

Optimização de um método de avaliação simultânea da dissolução e permeabilidade de fármacos

Pedro Ferreira¹, Hugo Serra^{1,2}, João Mário Pedro³, Anabela Graça³, Ana Luísa Simplício¹

1. Laboratório de Farmacocinética e Análise Biofarmacêutica, IBET/ ITQB-UNL. pedro_gferreira@hotmail.com.

2. Medinfar.

3. Área Científica de Farmácia, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa.

RESUMO: Englobado na temática do desenvolvimento de métodos *in vitro* para avaliação da biodisponibilidade de fármacos, este trabalho de investigação teve como objectivo a optimização de um método para avaliar em simultâneo a dissolução e permeabilidade de fármacos usando uma célula de fluxo bilateral com membranas de *Polyvinylidene Fluoride* (PVDF). Através de uma avaliação inicial, na qual se testou o efeito de diversas variáveis na permeabilidade da cafeína e do ácido acetilsalicílico, obtiveram-se resultados que permitiram concluir que os ensaios realizados são mais reprodutíveis, quando a célula de fluxo é utilizada em circulação unilateral no lado dador e com agitação do lado aceitador. Observou-se ainda que o método permite detectar a influência do pH (P_{app} da cafeína a pH 7,4 e 4,5: $4,84 \pm 1,57 \times 10^{-5} \text{cm.s}^{-1}$ e $6,00 \pm 0,70 \times 10^{-5} \text{cm.s}^{-1}$; P_{app} do ácido acetilsalicílico a pH 7,4 e 4,5: $3,85 \pm 0,38 \times 10^{-5} \text{cm.s}^{-1}$ e $5,11 \pm 0,65 \times 10^{-5} \text{cm.s}^{-1}$) e dos excipientes (P_{app} da cafeína isoladamente e em presença de excipientes: $6,76 \pm 1,22 \times 10^{-5} \text{cm.s}^{-1}$ e $5,84 \pm 0,43 \times 10^{-5} \text{cm.s}^{-1}$; P_{app} do ácido acetilsalicílico isoladamente e em presença de excipientes: $7,07 \pm 1,56 \times 10^{-5} \text{cm.s}^{-1}$ e $5,19 \pm 0,23 \times 10^{-5} \text{cm.s}^{-1}$) na permeabilidade dos compostos. Na avaliação da dissolução testou-se um método descrito na United States Pharmacopeia (USP) com meio de dissolução a pH 4,5 e um método com meio de dissolução a pH 7,4 pois na perspectiva de no futuro se realizarem ensaios com membranas celulares Caco-2, foi necessário testar um meio compatível com estas. As percentagens de dissolução dos ensaios a pH 7,4 foram de 96,3% para a cafeína e de 87,1% para o ácido acetilsalicílico, o que permitiu a utilização deste meio, visto ter sido superior ao limite mínimo de 80% estabelecido pela USP. Após estabelecimento das metodologias de dissolução e permeabilidade individuais, passou-se ao acoplamento das duas técnicas, tendo sido realizados ensaios de dissolução/permeabilidade com uma forma farmacêutica contendo os dois compostos em estudo (Melhoral®), nos quais se obtiveram permeabilidades aparentes de $3,97 \pm 0,37 \times 10^{-5} \text{cm.s}^{-1}$ e $3,69 \pm 0,29 \times 10^{-5} \text{cm.s}^{-1}$ para a cafeína e ácido acetilsalicílico a pH 4,5 e de $3,77 \pm 0,40 \times 10^{-5} \text{cm.s}^{-1}$ e $4,08 \pm 0,04 \times 10^{-5} \text{cm.s}^{-1}$ para a cafeína e ácido acetilsalicílico a pH 7,4, resultados estes que foram reprodutíveis e discriminativos e que perspectivam a possibilidade da utilização do sistema para futuros trabalhos envolvendo membranas de culturas celulares (Caco-2) ou tecidos (pele ou intestino).

Palavras-chave: biodisponibilidade, dissolução, permeabilidade, métodos *in vitro*.

