

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

BRUNA KOGICI MOHAMMED HATEEM

**Estudo da permeabilidade de fármacos por meio do modelo de
saco intestinal de ratos**

São Paulo

2022

BRUNA KOGICI MOHAMMED HATEEM

**Estudo da permeabilidade de fármacos por meio do modelo de
saco intestinal de ratos**

Versão Corrigida

Dissertação para obtenção do Título de
Mestre

Área de Concentração: Produção e
Controle Farmacêuticos

Orientadora: Prof^a Dra. Valentina Porta

São Paulo

2022

Bruna Kogici Mohammed Hateem

**Estudo da permeabilidade de fármacos por meio do modelo de saco intestinal
de ratos**

Comissão julgadora da dissertação para obtenção do Título de Mestre

Profª Dra. Valentina Porta
Orientadora/Presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2022.

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

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação: Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

K75e Kogici, Bruna
Estudo da permeabilidade de fármacos por meio do modelo de saco intestinal de ratos / Bruna Kogici. - São Paulo, 2022.
101 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Farmácia - Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos.
Orientador: Porta, Valentina

1. Permeabilidade. 2. Sistema de Classificação Biofarmacêutica. 3. Intestino delgado. 4. Saco intestinal. I. T. II. Porta, Valentina, orientador.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todos os professores que fizeram parte da minha jornada até aqui. Àqueles que, com carinho e dedicação transmitiram seus conhecimentos, suas experiências e foram verdadeiras inspirações para a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço a Deus por sempre guiar os meus passos, por colocar pessoas especiais em meu caminho, por iluminar cada etapa da minha vida e, com sua infinita bondade e misericórdia, me ajudou a enfrentar os obstáculos, que aos meus olhos, eram impossíveis de serem ultrapassados.

Meu agradecimento especial a Prof^a Valentina Porta, por tudo o que me ensinou ao longo da realização desse trabalho, pela paciência e pela disposição em me mostrar os caminhos quando os problemas mais imprevisíveis surgiam.

Obrigada Amouni, minha querida amiga, que sempre será minha inspiração como profissional e ser humano.

Agradeço também a colaboração das alunas Cibelli e Gabrilele na realização dos experimentos, dos técnicos, funcionários e professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, sempre dispostos a esclarecer dúvidas e auxiliar como possível.

Por fim, agradeço a minha família e amigos, por acreditarem em mim e me incentivarem a realizar os meus sonhos. E ao meu pequeno Amir, o grande amor da minha vida, que todos os dias me inspira a ser uma pessoa melhor.

“Se fui capaz de ver mais longe, é porque me apoiei em ombros de gigantes. ”

Isaac Newton

RESUMO

HATEEM, Bruna Kogici Mohammed. Estudo da permeabilidade de fármacos por meio do modelo de saco intestinal de ratos. 2022. 101f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Os parâmetros de permeabilidade e solubilidade são fundamentais à absorção oral de fármacos e a partir dessas características, foi criado o Sistema de Classificação Biofarmacêutica, através do qual os fármacos são divididos em quatro classes. Atualmente, para a determinação da solubilidade de um fármaco, existem diversos métodos padronizados por agências regulatórias, no entanto, para a determinação da permeabilidade, os ensaios são passíveis de diversas variações em sua execução, diminuindo a confiabilidade dos resultados obtidos e impossibilitando a comparação dos mesmos quando realizados com técnicas diferentes umas das outras. O objetivo do presente trabalho é avaliar as variáveis experimentais do modelo do saco intestinal que podem influenciar nos resultados de permeabilidade aparente de fármacos e na viabilidade do tecido. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da FCF-USP (109.2018-P574). Foram utilizados 33 *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, machos, jovens adultos, com peso entre 200 g e 300 g. Para realização do procedimento, cada animal permaneceu em jejum por cerca de quatro horas e após adequada anestesia a porção do jejuno do intestino delgado foi retirada e dividida em seis segmentos de aproximadamente 8,5cm cada. Foram realizados experimentos com e sem inversão do saco intestinal, submetidos a diferentes tempos de banho de gelo após sua ressecção, na presença ou ausência de inibidor da glicoproteína-P (verapamil). Os fármacos naproxeno e famotidina foram empregados como marcadores de alta e baixa permeabilidade, respectivamente. A losartana foi utilizada como substrato da glicoproteína P. Cada um dos sacos intestinais foi colocado em um tubo de ensaio contendo tampão Krebs, a 37°C, saturado com gás carbogênio. Para avaliação da integridade e viabilidade dos segmentos intestinais, observou-se a presença de movimentos peristálticos e coletaram-se amostras do meio de incubação nos tempos 0, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos para quantificação dos fármacos e de glicose, uma vez que esta é ativamente transportada para a serosa do intestino delgado. Determinou-se a permeabilidade aparente de cada fármaco e as concentrações de glicose nas diferentes condições experimentais, realizou-se planejamento fatorial multinível e os resultados foram analisados por análise variância (ANOVA), seguida de pós-teste de Tukey. Observou-se que as variáveis experimentais interferiram de forma significativa na viabilidade tecidual e na permeabilidade aparente dos fármacos. Não foram observadas diferenças significativas da permeabilidade de fármacos nos diferentes segmentos do jejuno. A glicose mostrou-se um bom marcador de viabilidade tecidual e foi constatado que a presença ou ausência de movimentos peristálticos não está relacionada diretamente com a viabilidade do tecido. Uma vez que foram constatadas tantas interferências nos resultados, é imprescindível que os procedimentos experimentais sejam padronizados, para que os resultados apresentem menor variabilidade e possam ser comparados entre si.

Palavras chave: permeabilidade, intestino delgado, jejuno sistema de classificação biofarmacêutica, saco intestinal invertido, saco intestinal sem inversão.

ABSTRACT

HATEEM, Bruna Kogici Mohammed. Study of drug permeability through the rat gut sac model. 101p. 2022. Dissertation (Master's in Drugs and Medicines) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2022.

The permeability and solubility parameters are fundamental to the oral absorption of drugs and from these characteristics, the Biopharmaceutical Classification System was created, through which drugs are divided into four classes. Currently, for the determination of the solubility of a drug, there are several methods standardized by regulatory agencies, however, for the determination of permeability, the tests are subject to several variations in their execution, reducing the reliability of the results obtained and making it impossible to compare the results obtained. same when performed with different techniques. The aim of this study is to evaluate if different experimental conditions can influence the results of apparent drug permeability and tissue viability on gut sac model. The present study was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals of FCF-USP (109.2018-P574). Thirty-three male, young adult *Rattus norvegicus* were used, weighing between 200 g and 300 g. To perform the procedure, each animal fasted for about four hours and after adequate anesthesia, the portion of the jejunum of the small intestine was removed and divided into six segments of approximately 8.5 cm each. Experiments were performed with and without inversion of the gut sac, submitted to different times of ice bath after its resection, in the presence or absence of a P-glycoprotein inhibitor (verapamil). The drugs naproxen and famotidine were used as markers of high and low permeability, respectively. Losartan was used as a substrate for P-glycoprotein. Each of the gut sacs was placed in a test tube containing Krebs buffer, at 37°C, saturated with carbogen gas. To evaluate the integrity and viability of the intestinal segments, the presence of peristaltic movements was observed and samples of the incubation medium were collected at 0, 30, 45, 60, 90 and 120 minutes for quantification of drugs and glucose, as it is actively transported to the serosa of the small intestine. The apparent permeability of each drug and the glucose concentrations were determined under different experimental conditions, multilevel factorial design was performed and the results were analyzed by analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post-test. It was observed that the experimental variables significantly interfered in the tissue viability and in the apparent permeability of the drugs. No significant differences in drug permeability were observed in the different segments of the jejunum. Glucose proved to be a good marker of tissue viability and it was found that the presence or absence of peristaltic movements is not directly related to tissue viability. Since so many interferences were found in the results, it is essential that the experimental procedures be standardized, so that the results show less variability and can be compared between different authors.

Keywords: permeability, small intestine, jejunum, biopharmaceutical classification system, everted gut sac, non-everted gut sac.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema de uma célula de Franz.....	266
Figura 2 Esquema de procedimento experimental do método de avaliação da permeabilidade por meio de saco intestinal de rato ou camundongo.....	28
Figura 3 Perfusão intestinal <i>in situ</i> para avaliação da permeabilidade de fármacos e outras substâncias	27
Figura 4 Anatomia do trato gastrointestinal de ratos	30
Figura 5 Planejamento fatorial multinível para avaliação da influência das condições experimentais no resultado de estudos de permeabilidade em saco intestinal de rato.	48
Figura 6 Ligamento de Treitz (seta)	51
Figura 7 Placa de Peyers (seta)	52
Figura 8 Medição de segmento intestinal	52
Figura 9 Lavagem do segmento com soro fisiológico	53
Figura 10 Remoção do excesso de soro fisiológico	53
Figura 11 Preparação do saco intestinal	54
Figura 12 Finalização do saco intestinal	54
Figura 13 Saco intestinal preenchido	55
Figura 14 Sistema para ensaio de permeabilidade	56
Figura 15 Inserção do segmento intestinal em instrumento metálico para iniciar a inversão.....	57
Figura 16 Amarração do segmento intestinal para realizar sua inversão	58
Figura 17 Inversão do segmento intestinal.....	58
Figura 18 Segmento intestinal invertido	58
Figura 19 Segmento intestinal em banho de gelo	59
Figura 20 Intestino delgado inteiro em banho de gelo (T2)	60
Figura 21 Sistema para coleta de amostras.....	61
Figura 22 Representação gráfica das respostas em função da concentração de famotidina.....	63
Figura 23 Representação gráfica das respostas em função da concentração de losartana.....	64
Figura 24 Representação gráfica das respostas em função da concentração de naproxeno	64

Figura 25 Cromatograma de amostra “Branco” analisada pelo método de quantificação de famotidina.....	70
Figura 26 Cromatograma de amostra “Branco” analisada pelo método de quantificação de losartana e naproxeno.....	70
Figura 27 Exemplo de cromatograma do método de quantificação de famotidina	71
Figura 28 Exemplo de cromatograma do método de quantificação da losartana e naproxeno	71
Figura 29 Representação gráfica da absorvância em função da concentração de glicose	72
Figura 30 Transporte de substâncias através dos enterócitos	79
Figura 31 Representação gráfica de interações principais entre as variáveis de estudo e a concentração de glicose nos sacos intestinais sem inversão.....	80
Figura 32 Representação gráfica de interações principais entre as variáveis de estudo e a concentração de glicose nos sacos intestinais com inversão.....	82
Figura 33 Interações principais entre as condições experimentais e a Papp do naproxeno	86
Figura 34 Papp do naproxeno com as variáveis envolvendo inversão do saco intestinal e banho de gelo.....	87
Figura 35 Representação gráfica de efeitos principais entre a diferentes condições experimentais e a Papp da famotidina	88
Figura 36 Papp da famotidina com as variáveis envolvendo inversão do saco intestinal e banho de gelo.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Resultados de precisão e exatidão intradia dos métodos cromatográficos para quantificação de famotidina, losartana e naproxeno em tampão Krebs	65
Tabela 2 Resultados de precisão e exatidão interdias dos métodos cromatográficos para quantificação de famotidina, losartana e naproxeno em tampão Krebs	66
Tabela 3 Estabilidade de 24h - Famotidina	67
Tabela 4 Estabilidade de 24h – Losartana	68
Tabela 5 Estabilidade de 24h – Naproxeno	68
Tabela 6 Resultados de precisão e exatidão intradias do método espectofotométrico para quantificação de glicose em tampão Krebs.....	73
Tabela 7 Resultados de precisão e exatidão interdias do método espectofotométrico para quantificação de glicose em tampão Krebs.....	73
Tabela 8 Estabilidade de curta duração: solução de glicose em tampão Krebs	74
Tabela 9 Estabilidade de longa duração: solução de glicose em tampão Krebs.....	74
Tabela 10 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento: solução de glicose em tampão Krebs	75
Tabela 11 Seletividade de método espectrofotométrico para quantificação de glicose em tampão Krebs	76
Tabela 12 Comprimento das diferentes porções do intestino delgado dos ratos	77

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Composição do tampão Krebs	32
Quadro 2 Preparo das soluções concentradas de fármacos.....	34
Quadro 3 Preparo de solução de fármacos utilizados nos ensaios de permeabilidade	35
Quadro 4 Condições cromatográficas para quantificação dos fármacos em tampão Krebs.....	37
Quadro 5 Fases móveis dos métodos cromatográficos desenvolvidos.....	37
Quadro 6 Diluição das soluções concentradas de fármacos.....	39
Quadro 7 Preparo da curva de calibração: losartana e naproxeno	39
Quadro 8 Preparo da curva de calibração: famotidina	40
Quadro 9 Volumes de amostras, padrão calibrador e reagente para quantificação de glicose em tampão Krebs.....	43
Quadro 10 Diluições da solução de glicose em tampão Krebs para se determinar a linearidade.....	44
Quadro 11 Fatores e níveis utilizados para a construção do planejamento fatorial ..	48
Quadro 12 Resumo das condições experimentais testadas no ensaio de permeabilidade (<i>continua</i>).....	49
Quadro 13 Concentrações de glicose nos experimentos sem inversão do saco intestinal	80
Quadro 14 Concentração de glicose nos experimentos com inversão do saco intestinal	82
Quadro 15 Valores médios de permeabilidade aparente obtidos em todas as condições experimentais.....	85
Quadro 16 Valores médios de Papp da famotidina representados no gráfico de interações principais.....	89
Quadro 17 Resumo das condições experimentais a serem adotadas ou evitadas ...	91

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 Cálculo do desvio padrão relativo.....	41
Equação 2 Determinação da exatidão.....	42
Equação 3 Cálculo da permeabilidade aparente.....	62
Equação 4 Cálculo da superfície do segmento intestinal.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC: ATP Binding Casset

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ANOVA: Análise de Variância

ATP: Trifosfato de adenosina

CDER: Center for Drug Evaluation and Research

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

CIVIV: Correlação *in vitro in vivo*

CME: Concentração média experimental

FCF: Faculdade de Ciências Farmacêuticas

FDA: Food and Drug Administration

GLUT: Transportador de glicose (*Glucose transporter*)

IQ: Instituto de Química

JI: Junções Íntimas

Papp: Permeabilidade aparente

P-gp: Glicoproteína P (*P-glycoprotein*)

pH: potencial hidrogeniônico

SCB: Sistema de Classificação Biofarmacêutica

SGLT: Sódio-glicose co-transportador

SLC: Solute Carrier

TGI: Trato Gastrointestinal

USP: Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	20
3. REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1 Biofarmácia	21
3.2 Sistema de classificação biofarmacêutica e bioisenção	22
3.3 Ensaio de permeabilidade intestinal	24
3.3.1 Métodos <i>in vitro</i>	245
3.3.2 Células de difusão	266
3.3.3 Perfusão intestinal <i>in situ</i>	267
3.3.4 Método do saco intestinal	24
3.4 Propriedades da estrutura intestinal de humanos e ratos	248
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Fármacos	31
4.2 Reagentes, solventes e soluções	31
4.2.1 Preparo do tampão Krebs	32
4.2.2 Preparo das soluções de fármacos	33
4.3 Equipamentos e materiais	35
4.4 Condições cromatográficas dos métodos para quantificação de famotidina, losartana e naproxeno em tampão Krebs	36
4.5 Validação dos métodos cromatográficos para quantificação de famotidina, losartana e naproxeno em tampão Krebs	38
4.5.1 Linearidade: solução de fármacos em tampão Krebs	38
4.5.2 Precisão e exatidão: solução de fármacos em tampão Krebs	40
4.5.3 Limites de detecção e quantificação: solução de fármacos em tampão Krebs	41
4.5.4 Estabilidade de curta e longa duração das amostras de fármacos em tampão Krebs	41
4.5.5 Estabilidade de fármacos solubilizados em tampão Krebs após ciclos de congelamento e descongelamento	42
4.5.6 Seletividade dos métodos cromatográficos para quantificação dos fármacos de estudo	42
4.6 Quantificação de glicose em tampão Krebs por método espectrofotométrico	43
4.7 Validação do método espectrofotométrico para quantificação de glicose em tampão Krebs	44
4.7.1 Linearidade: solução de glicose em tampão Krebs	44
4.7.2 Precisão e exatidão: solução de glicose em tampão Krebs	45

4.7.3 Limites de detecção e quantificação: solução de glicose em tampão Krebs	45
4.7.4 Estabilidade de curta e longa duração das amostras de glicose em tampão Krebs	45
4.7.5 Estabilidade das amostras de glicose em tampão Krebs após ciclos de congelamento e descongelamento.....	46
4.7.6 Seletividade do método espectrofotométrico para quantificação de glicose em tampão Krebs.....	46
4.8 Aspectos éticos na utilização dos animais	47
4.9 Planejamento estatístico	47
4.10 Ensaio de permeabilidade intestinal.....	50
4.10.1 Variáveis dos ensaios de permeabilidade	56
4.10.2 Coleta das amostras	60
4.10.3 Cálculo da permeabilidade aparente (Papp).....	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1 Validação dos métodos cromatográficos para quantificação de famotidina, losartana e naproxeno em tampão Krebs	63
5.1.1 Linearidade: solução de fármacos em tampão Krebs.....	63
5.1.2 Precisão e exatidão: solução de fármacos em tampão Krebs	65
5.1.3 Limites de detecção e quantificação: solução de fármacos em tampão Krebs	66
5.1.4 Estabilidade de curta e longa duração: solução de fármacos em tampão Krebs .	67
5.1.5 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamentos: solução de fármacos em tampão Krebs	69
5.1.6 Seletividade: solução de fármacos em tampão Krebs	69
5.2 Validação do método espectrofotométrico para quantificação de glicose em tampão Krebs	72
5.2.1 Linearidade: solução de glicose em tampão Krebs.....	72
5.2.2 Precisão e exatidão: solução de glicose em tampão Krebs	72
5.2.3 Limites de detecção e quantificação: solução de glicose em tampão Krebs	73
5.2.4 Estabilidade de curta e longa duração: solução de glicose em tampão Krebs.....	74
5.2.5 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento: solução de glicose em tampão Krebs.....	75
5.2.6 Seletividade: solução de glicose em tampão Krebs.....	76
5.3 Ensaio de permeabilidade	76
5.3.1 Comprimento intestinal.....	77
5.3.2 Viabilidade tecidual	78
5.3.3 Glicose	78
5.3.4 Permeabilidade aparente: Naproxeno	84
5.3.5 <i>Permeabilidade aparente: Losartana</i>	93
6. CONCLUSÃO	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
ANEXO.....	101

1. INTRODUÇÃO

A via oral de administração tem sido alvo para o desenvolvimento de novos fármacos, pois se trata de uma via amplamente utilizada na atualidade por demonstrar diversos aspectos positivos, tais como aceitação pelos pacientes, facilidade de administração e transporte, fácil manejo de doses e processo produtivo com custo relativamente menor em relação às demais formas farmacêuticas (BUXTON, 2017). No entanto, certos fatores como o conteúdo presente no trato gastrointestinal (TGI), a velocidade de esvaziamento gástrico e a alteração do potencial hidrogeniônico (pH), podem interferir de maneira significativa na absorção do fármaco administrado por via oral e, para que este atinja concentrações ideais para sua ação terapêutica, é necessário que apresente valores máximos de solubilidade e permeabilidade no local de absorção. Portanto, é possível prever a extensão da absorção *in vivo* a partir dos parâmetros de solubilidade e permeabilidade de determinado fármaco (AMIDON *et al.*, 1995).

A pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos é um processo dispendioso e que leva anos. A análise de custos e tempo que dez empresas norte americanas tiveram para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento de câncer, por exemplo, demonstra que levaram cerca de 7,3 anos com o custo médio de 757,4 milhões de dólares, considerando o processo de desenvolvimento até o registro do fármaco e, embora os custos sejam demasiados, trata-se de um negócio bastante rentável. (AVDEEF, 2003; PRASAD; MAILANKODY, 2017).

No desenvolvimento de novos fármacos, a fase pré-clínica consiste na realização de ensaios para determinar a toxicidade, genotoxicidade, tolerância local, carcinogenicidade e farmacocinética (absorção, distribuição, metabolismo e excreção), além de possibilitar a previsão de problemas de formulação relacionados à permeabilidade e solubilidade do fármaco. O uso de animais nestes ensaios deve ser racional, evitando duplicidades e utilização desnecessária, mas sem comprometer a confiabilidade das informações relacionadas à segurança da substância a ser testada. As informações farmacocinéticas nas espécies testadas devem estar disponíveis antes da exposição a grande número de seres humanos. (ANVISA, 2013).

Na última década a determinação do perfil farmacocinético de fármacos em desenvolvimento demonstrou-se bastante promissora, mas cabe salientar que o processo de absorção continua como ponto extremamente importante na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (AVDEEF, 2003).

Uma vez que os parâmetros de solubilidade e permeabilidade de fármacos são essenciais à absorção oral, para determinação da permeabilidade, podem ser empregados ensaios que avaliam a taxa de substância(s) que atravessa(m) a membrana intestinal e, para tanto podem ser utilizados modelos animais *in situ*, *ex vivo* ou *in vitro* (CDER/FDA, 2017).

Essas técnicas são amplamente utilizadas no meio científico não só para determinar a permeabilidade direta de fármacos, mas para o estudo do mecanismo de interações medicamentosas envolvendo transportadores de membrana e para a compreensão da fisiopatologia de doenças que acometem o TGI. No entanto, ainda não existem publicações de órgãos oficiais nacionais e internacionais que definam parâmetros experimentais para que os resultados sejam reprodutíveis, o que vai de encontro aos ensaios de solubilidade, cujos métodos estão padronizados por agências regulatórias (ANVISA, 2011a; PORTA, 2013; VOLPE, 2010).

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do projeto foi avaliar de que forma as condições experimentais, como inversão do saco intestinal, banho de gelo, presença de inibidor da glicoproteína P e região anatômica do segmento intestinal, influenciam o resultado do ensaio de permeabilidade em saco intestinal de rato.

Para atingir o objetivo geral, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Desenvolver e validar métodos analíticos para a quantificação de glicose e dos fármacos: losartana, famotidina e naproxeno em tampão Krebs
- Avaliar a permeabilidade aparente de um fármaco modelo (losartana) na presença e na ausência de um inibidor de glicoproteína-P (verapamil) em diferentes condições experimentais: inversão do saco intestinal, região anatômica dos segmentos intestinais, submersão dos segmentos intestinais em banho de gelo imediatamente após a retirada do intestino e com diferentes tempos de submersão dos segmentos intestinais no banho de gelo.
- Avaliar a viabilidade do tecido por meio da quantificação de glicose no meio externo, visualização dos movimentos peristálticos e quantificação de naproxeno, que será utilizado como marcador de alta permeabilidade e famotidina, um marcador de baixa permeabilidade.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Biofarmácia

Além de apreciar a atividade farmacológica intrínseca de um fármaco, é extremamente necessário considerar os excipientes utilizados e técnicas de fabricação, uma vez que tais fatores podem influenciar na eficácia e até mesmo na segurança de um medicamento. Portanto, a biofarmácia ou biofarmacotécnica é a ciência destinada ao estudo dos fatores físico-químicos relacionados ao fármaco e à forma farmacêutica que interferem em sua ação no organismo (STORPIRTIS; GAI, 2009).

