

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**



**Estudo da Correlação *in vivo/in vitro* empregando comprimidos de glibenclamida não bioequivalentes**

***Edilene Bolutari Baptista***

**Dissertação apresentada para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Nadia Maria Volpato**

**Rio de Janeiro 2005**

Ao meu querido pai, João Baptista,  
exemplo de honestidade e  
dedicação à família.  
Sempre presente.

À minha querida mãe, Edite Bolutari,  
pela confiança, carinho e  
ajuda em todos os momentos da minha vida.

À minha irmã, Edmara Bolutari,  
minha grande amiga,  
por toda a ajuda e incentivo.

Ao meu sobrinho, Matheus,  
por seus gestos de carinho.

Ao Fred,  
pela compreensão, amor e  
companheirismo em todas as horas.

## AGRADECIMENTOS

À professora Nadia Maria Volpato, por acreditar no meu trabalho, na minha vontade de aprender e pela paciência e ajuda nos momentos de dificuldades. Um exemplo de profissionalismo.

Aos professores Sheila Garcia, Valéria e Luís Maurício, por transmitirem suas experiências e ensinamentos.

As amigas Eliane, Vívian e Laís, por mostrarem-se sempre disponíveis a me ajudar e por todas os momentos de alegria.

Aos companheiros de mestrado pela troca de conhecimentos e incentivo nas horas difíceis.

A todos os amigos que sempre me incentivaram e me apoiaram.

Às estagiárias e alunos do LabCQ pelas ajudas prestadas.

A indústria farmacêutica Abbott do Brasil e sua ex-funcionária Alessandra, por nos fornecer os medicamentos e relatório de biodisponibilidade do medicamento teste.

Ao professor François Noël e seu aluno Fábio pelo auxílio prestado com o *software WinNonLin*.

À todos os professores e funcionários do programa de pós-graduação, pelos ensinamentos e prestatividade, em especial as professoras Carla Holandino e Gisela Dellamora, da comissão de acompanhamento.

À Deus, pela vida maravilhosa que Ele me deu.

## RESUMO

Com os métodos e as especificações para as análises dos medicamentos, objetiva-se controlar a qualidade de produção desses na rotina de uma indústria. Entretanto, como a bioequivalência das formulações só pode ser comprovada *in vivo* e diante da impossibilidade de realização rotineira de ensaios de biodisponibilidade, esforços têm sido feitos para que testes *in vitro* mimetizem o comportamento das formulações quando administradas ao paciente.

O teste de dissolução é um ensaio relativamente simples que pode ser realizado na rotina de um laboratório e, quando são empregadas as condições adequadas à formulação, pode prever a performance dessa *in vivo*.

O objetivo do presente trabalho foi testar diferentes condições para a dissolução de comprimidos de glibenclamida (GLB), que ainda não possui método de análise oficializado, utilizando duas formulações não bioequivalentes (referência e teste), cujos dados de biodisponibilidade foram cedidos ao estudo pela empresa responsável pelo desenvolvimento da formulação candidata a genérico. De posse dos dados *in vivo* e dos percentuais dissolvidos *in vitro*, procurou-se selecionar as condições que melhor correlacionam os dados.

Para os testes de dissolução foram selecionados os meios: suco entérico simulado (SES) pH 6,8 sem tensoativo e adicionado de polissorbatato 80 (Poli 80) e Laurilsulfato de sódio (LSS) nas concentrações de 0,1% e 1%, tampão acetato pH 5,5 adicionado dos mesmos tensoativos nas mesmas concentrações e tampão acetato pH 4,5 com Poli 80 1%. Foram empregados 900 mL de meio e aparato pá com velocidade de 75 rpm. A análise das alíquotas retiradas do meio de dissolução, assim como a caracterização da matéria-prima e dos comprimidos foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência com condições desenvolvidas e validadas para o estudo.

Os resultados encontrados para os perfis de dissolução foram condizentes com o teste de solubilidade, realizado previamente, demonstrando maiores percentuais dissolvidos nos meios de maior concentração de saturação da GLB. Verificou-se que o pH do meio exerce uma grande influência sobre a solubilidade da GLB, e quanto mais elevado, maior a capacidade de dissolução do fármaco na formulação, ainda que nesse caso a presença de surfactante tenha tido menor impacto na solubilização do ativo.

Em todos os meios os perfis de dissolução entre os medicamentos referência e teste foram distintos, assim como observado *in vivo*.

A correlação *in vivo/in vitro* foi realizada empregando-se nível C múltiplo. Para isso, dos dados *in vivo*, foi calculado o parâmetro farmacocinético área sob a curva (ASC) parcial. A análise do coeficiente de determinação e inclinação das correlações obtidas, apontaram o meio SES adicionado de Poli 80 1% como a condição mais promissora para a dissolução dos comprimidos de glibenclamida.

## ABSTRACT

Methods and specifications for analysis of drugs products have the purpose of controlling the quality of the production these in the routine of the pharmaceutical industries. Since the bioequivalence of formulations can be only proven in vivo and the accomplishment of this test routinely is impossible, efforts have been made in order to provide in vitro tests that reproduce the behavior of formulations when administered to the patients.

The dissolution test is a relatively simple method that can be carried out in the routine of a laboratory and, when adequate conditions to the formulations are used, the test can predict the performance of the dosage form in vivo.

The aim of the present work was to study different conditions for dissolution of glibenclamide (GLB) tablets, using two non bioequivalent formulations (reference and test), whose bioavailability data had been furnished by the company responsible for the development of the generic candidate formulation. From the in vivo data and the in vitro dissolved amounts, the conditions that better correlated the data among themselves were looked for.

For the dissolution tests the selected media employed were: simulated intestinal fluid (SIF) pH 6.8 without surfactant and added of polysorbatum 80 (Poly 80) and sodium lauryl sulfate (SLS), buffer pH 4.5 added of only Poly 80 1% and buffer pH 5.5 added of Poly 80 and SLS, both 0.1% and 1% (w/v) concentration. USP apparatus 2 (paddle) at 75 rpm was used and the volume of the different dissolution media was 900 mL. GLB analysis in the aliquots of dissolution medium, as well as the drug assay in the tablets, was carried out by HPLC with conditions developed and validated for the study.

The dissolution profiles results were roughly in accordance with previously determined solubility data, as larger dissolved drug amounts were obtained in the media where  $C_s$  of GLB was higher. It was verified that the pH has a great influence on the GLB dissolution enhancing the capacity of drug dissolution form formulations. In this case, the presence of surfactant had a minor impact in the GLB solubilization.

In all the medias the dissolution profiles between reference product and test had been distinct to a higher or lesser degree.

In vivo/in vitro correlation was developed applying level C approach with multiple points. Therefore from in vivo data, the partial areas under concentration-

time curve (AUC) were calculated for both products. Analysis of the determination coefficients and slopes of the obtained correlations, pointed out the SIF medium with Poly 80 1% as the promising condition for monitoring dissolution of GLB tablets.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ASC – área sob a curva  
BD – Biodisponibilidade  
BP – Farmacopéia Britânica  
BE – Bioequivalência  
CIVIV – correlação *in vivo/in vitro*  
CLAE – Cromatografia Líquida de alta eficiência  
 $C_s$  – Concentração de saturação  
 $C_{max}$  – concentração máxima alcançada  
CMC – concentração micelar crítica  
dp – desvio padrão  
DPR – desvio padrão relativo  
EP – erro padrão  
 $F_a$  – fração absorvida relativa  
FM – fase móvel  
GLB – glibenclamida  
IV – infravermelho  
 $K_e$  – constante de eliminação  
LSS – laurilsulfato de sódio  
Poli 80 – polissorbato 80  
R – medicamento referência  
SCB – Sistema de Classificação Biofarmacêutico  
SE – solução estoque  
SES – suco entérico simulado  
T – medicamento teste  
 $T_{1/2}$  – meia-vida de eliminação  
TGI – trato gastrointestinal  
 $T_{max}$  – tempo para o alcançar  $C_{max}$   
USP – Farmacopéia Americana  
UV – ultravioleta

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – Processos que ocorrem após a administração de formas farmacêuticas sólidas (ABDOU, 1995).	23
Figura 2 – Modelo de difusão em camada.	24
Figura 3 – Estrutura química da glibenclamida.	42
Figura 4 – Esquema de diluição da SE de GLB para curva-padrão empregada nos estudos de perfil de dissolução.	79
Figura 5 – Curva média da concentração plasmática de GLB <i>versus</i> tempo nos voluntários; administração de dose única dos medicamentos referência e teste, comprimidos de 5 mg.	81
Figura 6 – Concentração de saturação da GLB em diferentes meios.	86
Figura 7 – Cromatograma tridimensional da GLB demonstrativo do comprimento de onda escolhido, 227 nm.	89
Figura 8 – Cromatogramas representativos: (a) amostra de meio tampão pH 5,5 com Poli 80 0,1% (b) amostra de meio SES com Poli 80 1%.	90
Figura 9 – Cromatogramas representativos a) alíquota do meio de dissolução SES com Poli 80 0,1% (medicamento teste), (b) alíquota do meio de dissolução tampão pH 5,5 com LSS 0,1% (medicamento referência) (c) alíquota do meio de dissolução tampão pH 4,5 com Poli 80 1% (medicamento teste), (d) alíquota do meio de dissolução SES com LSS 1% (medicamento teste), (e) curva padrão de GLB na concentração de 8 µg/mL em SES sem tensoativo.	91
Figura 10 – Curva padrão média do 1º e 2º dia de testes.	93

