

Ensaio para a determinação da permeabilidade de fármacos visando o registro de medicamentos genéricos no Brasil e no mundo.

Ligia Collucci
Thais Triburcia de Souza

INTRODUÇÃO

❖ **Conceitos**

Medicamento Genérico

- Medicamento similar e intercambiável com um produto de referência ou inovador;
- Deve apresentar o mesmo fármaco, na mesma quantidade e forma farmacêutica do medicamento eleito como referência
- Política de medicamentos genéricos: implantada no Brasil em 1999 (Lei nº 9.787)
 - Objetivo principal: melhorar o acesso da população a medicamentos de baixo custo de qualidade comprovada

Equivalência Farmacêutica

- Equivalentes farmacêuticos: medicamentos que contém o mesmo fármaco, na mesma quantidade e forma farmacêutica, podendo ou não conter excipientes idênticos.

Biodisponibilidade

- Velocidade e extensão pelas quais um fármaco é absorvido a partir de uma forma farmacêutica e se torna disponível no sítio de ação.

Bioequivalência ou biodisponibilidade relativa

- Quociente entre a biodisponibilidade de um medicamento teste e a de um medicamento referência, utilizando os valores da área total sob a curva (ASC) da concentração plasmática em função do tempo na comparação
- Demonstração de equivalência terapêutica entre produtos:
 - Sob a mesma forma farmacêutica;
 - Idêntica composição qualitativa e quantitativa de princípios ativos ;
 - Comparável biodisponibilidade quando estudados sob um mesmo desenho experimental.

Equivalência terapêutica

- Equivalentes terapêuticos: contêm o mesmo composto terapeuticamente ativo, devendo, portanto, produzir o mesmo efeito terapêutico e a mesma potencialidade de efeitos adversos
- Devem ser:
 - Seguros
 - Eficazes
 - Bioequivalentes
- Podem diferir em algumas características, como cor, sabor, configuração, agentes conservantes e envase

Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB)

- Agrupar os fármacos com base em suas características de solubilidade, permeabilidade e dissolução a partir da forma farmacêutica.
- Divisão em quatro classes de acordo com suas características de solubilidade e permeabilidade

Classe	Solubilidade	Permeabilidade	Características
I	Alta	Alta	Absorção rápida e completa, extensão de absorção maior que 90% (FDA) e 85% (EMEA).
II	Baixa	Alta	Variabilidades devido a diferenças na formulação e variáveis fisiológicas.
III	Alta	Baixa	Variabilidades devido a diferenças no trânsito gastrointestinal, conteúdo luminal e permeabilidade da membrana.
IV	Baixa	Baixa	Possuem alta variabilidade na velocidade e extensão de absorção.

Bioisenção

- Não obrigatoriedade de um estudo de biodisponibilidade relativa ou de bioequivalência *in vivo* para o registro de um medicamento
- Elimina a exposição desnecessária de indivíduos saudáveis
- Alívio econômico
- Candidatos à Bioisenção:
 - ANVISA e FDA: Fármacos de Classe I com rápida dissolução (85% em 30 minutos)
 - EMA: Fármacos de classe I com dissolução rápida e excipientes que não apresentem impacto sobre a biodisponibilidade. Fármacos de classe III com dissolução muito rápida (85% em 15 minutos) e excipientes qualitativamente idênticos e quantitativamente similares
 - OMS: Fármacos classes I e III e Fármacos classe II quando são ácidos fracos com relação dose:solubilidade de 250 mL a pH 6,8, dissolução rápida a pH 6,8 e dissolução comparável com o medicamento de referência a pH 1,2 e 4,5.