Optimization of a drug simultaneous dissolution and permeability screening method

ABSTRACT: The goal of this research project was the optimization of a method for simultaneously screen the dissolution rate and the permeability of drug formulations across Polyvinylidene Fluoride membranes, using a bilateral flow cell. Initially, the effect of several variables was tested on caffeine and acetylsalicylic acid permeability. The obtained results showed that the method is more reproducible when the flow cell is used with unilateral flow at the donor side and with stirring on the acceptor side. It was also showed that the method is able to detect the influence of pH (caffeine P_{app} at pH 7,4 and 4,5: $4,84 \pm 1,57 \times 10^{-5} \text{cm.s}^{-1}$ and $6,00 \pm 0,70 \times 10^{-5} \text{cm.s}^{-1}$; acetylsalicylic acid P_{app} at pH 7,4 and 4,5: $3,85 \pm 0,38 \times 10^{-5} \text{cm.s}^{-1}$ and $5,11 \pm 0,65 \times 10^{-5} \text{cm.s}^{-1}$) and excipients (P_{app} of isolated caffeine

and in the presence of excipients: $6,76 \pm 1,22 \times 10^{-5} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ and $5,84 \pm 0,43 \times 10^{-5} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$; P_{app} of isolated acetylsalicylic acid and in the presence of excipients: $7,07 \pm 1,56 \times 10^{-5} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ and $5,19 \pm 0,23 \times 10^{-5} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ in drug permeability. A dissolution medium with pH 4.5, defined in the United States Pharmacopeia (USP) for caffeine/acetylsalicylic acid tablets, was used. Another biorelevant method was developed using a dissolution media with pH 7.4 due to the future goal of testing drugs permeability with Caco-2 cellular membranes. The dissolution percentages with this new media were of 96,3% for caffeine and 87,1% for the acetylsalicylic acid, higher then the 80% minimum limit described by the USP, making it possible to use this media in all the permeability assays. After the establishment of the isolated dissolution and permeability methodologies, the next step was the connection of both techniques. The dissolution/permeability assays were performed with a commercial pharmaceutical form containing both caffeine and acetylsalicylic acid (Melhoral®). The permeability results were reproducible and allowed discrimination between different media, opening therefore the possibility of its application in future works using cellular (Caco-2) or tissue (skin and intestinal) membranes.

Keywords: bioavailability, dissolution, permeability, in vitro methods.

Introdução

A utilização cada vez mais recorrente de métodos *in vitro* justifica-se pela constante evolução científica no campo das ciências da saúde, e mais concretamente na tecnologia farmacêutica, a qual tem vindo a proporcionar um aumento na investigação de moléculas com novos efeitos terapêuticos e no desenvolvimento de outras com efeitos equivalentes a moléculas já existentes.

No entanto, o desenvolvimento de novos fármacos é um processo demorado e que comporta elevados custos financeiros¹⁻², o que, aliado à tendência crescente de reduzir a realização de ensaios em humanos e animais, tem levado à consciencialização da necessidade de desenvolver novos métodos *in vitro* com o objectivo de aumentar a eficiência do processo. A utilização destes métodos, principalmente nas fases iniciais de investigação, permite também uma selecção precoce dos compostos em desenvolvimento e o descarte dos compostos menos promissores, garantido uma maior probabilidade de sucesso nas fases seguintes, nomeadamente nos ensaios clínicos³.

Na tentativa de desenvolver métodos *in vitro* que simulem cada vez melhor o processo *in vivo*, foram já desenvolvidos diversos modelos que avaliam a permeabilidade de princípios activos isolados. Os mais utilizados são o modelo Caco-2 e PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*) que se baseiam na utilização de uma membrana celular no primeiro caso, e fosfolipídica no segundo³⁻⁵.

No entanto, devido à limitação que estes apresentam, pelas suas dimensões, de apenas permitirem avaliar compostos já previamente solubilizados, têm vindo a ser desenvolvidos outros modelos que integram os passos da dissolução e absorção. Estes modelos permitem testar a permeabilidade de um fármaco a partir da sua forma farmacêutica sólida^{3,6-8}.

O presente trabalho de investigação realizou-se na tentativa de responder ao mesmo problema que os estudos referidos, reproduzindo mais fielmente o processo que ocorre *in vivo*, perspectivando-se assim a sua utilização futura no estabelecimento de correlações *in vivo/in vitro*.

O objectivo principal foi a avaliação da viabilidade de utilização de uma célula de fluxo previamente construída no laboratório para determinação simultânea da solubilidade/permeabilidade de formas farmacêuticas sólidas, tendo sido para isso necessário alcançar os objectivos da optimização do método de determinação da permeabilidade da cafeína e ácido acetilsalicílico em separado e conjuntamente em célula de fluxo e avaliada a precisão da determinação, utilizando diferentes tipos de membranas e variando outros parâmetros considerados relevantes, o desenvolvimento de um método de dissolução adequado e a aplicação do modelo para determinação da dissolução e permeabilidade, em contínuo, usando formas comercialmente disponíveis de cafeína e ácido acetilsalicílico e avaliada a sua reprodutibilidade.

