

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS
BIOFARMACOTÉCNICA

ESTUDOS DE PERMEABILIDADE INTESTINAL DE FÁRMACOS

José Eduardo Gonçalves
Mariane Ballerini Fernandes

São Paulo
- 2011 -

O processo de P&D e o lançamento de medicamentos

Os custos médios divulgados pela indústria para se levar um medicamento inovador ao mercado nos Estados Unidos é da ordem de US\$ 800 milhões - 1,4 bilhão (incluindo os testes clínicos e pré-clínicos).

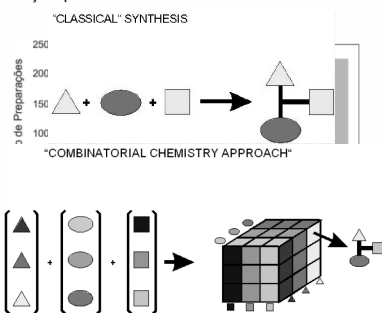
ESTÁGIO DE P&D	P&D (DESCOBERTA)	DESENVOLVIMENTO PRÉ-CLÍNICO	TESTES CLÍNICOS			REGISTRO	FASE 4
			Fase 1 ¹	Fase 2 ²	Fase 3 ³		
Principais Atividades	Exploração inicial: sem vistas à identificação de leads de pesquisa sobre doenças e busca em laboratório ou computador de moléculas biologicamente ativas para tratamento. Envolve estudos de farmacodinâmica, toxicologia e ações químicas, bem como o desenvolvimento em escala piloto e experimental.	Compostos selecionados são estudados em termos de Eficácia Pré-clínica de Laboratório de Toxicidade e segurança em paralelo ao desenvolvimento de métodos analíticos necessários para desenvolvimento de ensaios pré-clínicos.	Com estudos bem estruturados realizados em humanos em três fases de testes clínicos: Fase 1 - segurança e tolerância em voluntários saudáveis; Fase 2 - estudos de segurança, eficácia e toxicidade em pequenos grupos de pacientes; a Fase 3 - testes mais longos com maiores populações para demonstrar proveito de eficácia, segurança e valor.	Seus resultados, dos testes clínicos são estatísticos em termos de qualidade, eficácia e segurança. Um dossiê é apresentado às autoridades reguladoras para aprovação.	Terminado o estudo de pós-marketing, envolvendo milhares de pacientes, após o medicamento ser lançado no mercado, com vista a identificar efeitos secundários e reações adversas não previstas.		
Taxa de Sucesso ⁴		Menos de 1%	70%	60%	50%	30%	N/A
Tempo	4-6 anos	1 ano	1-1,5 ano	1-2 anos	2-3 anos	1-2 anos	Vários anos
% Casos	30	5	7	20	22	10	10

Fonte: JFPMIA (2004, p. 23).

Novas tecnologias

QUÍMICA COMBINATÓRIA

- tornou possível a síntese de bibliotecas de compostos a partir de uma mesma reação química



Novas tecnologias

Tecnologias de alta capacidade de rastreio (HTS, High-throughput screening)

- permitiram o rastreamento da atividade de substâncias por meio de ensaios *in vitro* miniaturizados baseados em ligações com moléculas-alvo.

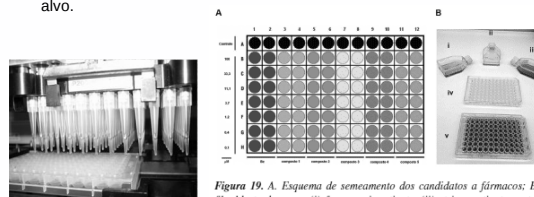


Figura 19. A. Esquema de sementeamento dos candidatos a fármacos; B. fibroblastos humanos (i), formas epimastigotas (ii) e tripomastigotas metacíclicas (iii) usadas para a triagem de novos compostos. Representação do experimento logo após a adição do substrato (iv). Viabilidade do parasita 3 h após a adição do substrato (v).

Problemas no desenvolvimento de novos fármacos

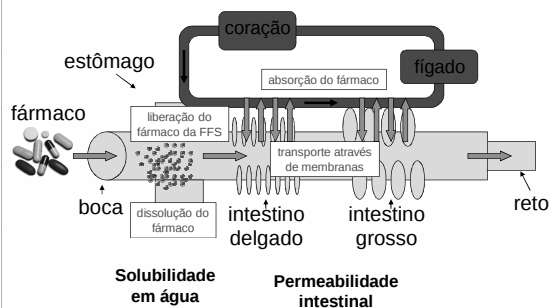
Tais esforços, no entanto, não foram suficientes para aumentar o número de novos fármacos lançados no mercado e muitos dos novos compostos identificados sequer chegam aos testes pré-clínicos.