REQUISITOS	AGÊNCIA REGULATÓRIA			
	ANVISA	FDA	EMA	OMS
CANDIDATOS SEGUNDO O SCB	Classe I	Classe I	Classes I e III	Classes I, II e III
CARACTERÍSTICAS PARA CLASSIFICAÇÃO DE FARMACOS DE ALTA SOLUBILIDADE	Maior dose solúvel em volume ≤250 mL, pH 1,2-6,8, 37°C	Maior dose solúvel em volume ≤250 mL, pH 1-7,5, 37°C	Maior dose solúvel em volume ≤250 mL, pH 1,2-6,8, 37°C	Maior dose solúvel em volume ≤250 mL, pH 1,2-6,8, 37°C
CLASSIFICAÇÃO DE FARMACOS DE ALTA PERMEABILIDADE	Absorção ≥85%	Absorção ≥90%	Absorção ≥85%	Absorção ≥85%
MEIOS DE DISSOLUÇÃO	Tampão pH 1,2; 4,5 e 6,8 a 37°C			
VOLUME DE MEIO	900 mL	900 mL	500 mL	900 mL
APARATO DE AGITAÇÃO	Pá: 50 rpm/ cesto: 100 rpm	Pá: 50 rpm/ cesto: 100 rpm	Pá: 50 rpm/ cesto: 100 rpm	Pá: 75 rpm/ cesto: 100 rpm
PERFIL DE DISSOLUÇÃO	Dissolução rápida	Dissolução rápida	I: dissolução rápida III: dissolução muito rápida	I: dissolução rápida II: dissolução rápida em pH 6,8 III: dissolução muito rápida

Principais Requisitos para Bioisenção Baseada no SCB

Quais são as principais diferenças?

Permeabilidade

- Capacidade de passagem do fármaco através da parede do jejuno humano
- A determinação da permeabilidade de um fármaco contribui para a previsão de sua biodisponibilidade

Com a diminuição de 90 para 85%:

- Fármacos classe III passaram a ser classe I
- Mais medicamentos elegíveis para bioisenção → muitos da lista de medicamentos essenciais da OMS

REQUISITOS	AGÊNCIA REGULATÓRIA			
	ANVISA	FDA	EMA	OMS
CANDIDATOS SEGUNDO O SCB	Classe I	Classe I	Classes I e III	Classes I, II e III
CARACTERÍSTICAS PARA CLASSIFICAÇÃO DE FÁRMACOS DE ALTA SOLUBILIDADE	Maior dose solúvel em volume ≤ 250 mL, pH 1,2-6,8, 37°C	Maior dose solúvel em volume ≤ 250 mL, pH 1-7,5, 37°C	Maior dose solúvel em volume ≤ 250 mL, pH 1,2-6,8, 37°C	Maior dose solúvel em volume ≤ 250 mL, pH 1,2-6,8, 37°C
CLASSIFICAÇÃO DE FÁRMACOS DE ALTA PERMEABILIDADE	Absorção $\geq 85\%$	Absorção $\geq 90\%$	Absorção $\geq 85\%$	Absorção $\geq 85\%$

Adaptado de BELLAVINHA, 2012

INTRODUÇÃO

- ❖ **Importância da determinação da permeabilidade para o registro de medicamentos genéricos**

Importância da determinação da permeabilidade para o registro de medicamentos genéricos

- Genérico → INTERCAMBIALIDADE
 - Equivalência farmacêutica
 - Bioequivalência
 - Boas práticas de fabricação } Equivalência Terapêutica
- Determinação da permeabilidade de um fármaco contribui para a previsão de sua biodisponibilidade
- Classificação SCB → possibilidade de Bioisenção
 - Agilizar, facilitar e baratear aprovação e registro
 - Elimina a exposição desnecessária de indivíduos saudáveis

OBJETIVO E METODOLOGIA

Analisar como são realizados os ensaios de permeabilidade com a finalidade de registro de um medicamento genérico no Brasil e no mundo, utilizando três exemplos de estudo bem como pesquisa bibliográfica em diversas fontes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- ❖ Principais métodos para a determinação da permeabilidade

Principais métodos para a determinação da permeabilidade

- Estudos farmacocinéticos em seres humanos (estudos de balanço de massas e biodisponibilidade absoluta)
- Métodos de permeabilidade intestinal
- Perfusão intestinal *in vivo*
- Perfusão intestinal *in situ*
- Métodos de permeabilidade *in vitro* usando segmentos intestinais de animais
- Estudos com monocamadas de células epiteliais (Caco-2)
- Métodos *in silico*

Métodos *in situ*

- Avaliação da perfusão intestinal em um animal vivo → simula condições reais de absorção do fármaco
- Baixo custo e técnicas cirúrgicas simples
- Principais vantagens: semelhança com as condições *in vivo* e não influência do metabolismo hepático
- Desvantagem: baseado apenas no desaparecimento do fármaco do lúmen intestinal → não considera que o fármaco pode ficar retido