- Figura 11 – Ilustração da curva padrão de GLB em meio de dissolução SES + LSS 1% (p/V). 96
- Figura 12 – Perfis de dissolução da GLB dos comprimidos referência (R) e teste (T) em meio tampão acetato pH 5,5 adicionado de Poli 80 0,1% e 1% (p/V). (valores médios  $\pm$  dp; n = 6). 100
- Figura 13 – Perfis de dissolução da GLB dos comprimidos referência (R) e teste (T) em meio tampão acetato pH 5,5 adicionado de LSS 0,1% e 1% (p/V) (valores médios  $\pm$  dp; n = 6). 101
- Figura 14 – Perfis de dissolução da GLB dos comprimidos referência (R) e teste (T) em meio SES adicionado de Poli 80 0,1% e 1% (p/V) (valores médios  $\pm$  dp; n = 6). 102
- Figura 15 – Perfis de dissolução da GLB dos comprimidos referência (R) e teste (T) em meio SES adicionado de LSS 0,1% e 1% (p/V) (valores médios  $\pm$  dp; n = 6). 103
- Figura 16 – Perfis de dissolução da GLB dos comprimidos referência (R) e teste (T) em SES sem adição de tensoativo (valores médios  $\pm$  dp; n = 6). 104
- Figura 17 – Perfis de dissolução da GLB dos comprimidos referência (R) e teste (T) em tampão acetato pH 4,5 adicionado de Poli 80 1% (valores médios  $\pm$  dp; n = 6). 105
- Figura 18 – Perfil de dissolução de GLB dos comprimidos referência (R) e teste (T) em meio tampão borato pH 9,5 sem adição de tensoativo (valores médios  $\pm$  dp; n = 6). 108
- Figura 19 – Correlação da ASC conc. plasmática *versus* tempo e a % de dissolução de GLB obtida no meio SES + Poli 80 0,1% (p/V) (b = inclinação e 109

$r^2$  = coeficiente de determinação).

Figura 20 – Correlação da ASC conc. plasmática *versus* tempo e a % de dissolução de GLB obtida no meio SES + Poli 80 1% (p/V) (b = inclinação e  $r^2$  = coeficiente de determinação). 109

Figura 21 – Correlação da ASC conc. plasmática *versus* tempo e a % de dissolução de GLB obtida no meio SES + LSS 0,1% (p/V) (b = inclinação e  $r^2$  = coeficiente de determinação). 110

Figura 22 – Correlação da ASC conc. plasmática *versus* tempo e a % de dissolução de GLB obtida no meio SES + LSS 1% (p/V) (b = inclinação e  $r^2$  = coeficiente de determinação). 110

Figura 23 – Correlação da ASC conc. plasmática *versus* tempo e a % de dissolução de GLB obtida no meio SES sem adição de tensoativo (b = inclinação e  $r^2$  = coeficiente de determinação). 111

Figura 24 – Correlação da ASC conc. plasmática *versus* tempo e a % de dissolução de GLB obtida no meio tampão acetato pH 4,5 + Poli 80 1% (p/V) (b = inclinação e  $r^2$  = coeficiente de determinação). 111

Figura 25 – Correlação da ASC conc. plasmática *versus* tempo e a % de dissolução de GLB obtida no meio tampão acetato pH 5,5 + Poli 80 0,1% (p/V) (b = inclinação e  $r^2$  = coeficiente de determinação). 112

Figura 26 – Correlação da ASC conc. plasmática *versus* tempo e a % de dissolução de GLB obtida no meio tampão acetato pH 5,5 + Poli 80 1% (p/V) (b = inclinação e  $r^2$  = coeficiente de determinação). 112

Figura 27 – Correlação da ASC conc. plasmática *versus* tempo e a % de dissolução de GLB obtida no meio tampão acetato pH 5,5 + LSS 0,1% (p/V) (b = inclinação e  $r^2$  = coeficiente de determinação). 113

- Figura 28 – Correlação da ASC conc. plasmática *versus* tempo e a % de dissolução de GLB obtida no meio tampão acetato pH 5,5 + LSS 1% (p/V) (b = inclinação e  $r^2$  = coeficiente de determinação). 113
- Figura 29 – Promoção da solubilidade da GLB nos meios de dissolução contendo Poli 80 e LSS expressos como razão entre as concentrações de saturação do fármaco. 118
- Figura 30 – Perfis de dissolução da GLB do comprimido referência em meio SES na ausência de tensoativo e adicionado dos tensoativos Poli 80 e LSS nas concentrações de 0,1% e 1% (p/V) (valores médios  $\pm$  dp, n = 6). 119
- Figura 31 – Perfis de dissolução da GLB do comprimido referência em meio SES, tampão acetato pH 5,5 e tampão acetato pH 4,5 adicionados de Poli 80 na concentração de 1% (p/V) (valores médios  $\pm$  dp, n = 6). 120

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Delineamento <i>crossover</i> 2x2, medicamento referência (R) e teste (T).	50
Tabela 2 – Parâmetros farmacocinéticos obtidos a partir da curva média de concentração plasmática da GLB <i>versus</i> tempo.	81
Tabela 3 – Associação de tempos para correlação dos dados obtidos no estudo de BE com os percentuais de GLB dissolvidos.	82
Tabela 4 – Solubilidade da GLB nos meios avaliados, expressa como concentração de saturação (Cs) a 37 °C.	85
Tabela 5 – Promoção da solubilidade da GLB nos meios de dissolução contendo Poli 80 e LSS expressos como razão entre as concentrações de saturação do fármaco.	87
Tabela 6 – Resultados do teste de precisão intra e inter-dia.	92
Tabela 7 – Análise de Linearidade do método.	93
Tabela 8 – Resultados do teste de precisão de injeção.	94
Tabela 9 – Coeficiente angular e coeficiente de determinação das curvas padrão obtidas com os meios de dissolução.	96
Tabela 10 – Peso médio e valores mínimos e máximos encontrados nas amostras dos comprimidos.	97
Tabela 11 – Resultados obtidos com a uniformidade de dose por conteúdo.	98
Tabela 12 – Resultados obtidos com a dureza.	98

Tabela 13 – Resultados obtidos com a friabilidade.	99
Tabela 14 – Valores de $f_1$ e $f_2$ para os diferentes meios analisados.	107

## SUMÁRIO

### INTRODUÇÃO

<b>1 Dissolução ou liberação do fármaco de forma farmacêutica sólida</b>	<b>21</b>
1.1 Teoria da dissolução	23
1.2 Teste de dissolução	25
1.3 Fatores que influenciam a dissolução e absorção dos fármacos	28
1.3.1 Fatores ligados ao paciente	28
1.3.2 Tempo de esvaziamento gástrico	30
1.3.3 Motilidade do Trato gastrointestinal	31
1.4 Fatores ligados ao fármaco	31
1.4.1 Solubilidade	31
1.4.2 Polimorfismo e Amorfismo	32
1.4.3 Solvatos e Anidros	35
1.4.4 Tamanho de partículas	36
1.5 Fatores relacionados à formulação	37
1.5.1 Excipientes	37
1.5.2 Processos tecnológicos	39
1.6 Fatores relacionados ao sistema e ao meio de dissolução	39
1.6.1 Tensoativos	41
<b>2 Glibenclamida</b>	<b>42</b>
2.1 Propriedades físico-químicas	42
2.2 Propriedades farmacodinâmicas e mecanismo de ação	43
2.3 Propriedades farmacocinéticas	45
2.3.1 Absorção	45
2.3.2 Distribuição	46
2.3.3 Metabolismo e excreção	46
2.4 Formas farmacêuticas e de apresentação	46

<b>3 Estudos de Biodisponibilidade</b>	<b>47</b>
<b>4 Correlação in vivo/in vitro</b>	<b>51</b>
4.1 Classificação Biofarmacêutica	52
4.2 Níveis de correlação	54
4.2.1 Correlação nível A	54
4.2.2 Correlação nível B	55
4.2.1 Correlação nível C	55
4.2.1 Correlação nível C múltiplo	56
<b>5. Justificativa</b>	<b>56</b>
<b>OBJETIVOS</b>	
1 Objetivos gerais	58
2 Objetivos específicos	59
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	
<b>1 Materiais</b>	<b>61</b>
1.1 Equipamentos e acessórios	61
1.2 Reagentes	62
1.3 Produtos farmacêuticos e substância química de referência	63
<b>2. Métodos</b>	<b>64</b>
<b>2.1 Determinação da solubilidade da glibenclamida em diferentes meios</b>	<b>64</b>
2.1.1 Procedimento	64
2.1.2 Curva Padrão	65
2.1.3 Cálculo	65
2.2 Procedimento de preparo de meios	66