Metodologia

Equipamento, materiais e reagentes

Os ensaios de permeabilidade foram conduzidos em célula de fluxo contínuo previamente projectada e desenvolvida pelo laboratório (Figura 1). Para os ensaios de dissolução foi utilizado o aparelho tipo II (cestos). Para promover o fluxo na célula de permeabilidade e entre esta e o aparelho de dissolução, utilizou-se uma bomba peristáltica (*Masterflex 7524-05, Cole-Parmer*) e tubos de silicone para direccionar o fluxo.

Como solventes para as soluções e como eluentes para HPLC utilizou-se água desionizada, acetonitrilo, metanol e ácido acético glacial, todos da *Lab-Scan*.

As membranas artificiais utilizadas nos ensaios de permeabilidade foram de PVDF *Millipore*, com $0,22 \mu\text{m}$ de diâmetro de poros.

Os compostos a analisar foram a cafeína (98%, *SAFC*) e o ácido acetilsalicílico (99%, *SIGMA*) e a forma farmacêutica que contém ambos os princípios activos, o Melhoral®.

A quantificação dos princípios activos das amostras foi efectuada pelo método do padrão externo, por HPLC, utilizando um aparelho Elite LaChrom (*Hitachi*), com um detector de vector de díodos (L-2455), forno para a coluna

Tabela 1: Descrição dos ensaios realizados.

Ensaio	Descrição
a	Ensaio de permeabilidade da cafeína em 100ml de solução com concentração de 100ppm em célula de fluxo contínuo com membrana de PVDF, circulação bilateral, meio de transporte tampão fosfato pH 7.4
b	Ensaio de permeabilidade da cafeína em 100ml de solução com concentração de 100ppm em célula de fluxo contínuo com membrana de PVDF, circulação unilateral, meio de transporte tampão fosfato pH 7.4
c	Ensaio de permeabilidade da cafeína em 100ml de solução com concentração de 100ppm em célula de fluxo contínuo com membrana de PVDF, circulação unilateral com agitação, meio de transporte tampão fosfato pH 7.4
d	Ensaio de permeabilidade do ácido acetilsalicílico em 100ml de solução com concentração de 100ppm em célula de fluxo contínuo com membrana de PVDF, circulação unilateral com agitação, meio de transporte tampão fosfato pH 7.4
e	Ensaio de permeabilidade da cafeína em 100ml de solução com concentração de 100ppm em célula de fluxo contínuo com membrana de PVDF, circulação unilateral, agitação, meio de transporte tampão acetato pH 4.5
f	Ensaio de permeabilidade do ácido acetilsalicílico em 100ml de solução com concentração de 100ppm em célula de fluxo contínuo com membrana de PVDF, circulação unilateral, agitação, meio de transporte tampão acetato pH 4.5
g	Ensaio de permeabilidade da cafeína em 100 ml de solução com concentração de 100 ppm em célula de fluxo contínuo com membrana de PVDF, circulação unilateral, agitação, meio de transporte tampão HBSS pH 7.4
h	Ensaio de permeabilidade do ácido acetilsalicílico em 100 ml de solução com concentração de 100 ppm em célula de fluxo contínuo com membrana de PVDF, circulação unilateral, agitação, meio de transporte tampão HBSS pH 7.4
i	Ensaio de permeabilidade da cafeína e do ácido acetilsalicílico em 100 ml de solução com concentração de 60ppm e 1000 ppm respectivamente, em célula de fluxo contínuo com membrana de PVDF, circulação unilateral, agitação, meio de transporte tampão fosfato pH 7.4
j	Ensaio de permeabilidade do Melhoral® em 100ml de solução, em célula de fluxo contínuo com membrana de PVDF, circulação unilateral, agitação, meio de transporte tampão fosfato pH 7.4
k	Ensaio de dissolução/permeabilidade do Melhoral® em 500 ml de solução tampão acetato pH 4.5, em célula de fluxo contínuo com membrana de PVDF, circulação unilateral, agitação
l	Ensaio de dissolução/permeabilidade do Melhoral® em 500 ml de solução tampão fosfato a pH 7.4, em célula de fluxo contínuo com membrana de PVDF, circulação unilateral, agitação

**Figura 1:** Célula de fluxo contínuo**Figura 2:** Montagem do sistema de permeabilidade constituído por célula de fluxo contínuo, bomba peristáltica, tubos de silicone e placa com agitação.

(L-2300) amostrador automático (L-2200) e bomba quadrinária (L-2130). A coluna cromatográfica utilizada era de fase reversa, sendo a fase estacionária do tipo RP18 (250mmx4mm), LiChrospher 100 com tamanho de partícula de 5µm e tamanho de poro de 100Å.

