CONSIGLIERI, O.V. **Biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos: Aspectos fundamentais para o planejamento e execução de estudos**. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v. 31, p. 63-70, 1995.

SUGANO K, HAMADA H, MACHIDA M, USHIO H, SAITOH K, TERADA K. **Optimized conditions of bio-mimetic artificial membrane permeation assay**. *Int J Pharm.* 2001;228(1-2):181-8.

TAKANO, Mikihisu; YUMOTO, Ryoko; MURAKAMI, Teruo. **Expression and function of efflux drug transporters in the intestine**. *Pharmacology & Therapeutics*, [s.l.], v. 109, n. 1-2, p.137-161, jan. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.06.005>.

THIM L. **Trefoil peptides: from structure to function**. *Cell Mol Life Sci.* 1997;53(11-12):888-903.

THOMSON AB. Mechanisms of intestinal adaptation: **unstirred layer resistance and membrane transport**. *Can J Physiol Pharmacol.* 1984;62(6):678-82.

VILLANOVA, Janaina C. O.; ORÉFICE, Rodrigo L.; CUNHA, Armando S. **Aplicações farmacêuticas de polímeros**. *Polímeros*, [s.l.], v. 20, n. 1, p.51-64, 2010. FapUNIFESP (SciELO).

VILLELA, G.G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. *Bioquímica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1961. 452p.

VIZSERÁLEK, Gábor et al. PAMPA study of the temperature effect on permeability. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 53, p.45-49, mar. 2014. Elsevier BV.

VOLPE, Donna A. **Application of Method Suitability for Drug Permeability Classification**. *The Aaps Journal*, [s.l.], v. 12, n. 4, p.670-678, 2 set. 2010. American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS).

WASHINGTON N., WASHINGTON C., WILSON, C. **Physiological Pharmaceutics: Barriers to a drug absorption**. 2 ed., Taylor & Francis e-Library, 2003.

WOHNSLAND, F. AND FALLER, B. **High-Throughput Permeability pH Profile and High-Throughput Alkane/Water logP with Artificial Membranes** (2001) *J. Med. Chem.*, 44(6), 923-930.

WOODCOCK, D.M., LINSENMEYER, M.E., CHOJNOWSKI, G. **Reversal of multidrug resistance by surfactants**. *British Journal of Cancer*, v. 66, p. 62– 68, 1992.

YU LX, LIPKA E, CRISON JR, Amidon GL. **Transport approaches to the biopharmaceutical design of oral drug delivery systems: prediction of intestinal absorption.** Adv Drug Deliv Rev. 1996; 19(3):359-76.

ZHU, C., JIANG, L., CHEN, C., HAWNG, K., 2001. **A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drugs absorption potential.** Eur. J. Med. Chem. 37 (2002), 399-407.

ZULAL, NOOR & K. LAKSHMI, P. (2015). **Enhancement of Solubility and Bioavailability of Candesartan Cilexetil using Natural P-Glycoprotein Inhibitors.** Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 14. 21-26. 10.4314/tjpr.v14i1.4.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

Escola de Farmácia

CERTIFICADO DE CORREÇÃO

Certifico que o(a) Aluno(a) Renata Rodrigues Lima, matrícula 12.2.2065 defendeu o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado Modelo in vitro de permeabilidade em membrana Artificial Paralela para previsão da absorção de fármacos, em 22 de Agosto de 2017 e **REALIZOU TODAS AS CORREÇÕES REQUERIDAS PELA COMISSÃO AVALIADORA.**

Ouro Preto, 29/08/2017

Assinatura do(a) orientador(a)