<b>2.3 Análise quantitativa da glibenclamida</b>	67
2.3.1 Estabelecimento das condições cromatográficas	68
2.3.1.1 Fase móvel	68
2.3.1.2 Fluxo	68
2.3.1.3 Volume de injeção	69
2.3.1.4 Comprimento de onda	69
2.3.2 Validação da metodologia	69
2.3.2.1 Especificidade frente a composição dos meios de dissolução	70
2.3.2.3 Linearidade de resposta e precisão intra e inter-dia	70
2.3.2.4 Precisão do volume de injeção	70
2.3.2.2 Limite de detecção e Limite de quantificação	71
<b>2.4 Caracterização da matéria-prima</b>	71
<b>2.5 Caracterização dos comprimidos de glibenclamida</b>	72
2.5.1 Peso médio e uniformidade de peso	72
2.5.2 Uniformidade de dose por conteúdo	72
2.5.2.1 Procedimento	72
2.5.3 Dureza	73
2.5.4 Friabilidade	73
2.5.5 Desintegração	73
2.5.6 Doseamento	73
2.5.6.1 Procedimento	74
<b>2.6 Determinação do perfil de dissolução dos comprimidos de glibenclamida</b>	75
2.6.1 Meio de dissolução	75
2.6.2 Tipo de agitador e velocidade de agitação	76
2.6.3 Tempo de ensaio e coleta das amostras	76
2.6.3.1 Calibração do volume	77
2.6.4 Procedimento de ensaio de dissolução e quantificação da glibenclamida dissolvida	77
2.6.4.1 Curvas Padrão	78

2.6.5 Cálculo	79
<b>2.7 Tratamento dos dados in vivo e estabelecimento da correlação in vivo/in vitro</b>	<b>80</b>

## **RESULTADOS**

<b>1 Determinação da solubilidade da glibenclamida em diferentes meios</b>	<b>85</b>
<b>2. Análise Quantitativa da glibenclamida</b>	<b>87</b>
2.1 Estabelecimento das condições cromatográficas	87
2.1.1 Fase móvel	87
2.1.2 Fluxo	88
2.1.3 Volume de injeção	88
2.1.4 Comprimento de onda	89
2.1.6 Validação da metodologia	90
2.1.6.1 Especificidade frente a composição dos meios de dissolução	90
2.1.6.2 Precisão e Linearidade de resposta	92
2.1.6.3 Limite de detecção e Limite de quantificação	95
2.1.6.4 Curvas Padrão	96
<b>3 Caracterização da matéria-prima</b>	<b>97</b>
<b>4 Caracterização dos comprimidos de glibenclamida</b>	<b>97</b>
4.1 Peso médio e uniformidade de peso	97
4.2 Uniformidade de dose por conteúdo	98
4.3 Dureza	98
4.4 Friabilidade	99
4.5 Desintegração	99
4.6 Doseamento	99
<b>5 Determinação do perfil de dissolução dos comprimidos de glibenclamida</b>	<b>100</b>
5.1 Comparação entre os perfis de dissolução	107
<b>6 Estabelecimento da correlação entre os dados in vivo/in vitro</b>	<b>108</b>

<b>DISCUSSÃO DOS RESULTADOS</b>	115
<b>CONCLUSÃO</b>	127
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	129
<b>ANEXOS</b>	137
ANEXO 1	138
ANEXO 2	139
ANEXO 3	140

# INTRODUÇÃO

## INTRODUÇÃO

### 1 Dissolução ou liberação do fármaco de forma farmacêutica sólida

Até alguns anos atrás, a preocupação do Controle de Qualidade restringia-se às análises físico-químicas a fim de atestar o teor da substância ativa e sua uniformidade na formulação, não se questionando a capacidade dessa em liberar o fármaco para que fosse absorvido em quantidade e velocidade adequadas para o alcance do efeito terapêutico desejado. Mesmo fornecendo valiosas informações sobre a disponibilidade biológica do fármaco, a dissolução não comprova sua eficiência terapêutica (ABDOU, 1995; STORPIRTIS & CONSIGLIERI, 1995).

Hoje, compreende-se muito mais a importância do teste de dissolução, pois um comprimido tecnicamente perfeito não garante sua eficácia, pois antes das fases farmacocinéticas (absorção, distribuição, biotransformação e excreção) e farmacodinâmica (interação fármaco-receptor), existe a fase biofarmacotécnica cujo objetivo é a liberação do fármaco a partir do medicamento, tornando-o disponível para ser absorvido (STORPIRTIS & CONSIGLIERI, 1995). Assim, em 1970 a Farmacopéia dos Estados Unidos (USP) XVIII oficializou o primeiro teste de dissolução. No Brasil, a oficialização deu-se somente em 1988 pela Farmacopéia Brasileira 4ª edição.

De uma maneira simples, dissolução pode ser definida como o processo pelo qual as partículas de um fármaco dissolvem-se, e esse que antes encontrava-se no estado sólido, libera-se de sua forma farmacêutica de administração, sendo as moléculas da superfície as primeiras a entrarem em solução. Na interface fármaco - solução, forma-se uma camada dita estagnante a partir da qual as moléculas do

fármaco difundem através do líquido solvente e entram em contato com as membranas biológicas, ocorrendo a absorção (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000).

Determinando a velocidade de liberação do fármaco e, conseqüentemente, sua velocidade de absorção, existem, principalmente, dois fatores: a solubilidade do fármaco e as características físico-químicas da forma farmacêutica. No caso dos fármacos de baixa solubilidade, como a glibenclamida (GLB), não só a velocidade de absorção pode ser lenta como a absorção pode ser incompleta. Porém, se a combinação desses dois fatores leva a uma dissolução rápida do medicamento, a velocidade de absorção dependerá somente da permeabilidade desse às barreiras da membrana; já para um processo de dissolução lento, esse torna-se a etapa limitante da absorção.

Para sólidos orais, medicamentos de liberação imediata, o processo de absorção inclui: desintegração do medicamento com liberação do fármaco, dissolução do fármaco e finalmente, a absorção através da membrana celular (SHARGEL & YU, 1999a).

Os processos mencionados anteriormente, relacionados à liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica, estão representados de forma esquemática na Figura 1.

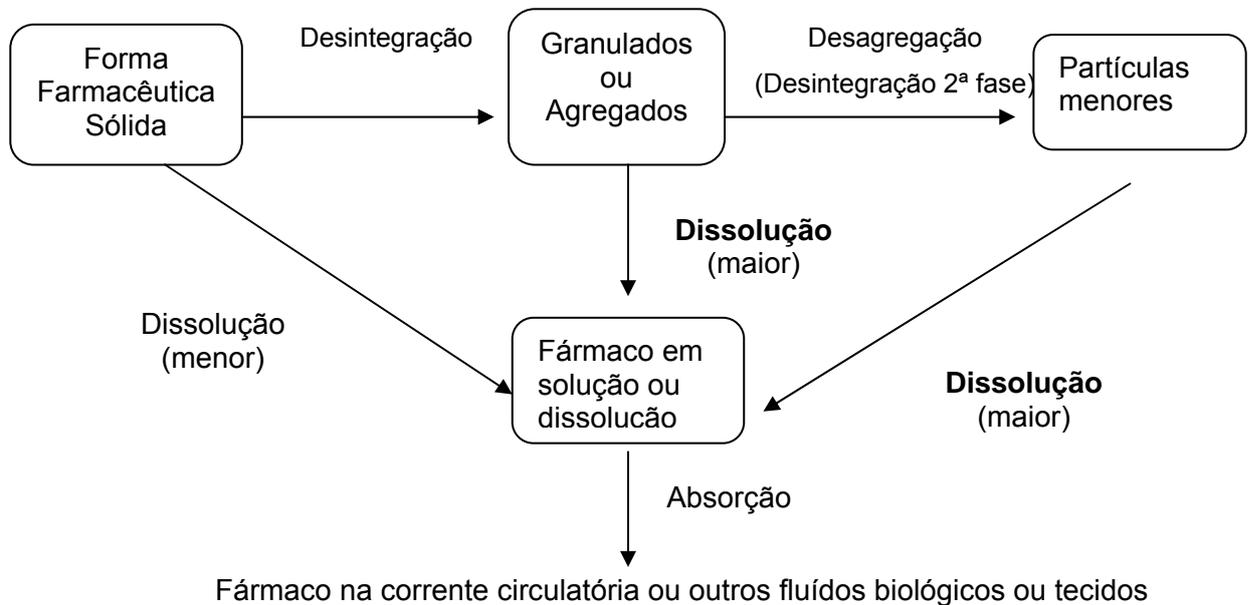


Figura 1 – Processos que ocorrem após a administração de formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata (ABDOU, 1995)

### 1.1 Teoria da dissolução

Há vários anos, pesquisadores buscam, por meio de modelos e equações matemáticas, explicar o fenômeno da dissolução. Em 1897, Noyes e Whitney, já questionavam o assunto e desenvolveram uma equação, baseando-se na segunda lei de Fick (equação 1) (ABDOU, 1995; AULTON, 2005; SHARGEL & YU, 1999b):

$$\frac{dC}{dt} = K(C_s - C_t) \quad (\text{equação 1})$$

Em que,

$dC/dt$  = razão de dissolução do fármaco;

$K$  = constante de proporcionalidade;

$C_s$  = concentração de saturação (solubilidade máxima);

$C_t$  = concentração no tempo  $t$ ;

$C_s - C_t$  = gradiente de concentração.