Procedimentos

O trabalho desenvolvido iniciou-se com ensaios de permeabilidade em isolado, seguidos de ensaios de dissolução também em isolado, e após a optimização dos dois parâmetros procedeu-se à realização dos ensaios de dissolução e permeabilidade em simultâneo.

Os ensaios de permeabilidade (Tabela 1) foram optimizados através da avaliação do efeito de algumas variáveis na permeabilidade dos princípios activos e consequente avaliação da reprodutibilidade dos ensaios. Os factores sujeitos a variação foram a circulação unilateral (apenas no lado dador) ou bilateral (no lado dador e aceitador), presença de agitação ou não, o meio de transporte utilizado e respectivo pH, a comparação da permeabilidade dos princípios activos em isolado ou em simultâneo e a

Tabela 2: Valores de P_{app} e % permeada dos ensaios realizados

	P_{app} $10^5 \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$	Porcentagem permeada (%)	Concentração máxima no compartimento dador (ppm)	Concentração máxima no compartimento aceitador (ppm)
a		0,66±0,58	100	3,0
b		0,92±0,56	100	32,7
c	4,84±1,57	0,92±0,22	100	31,0
d	3,85±0,38	0,73±0,07	100	25,0
e	6,00±0,70	1,03±0,21	100	34,7
f	5,11±0,65	0,97±0,12	100	32,5
g	4,72±0,62	0,88±0,10	100	30,0
h	3,01±1,34	0,56±0,25	100	19,0
i cafeína	6,76±1,22	1,27±0,45	60	40,2
ác. acetilsalicílico	7,07±1,56	1,33±0,32	1000	449,9
j cafeína	5,84±0,43	1,08±0,07	60	22,1
ác. acetilsalicílico	5,19±0,23	0,98±0,03	1000	335,0
k cafeína	3,69±0,29	0,15±0,04	60	21,6
ác. acetilsalicílico	3,97±0,37	0,14±0,02	1000	338,2
l cafeína	3,77±0,40	0,16±0,01	60	22,6
ác. acetilsalicílico	4,08±0,04	0,14±0,01	1000	331,3

comparação da permeabilidade dos princípios activos em simultâneo com a permeabilidade de uma formulação comercial dissolvida (Melhoral®), para avaliação do efeito dos excipientes.

A montagem dos equipamentos (Figura 2) foi feita de modo a garantir fluxo através do sistema "recipiente dador → bomba peristáltica → compartimento dador da célula → recipiente dador" em circulação contínua, tendo o cuidado de verificar os tubos de silicone, e os parafusos que unem ambos os compartimentos da célula de fluxo, para evitar eventuais fugas de solução. As membranas utilizadas foram de PVDF.

O fluxo utilizado em todos os ensaios realizados foi 0,8mL/min, já que na perspectiva de utilizar futuramente membranas de células Caco-2, o caudal não poderia ser superior a 1mL/min, visto que colocaria em causa a integridade da monocamada celular⁸. No entanto, visto que a segunda bomba peristáltica apresentava um máximo de 0,8mL/min, foi este o valor seleccionado.

Os ensaios duraram três horas, e foram retiradas amostras de 100µl, com o auxílio de uma seringa de vidro aos 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120 e 180 minutos, sendo repostos igual volume de tampão para manutenção do volume inicial. As amostras foram analisadas por HPLC, com um método isocrático, cujo eluente era constituído por acetoneitrilo:água desionizada:ácido acético a 35:64:1, com um fluxo de 1,2ml/min, a 40°C e com uma pressão de cerca de 150 bar.

Os ensaios de dissolução foram realizados com o objectivo de avaliar diferentes meios de dissolução com diferentes

pHs. Isto porque o método descrito na USP para os ensaios de dissolução de comprimidos contendo cafeína e ácido acetilsalicílico são realizados com uma solução tampão acetato pH 4,5 e aquando da realização dos ensaios de dissolução/permeabilidade com membranas celulares não é possível utilizar um meio de dissolução ácido, visto que poria em causa a integridade das mesmas. Assim foram realizados ensaios de dissolução de comprimidos de Melhoral® através do método descrito na USP e também com um meio de dissolução com pH compatível com as células Caco-2, a solução tampão fosfato pH 7,4.

Estes ensaios foram levados a cabo num aparelho de dissolução com 6 recipientes e respectivos cestos a 37°C e 50rpm.