ABSORÇÃO, DISTRIBUIÇÃO, METABOLISMO E EXCREÇÃO (ADME)

Principal razão de falha nos ensaios clínicos



Absorção oral de fármacos

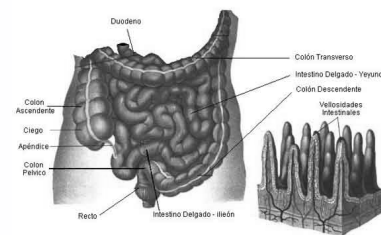


*adaptado de Amidon, G – Dissolution in vitro and ex-vivo: implicatos for BE standards

Fatores que afetam a absorção oral de fármacos

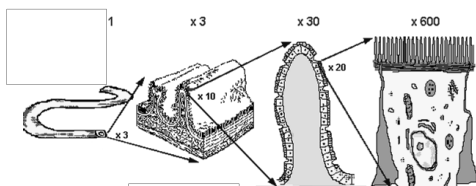
- composição dos líquidos fisiológicos do trato gastrointestinal (suco gástrico, sais biliares e líquidos intestinais);
- precipitação no local de absorção;
- adsorção do fármaco aos compostos presentes no lúmen;
- a degradação química ou bacteriana;
- metabolização na parede do trato gastrointestinal (TGI)
- mecanismos de transportes que determinam as rotas de absorção

Epitélio intestinal



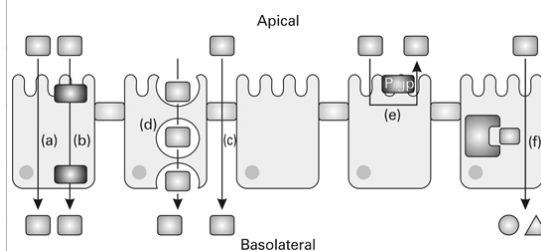
- Área de aproximadamente 200 m² (projeções, vilosidades e microvilosidades)
- Pelos capilares passam cerca de 1,0 a 1,5 L de plasma/min

Epitélio intestinal



- Enterócitos dispostos em monocamadas
- Porção apical: face para o lúmen intestinal
- Porção basal em contato com a matriz extracelular
- Tight junctions (junções oclusivas)
- Muco

Mecanismos de absorção



(GONÇALVES *et al.*, 2009).

Importância das alternativas aos métodos de absorção *in vivo*

- Ética
- Econômica
- Tempo de análise
- Pesquisa de novos fármacos
- Quantitativa

Modelos para a avaliação da permeabilidade intestinal de fármacos

- ▣ Físico-Químicos
- ▣ *in situ*
- ▣ *in silico*
- ▣ *in vitro*

Métodos físico-químicos

Consistem em prever a absorção de fármacos a partir de suas propriedades físico-químicas. Em geral, a permeabilidade dos fármacos é o principal fator para determinar sua absorção intestinal por transporte passivo

Principais propriedades físico-químicas

- ▣ Peso molecular;
- ▣ PKa;
- ▣ Lipofilicidade;
- ▣ carga/ionização;
- ▣ Solubilidade;
- ▣ Tamanho ou porção molecular

Permeabilidade aparente

$$PA = \log (p \cdot F_{\text{non}} [S_o \cdot V_L / X_o])$$

P = Coeficiente de partição octanol/água

F_{non} = Fração do fármaco não ionizado no pH 6,5

S_o = Solubilidade aquosa do fármaco não ionizado a 37°C

V_L = Volume luminal (± 250 mL)

X_o = Dose do fármaco

Métodos *in situ*

Consiste na perfusão de substâncias por segmentos intestinais de roedores (ratos e coelhos) para estudar a permeabilidade e a cinética de absorção dos mesmos.