Nesta equação, a área superficial foi considerada constante, como nem sempre tal condição é aplicável, Brunner e Tolloczko modificaram a equação incorporando a área superficial como uma variável (ABDOU, 1995; SHARGEL & YU, 1999b).

Para explicar o mecanismo de dissolução, Nernst propôs, em 1904, a teoria do filme – modelo da difusão em camada, demonstrado na Figura 2, partindo-se do princípio de que havendo uma partícula sólida imersa num líquido, deve-se considerar: a solubilização do sólido, em nível de interface ( $C_s$ ), formando uma fina camada estagnante ou filme ( $h$ ), ao redor da partícula, e a difusão da camada para o seio do líquido ( $C_t$ ) (ABDOU, 1995; SHARGEL & YU, 1999b).

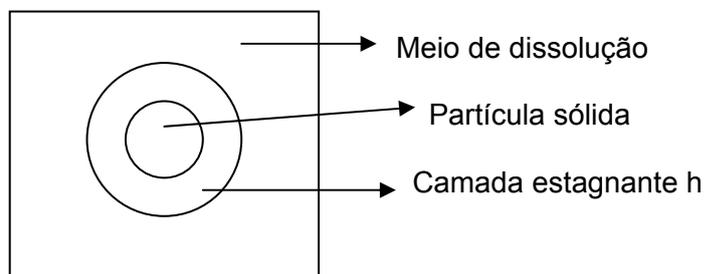


Figura 2 – Modelo de difusão em camada

Ainda em 1904, Brunner, baseando-se no modelo de difusão em camada de Nernst e na 1ª Lei de Fick, que descreve o processo de difusão passiva, incluiu na equação acrescentada da área superficial (S) a constante D (coeficiente de difusão), a espessura da camada estagnante (h), e o volume do meio de dissolução (V), como apresentado na equação 2 (ABDOU, 1995; SHARGEL & YU, 1999b).

$$\frac{dC}{dt} = K \frac{DS}{Vh} (C_s - C_t) \quad (\text{equação 2})$$

A constante de proporcionalidade  $K$ , descrita na equação 2, é conhecida como a velocidade de dissolução intrínseca e é uma característica de cada composto químico (ABDOU, 1995).

## 1.2 Teste de dissolução

O teste de dissolução de medicamentos tem sido empregado como uma excelente ferramenta na detecção de problemas na formulação que poderiam alterar a liberação do fármaco no organismo, dessa forma garantindo qualidade lote a lote, orientando o desenvolvimento de novas formulações e assegurando a uniformidade da qualidade e do desempenho do medicamento depois de determinadas alterações (Brasil. Resolução nº 901, 2003).

Assim, as especificações para dissolução *in vitro* são estabelecidas com intuito de indicar problemas potenciais de biodisponibilidade (BD). (Brasil. Resolução nº 901, 2003)

No caso de medicamentos novos, as especificações para a dissolução devem ser baseadas em dados obtidos de acordo com o estudo de BD. Para os

medicamentos genéricos, seguem as recomendações do medicamento referência (Brasil. Resolução nº 901, 2003).

As metodologias trazem especificações de um único ponto, para testes de controle de qualidade de rotina, ou de dois pontos, para caracterizar a qualidade do medicamento ou controle de qualidade de rotina de fármacos pouco solúveis (Brasil. Resolução nº 901, 2003; THE UNITED, 2004a).

Para realizar um perfil de dissolução, deve-se amostrar, no mínimo em cinco pontos, desses no mínimo três devem corresponder a valores de percentual de fármaco dissolvido menor que 65% (se possível) e o último ponto deverá corresponder a um tempo de coleta igual a, pelo menos, o dobro do tempo anterior (Brasil. Resolução nº 901, 2003; CDER/FDA, 1997).

As especificações para medicamentos genéricos e similares são determinadas com base na disponibilidade da metodologia em farmacopéias. A primeira opção é o teste descrito na Farmacopéia Brasileira, na ausência deste, outros códigos autorizados pela legislação vigente podem ser utilizados. Para o perfil, o intervalo recomendado para coleta é de quinze minutos ou menos utilizando 12 unidades de cada medicamento (teste e referência) (Brasil. Resolução nº 901, 2003).

Os ensaios de dissolução também podem ser empregados para evitar a exigência da realização de estudos de bioequivalência (BE) para dosagens menores de um certo medicamento (Brasil. Resolução nº 901, 2003).

Para a realização do ensaio de dissolução para formas sólidas, os equipamentos oficializados pelas principais farmacopéias são descritos brevemente a seguir. (BRITISH, 2004; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988a; THE UNITED, 2004a):

*Método 1* - Cuba de precipitação e cesta rotatória: geralmente empregado para formas sólidas (cápsulas), formas de baixa densidade ou que desintegram lentamente, grânulos ou formas de liberação imediata (anexo 1).

*Método 2* – Cuba de precipitação e pá rotatória: recomendado às formas sólidas (comprimidos) e formas de liberação imediata; pode-se empregar “sinters” que é um tipo de acessório desenvolvido para fixar formas de baixa densidade, como cápsulas (anexo 2).

*Método 3* – cilindros alternantes: derivado do clássico aparelho de desintegração, constitui numa série de frascos de fundo redondo e tubos cilíndricos com tela de polipropileno na face superior e inferior apresentando movimento oscilatório vertical e deslocamento horizontal dos cilindros entre os frascos, geralmente empregado para perfil de liberação/dissolução com alteração de pH e para grânulos de liberação modificada.

*Método 4* – Célula de fluxo: destinado a fármacos de baixa solubilidade apresentando melhor mimetização da condição *sink*, cuja definição segue adiante.

Alguns fatores podem influenciar o ensaio de dissolução como: empenamento das hastes, nivelamento do aparelho, vibração da bancada e agitação, que para a cesta recomenda-se 75 ou 100 rpm e para a pá 50 ou 75 rpm; temperatura ( $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), composição do meio e calibração do equipamento, realizada através de comprimidos calibradores.

O volume de meio empregado no ensaio de dissolução é muito importante. Usualmente esse volume está compreendido entre 500 e 1000 mL. Para fármacos pouco solúveis esse valor pode ser superior, de modo a atender a condição *sink*, a qual se refere a um excesso de volume de meio que irá permitir que o ativo dissolva-se continuamente. Isso porque, *in vivo*, a maioria dos fármacos é absorvida, em nível

de membrana epitelial intestinal, tão logo se dissolve, isto é, estabelece-se um equilíbrio em pouco tempo, sem efeitos da diminuição do gradiente de concentração na cinética de dissolução. Para obter tal condição *in vitro*, além do uso de um grande recipiente, empregando-se consideráveis quantidades de meio, uma reposição constante do mesmo, de modo que a concentração de soluto não atinja mais do que 20 a 30% de sua solubilidade máxima, também pode ser utilizada (ABDOU, 1995; AULTON, 2005; SHARGEL & YU, 1999b).

Todos esses fatores devem estar descritos na metodologia de dissolução do medicamento e ser devidamente seguidos.

### **1.3 Fatores que influenciam a dissolução e absorção dos fármacos**

Neste tópico, serão relatados os fatores conhecidos que podem influenciar a BD do medicamento, podendo ser divididos em fatores ligados ao paciente, fatores ligados ao fármaco, fatores relacionados à formulação e fatores relacionados ao sistema e ao meio de dissolução.

#### **1.3.1 Fatores ligados ao paciente**

Para que o fármaco tenha acesso à circulação geral, é preciso que, no sítio de absorção, atravesse uma ou mais camadas celulares, sendo que, a permeabilidade do fármaco, está vinculada à sua estrutura molecular e as propriedades físicas e biológicas da membrana. (SHARGEL & YU, 1999b).

As membranas do organismo funcionam como barreiras, pelas quais o fármaco passa através de dois mecanismos: transporte ativo ou passivo. E devido a sua composição ou natureza lipoproteica, determinados fármacos podem ter maior ou menor facilidade nesse transporte. Além da fisiologia da membrana, a fisiologia do trato gastrointestinal (TGI), exerce papel fundamental na absorção de moléculas (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000).

É necessário ressaltar que, antes da fase de absorção, é preciso que ocorra a solubilização da substância. A razão dose/solubilidade pode ser definida como o volume de fluido gastrointestinal (GI) necessário para que a dose administrada se dissolva. Nos casos em que o fármaco é pouco solúvel e sua forma farmacêutica apresenta maior dosagem, o volume de fluido GI disponível pode ser insuficiente para a sua completa solubilização, acarretando uma BD incompleta (HÖRTER & DRESSMAN, 2001).

Para compreender o processo de absorção dos medicamentos de uso oral, deve-se conhecer a fisiologia do TGI. Os principais componentes do TGI são: estômago, intestino delgado (ID), intestino grosso (IG) e cólon.