Algumas das características biofarmacêuticas estudadas no desenvolvimento e produção de medicamentos são, por exemplo: a solubilidade, tamanho de partícula, impurezas e forma polimórfica do princípio ativo; via de administração do medicamento; posologia; forma farmacêutica, características dos excipientes e técnicas de fabricação. Esses estudos possuem fundamentação científica e podem ser realizados por métodos *in vitro* ou *in vivo* (SHARGEL *et al.*, 2016).

Uma vez que o fármaco é liberado da sua forma farmacêutica, o mesmo deve atingir o seu sítio de ação (alvo farmacológico). Para tanto, o mesmo deve ser absorvido, distribuído e posteriormente eliminado (metabolizado e excretado). Essas etapas compreendem a farmacocinética, que está voltada para o estudo do movimento e disposição dos fármacos no organismo. (WECKER; TAYLOR; THEOBALD JR, 2019).

A absorção é definida como a passagem de uma substância do seu local de administração para a circulação sistêmica e, para formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral é necessário que, primeiramente, haja a liberação do princípio ativo da forma farmacêutica e posterior dissolução do fármaco no conteúdo do TGI. Se o fármaco for extensamente metabolizado ou excretado por via hepática ou intestinal, sua biodisponibilidade (velocidade e fração de fármaco que atinge a circulação sistêmica) pode ser reduzida drasticamente. Além desta definição, a absorção também pode ser considerada quando o fármaco atinge a circulação porta-hepática ou quando este deixa o lúmen intestinal e atravessa a membrana apical dos enterócitos (BUXTON, 2017).

Existem fatores limitantes à absorção de fármacos administrados por via oral sob formas farmacêuticas sólidas, tais como: a capacidade de desintegração da forma

farmacêutica, a taxa de dissolução do fármaco nos fluidos do TGI e a sua capacidade de atravessar a membrana celular dos enterócitos (SHARGEL *et al.*, 2016).

O metabolismo ou biotransformação de xenobióticos, é um processo mediado por enzimas e é dividido em duas fases. A fase I compreende reações de oxidação e hidrólise, o que geralmente confere maior hidrossolubilidade ao composto. A fase II é caracterizada por reações de conjugação, como acetilação, glicuronidação metilação, entre outras, que podem inativar o composto e aumentar ainda mais a sua hidrossolubilidade, o que facilita o processo de eliminação por diferentes vias, como a renal ou biliar (FISHER *et al.*, 2020).

3.2 Sistema de classificação biofarmacêutica e bioisenção

Os parâmetros de solubilidade e permeabilidade são essenciais à absorção oral de um fármaco e estão diretamente relacionados com sua biodisponibilidade, portanto foi criado o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), através do qual os fármacos são divididos nas seguintes classes (AMIDON *et al.*, 1995):

Classe I: fármacos que apresentam alta solubilidade e alta permeabilidade;

Classe II: fármacos que apresentam baixa solubilidade e alta permeabilidade;

Classe III: fármacos que apresentam alta solubilidade e baixa permeabilidade;

Classe IV: fármacos que apresentam baixa solubilidade e baixa permeabilidade.

Com base nessa classificação, torna-se possível realizar correlações *in vitro-in vivo* (CIVIV) de determinada forma farmacêutica, o que consiste na comparação entre parâmetros obtidos em ensaios *in vitro*, como a avaliação da extensão de dissolução e um parâmetro obtido por ensaios realizados *in vivo*, como a determinação da concentração plasmática máxima (BRASIL^a, 2002; EDDINGTON *et al.*, 1998).

O SCB pode auxiliar no desenvolvimento de novos compostos, novas formulações, prever a biodisponibilidade de compostos em estudo, além de contribuir notoriamente nos processos de bioisenção, que correspondem à realização de ensaios *in vitro* para substituir análises de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de determinadas formas farmacêuticas, tais como soluções aquosas parenterais, orais, otológicas, gases, medicamentos de uso oral destinados a ação local no trato gastrointestinal, entre outras. Além disso, a bioisenção também pode ser aplicada para alteração de dosagens, desde que o medicamento em questão

apresente características específicas descritas na RDC nº37, publicada em 03 de agosto de 2011, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Na Instrução Normativa nº 04 de 3 de agosto de 2011, também publicada pela ANVISA, é possível observar uma lista de fármacos candidatos à bioisenção baseada no SCB, dentre eles pode-se citar como exemplos, o ácido acetilsalicílico, o cloridrato de propranolol, o fluconazol e o paracetamol. Além disso, essa publicação descreve detalhadamente as condições experimentais a serem seguidas para a comprovação da solubilidade do fármaco em questão:

“Art 9º Um fármaco será considerado altamente solúvel se sua maior dose administrada oralmente como uma formulação de liberação imediata (dose máxima por administração descrita em bula) solubiliza-se completamente em até 250 ml de cada uma das soluções tampão utilizadas dentro da faixa de pH fisiológico (1,2 a 6,8), a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.” (ANVISA, 2011^c)

Embora o SCB seja baseado nos parâmetros de solubilidade e permeabilidade de um fármaco, observa-se que na RDC nº37, publicada em 03 de agosto de 2011, os ensaios de solubilidade estão detalhadamente descritos, padronizados e são amplamente utilizados na prática, no entanto, para a determinação da permeabilidade, os critérios experimentais não estão estabelecidos. Nova norma técnica brasileira encontra-se em processo de aprovação sob consulta pública de número 1044, de oito de abril de 2021 e prevê critérios para ensaios de permeabilidade em células Caco-2.

A permeabilidade de uma substância pode ser determinada indiretamente, a partir da quantificação de sua concentração na corrente sanguínea, enquanto que sua determinação direta pode ser realizada a partir da quantificação da massa de substância transferida através da parede intestinal humana. Como alternativa ao uso de seres humanos para esse tipo de determinação, é possível utilizar modelos animais de perfusão intestinal *in vivo* ou *in situ*, métodos *ex vivo* que utilizam tecido intestinal humano ou animal ou ainda métodos *in vitro* como a cultura de células epiteliais (CDER/FDA, 2017).

Uma substância é considerada altamente permeável quando sua concentração plasmática atinge nível $\geq 85\%$ da dose administrada e um único método pode ser utilizado para essa determinação, quando (CDER/FDA, 2017):

- Sua biodisponibilidade absoluta é de 85% ou mais, ou;
- Quando 85% ou mais da dose administrada é excretada de forma inalterada na urina, ou;

- Quando 85% ou mais da dose administrada é identificada na urina na forma de metabólitos.

Se o método selecionado falhar na demonstração da permeabilidade, podem ser utilizados dois métodos diferentes e, se houver resultados conflituosos, os dados provenientes de estudos com seres humanos superam os obtidos de estudos com animais ou culturas celulares (CDER/FDA, 2017).

Conforme definição da ANVISA (2020), o termo biodisponibilidade:

“Indica a velocidade e a extensão de absorção de um princípio ativo em uma forma de dosagem, a partir de sua curva concentração/tempo na circulação sistêmica ou sua excreção na urina.” (ANVISA)

A biodisponibilidade absoluta é determinada a partir da comparação entre administração extravascular e intravascular de um medicamento, enquanto que, a biodisponibilidade relativa é aquela determinada a partir da comparação entre duas administrações extravasculares (SHARGEL *et al.*, 2016).

3.3 Ensaio de permeabilidade intestinal

3.3.1 Métodos in vitro

As culturas celulares contribuem de maneira expressiva para a compreensão de diversos mecanismos de absorção de fármacos ao longo do TGI e sua aplicação também tem despertado especial interesse para o estudo do mecanismo de doenças. A partir da utilização de marcadores, é possível estudar diferentes formas de transporte de substâncias, como o transcelular, paracelular e aqueles mediados por transportadores. Os métodos *in vitro* contribuíram de forma bastante significativa para a compreensão da fisiologia do TGI e atualmente há grande variedade de técnicas disponíveis para estudos envolvendo a mucosa intestinal (SCHOULTZ e KEITA, 2020).

A linhagem de células de adenocarcinoma de cólon humano, conhecida com Caco-2, tem sido bastante utilizada, uma vez que possui características morfológicas e bioquímicas bastante semelhantes ao intestino delgado e, ao atingir confluência, apresenta microvilosidades, expressa enzimas e proteínas transportadoras (ARAÚJO, 2021).

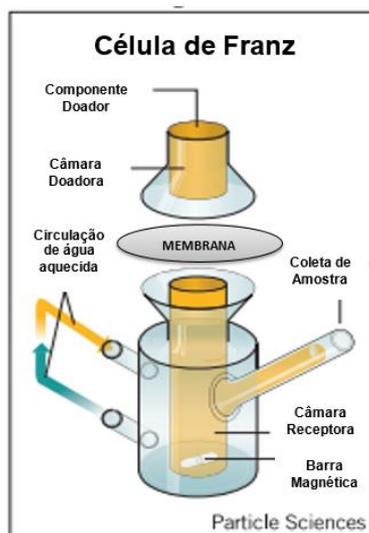
No entanto, esse modelo apresenta limitações, como por exemplo, menor quantidade de poros paracelulares e menor expressão de transportadores quando comparado ao intestino humano, além disso, no estudo de substâncias pouco solúveis, o uso de solventes, como o metanol e o polietilenoglicol, pode interferir na integridade das junções íntimas (YANG *et al.*, 2017).

Outra linhagem celular bastante utilizada nos ensaios de permeabilidade é a *Madin-Darby canine kidney cells* (MDCK). Quando comparada a Caco-2, pode diferir quanto a presença ou ausência de determinados transportadores ativos e na expressão de enzimas. As células MDCK apresentam elevada correlação de permeabilidade com as células Caco-2 (0,93), no entanto esse valor é menor quando a correlação é feita com a absorção em humanos (YANG *et al.*, 2017).

3.3.2 Células de difusão

Para a determinação da permeabilidade de substâncias através do intestino ou até mesmo da pele, pode ser empregado o método de difusão celular vertical que utiliza um aparato específico denominado *célula de Franz*, representado esquematicamente na Figura 1. O procedimento consiste na aplicação de um pequeno pedaço de pele humana, intestino humano/animal ou até mesmo uma membrana sintética entre duas câmaras de difusão vertical, dentre as quais uma será a doadora da substância em estudo e a outra será a receptora. O aparato *Side-By-Side* é um modelo horizontal de célula de difusão *in vitro*, no qual a câmara doadora e a receptora ficam lado a lado e um agitador magnético mantém o movimento das soluções em ambos compartimentos. (PARAISO, 2012).

Figura 1 Esquema de uma célula de Franz

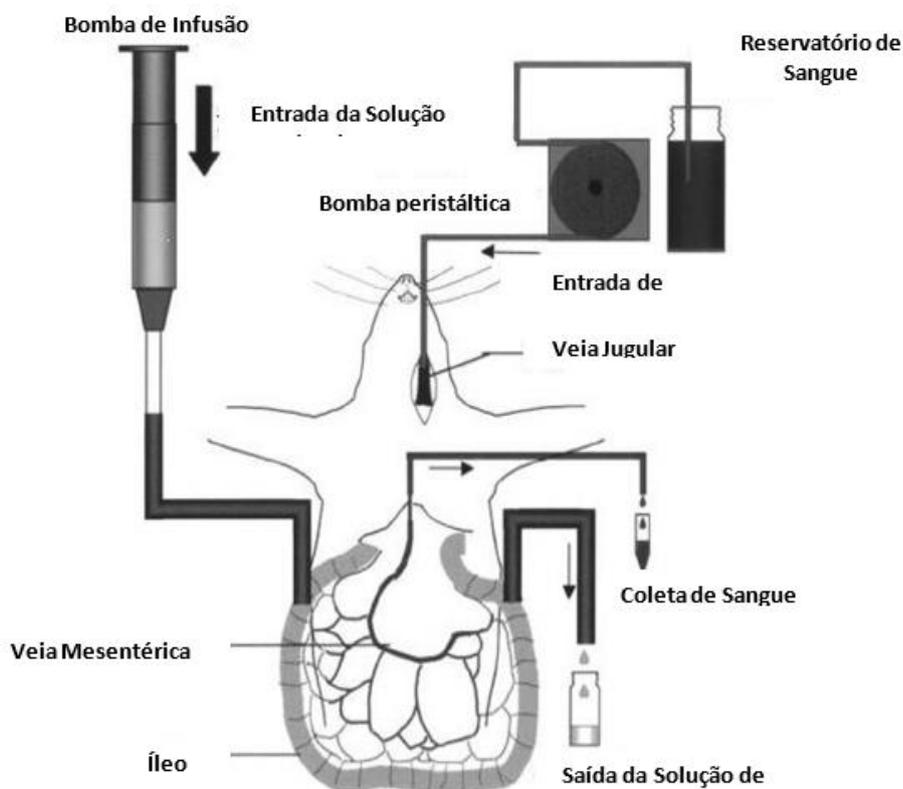


Fonte: (SCIENCES, 2009)

3.3.3 Perfusão intestinal *in situ*

A perfusão intestinal *in situ* é um modelo considerado promissor na determinação da permeabilidade intestinal de fármacos por apresentar bastante proximidade com as condições *in vivo*, tais como: suprimento sanguíneo e inervação preservados e até mesmo presença de enzimas ao longo do TGI. São utilizados animais de pequeno porte, tais como coelhos, ratos ou camundongos. O procedimento é realizado com o uso de anestesia que garanta completa ausência de reflexos dolorosos. Como ilustrado na Figura 3, é realizada uma incisão abdominal mediana para possibilitar a canulação da porção proximal e distal do intestino, possibilitando a circulação do fármaco em estudo ao longo de seu comprimento. O fluxo de fármaco é mantido por uma bomba peristáltica e a determinação da permeabilidade do fármaco é feita através de sua quantificação no fluido obtido no segmento distal (DEZANI, 2017; PRATAP SINGH *et al.*, 2012).

Figura 2 Perfusão intestinal *in situ* para avaliação da permeabilidade de fármacos e outras substâncias



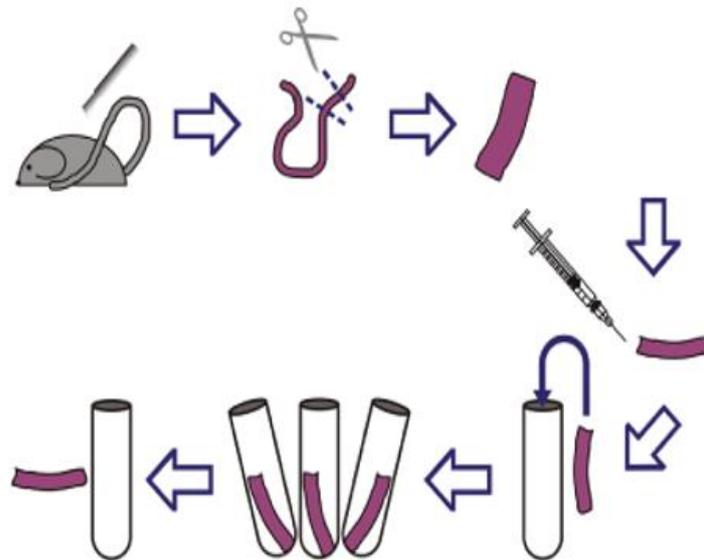
Fonte: Adaptado de PRATAP SINGH *et al.*, 2012.

3.3.4 Método do saco intestinal

O método do saco intestinal para avaliar a permeabilidade de substâncias ao longo do intestino delgado foi desenvolvido em 1954 por WILSON e WISEMAN. Devido à facilidade de manejo, baixo custo e certa semelhança anatômica com o corpo humano, geralmente são utilizados intestinos de roedores como ratos ou camundongos. A Figura 2 representa os passos desta técnica, na qual o órgão é dividido em segmentos de tamanhos determinados pelo pesquisador, os resíduos do conteúdo intestinal são retirados por meio de lavagem com solução de soro fisiológico ou tampão específico, uma das extremidades do segmento é fechada com o auxílio de um fio de algodão, formando assim um saco intestinal que é preenchido com a substância de interesse. Posteriormente, a outra extremidade é fechada e o saco intestinal é submerso em um tampão que mimetiza os fluidos corporais, considerando aspectos como pH, temperatura e oxigenação. Com a aplicação dessa técnica, é possível determinar a permeabilidade direta de uma substância, a partir de sua

quantificação no meio externo no qual o saco intestinal fica submerso (QUEVEDO; NIETO; BRIÑÓN, 2011; SILVA, 2014).

Figura 3 Esquema de procedimento experimental do método de avaliação da permeabilidade por meio de saco intestinal de rato ou camundongo



Fonte: adaptado de (GREMIÃO *et al.*, 2010)

Existem variações na execução da técnica, como por exemplo a inversão do saco intestinal, a submersão do intestino ou dos segmentos em banhos de gelo. E além disso, a delimitação das porções do duodeno, jejuno e íleo difere entre os autores.

3.4 Propriedades da estrutura intestinal de humanos e ratos

Grande parte da digestão e absorção de nutrientes se dá no intestino delgado, pois este órgão apresenta amplo comprimento e superfície de contato ainda maior devido a presença de pregas circulares, vilosidades e microvilosidades (TORTORA; DERRICKSON, 2010).

Anatomicamente, o intestino delgado é dividido em três porções denominadas: duodeno, jejuno e íleo. Em humanos, o duodeno tem cerca de 25 cm de comprimento, o jejuno 1m e o íleo 2m, esta última correspondendo a maior porção deste órgão (TORTORA; DERRICKSON, 2010).

A superfície epitelial localizada no lúmen do intestino delgado é denominada “superfície apical” e a superfície que está em contato com os vasos sanguíneos é denominada “superfície basolateral” (AVDEEF, 2003). O epitélio intestinal corresponde a um dos principais sítios de absorção e metabolismo de substâncias endógenas e xenobióticos, incluindo os fármacos. Apresenta diversos transportadores em sua estrutura que controlam a absorção, distribuição e eliminação dos fármacos (BUXTON, 2017).

O transporte de substâncias através da membrana plasmática apresenta mecanismos diversos. Quando esse transporte acontece a favor do gradiente eletroquímico dos solutos, não há exigência de suprimento de energia e se dá por difusão passiva ou difusão facilitada (mediada por um transportador) (TORTORA; DERRICKSON, 2010). São reconhecidas duas rotas principais da difusão passiva: a transcelular (o soluto atravessa a membrana plasmática da célula) e paracelular (a passagem do soluto se dá através do espaço entre as células) (AVDEEF, 2003)

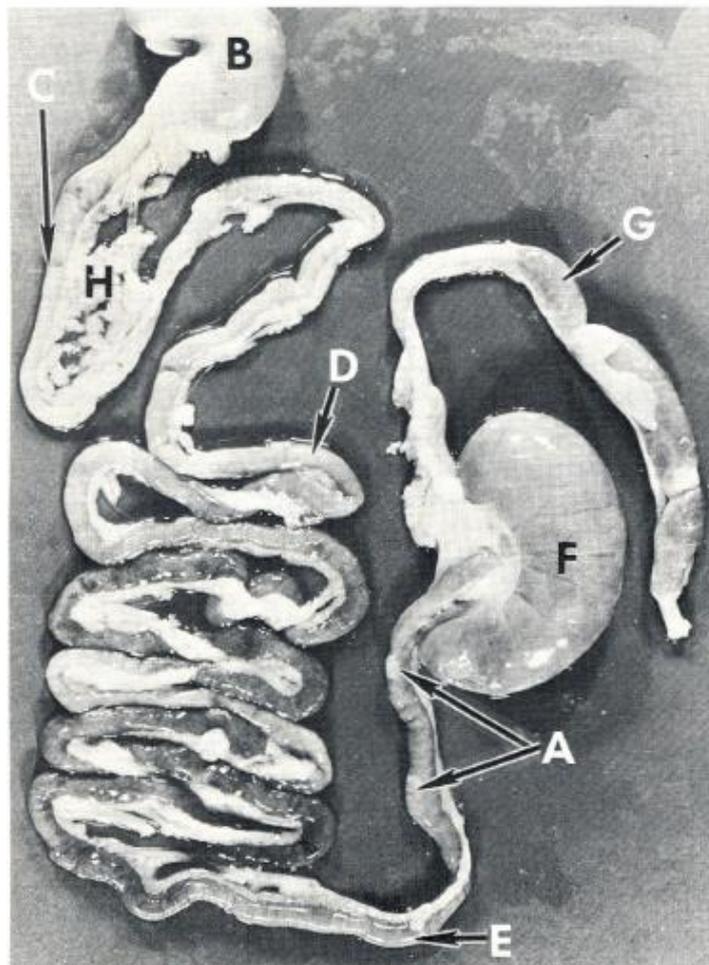
O transporte ativo de substâncias acontece contra o gradiente eletroquímico dos solutos e exige suprimento de energia (TORTORA; DERRICKSON, 2010). O transporte ativo primário é mediado por transportadores. Duas grandes superfamílias de genes desempenham papel crítico no transporte de fármacos através da membrana plasmática, a superfamília *solute carrier* (SLC), que realiza a captação e expulsão dos fármacos do tecido e a superfamília *ATP binding cassette* (ABC) que realiza apenas o efluxo unidirecional. É importante ressaltar que o transporte de substâncias mediado por transportadores é saturável e seletivo para determinados substratos (BUXTON, 2017).

A glicoproteína-P (P-gp) pertence à superfamília ABC e é expressa no intestino, fígado, rins e cérebro. A P-gp apresenta papel importante nos processos de absorção, distribuição e eliminação de fármacos (WROBLEWSKA *et al.*, 2016). São exemplos de substratos da P-gp: digoxina, loperamida, quinidina e losartana (CDER/FDA, 2016; YERASI; VURIMINDI; DEVARAKONDA, 2015)

No transporte ativo secundário, o transporte de um soluto contra seu gradiente eletroquímico é energeticamente impulsionado pelo transporte de outro soluto. Quando os solutos se movem para mesma direção, denomina-se simporte. Quando os solutos se movem em direções opostas, é designado antiporte ou contra-transporte (BUXTON, 2017).