Os ensaios demoraram 60 minutos e foram retiradas amostras de 100µl, sem reposição de volume, aos 5, 10, 20, 30, 45 e 60 minutos. As amostras foram filtradas, através de um filtro de PVDF com 0,45µm de diâmetro de poros, e acondicionadas em vials para análise por HPLC.

Quanto aos ensaios de dissolução e permeabilidade em simultâneo (Tabela 1), tiveram como objectivo a avaliação da permeabilidade dos compostos a partir da sua forma oral sólida, ao contrário dos outros ensaios realizados anteriormente, que apenas testaram a permeabilidade dos compostos a partir de uma solução, e assim testar os eventuais efeitos dos excipientes na permeabilidade. Foram realizados ensaios com membranas de PVDF para o Melhoral®.

Os procedimentos para estes ensaios foram em tudo idênticos aos ensaios de permeabilidade e dissolução em isolado, tendo apenas sido feita a conexão do aparelho de

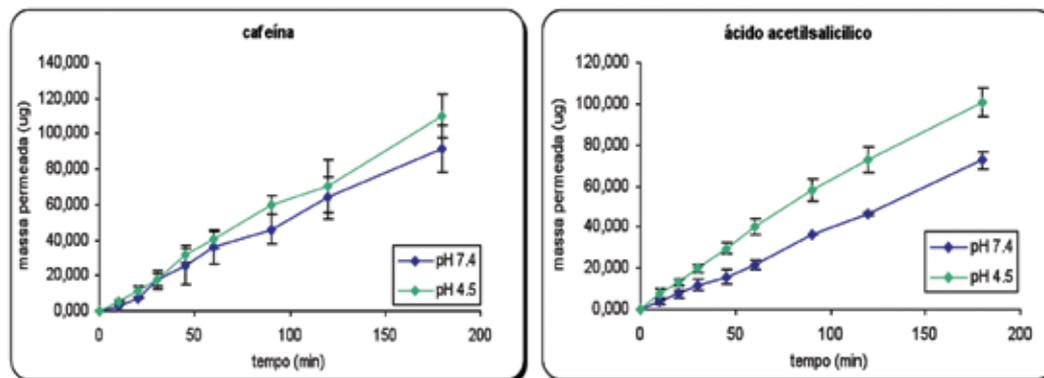


Figura 3: Comparação de curvas de permeação a pH 4.5 e 7.4 para cafeína e ácido acetilsalicílico (média±intervalo de confiança, n=3)

dissolução à célula de fluxo, através de tubos de silicone, e o fluxo foi garantido pela acção da bomba peristáltica.

Tratamento estatístico dos dados

Os dados resultantes da análise por HPLC foram tratados de forma a serem apresentados em forma de curva de permeação (tempo vs massa permeada), tendo sido também calculadas as percentagens permeadas e as permeabilidades aparentes (P_{app}) dos princípios activos através da fórmula,

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{AC_0}$$

onde P_{app} é o coeficiente de permeabilidade aparente, medido em $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$, dQ/dt ($\text{mg} \cdot \text{s}^{-1}$) é a quantidade acumulada de composto permeado por unidade de tempo, A a área superficial efectiva da membrana, exposta ao meio de permeação e C_0 a concentração inicial de composto a permear no lado dador da célula de fluxo.

Os resultados apresentados são a média das três repetições, feitas para cada ensaio, com o intervalo de confiança associado, calculado com a seguinte fórmula,

$$e = \frac{2,92 \times DP}{\sqrt{n}}$$

onde e é o intervalo de confiança, DP o desvio padrão e n o número de ensaios.

Apresentação e Discussão de resultados

Os primeiros ensaios de permeabilidade realizados permitiram obter informação sobre alguns parâmetros que afectam a reprodutibilidade do método em termos da P_{app} e percentagem permeada (Ver Tabela 2). Testaram-se nestes ensaios preliminares para a cafeína com tampão fosfato a pH 7.4, a circulação bilateral (a) ou unilateral (b) e a presença ou ausência de agitação, tendo-se verificado uma diferença significativa no erro associado à percentagem permeada dos dois ensaios, tendo esta sido superior nos ensaios com circulação bilateral, o que vai de encontro aos resultados obtidos por Motz (2007).

Este facto pode ter sido devido à utilização das duas bombas peristálticas diferentes em simultâneo. A possibilidade

de não se encontrarem ambas a funcionar com o fluxo pretendido, e o facto de estarem a bombear as soluções ao mesmo tempo, pode ter originado alterações nos valores de pressão dentro da célula de fluxo, o que influencia a permeação dos compostos. Visto que as variações na pressão afectam a integridade das membranas Caco-2⁸, decidiu-se otimizar o método com circulação apenas no compartimento dador. Outra explicação para a pouca reprodutibilidade dos ensaios pode residir no facto de que com circulação bilateral, a solução aceitadora tem necessariamente um volume maior, o que condiciona a homogeneidade da mesma. Com circulação unilateral, a parte aceitadora fica confinada ao compartimento aceitador da célula, que ao apresentar um volume reduzido, facilita a homogeneização e a toma de amostras.

