

AVALIAÇÃO DOS CRITÉRIOS DE ISENÇÃO DE ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA *In Vivo* PARA MEDICAMENTOS ORAIS EM FORMA FARMACÊUTICA SÓLIDA DE LIBERAÇÃO IMEDIATA

FLACH, A.O.P.; DALLA COSTA, T.

Departamento de Produção e Controle de Medicamentos, Faculdade de Farmácia – UFRGS

RESUMO: Com a nova lei dos genéricos instituída no Brasil, as indústrias que quiserem fabricá-los deverão comprovar a intercambialidade destes com os medicamentos de referência através de estudos de bioequivalência. Visando reduzir a necessidade dos mesmos por serem onerosos e exporem voluntários sadios aos testes, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária estabeleceu critérios de isenção. Serão discutidos neste trabalho os critérios para isenção de estudos de bioequivalência de medicamentos orais em forma farmacêutica sólida de liberação imediata, baseado no Sistema de Classificação Biofarmacêutico. As metodologias utilizadas para realização dos experimentos necessários para comprovar os critérios estabelecidos na legislação para solicitação de isenção são também apresentados.

UNITERMOS: Sistema de Classificação Biofarmacêutico, Solubilidade, Permeabilidade, Correlação *in vitro-in vivo*.

ABSTRACT: EVALUATION OF THE CRITERIA FOR WAIVING IMMEDIATE RELEASE SOLID ORAL DOSAGE FORMS OF *IN VIVO* BIOEQUIVALENCE STUDIES. The Brazilian law that created the generics established that all products must perform bioequivalence studies to prove their interchangeability with the reference product. Due to the cost of these studies and the fact that they expose healthy volunteers to unnecessary risks, the Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brazilian Federal Drug Agency) listed some criteria to waive this studies for some drug products. This paper will discuss the fundamentals to waive bioequivalence studies to solid oral immediate release dosage forms based on the Biopharmaceutics Classification System. The methodologies used to perform the necessary studies to classify the drug in the system and release the *in vivo* studies are presented and discussed.

KEYWORDS: Biopharmaceutics Classification System, Solubility, Permeability, *in vitro-in vivo* correlation.

INTRODUÇÃO

A exemplo de países como os Estados Unidos e membros da Comunidade Européia, o Brasil estabeleceu uma legislação para medicamentos genéricos a partir de 1999, através da Lei 9.787/99 e da Resolução 391/99 (BRASIL, 1999a; BRASIL, 1999b).

Para se adequar à nova legislação cabe às indústrias produtoras de genéricos comprovarem a intercambialidade desses com os medicamentos referência, através de estudos de bioequivalência (BE) (BRASIL, 1999b).

Os critérios para os ensaios de bioequivalência foram estabelecidos na Resolução 391/99 e devem ser seguidos para que o registro do medicamento seja aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVS). O estudo de BE de um genérico deve ser considerado como mais um teste de qualidade desse medicamento, que, neste caso, envolve a avaliação de sua eficácia e segurança, através da comparação do seu perfil de concentração plasmática em função do tempo com o perfil obtido pela administração do

medicamento referência, nas mesmas condições experimentais.

Os estudos de BE são, em geral, onerosos e demorados, além de exporem os voluntários sadios a riscos advindos da utilização do medicamento. Visando reduzir a necessidade de realização dos mesmos, a ANVS, baseada em parâmetros científicos, estabeleceu critérios de isenção para alguns medicamentos.

Na Resolução 391/99 (BRASIL, 1999b), nove situações de isenção de bioequivalência de medicamentos que pretendam registro como genérico são estabelecidas. A maioria relaciona-se a formas líquidas para administração parenteral, tópica ou oral, desde que os adjuvantes utilizados não interfiram com os fenômenos de absorção e que o medicamento apresente equivalência farmacêutica com o produto de referência. Os medicamentos para uso tópico também são isentos, uma vez que não visam ação sistêmica.

Dos medicamentos dispensados do estudo de bioequivalência, apenas um grupo relaciona-se a formas farmacêuticas sólidas, apesar destas possuírem alto potencial de bio-inequivalência,

devido ao uso de adjuvantes e da tecnologia empregada. Para que estes medicamentos possam ser isentos de avaliação *in vivo*, os mesmos devem possuir quatro características: o fármaco deve apresentar alta solubilidade, alta permeabilidade, biodisponibilidade absoluta superior a 90 % e a forma farmacêutica sólida que o contém deve apresentar rápida cedência (maior que 85 % em até 15 minutos, empregando HCl 0,1M).

A ANVS considera fármaco de alta solubilidade em água *aquela que, na maior dosagem por forma farmacêutica, for completamente solúvel em 250 ml de cada um dos três tampões farmacopéicos na faixa de pH 1 a 8, a 37 °C ± 0,5 (preferentemente, pH 1,0; 4,6 e 6,8)*. A permeabilidade é definida *como a permeabilidade efetiva do fármaco à parede do jejuno humano e inclui a resistência aparente ao transporte de massa através da membrana intestinal. Fármacos de alta permeabilidade são, geralmente, aqueles estáveis nas condições do trato gastrointestinal e que apresentam biodisponibilidade absoluta maior que 90 %, ou aqueles para os quais essa propriedade foi determinada experimentalmente* (BRASIL, 199b).

A avaliação do fármaco quanto à solubilidade e à permeabilidade está baseada no Sistema de Classificação Biofarmacêutico (SCB) dos fármacos, desenvolvido recentemente (AMIDON *et al.*, 1995). Este Sistema vem sendo empregado pela *Food and Drug Administration* (FDA) com a mesma finalidade. Neste contexto, o objetivo deste trabalho é apresentar o Sistema de Classificação Biofarmacêutico e discutir a metodologia para realização dos experimentos necessários para isentar formas farmacêuticas sólidas de uso oral dos testes de bioequivalência.