O amplo uso de ratos da espécie *Rattus norvegicus* nas pesquisas científicas é justificado pelas semelhanças anatômicas, fisiológicas e genéticas com os seres humanos, no entanto em relação ao intestino delgado de ratos, observa-se que, diferente da anatomia humana, o jejuno corresponde à maior porção do órgão, como observado na Figura 4. Ao longo da região final do jejuno e íleo é possível visualizar estruturas circulares e esbranquiçadas externa e internamente denominadas pontos ou placas de Peyers (BAKER; LINDSEY; WEISBROTH, 1980).

Figura 4 Anatomia do trato gastrointestinal de ratos



(A) pontos Peyers (B) Estômago (C) Duodeno (D) Jejuno (E) Íleo (F) Ceco (G) Cólon (H) Pâncreas.

Fonte: (BAKER; LINDSEY; WEISBROTH, 1980)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fármacos

- Famotidina – Fabricante: Suleshvari Pharma / Lote: 11/FMD/088
- Losartana – Fabricante: Medley / Lote: 0500003271
- Naproxeno – Fabricante: Sigma-Aldrich / Lote: 041M1171V
- Verapamil – Fabricante: EMS – Lote: M527214

Os fármacos losartana e verapamil foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Desenvolvimento e Inovação Farmacotécnica do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

A losartana foi selecionada como fármaco modelo substrato da glicoproteína P. O naproxeno como marcador de alta permeabilidade. A famotidina, marcador de baixa permeabilidade e o verapamil, como inibidor da glicoproteína P (CDER/FDA, 2016, 2017).

4.2 Reagentes, solventes e soluções

Para o desenvolvimento do presente estudo foram utilizados os seguintes reagentes e solventes:

- Acetonitrila de pureza cromatográfica - Merck
- Ácido acético glacial - Merck
- Ácido Clorídrico 0,1M
- Água purificada obtida em equipamento de osmose reversa
- Água ultrapura obtida em equipamento Milli-Q®
- Bicarbonato de sódio P.A. - Synth
- Cetamina 116mg/mL - Ceva
- Cloreto de cálcio P.A. - Synth
- Cloreto de potássio P.A. - Synth
- Cloreto de sódio P.A. - Synth
- Fosfato de potássio monobásico P.A. - Synth
- Fosfato de sódio dibásico P.A. - Synth
- Gás carbogênio (95% oxigênio + 5% gás carbônico) - Oxilumen
- Glicose P.A. - Merck

- Hidróxido de Sódio 0,1M
- Kit comercial Glicose Liquiform, referência 133, Labtest
- Metanol de pureza cromatográfica – J.T. Baker
- NaCl 0,9% (soro fisiológico)
- Sulfato de magnésio P.A. - Synth
- Xilazina 23mg/mL – Ceva

4.2.1 Preparo do tampão Krebs

Todos os componentes foram pesados em balança analítica nas quantidades descritas no Quadro 1.

Quadro 1 Composição do tampão Krebs

Componente	Concentração
Bicarbonato de Sódio (NaHCO ₃)	2,1g/L
Cloreto de Sódio (NaCl)	6,9g/L
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂)	0,373g/L
Cloreto de Potássio (KCl)	0,35g/L
Fosfato de Potássio Monobásico (KH ₂ PO ₄)	0,16g/L
Glicose	2,0g/L
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄)	0,141g/L

Fonte: QUEVEDO; NIETO; BRINÓN, 2011

Primeiramente foram solubilizados em água ultrapura, sob agitação constante em agitador magnético, os seguintes componentes: cloreto de sódio, cloreto de potássio, sulfato de magnésio, fosfato de potássio monobásico e glicose. Após completa solubilização, acrescentou-se o cloreto de cálcio e por fim, o bicarbonato de sódio.

O pH da solução foi ajustado para 7,4 e, quando necessário, foram utilizadas soluções de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1M ou ácido clorídrico (HCl) 0,1M.

A solução foi transferida para um balão volumétrico de 1L e, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, o volume foi completado com água ultrapura.

4.2.2 Preparo das soluções de fármacos

As soluções dos fármacos utilizadas nos experimentos de permeabilidade foram preparadas diariamente seguindo as massas e volumes descritos nos Quadros 2 e 3. As concentrações de trabalho foram determinadas a partir do cálculo da *Highest Drug Strenght*, que se refere a dose terapêutica do fármaco dissolvida em 250mL de água, multiplicado por 10% (fator de ajuste para estudos de permeabilidade intestinal). Por exemplo: dose terapêutica de losartana (40mg), dissolvidas em 250mL de água resulta na concentração de 0,16mg/mL, multiplicado por 10% é igual a 16 µg/mL. Com exceção da concentração de verapamil, que foi baseada na publicação de (INCECAYIR; TSUME; AMIDON, 2013).

Quadro 2 Preparo das soluções concentradas de fármacos

Fármaco	Massa	Volume Final	Solução concentrada	Considerações do preparo:
Famotidina	12,5mg	25mL de água ultrapura	500 µg/mL	Agitou-se durante dois minutos em vórtex e manteve-se durante uma hora em banho de ultrassom.
Losartana	12,5mg	25mL de tampão Krebs	500 µg/mL	A losartana dissolve-se facilmente em TK.
Naproxeno	20,0mg	25mL de tampão Krebs	800 µg/mL	Agitou-se durante dois minutos em vórtex e manteve-se durante 30 minutos em banho de ultrassom.
Verapamil	50,0mg	5mL de metanol	10 mg/mL	Foram necessárias as seguintes diluições para reduzir a concentração de metanol: 1ª 1mL solução 10mg/mL + 1mL de água = solução a 5mg/mL. 2ª 1mL solução 5mg/mL + 1mL de água = solução a 2,5mg/mL. 3ª 1mL solução 2,5mg/mL + 1mL de água = solução a 1,25mg/mL

Fonte: autoria própria

Quadro 3 Preparo de solução de fármacos utilizados nos ensaios de permeabilidade

Fármaco	Volume de solução concentrada	Concentração Final
Famotidina 500 µg/mL	0,8mL	16 µg/mL
Losartana 500 µg/mL	2,0mL	40 µg/mL
Naproxeno 800 µg/mL	6,25mL	200 µg/mL
Verapamil* 1,25mg/mL	0,9mL	45 µg/mL
Tampão Krebs	Quantidade suficiente para 25mL (em balão volumétrico)	

*Adicionado aos experimentos com a variável “com inibidor da P-gp”.

Fonte: autoria própria.

Para a realização dos ensaios de permeabilidade foram preparados 25 mL de solução de fármacos diluídos em tampão Krebs, o suficiente para preencher todos os sacos intestinais nos experimentos sem inversão. Nos experimentos com inversão do saco intestinal, foi preparado o dobro de solução.

4.3 Equipamentos e materiais

- Agitador Magnético e Barra Magnética – Nova Ética
- Amostrador Automático SIL-10AD - Shimadzu
- Balança analítica Ax200 - Shimadzu
- Balança semi-analítica
- Banho Maria – Nova Ética
- Bomba de vácuo isenta de óleo R-TE-0582 – Tecnal
- Bomba de dois canais LC-10AD – Shimadzu
- Bomba de um canal LC-10AT - Shimadzu
- Coluna Agilent Zorbax® Eclipse XDB – C18, 5 µm, de fase reversa: 150x4,6mm
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu – LC10
- Desgaseficador DGU-14A - Shimadzu

- Detector UV SPD-M10A - Shimadzu
- Forno de Coluna CTO-10^a – Shimadzu
- Integrador SCL-10A - Shimadzu
- Lavadora ultrassônica – Unique
- Micropipeta monocal de 10-100µL - Transferpette[®]
- Micropipeta monocal de 100-1000µL - Transferpette[®]
- Micropipeta monocal de 0,5 – 5mL - Transferpette[®]
- PHmetro digital PG200 - Gehaka
- Software HPLC Class VP

Os materiais utilizados foram: espátula, vidros de relógio, provetas, seringa descartáveis de diferentes volumes, agulhas descartáveis, esparadrapo, balões volumétricos de diferentes volumes, membrana de celulose 22µm (Millipore[®]), sistema de filtração à vácuo, béquero de diferentes volumes, funil de vidro, bagueta, frascos de vidro âmbar, etiquetas, tubos de ensaio, estante para tubos de ensaio, ponteiros descartáveis, vials, materiais cirúrgicos (pinças e tesouras), gaze, linha de algodão.

4.4 Condições cromatográficas dos métodos para quantificação de famotidina, losartana e naproxeno em tampão Krebs

Os métodos de quantificação de fármacos foram desenvolvidos e validados utilizando-se o tampão Krebs como diluente, uma vez que todos os experimentos foram realizados com esse meio de incubação.

A famotidina, que apresenta baixa permeabilidade e solubilidade, (CDER/FDA, 2017), foi selecionada para avaliar a integridade do tecido, dado que seu transporte se dá por via paracelular (HAKKER *et al.*, 1999).

A losartana foi utilizada por ser substrato da P-gp e, por fim, o naproxeno foi empregado como marcador de alta permeabilidade, pois é transportado através da membrana plasmática por difusão passiva (CDER/FDA, 2017; WROBLEWSKA *et al.*, 2016).

As condições cromatográficas para a quantificação dos fármacos de estudo constam no Quadro 4.

Quadro 4 Condições cromatográficas para quantificação dos fármacos em tampão Krebs

Fármaco	<i>Famotidina</i>	<i>Losartana e Naproxeno</i>
Coluna	C18, 150x4,6mm, 5µm	C18, 150x4,6mm, 5µm
Temperatura	22 a 25°C	22 a 25°C
Fluxo	1,0 mL/min	1,0 mL/min
Volume de injeção	80µL	80µL
Comprimento de onda	267nm	205nm (de 0 até 3 min e 59 seg) 273nm (de 4 até 6,5 min)
Tempo de corrida	4,5 min	6,5 min
Método baseado na publicação de:	(ZARGHI <i>et al.</i> , 2005)	(VELDANDI <i>et al.</i> , 2010, ZAKERI-MILANI <i>et al.</i> , 2005)

Fonte: autoria própria

As fases móveis de cada um dos métodos constam no Quadro 5:

Quadro 5 Fases móveis dos métodos cromatográficos desenvolvidos

Fármaco	Fase Móvel		
Famotidina	Acetonitrila 15%	Fosfato de sódio dibásico 0,03M (pH 6,5) 85%	-
Losartana e Naproxeno	Acetonitrila 10%	Solução ácida pH 3,0 32%	Metanol 58%

Fonte: autoria própria

Para o preparo da solução de fosfato de sódio dibásico 0,03M foram pesados 4,26g de fosfato de sódio dibásico em balança analítica. O sal foi dissolvido em cerca de 900 mL de água ultrapura sob agitação constante em agitador magnético. Quando necessário, foram utilizadas soluções de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1M ou ácido clorídrico (HCl) 0,1M para ajuste de pH a 6,5, utilizando-se um pHmetro. A solução foi transferida para balão volumétrico de 1L e o seu volume final ajustado com água ultrapura com o auxílio de uma pipeta de Pasteur.

A solução ácida foi preparada em capela de segurança e, com o auxílio de uma pipeta graduada de vidro, adicionou-se ácido acético glacial a cerca de 900mL de água ultrapura contida em um béquer, sob agitação constante até atingir valor de pH igual a 3,0. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 1L e o menisco foi ajustado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. A solução foi homogeneizada.

Essas soluções foram filtradas em sistema à vácuo com membrana Durapore® PVDF, hidrofílica, 0,22µm.

4.5 Validação dos métodos cromatográficos para quantificação de famotidina, losartana e naproxeno em tampão Krebs

O procedimento de validação dos métodos analíticos seguiu as instruções contidas na RDC 166/2017 e RDC 899/2003, que traz especificações para métodos bioanalíticos.

4.5.1 Linearidade: solução de fármacos em tampão Krebs

Para a determinação da linearidade dos métodos de quantificação da famotidina, losartana e naproxeno foram desenvolvidas curvas com as seguintes concentrações: 1, 5, 10, 25 e 50 µg/mL.

O preparo das soluções concentradas está descrito no Quadro 2.

Uma vez que as soluções utilizadas nos experimentos de permeabilidade apresentam concentrações extremamente baixas, foi necessário diluir as soluções concentradas para 100 µg/mL, utilizando o tampão Krebs como solvente, conforme Quadro 6.

Quadro 6 Diluição das soluções concentradas de fármacos

Fármaco	Volume de solução concentrada	Volume de tampão Krebs	Volume Final	Concentração Final
Naproxeno 800 µg/mL	0,625 mL	4,375 mL	5,0 mL	100 µg/mL
Losartana 500 µg/mL	1,0 mL	4,0 mL	5,0 mL	100 µg/mL
Famotidina 500 µg/mL	1,0 mL	4,0 mL	5,0 mL	100 µg/mL

Fonte: autoria própria

Deste modo foi possível prosseguir com as diluições da curva de calibração de acordo com os Quadros 7 e 8.

Quadro 7 Preparo da curva de calibração: losartana e naproxeno

Fármaco	Concentrações das amostras padrão da curva de calibração				
	1,0 µg/mL	5,0 µg/mL	10,0 µg/mL	25,0 µg/mL	50,0 µg/mL
Losartana 100 µg/mL	10 µL	50 µL	100 µL	250 µL	500 µL
Naproxeno 100 µg/mL	10 µL	50 µL	100 µL	250 µL	500 µL
Volume de TK	980 µL	900 µL	800 µL	500 µL	0

Fonte: autoria própria

Quadro 8 Preparo da curva de calibração: famotidina

	Concentrações das amostras padrão da curva de calibração				
Fármaco	1,0 µg/mL	5,0 µg/mL	10,0 µg/mL	25,0 µg/mL	50,0 µg/mL
Famotidina 100 µg/MI	10 µL	50 µL	100 µL	250 µL	500 µL
Volume de TK	990 µL	950 µL	900 µL	750 µL	500 µL

Fonte: autoria própria

As diluições foram realizadas em vials, utilizando pipetas volumétricas com volumes variáveis (10 a 100µL, 100 a 1000 µL e 0,5 a 5mL). Para completa homogeneização, foi utilizado vórtex durante cinco segundos em cada vial.

Todas as amostras padrão foram preparadas em triplicatas.

4.5.2 Precisão e exatidão: solução de fármacos em tampão Krebs

Na determinação da precisão e exatidão do método cromatográfico para quantificação de naproxeno, foram utilizadas amostras de controle de qualidade em três diferentes concentrações: alta (500 µg/mL), média (250 µg/mL) e baixa (40 µg/mL) e foram preparadas três replicatas de cada concentração. Foram avaliadas a precisão e a exatidão do método a partir de análises realizadas no mesmo dia (intradia) e em três dias diferentes (interdias). As concentrações definidas para os fármacos losartana e famotidina foram: alta (60 µg/mL), média (30 µg/mL) e baixa (3 µg/mL).

A precisão foi calculada a partir da Equação 1.

Equação 1: Cálculo do desvio padrão relativo - precisão

$$DPR (\%) = \frac{DP}{CME} \times 100$$

Onde: DPR (%): Desvio padrão relativo em porcentagem

DP: Desvio padrão

CME: concentração média experimental

O valor do DPR deve ser menor ou igual a 15% (RDC 27/2012).

A exatidão foi calculada a partir da Equação 2.

Equação 2: Determinação da exatidão

$$Exatidão (\%) = \frac{CME}{CN} \times 100$$

Onde: CME: Concentração média experimental

CN: Concentração nominal

O cálculo da exatidão deve apresentar valor correspondente a 100% ± 20% (RDC 27/2012).

4.5.3 Limites de detecção e quantificação: solução de fármacos em tampão Krebs

O limite de detecção refere-se à menor quantidade de analito que pode ser detectada em uma amostra, mas não necessariamente quantificado. Em relação ao limite de quantificação, este compreende a menor quantidade de analito presente em uma amostra capaz de ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2017).

Para se estabelecer os limites de detecção e quantificação foram realizadas diluições seriadas dos fármacos de estudo, em triplicatas, até que a razão sinal/ruído fosse maior ou igual a 2:1 (para o limite de detecção) e de 10:1 (para o limite de quantificação) (BRASIL^d, 2017).

4.5.4 Estabilidade de curta e longa duração das amostras de fármacos em tampão Krebs

Foram preparadas triplicatas de amostras de controle de qualidade de famotidina, losartana e naproxeno em concentrações altas, médias e baixas. Para determinação da estabilidade de curta duração, as amostras de controle de qualidade foram analisadas imediatamente após seu preparo e então mantidas em temperatura ambiente (24°C), protegidas da luz, por um período de 24h. Após esse período as amostras foram analisadas novamente.

Dada a possibilidade de armazenar as amostras para análises posteriores, foi realizado um teste de estabilidade de longa duração, no qual as amostras de controle de qualidade foram analisadas imediatamente após o seu preparo e então submetidas a congelamento lento em freezer convencional a -8 °C, por 30 dias. Após esse período, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente, homogeneizadas em vórtex durante dois segundos e analisadas novamente.

4.5.5 Estabilidade de fármacos solubilizados em tampão Krebs após ciclos de congelamento e descongelamento

Para determinação da estabilidade das amostras submetidas a ciclos de congelamento e descongelamento, foram preparadas triplicatas de amostras de controle de qualidade de famotidina, losartana e naproxeno em concentrações altas, médias e baixas. As amostras de controle de qualidade foram analisadas imediatamente após o preparo e, em seguida submetidas a congelamento lento em freezer convencional a -8 °C, por pelo menos 12h.

Após 24h, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente durante cerca de 30 minutos, homogeneizadas em vórtex durante dois segundos e analisadas novamente.

Repetiu-se esse ciclo por três vezes.

4.5.6 Seletividade dos métodos cromatográficos para quantificação dos fármacos de estudo

De acordo com o capítulo IV, seção I, art. 19 da RDC 166/2017:

“A seletividade do método analítico deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz”

Para verificar se os componentes do tampão Krebs eram capazes de interferir na quantificação dos fármacos empregados no presente estudo, foram realizadas análises dessa solução, seguindo as condições cromatográficas de cada um dos métodos desenvolvidos.

Além disso, dada a utilização de material biológico e a possível interferência de fragmentos e conteúdos intestinais na quantificação de fármacos, foi realizado um ensaio de permeabilidade (denominado BRANCO), no qual não se usou nenhum

fármaco e as amostras de tampão Krebs coletadas ao longo do experimento foram analisadas conforme os métodos cromatográficos desenvolvidos.

4.6 Quantificação de glicose em tampão Krebs por método espectrofotométrico

A quantificação da glicose foi realizada por método espectrofotométrico enzimático de ponto final utilizando-se o kit comercial Glicose Liquiform, referência 133 da marca Labtest.

Para realização dos testes foram seguidas as instruções fornecidas pelo fabricante (Labtest). Primeiramente foram pipetados os volumes descritos no Quadro 8 em tubos de ensaio devidamente identificados.

Quadro 9 Volumes de amostras, padrão calibrador e reagente para quantificação de glicose em tampão Krebs

	Branco	Padrão	Teste
Amostra	-	-	100µL
Padrão calibrador 1mg/mL	-	100µL	-
Reagente 1*	1,0mL	1,0mL	1,0mL

* tampão fosfato 30 mmol/L, pH 7,5; fenol 1 mmol/L; glicose oxidase 12500 U/L; peroxidase 800 U/L; 4-aminoantipirina 290 mol/L; azida sódica 7,5 mmol/L e surfactantes
Fonte: (LABTEST, 2011)

Após pipetar os volumes supracitados, os tubos de ensaio foram homogeneizados vigorosamente utilizando vórtex e incubados a 37 °C durante 10 minutos em banho-maria.

As absorbâncias das amostras foram determinadas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 505nm. O zero foi definido a partir da leitura do reagente 1 (branco).

4.7 Validação do método espectrofotométrico para quantificação de glicose em tampão Krebs

Para proceder a validação do método espectrofotométrico para quantificação de glicose em tampão Krebs foram seguidos os testes e parâmetros descritos na RDC 166/2017.

4.7.1 Linearidade: solução de glicose em tampão Krebs

Para determinar a linearidade do método, foram preparadas triplicatas de soluções de glicose em tampão Krebs (preparado previamente sem adição de glicose) com as seguintes concentrações: 500, 1000, 1500, 2000 e 2500 µg/mL.

Pesaram-se 75,0 mg de glicose e dissolveram-se em 25 mL de tampão Krebs (sem glicose), o que resultou em solução com concentração igual a 3000 µg/mL.

Para atingir as concentrações definidas para a curva de calibração, foram realizadas as diluições descritas no Quadro 9.

Quadro 10 Diluições da solução de glicose em tampão Krebs para se determinar a linearidade

Volume de solução concentrada (3000 µg/mL)	Volume de tampão Krebs	Concentração Final
500 µL	2500 µL	500 µg/mL
1000 µL	2000 µL	1000 µg/mL
1500 µL	1500 µL	1500 µg/mL
2000 µL	1000 µL	2000 µg/mL
2500 µL	500 µL	2500 µg/mL

Fonte: autoria própria

As soluções foram preparadas em tubos de ensaio com o auxílio de pipetas volumétricas com volumes variáveis (10 a 100µL, 100 a 1000 µL e 0,5 a 5mL). Para completa homogeneização, foi utilizado vórtex durante cinco segundos em cada tubo de ensaio.

4.7.2 Precisão e exatidão: solução de glicose em tampão Krebs

Para determinar a precisão e exatidão, foram selecionadas três diferentes concentrações: alta (1200 µg/mL), média (800 µg/mL) e baixa (400 µg/mL).

Foram analisadas três replicatas de cada concentração em três dias diferentes para se determinar a precisão e exatidão interdia e, foram analisadas três replicatas de cada concentração em um mesmo dia, para se determinar a precisão e exatidão intradia.

Os cálculos estão apresentados no item 4.5.2 deste trabalho.

4.7.3 Limites de detecção e quantificação: solução de glicose em tampão Krebs

O limite de detecção foi determinado a partir da equação 3:

Equação 3: Cálculo do limite de detecção

$$LD = \frac{3 \times \sigma}{IC}$$

Onde:

σ = desvio padrão do intercepto com o eixo Y de três curvas de calibração.

IC = Inclinação da curva de calibração (BRASIL^f, 2012).

Para determinação do limite de quantificação, foram realizadas diluições seriadas e em triplicatas da solução de glicose em tampão Krebs até que o desvio padrão relativo atingisse valor superior a 20% (BRASIL^f, 2012).

4.7.4 Estabilidade de curta e longa duração das amostras de glicose em tampão Krebs

Prepararam-se triplicatas de amostras de soluções de glicose nas concentrações de 1200, 800 e 400 µg/mL. Para se determinar a estabilidade de curta duração analisaram-se as soluções imediatamente após seu preparo e então as mesmas foram mantidas em temperatura ambiente (24°C), protegidas da luz, por um período de 24h. Após esse período as amostras foram analisadas novamente.