No entanto, e apesar de mais reprodutíveis, verificaram-se ainda alguns valores fora do esperado nos ensaios com circulação unilateral, facto que pode ser explicado pela falta de agitação, provocando acumulação do princípio activo em certas zonas do compartimento aceitador, afectando a toma de amostras. Com agitação, a difusão do composto é facilitada, ficando com uma concentração homogénea no compartimento aceitador, diminuindo eventuais erros na toma de amostras. Posto isto, decidiu-se realizar todos os ensaios com circulação unilateral e agitação. Comparando os ensaios com circulação unilateral sem agitação (b) e os ensaios com circulação unilateral com agitação (c) é possível verificar uma diminuição do erro associado às percentagens permeadas nos últimos, de $0,92 \pm 0,56\%$ para $0,92 \pm 0,22\%$, o que comprovou que a agitação, para além da circulação, é um factor que afecta a reprodutibilidade do método.

Seguidamente realizaram-se os ensaios nas mesmas condições para o ácido acetilsalicílico (d), tendo-se obtido um erro associado à percentagem permeada, $0,73 \pm 0,07\%$ inferior aos ensaios anteriores, o que pode ser explicado pelo facto de nos primeiros ensaios ter sido utilizado um aparelho de HPLC diferente, que originava picos menos definidos e conseqüentemente mais difíceis de quantificar, originando resultados mais dispares.

Para a avaliação do efeito do pH na permeabilidade foram comparados ensaios realizados com tampão acetato a pH 4.5

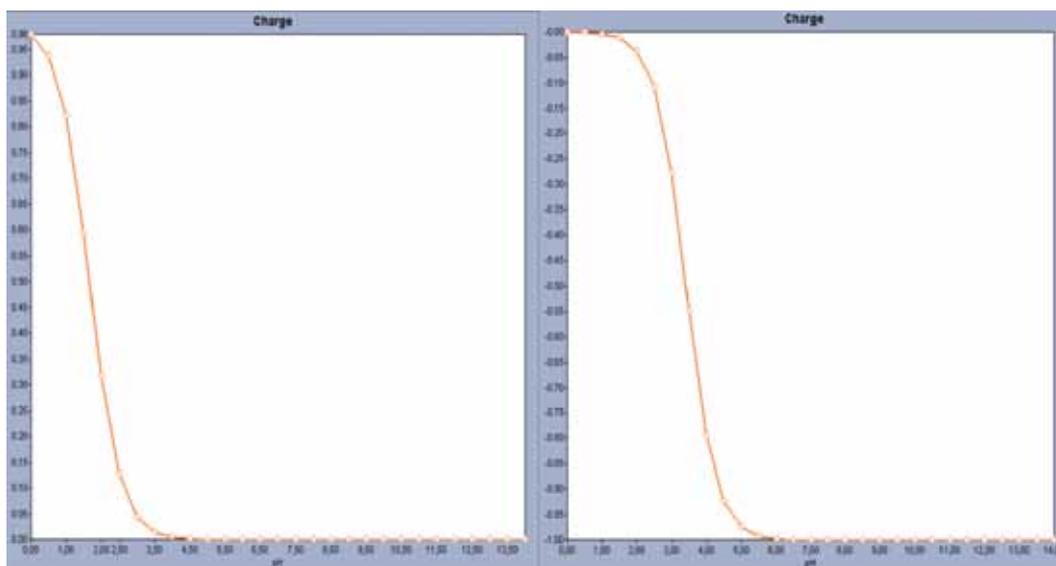


Figura 4: Curvas de ionização da cafeína e ácido acetilsalicílico estimadas através do software *Marvin Chemaxon*.

e tampão fosfato a pH 7.4 para a cafeína (e) e para o ácido acetilsalicílico (f). A absorção passiva através das membranas fisiológicas ocorre principalmente quando os compostos se encontram na forma neutra. Assim sendo, os ácidos são preferencialmente absorvidos no estômago onde estão protonados, enquanto que os compostos básicos, que estão ionizados no estômago, são absorvidos no tracto intestinal onde o pH varia entre 6 e 8, dependendo da área e do estado de jejum ou após refeição. No entanto, a biodisponibilidade depende não só da permeabilidade mas também da solubilidade e por isso há que considerar a dissolução dos compostos logo à chegada ao estômago onde o pH é bastante mais baixo⁹⁻¹¹.