O sistema digestivo é responsável pelos processos de secreção, digestão e absorção. Estes processos, podem ser afetados de acordo com a dieta, conteúdo do TGI, hormônios, sistema nervoso, doença e pelos fármacos. Dessa forma, os fármacos administrados pela via enteral estão sujeitos a sofrer influência no processo de absorção pelos mesmos fatores que afetam as funções do aparelho digestivo. (SHARGEL & YU, 1999b).

Como uma máquina, cada parte do sistema digestivo tem sua contribuição para o processo de absorção dos fármacos. O fluxo sanguíneo do TGI, por exemplo, facilita a absorção de moléculas lipossolúveis por ser o responsável pela

manutenção do gradiente de concentração em torno da membrana epitelial (STORPIRTIS *et al.*, 1999).

Como dito anteriormente, a solubilização do fármaco é um dos primeiros passos para que ocorra a absorção. A solubilidade de ácidos e bases fracas, dependerá do pH do meio de dissolução. No TGI, o pH dos fluidos é uma das influências mais importantes para os fármacos ionizáveis, os valores de pH chegam a variar de 1 a 8, dependendo do compartimento e do estado em que se encontra o indivíduo, em jejum ou alimentado. Outros fatores também influenciam o pH dos fluidos: idade, condições patofisiológicas e interações medicamentosas (HÖRTER & DRESSMAN, 2001).

### **1.3.2 Tempo de esvaziamento gástrico**

As influências no tempo de esvaziamento gástrico, podem acarretar em mudanças no tempo de trânsito, alterando o processo de dissolução da forma farmacêutica (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000).

Tais alterações, podem trazer benefícios ao paciente, ou não, dependendo das características físico-químicas do fármaco. As penicilinas, por exemplo, por apresentarem instabilidade em solução, podem sofrer decomposição caso permaneçam mais tempo no estômago; alguns antiinflamatórios podem causar irritação na mucosa gástrica, quando em contato prolongado (SHARGEL & YU, 1999b).

O processo de envelhecimento faz com que o tempo de esvaziamento gástrico diminua, assim como, o uso de medicamentos anticolinérgicos, bebida

gelada, atividade física vigorosa e a condição diabética (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000; SHARGEL & YU, 1999b).

### **1.3.3 Motilidade do TGI**

Os movimentos fisiológicos do TGI dependem do estado alimentado ou em jejum em que se encontra o indivíduo. A velocidade e extensão da absorção de fármacos é dependente do tempo de esvaziamento gástrico. Se, por exemplo, ocorre um atraso no esvaziamento gástrico, isso pode retardar a velocidade e, possivelmente a extensão da absorção do fármaco (SHARGEL & YU, 1999b).

## **1.4 Fatores ligados ao fármaco**

### **1.4.1 Solubilidade**

A solubilidade de um fármaco, parâmetro que representa a concentração de uma substância dissolvida em equilíbrio com o soluto, pode ser influenciada pelos valores fisiológicos de pH, por exemplo, um fármaco ácido será mais solúvel no intestino, onde o pH é mais elevado (SHARGEL & YU, 1999a).

Esta relação, solubilidade-pH, pode ser explicada pelo grau de ionização da molécula, que é dependente do pH da solução. Sendo as membranas celulares de característica lipídica, essas serão mais permeáveis àquelas substâncias com características lipossolúveis, que nesse caso, são as formas não-ionizadas, além

disso, a natureza carregada da membrana celular, pode resultar na repulsão ou atração do fármaco ionizado (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000).

Baseando-se na solubilidade e pKa de um fármaco, é possível estimar sua dissolução no TGI e futuros problemas com a BD (ABDOU, 1995; SHARGEL & YU, 1999a).

A equação modificada de Noyes e Whitney (equação 2), mostra que a solubilidade aquosa de um fármaco é o fator determinante para a taxa de dissolução (ABDOU, 1995).

A solubilidade pode ser melhorada com o auxílio da farmacotécnica através da adição de excipientes ácidos ou básicos, como no caso da aspirina efervescente, cuja formulação contém bicarbonato de sódio, que faz com que o meio de dissolução se torne mais alcalino, propiciando uma dissolução mais acelerada de ácidos fracos, o que resulta num efeito analgésico mais rápido do que as formas convencionais (SHARGEL & YU, 1999a).

Uma outra maneira de se aumentar a solubilidade dos fármacos pouco solúveis é através da sua complexação com ciclodextrinas ou polímeros (STORPIRTIS *et al.*, 1999).

#### **1.4.2 Polimorfismo e Amorfismo**

Polimorfismo é a propriedade pela qual uma única substância química pode existir em mais de uma forma cristalina, dependendo das condições (temperatura, solvente, tempo) sob as quais a cristalização é induzida (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000).

Embora a estrutura química seja a mesma, as substâncias polimórficas apresentam variações na densidade, solubilidade e características de compressão. Porém, tais diferenças são importantes para o sólido, pois quando em solução, as formas são indistinguíveis (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000; SHARGEL & YU, 1999b).

Os materiais farmacêuticos ocorrem não só na forma cristalina identificável, mas também como partículas amorfas sem estrutura definida, podendo influenciar na estabilidade química e na atividade biológica (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000).

Quando se comparam as formas cristalinas e amorfa, espera-se que a amorfa seja menos estável quimicamente e mais solúvel que a cristalina, podendo ocorrer diferentes extensões de absorção, implicando nas diferenças de atividade farmacológica de cada uma (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000; SHARGEL & YU, 1999a; SINGHAL & CURATOLO, 2004).

A explicação para as diferenças de estabilidade e solubilidade, citada acima, é que os cristais apresentam menor energia livre, já na forma amorfa, pela ausência de uma rede cristalina tridimensional, a mobilidade molecular é maior (SHARGEL & YU, 1999a; SINGHAL & CURATOLO, 2004).

Alguns polimorfos, apresentam-se na forma metaestável, que é uma forma menos estável. Seu uso na produção de um medicamento poderia resultar numa velocidade de dissolução maior do que a da forma cristalina. Outros problemas na formulação poderiam surgir, pois a forma metaestável pode ser convertida na mais estável. Caso a alteração ocorra antes de expirar o prazo de validade, isso poderia resultar em diferenças na BD do fármaco (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000; SINGHAL & CURATOLO, 2004).

O polimorfismo pode afetar as propriedades mecânicas das partículas do fármaco. Um efeito comum é a alteração do fluxo do pó devido às diferenças na morfologia das partículas. O formato de agulha ou haste, faz com que a partícula apresente um fluxo menor quando comparado com os polimorfos de pequeno raio. Uma característica do material amorfo, é que quando compactado, possui alta fragilidade e elasticidade (SINGHAL & CURATOLO, 2004).

Todas essas diferenças mecânicas podem ou não afetar a produção de um medicamento. Se o efeito não for desejável, pode-se utilizar excipientes para minimizar a instabilidade química, aumentar a solubilidade do fármaco e melhorar qualquer propriedade mecânica que seja afetada com o uso da forma polimórfica (SINGHAL & CURATOLO, 2004; SNIDER, ADDICKS, OWENS, 2004).

Embora a instabilidade química possa ser corrigida, é melhor usar um polimorfo estável com problemas mecânicos, corrigindo esses com o uso de excipientes e técnicas de produção, do que optar pelo uso de uma forma instável só por ter melhores propriedades mecânicas. Em alguns casos, as propriedades mecânicas alteradas são usadas a favor da indústria, agilizando o processo de produção ou tornando-o de menor custo. Um exemplo, é a compressão direta do paracetamol na forma II, ortorombica, substituindo o processo de granulação necessário com o uso da forma I, monoclinica (SINGHAL & CURATOLO, 2004; SNIDER, ADDICKS, OWENS, 2004).

O impacto do polimorfismo na taxa de dissolução está principalmente ligado a solubilidade entre as formas. *In vivo*, isso pode resultar em taxas de absorção diferentes, refletindo em  $C_{máx}$  diferente. *In vitro*, as diferenças físico-químicas aparecem nos perfis de dissolução (SINGHAL & CURATOLO, 2004; SNIDER, ADDICKS, OWENS, 2004).

Para se caracterizar um polimorfo, as análises mais usuais são: ponto de fusão, solubilidade, técnicas de análise térmica (DSC), espectroscopia por IV, termomicroscopia e difração de raio-X (STORPIRTIS *et al.*, 1999; SULEIMAN & NAJIB, 1989).

### **1.4.3 Solvatos e Anidros**

A taxa de dissolução e a solubilidade do fármaco podem ter diferenças significativas para os diferentes solvatos. Essas substâncias de forma cristalina, também denominadas de pseudopolimorfos, apresentam a capacidade de se associarem a moléculas de solventes (solvatação). Se o solvente for a água, a substância recebe o nome de hidrato (SINGHAL & CURATOLO, 2004; STORPIRTIS *et al.*, 1999).

A estabilidade física das formas anidra e hidratada, pode depender da umidade relativa e/ou temperatura do ambiente. Transições entre as formas, podem ocorrer durante a dissolução da forma farmacêutica na interface fármaco/meio. Isso pode afetar a taxa de dissolução e refletir na sua BD (SINGHAL & CURATOLO, 2004).