A fim de se estabelecer a estabilidade de longa duração, as amostras foram analisadas imediatamente após o seu preparo e então submetidas a congelamento lento em freezer convencional a -8 °C, por 30 dias.

Após 30 dias, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente, homogeneizadas em vórtex durante dois segundos e então analisadas novamente.

4.7.5 Estabilidade das amostras de glicose em tampão Krebs após ciclos de congelamento e descongelamento

Para determinação da estabilidade das amostras submetidas a ciclos de congelamento e descongelamento, foram preparadas triplicatas de amostras de glicose nas concentrações de 1200, 800 e 400 µg/mL. As amostras foram analisadas imediatamente após o preparo e, em seguida submetidas a congelamento lento em freezer convencional a -8 °C, por pelo menos 12h.

Após 24h, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente durante 30 minutos, homogeneizadas em vórtex durante dois segundos e então analisadas novamente.

Repetiu-se esse ciclo por três vezes.

4.7.6 Seletividade do método espectrofotométrico para quantificação de glicose em tampão Krebs

Para verificar possível interferência dos fármacos na quantificação de glicose, primeiramente foi analisado o tampão Krebs sem nenhum fármaco (Branco) e este foi comparado com a solução de trabalho contendo famotidina, losartana, naproxeno e verapamil.

Uma vez que a glicose é ativamente transportada nos enterócitos e é essencial para a viabilidade do tecido, não foi possível estabelecer possível interferência da presença de resíduos biológicos nas amostras coletadas no ensaio de permeabilidade denominado BRANCO, no qual não se usou nenhum fármaco.

4.8 Aspectos éticos na utilização dos animais

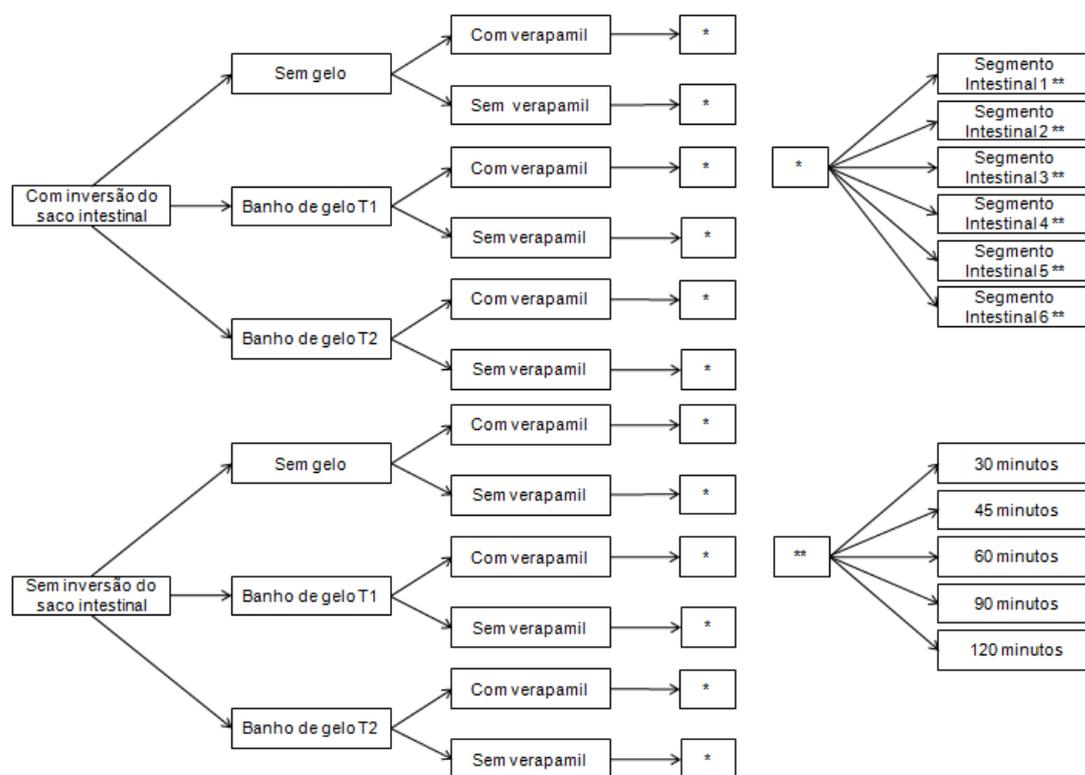
O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade de São Paulo (USP) com número de registro 109.2018-P574 (Anexo). Foram utilizados 33 *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, machos, jovens adultos, com peso entre 200 g e 300 g.

Os animais foram adquiridos mensalmente no Biotério de Produção de Ratos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, conforme o número de experimentos realizados no mês. Ficaram em caixas contendo maravalha, sem necessidade de isolamento, com livre acesso a água potável e ração comercial esterilizada pelo método de radiação Gama. Os animais permaneceram no Biotério de Produção e Experimentação da FCF e Instituto de Química (IQ) USP, em ambiente climatizado a 22 ± 2 °C, umidade relativa de $55 \pm 10\%$ e ciclo sono-vigília controlado através de luzes que ficavam acesas por 12h e apagadas por 12h (NEVES; FILHO; WENZEL DE MENEZES, 2013).

4.9 Planejamento estatístico

O delineamento experimental foi realizado a partir do planejamento fatorial multinível como ilustrado na Figura 5. Os experimentos foram executados em triplicatas e os resultados analisados por análise de variância (ANOVA), seguida de pós-teste de Tukey.

Figura 5 Planejamento fatorial multinível para avaliação da influência das condições experimentais no resultado de estudos de permeabilidade em saco intestinal de rato.



Fonte: autoria própria.

De acordo com o Quadro 11, foram considerados os seguintes fatores e níveis para a construção do planejamento fatorial:

Quadro 11 Fatores e níveis utilizados para a construção do planejamento fatorial

Fatores	Níveis
1. Inversão do saco intestinal	Com ou sem (dois níveis)
2. Banho de gelo	Sem gelo, banho de gelo imediatamente após a retirada do intestino ou banho de gelo durante o preparo dos segmentos (três níveis)
3. Inibidor da glicoproteína-P - Verapamil	Com ou sem (dois níveis)
4. Segmentos intestinais	S1, S2, S3, S4, S5 ou S6 (seis níveis)
5. Tempo de experimento	30, 45, 60, 90 ou 120 minutos (cinco níveis)

Fonte: autoria própria.

É importante ressaltar que em cada rato, foram obtidos seis segmentos intestinais de intestino delgado.

Os resultados da permeabilidade aparente da losartana na presença ou ausência de inibidor de Pg-P foram comparados entre as condições experimentais propostas e expressos em média \pm desvio padrão. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Tendo em vista a complexidade do procedimento experimental, foram utilizados quatro animais para treinamento da técnica cirúrgica.

Todas as condições experimentais analisadas estão detalhadas no Quadro 12.

Quadro 12 Resumo das condições experimentais testadas no ensaio de permeabilidade (*continua*)

Inversão do saco intestinal	Banho de Gelo	Inibidor da glicoproteína P	Segmentos intestinais	Tempo	Nº de animais
Com inversão	Sem gelo	Com verapamil	S1, S2, S3, S4, S5 e S6	30, 45, 60, 90 e 120 minutos	3
Com inversão	Sem gelo	Sem verapamil	S1, S2, S3, S4, S5 e S6	30, 45, 60, 90 e 120 minutos	3
Com inversão	Banho de gelo T1	Com verapamil	S1, S2, S3, S4, S5 e S6	30, 45, 60, 90 e 120 minutos	3
Com inversão	Banho de gelo T1	Sem verapamil	S1, S2, S3, S4, S5 e S6	30, 45, 60, 90 e 120 minutos	3
Com inversão	Banho de gelo T2	Com verapamil	S1, S2, S3, S4, S5 e S6	30, 45, 60, 90 e 120 minutos	3
Com inversão	Banho de gelo T2	Sem verapamil	S1, S2, S3, S4, S5 e S6	30, 45, 60, 90 e 120 minutos	3
Sem inversão	Sem gelo	Com verapamil	S1, S2, S3, S4, S5 e S6	30, 45, 60, 90 e 120 minutos	3
Sem inversão	Sem gelo	Sem verapamil	S1, S2, S3, S4, S5 e S6	30, 45, 60, 90 e 120 minutos	3
Sem inversão	Banho de gelo T1	Com verapamil	S1, S2, S3, S4, S5 e S6	30, 45, 60, 90 e 120 minutos	3
Sem inversão	Banho de gelo T1	Sem verapamil	S1, S2, S3, S4, S5 e S6	30, 45, 60, 90 e 120 minutos	3

Quadro 12 Resumo das condições experimentais testadas no ensaio de permeabilidade (*conclusão*)

Inversão do saco intestinal	Banho de Gelo	Inibidor da glicoproteína P	Segmentos intestinais	Tempo	Nº de animais
Sem inversão	Banho de gelo T2	Com verapamil	S1, S2, S3, S4, S5 e S6	30, 45, 60, 90 e 120 minutos	3
Sem inversão	Banho de gelo T2	Sem verapamil	S1, S2, S3, S4, S5 e S6	30, 45, 60, 90 e 120 minutos	3
			Total de experimentos:		36
			Animais para treinamento:		4
			Total de animais:		40

Fonte: autoria própria.

4.10 Ensaio de permeabilidade intestinal

Nos dias dos experimentos os animais foram deixados em jejum (com livre acesso a água) durante quatro horas. Ainda no Biotério de Produção e Experimentação da FCF/IQ - USP, cada rato foi pesado em balança semi-analítica e recebeu anestesia com xilazina (10mg/kg) e cetamina (100mg/kg) por via intraperitoneal, no quadrante inferior direito do abdome, utilizando seringa descartável de 1mL e agulha no calibre de 20 x 5,5mm. (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2016). A anestesia nesse momento foi essencial para evitar o estresse resultante do transporte do animal até o Laboratório de Permeabilidade e Biodisponibilidade (LPB), localizado no bloco 15 da FCF/USP onde foram realizados os experimentos. No LPB foi certificada a ausência de reflexos sensoriais e dolorosos através da avaliação de sinais como reflexo caudal e palpebral. Durante todo o procedimento cirúrgico certificou-se a ausência de reflexos dolorosos. Quando necessário, realizou-se suplementação anestésica com 10% da dose de xilazina e cetamina. Com vista no bem-estar animal, é importante ressaltar que foi realizado apenas um experimento por vez e que, durante o mesmo, não houve outros animais no laboratório. Estes permaneceram no Biotério da FCF/IQ USP.

Os procedimentos sem inversão do saco intestinal e sem banho de gelo foram realizados seguindo as etapas a seguir:

Etapa 1: Realização de incisão abdominal mediana com cerca de cinco cm para exposição do intestino delgado.

Etapa 2: Identificação e isolamento do duodeno a partir do estômago até o ligamento de Treitz, que indica a transição entre duodeno e jejuno (Figura 6).

Figura 6 Ligamento de Treitz (seta)



Fonte: autoria própria.

Quando não foi possível identificar essa estrutura anatômica, considerou-se como jejuno a primeira porção na qual se observou a presença de placas de Peyers (Figura 7).

Figura 7 Placa de Peyers (seta)



Fonte: autoria própria.

Etapa 3: Retirada do mesentério delicadamente com as mãos ou com o auxílio de uma pinça. Divisão do jejunum em seis segmentos com cerca de 8,5 cm cada, (S1, S2, S3, S4, S5 e S6). A medição é demonstrada na Figura 8.

Figura 8 Medição de segmento intestinal



Fonte: autoria própria

Etapa 4: Lavagem da parte interna do segmento de jejuno com cerca de 10mL de soro fisiológico aquecido a 37°C, utilizando uma seringa com ponta do tipo luer slip (Figura 9).

Figura 9 Lavagem do segmento com soro fisiológico



Fonte: autoria própria

Etapa 5: Remoção do excesso de soro fisiológico com o auxílio de uma gaze (Figura 10).

Figura 10 Remoção do excesso de soro fisiológico



Fonte: autoria própria

Etapa 6: Formação de saco intestinal, para tanto amarrou-se uma das extremidades do segmento com linha de algodão, como demonstrado na Figura 11.

Figura 11 Preparação do saco intestinal



Fonte: autoria própria

Etapa 7: Preenchimento do segmento com cerca de 1,5 mL de solução contendo os fármacos de estudo. Esse procedimento foi realizado com o auxílio de uma seringa de ponta luer slip como ilustrado na Figura 12. Imediatamente após o preenchimento, a outra extremidade do segmento foi amarrada com linha de algodão para fechamento do saco intestinal.

Figura 12 Finalização do saco intestinal



Fonte: autoria própria

Etapa 8: Verificação do comprimento do saco intestinal após o preenchimento com a solução de fármacos (Figura 13). Foi possível observar expansão do saco intestinal, portanto essa medição é fundamental para os cálculos da permeabilidade aparente.

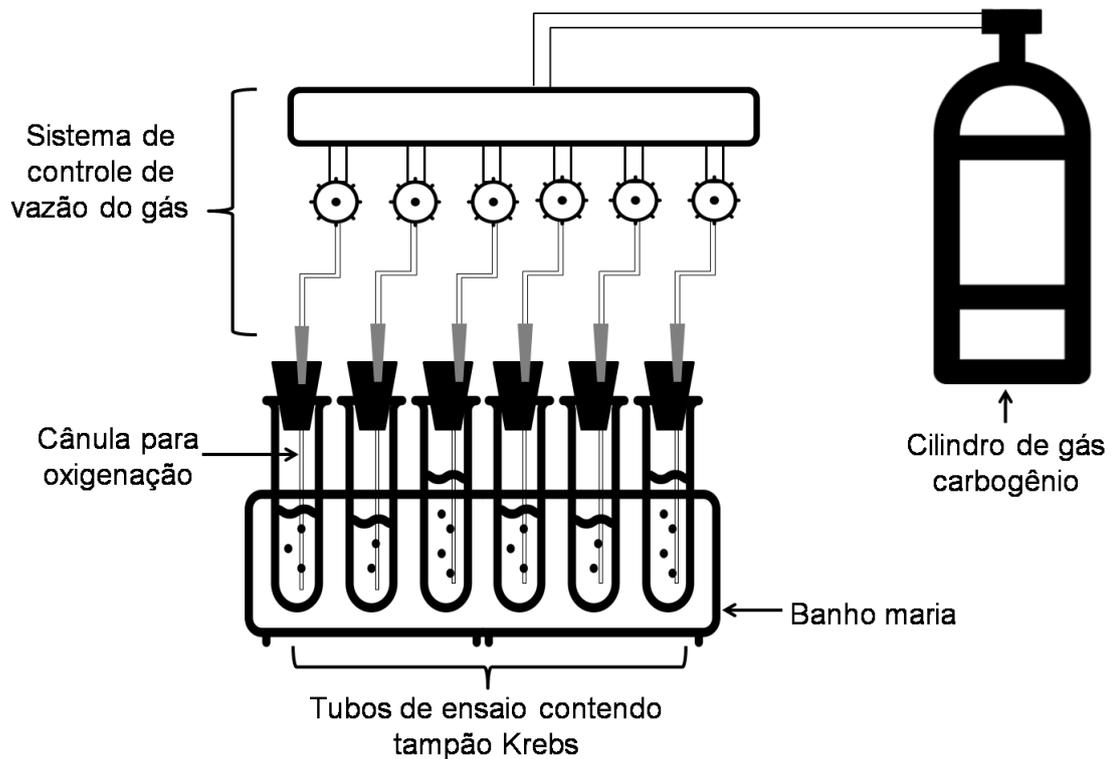
Figura 13 Saco intestinal preenchido



Fonte: autoria própria

Etapa 9: Colocação do saco intestinal em tubo de ensaio (com diâmetro 13,5mm, comprimento 150mm e espessura 0,9mm) contendo 25mL de tampão Krebs aquecido em banho maria a 37 °C e oxigenado com gás carbogênio. Foi montado um sistema conforme ilustração na Figura 14. É importante ressaltar que a oxigenação do meio também possibilitou certa movimentação do saco intestinal dentro do tubo de ensaio, com o intuito de promover maior semelhança às condições *in vivo*.

Figura 14 Sistema para ensaio de permeabilidade



Fonte: autoria própria

Imediatamente após a coleta de todos os segmentos, o animal foi eutanasiado por meio de exsanguinação sob anestesia através de incisão da artéria abdominal.

Para determinação do comprimento total do intestino delgado, ao final do experimento foram medidas as porções de duodeno e íleo.

4.10.1 Variáveis dos ensaios de permeabilidade

O método do saco intestinal para avaliar a permeabilidade de substâncias ao longo do intestino delgado foi desenvolvido em 1954 por WILSON e WISEMAN, no entanto, ao longo dos anos, diversos autores desenvolveram variações na execução da técnica experimental. Com bases nas publicações de (ALI *et al.*, 2018; GARRAIT *et al.*, 2006; LIFSCHITZ *et al.*, 2009; QUEVEDO; NIETO; BRIÑÓN, 2011b; SHARMA; CHAWLA; PANCHAGNULA, 2002; SILVA, 2014) foram avaliadas as seguintes variáveis na realização dos experimentos:

- **Saco intestinal invertido:** uma das dificuldades enfrentadas na realização do procedimento experimental é garantir a adequada oxigenação do tecido, para tanto, a inversão do saco intestinal é um recurso utilizado para expor maior

parte da mucosa ativa ao meio oxigenado, além de aumentar a superfície de contato e reduzir a espessura da parede do saco intestinal (WILSON; WISEMAN, 1954).

Para realização dos experimentos com inversão do saco intestinal, foram seguidas as etapas um, dois, três, quatro e cinco, descritas anteriormente, no entanto, antes de prosseguir com o preenchimento do saco intestinal, os mesmos foram invertidos conforme os procedimentos descritos esquematicamente a seguir:

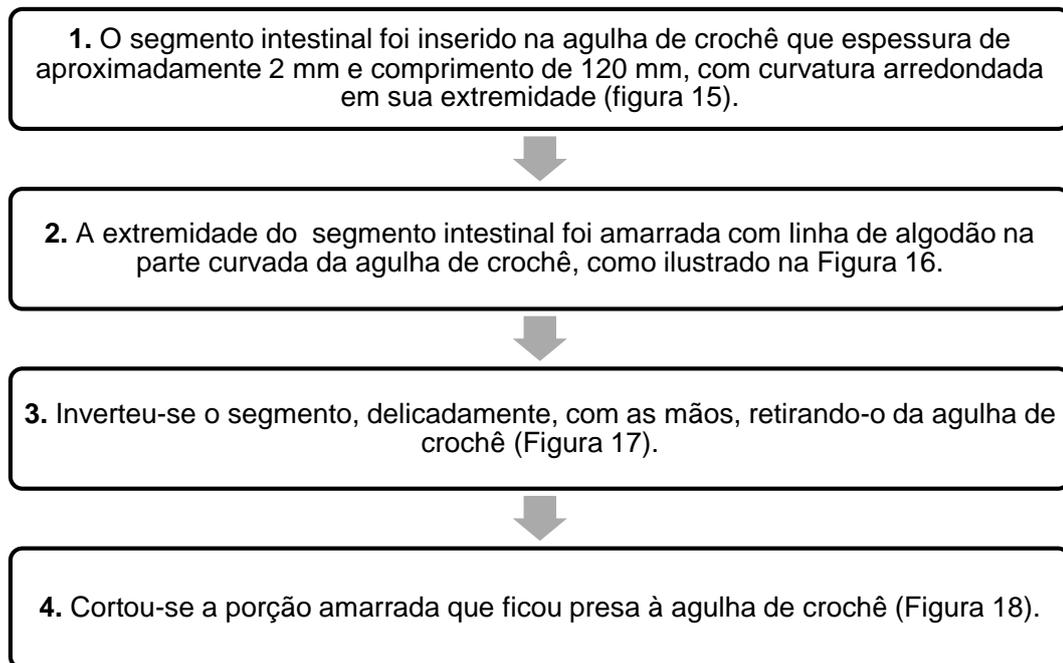
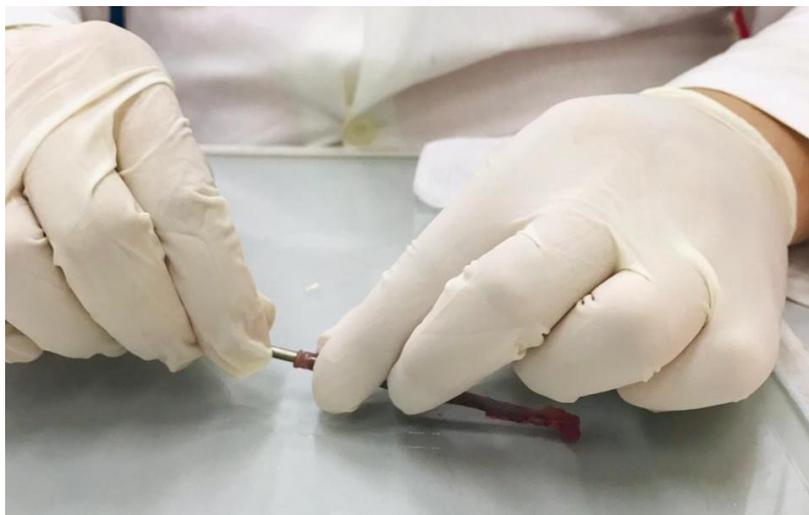


Figura 15 Inserção do segmento intestinal em instrumento metálico para iniciar a inversão



Fonte: autoria própria

Figura 16 Amarração do segmento intestinal para realizar sua inversão



Fonte: autoria própria

Figura 17 Inversão do segmento intestinal



Fonte: autoria própria

Figura 18 Segmento intestinal invertido



Fonte: autoria própria

Após a inversão do segmento, foram seguidos os procedimentos descritos nas etapas seis a nove dos experimentos sem inversão.

Vale ressaltar que em todos os experimentos com inversão, o saco intestinal foi preenchido com tampão Krebs e os fármacos foram colocados nos tubos de ensaio para avaliação de seu transporte na direção da região apical para basal dos enterócitos, assim como acontece nos experimentos sem inversão.

- **Submersão do segmento intestinal em banho de gelo:** a viabilidade do saco intestinal depende do tempo entre a retirada do órgão e o início do experimento, alguns autores mantêm os segmentos intestinais em gelo para garantir a viabilidade, então foram comparados os segmentos intestinais:

- Sem passagem pelo tampão Krebs gelado ((ALI *et al.*, 2018; QUEVEDO; NIETO; BRIÑÓN, 2011)

- Lavados imediatamente após sua retirada com tampão Krebs gelado, procedimento denominado como T1 no presente ensaio (JONKER; HAMMAN; KOTZÉ, 2002; SA *et al.*, 2012);

- Mantidos em tampão Krebs gelado durante todo o preparo dos segmentos, procedimento denominado T2 no presente ensaio (HAMILTON; BUTT, 2013a).