A escolha dos pH de trabalho, teve assim em consideração estes factores e ainda a intenção de futura utilização do método com membranas de células Caco-2, as quais necessitam de um pH próximo da neutralidade para manterem a sua viabilidade. Desta forma optou-se por otimizar o método a pH 7,4. O valor de pH a 4,5 foi escolhido, visto ser o pH descrito na USP para a realização de ensaios de dissolução.

Em todos os ensaios de permeabilidade realizados, verificou-se que não foi atingido o equilíbrio de concentrações entre o compartimento aceitador e dador (Tabela 2), sendo que apenas se observou a zona linear, sem patamar de saturação, nas curvas de permeação (Figura 3)

Ao observar a comparação das curvas de permeação a diferentes pHs, verifica-se uma variação na permeabilidade dos dois princípios activos, sendo que a diferença é significativa apenas para o ácido acetilsalicílico.

Visto que a cafeína tem um pK_a menor que 2 (Figura 4), encontra-se completamente neutra tanto a pH 4,5 como 7,4, apresentando por isso valores de permeabilidade idênticos. O ácido acetilsalicílico tem um pK_a da ordem de 3,5 e portanto só se encontra parcialmente protonado (e portanto neutro) a valores de pH abaixo dos 5,5, pelo que a

pH 4,5 origina valores de permeabilidade mais elevados do que a pH 7,4 onde está completamente ionizado. O facto de ter sido possível detectar esta variação, à semelhança de outros estudos, revela-se de grande valor, pois a biodisponibilidade dos compostos depende em grande parte da sua lipofilicidade e solubilidade, que dependem por sua vez do pH¹⁰⁻¹².

Os ensaios seguintes foram realizados com o objectivo de testar um outro meio de transporte, o tampão HBSS a pH 7,4 visto que aquando da realização de ensaios com membranas de células Caco-2 seria este meio o utilizado, pois contém na sua composição os sais necessários à manutenção da viabilidade da monocamada celular. Verificou-se que os ensaios com HBSS para a cafeína (g) originaram resultados reprodutíveis e idênticos aos ensaios com tampão fosfato. Para os ensaios com o ácido acetilsalicílico (h) registou-se uma ligeira diminuição dos valores de P_{app} e de % de massa permeada, facto que se deveu à degradação do ácido acetilsalicílico, visto que as amostras de dois dos ensaios apenas foram analisadas no final do dia.

Da comparação dos ensaios seguintes, com cafeína e ácido acetilsalicílico em solução e do Melhoral® em solução (j), foi possível verificar maiores permeabilidades aparentes e percentagens permeadas no caso do ácido acetilsalicílico e cafeína em solução, em relação ao Melhoral® em solução. Visto que ambos os ensaios foram realizados em condições iguais e ambas com tampão fosfato a pH 7.4, considera-se que as diferenças entre os dois ensaios, ainda que não estatisticamente significativa, pode ser devida à presença de excipientes na formulação comercial, que influenciaram a permeação dos princípios activos. De facto verifica-se que no caso dos compostos individuais que está mais perto do equilíbrio entre as concentrações nos dois compartimentos do que no caso em que estão presentes os excipientes. Os excipientes podem ter um efeito de solubilização dos princípios activos (efeito de "sink"), dificultando a sua

permeabilização para o compartimento aceitador de onde estão ausentes, explicando assim a redução na percentagem permeada¹³.

Após os ensaios de permeabilidade, testou-se a dissolução do Melhoral®, a dois pHs diferentes, com tampão acetato a pH 4.5 e com tampão fosfato a pH 7.4. Apesar de se verificar uma ligeira diminuição da solubilidade a pH 7.4 (de 98,3% para 96,3% para a cafeína e de 94,3% para 87,1% no caso do ácido acetilsalicílico respectivamente), a quantidade dissolvida foi superior ao limite mínimo descrito, pelo que se decidiu que o tampão fosfato poderia ser utilizado nos ensaios de dissolução/permeabilidade.

Após otimizado o modelo nas componentes da permeabilidade e dissolução em isolado, foram realizados os ensaios dos dois parâmetros em simultâneo, para o Melhoral® com membranas de PVDF, com tampão acetato a pH 4.5 (k) e tampão fosfato a pH 7.4 (l), tendo originado resultados idênticos para ambos os princípios activos a diferentes pHs, o que, mais uma vez pode ser justificado pelo efeito de "sink" que neste caso se sobrepõe ao efeito de pH. Um modo de confirmar este efeito e ao mesmo tempo aumentar a percentagem permeada, poderia consistir na indução do efeito de "sink" também no compartimento aceitador¹³.