Cálculo da perfusão

$$P_{\text{eff}} = [-Q_{\text{in}} \cdot \ln (C_o / C_i)] / 2\pi RL$$

Q_{in} = É a razão do fluxo de perfusão

$2\pi RL$ = É a área da transferência de massas avaliada

pela absorção no cilindro intestinal

C_o e C_i São as concentrações no lado da injeção (lúmen) e no outro lado após o equilíbrio

Métodos *in situ*

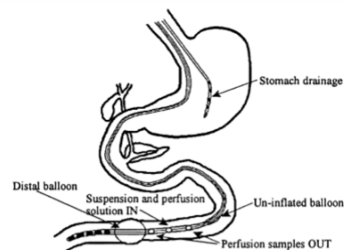
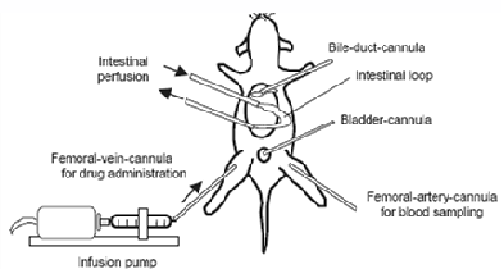


Fig. 1. The multichannel perfusion tube Loc-I-Gut® in the proximal human jejunum. Air is blown into the distal balloon to create a semi-open segment. Gastric drainage is applied by a separate tube placed in the antrum region of the stomach.

BONLOKKE, L.; HOVGAAARD, L.; KRISTENSEN, H.G.; KNUSTON, L.; LENNERNÄS, H. - Direct estimation of the *in vivo* dissolution of spironolactone, in two particle size ranges, using the single-pass diffusion technique (Loc-I-Gut®) in humans. *European Journal of Pharmaceutics*, v.12, p.239-250, 2.001.

Métodos *in situ*



Métodos *in silico*

São métodos computacionais usados para prever a permeabilidade da membrana aos compostos com exatidão.

Este método se baseia na lipofilicidade do composto, capacidade de formar ligações de hidrogênio, tamanho molecular, área superficial polar e propriedades quânticas.



Métodos *in vitro*

Grande variedade de modelos: no entanto, não existe nenhum método *in vitro*, até o momento, que mimetize adequadamente todos os mecanismos envolvidos.



Aplicação de um modelo *in vitro* para a permeabilidade intestinal depende de sua capacidade de simular as características das barreiras biológicas *in vivo*.

Importância no aspecto ético

Métodos *in vitro*

Baseado em membranas artificiais

➤ PAMPA

Baseado em tecido animal

➤ Intestino "invertido"

➤ Segmentos intestinais

➤ Vesículas isoladas de membranas

Baseado em células

➤ Caco-2

➤ MDCK

PAMPA - Parallel Artificial Membrane Permeability Assay

Técnica desenvolvida em 1998 por Kansy *et al.*

Caracteriza-se por ser uma técnica não celular na qual uma membrana sintética formada por fosfolípidios depositados em um suporte poroso simula a composição de uma membrana celular.

Composição básica

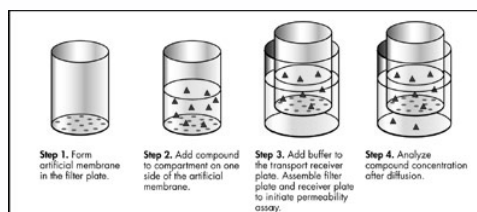
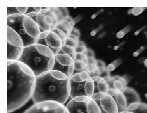
Fosfatidilcolina + Lecitina 1% em Dodecano – suporte poroso de PVDF

Utilizada para previsão da permeabilidade transcelular passiva – exclusivamente – não apresenta transportadores.

Considera apenas a lipofilicidade do composto a ser avaliado

Técnica rápida – robusta – baixo custo

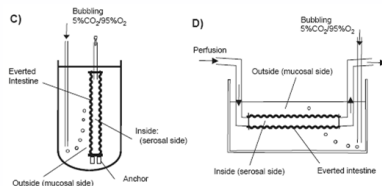
PAMPA - Parallel Artificial Membrane Permeability Assay



Intestino "invertido"

O método consiste em avaliar a absorção utilizando porção de intestino animal invertido

Possível estudar o transporte passivo e ativo e comparar a cinética do transporte de fármacos na presença e na ausência de inibidores ou substratos de glicoproteínas-P



Intestino "invertido"

❑ VANTAGENS

- ❑ Analítica, pois o volume de amostra do lado seroso é pequeno e o fármaco se acumula rapidamente

❑ DESVANTAGENS

- ❑ Falta de sangue e nervos.
- ❑ Diminuição da viabilidade.
- ❑ Danos morfológicos

Segmentos intestinais

Consiste no isolamento de tecido animal, de tamanho apropriado.