Para realização dos experimentos com banho de gelo (T1), imediatamente após a retirada do segmento intestinal (etapa 3), o mesmo foi submerso em tampão Krebs gelado (2 °C) e a parte interna de cada segmento do jejuno foi lavada com cerca de 10mL desta solução (Figura 19).

Figura 19 Segmento intestinal em banho de gelo



Fonte: autoria própria

Nos experimentos realizados com banho de gelo (T2), o jejuno inteiro foi retirado e submergido em tampão Krebs gelado (2 °C), onde permaneceu durante o preparo de todos os segmentos intestinais, os quais foram lavados com cerca de 10mL desta solução (Figura 20).

Figura 20 Intestino delgado inteiro em banho de gelo (T2)

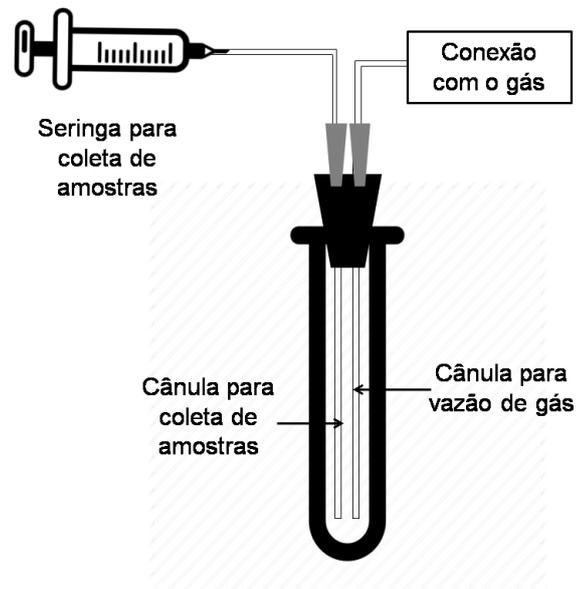


Fonte: autoria própria

4.10.2 Coleta das amostras

Foram coletadas amostras de 500 μ L do meio de incubação nos tempos zero, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos de experimento e, a cada coleta, foram adicionados 500 μ L de tampão Krebs ao meio de incubação para manutenção do volume. Foi elaborado um sistema para coleta das amostras, no qual foi colocada uma cânula exclusiva para tal fim no meio de incubação (Figura 21).

Figura 21 Sistema para coleta de amostras



Fonte: autoria própria

Cada amostra foi filtrada com filtro de seringa do tipo PVDF, hidrofílico, com poros de $0,45\mu\text{m}$.

4.10.3 Cálculo da permeabilidade aparente (P_{app})

A P_{app} foi calculada com base na equação 3 (JONKER; HAMMAN; KOTZÉ, 2002):

Equação 4: Cálculo da permeabilidade aparente

$$P_{app} = \left(\frac{dc}{dt}\right) \left(\frac{1}{A \times 60 \times C_0}\right)$$

Onde P_{app} : permeabilidade aparente em cm/s, dc/dt é a taxa de permeabilidade em unidades de massa/minuto.

A: superfície do segmento intestinal em cm^2 .

C_0 é a concentração inicial do fármaco dentro do segmento intestinal.

A superfície do segmento intestinal (A) foi calculada a partir da Equação 4 (JONKER; HAMMAN; KOTZÉ, 2002):

Equação 5: Cálculo da superfície do segmento intestinal

$$A = 2\pi rh$$

Onde r tamanho do raio do segmento intestinal (cm)

h: comprimento (cm).

De acordo com os dados de Quevedo et.al (2009), o raio foi definido como 0,4cm.

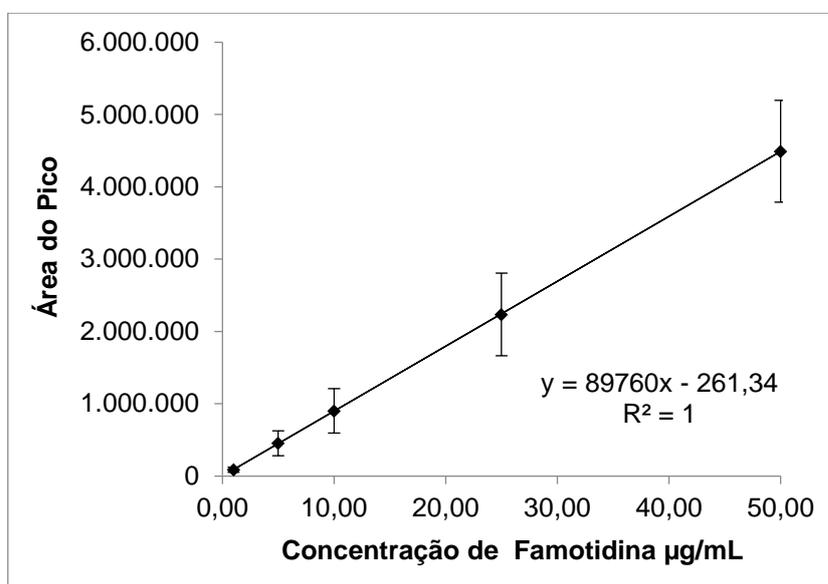
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Validação dos métodos cromatográficos para quantificação de famotidina, losartana e naproxeno em tampão Krebs

5.1.1 Linearidade: solução de fármacos em tampão Krebs

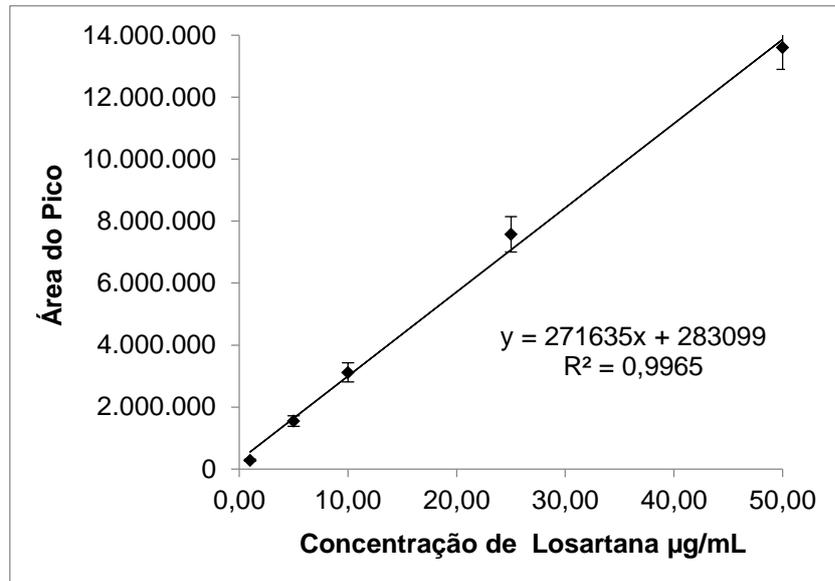
Os métodos cromatográficos para quantificação de famotidina, losartana e naproxeno mostraram-se lineares entre as concentrações de 1,0 a 50,0 µg/mL, as Figuras 22, 23 e 24 apresentam as demonstrações gráficas das curvas de calibração.

Figura 22 Representação gráfica das respostas em função da concentração de famotidina



Fonte: autoria própria

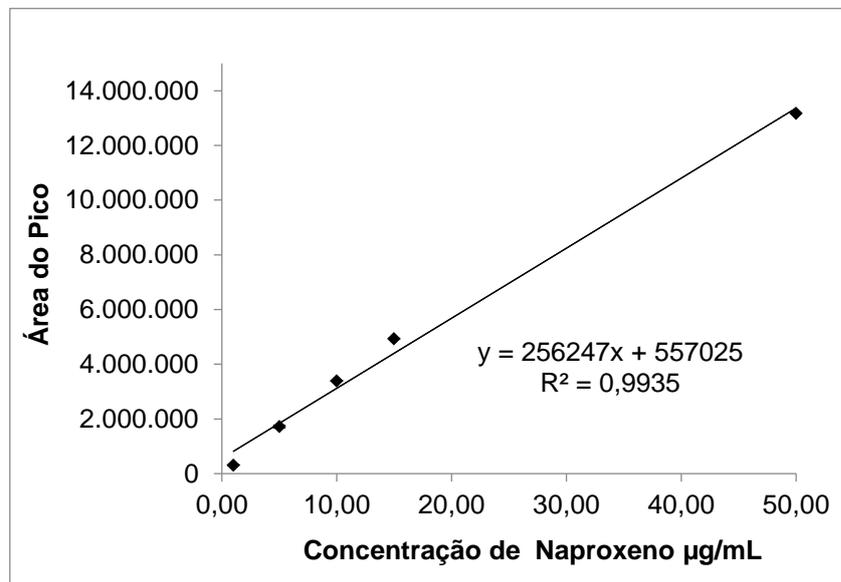
Figura 23 Representação gráfica das respostas em função da concentração de losartana



Fonte: autoria própria

Naproxeno: entre 1,0 e 50,0 µg/mL, cuja curva está apresentada na figura 24.

Figura 24 Representação gráfica das respostas em função da concentração de naproxeno



Fonte: autoria própria

5.1.2 Precisão e exatidão: solução de fármacos em tampão Krebs

Em um mesmo dia, foram analisadas três replicatas das concentrações alta, média e baixa de cada um dos fármacos usados no presente estudo. Os resultados estão expressos na Tabela 1 e indicam precisão e exatidão intradia do método proposto.

Tabela 1 Resultados de precisão e exatidão intradia dos métodos cromatográficos para quantificação de famotidina, losartana e naproxeno em tampão Krebs

Fármaco	Concentração nominal (µg/mL)	Concentração		Desvio Padrão	Precisão (%)	Exatidão (%)
		média experimental (µg/mL)				
Famotidina	3,0	3,10		0,010	0,32	103,21
	30,0	31,57		0,221	0,70	105,22
	60,0	62,62		0,116	0,19	104,36
Losartana	3,0	2,51		0,037	1,48	83,59
	30,0	33,18		0,162	0,49	110,60
	60,0	60,19		1,289	1,75	100,31
Naproxeno	40,0	35,91		0,067	0,19	82,16
	250,0	283,53		3,819	1,35	113,41
	500,0	410,80		11,791	2,87	89,78

Fonte: autoria própria

O mesmo procedimento foi realizado em três dias diferentes e os resultados estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2 Resultados de precisão e exatidão interdias dos métodos cromatográficos para quantificação de famotidina, losartana e naproxeno em tampão Krebs

Fármaco	Concentração nominal (µg/mL)	Concentração experimental média (µg/mL)	Desvio Padrão	Precisão (%)	Exatidão (%)
Famotidina	3,0	3,06	0,044	1,44	101,87
	30,0	30,91	0,708	2,29	103,04
	60,0	61,09	1,595	2,61	101,82
Losartana	3,0	2,30	0,112	4,87	76,58
	30,0	32,75	0,891	2,72	109,15
	60,0	59,13	2,351	3,98	98,55
Naproxeno	40,0	35,72	0,610	1,71	89,29
	250,0	287,89	5,942	2,06	115,16
	500,0	398,30	18,060	4,53	79,66

Fonte: autoria própria

É importante ressaltar que os resultados de precisão e exatidão interdia se enquadram nos limites estabelecidos na RDC 27/2012, com valores de precisão menores que 15% e exatidão no intervalo entre 100% ± 20%.

Entretanto, os métodos de quantificação de losartana, especificamente na concentração de 3,0 µg/mL e de naproxeno, na concentração de 500 µg/mL apresentaram exatidão interdia fora do intervalo estabelecido, com valor de 76,58% e 79,66%, respectivamente, o que não interferiu nos resultados experimentais, dado que todas as análises sempre eram realizadas de uma só vez, não houve necessidade de analisar amostras do mesmo experimento em dias diferentes.

5.1.3 Limites de detecção e quantificação: solução de fármacos em tampão Krebs

A partir de diluições seriadas dos fármacos e análise da razão sinal/ruído, foi possível determinar os limites de detecção da famotidina (0,02 µg/mL), da losartana (0,03 µg/mL) e do naproxeno (0,01 µg/mL).

Os limites de quantificação dos fármacos em questão foram: 0,05 µg/mL (famotidina), 0,08 µg/mL (losartana) e 0,03 µg/mL (naproxeno).

Nos experimentos de Zargui et.al (2005), o limite de quantificação da famotidina foi de 0,015 µg/mL. Valdandi et. al (2010) obteve limite de quantificação de losartana igual a 0,05 µg/mL em plasma humano, valores bastantes próximos ao obtido no presente estudo.

Vakeri-Milani et. al (2005) obtiveram limite de quantificação de naproxeno igual a 0,0003 µg/mL. Embora o resultado obtido no presente estudo tenha sido bastante diferente (0,03 µg/mL), deve-se considerar que os autores em questão não utilizaram o tampão Krebs nos ensaios de permeabilidade e o método desenvolvido foi ajustado para que se pudesse quantificar losartana e naproxeno em uma mesma corrida cromatográfica. Ainda assim, o método apresentou sensibilidade adequada aos ensaios realizados.

5.1.4 Estabilidade de curta e longa duração: solução de fármacos em tampão Krebs

As análises realizadas em amostras mantidas durante 24h em temperatura ambiente demonstraram estabilidade, uma vez que os parâmetros de precisão e exatidão se mantiveram dentro dos limites estabelecidos na RDC 27/2012. Os resultados estão expostos nas tabelas 4 e 5.

Tabela 3 Estabilidade de 24h - Famotidina

Famotidina		Análise inicial	Análise após 24h
60,0 µg/mL	CME	59,57 µg/mL	57,52 µg/MI
	Precisão (DPR)	0,28%	3,80%
	Exatidão	99,29%	95,87%
30,0 µg/mL	CME	30,26 µg/mL	28,56 µg/mL
	Precisão (DPR)%	0,53%	1,53%
	Exatidão	100,86%	95,21%
3,0 µg/mL	CME	3,02 µg/mL	2,63 µg/mL
	Precisão (DPR)%	0,56%	2,02%
	Exatidão	100,53%	87,69%

Fonte: autoria própria

Tabela 4 Estabilidade de 24h – Losartana

Losartana		Análise inicial	Análise após 24h
60,0 µg/mL	CME	62,11 µg/mL	59,12 µg/mL
	Precisão (DPR)	1,88%	0,642%
	Exatidão	103,52%	98,53%
30,0 µg/mL	CME	33,26 µg/mL	34,03 µg/mL
	Precisão (DPR)%	0,545%	0,547%
	Exatidão	110,88%	113,44%
3,0 µg/mL	CME	2,18 µg/mL	2,67 µg/mL
	Precisão (DPR)%	1,90%	1,49%
	Exatidão	72,51%	88,94%

Fonte: autoria própria

A estabilidade das amostras de naproxeno com concentração alta (500 µg/mL) e média (250 µg/mL) não foi estabelecida devido problemas instrumentais. Ainda assim, foi possível constatar estabilidade das amostras de 40 µg/mL, de acordo com os dados apresentados na tabela 5.

Tal concentração representa bem as condições dos ensaios de permeabilidade, que atingiram concentrações de até 90 µg/mL de naproxeno.

Tabela 5 Estabilidade de 24h – Naproxeno

Naproxeno		Análise inicial	Análise após 24h
40,0 µg/mL	CME	32,67 µg/mL	35,03 µg/mL
	Precisão (DPR)%	0,19%	0,95%
	Exatidão	81,67	87,58

Fonte: autoria própria

Com relação ao ensaio de estabilidade de longa duração, após os 30 dias de congelamento, as amostras tornaram-se turvas e, mesmo após filtração com filtro de seringa do tipo PVDF, hidrofílico, com poros de 0,45µm, as análises cromatográficas não resultaram em picos bem definidos.

5.1.5 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamentos: solução de fármacos em tampão Krebs

Ao descongelar as amostras que ficaram 24h armazenadas entre -8 °C, todas elas ficaram turvas. As mesmas foram filtradas com filtro de seringa do tipo PVDF, hidrofílico, com poros de 0,45µm, mas as análises cromatográficas não resultaram em picos bem definidos.

5.1.6 Seletividade: solução de fármacos em tampão Krebs

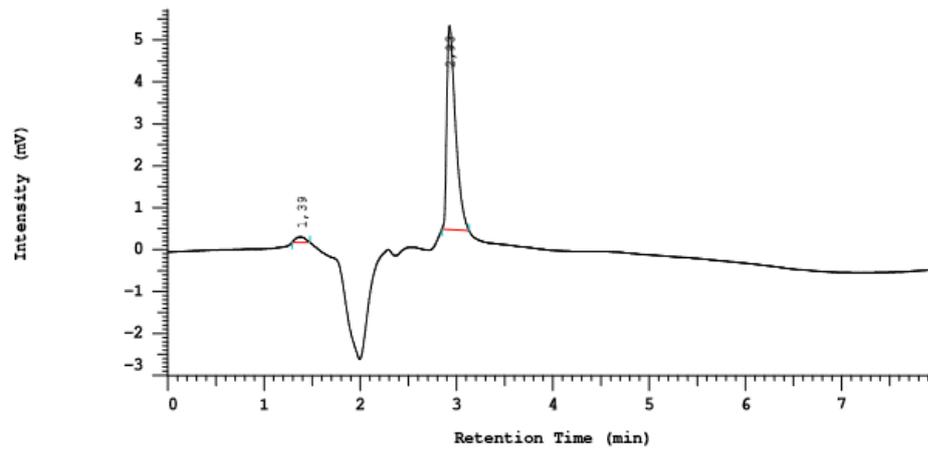
Constatou-se que as análises cromatográficas do tampão Krebs (Branco) apresentaram ruídos em 3,0 minutos de corrida no método de quantificação de famotidina e ruídos entre 1,5 e 2,0 minutos no método de quantificação de losartana e naproxeno, como é possível observar nos cromatogramas representados nas Figuras 25 e 26.

Contudo, não houve interferência na análise dos fármacos, pois esses demonstraram tempos de retenção diferentes dos ruídos apontados na análise do tampão Krebs (Branco).

Famotidina apresentou tempo de retenção de 3,4 minutos, conforme exemplo de cromatograma representado na Figura 27.

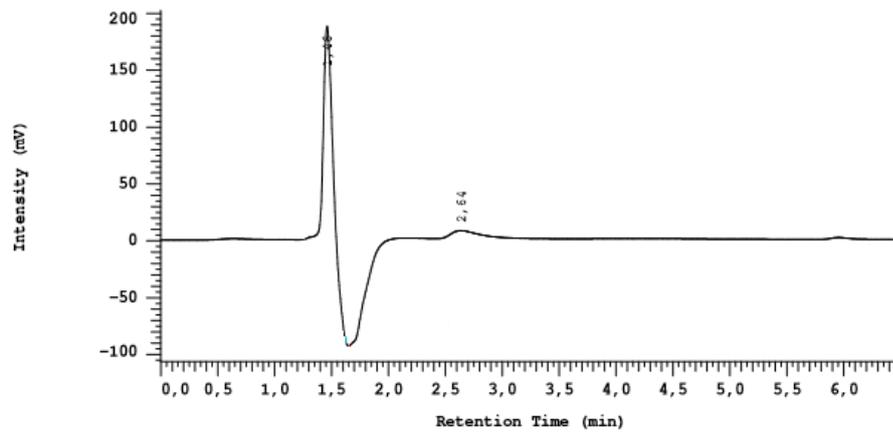
Losartana apresentou tempo de retenção de 3,4 minutos e o naproxeno, 5,0 minutos, de acordo com exemplo de cromatograma demonstrado na Figura 28.

Figura 25 Cromatograma de amostra “Branco” analisada pelo método de quantificação de famotidina



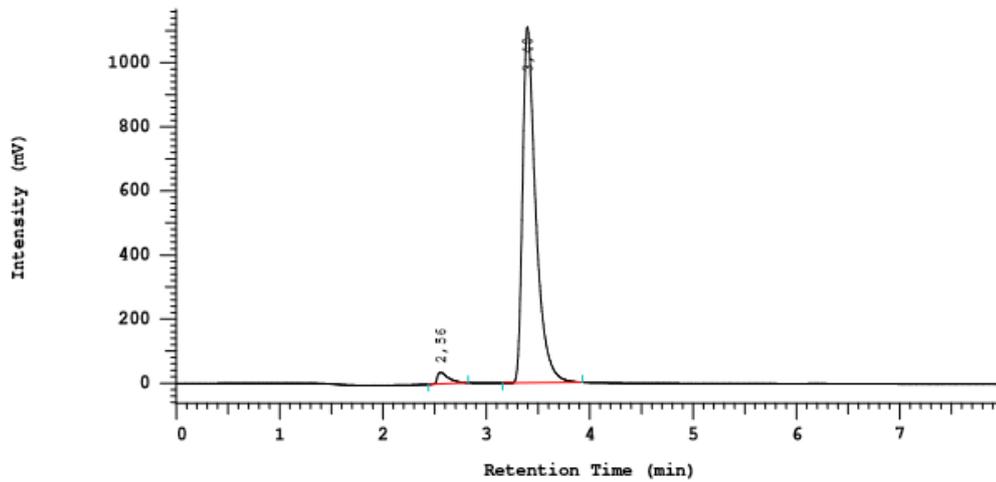
Fonte: autoria própria

Figura 26 Cromatograma de amostra “Branco” analisada pelo método de quantificação de losartana e naproxeno



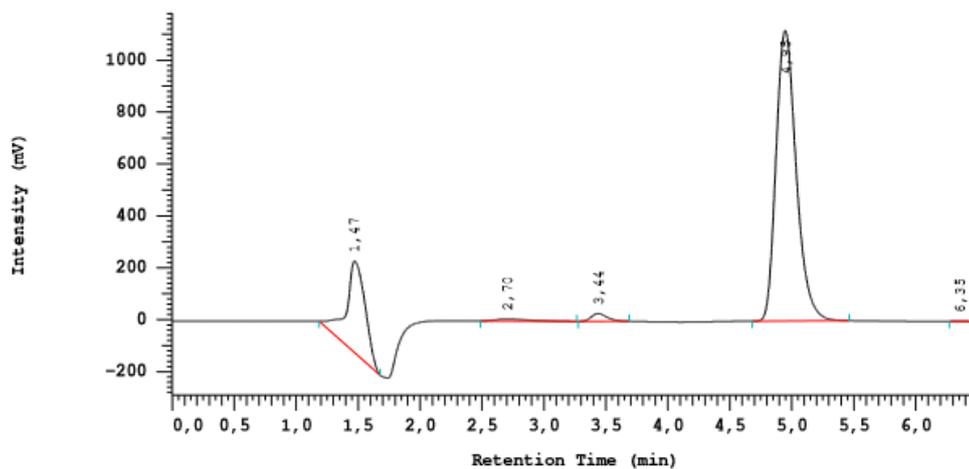
Fonte: autoria própria

Figura 27 Exemplo de cromatograma do método de quantificação de famotidina



Fonte: autoria própria

Figura 28 Exemplo de cromatograma do método de quantificação da losartana e naproxeno



Fonte: autoria própria

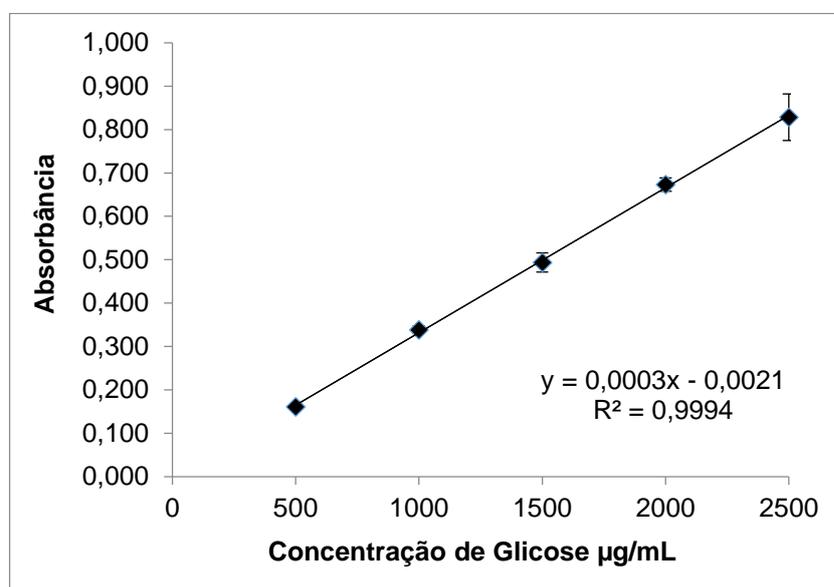
Não foi constatada interferência de possível material biológico presente nas amostras na quantificação dos fármacos, pois nos cromatogramas obtidos no experimento BRANCO não se observou nenhum pico além do ruído já esperado do tampão Krebs.