Também se verificou que a percentagem permeada foi igual tanto no caso dos testes sobre comprimidos completamente dissolvidos como no caso dos ensaios em que a dissolução ocorreu concomitantemente com a permeação, sendo assim possível concluir que, neste caso a dissolução não deve constituir um passo limitante para a biodisponibilidade.

Conclusões

Com a realização deste trabalho de investigação foi possível concluir que o método origina os resultados mais reprodutíveis com agitação no compartimento aceitador e circulação unilateral apenas no lado dador da célula de permeabilidade.

Concluiu-se também, conforme esperado, que o sistema permite detectar a influência do pH na permeabilidade dos compostos ionizáveis, ao verificar que a pH mais ácido a permeabilidade foi superior do que a pH 7.4 no caso do ácido acetilsalicílico, e que a presença de excipientes afecta a permeabilidade, visto que ensaios para os princípios activos nas mesmas concentrações e em condições experimentais idênticas aos ensaios para o comprimido, originaram resultados diferentes de permeabilidade.

Quanto ao objectivo principal, foi possível concluir que o método origina resultados reprodutíveis nos ensaios de dissolução e permeabilidade em simultâneo com membrana de PVDF.

As quantidades permeadas foram em geral bastante reduzidas pelo que a adição de auxiliares de solubilização no compartimento aceitador será um parâmetro a avaliar no futuro e que poderá elucidar o motivo pelo qual os excipientes afectam a permeabilidade dos compostos *in vitro* e contribuir para a aproximação do modelo à realidade fisiológica.

Referências bibliográficas

1. Chalchat B. [Current challenges for the pharmaceutical research industry]. *Ann Pharm Fr.* 1993;51(1):16-25. French
2. Kola I. The state of innovation in drug development. *Clin Pharmacol Ther.* 2008 Feb;83(2):227-30.
3. Corti G, Maestrelli F, Cirri M, Furlanetto S, Mura P. Development and evaluation of an in vitro method for prediction of human drug absorption I: assessment of artificial membrane composition. *Eur J Pharm Sci.* 2006 Mar;27(4):346-53.
4. Di L, Kerns EH. Profiling drug-like properties in discovery research. *Curr Opin Chem Biol.* 2003 Jun;7(3):402-8.
5. Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001 Mar;46(1-3):27-43.
6. Corti G, Maestrelli F, Cirri M, Zerrouk N, Mura P. Development and evaluation of an in vitro method for prediction of human drug absorption II: demonstration of the method suitability. *Eur J Pharm Sci.* 2006 Mar;27(4):354-62.
7. Ginski MJ, Taneja R, Polli JE. Prediction of dissolution-absorption relationships from a dissolution/Caco-2 system. *AAPS PharmSci.* 1999;1(2):E3.
8. Motz SA. Combined assessment of dissolution and epithelial permeability of solid oral dosage forms [dissertation]. Saarbrücken: Universität des Saarlandes; 2007. Available from: http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=983385645&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=983385645.pdf
9. Phang JS, Marsh WA, Barlows TG 3rd, Schwartz HI. Determining feeding tube location by gastric and intestinal pH values. *Nutr Clin Pract.* 2004 Dec;19(6):640-4.
10. He X, Kadomura S, Takekuma Y, Sugawara M, Miyazaki K. A new system for the prediction of drug absorption using a pH-controlled Caco-2 model: evaluation of pH-dependent soluble drug absorption and pH-related changes in absorption. *J Pharm Sci.* 2004 Jan;93(1):71-7.
11. Kobayashi M, Sada N, Sugawara M, Iseki K, Miyazaki K. Development of a new system for prediction of drug absorption that takes into account drug dissolution and pH change in the gastro-intestinal tract. *Int J Pharm.* 2001 Jun;221(1-2):87-94.
12. Sugawara M, Kadomura S, He X, Takekuma Y, Kohri N, Miyazaki K. The use of an in vitro dissolution and absorption system to evaluate oral absorption of two weak bases in pH-independent controlled-release formulations. *Eur J Pharm Sci.* 2005 Sep;26(1):1-8.
13. Jamzad S, Fassihi R. Role of surfactant and pH on dissolution properties of fenofibrate and glipizide: a technical note. *AAPS PharmSciTech.* 2006 Apr;7(2):E33.

Artigo recebido em 02.09.2008 e aprovado em 16.12.2008.