Algumas formas polimórficas da GLB foram isoladas e caracterizadas físico-quimicamente, e no estudo de perfil de dissolução, as formas solvatadas exibiram um alto percentual dissolvido, diferentemente das formas não-solvatadas (SULEIMAN & NAJIB, 1989).

#### 1.4.4 Tamanho de partículas

Sabe-se que quando as partículas de um fármaco são reduzidas, a velocidade de dissolução acelera; a explicação está no aumento da área superficial em contato com o solvente. Através da equação de Noyes e Whitney (ver item 1.1), pode-se demonstrar a relação direta da área superficial com a taxa de dissolução (ABDOU, 1995; ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000; SHARGEL & YU, 1999a).

Uma das formas de se observar esse efeito, é através do processo de micronização. Para os fármacos pouco solúveis, essa técnica tem sido utilizada para obter uma BD desejada. (ABDOU, 1995; ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000)

No caso de fármacos altamente solúveis, o tamanho das partículas não se torna tão importante, diante da capacidade de solubilização desses. Outras vezes, a redução nesse tamanho pode gerar a potencialização dos efeitos, atingindo níveis tóxicos (STORPIRTIS *et al.*, 1999).

Diante da influência da granulometria no processo de dissolução dos fármacos, torna-se de grande importância a qualificação dos fornecedores da matéria-prima, uma vez que, existe uma variabilidade no tamanho das partículas dependendo do fabricante, fato que pode implicar em diferentes graus de resposta terapêutica num mesmo indivíduo (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000).

## 1.5 Fatores relacionados à formulação

A taxa de dissolução pode ser significativamente alterada quando o fármaco é misturado aos excipientes durante a produção, em alguns casos, isso pode levar a uma diminuição da BD e da resposta clínica (ABDOU, 1995).

### 1.5.1 Excipientes

O conceito de excipientes passou por uma evolução de um simples veículo quimicamente e farmacologicamente inerte para um adjuvante essencial, garantindo e otimizando a performance de um medicamento (PIFFERI, SANTORO & PEDRANI, 1999).

Fármacos que são física e/ou quimicamente instáveis podem requerer excipientes especiais, revestimento ou determinados processos tecnológicos para protegê-los da degradação (SHARGEL & YU, 1999b). Assim, o sucesso de um medicamento não depende somente das características do fármaco e do processo de produção, mas também da qualidade dos excipientes (PIFFERI, SANTORO & PEDRANI, 1999).

Os excipientes são adicionados às formulações devido às suas propriedades funcionais que podem melhorar a compressão do fármaco, diminuir a irritação gástrica, melhorar a conservação e etc., porém mesmo ditos inertes, eles também podem alterar as propriedades físico-químicas dos medicamentos; vários estudos foram realizados com o intuito de provar tais efeitos, entre eles a velocidade de dissolução (SHARGEL & YU, 1999b).

As reações dos excipientes com o ativo podem resultar tanto em uma forma mais solúvel quanto em uma menos solúvel. Para fármacos de baixa solubilidade, a adição de um desintegrante à formulação pode acelerar a desintegração da forma farmacêutica promovendo a liberação das partículas. No caso dos surfactantes, quando em baixa concentração, eles podem diminuir a tensão superficial e, conseqüentemente, aumentar a dissolução, porém em altas concentrações, eles podem interagir com o fármaco formando micelas, e grandes moléculas apresentam a área superficial diminuída, logo dissolvem menos (SHARGEL & YU, 1999b).

Dentro de uma mesma classe de excipientes podem surgir efeitos diferenciados dependendo das características físico-químicas da substância, por exemplo, estudos mostraram que o estearato de magnésio, lubrificante hidrofóbico, tende a retardar a taxa de dissolução dos comprimidos de ácido salicílico por diminuir a área interfacial fármaco-solvente através de mudanças nas características da superfície dos comprimidos resultando na diminuição da molhabilidade, logo prolongando o tempo de desintegração e diminuição da área da interface entre o ativo e o solvente. Outros lubrificantes como o laurilsulfato de sódio (LSS) podem aumentar a dissolução significativamente (ABDOU, 1995).

Algumas substâncias podem modificar o pH do meio onde o ativo será dissolvido resultando no aumento ou diminuição da solubilidade desse (SHARGEL & YU, 1999b).

Alguns excipientes podem prolongar o tempo de retenção de um fármaco no TGI e com isso elevar a quantidade total absorvida. Outros podem agir como carreadores através da parede intestinal. Assim, quando imprópriamente utilizados na formulação, eles podem afetar a taxa e extensão de absorção de um fármaco (SHARGEL & YU, 1999b).

### 1.5.2 Processos tecnológicos

Na produção do medicamento, deve-se considerar diversos fatores que podem resultar na modificação da BD, por isso o motivo de serem necessários novos testes quando se altera alguma etapa de produção desse.

Entre tais fatores estão os tipos de misturadores utilizados, em “V” ou “Turbula”, o tipo de via utilizada, úmida ou seca, temperatura de secagem e força de compressão (STORPIRTIS *et al.*, 1999). A alta compressibilidade sem o uso suficiente de desintegrante, pode dificultar a desintegração da forma farmacêutica (SHARGEL & YU, 1999b).

É óbvio que não só as mudanças no processo são importantes, como também, a calibração freqüente dos instrumentos utilizados, como as balanças, garantido a precisão das medidas.

### 1.6 Fatores relacionados ao sistema e ao meio de dissolução

Ao se planejar o teste de dissolução é importante estabelecer condições o mais fisiológicas possível, isso permite interpretar os dados de dissolução *in vitro* com a performance do medicamento *in vivo* (CDER/FDA, 1997).

Para que um teste de dissolução tenha sucesso, é preciso que a intensidade de agitação seja coerente com o dispositivo utilizado e a velocidade de dissolução esperada, sendo que para prevenir a turbulência no sistema e sustentar um fluxo laminar reprodutível, características essenciais para obter resultados de confiança,

tanto a velocidade de agitação como a de fluxo devem ser mantidas em níveis mais baixos (ABDOU, 1995).

Tanto a temperatura como a agitação do meio, são fatores que podem influenciar a dissolução do fármaco. É muito importante que se mantenha uma temperatura de 37 °C com variação máxima de  $\pm 0,5$  °C, o motivo de ser um fator cuidadosamente controlado é pela sua relação com a solubilidade do fármaco (ABDOU, 1995). Um aumento na temperatura faz com que a energia cinética da molécula aumente, aumentando a constante de difusão D (ver item 1.1). Quanto à agitação, que *in vivo* pode ser definida como os movimentos peristálticos do TGI, deve ser mantida constante, pois o seu aumento poderá refletir na diminuição da espessura da camada estagnante (Figura 2) refletindo em um maior percentual dissolvido (SHARGEL & YU, 1999a).

Quanto à escolha do meio utilizado, essa é dependente da solubilidade do fármaco analisado e para se realizar os testes, grandes esforços devem ser feitos para simular as condições *in vivo*, seja através do controle do pH, da viscosidade e da tensão superficial. No caso do pH, é sugerido utilizar um meio que esteja numa faixa fisiologicamente relevante, ou seja, entre 1,2 e 6,8 (CDER/FDA, 1997), porém em alguns casos, como ácidos fracos de baixa solubilidade, se faz necessário a utilização de meios com pH superior a 6,8, mas é necessário que se tenha cautela, pois determinadas condições podem acelerar a velocidade de dissolução superestimando o percentual dissolvido (EL-MASSIK *et al.*, 1996; SILVA & VOLPATO, 2002).

A importância da viscosidade está na fase de difusão que ocorre após a etapa de solubilização, estando o meio muito viscoso, a velocidade de difusão pode diminuir. Quanto à tensão superficial do meio de dissolução, seu efeito é significativo

sobre a velocidade de dissolução e liberação do fármaco da forma farmacêutica sólida, por isso o emprego de tensoativos e agentes molhantes que diminuem o ângulo de contato sólido-líquido facilitando o processo de penetração do meio na matriz (ABDOU, 1995).

Assim, controlando todos esses parâmetros, procura-se delinear condições o mais próximo do objetivo máximo: reproduzir *in vitro* o que ocorre *in vivo*.

### **1.6.1 Tensoativos**

Os tensoativos (surfactantes) são frequentemente utilizados nos meios de dissolução com o intuito de melhorar a solubilização de fármacos pouco solúveis (MANIASSO, 2001).

A estrutura típica de um tensoativo é uma cadeia de hidrocarbonetos (8 a 18 átomos) ligada a um grupo que define a natureza não-iônica, catiônica, aniônica ou anfótera do surfactante (MANIASSO, 2001; NEUGEBAUER, 1990).

A concentração micelar crítica (CMC) pode ser definida como o limite de concentração do tensoativo acima do qual há formação de micelas. Espontaneamente em solução aquosa, a partir da CMC, grandes agregados moleculares de dimensões coloidais, possuindo ambas regiões estruturais hidrofílica e hidrofóbica, associam-se dando origem às micelas. Abaixo da CMC o tensoativo está na forma de monômeros e próximo a CMC ocorre um equilíbrio dinâmico entre monômeros e micelas (NEUGEBAUER, 1990).

Os tensoativos podem ser naturais ou sintéticos.