5.2 Validação do método espectrofotométrico para quantificação de glicose em tampão Krebs

5.2.1 Linearidade: solução de glicose em tampão Krebs

O método espectrofotométrico para quantificação de glicose mostrou-se linear entre as concentrações de 500 a 2500 µg/mL, a Figura 29 apresenta a demonstração gráfica da curva de calibração.

Figura 29 Representação gráfica da absorbância em função da concentração de glicose



Fonte: autoria própria

5.2.2 Precisão e exatidão: solução de glicose em tampão Krebs

Em um mesmo dia, foram analisadas três replicatas das concentrações baixa, média e alta de glicose (400, 800 e 1200 µg/mL). Os resultados estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6 Resultados de precisão e exatidão intradias do método espectrofotométrico para quantificação de glicose em tampão Krebs

Concentração nominal (µg/mL)	Concentração experimental média (µg/mL)	Desvio Padrão	Precisão (%)	Exatidão (%)
400	417,94	24,85	5,94	104,48
800	823,61	20,96	2,55	102,95
1200	1232,26	38,59	3,13	102,69

Fonte: autoria própria

O mesmo procedimento foi realizado em três dias diferentes e os resultados estão expressos na Tabela 7.

Tabela 7 Resultados de precisão e exatidão interdias do método espectrofotométrico para quantificação de glicose em tampão Krebs

Concentração nominal (µg/mL)	Concentração experimental média (µg/mL)	Desvio Padrão	Precisão (%)	Exatidão (%)
400	393,09	41,30	10,51	98,27
800	811,62	34,09	4,20	101,45
1200	1221,31	27,25	2,23	101,78

Fonte: autoria própria

O presente método para quantificação de glicose em tampão Krebs demonstrou precisão e exatidão intra e interdia, uma vez que os parâmetros descritos acima se enquadram nos limites estabelecidos na RDC 27/2012.

5.2.3 Limites de detecção e quantificação: solução de glicose em tampão Krebs

O limite de detecção calculado a partir da equação 3 foi de 71,41 µg/mL, tal valor se mostra em conformidade com a metodologia do presente estudo, uma vez que a concentração de glicose no tampão Krebs é de 2mg/mL.

A partir de diluições seriadas de uma solução de glicose em tampão Krebs, foi possível determinar que o limite de quantificação do método em questão foi de

80µg/mL, pois essa foi a menor concentração na qual se obteve valor de precisão menor que 20% (9,86%) e exatidão entre 80 e 120% (115,97).

5.2.4 Estabilidade de curta e longa duração: solução de glicose em tampão Krebs

As amostras de glicose em tampão Krebs mantidas em temperatura ambiente durante 24h exibiram estabilidade, pois os valores de precisão e exatidão mantiveram-se dentro dos limites estabelecidos pela RDC 27/2012. Os dados estão demonstrados na Tabela 8.

Tabela 8 Estabilidade de curta duração: solução de glicose em tampão Krebs

Glicose		Análise inicial	Análise após 24h
400,0 µg/mL	CME	356,82 µg/mL	328,77 µg/mL
	Precisão (DPR)	9,45%	8,55%
	Exatidão	89,20%	82,19%
800,0 µg/mL	CME	835,30 µg/mL	718,37 µg/mL
	Precisão (DPR)%	1,12%	6,36%
	Exatidão	104,41%	89,80%

Fonte: autoria própria

Após congelamento durante 30 dias, as amostras não mostraram estabilidade, pois constatou-se perda de precisão e exatidão do método. Os valores estão expostos na Tabela 9.

Tabela 9 Estabilidade de longa duração: solução de glicose em tampão Krebs

Glicose		Análise inicial	Análise após 24h
400,0 µg/mL	CME	365,10 µg/mL	665,23 µg/mL
	Precisão (DPR)	10,87%	25,57%
	Exatidão	91,27%	166,31%
800,0 µg/mL	CME	790,13 µg/mL	1123,23 µg/mL
	Precisão (DPR)%	1,64%	26,49%
	Exatidão	98,77%	140,40%

Fonte: autoria própria

Inicialmente, os ensaios de estabilidade foram realizados com a concentração baixa de 80 µg/mL, no entanto, por se tratar do limite de quantificação do método, as análises apresentaram muita variação. Contudo, os resultados obtidos com as concentrações de 400 e 800 µg/mL são condizentes com os ensaios de permeabilidade, nos quais se utiliza tampão Krebs com concentração de glicose igual a 2mg/mL.

5.2.5 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento: solução de glicose em tampão Krebs

Embora as amostras apresentassem turvação após o congelamento e descongelamento, foi possível observar que a precisão e exatidão do método espectrofotométrico para quantificação de glicose mantiveram-se dentro dos limites determinados na RDC 27 de 2012. Possivelmente devido ao baixo volume de amostra utilizado para a análise, apenas 10µL para 1mL do reagente de trabalho. Os dados estão demonstrados na Tabela 10.

Tabela 10 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento: solução de glicose em tampão Krebs

Glicose		Análise inicial	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3
400,0 µg/mL	CME	351,93 µg/mL	355,40 µg/mL	332,02 µg/mL	419,94 µg/mL
	Precisão (DPR)	5,89%	1,52%	2,97%	1,78%
	Exatidão	87,98%	88,85%	83,01%	104,99%
800,0 µg/mL	CME	803,54 µg/mL	798,56 µg/mL	673,02 µg/mL	833,33 µg/mL
	Precisão (DPR)%	1,96%	6,95%	7,84%	1,77%
	Exatidão	100,44%	99,82%	84,13%	104,17%

Fonte: autoria própria

5.2.6 Seletividade: solução de glicose em tampão Krebs

Nos resultados obtidos da análise do tampão Krebs com e sem fármacos, não se observou interferência dos mesmos na quantificação de glicose, como demonstrado na Tabela 11.

Tabela 11 Seletividade de método espectrofotométrico para quantificação de glicose em tampão Krebs

Concentração nominal: 2000,00 µg/mL	TK sem fármacos	TK com fármacos
Concentração experimental média (µg/mL)	2060,19	2075,25
Desvio Padrão	15,33	34,41
Precisão (%)	0,74	1,66
Exatidão (%)	103,01	103,76

Fonte: autoria própria

5.3 Ensaio de permeabilidade

É importante ressaltar que, a respeito do tempo de jejum dos animais não foi possível constatar um consenso no período. Por exemplo, nos experimentos de Quevedo *et al.* (2009) os animais eram deixados em jejum durante 24h; nos de Jonker *et al.* (2002), 12h; Sa *et al.* (2012) não especificaram o tempo em horas, mas descreveram que os animais ficavam em jejum durante a noite anterior ao procedimento cirúrgico. Ali *et al.* (2018) deixaram os animais em jejum durante 18h. O procedimento em comum de todos eles foi o livre acesso a água.

A finalidade do jejum é a redução da quantidade de conteúdo intestinal durante o procedimento experimental. Destaca-se que o epitélio intestinal é altamente adaptável a variações de conteúdo no lúmen, mas o jejum prolongado pode causar interferências na atividade enzimática do intestino (ALAM; AL-JENOABI; AL-MOHIZEA, 2011).

Para evitar quaisquer danos relacionados ao jejum prolongado, foi estipulado um período de abstenção de comida entre quatro e seis horas, o que foi suficiente para a adequada indução anestésica e não houve dificuldades na execução do experimento.

5.3.1 Comprimento intestinal

Foram calculadas as médias de todas as massas dos ratos e dos comprimentos do intestino delgado, uma vez que esses dados são escassos na literatura. Os resultados estão expostos na Tabela 12.

Tabela 12 Comprimento das diferentes porções do intestino delgado dos ratos

	Massa total média dos animais (g)	Compriment o total do Intestino delgado (cm)	Duodeno (cm)	Jejuno (cm)	Íleo (cm)
Média ± Desvio Padrão	284,10 ± 46,77	85,70 ± 10,24	4,98 ± 1,07	52,12 ± 11,48	28,74 ± 8,90
Porcentagem relativa ao intestino delgado			5,8%	60,8%	33,5%

Fonte: autoria própria

Foi possível observar que a espécie de rato utilizada no presente estudo (*Rattus norvegicus* da linhagem Wistar), apresenta o jejuno como a maior porção do intestino delgado, diferente do intestino delgado de seres humanos, cuja maior porção é o íleo (TORTORA; DERRICKSON, 2010).

No presente estudo, a divisão do intestino delgado foi realizada da seguinte forma: duodeno (cerca de 5cm após o piloro ou até o ligamento de Treitz quando sua visualização era possível), jejuno (a primeira porção na qual se observou a presença de placas de Peyers, seis segmentos entre 7,5 e 8,5cm cada) e íleo (porção de aproximadamente 30cm acima do ceco).

No experimento realizado por Quevedo *et al.* (2009), o intestino delgado foi dividido em quatro porções: jejuno (15cm de porção proximal e 15cm de porção distal) e íleo (15cm de porção proximal e 15cm de porção distal).

Sharma *et al.* (2002) descreveram em sua publicação que a divisão do intestino foi feita da seguinte maneira: duodeno (cerca de 5cm de comprimento após o piloro), jejuno (três a seis segmentos com cerca de 6cm cada) e íleo (acima do ceco).

Lacombe *et al.* (2004) realizaram experimentos com a técnica do saco intestinal invertido e o intestino delgado foi dividido considerando as seguintes porções: 25% de duodeno, 50% de jejuno e 25% de íleo.

A correta ressecção dos segmentos do intestino delgado é importante, pois já são estabelecidas diferenças importantes na absorção de substâncias ao longo do intestino, devido as diferenças de pH, a atividade enzimática, expressão de transportadores, volume de fluido intestinal, entre outras (ALAM; AL-JENOABI; AL-MOHIZEA, 2011).

5.3.2 Viabilidade tecidual

Desde o desenvolvimento da técnica do saco intestinal em 1954 por Wilson e Wiseman, muitas alterações foram realizadas para melhorar a viabilidade do tecido e garantir a integridade da membrana. Esta técnica é amplamente utilizada para estudar o mecanismo de absorção de substâncias, a ação de enzimas na conversão de pró-fármacos e biotransformação de fármacos nos segmentos intestinais, o mecanismo de interações medicamentosas, entre outras aplicações, incluindo também o funcionamento de transportadores de membrana. (ALAM; AL-JENOABI e AL-MOHIZEA, 2011).

5.3.3 Glicose

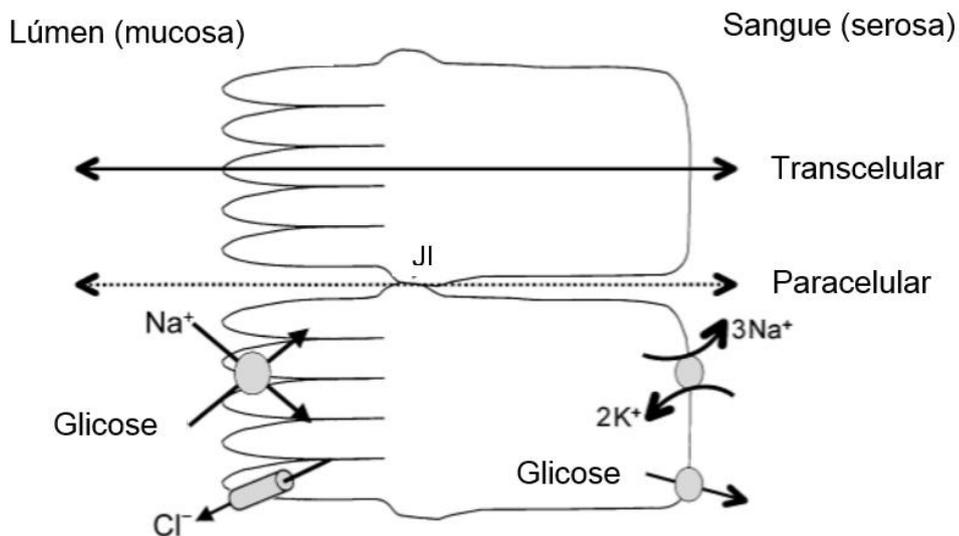
A Figura 30 ilustra o transporte transcelular que acontece por canais e transportadores de membrana, o transporte paracelular de íons e outros solutos de baixo peso molecular que acontece entre os pequenos espaços existentes entre os enterócitos, as chamadas junções íntimas (JI) e o transporte de íons cloreto, que acontece especificamente por canais na membrana apical. Destaca-se nesta figura o transportador *sódio-glicose co-transportador* (SGLT1) presente na membrana apical do intestino delgado, que capta glicose em processo impulsionado pelo sódio. A cada duas moléculas de glicose, também entram dois íons sódio na célula epitelial. A energia requerida neste processo é proveniente de duas fontes:

- I. A maior concentração de sódio fora da célula gera um gradiente eletroquímico. O interior da célula apresenta então um potencial elétrico negativo que favorece a entrada destes íons e da glicose;

- II. Transportador Na^+/K^+ -ATPase mantém níveis elevados de sódio fora da célula em um processo com gasto de energia na forma de adenosina trifosfato (ATP).

Já no interior da célula, a glicose se desloca até a membrana basal, onde é transportada para o sangue via Transportador de Glicose (*Glucose Transporter*) GLUT2 de forma passiva, sempre a favor do gradiente de concentração. No intestino podem ser encontrados: GLUT 2, 5, 7 e 12 (FERRARIS; CAREY, 2000; NELSON; COX, 2014).

Figura 30 Transporte de substâncias através dos enterócitos



Fonte: adaptado de (FERRARIS; CAREY, 2000)

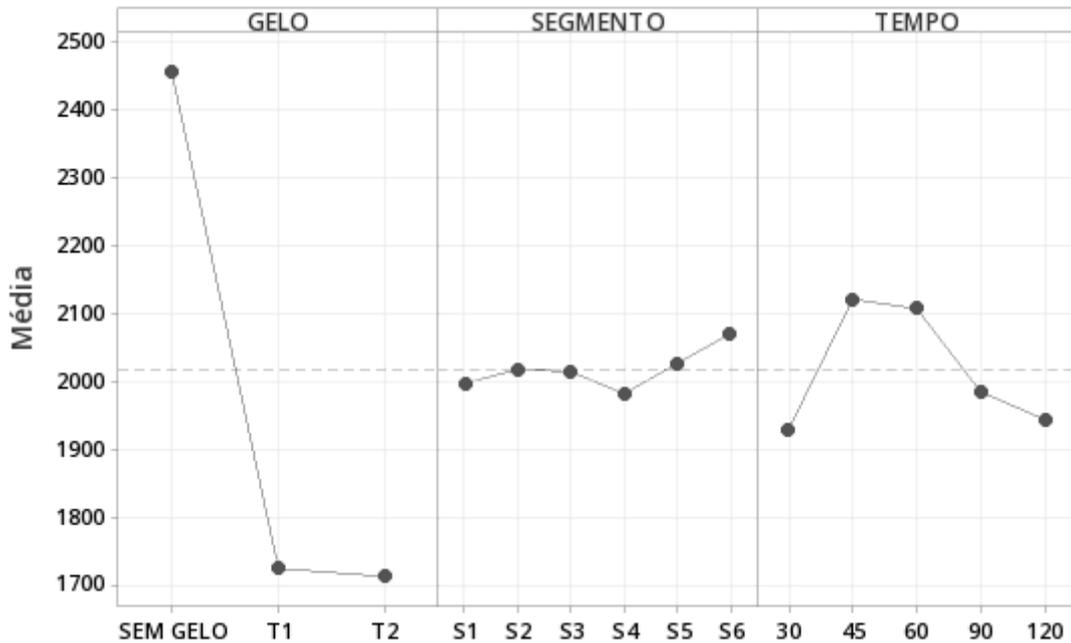
5.3.3.1 Experimentos sem inversão do saco intestinal

Baseado no funcionamento do transportador SGLT1, nos experimentos realizados sem inversão do saco intestinal espera-se que a glicose presente dentro do saco intestinal seja transportada para fora, no sentido mucosa-serosa (ou apical-basal). Quando o transportador $\text{Na}/\text{K}/\text{ATPase}$ não tiver mais energia (ATP) para transportar sódio para fora da célula, o gradiente eletroquímico fica comprometido e transporte de glicose não ocorre, assim a concentração dessa substância no meio externo tende a diminuir ou se estabilizar ao longo do tempo.

No gráfico de interações principais representado pela Figura 31 é possível observar que nos tempos de gelo T1 e T2 as concentrações médias de glicose no

meio externo foram estatisticamente menores em relação ao experimento sem banho de gelo ($p < 0,05$). Os valores estão demonstrados no Quadro 13.

Figura 31 Representação gráfica de interações principais entre as variáveis de estudo e a concentração de glicose nos sacos intestinais sem inversão



Fonte: autoria própria

Quadro 13 Concentrações de glicose nos experimentos sem inversão do saco intestinal

Tempo de gelo	Concentração de glicose ($\mu\text{g/mL}$)
Sem gelo	$2743,87 \pm 559,38$
T1	$1725,80 \pm 95,01$
T2	$1714,00 \pm 84,85$

Fonte: autoria própria

No experimento sem banho de gelo o aumento de glicose no meio externo indica que houve transporte ativo dessa substância da mucosa para a serosa. Já a redução da concentração média de glicose nos experimentos com banho de gelo T1 e T2 a pode indicar que esse transporte ficou comprometido, uma vez que alterações de temperatura podem interferir nos transportes ativos e/ou passivos (ALAM; AL-

JENOABI; AL-MOHIZEA, 2011). Ou então houve maior consumo de glicose pelo próprio tecido, porém para confirmar essa hipótese, seria necessário desenvolver um dispositivo para coleta de amostra do interior do saco intestinal para quantificação de glicose ao longo do experimento, assim seria possível calcular o balanço final dessa substância e estimar a quantidade consumida pelo próprio tecido.

As concentrações de glicose ao longo dos segmentos intestinais mantiveram-se praticamente constantes, com discreto aumento a partir do segmento S4, o que indica certa uniformidade de transportadores SGLT1 ao longo do jejuno. Em estudo publicado por Koepsell (2020), é descrito que há maior expressão do transportador SGLT1 no intestino delgado em relação ao intestino grosso, e o jejuno apresenta maior capacidade de transporte de glicose quando comparado ao duodeno e o íleo.

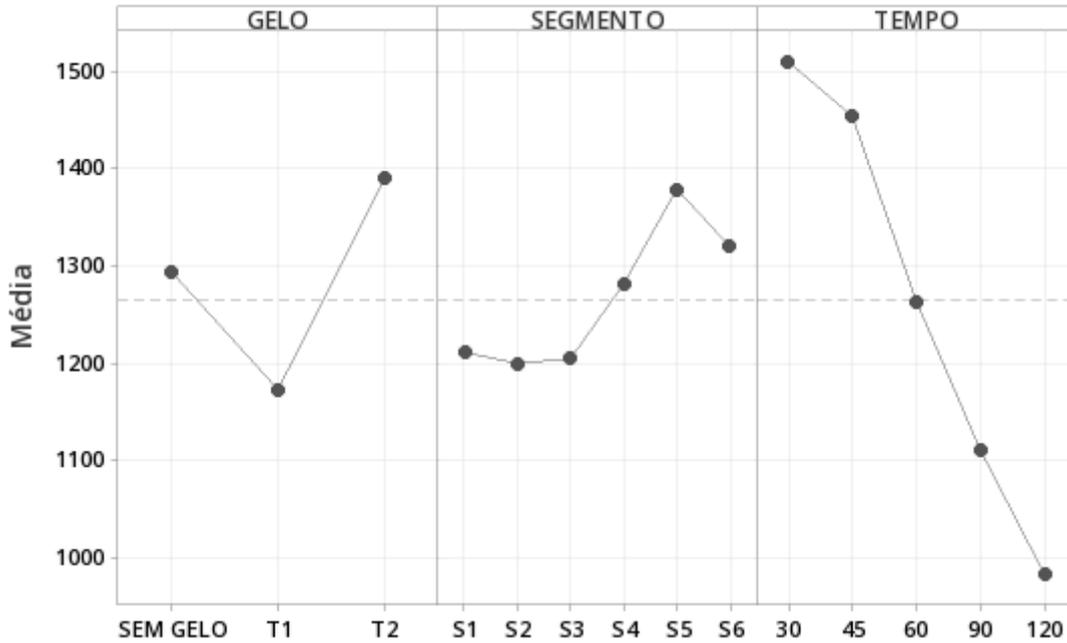
Os resultados demonstram que, ao longo do experimento, houve moderado aumento da concentração de glicose entre 45 e 60 minutos, possivelmente foi o período de adaptação do tecido às condições experimentais, uma vez que a presença de movimentos peristálticos também só foi observada após 30 a 45 minutos e manteve-se ao longo de todo o experimento (120 minutos) com a variável “sem inversão do saco intestinal”.