Determina-se a razão de fármaco que atravessou o tecido. A permeabilidade é baseada no aparecimento do fármaco no lado seroso e desaparecimento no lado mucoso.

- | | |
|--|--------------------------------------|
| ▣ VANTAGENS | ▣ DESVANTAGENS |
| ▣ Absorção em vários segmentos intestinais | ▣ Falta de sangue e nervos |
| ▣ Pouca amostra | ▣ Viabilidade dos tecidos |
| ▣ Fármaco coletado suficiente | ▣ Mudanças morfológicas e funcionais |

Vesículas isoladas de membranas

As vesículas podem ser preparadas de qualquer porção intestinal ou de enterócitos isolados.

Elas oferecem uma oportunidade única de estudar as propriedades dos fármacos e o transporte de nutrientes em níveis celulares

- | | |
|----------------|--|
| ▣ VANTAGENS | ▣ DESVANTAGENS |
| ▣ Congelamento | ▣ Não possibilita integração de metodologias |
| ▣ Preservação | ▣ Impurezas |
| | ▣ Volume pequeno de vesículas |
| | ▣ Métodos analíticos sensíveis |

Células Caco-2

São células extraídas de adenocarcinoma de cólon humano, que, em cultura, se diferenciam espontaneamente em enterócitos.

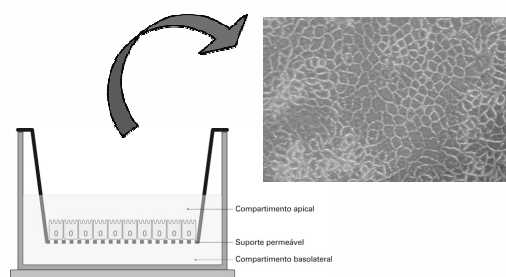
As células são cultivadas em filtros permeáveis e porosos.

Monocamada celular com microvilosidades, sistemas de transportes ativos e passivos, sistemas enzimáticos.



Possibilitam a avaliação das diferentes vias de absorção (paracelular e transcelular).

Células Caco-2



Coeficiente de Permeabilidade aparente

$$P_{app} = (V / A \cdot C_o) (dC/dT)$$

V = Volume da câmara receptora

A = Área de tecido exposta

C_o = Concentração inicial do fármaco na câmara doadora

dC/dT = É a mudança da concentração do fármaco na câmara receptora em função do tempo

Cultura de células Caco-2

Manutenção da cultura de células em condições assépticas



Fluxo laminar



Utensílios estéreis, apirrogênicos:
Filtros esterilizantes, pipetas,
garrafas de cultivo (descartáveis)



Cultura de células Caco-2

Meio de cultivo:

DMEM

Meio com alta concentração de nutrientes (aminoácidos, vitaminas e micronutrientes). A formulação inicial continha 5,6 mM de glicose – 25mM mostrou ser melhor para crescimento de variados tipos celulares de mamíferos.

Forma de pós

Água de preparo = bastante crítica sua qualidade – traços de minerais ou contaminantes = impacto na viabilidade celular

Deve ser ultrapura = resistividade > 20mOhms

Cultura de células Caco-2

Meio de cultivo:

Antibióticos

Evitar estocar o meio com antibióticos por muito tempo → mascarar contaminação em baixo nível que podem ser problemáticas futuramente e criar resistência bacteriana.

Os mais empregados:

Penicilina (100IU/mL) bactérias gram positivas

Estreptomicina (50ug/mL) bactérias gram negativas

Anfotericina-B 25ug/mL antifúngico

Cultura de células Caco-2

Meio de cultivo:

Nutrientes

Glicose - principal carboidrato normalmente utilizado em células de mamíferos – 5 a 25mM.

Glicose → Piruvato → lactato → ácido láctico

Glutamina - aminoácido adicionado em maior concentração que outros – fonte de energia adicional

Aminoácidos não essenciais – células não produzem

Cultura de células Caco-2

Meio de cultivo:

Sais

Garantem a osmolaridade do meio (300mOsm/kg)

Principais Na⁺ K⁺ Mg⁺ Ca⁺ Cl⁻ Sulfato e Fosfato.