## 2 Glibenclamida

A glibenclamida (GLB), cujos sinônimos são: gliburida, glibenclamídeo, glibenzciclâmida (MERCK INDEX; 2001), é um potente agente hipoglicemiante e uma das substâncias mais utilizadas da classe das sulfoniluréias em diversos países (GILMAN, 2001).

As sulfoniluréias foram descobertas acidentalmente, observando a ação hipoglicêmica de algumas sulfonamidas em experimentos com animais. Esta classe de fármacos pode ser dividida em duas gerações de acordo com a estrutura química. A GLB pertence a segunda geração (GILMAN, 2001).

### 2.1 Propriedades físico-químicas

A GLB, cujo nome químico é 5-Cloro-N-[2-[4-[[[(cicloexilamino)carbonil]amino]sulfonyl]fenil]etil]-2-metoxibenzamida, apresenta a estrutura química representada na Figura 3 (MERCK INDEX; 2001):

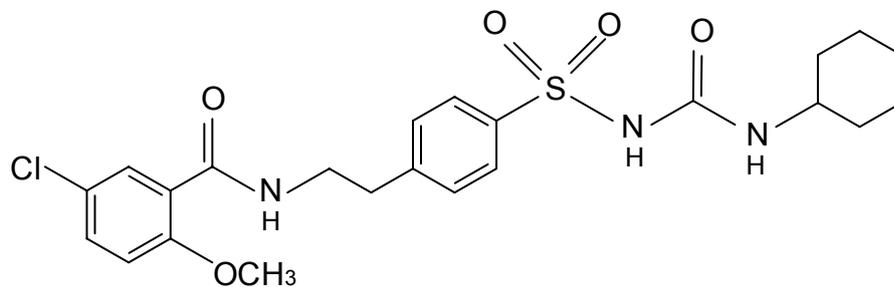


Figura 3 - Estrutura química da glibenclamida

A matéria-prima, apresenta-se sob a forma de pó cristalino branco, ou quase branco. É praticamente insolúvel em água e éter etílico, solúvel em dimetilformamida, pouco solúvel em etanol, metanol e clorofórmio, dissolve-se em soluções diluídas de hidróxidos alcalinos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2001; MARTINDALE, 1999). Seu pka é de 5,3 e a DL50 em ratos e camundongos é superior: a 20 g/kg por via oral; 12,5 g/kg por via intra peritonial e 20 g/kg por via subcutânea (MERCK, 2001).

## **2.2 Propriedades farmacodinâmicas e mecanismo de ação**

A GLB é um fármaco utilizado no tratamento do *diabetes mellitus* que é um distúrbio metabólico crônico, caracterizado por níveis elevados da glicemia – hiperglicemia – devido à deficiência e/ou resistência à insulina. Existem duas formas principais de *diabetes mellitus*:

- Diabetes tipo 1 (*diabetes mellitus* insulino-dependente – DMID – ou diabetes de início juvenil)
- Diabetes tipo 2 (*diabetes mellitus* não-insulino-dependente – DMNID – ou diabetes de início na maturidade)

A dieta constitui a base para o tratamento do diabetes tipo 2, mas freqüentemente, essa é acompanhada por agentes orais cujos principais grupos são as biguanidas e as sulfoniluréias, sendo a tolbutamida e a clorpropamida as primeiras a serem utilizadas terapêuticamente. Porém, as sulfoniluréias denominadas de “segunda geração”, como a GLB, são mais potentes.

As sulfoniluréias causam hipoglicemia por meio do estímulo das células  $\beta$  pancreáticas para a liberação de insulina, ou através do aumento da sensibilidade dos tecidos periféricos à insulina. Portanto, estes fármacos são ineficazes em pacientes que retiraram o pâncreas ou que não possuem insulina endógena. As sulfoniluréias também estimulam a liberação de somatostatina e podem suprimir a secreção de glucagon (GILMAN, 2001).

Em geral, são bem toleradas, apresentando como efeitos indesejáveis o aumento de peso (no caso de obesos), distúrbios gastrintestinais (relatado em cerca de 3% dos pacientes), podendo ocorrer erupções cutâneas alérgicas e a lesão da medula óssea, caso raro, porém grave (GILMAN, 2001).

Dentro das interações farmacológicas, vários compostos podem aumentar o efeito hipoglicemiante, entre esses, alguns agentes antiinflamatórios não-esteróides, antifúngicos, antibacterianos e o álcool. Outros podem reduzir sua ação, como os diuréticos e corticosteróides (RANG, DALE & RITTER, 2001).

A administração de GLB, usualmente, é em dose única diária, sendo que, a recomendação inicial da dose adulta é de 2,5 a 5 mg para a forma não micronizada, sendo relatadas indicações de até 20 mg diários. Para a forma farmacêutica com GLB micronizada, a dose é de 1,5 a 3 mg diários com um máximo de 12 mg diários. As diferentes doses são em virtude de alguns países comercializarem comprimidos com o fármaco micronizado, o que aumenta a sua biodisponibilidade, como dito anteriormente (MARTINDALE, 1999).

## 2.3 Propriedades farmacocinéticas

A GLB apresenta extensas variações interindividuais na sua farmacocinética e farmacodinâmica, essas diferenças interindividuais podem ser atribuídas a fatores como peso corporal, proteínas carreadoras do plasma, sexo, idade e polimorfismos genéticos na enzima citocromo P450 (CYP2C9) (KIRCHHEINER *et al.*, 2002; NIEMI *et al.*, 2002). As diferenças atribuídas ao genótipo CYP2C9 podem ser refletidas na concentração plasmática de insulina (KIRCHHEINER *et al.*, 2002).

### 2.3.1 Absorção

A GLB é rapidamente absorvida pelo TGI após sua administração oral não sofrendo efeito de 1ª passagem significativa, já que praticamente 100% da dose oral é biodisponível (NIOPAS & DAFTSIOS, 2002).

Os picos de concentração plasmática ocorrem dentro de 2 a 4 horas, dependendo da forma administrada; para o fármaco não micronizado os picos ocorrem dentro de 4 h com meia-vida de 10 h. Recentemente, foram relatadas meias vidas de 1,4 a 5 horas. A GLB micronizada atinge picos plasmáticos entre 2 a 3 horas, com meia-vida de aproximadamente 4 horas (MARTINDALE, 1999).

Em virtude de requerer um tempo para alcançar uma concentração ótima no plasma, algumas sulfoniluréias podem ser mais efetivas quando administradas 30 minutos antes da alimentação (GILMAN, 2001).

### **2.3.2 Distribuição**

Todas as sulfoniluréias ligam-se fortemente à albumina plasmática e a duração do efeito da GLB varia, podendo estar compreendido entre 18-24 horas (RANG, DALE & RITTER, 2001).

### **2.3.3 Metabolismo e excreção**

Sua metabolização ocorre, quase por completa, no fígado (NIEMI *et al.*, 2002). Seus metabólitos primários são produtos de hidroxilação (4-trans-hidroxi e 3-cis-hidroxi), os quais são fracamente ativos e excretados 50% na urina e 50% nas fezes, via bile (KIRCHHEINER *et al.*, 2002; MARTINDALE, 1999; THE UNITED, 2004b). E é devido a essa atividade moderada dos metabólitos que a GLB deve ser evitada em indivíduos idosos, assim como em pacientes com leve comprometimento renal, devido ao risco de hipoglicemia (RANG, DALE & RITTER, 2001).

## **2.4 Formas farmacêuticas e de apresentação**

De acordo com o Dicionário de Especialidades Farmacêuticas (DEF, 2005), estão listadas 14 formulações comerciais para a GLB no Brasil, entre nomes de marca e genéricos, sendo a forma de apresentação comprimidos. Esses podem estar nas dosagens de 5 e 10 mg, cujas embalagens variam entre 20, 30, 100 e até 500 comprimidos.

### 3 Estudos de Biodisponibilidade

Desde que o Ministério da Saúde adotou como prioridade da política de medicamentos o genérico, algumas leis e resoluções foram adotadas de modo a regulamentar a produção e comercialização desse, o qual se tornou uma alternativa mais econômica à população. Assim, alguns termos e conceitos, tornaram-se relevantes para se entender a aplicação dessas diretrizes.

O Medicamento Genérico definido como “medicamento similar a um produto de referência ou inovador, que se pretende ser com este intercambiável, geralmente produzido após a expiração ou renúncia da proteção patentária ou de outros direitos de exclusividade, comprovada a sua eficácia, segurança e qualidade, e designado pela DCB (Denominação Comum Brasileira) ou, na sua ausência, pela DCI (Denominação Comum Internacional)” (Brasil. Lei nº 9.787,1999), não deve apresentar diferenças estatisticamente significativas em relação à biodisponibilidade (BD), quando comparado à um de referência, geralmente o medicamento pioneiro; isto implica na realização de estudos de BE.

Os estudos de BD, iniciaram-se a partir de 1945, com a primeira publicação do conceito de disponibilidade biológica. Seu desenvolvimento se deu na década de 60 com o progresso nas técnicas analíticas para análise das amostras biológicas (MANUAL DE BOAS PRÁTICAS EM BIODISPONIBILIDADE E BIOEQUIVALÊNCIA, 2005a).