5.3.3.2 Experimentos com inversão do saco intestinal

A partir do funcionamento do transportador SGLT1, nos experimentos com inversão do saco intestinal, supõe-se que a glicose que está fora do saco intestinal (mucosa) seja transportada para dentro (serosa). Quando o transportador Na^+/K^+ -ATPase não tiver mais energia (ATP) para transportar sódio para fora da célula, o gradiente eletroquímico fica comprometido e o transporte de glicose não ocorre, portanto espera-se aumento ou estabilidade da concentração dessa substância fora do saco intestinal ao longo do tempo.

A Figura 32 apresenta o gráfico das interações principais entre as variáveis dos experimentos com inversão do saco intestinal e a concentração de glicose e o Quadro 14 contém os valores das concentrações de glicose, representados pela média \pm desvio padrão.

Figura 32 Representação gráfica de interações principais entre as variáveis de estudo e a concentração de glicose nos sacos intestinais com inversão



Fonte: autoria própria

Quadro 14 Concentração de glicose nos experimentos com inversão do saco intestinal

Tempo de gelo	Concentração de glicose ($\mu\text{g/mL}$)
Sem gelo	1293,20 \pm 380,83
T1	1173,94 \pm 237,26
T2	1390,93 \pm 158,59

Fonte: autoria própria

É possível observar que com o tempo de gelo T2 a concentração média de glicose foi estatisticamente maior em relação aos demais tempos de gelo ($p < 0,05$). Esse resultado indica que o transportador SGLT1 teve sua atividade comprometida devido a permanência do tecido em baixa temperatura durante todo o preparo dos segmentos, tal como observado nos experimentos sem inversão do saco intestinal. Esse resultado difere dos achados de Hamilton e Butt (2013), que observaram redução significativa de glicose no meio de incubação em experimentos com saco

intestinal invertido e manutenção do tecido em banho de gelo durante todo o preparo dos segmentos.

Nos ensaios com o banho de gelo T1 e inversão do saco intestinal, observou-se redução significativa ($p < 0,05$) da concentração média de glicose, indicando que o transporte dessa substância no sentido mucosa-serosa aconteceu de forma mais efetiva quando comparado às demais condições experimentais, inclusive sem banho de gelo.

Li-A *et al.* (2011) utilizaram a quantificação de lactato desidrogenase e glicose como marcador de viabilidade tecidual em seus experimentos com saco intestinal invertido e lavagem dos segmentos com solução salina gelada imediatamente após a ressecção. Os autores observaram que o tecido se manteve viável até 120 minutos de experimento.

Ao longo dos experimentos foi possível observar redução das concentrações de glicose, independentemente da temperatura. Supõe-se que o tecido permaneceu íntegro, uma vez que o transportador SGLT1 manteve o transporte ativo de glicose para o interior do saco intestinal. A inversão do saco intestinal é um procedimento amplamente utilizado, Barthe *et al.* (1998) concluíram que não há alteração significativa na morfologia dos enterócitos de sacos intestinais submetidos a inversão mesmo após duas horas de experimento, além disso após 60 minutos de experimento, constatou que a concentração de glicose no interior do saco intestinal era entre três e quatro vezes maior do que no meio de incubação, indicando integridade do tecido devido a atividade do transportador SGLT1.

Com relação aos diferentes segmentos, observou-se elevação da concentração de glicose na porção distal do jejuno, entre os segmentos S3 e S6. Tal resultado difere da condição experimental “sem inversão do saco intestinal” que manteve concentrações bastante semelhantes entre os diferentes segmentos e condiz com dados da literatura que indicam que a presença do transportador SGLT1 difere apenas entre as diferentes porções do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) (KOEPESELL, 2020).

Alam *et al.* (2011) afirmam que o modelo de saco intestinal invertido apresenta vantagens como ampla superfície de contato e presença de barreira de muco, que garante certa semelhança aos modelos *in vivo*. Como principal desvantagem, os autores destacam a viabilidade do tecido por cerca de duas horas de experimento, período que pode ser insuficiente para certas determinações.

A respeito dos movimentos peristálticos, considera-se a seguinte citação:

“A peristalse é controlada pela atividade miogênica intrínseca das células musculares lisas. Também é influenciada pelas células intersticiais de Cajal que atuam como marca-passo. Essas células se despolarizam espontaneamente”

Poderia se supor que a peristalse fosse um bom marcador da viabilidade tecidual. Nos experimentos sem inversão do saco intestinal, observou-se movimentos peristálticos a partir de 30 minutos de experimento, aproximadamente, resultado que vai ao encontro de um discreto aumento do transporte de glicose no sentido mucosa-serosa nesse tempo e poderia corresponder a um período de adaptação do tecido as condições experimentais. No entanto, nos experimentos com inversão do saco intestinal, não se observou movimentos peristálticos, mas o transporte ativo de glicose pelo transportador SGLT1 aconteceu de forma efetiva, indicando viabilidade do tecido.

A ausência dos movimentos peristálticos pode estar relacionada com as alterações anatômicas decorrentes do processo de inversão, uma vez que a camada de músculos lisos permaneceu no interior do saco intestinal. A partir dessa observação, é importante se estabelecer um dispositivo que mimetize a peristalse durante os ensaios com a inversão do saco intestinal, tal como realizado por Barthe *et al.* (1998) e Wilson e Wiseman (1954), entre outros autores. No entanto, esse procedimento não é comum a todos os experimentos, como os realizados por Hamilton e Butt (2013) e Quevedo *et al.* (2009)., por exemplo.

5.3.4 Permeabilidade aparente: Naproxeno

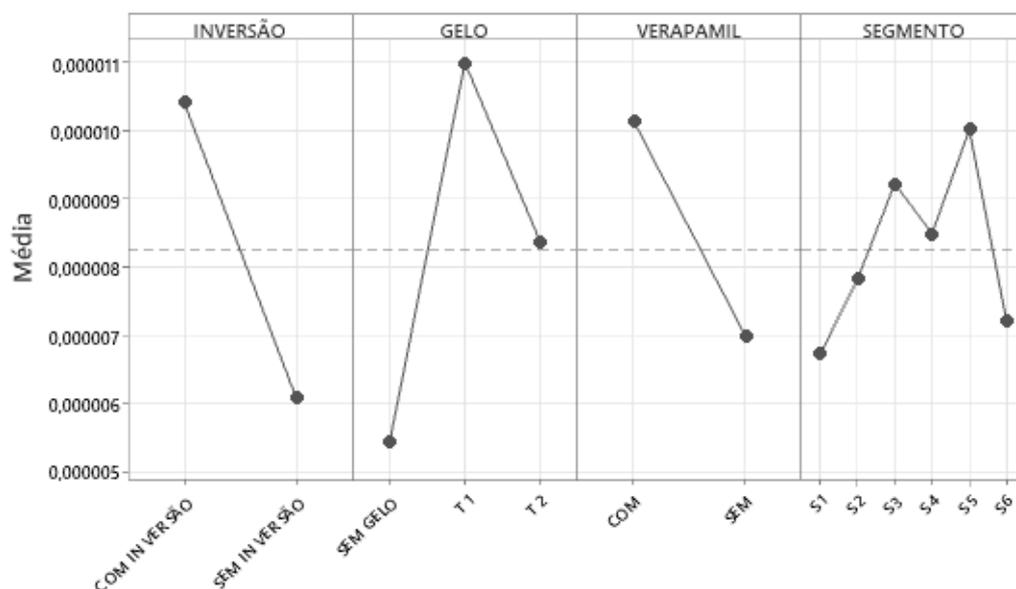
Para melhor compreensão dos resultados, o Quadro 15 sumariza os valores médios de Papp obtidos em todas as variáveis experimentais, seguidos do seu respectivo desvio padrão.

Quadro 15 Valores médios de permeabilidade aparente obtidos em todas as condições experimentais

Condições Experimentais			Papp.10 ⁻⁶ cm/s Naproxeno	Papp.10 ⁻⁶ cm/s Famotidina	Papp.10 ⁻⁶ cm/s Losartana
Inversão do saco intestinal	Banho de Gelo	Inibidor da P-gp			
Com inversão	Sem gelo	Com verapamil	5,03 ± 4,97	48,56 ± 19,39	3,49 ± 0,52
Com inversão	Sem gelo	Sem verapamil	5,43 ± 4,73	17,03 ± 3,74	5,80 ± 4,84
Com inversão	Banho de gelo T1	Com verapamil	26,05 ± 14,87	14,39 ± 9,11	*
Com inversão	Banho de gelo T1	Sem verapamil	8,39 ± 3,94	34,50 ± 25,57	21,09 ± 18,92
Com inversão	Banho de gelo T2	Sem verapamil	7,15 ± 7,10	12,87 ± 8,54	31,16 ± 13,43
Sem inversão	Sem gelo	Com verapamil	5,45 ± 1,27	4,02 ± 2,51	2,65 ± 2,61
Sem inversão	Sem gelo	Sem verapamil	5,80 ± 1,64	0,72 ± 0,37	0,66 ± 0,55
Sem inversão	Banho de gelo T1	Com verapamil	4,03 ± 1,90	3,92 ± 0,66	*
Sem inversão	Banho de gelo T1	Sem verapamil	5,52 ± 2,31	18,69 ± 24,76	*
Sem inversão	Banho de gelo T2	Sem verapamil	9,60 ± 2,91	55,34 ± 19,82	4,81 ± 1,27

Fonte: autoria própria

Figura 33 Interações principais entre as condições experimentais e a Papp do naproxeno



Fonte: autoria própria

Ao analisar os dados representados no Quadro 16, de forma individual, nota-se grande variabilidade dos valores da Papp do naproxeno, mas de acordo com os resultados da análise fatorial multinível, cujo gráfico de interações principais é representado na Figura 33, é possível observar que houve diferença significativa ($p < 0,001$) da Papp do naproxeno entre os experimentos com e sem inversão do saco intestinal, com médias iguais a $10,41 \cdot 10^{-6} \pm 10,87 \cdot 10^{-6}$ cm/s e $6,08 \cdot 10^{-6} \pm 2,66 \cdot 10^{-6}$ cm/s, respectivamente. É importante ressaltar a grande variabilidade entre os resultados, mas a maior Papp desse fármaco nos segmentos com inversão por ser justificada devido a maior exposição da mucosa intestinal ao meio externo, favorecendo esse transporte.

Valladares-Méndez *et al.* (2017) utilizaram o naproxeno como marcador de alta permeabilidade em experimentos realizados com o modelo de saco intestinal invertido e sem banho de gelo. A Papp obtida foi de $15,4 \cdot 10^{-6}$ cm/s, valor muito semelhante ao marcador de baixa permeabilidade utilizado, a furosemida, com Papp igual a $11,6 \cdot 10^{-6}$ cm/s. Os autores não discutem o motivo de tais resultados, mas os utilizam com fim de comparação à Papp de duas moléculas em desenvolvimento.

Dependendo da técnica utilizada, nota-se grande variação dos resultados de permeabilidade de uma substância, no caso do naproxeno, em experimento utilizando células Caco-2, a Papp obtida foi igual a $48,8 \cdot 10^{-6}$ cm/s (CORTI *et al.*, 2008).

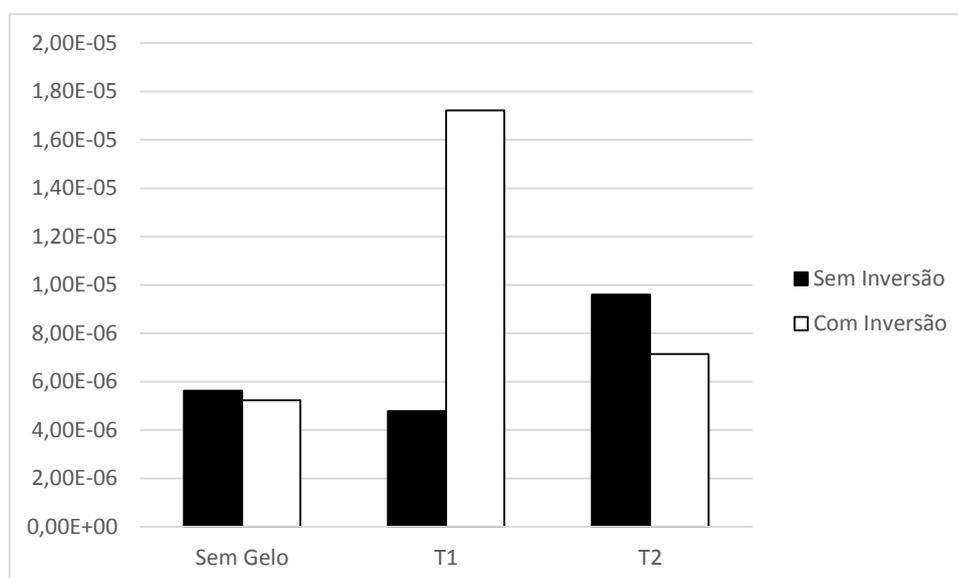
Dados publicados por Zazeri-Milani *et al.* (2005), demonstram que a permeabilidade efetiva do naproxeno foi igual a $117,00 \cdot 10^{-6}$ cm/s em estudo de perfusão intestinal *in situ* realizado com ratos da linhagem Wistar.

Em um modelo de perfusão intestinal, especificamente na região proximal do jejuno de humanos, a permeabilidade efetiva do naproxeno foi de $850,00 \cdot 10^{-6}$ cm/s. (LENNERNÄS, 2014).

Levando em conta apenas as variáveis envolvendo o banho de gelo, não há diferença significativa entre as médias da Papp do naproxeno ($p > 0,05$). Os valores expressos na figura 33 são: Sem banho de gelo ($5,43 \pm 3,36 \cdot 10^{-6}$ cm/s), T1 ($11,00 \pm 11,61 \cdot 10^{-6}$ cm/s) e T2 ($8,38 \pm 5,33 \cdot 10^{-6}$ cm/s).

A Figura 34 traz a representação gráfica desses resultados de forma detalhada, considerando os experimentos com e sem inversão do saco intestinal.

Figura 34 Papp do naproxeno com as variáveis envolvendo inversão do saco intestinal e banho de gelo



Fonte: autoria própria

Nota-se que, nos experimentos sem inversão do saco intestinal, a variável T2 apresentou valor médio igual a $9,60 \pm 2,9 \cdot 10^{-6}$ cm/s, que é significativamente maior ($p < 0,001$) em relação aos demais banhos de gelo (Sem gelo = $5,63 \pm 1,41 \cdot 10^{-6}$ cm/s) e (T1 = $4,78 \pm 2,17 \cdot 10^{-6}$ cm/s).

Ao inverter o saco intestinal, constatou-se que no tempo de gelo T1 houve aumento significativo ($p < 0,05$) da Papp média do naproxeno, $17,22 \pm 13,88 \cdot 10^{-6}$ cm/s.

Por se tratar de um marcador de alta permeabilidade, esses valores se destacam entre os resultados obtidos no presente estudo.

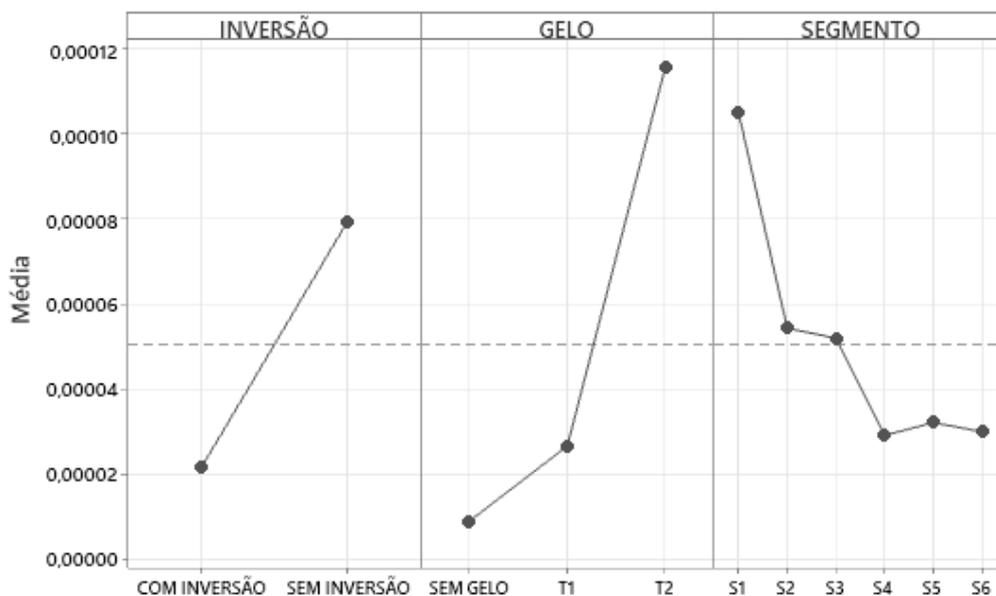
A presença do verapamil não interferiu de forma significativa na Papp do naproxeno ($p > 0,05$), resultado esperado, uma vez que o transporte do naproxeno se dá por difusão passiva e o verapamil é um inibidor da P-gp (WROBLEWSKA *et al.*, 2016).

Independente se houve ou não inversão do saco intestinal, não se observou diferença significativa da Papp do naproxeno ao longo dos segmentos intestinais ($p > 0,05$).

5.3.5 Permeabilidade aparente: Famotidina

A Figura 35 refere-se à demonstração gráfica dos efeitos principais das variáveis de estudo sobre a Papp da famotidina e o Quadro 16 contém os valores de média \pm desvio padrão apresentados no gráfico correspondente. Os resultados da análise de variância demonstraram que a inversão do saco intestinal não interferiu de forma significativa na Papp da famotidina ($p > 0,05$).

Figura 35 Representação gráfica de efeitos principais entre a diferentes condições experimentais e a Papp da famotidina



Fonte: autoria própria

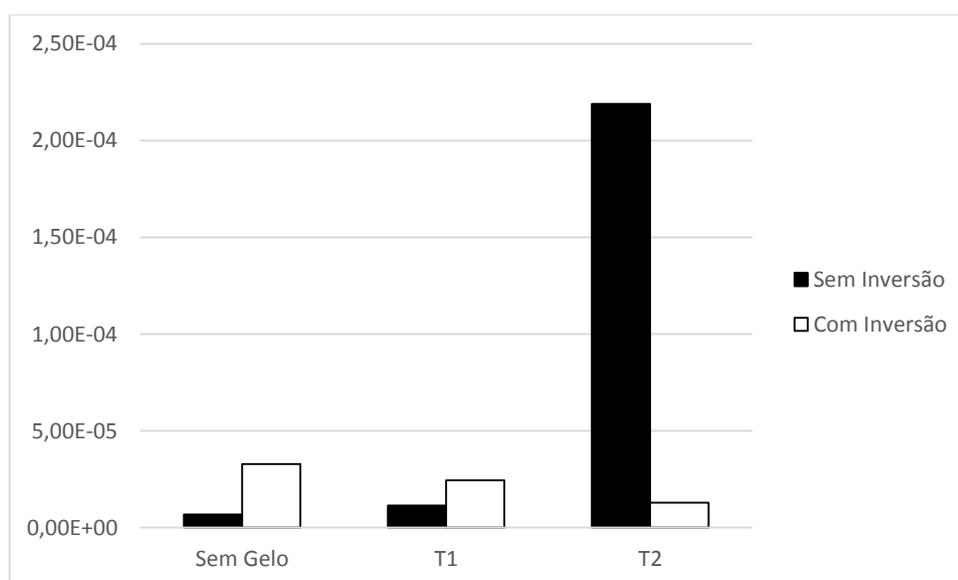
Quadro 16 Valores médios de Papp da famotidina representados no gráfico de interações principais

Condições experimentais	Famotidina Papp.10 ⁻⁶ cm/s
Com inversão	25,5 ± 20,2
Sem inversão	51,0 ± 11,10
Sem banho de gelo	19,80 ± 20,64
Gelo T1	17,87 ± 20,49
Gelo T2	115,88 ± 156,00

Fonte: autoria própria

É possível constatar grande variabilidade dos resultados da Papp da famotidina entre as diferentes condições experimentais, mas com relação ao banho de gelo T2 nos experimentos sem inversão do saco intestinal, nota-se aumento expressivo da Papp desse fármaco ($p < 0,001$). Uma vez que a famotidina é transportada por via paracelular (HAKKER *et al.*, 1999), esse aumento indica que houve lesão tecidual. Nos experimentos com inversão do saco intestinal não há diferença significativa do valor médio de Papp de famotidina entre os diferentes tempos de gelo ($p > 0,05$). O gráfico representado pela Figura 36 ilustra de forma mais clara tal resultado.

Figura 36 Papp da famotidina com as variáveis envolvendo inversão do saco intestinal e banho de gelo



Fonte: autoria própria

Os valores de Papp de famotidina na literatura também diferem bastante um dos outros dependendo da técnica experimental utilizada. Rozenhnal *et al.* (2012) realizaram experimentos utilizando intestino delgado humano no modelo experimental da câmara de Ussing. A Papp da famotidina obtida foi igual a $1,12 \pm 0,44 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$. Dubbelboer *et al.* (2019) efetuaram extensa busca na literatura e compilaram resultados de múltiplas determinações da permeabilidade efetiva de diversos fármacos em estudos com a técnica de perfusão intestinal *in situ* em ratos. Para a famotidina, o valor encontrado foi de $3,7 \pm 0,87 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$.

Uma vez que a famotidina é um fármaco que apresenta baixa permeabilidade, no presente estudo destaca-se o menor valor com as variáveis: “Sem inversão do saco intestinal” e “Sem gelo”, com Papp igual a $0,72 \pm 0,37 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$.

Quanto aos diferentes segmentos intestinais, embora seja possível observar valores mais elevados de Papp de famotidina nos segmentos proximais, essa diferença não é significativa ($p > 0,05$). Essa tendência foi confirmada em estudo de perfusão intestinal *in situ* realizado por Dahan e Amidon (2009).

A análise fatorial multinível também demonstrou que o verapamil não interferiu de forma significativa na Papp da famotidina, com valor de $p > 0,05$. Reforçando esse dado, a publicação de Dahan e Amidon (2009) demonstrou que esse fármaco é substrato da P-gp, mas sua permeabilidade só é afetada nos segmentos distais do intestino delgado, principalmente no íleo.

Ao verificar os resultados de forma individual (Quadro 16), é interessante o fato de que na maioria das condições experimentais a Papp do marcador de alta permeabilidade (naproxeno) foi maior do que o de baixa (famotidina). Valladares-Méndez *et al.* (2017) obtiveram resultados em que o marcador de alta permeabilidade (naproxeno) apresentou Papp semelhante ao marcador de baixa permeabilidade (furosemida), $15,4 \cdot 10^{-6}$ e $11,6 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$, respectivamente. Entretanto não discutiram esse resultado em especial.