Traços de Elementos

Elementos inorgânicos Mn, Cu, Zn, Mo, Va, Se, Fe, Ca, Mg, Si, Ni, etc. → atividades enzimáticas

Vitaminas e hormônios

Presente no soro fetal

Estabilizante de pH: Bicarbonato de Sódio, CO₂ (5 a 10 %) e sais de Hepes.

Cultura de células Caco-2



Cultivo em garrafas 75cm² - Meio DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino + 1% a.a. não essenciais + 1% glutamina + penicilina/estreptomicina



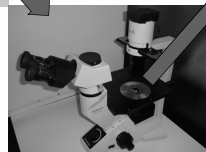
Mantidas em incubadora de CO₂
37° C
5% CO₂
90% Umidade Relativa

Cultura de células Caco-2

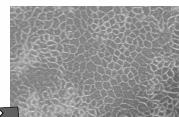
Acompanhamento do crescimento celular



Células em garrafa de cultura



Microscópio invertido



Cultura celular atinge mais que 90% de cobertura da área da garrafa – necessidade de repique (3 a 4 dias)

Cultura de células Caco-2

Repique de cultura

Cultura em garrafa com, no mínimo, 90% cobertura da área de crescimento



Solução de Tripsina/EDTA



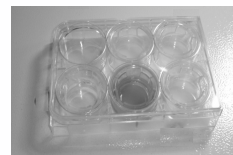
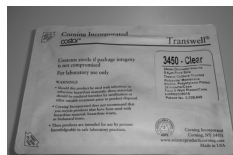
Células em suspensão

Diluição 1:4



Experimento de permeabilidade com células Caco-2

Placas Transwell® - suporte permeável de policarbonato, polietileno, polietilenoftalato, policarbonato revestido com colágeno.
Placas com 6, 12, 24 96 poços

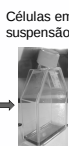


Experimento de permeabilidade com células Caco-2

Contagem celular para transferência às placas Transwell®



Solução de Tripsina/EDTA



Células em suspensão

Suspensão celular (10uL) + Triptan Blue (10uL)



Microscópio biológico
Determinação do número de células viáveis

Experimento de permeabilidade com células Caco-2

Transferência de células para placas

Suspensão celular com número de células viáveis determinada



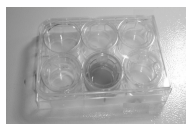
Transferência de volume adequado de suspensão celular para poços da placa



Densidade celular utilizada:
 5×10^4 cél/cm²

Experimento de permeabilidade com células Caco-2

Incubação da cultura em placas do experimento de permeabilidade



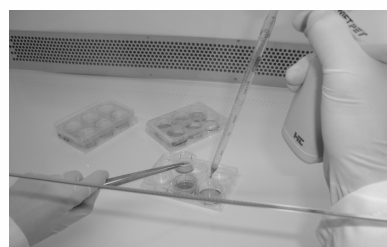
Placa contendo as células Caco-2
Meio DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino + 1% a.a. não essenciais + 1% glutamina + penicilina/estreptomicina



Mantidas em incubadora de CO₂
37° C
5% CO₂
90% Umidade Relativa
Tempo de cultivo: 21 dias

Experimento de permeabilidade com células Caco-2

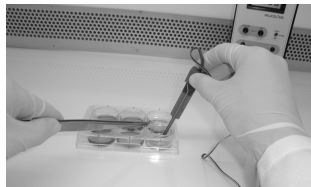
Manutenção da cultura nas placas



Substituição do meio de cultivo a cada 48 horas

Experimento de permeabilidade com células Caco-2

Após 21 dias de cultivo, as células estão diferenciadas para realização do experimento



Avaliação da integridade da membrana por meio da medida da resistência elétrica transepitelial (RET)
Diferença do potencial elétrico entre compartimentos apical e basolateral

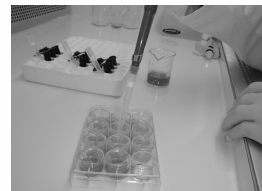


Minivoltímetro - Millicell ERS®

Experimento de permeabilidade com células Caco-2



Agitador Orbital Termostatzado
Experimento realizado sob agitação moderada 25 a 50 rpm a 37°C



Coleta das amostras em tempos determinados
Experimento realizado em meio de solução balanceada de Hanks
Os valores do pH do meio variam entre 5,0 a 7,4 (faixa fisiológica)