Métodos *in silico*

- Método computacional baseado nos parâmetros físico químicos do fármaco
- Consegue prever a permeabilidade da membrana aos compostos com exatidão
- Eficiente para prever a permeabilidade de um fármaco que atravesse a membrana somente por difusão passiva
- Grande aplicabilidade para atender a demanda gerada pela triagem de novas moléculas em larga escala

Ensaio de permeabilidade com membranas paralelas artificiais (PAMPA)

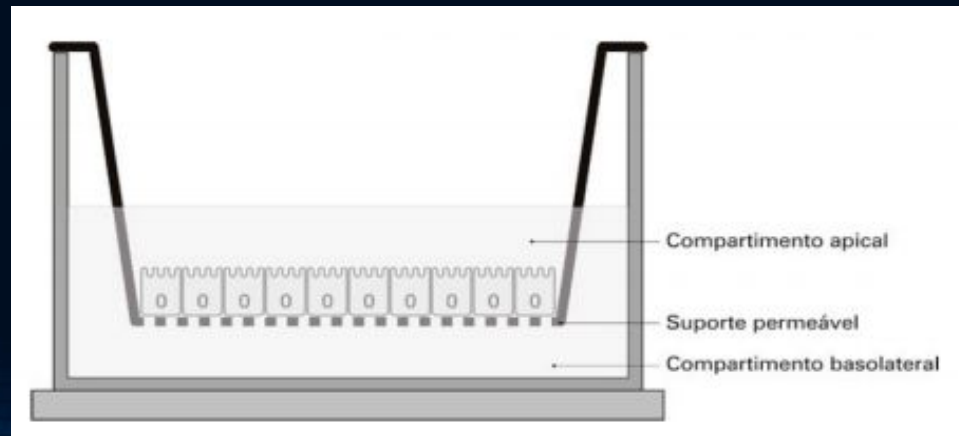
- Método *in vitro*
- Emprega membranas sintéticas constituídas de fosfolipídeos
- Permite determinar a interação do fármaco com a bicamada lipídica por meio da sua transição de um meio aquoso para um meio lipídico, simulando as características de uma membrana celular
- Dois compartimentos:
 - Doador → onde o fármaco é adicionado
 - Receptor → onde o fármaco que atravessou a membrana é quantificado

Células Caco-2

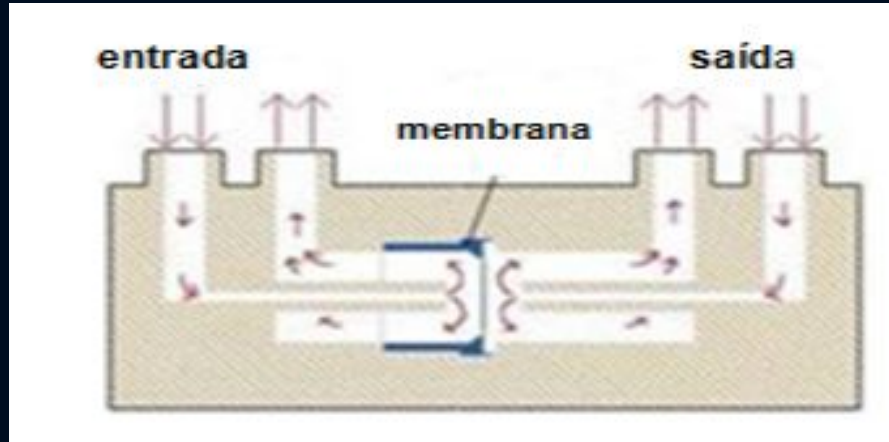
- Modelo celular mais empregado para investigar processos de absorção intestinal *in vitro*
- Células Caco-2: provenientes de adenocarcinoma de cólon humano → apresentam muitas características morfológicas e bioquímicas presentes no intestino delgado humano
- Mais eficiente na caracterização da permeabilidade de compostos absorvidos passivamente pela via transcelular
- Dois compartimentos
 - Doador
 - Receptor