DISSOLUÇÃO *IN VITRO*

Um aspecto importante do desenvolvimento de medicamentos é encontrar uma característica da formulação *in vitro* que reflita seu desempenho *in vivo*. Embora formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata sejam rotineiramente sujeitas a testes como uniformidade de conteúdo, peso, dureza, friabilidade e desintegração, o teste, que é mais freqüentemente associado com a avaliação do desempenho *in vivo* destas formulações, é o teste de dissolução (WADKE *et al.*, 1989).

Os testes de dissolução *in vitro* proporcionam informações úteis nos vários estágios do processo de desenvolvimento de medicamentos. Os resultados do perfil de cedência de formulações são utilizados para avaliar as propriedades de liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica e, assim, selecionar adjuvantes apropriados para a formulação. Testes de dissolução são também empregados durante o desenvolvimento de produtos para auxiliar na escolha entre formulações similares, com o objetivo de selecionar a forma farmacêutica que

possui o perfil de liberação mais apropriado e reprodutível. Contudo, se estes testes não são executados sob condições apropriadas, a previsão de que o fármaco e a forma farmacêutica exibirão o perfil desejado *in vivo*, pode ser completamente errônea (DRESSMAN *et al.*, 1997).

Os perfis de dissolução são utilizados para estabelecer a correlação *in vitro* / *in vivo* entre a liberação do fármaco da forma farmacêutica e a absorção do mesmo. Quando os resultados *in vitro* não tem correlação com o desempenho *in vivo* do medicamento, estudos clínicos são necessários para avaliar a biodisponibilidade do produto, aumentando substancialmente o custo do desenvolvimento do mesmo (DRESSMAN *et al.*, 1997).

FATORES LIMITANTES PARA A ABSORÇÃO DE FÁRMACOS

Basicamente são quatro as possíveis causas de absorção incompleta de um fármaco após administração oral de uma forma farmacêutica sólida (DRESSMAN *et al.*, 1997):

1. o fármaco não é liberado da forma farmacêutica para ser dissolvido no locais no trato gastrointestinal onde tem melhor absorção, em tempo apropriado;
2. o fármaco é decomposto no trato gastrointestinal ou forma um complexo não absorvível;
3. o fármaco não é transportado eficientemente através da parede intestinal na direção apical para basal;
4. o fármaco é metabolizado e/ou eliminado na rota para a circulação sistêmica (metabolismo de primeira passagem).

Uma vez que o trato gastrointestinal (TGI) não é um sistema estático, as velocidades de liberação, decomposição, complexação e transporte através da parede intestinal têm que ser maior que a velocidade de trânsito da forma farmacêutica/ fármaco no mesmo. Desse modo, para um fármaco ser bem absorvido, a liberação e a penetração através da membrana do TGI têm que ser completadas dentro do tempo de residência da forma farmacêutica/fármaco no intestino, incluindo os locais de absorção do fármaco, enquanto que a decomposição e a complexação têm que ocorrer mais lentamente que a liberação/penetração ou trânsito (DRESSMAN *et al.*, 1997).

SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICO (SCB)

O sistema de classificação biofarmacêutico (AMIDON *et al.*, 1995) foi estabelecido com o intuito de auxiliar a indústria farmacêutica na solicitação de isenção dos ensaios de bioequivalência para um determinado medicamento, baseando-se nos testes de dissolução *in vitro*.

Através desse sistema, os fármacos podem ser classificados em quatro grupos (Tab. 1), de acordo com suas propriedades de solubilidade e penetração na mucosa gastrintestinal (AMIDON, *et al.*, 1995; STAVCHANSKY & PADE, 1998):

Grupo I: alta permeabilidade – alta solubilidade (AP-AS): Estes fármacos são rápida e completamente absorvidos, com extensão de absorção maior que 90 %. Contudo, a biodisponibilidade sistêmica desses pode ser limitada devido ao metabolismo de primeira passagem, como no casos do propranolol e diltiazem. O passo limitante para a absorção do fármaco é a dissolução ou esvaziamento gástrico, no caso da dissolução ser muito rápida.

Grupo II: alta permeabilidade – baixa solubilidade (AP-BS): Para esta classe, a dissolução no trato gastrintestinal é a etapa limitante para o processo de absorção. A variabilidade na absorção destes fármacos pode ser devida às diferenças de formulação e variáveis fisiológicas, que podem influenciar o processo de cedência dos mesmos.

Grupo III: baixa permeabilidade – alta solubilidade (BP-AS): A permeação do fármaco através da membrana intestinal é a etapa limitante no processo de absorção. A velocidade e extensão de absorção deste grupo de fármacos podem ser altamente variáveis devido às diferenças no trânsito gastrintestinal, conteúdo luminal e permeabilidade da membrana e não às diferenças de formulação.

Grupo IV: baixa permeabilidade – baixa solubilidade (BP-BS): São fármacos que possuem alta variabilidade na velocidade e extensão de absorção. Desse modo, possuem absorção ruim, sendo problemáticos para utilização oral.

Tabela 1. Fármacos modelos dos grupos do sistema de classificação biofarmacêutica*.

Grupo I Alta permeabilidade – Alta solubilidade	Grupo II Alta permeabilidade – Baixa solubilidade
naproxeno ácido salicílico propranolol diltiazem efedrina	fenitoína
Grupo III Baixa permeabilidade – Alta solubilidade	Grupo IV Baixa permeabilidade – Baixa solubilidade
furosemida cimetidina	clorotiazida

*Adaptado de STAVCHANSKI & PADE, 1998.

A relação entre permeabilidade/ solubilidade do fármaco e absorção através do trato gastrintestinal em humanos sugere que fármacos do tipo AP-AS e AP-BS são absorvidos completamente. Contudo, fármacos do tipo BP-AS geralmente têm biodisponibilidade oral entre 40 e 80 % e aqueles do grupo BP-BS mostram

absorção incompleta ou ruim (STAVCHANSKY & PADE, 1998).