Experimento de permeabilidade com células Caco-2

Quantificação das amostras provenientes dos experimentos de permeabilidade



HPLC – UV-Vis
HPLC - FL



HPLC – MS/MS

Experimento de permeabilidade com células Caco-2

Os valores de Permeabilidade Aparente (P_{app}) em cm/s foram determinados segundo a equação :

$$P_{app} = \frac{VR}{(A \times C_0)} \times \frac{dC}{dt}$$

Experimento de permeabilidade com células Caco-2

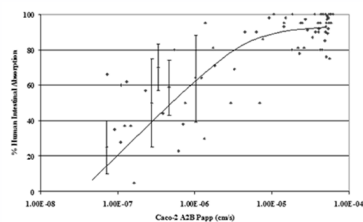


Figure 4. Relationship between Caco-2 permeability and % human intestinal absorption.

Zhao YH et al. (2001) J Pharmaceut Sci 90; 749-784

Valores de P_{app}

< 1×10^{-6} cm/s - Baixa Permeabilidade (0 – 20% de absorção)

$1 - 10 \times 10^{-6}$ cm/s - Perm. intermediária (20 – 70%)

> 10×10^{-6} cm/s - Alta Perm. (70 – 100%)

YEE, S. - In vitro Permeability Across Caco-2 Cells (Colonic) Can Predict In Vivo (Small Intestinal) Absorption in Man - Fact or Myth. Pharm. Res., v. 14, p. 763 – 766, 1.997.

Empregos potenciais para as células Caco-2

AVALIAÇÃO DE:

- permeação de fármacos em desenvolvimento
- funções das células epiteliais do intestino
- estratégias de formulações (dendrimeros, nanoencapsulamento)
- efeito tóxico potencial de determinados compostos
- metabolismo de pré-sistêmico fármacos
- possíveis interações entre fármacos no processo de absorção

Limitações ao empregos de células Caco-2

- Variação do número de transportadores
- A baixa permeabilidade de compostos hidrofílicos com baixo peso molecular
- A presença de co-solventes (metanol, etanol, propilenoglicol e polietilenoglicol)
- A aderência física de fármacos de alta lipossolubilidade aos materiais do suporte de cultivo celular
- Tempo de crescimento das células Caco-2
- Variabilidade entre diferentes laboratórios levam à necessidade de padronização da técnica.
- Variabilidade dependente das condições de cultivo

Necessidade de padronização da técnica

- ▣ Condições de cultivo das células
- ▣ Tempo de cultivo
- ▣ Duração do estudo
- ▣ pH
- ▣ Substratos para adsorção do fármaco antes e após a permeação.



FDA – Guia Bioisenções - 2000

Descreve a necessidade da utilização de compostos com valores de Papp previamente determinadas para padronizar e validar a técnica

Drug	Permeability Class
Antipyrine	High (Potential IS candidate)
Caffeine	High
Carbamazepine	High
Fluvastatin	High
Ketoprofen	High
Metoprolol	High (Potential IS candidate)
Naproxen	High
Propranolol	High
Theophylline	High
Verapamil	High (Potential ES candidate)
Amoxicillin	Low
Atenolol	Low
Furosemide	Low
Hydrochlorothiazide	Low
Mannitol	Low (Potential IS candidate)
α-Methylidopa	Low
Polyethylene glycol (400)	Low
Polyethylene glycol (1000)	Low
Polyethylene glycol (4000)	Low (Zero permeability marker)
Ranitidine	Low

Células MDCK

MDCK é um modelo proposto por "Madin-Darby" a partir de células de rim canino

Quando cultivadas em membranas semipermeáveis se diferenciam em células epiteliais colunares, com junções semelhantes às células Caco-2

Não apresentam n° expressivo de transportadores (ideal para estudar transporte de fármacos por difusão passiva)

Comparação entre células Caco-2 e MDCK

Células	Espécie	Origem	Cultura	Limitações
Caco-2	Humana	Cólon	2-3 semanas	Ausência de muco e CYP 3A4. Concentração de solventes orgânicos < 1-2%.
MDCK	Canina	Rim	3-7 dias	
MDCK-MDR1	Canina	Rim com gene MDR1 humano transfectado	3-7 dias	