GONÇALVES *et al.*, 2009

- Ideal para:
 - Direcionar alterações nas características físico químicas
 - Investigar estratégias de formulação para melhorar a permeabilidade
 - Caracterizar possíveis interações entre fármacos
 - Investigar potenciais efeitos tóxicos do fármaco ao epitélio intestinal



Câmaras de Ussing



WPI,2012

- Sistema *in vitro* que usa segmento intestinal de animais
- Dois compartimentos
 - Doador
 - Receptor
- Principal vantagem: possibilidade de ser usado para fins múltiplos (Exemplo: estudar diferenças regionais do trato gastrointestinal em relação à absorção)
- Principal desvantagem: subestimação possível do transporte do fármaco através do tecido animal devido à retenção do composto na membrana

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- ❖ **Exemplo 1 -"Avaliação da solubilidade e da permeabilidade intestinal de fármacos antirretrovirais. Aplicações na Classificação Biofarmacêutica"**

Exemplo 1

- Fármacos: Estavudina (d4T), lamivudina (3TC) e zidovudina (AZT)
 - Tratamento terapêutico de pessoas infectadas com o vírus HIV
- Objetivos
 - Padronização da técnica para a determinação da permeabilidade em segmentos intestinais de ratos da linhagem Wistar, por meio do modelo de perfusão in situ.
 - Determinação da permeabilidade efetiva dos fármacos estavudina, lamivudina e zidovudina empregando o modelo de perfusão in situ.
- Permeabilidade efetiva (P_{ef}) da estavudina, lamivudina e zidovudina
 - Cálculo a partir da solubilização do fármaco na solução de perfusão e posterior equilíbrio com a membrana intestinal
 - Os resultados dos fármacos antirretrovirais e dos marcadores foram obtidos a partir de métodos cromatográficos previamente validados.

Exemplo 1

- Classificação de um fármaco quanto à permeabilidade - Zakeri-Milani e colaboradores (2005)
 - Maior que $2,0 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ para substâncias de alta permeabilidade
 - Menor que $2,0 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ para substâncias de baixa permeabilidade.
- d4T e AZT : considerados como substâncias de alta permeabilidade.
- 3TC: valor de permeabilidade muito próximo ao limite proposto

	$P_{ef} \times 10^{-5} (\text{cm.s}^{-1})$	$DP \times 10^{-5} (\text{cm.s}^{-1})$	DPR(%)
d4T	3,96	0,47	11,85
3TC	3,08	0,26	8,41
AZT	4,17	0,43	10,32
Fluoresceína	0,005	0,001	21,59
Metoprolol	5,32	0,54	10,21

DP = desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo. Os valores representam a média de seis determinações para a fluoresceína e de sete determinações para o metoprolol, d4T, 3TC e AZT

PEREIRA, Thaisa Marinho. 2011)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- ❖ Exemplo 2-”Avaliação do ácido fólico como potencial candidato à bioisenação”

Exemplo 2

- Ácido fólico
 - Tratamento de anemia megaloblástica, diminuição do risco para doenças cardiovasculares, câncer de cólon, doenças neurológicas e hipertensão.
 - Consta nas edições mais recentes da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais e da Lista de Medicamentos Essenciais da Organização Mundial de Saúde.
- Objetivos
 - Avaliar as características biofarmacêuticas do ácido fólico, visando subsidiar a sua indicação, ou não, como candidato à bioisenção.
 - Desenvolvimento de método analítico para quantificação nos estudos de solubilidade e dissolução.
 - Análise das informações disponíveis na literatura sobre permeabilidade intestinal

Exemplo 2

- Análise das informações disponíveis na literatura sobre a permeabilidade intestinal do ácido fólico
 - Experimentos in vitro (células Caco-2) → classificação do fármaco como de permeabilidade moderada a alta
 - Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos → ácido fólico apresenta biodisponibilidade de aproximadamente 100% → considerado altamente permeável
 - Dose de 1mg → altamente solúvel e altamente permeável (classe I) → poderia ser bioisento
 - Dose de 5mg → baixa solubilidade e alta permeabilidade (classe II) → bioisenção inviável (FDA e Anvisa)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- ❖ Exemplo 3 -”Avaliação biofarmacêutica do diazepam visando subsidiar discussão sobre bioisenção”

Exemplo 3

- **Diazepam** → amplamente consumido em todo o mundo
 - Ansiolítico, relaxante muscular e anticonvulsivante .
- **Objetivos**
 - Elucidação das características biofarmacêuticas do diazepam
 - Avaliar os impactos que os excipientes comumente utilizados nos comprimidos podem ocasionar na sua absorção
 - Decisão segura em se considerar novos medicamentos contendo este fármaco, como bioisentos.