O SCB dirige-se a duas das quatro potenciais limitações para a biodisponibilidade de fármacos administrados por via oral. Dessas duas, a solubilidade é uma limitação físico-química do fármaco com potencial de causar liberação incompleta a partir da forma farmacêutica. É importante entender que a classificação é baseada nas propriedades de solubilidade do fármaco através da parte alta do TGI (boca, esôfago, estômago e duodeno). Estudos de permeabilidade são necessários para determinar os principais locais de absorção do fármaco no TGI e, também, para avaliar a eficiência do transporte do fármaco através da parede intestinal. Uma variedade de membranas sintéticas, culturas de células, tecidos e modelos animais são disponíveis para avaliação da permeabilidade (DRESSMAN *et al.*, 1997). Os modelos de cultura de célula são os mais utilizados atualmente e serão discutidos a seguir.

CORRELAÇÃO IN VITRO-IN VIVO

Embora o SCB seja limitado a dois dos quatro importantes fatores que determinam a absorção, ele proporciona um ponto de partida útil para reconhecimento de quando e como os testes de dissolução podem auxiliar no planejamento e avaliação de formas farmacêuticas orais. Compostos pertencentes a Grupo I, isto é, compostos com alta solubilidade e permeabilidade, deverão dissolver-se rapidamente quando colocados em formas farmacêuticas de liberação imediata e, também, ser rapidamente transportados através da parede intestinal. Portanto, é esperado que eles sejam bem absorvidos, a menos que sejam instáveis, formem complexos insolúveis, sejam secretados diretamente da parede intestinal através de um sistema de efluxo como o da glicoproteína-P, por exemplo, ou sejam submetidos ao metabolismo de primeira passagem. Desse modo, o teste de cedência para formulações de liberação imediata contendo fármacos da Grupo I necessita apenas comprovar que o fármaco é realmente liberado rapidamente da forma farmacêutica em meio aquoso (DRESSMAN *et al.*, 1997; MAKHEY *et al.*, 1998).

AMIDON e colaboradores sugerem que, para estes medicamentos, um simples teste *in vitro*, no qual se obtenha 85 % de dissolução do fármaco em menos de 15 minutos, é o suficiente para garantir a biodisponibilidade. Estes autores afirmam que *dois medicamentos contendo o mesmo fármaco, tendo o mesmo perfil de concentração na superfície da membrana intestinal, possuem a mesma velocidade e extensão de absorção*. Esta afirmação implica em assumir que *se dois medicamentos têm o mesmo perfil de dissolução in vivo, sob todas condições luminiais, eles apresentam a mesma taxa e extensão da absorção do fármaco* (AMIDON *et al.*,

1995). Desse modo, não haveria necessidade de realizar-se estudos *in vivo* para comparar a biodisponibilidade destes produtos. Apenas com o teste *in vitro* podem ser considerados bioequivalentes.

Os padrões de motilidade do trato gastrointestinal alto podem ser classificados em quatro grupos: ausência de atividade (aquiescência), movimento segmental, movimento propagativo e contrações tônicas. No estado de jejum ocorrem longos períodos de pouca ou nenhuma atividade motora. A cada duas horas inicia-se um ciclo de contrações que culmina com a movimentação do conteúdo do estômago para o intestino, chamada fase de atividade III. A fase I é aquela na qual o TGI alto não possui nenhuma atividade (aquiescência), na fase II os movimentos são segmentais e na fase III os movimentos são propagativos (variações curtas ou longas). A absorção é menos eficiente na fase III (estado de jejum com contrações longas), é intermediária durante fases I e II e é aumentada durante a alimentação. Do mesmo modo, é esperado que a dissolução seja mais eficiente no estado de alimentação, devido a uma melhor mistura provocada pelos movimentos intestinais.

Dependendo da fase de motilidade e do volume de líquido ingerido, a meia-vida de esvaziamento gástrico pode variar (Fig. 1). Na condição de jejum, a velocidade de esvaziamento gástrico é dependente da motilidade e do volume de líquido ingerido, apresentando uma meia-vida de esvaziamento entre 5 e 22 minutos. O tempo de esvaziamento de volumes de 50 e 200 mL é, em média, de 12 e 22 minutos, respectivamente. Isto sugere que a especificação de cedência, para formas farmacêuticas de liberação imediata, de 85 % em menos que 15 minutos, pode garantir bioequivalência (AMIDON *et al.*, 1995).

As expectativas de obtenção de correlação *in vitro/in vivo* para medicamentos de liberação

imediate baseadas no Sistema de Classificação Biofarmacêutico estão apresentadas na tabela 2.

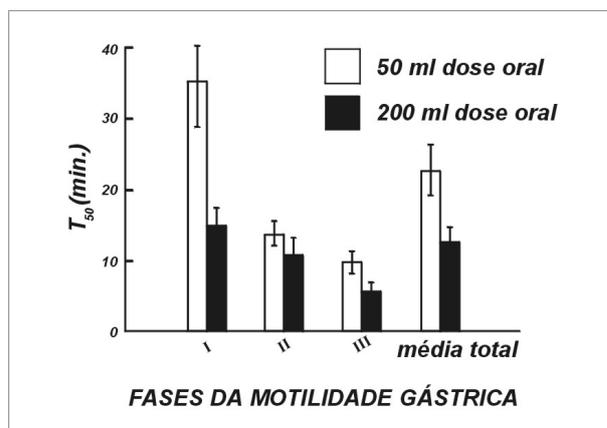


Figura 1. Tempo de meia-vida de esvaziamento gástrico, T_{50} , em humanos, em função da fase de motilidade na condição de jejum para administrações de 50 e 200 mL de água (AMIDON *et al.*, 1995).

No Grupo I (AS-AP), o fármaco é bem absorvido, embora sua biodisponibilidade sistêmica possa ser reduzida devido ao metabolismo de primeira passagem. A etapa limitante da velocidade de absorção é a cedência do fármaco a partir da forma farmacêutica ou o esvaziamento gástrico, quando a cedência ocorre muito rapidamente. Para ser utilizado como substituto da biodisponibilidade, o perfil de dissolução tem que ser bem definido e reprodutível. Para formas farmacêuticas de liberação imediata, que liberam o fármaco muito rapidamente, a velocidade de absorção será controlada pela taxa de esvaziamento gástrico, não sendo possível estabelecer correlação com o perfil de dissolução *in vitro* (AMIDON *et al.*, 1995).