Outras linhagens celulares

Cell culture	Origin	Ref
CaCo-2 cell line: Human adenocarcinoma cell line expressing P-gp	Human intestinal	Artursson, et al. ¹⁶
TC7: CaCo-2 subclone obtained from CaCo-2 isolation	Human intestinal	Rousset, et al. ¹⁷
HT29-MTX: Human intestinal cell line characterised by their ability to produce mucus	Human intestinal	Walter, et al. ¹⁸
LLC-PK1: Pig kidney epithelial cell line (parental cell line; P-gp practically absent)	Pig kidney	Mile, et al. ¹⁹ Perantoni, et al. ⁴ Paul, et al. ⁵
LLC-GAS-COL150 and LMDR1 correspond to the parental LLC-PK1 transfected with human MDR1 cDNA	Pig kidney	Tanigawara, et al. ⁷
LMRP1: LLC-PK1 transfected with human MRP1 cDNA	Pig kidney	Van der Sandt, et al. ¹¹
MDCK: Canine kidney cell line (P-gp practically absent)	Dog kidney	Irvine, et al. ¹² Braun, et al. ¹⁰
(Madin-Darby canine kidney)		
MDCK-MDR1: Obtained from the parental cell line transfected with human MDR1 cDNA	Dog kidney	Soldner, et al. ¹⁴
MDCK-28: Human MRP2-transfected MDCK cells	Dog kidney	
Calu-3 cells: Human submucosal serous cell line	Human	Cowley, et al. ⁷
LS180: Cell line derived from a primary human colon carcinoma	Human	Dudzisz Sled, et al. ²
LS180-AD50: A Doxorubicin-selected LS180 subline expressing moderate levels of P-gp	Human	Bhat, et al. ⁴

Limitações x Melhorias em cultura celulares

Ausência de muco → Células produtoras

↓ Enzimas CYP 3A4 → Vitamina D3/ transfeção de gene

Diferentes porções do intestino → Câmaras com diferentes pHs

Junção inadequada /Heterogeneidade da fase aquosa e variabilidade na expressão dos transportadores → Agitação do sistema

Desafios e perspectivas para culturas celulares

- **PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA CULTURA CELULAR**
- **FORNECIMENTO/AQUISIÇÃO DAS CÉLULAS**
- **SISTEMAS VALIDÁVEIS E INTEGRÁVEIS PARA ESTUDOS DE CORRELAÇÃO IVIV**
- **ASPECTOS REGULATÓRIOS**

Desafios e perspectivas para métodos *in vitro*

Área acadêmica e industrial:

- desenvolvimento de modelos *in vitro* adequados, de elevado poder preditivo e custo-efetivos para a avaliação das características de permeabilidade e de absorção de fármacos

Área regulatória:

- adotar modelos correlacionáveis com os resultados de estudos de BD, de modo a isentar medicamentos de estudos *in vivo* nas etapas de registro ou pós-registro

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

PER ARTURSSON et al. - Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv. Drug Del. Ver.*, v. 46, p. 27-43, 2001.

SOUZA, J.; BENET, L.Z.; HUANG, Y.; STORPIRTIS, S. Comparison of Bidirectional Lamivudine and Zidovudine Transport Using MDCK, MDCK-MDR1, and Caco-2 Monolayers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 98, p. 4413-4419, 2.009.

SOUZA, J.; FREITAS, Z.M.F.; STORPIRTIS, S. - Modelos *in vitro* para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v. 43, n. 4, p. 515-527, 2.007.

BALIMANE P.V.; CHONG S. Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. *Drug Discovery Today*, v.10, n.5, p. 335-343, 2.005.

BENET, L. Z.; CUMMINS, C.L.; WU, C. U. Unmasking the dynamic interplay between efflux transporters and metabolic enzymes. *Int. J. Pharm.*, v.277, p.3-9, 2.004.

ENGMAN, H. Intestinal barriers to oral drug absorption - cytochrome P450 3A ABC-transport proteins. *Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations From the Faculty of Pharmacy*, v. 296, 2.003.

GINSKI, J.M.; TANEJA, R.; POLLI, J.E. Prediction of dissolution-absorption relationships from a continuous dissolution/Caco-2 system. *AAPS Pharm. Sci.*, v.1, n. 3, p. 1-12, 1.999.

TSUJI, A.; TAMAI, I. Carrier - mediated intestinal transport of drugs. *Pharm. Res.*, v.13, p. 963-977, 1.996.