Ao analisar todas as interferências das variáveis experimentais na Papp dos fármacos, é possível concluir que nos experimentos com e sem inversão, os variados tempos de gelo interferem de formas diferentes e, muitas vezes significativa no resultado final da concentração de glicose ou na permeabilidade aparente. Admitindo maiores valores de Papp para o marcador de alta permeabilidade (naproxeno) e baixos valores para o marcador de baixa permeabilidade (famotidina), o Quadro 17

traz um breve resumo das condições experimentais que devem ser adotadas ou evitadas.

Quadro 17 Resumo das condições experimentais a serem adotadas ou evitadas

	Sem inversão		Com inversão	
	<i>Adotar</i>	<i>Evitar</i>	<i>Adotar</i>	<i>Evitar</i>
Glicose	Sem gelo	T1 e T2	Sem gelo ou T1	T2
Naproxeno	T2	Sem gelo e T1	T1	Sem gelo e T2
Famotidina	Sem gelo ou T1	T2	Sem gelo, T1 ou T2	-

Fonte: autoria própria

É possível observar que o tempo de gelo T2 corresponde a variável experimental que trouxe maiores interferências negativas nos resultados finais de glicose e permeabilidade aparente do naproxeno e da famotidina.

Nos experimentos com inversão do saco intestinal, o tempo de gelo T1 apresentou resultados favoráveis em todos os parâmetros analisados.

Nos ensaios sem inversão do saco intestinal observa-se maior variação de recomendações quanto ao banho de gelo, portanto não é possível se estabelecer uma única condição experimental nesse caso. Mas, nos experimentos sem inversão do saco intestinal e sem banho de gelo foi possível observar que os valores de Papp do naproxeno ($5,45 \pm 1,27 \cdot 10^{-6}$ cm/s e $5,80 \pm 1,64 \cdot 10^{-6}$ cm/s) foram maiores que os da famotidina ($4,02 \pm 2,51 \cdot 10^{-6}$ cm/s e $0,72 \pm 0,37 \cdot 10^{-6}$ cm/s). O aumento a Papp da famotidina na presença do verapamil vai ao encontro dos achados de Dahan e Amidon (2009), os quais demonstram que esse fármaco é um substrato da P-gp.

Existem diferentes técnicas para a determinação da permeabilidade de substâncias ao longo do TGI, cada uma delas possui vantagens, desvantagens e limitações. A técnica do saco intestinal se demonstrou econômica, de fácil execução, útil para estudos envolvendo transportadores de membrana, preserva a estrutura do tecido, o que é importante para a investigação do transporte de substâncias por via transcelular ou paracelular, por exemplo. Além disso, apresenta diversas formas de se avaliar a viabilidade tecidual. Outra vantagem a ser destacada relaciona-se à fácil quantificação de fármacos no tampão de incubação nos experimentos com inversão

do saco intestinal, uma vez que há maior concentração dos mesmos no meio externo, não são necessários métodos quantitativos de elevada sensibilidade.

No entanto, possui limitações, como a falta de inervação e vascularização, reduzido muco intestinal, ausência de fluidos intestinais (ALAM; AL-JENOABI; AL-MOHIZEA, 2011). Além da grande variabilidade de resultados que está relacionada a diferentes condições experimentais, segmento intestinal empregado e viabilidade intestinal limitada a cerca de duas horas.

Quanto ao aspecto ético na utilização de animais na pesquisa, há anos extensas buscas são realizadas para substituição do modelo animal por outros *in vitro* ou *in silico*, no entanto, para a realização desta técnica, é possível que os demais tecidos e órgãos provenientes de um mesmo animal sejam empregados em outras pesquisas científicas. Para isso é necessária uma rede de comunicação eficaz entre pesquisadores e comitês de ética de uma instituição.

A qualidade dos resultados de permeabilidade aparente e efetiva é importante para a construção de modelos *in silico* e a falta de padronização das condições experimentais dificulta ainda mais essa evolução (LENNERNAS, 2007). A Agência Europeia de Medicamentos (2018) estabelece que, nos ensaios para determinação de Papp com células Caco-2, deve-se utilizar substâncias padronizadas que servem de marcadores de baixa, moderada e alta permeabilidade, com o intuito de comparar os resultados com o fármaco em estudo e assim classifica-lo quanto a sua permeabilidade no SCB. A partir dessa premissa, a técnica do saco intestinal poderia ser empregada na classificação da permeabilidade de uma substância a partir da comparação entre marcadores de alta e baixa permeabilidade, no entanto, devido a grande variabilidade de condições experimentais, dificilmente os resultados podem ser comparados entre diferentes laboratórios.

Embora a realização dos experimentos tenha sido feita em um único laboratório, por um mesmo analista, utilizando apenas uma técnica cirúrgica, com os mesmos aparatos para todas as replicatas, foi constatada grande variabilidade dos resultados, portanto são necessários estudos complementares que avaliem a Papp de diferentes fármacos com o controle das condições experimentais com o intuito de reduzir tamanha variabilidade. Também é importante avaliar se há interferência significativa nos resultados quando se muda o analista ou o experimento é realizado em laboratórios diferentes sob mesmas condições experimentais.

5.3.5 Permeabilidade aparente: Losartana

A losartana é um fármaco substrato da P-gp, que é expressa na membrana apical dos enterócitos, é um transportador de efluxo e limita a absorção de xenobióticos (TERAO *et al.*, 1996).

Achados de Dahan e Amidon (2009) e Tian *et al.* (2002) demonstraram que a expressão de P-gp é crescente ao longo do intestino delgado de ratos e camundongos, com menor expressão nas regiões proximais e maior expressão no íleo, os resultados do presente estudo indicam que não há diferença significativa da Papp de losartana entre os segmentos do jejuno ($p > 0,05$).

Considerando que as condições experimentais ideais foram “sem inversão do saco intestinal” e “sem banho de gelo”, foi obtida Papp média de losartana na ausência de verapamil foi igual a $0,66 \pm 18,92 \cdot 10^{-6}$ cm/s. Dados provenientes de estudo com células Caco-2 demonstram Papp da losartana igual a $1,05 \pm 0,21 \cdot 10^{-6}$ cm/s (ZHAO; WEI; ZHANG, 2019)

Em um levantamento de dados publicados com a técnica de perfusão intestinal *in situ* em ratos, Dubbelboer *et al.* (2019) demonstram que o valor médio de permeabilidade efetiva da losartana é de $48,7 \pm 29,5 \cdot 10^{-6}$ cm/s. Já a permeabilidade efetiva desse fármaco em experimentos de perfusão intestinal em humanos é igual a $11,5 \cdot 10^{-6}$ cm/s (LENNERNÄS, 2014).

Os resultados encontrados na literatura diferem bastante um dos outros e também entre os valores obtidos no presente estudo, variando de $0,66 \pm 0,55 \cdot 10^{-6}$ cm/s a $31,16 \pm 13,43 \cdot 10^{-6}$ cm/s.

A presença do verapamil, não interferiu de forma significativa na Papp da losartana ($p > 0,05$). Uma vez que se trata de um inibidor da P-gp, esse reduz o transporte de efluxo da losartana no sentido basal-apical (HUSAIN *et al.*, 2022), logo seria esperado o aumento da Papp da losartana, como observado por Zhao *et al.* (2019) em seus experimentos com células Caco-2.

É importante ressaltar que achados do presente estudo utilizando as variáveis “sem inversão do saco intestinal” e “sem gelo”, as mesmas que demonstraram coerência entre os valores de Papp do naproxeno e famotidina, apresentaram discreto aumento da Papp da losartana na presença do verapamil: de $0,66 \pm 0,55 \cdot 10^{-6}$ cm/s para $2,65 \pm 2,61 \cdot 10^{-6}$ cm/s. No entanto, não houve significância estatística, com valor de $p > 0,05$.

6. CONCLUSÃO

As diferentes condições experimentais adotadas para realização da técnica do saco intestinal demonstraram influências bastante significativas na permeabilidade aparente de fármacos e corroboraram para grande variabilidade de resultados.

A glicose se mostrou um ótimo marcador de viabilidade tecidual, enquanto que a presença ou ausência de movimentos peristálticos não apontou relação com esse parâmetro.

Com relação a correta ressecção dos segmentos intestinais, é importante que o intestino delgado seja dividido corretamente em duodeno, jejuno e íleo, segundo a anatomia da espécie em estudo, uma vez que pode haver diferenças significativas na permeabilidade de substâncias entre essas porções.

A técnica se mostrou eficiente para estudos envolvendo substratos da glicoproteína-P e compostos com diferentes formas de transporte celular, além disso é de fácil execução e baixo custo. As principais desvantagens identificadas relacionam-se a falta de parâmetros fisiológicos, como a inervação, vascularização e presença de fluidos intestinais. Além da elevada variabilidade dos resultados obtidos.

A partir dos resultados de permeabilidade aparente dos marcadores de alta e baixa permeabilidade, recomenda-se que nos experimentos realizados com inversão do saco intestinal se utilize o banho de gelo T1, que corresponde a submersão do segmento intestinal em banho de gelo e sua lavagem com soro fisiológico gelado imediatamente após sua ressecção. No entanto, quando não se realiza inversão do saco intestinal, nenhum tipo de banho de gelo é recomendado.

No momento atual, as limitações da técnica podem impossibilitar sua aplicação para a classificação dos fármacos no SCB, mas esta se mostra bastante eficiente no estudo do mecanismo de transporte de substâncias ao longo do intestino, bem como na determinação da permeabilidade de novos compostos logo nas fases iniciais de desenvolvimento, desde que sejam utilizados marcadores com diferentes graus de permeabilidade com efeito de comparação.

A falta de padronização das condições experimentais dificulta a comparação dos resultados entre diferentes laboratórios, mesmo se tratando de um mesmo modelo experimental. Portanto são necessários estudos complementares que controlem essas condições com o objetivo de reduzir tamanha variabilidade de resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSOHN, P. **Histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

ALAM, M. A.; AL-JENOABI, I.; AL-MOHIZEA, A. M. Everted gut sac model as a tool in pharmaceutical research: limitations and applications. 2011.

ALI, B. *et al.* **Enhancement of gut permeation of amoxicillin with Nigella sativa seed extract and its phytochemical screening**. **Chinese Journal of Natural Medicines**, 2018.

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

ANVISA. **Conceitos e definições**. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao/perguntasfrequentes/medicamentos/conceitos-e-definicoes>. Acesso em: 26 ago. 2022.

ARAÚJO, L. S. Impacto das condições de cultura de células Caco-2 na avaliação da permeabilidade intestinal do biomarcador ácido ent-poliáltico da oleorresina de *Copaifera duckei*. 2021. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021. doi:10.11606/D.60.2021.tde-26112021-161533. Acesso em: 2022-12-05.

BAKER, H. J.; LINDSEY, J. R.; WEISBROTH, S. H. **The laboratory rat: biology and diseases**. Nova Iorque: Orlando Academic Press, 1980. v. 1

BARTHE, L. *et al.* **An improved everted gut sac as a simple and accurate technique to measure paracellular transport across the small intestine**. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**. **Anais...**1998.

BARTOS, C. *et al.* Comparison of modern in vitro permeability methods with the aim of investigation nasal dosage forms. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 6, 2021.

BRASIL^a. **Resolução nº 482**, de 19 de março de 2002. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasil, 2002. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2002/res0482_19_03_2002.html>. Acesso em 20 ago. 2022.

BRASIL^b, **Resolução de Diretoria Colegiada nº 37**, de 03 de agosto de 2011. Dispõe sobre o Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência e dá outras providências. Brasília, DF. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0037_03_08_2011.pdf/13c41657-e93b-4d09-99eb-377f760f3aa0>. Acesso em: 22 ago. 2022.

BRASIL^c. **Instrução Normativa nº 4**, de 03 de agosto de 2011. Dispõe sobre a lista de fármacos candidatos à bioisenção baseada no sistema de classificação

biofarmacêutica (SCB) e dá outras providências. Brasília, DF. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/int0004_03_08_2011.html> Acesso em: 22 ago. 2022.

BRASIL^d. **Resolução de Diretoria Colegiada nº 166**, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Brasil. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401> Acesso em 22 ago. 2022.

BRASIL^e. **Resolução nº 899**, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Brasil. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0899_29_05_2003.html>. Acesso em 10 ago. 2022.

BRASIL^f. **Resolução de Diretoria Colegiada nº 27**, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Brasil. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html>. Acesso em 21 ago 2022.

BUXTON, I. L. O. Pharmacokinetics: The Dynamics of Drug Absorption, Distribution, Metabolism, and Elimination. In: BRUNTON, L. L.; HILAL-DANDAN, R.; KNOLLMANN, B. C. (Eds.). **Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 13e**. New York, NY: McGraw-Hill Education, 2017.

CDER/FDA. **Drug interactions and labeling - Drug development and drug interactions: table of substrates, inhibitors and inducers**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DrugInteractionsLabeling/ucm093664.htm>>. Acesso em: 9 set. 2019.

CDER/FDA. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Evaluation and Research (CDER). **Guidance for Industry: In Vitro Metabolism- Mediated Drug-Drug and Transporter- Interaction Studies. Draft Guidance**, n. December, p. 1–16, 2017.

CORTI, G. *et al.* Dissolution and permeation properties of naproxen from solid-state systems with chitosan. **Drug Delivery**, v. 15, n. 5, p. 303–312, 2008.

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

DEZANI, T. M. **Avaliação dos mecanismos envolvidos na permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio do modelo de perfusão in situ em ratos**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2017.

DUBBELBOER, I. R. *et al.* Rat intestinal drug permeability: A status report and

summary of repeated determinations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 142, p. 364–376, 1 set. 2019.

EDDINGTON, N. D. *et al.* Development and internal validation of an in vitro - in vivo correlation for a hydrophilic metoprolol tartrate extended release tablet formulation. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 3, p. 466–473, 1998.

FERRARIS, R. P.; CAREY, H. V. INTESTINAL TRANSPORT DURING FASTING AND MALNUTRITION. **Annual Reviews Nutr.**, v. 20, p. 195–219, 2000.

FISHER, Jeffrey W. *et al.* (ed.). **Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling: methods and applications in toxicology and risk assessment**. Londres: Academic Press, 2020.

GARRAIT, G. *et al.* Gastrointestinal absorption and urinary excretion of trans-cinnamic and p-coumaric acids in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 8, p. 2944–2950, 2006.

GREMIÃO, M. P. D. *et al.* Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 1, 2010.

HAKKER, D. H. R. T. *et al.* Saturable Transport of H₂ -Antagonists Ranitidine and Famotidine Across Caco-2 Cell Monolayers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, n. 7, p. 1–8, 1999.

HAMILTON, K. L.; BUTT, A. G. Glucose transport into everted sacs of the small intestine of mice. **AJP: Advances in Physiology Education**, v. 37, n. 4, p. 415–426, 2013a.

HAMILTON, K. L.; BUTT, A. G. Glucose transport into everted sacs of the small intestine of mice. **American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education**, v. 37, n. 4, p. 415–426, 1 dez. 2013b.

HUSAIN, A. *et al.* Approaches to minimize the effects of P-glycoprotein in drug transport: A review. **Drug Development Research**, 1 jun. 2022.

INCECAYIR, T.; TSUME, Y.; AMIDON, G. L. Comparison of the Permeability of Metoprolol and Labetalol in Rat, Mouse, and Caco-2 Cells: Use as a Reference Standard for BCS Classification. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, p. 958–966, 2013.

INGLATERRA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **ICH guideline M9 on biopharmaceutics classification 5 system based biowaivers**. 2018. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-m9-biopharmaceutics-classification-system-based-biowaivers-step-2b-first-version_en.pdf. Acesso em: 20 ago. 2022.

JONKER, C.; HAMMAN, J. H.; KOTZÉ, A. F. Intestinal paracellular permeation enhancement with quaternised chitosan: In situ and in vitro evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 238, n. 1–2, p. 205–213, 2002.

KOEPSELL, H. Glucose transporters in the small intestine in health and disease. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 472, n. 9, p. 1207–1248, 2020.

LABTEST. **Glicose Liquiform: instruções de uso**. Disponível em: <https://labtest.com.br/wp-content/uploads/2016/09/Ref_133_RevDezembro2011_Ref240214_Port.pdf>. Acesso em: 9 set. 2019.

LACOMBE, O. *et al.* Localisation of drug permeability along the rat small intestine , using markers of the paracellular , transcellular and some transporter routes. v. 23, p. 385–391, 2004.

LENNERNAS, H. Modeling Gastrointestinal Drug Absorption Requires More In Vivo Biopharmaceutical Data: Experience from In Vivo Dissolution and Permeability Studies in Humans. **Current Drug Metabolism**, v. 8, n. 7, p. 645–657, 2007.

LENNERNÄS, H. Human in vivo regional intestinal permeability: Importance for pharmaceutical drug development. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, n. 1, p. 12–23, 2014.

LI-A, M. *et al.* Excipients enhance intestinal absorption of ganciclovir by P-gp inhibition: Assessed in vitro by everted gut sac and in situ by improved intestinal perfusion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, p. 31–45, 2011.

LIFSCHITZ, A. *et al.* Combined use of ivermectin and triclabendazole in sheep: In vitro and in vivo characterisation of their pharmacological interaction. **Veterinary Journal**, v. 182, n. 2, p. 261–268, 2009.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Angelica Rosat Consiglio. In: **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NEVES, S. M. P.; FILHO, J. M.; WENZEL DE MENEZES, E. **Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. Disponível em: <<http://interactivepdf.uniflip.com/2/81637/296210/pub/document.pdf>>. Acesso em: 9 set. 2019.

PARAISO, R. L. M. **Determinação da solubilidade e permeabilidade de fármacos conforme o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB)**. Universidade de São Paulo, 2012.

PORTA, V. **Métodos Biofarmacêuticos na Garantia de Eficácia e Segurança de Medicamentos**. Universidade de São Paulo, 2013.

PRASAD, V.; MAILANKODY, S. Research and development spending to bring a single cancer drug to market and revenues after approval. **JAMA Internal Medicine**, v. 177, n. 11, p. 1569–1575, 2017.

PRATAP SINGH, S. *et al.* Simultaneous determination of nine model compounds in permeability samples using RP-HPLC: Application to prove the cassette administration

principle in single pass intestinal perfusion study in rats. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, p. 71–76, 2012.

QUEVEDO, M. A. *et al.* In vitro and in vivo pharmacokinetic characterization of two novel prodrugs of zidovudine. **Antiviral Research**, v. 83, p. 103–111, 2009.

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

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

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

SA, C. *et al.* The effects of notoginsenoside R 1 on the intestinal absorption of geniposide by the everted rat gut sac model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 1, p. 136–143, 2012.

SCHOULTZ, I.; KEITA, Å. V. The Intestinal Barrier and Current Techniques for the Assessment of Gut Permeability. **Cells**, v. 9, n. 8, p. 1–30, 2020.

SCIENCES, P. Particle Sciences is a leading integrated provider of formulation and analytic services and both standard and nanotechnology. **Particle Sciences**, 2009.

SHARGEL, Leon *et al* (ed.). **Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics**. 7. ed. Nova Iorque: McGraw Hill Education, 2016.

SHARMA, P.; CHAWLA, H. P. .; PANCHAGNULA, R. LC determination of cephalosporins in in vitro rat intestinal sac absorption model. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 27, n. 1–2, p. 39–50, 1 jan. 2002.

SILVA, L. C. DA. **Desenvolvimento e validação de um novo modelo de permeabilidade intestinal**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, 2014.

TERAO, T. *et al.* Active secretion of drugs from the small intestinal epithelium in rats by P-glycoprotein functioning as an absorption barrier. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 48, n. 10, p. 1083–1089, 1996.

TIAN, R. *et al.* **Effects of Grapefruit Juice and Orange Juice on the Intestinal Efflux of P-Glycoprotein Substrates**. [s.l: s.n.].

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. **Princípios de Anatomia e Fisiologia**. 12. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. **GUIA DE ANESTESIA E ANALGESIA PARA RATOS E CAMUNDONGOS**. Disponível em:

<http://www.ufrgs.br/creal/informacoes/anestesia_FINAL_2016.pdf>. Acesso em: 9 set. 2019.

VELDANDI, U. K. *et al.* Development and Validation of HPLC Method for the Determination of Losartan in Human Plasma. **Reviews in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 1, jan. 2010.

VOLPE, D. A. Application of Method Suitability for Drug Permeability Classification. **The AAPS Journal**, v. 12, n. 4, p. 670–678, 2010.

WECKER, L.; TAYLOR, D. A.; THEOBALD JR, R. J. **Brody's Human Pharmacology: mechanism-based therapeutics**. 6. ed. Filadélfia: Elsevier, 2019.

WILSON, T. H.; WISEMAN, G. The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface. **The Journal of Physiology**, v. 123, n. 1, p. 116–125, 1954.

WROBLEWSKA, L. *et al.* pH dependent but not P-gp dependent bidirectional transport study of S-propranolol: the importance of passive diffusion. **Pharm Res**, v. 32, n. 8, p. 839–841, 2016.

YANG, Y. *et al.* Oral drug absorption: Evaluation and prediction. In: **Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice**. 2 ed. p. 331–354, 2017.

YERASI, N.; VURIMINDI, H.; DEVARAKONDA, K. Frog intestinal perfusion to evaluate drug permeability: Application to P-gp and CYP3A4 substrates. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, n. 141, 2015.

ZAKERI-MILANI, P. *et al.* Simultaneous determination of naproxen, ketoprofen and phenol red in samples from rat intestinal permeability studies: HPLC method development and validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n. 3–4, p. 624–630, 15 set. 2005.

ZARGHI, A. *et al.* Development of a rapid HPLC method for determination of famotidine in human plasma using a monolithic column. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n. 3–4, p. 677–680, 2005.

ANEXO



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

CEUA/FCF 109.2018-P574

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Estudo da permeabilidade de fármacos por meio do modelo de saco intestinal de ratos**, registrada com o nº **574**, sob a responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Bruna Kogici Mohammed Hatem**, sob orientação do(a) **Profa. Dra. Valentina Porta** – que envolve produção ou manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto Federal nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e das normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), em reunião de **06 de novembro de 2018**.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	06/11/2018 a 31/07/2020
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> - Wistar
Número de animais	40
Sexo	Macho
Peso/Idade	200 - 300g – 8 semanas
Origem	Biotério de Produção de Ratos do ICB-USP

Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento do projeto de pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 09 de novembro de 2018.


Prof. Dra. Sabrina Epiphânio
Vice-Coordenadora CEUA/FCF/USP