Tabela. 2. Expectativa de correlação *in vitro/in vivo* para medicamentos de liberação imediata baseada no Sistema de Classificação Biofarmacêutico*

Grupo	Solubilidade	Permeabilidade	Expectativa de correlação <i>in vitro/in vivo</i> **
I	Alta	Alta	Há correlação <i>in vitro/in vivo</i> se a velocidade de dissolução é mais lenta que a velocidade de esvaziamento gástrico. Caso contrário, a correlação é limitada ou inexistente.
II	Baixa	Alta	Correlação <i>in vitro/in vivo</i> é esperada se a velocidade de dissolução <i>in vitro</i> é similar à <i>in vivo</i> .
III	Alta	Baixa	A permeabilidade é a etapa determinante da velocidade de absorção e a correlação é limitada ou inexistente.
IV	Baixa	Baixa	Correlação <i>in vitro/in vivo</i> limitada ou inexistente

*Adaptado de Amidon *et al.*, 1995.

**Uma correlação limitada significa que a taxa de dissolução, embora não seja o fator limitante da velocidade, pode ser similar à velocidade de absorção e a extensão da correlação dependerá das velocidades relativas.

Para fármacos do Grupo II (BS-AP) o perfil de dissolução tem que ser mais claramente definido e reprodutível, uma vez que a dissolução do fármaco é a etapa limitante para absorção. A taxa de absorção para este grupo é, geralmente, mais baixa que para os fármacos do grupo I, sendo dependente das diferenças de formulação e das variáveis *in vivo* que possam afetar o perfil de dissolução. Meios e métodos de dissolução que simulem os processos *in vivo* são importantes para se obter uma boa correlação *in vitro/in vivo*.

Para os fármacos do Grupo III (AS-BP) a permeabilidade é a etapa que controla a absorção. Embora o perfil de dissolução *in vitro* deva ser bem definido, a utilização de um critério simples como o empregado para o Grupo I somente é aplicável para formas farmacêuticas de liberação imediata, para as quais a passagem do fármaco para o intestino é controlada pela velocidade de esvaziamento gástrico. A velocidade e extensão da absorção do fármaco pode ser altamente variável para este grupo. Porém, se a dissolução é rápida (85 % em menos que 15 minutos) esta variação será devida ao trânsito gastrointestinal variável, ao conteúdo luminal e à permeabilidade da membrana e não a fatores de formulação.

Fármacos do Grupo IV (BS-BP) apresentam problemas importantes na liberação oral, sendo a correlação *in vitro/in vivo* limitada ou inexistente.

SOLUBILIDADE

De acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutico, fármaco de alta solubilidade é definido como aquele cuja maior dose terapêutica pode ser dissolvida em 250 mL de um meio aquoso na faixa de pH de 1 a 8. O volume de 250 mL foi estabelecido baseando-se no volume mínimo esperado no estômago de um voluntário, em jejum, submetido a um estudo de biodisponibilidade ou bioequivalência, cujo protocolo recomenda a administração da forma farmacêutica com um copo de água (GUIDANCE FOR INDUSTRY, 1999).

Experimentos para determinação da solubilidade do fármaco devem ser conduzidos a 37 °C, utilizando-se um excesso do mesmo e variando-se o pH do meio aquoso, através da utilização de diferentes tampões. A quantidade do fármaco é colocada em um frasco contendo o tampão no qual o mesmo será testado. Após um período prolongado de agitação, para que o equilíbrio possa ser atingido, alíquotas da solução são retiradas e filtradas, antes da quantificação com metodologia adequada (STAVCHANSKY & PADE, 1998). Através desta metodologia pode-se determinar a quantidade máxima do fármaco que pode ser dissolvida no volume especificado de 250 mL.

PERMEABILIDADE

O segundo critério do SCB é a permeabilidade do fármaco, que se relaciona com a quantidade de sua absorção em humanos. A permeabilidade pode ser determinada através de diversas metodologias descritas na literatura, utilizando-se modelos em humanos, modelos animais *in situ* ou *ex-vivo* e cultura de células (ARTURSSON, 1990; ARTURSSON & KARLSSON, 1991; COGBURN *et al.*, 1991; HILGERS *et al.*, 1990; LENNERNÄS, 1992; LENNERNÄS, 1998; RUBAS *et al.*, 1993; SINKO *et al.*, 1991; STAVCHANSKY & PADE, 1998; TAYLOR *et al.*, 1985; WINIWARTER *et al.*, 1998; ZOCCHI *et al.*, 1998). No entanto, para o desenvolvimento do SCB, a metodologias com cultura de células tem sido mais utilizadas.

HILGERS e colaboradores (1990) sugerem que células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2) podem ser úteis para prever o potencial de absorção oral de fármacos. Quando desenvolvidas sobre filtros semi-permeáveis, essas células diferenciam-se espontaneamente formando monocamadas confluentes que exibem similaridade morfológica e funcional com o epitélio do intestino delgado. Devido a estas propriedades, sugeriu-se esta linhagem de células como um modelo *in vitro* para o estudo do processo de absorção do fármaco e seu metabolismo na mucosa intestinal. Entre as vantagens de tal sistema em relação ao estudo com animais, podem-se citar a capacidade de examinar um grande número de amostras em pequeno espaço de tempo, a diminuição da quantidade de fármaco requerida em cada análise e a possibilidade de interpretação clara dos resultados.

Nos estudos de transporte com células Caco-2 utiliza-se um sistema composto de um compartimento doador (câmara apical), onde é colocado o fármaco, e um compartimento receptor (câmara basal), separados por uma monocamada de células (Fig. 2). A taxa de transporte do fármaco é determinada pela adição de compostos na câmara doadora e monitoramento do seu aparecimento na câmara receptora. Alternativamente, pode-se determinar o desaparecimento do fármaco na câmara doadora. O volume dos compartimentos doador e receptor dependem do tamanho do sistema utilizado, variando na faixa de 200 µL a 3 mL (ARTURSSON & KARLSSON, 1991; COGBURN *et al.*, 1991; HILGERS *et al.*, 1990; RUBAS *et al.*, 1993; STAVCHANSKY & PADE, 1998).