Exemplo 3

- Permeabilidade do diazepam
 - Literatura → alta permeabilidade.
- Classe I no SCB
- Estudo de dissolução → baixa velocidade de dissolução quando veiculados nos medicamentos nas Formas Farmacêuticas Sólidas Oraís de Liberação Imediata → avaliação das formulações visando uma decisão segura sobre a bioisenção de novos produtos contendo este fármaco.

Referência	Método	Peff (10 ⁻⁶ cm/s)	Valores referência de alta permeabilidade (10 ⁻⁶ cm/s)	Permeabilidade
Haslam et al., 2011	Segmento jejunal de ratos	127,9	-	Alta
	Segmento jejunal humano	89,0	-	Alta
	Caco -2	27,0	-	Alta
Turco et al., 2011	Caco – 2/TC7	16,98 ± 1,58	-	Alta
Zaki et al., 2010	2/4/A1	229,0+/- 7,8	>55,0	Alta
Thomas et al., 2008	Caco-2	97,6	-	Alta
Nordqvist et al., 2004	Caco-2	48,0 ± 8,0	> 12,0	Alta
Yazdanian et al., 1998	Caco-2	33,4 ± 2,5	> 7,0	Alta
Yee, 1997	Caco-2	70,79	> 10,0	Alta

CONCLUSÃO

Conclusão

- Os ensaios de permeabilidade apresentam grande importância principalmente em estudos que visam a bioisecção de fármacos
- Seleção de um método adequado deve ser feita de forma criteriosa → variabilidade entre as técnicas de cada método pode gerar divergências nos resultados
- Padronização de técnica é de suma importância para minimizar possíveis variações nos resultados
- Importante ressaltar a relevância do SCB

The background is a dark blue gradient with a pattern of curved, concentric lines that create a tunnel-like or vortex effect, drawing the eye towards the center. The lines are more densely packed in the center and become more widely spaced towards the edges.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA. Resolução-RDC nº 135, de 29 de maio de 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/legis/resolucoes/2003/135_03rdc.htm>. Acesso em: 20 de maio de 2017
- ANVISA. Resolução - RDC nº 10, de 2 de janeiro de 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/legis/resolucoes/10_01rdc.htm>. Acesso em: 20 de maio de 2017
- ANVISA. Resolução nº 391, de 9 de agosto de 1999. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/legis/resolucoes/391_99.htm>. Acesso em: 20 de maio de 2017
- ANVISA. Confiabilidade e Garantia da Qualidade dos Genéricos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/profissionais/confiabilidade.htm>>. Acesso em: 22 de maio de 2017.
- ARAÚJO, Lorena Ulhôa et al. **Medicamentos genéricos no Brasil: panorama histórico e legislação**, 2010.
- PARAISO, Rafael Leal Monteiro. **Determinação da solubilidade e permeabilidade de fármacos conforme o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB)**. Tese de Doutorado-Universidade de São Paulo.
- DEZANI, Andre Bersani. **Avaliação in vitro da solubilidade e da permeabilidade da lamivudina e da zidovudina. Aplicações na classificação biofarmacêutica**. 2010. Tese de Doutorado-Universidade de São Paulo.
- PEREIRA, Thaisa Marinho. **Avaliação da solubilidade e da permeabilidade intestinal de fármacos antirretrovirais. Aplicações na Classificação Biofarmacêutica**. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, 2011
- ARRUNÁTEGUI, L. B. **Avaliação biofarmacêutica do diazepam visando subsidiar discussão sobre bioisenção**. 2013. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.
- BELLAVINHA, K. R. **Avaliação do ácido fólico como potencial candidato à bioisenção**. 2012. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2012.
- AMIDON, G.L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. **A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability**, Pharm. Res., v.12, p. 413-420, 1995.