As monocamadas de células são obtidas após 14 a 21 dias em cultura sobre filtros Transwell, não recobertos por colágeno (HILGERS *et al.*, 1990). A integridade da camada de células é testada antes e após os experimentos utilizando-se substâncias marcadoras tais como ³H-manitol (COGBURN *et al.*, 1991).

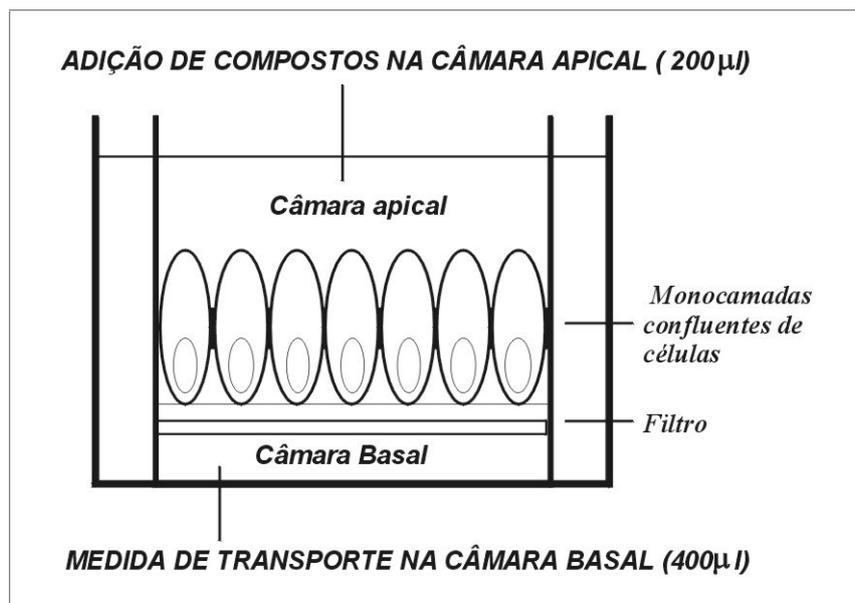


Figura 2. Esquema representativo da sistema utilizado para estudo de transporte de fármacos através de monocamada de células Caco-2 (COGBURN *et al.*, 1991).

O coeficiente de permeabilidade efetiva do fármaco (P_e), nos estudos de desaparecimento do fármaco do compartimento doador pode ser calculado pela equação (HILGERS *et al.*, 1990):

onde V_D é o volume do compartimento doador, A é a área superficial da monocamada de células e k é a constante de primeira ordem que descreve a velocidade de passagem do fármaco do compartimento doador para o receptor e pode ser obtida pela equação:

$$\ln \left(\frac{C_t}{C_0} \right) = -k \cdot t$$

onde C_t é a concentração do fármaco no compartimento doador no tempo t e C_0 é a sua concentração inicial neste compartimento. A constante k pode ser determinada através da inclinação da reta obtida da representação gráfica da concentração do fármaco no compartimento doador em função do tempo.

Vários estudos têm sido relatados na literatura utilizando a metodologia com células Caco-2. A título de exemplo, alguns destes trabalhos são discutidos a seguir.

No estudo realizado por HILGERS e colaboradores (1990) foi avaliado o aparecimento e o desaparecimento do fármaco nos respectivos compartimentos receptor e doador. Os fármacos testados foram glicose, ácido salicílico,

testosterona, ácido hipúrico e uréia. Foi possível determinar taxas de desaparecimento variáveis, de acordo com o fármaco, exceto para o ácido hipúrico, que não foi possível avaliar. A relação entre permeabilidade através das células Caco-2 e a lipofilia do fármaco foi estabelecida utilizando-se os coeficientes de partição (CP) dos mesmos (Tab. 3).

Quando se observa o transporte do fármaco a partir do desaparecimento da solução doadora, os coeficientes de permeabilidade são diretamente relacionados com o coeficiente de partição octanol-água do fármaco. Desse modo, quando o ácido salicílico está presente na solução na forma protonada, em pH 4,5, com um logaritmo de coeficiente de partição aparente

de 1,74, é absorvido quatro vezes mais rapidamente que em pH 7,1, onde a lipossolubilidade é muito menor. Além disso, quando os coeficientes de permeabilidade são colocados em um gráfico em função do coeficiente de partição, como na figura 3, uma relação sigmoidal é facilmente evidenciada (HILGERS, 1990).

Substâncias polares como a uréia e o íon hipurato mostram permeabilidade muito baixa, consistente com a hipótese de transporte através dos poros da membrana. Os fármacos que apresentaram transporte mais rápido foram a testosterona e o ácido salicílico, que desapareceram do compartimento doador praticamente com a mesma velocidade.

Estes fármacos mostraram permeabilidade máxima de cerca de 8×10^{-5} cm/s, que é a permeabilidade máxima para este sistema. A glicose é uma exceção para esta relação, possuindo absorção muito maior que a esperada baseada no seu coeficiente de partição. Isso ocorre devido ao transporte ativo de glicose através da membrana, demonstrado *in vivo*, que pode ser também observado neste sistema *in vitro*. Os resultados observados neste sistema utilizando monocamada de células Caco-2 são qualitativamente consistentes com os demonstrados com modelos de absorção intestinal *in vivo* (HILGERS *et al.*, 1990).

Tabela 3: Coeficiente de permeabilidade (P_e) determinado através do aparecimento (A) e através do desaparecimento (D) no sistema de células Caco-2 e coeficiente de partição octanol/água (CP) (HILGERS *et al.*, 1990).

Soluto	Concentração (μM)	log CP (em pH 7,1)	P_e ($\text{cm/s} \times 10^5$) ^a	
			D	A
D-glicose	3,7	-3,24	8,5(0,3)	-
Ácido salicílico (pH 4,5)	2,0	1,74 ^b	7,8 (1,2)	-
Ácido hipúrico	1,5	-3,0 ^c	0 ^d	0,067 (0,002)
Uréia	1,7	-1,09	0,75 (0,1)	0,76 (0,01)
Ácido salicílico (pH 7,1)	2,0	-0,82 ^b	1,8(0,2)	1,9(0,2)
Testosterona	1,7	3,31	8,2(1,0)	6,3(0,3)

^a Valores médios (\pm desvio padrão) para, no mínimo, três determinações.

^b Calculados do log coeficiente de partição intrínseco = 3,28 e $pK_a = 3,0$

^c Calculados do log coeficiente de partição intrínseco = 0,49 e $pK_a = 3,64$

^d Não foi possível determinar

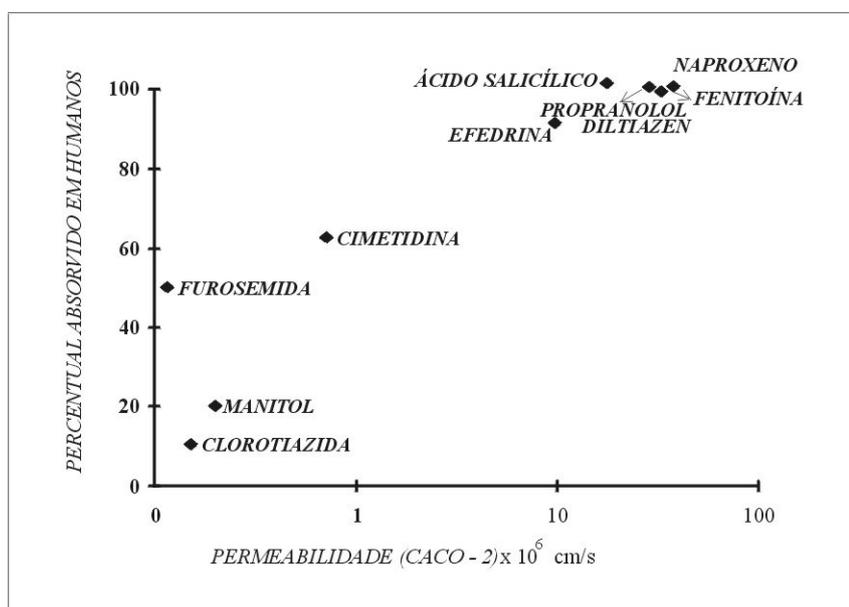


Figura 3. Relação entre os coeficientes de permeabilidade (P_e) observados e coeficientes de partição aparente em octanol-água (log CP) para os solutos modelo no sistema de células Caco-2. Os coeficientes de permeabilidade foram calculados dos resultados de desaparecimento do compartimento doador (HILGERS *et al.*, 1990).

Os resultados dos estudos de transporte de fármacos através desta monocamada sugerem que a combinação das vias de difusão aquosa e lipídica é responsável pela absorção de fármacos através da mucosa intestinal. O caminho lipídico é mais favorável para compostos lipofílicos, enquanto que moléculas altamente polares são muito menos permeáveis à membrana celular devido às suas pobres propriedades de partição (HILGERS *et al.*, 1990), podendo, em função de seu tamanho molecular, utilizar o transporte através dos poros.

Em teoria, a velocidade de desaparecimento do fármaco do compartimento doador e a velocidade de aparecimento do mesmo no compartimento receptor devem ser iguais, porque se assume que, *in vivo*, o que desaparece do

lumen intestinal deve surgir na corrente circulatória. No entanto, se o fármaco é metabolizado ou sequestrado por alguma organela intracelular durante a absorção, esta relação não é mais válida. Pode-se observar pela análise da tabela 3 que os dados obtidos para uréia a ácido salicílico confirmam esta hipótese. A testosterona, no entanto, mostra um valor de P_e menor para o aparecimento do que para o desaparecimento. Uma possível explicação para este fato, uma vez que a testosterona não sofre metabolismo no nível de membrana intestinal, pode ser devida à aproximação feita no cálculo do coeficiente de permeabilidade, especialmente no valor da área superficial da membrana, que pode ser diferente no lado receptor e doador, respectivamente (HILGERS *et al.*, 1990).

(HILGERS *et al.*, 1990).

A mesma correlação entre permeabilidade através da monocamada de células Caco-2 e a absorção de substâncias em humanos também foi evidenciada por RUBAS e colaboradores (1993) estudando a hidrocortisona, naproxeno, progesterona, metanol, poligol 900, poligol 4000, ganciclovir e manitol. Estes autores demonstraram que compostos como hidrocortisona, naproxeno, progesterona e metanol, que mostraram 100 % de absorção em humanos, têm valores de permeabilidade maior que 7×10^{-5} cm/s. Fármacos incompletamente absorvidos (menor que 20 %), tais como ganciclovir, demonstraram uma permeabilidade de aproximadamente uma ordem de magnitude inferior, ou seja, menor que 1×10^{-5} cm/s (RUBAS *et al.*, 1993).

ARTURSSON (1990) também relatou uma boa correlação entre os resultados obtidos no modelo Caco-2 e aqueles obtidos em um modelo de ratos *in situ* para alguns β - bloqueadores como propranolol, alprenolol, metoprolol, practolol, atenolol. Os valores obtidos *in vitro* e *in situ* foram similares para todos os fármacos, com exceção do atenolol, que foi absorvido com uma velocidade muito inferior no modelo Caco-2 comparado com o processo no rato, em função de sua maior hidrofília (ARTURSSON, 1990).

A correlação entre a extensão de absorção e a permeabilidade de alguns fármacos, determinada através de monocamadas de células Caco-2, foi estabelecida por STAVCHANSKY e PADE (1998) (Fig. 4). Fármacos como clorotiazida, manitol, furosemida, cimetidina, efedrina, diltiazem, propranolol, fenitoína, naproxeno e ácido salicílico foram testados.

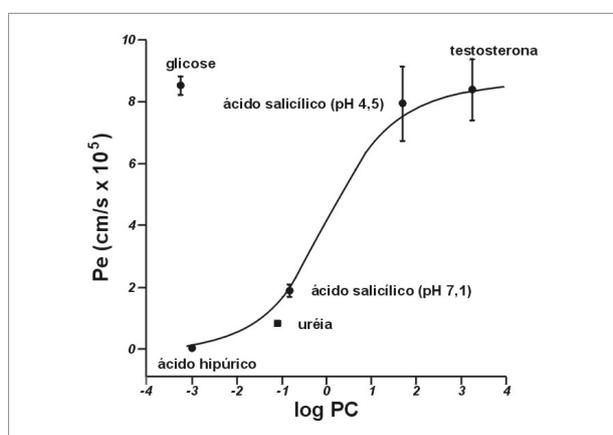


Figura 4. Correlação entre a extensão da absorção de fármacos (P_e) em humanos e coeficiente de permeabilidade (PC) medido através das monocamadas Caco-2. (STAVCHANSKY & PADE, 1998).

Como pode ser observado na figura 4, compostos com coeficiente de permeabilidade efetivos maiores que 10×10^6 cm/s exibem completa absorção em humanos (maior que 90 %). Esta correlação pode ser usada para prever a absorção de fármacos em humanos, contudo, é limitada pela solubilidade do fármaco, pois a permeabilidade não conta com a relação entre o tamanho da dose e sua solubilidade no fluido intestinal. Desse modo, esta correlação entre permeabilidade e extensão da absorção em humanos poderá ser válida apenas nos casos onde a solubilidade do fármaco seja suficientemente ampla para permitir sua absorção antes que seja removido pelo esvaziamento gástrico (RUBAS *et al.*, 1993; STAVCHANSKY & PADE, 1998).

Os estudos utilizando monocamadas de células Caco-2, apesar de demonstrarem boa correlação entre permeabilidade de absorção dos fármacos tem algumas desvantagens. A principal é a falta ou a reduzida expressão de uma enzima

oxidativa comum e importante no trato intestinal que é o citocromo P450 subfamília 3A4, que é uma enzima que contribui significativamente para o metabolismo de muitos fármacos e xenobióticos (HU *et al.*, 1999). Além disso, a falta de padronização das metodologias para obtenção das monocamadas de células pode levar a resultados diferentes, dependendo do laboratório onde os estudos foram conduzidos.

CONCLUSÕES

A legislação para medicamentos genéricos no Brasil obriga as indústrias, que desejarem fabricá-los, comprovar a intercambialidade destes com os medicamentos de referência, através dos estudos de BE.

Para que se obtenha isenção destes estudos, o fármaco presente neste medicamento deve apresentar as seguintes características: alta permeabilidade, alta solubilidade, biodisponibilidade absoluta igual ou superior a 90 % e, a forma farmacêutica sólida que o contém, deve apresentar cedência rápida (85 % de dissolução em até 15 minutos).

Para comprovar a alta solubilidade e alta permeabilidade, bem como a biodisponibilidade absoluta superior a 90 % do fármaco objeto da produção do medicamento genérico, a indústria pode utilizar-se de estudos já relatados na literatura ou, quando estes não são disponíveis, realizá-los utilizando metodologia atualizada. A determinação da solubilidade, de acordo com o SCB, é de fácil execução, não necessitando de equipamentos sofisticados. A avaliação da permeabilidade, no entanto, pode ser realizada *in vitro* ou *in vivo* e requer metodologias mais especializadas. Conforme demonstrado nesta revisão, os estudos de permeabilidade utilizando células Caco-2 têm demonstrado boa correlação com a absorção em humanos, sendo indicados para a avaliação deste parâmetro. Esses estudos, no entanto, devem ser conduzidos e seus resultados analisados criteriosamente para que possam inferir o comportamento dos fármacos em humanos.

Após a comprovação de que o fármaco pertence ao Grupo I, a cedência rápida da forma farmacêutica oral que o contém pode ser comprovada com um teste de dissolução *in vitro*, utilizando equipamentos descritos na Farmacopéia.

Alternativas que facilitem a comprovação da qualidade biológica de medicamentos podem ser empregadas, desde que assegurem a eficácia e segurança dos mesmos. O SCB é uma alternativa para as indústrias, que podem comprovar a qualidade de seus produtos a baixos custos utilizando métodos adequados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMIDON, G.L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. *Pharmaceutical Research*, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.
- ARTURSSON, P. Epithelial Transport of Drugs in Cell Culture. I: A Model for Studying the Passive Diffusion of Drugs over Intestinal Absorptive (Caco-2) Cell. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 79, n. 6, p. 476-482, 1990.
- ARTURSSON, P.; KARLSSON, J. Correlation between Oral Drug Permeability Coefficients in Human Intestinal Epithelial (Caco-2) Cells. *Biochemical and Biophysical Communications*, v. 175, n. 3, p. 880-885, 1991.
- AUDUS, K.L.; BARTEL, R.L.; HIDALGO, I.J.; BORCHARDT, R.T. The Use of Cultured Epithelial and Endothelial Cells for Drug Transport and Metabolism Studies. *Pharmaceutical Research*, v. 7, n. 5, p. 435-448, 1990.
- BRASIL. Lei 9.787, de 10 de fevereiro de 1999, estabelece o medicamento genérico no País. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, n. 29, seção 1, p. 1-2, 11. fev. 1999a.
- BRASIL. Resolução 391, de 9 de agosto de 1999, estabelece as bases legais para instituição do medicamento genérico no País. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, n. 152, p. 62-9, seção 1, 10. ago. 1999b.
- CHONG, S.; DANDO, S.A.; SOUCEK, K.M.; MORRISON, R.A. In Vitro Permeability through Caco-2 Cells is not Quantitatively Predictive of In Vivo Absorption for Peptide-Like Drugs Absorbed Via the Dipeptide Transporter System. *Pharmaceutical Research*, v. 13, n. 1, p. 120-123, 1996.
- COGBURN, J.N.; DONOVAN, M.G.; SCHASTEEN, C.S. A Model of Human Small Intestinal Absorptive Cells. 1. Transport Barrier. *Pharmaceutical Research*, v. 8, n. 2, p. 210-216, 1991.
- DRESSMAN, J.B.; AMIDON, G.L.; REPPAS, C.; SHAH, V.P. Dissolution Testing as a Prognostic Tool for Oral Drug Absorption: Immediate Release Dosage Forms. *Pharmaceutical Research*, v. 15, n. 1, p. 11-22, 1998.
- DRESSMAN, J.B.; FLEISHER, D.; AMIDON, G.L. Physicochemical Model for Dose-Dependent Drug. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 73, n. 9, p. 1274-1279, 1984.
- GINSKI, M.J.; TANEJA, R.; POLLI, J.E. Prediction of Dissolution - Absorption Relationships from a Continuous Dissolution/Caco2-System. *Pharmaceutical Sciences*, [serial on the internet]. v. 1, n. 2, June 3, 1999. Disponível na página da Internet: <http://.pharmsci.org/journal>.
- GUIDANCE FOR INDUSTRY. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Containing Certain Active Moieties/Active Ingredients Based on a Biopharmaceutics Classification System, Washington: CDER, Food and Drug Administration, 1999.
- HIDALGO, I.J.; HILLGREN, K.M.; GRASS, G.M.; BORCHARDT, R.T. Characterization of the Unstirred Water Layer in Caco2 Cell Monolayers Using a Novel Diffusion Apparatus. *Pharmaceutical Research*, v. 8, n. 2, p. 222-226, 1991.
- HILGERS, A.R.; CONRADI, R.A.; BURTON, P.S. Caco-2 Cell Monolayers as a Model for Drug Transport Across the Intestinal Mucosa. *Pharmaceutical Research*, v. 7, n. 9, p. 902-910, 1990.
- LENNERNÄS, H. Human Intestinal Permeability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 87, n. 4, p. 403-410, 1998.
- LENNERNÄS, H.; AHRENSTEDT, O.; HÄLLGREN, R.; KNUTSON, L.; RYDE, M. PAALZOW, L.K.. Regional Jejunal Perfusion, a New in Vivo Approach to Study Oral Drug Absorption in Man. *Pharmaceutical Research*, v. 9, n. 10, p. 1243-1251, 1992.
- MAKHEY, V.D.; GUO, A.; NORRIS, D.A.; HU, P.; YAN, J.; SINKO, P.J. Characterization of the Regional Intestinal Kinetics of Drug Efflux in Rat and Human Intestine and in Caco-2 Cells. *Pharmaceutical Research*, v. 15, n. 8, p. 1160-1161, 1998.
- PADE, V.; STAVCHANSKY, S. Estimation of the Relative Contribution of the Transcellular and Paracellular Pathway to the Transport of Passively Absorbed Drugs in the Caco-2 Cell Culture Model. *Pharmaceutical Research*, v. 14, n. 9, p. 1210-1215, 1997.
- RUBAS, W.; JEZYK, N.; GRASS, G.M. Comparison of the Permeability Characteristics of a Human Colonic Epithelial (Caco-2) Cell Line to Colon of Rabbit, Monkey, and Dog Intestine and Human Drug Absorption. *Pharmaceutical Research*, v. 10, n. 1, p. 113-118, 1993.
- SHELLY, J.P.; BUSKIRK, G.A.V.; SAVELLO, D.R.; AMIDON, G.L.; ARBIT, H.M.; DIGHE, S.; FAWZI, M.B.; GONZALEZ, M.A.; MALICK, A.W.; MALINOWSKI, H.; NEDICH, R.; PECK, G.E.; PÉARCE, D.M.; SHAH, V.; SHANGRAW, R.F.; SCHWARTZ, J.B.; TRUELOVE, J. Scaleup of Immediate Release Oral Solid Dosage Forms. *Pharmaceutical Research*, v. 10, n. 2, p. 313-316, 1993.
- SINKO, P.J.; LEESMAN, G.D.; AMIDON, G.L. Predicting Fraction Dose Absorbed in Humans

- Using a Macroscopic Mass Balance Approach. *Pharmaceutical Research*, v. 8, n. 8, p. 979-987, 1991.
- SOLDNER, A.; CHRISTIANS, U.; SUSANTO, M.; WACHER, V.; SILVERMAN, J.; BENET, L.Z. Grapefruit Juice Activates P-Glycoprotein-Mediated Drug Transport. *Pharmaceutical Research*, v. 16, n. 4, p. 478-485, 1999.
- STAVCHANSKY, S.; PADE, V. Link between Drug Absorption Solubility and Permeability Measurements in Caco-2 Cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 87, n. 12, p. 1604-1607, 1998.
- TAYLOR, D.C.; POWNALL, R.; BURKE, W. The Absorption of β -Adrenoceptor Antagonists in Rat *In-Situ* Small Intestine; The Effect of Lipophilicity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 37, p. 280-283, 1985.
- WADKE, D.A.; SERAJUDDIN, A.T.M.; JACOBSON, H. Preformulation Testing. In: LIEBERMAN, H.A.; LACHMAN, L.; SCHWARTZ, J.B. (Ed.) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*. v.1. New York: Marcel Dekker, 1989. p. 1-73.
- WINIWARTER, S.; BONHAM, N.M.; AX, F.; HALLBERG, A. LENNERNÄS, H.; KARLÉN, A. Correlation of Human Jejunal Permeability (*In Vivo*) of Drugs with Experimentally and Theoretically Derived Parameters. A Multivariate Data Analysis Approach. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 41, n. 25, p. 4939-4949, 1998.
- ZOCCHI, L.; REFFAINI, A.; AGOSTONI, P.; CREMASCHI, D. Diffusional Permeability of Rabbit Mesothelium. *Journal of Applied Physiology*, v. 85, n. 2, p. 471-477, 1998.

Endereço para correspondência:

Prof^ª. Dr. Teresa C. T. Dalla Costa
Faculdade de Farmácia/UFRGS
Av. Ipiranga, 2752
90610-000 - Porto Alegre/RS
e-mail: Teresadc@farmacia.ufrgs.br

Recebido em: 22.12.1999**Aceito em: 29.12.1999**