O termo BD, relaciona-se à quantidade de fármaco absorvida a partir de uma forma farmacêutica e à velocidade em que tal processo ocorre. Ambos fatores, podem ser afetados pela alteração da composição ou método de fabricação do medicamento. Assim, os estudos de BD são utilizados para definir os efeitos

provocados pela alteração das propriedades físico-químicas do fármaco e as mudanças na sua farmacocinética dependendo da forma de dosagem (DI SANTO, 1995, SHARGEL & YU, 1999c, STORPIRTIS & CONSIGLIERI, 1995).

A BD pode ser absoluta ou relativa (bioequivalência).

Na BD absoluta, o cálculo de fração absorvida do fármaco administrado por via extravascular tem como referência o mesmo fármaco administrado por via intravascular, considerado 100% biodisponível (MANUAL DE BOAS PRÁTICAS EM BIODISPONIBILIDADE E BIOEQUIVALÊNCIA, 2005a).

A BE, consiste em realizar estudos comparativos de BD de produtos contendo o mesmo princípio ativo. Serão considerados bioequivalentes, aqueles que, quando administrados ao mesmo indivíduo, nas mesmas condições, não apresentarem diferenças significativas, em relação à quantidade e velocidade de absorção (DI SANTO, 1995, STORPIRTIS & CONSIGLIERI, 1995).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em alguns casos pode ocorrer a substituição da bioequivalência pelos estudos de Equivalência Farmacêutica. Na RE nº 897 de 29 de maio de 2003 estão descritas todas as condições para tal substituição.

A RE nº 896, de 29 de maio de 2003, define diretrizes para as provas de biodisponibilidade relativa/ bioequivalência. Nessas são abordadas as etapas: clínica, analítica e estatística, em que, respectivamente, são apresentados o perfil dos voluntários, a análise das amostras e a análise estatística dos parâmetros farmacocinéticos, obtidos das curvas de concentração plasmática do fármaco *versus* tempo. Os parâmetros farmacocinéticos são: área sob a curva concentração sanguínea *versus* tempo (ASC), pico de concentração máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ) do fármaco e/ou metabólito e o tempo para atingir este pico ( $T_{m\acute{a}x}$ ). A depuração (CL), o volume

aparente de distribuição ( $V_d$ ) e a meia-vida de eliminação ( $t_{1/2}$ ) do fármaco e/ou metabólito também devem ser determinados, porém, sem necessidade de tratamento estatístico.

A medida mais importante é a ASC que pode ser considerada representativa da quantidade de fármaco absorvido após a administração de dose única de um medicamento que alcança a circulação sistêmica (DI SANTO, 1995). Um dos métodos para se calcular a ASC do tempo zero até o tempo da última coleta é o método dos trapezóides que consiste na soma das áreas dos trapézios determinados pelos tempos de coleta e respectivas concentrações. A ASC também pode ser extrapolada e calculada do tempo zero até o tempo relativo à completa eliminação do fármaco. Este parâmetro é independente da rota de administração do medicamento. Porém, em alguns casos, o aumento na dosagem, leva a uma saturação do caminho de metabolização e/ou excreção do fármaco, conseqüentemente prolongando a meia-vida de eliminação desse. Nesses casos a ASC aumenta desproporcionalmente (SHARGEL & YU, 1999c; MANUAL DE BOAS PRÁTICAS EM BIODISPONIBILIDADE E BIOEQUIVALÊNCIA, 2005b).

A  $C_{máx}$ , é a medida que representa a maior concentração do fármaco observada e é diretamente proporcional ao total de fármaco absorvido pelo organismo. Seu valor pode expressar uma resposta terapêutica suficiente ou níveis tóxicos possíveis (DI SANTO, 1995; SHARGEL & YU, 1999c).

O tempo requerido para alcançar o  $C_{máx}$  é denominado de  $T_{máx}$ . Nesse ponto, a taxa de absorção é igual à de eliminação. Um valor pequeno de  $T_{máx}$  pode demonstrar uma rápida absorção.

A curva de concentração plasmática do fármaco *versus* tempo é caracterizada pela quantificação das amostras biológicas relativa a tempos de coleta previamente estabelecidos.

Para a seleção dos voluntários devem ser observadas características antropométricas como: raça, sexo, idade, relação peso-estatura, além do estado físico, hábitos alimentares e aspectos psíquicos (MANUAL DE BOAS PRÁTICAS EM BIODISPONIBILIDADE E BIOEQUIVALÊNCIA, 2005b). Após ser informado da natureza do estudo e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o voluntário é submetido a uma avaliação médica (MANUAL DE BOAS PRÁTICAS EM BIODISPONIBILIDADE E BIOEQUIVALÊNCIA, 2005a).

Entre os indivíduos existe uma grande variabilidade biológica e para que não haja comprometimento do estudo, aplica-se um ensaio cruzado em que os medicamentos teste e referência são administrados em duas fases. Tal planejamento, é denominado *crossover*, assim, cada bloco aleatório recebe mais de uma formulação em períodos diferentes. Na primeira fase, um número de indivíduos recebe o medicamento teste, simultaneamente, um outro grupo receberá o referência. Após a eliminação de todo o fármaco (*washout*), período recomendado pela legislação brasileira, de no mínimo sete meias-vidas de eliminação do fármaco, ou do metabólito, quando esse for o ativo, os grupos são invertidos, repetindo-se o processo. Esse é um delineamento conhecido como *crossover 2x2*, como demonstrado na Tabela 1 (STORPIRTIS & CONSIGLIERI, 1995; MANUAL DE BOAS PRÁTICAS EM BIODISPONIBILIDADE E BIOEQUIVALÊNCIA, 2005b).

Tabela 1: Delineamento *crossover 2x2*, medicamento referência (R) e teste (T)

Seqüência	Período	
	1	2
1	R	T
2	T	R

Os estudos podem ser conduzidos levando-se em conta o estado em jejum, estado alimentado, ou ainda, administração de doses múltiplas (SHARGEL & YU, 1999c).

Para a coleta das amostras, necessita-se conhecer as características farmacocinéticas do fármaco. De acordo com a legislação brasileira, recomenda-se um tempo igual ou superior a 3-5 vezes a meia-vida de eliminação do fármaco ou do metabólito, quando esse for o ativo (STORPIRTIS & CONSIGLIERI, 1995; MANUAL DE BOAS PRÁTICAS EM BIODISPONIBILIDADE E BIOEQUIVALÊNCIA, 2005b).

A metodologia analítica para a quantificação do fármaco deve ser validada. Os métodos mais comuns são a cromatografia líquida de alta eficiência, espectrofotometria de massas direta, ou combinada a métodos cromatográficos, além de métodos baseados em imunoenaios (STORPIRTIS & CONSIGLIERI, 1995).

Para a análise estatística dos resultados, o modelo matemático de escolha deve permitir estabelecer diferenças significativas.

#### **4 Correlação *in vivo/in vitro* (CIVIV)**

Sendo o teste de dissolução uma excelente ferramenta do controle de qualidade para monitorar os processos de fabricação de medicamentos, a correlação dos dados obtidos *in vitro* com aqueles originários de estudos em humanos, caracteriza uma forma de validação das condições empregadas neste teste.

A preocupação em desenvolver métodos de dissolução que reflitam o processo de absorção *in vivo*, caracterizando-os a partir das correlações dos dados,

tem sido alvo de pesquisadores há algumas décadas. Levy, Leonards e Procknal (1965) utilizaram a CIVIV em seus estudos com o ácido acetil salicílico.

O estabelecimento da CIVIV, visa compreender o processo de absorção do fármaco e a dependência com o processo de liberação da forma farmacêutica estudado *in vitro* (CUTLER, BEYSSAC, & AIACHE, 1997). A relação entre as propriedades, biológica e físico-química, é expressa quantitativamente (THE UNITED, 2004b).

Se o fármaco é altamente permeável e a dissolução *in vitro* é o passo limitante, a CIVIV pode ser desenvolvida (UPPOOR, 2001).

Nos estudos de CIVIV, usa-se o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) como medida da proporção de variância e testes de significância estatística da inclinação da regressão (CUTLER, BEYSSAC, & AIACHE, 1997).

#### **4.1 Classificação Biofarmacêutica**

O sistema de classificação biofarmacêutica (SCB) é um esquema baseado na solubilidade aquosa e permeabilidade intestinal do fármaco. Quando combinado com a dissolução do medicamento, o SCB considera três fatores que governam a velocidade e extensão de absorção do fármaco: dissolução, solubilidade e permeabilidade intestinal (AMIDON et al., 1995; CDER/FDA, 2000; LINDENBERG, KOPP & DRESSMAN, 2004).

De acordo com o SCB, os fármacos podem ser divididos em quatro classes:

- CLASSE I: *Alta solubilidade - Alta permeabilidade*

Por se tratarem de formulações que se dissolvem rapidamente, a taxa de absorção será controlada pelo esvaziamento gástrico, nesse caso, a correlação *in vitro/in vivo* (CIVIV) esperada, é baixa (AMIDON *et al.*, 1995; GALIA *et al.*, 1998).

- CLASSE II: *Baixa solubilidade - Alta permeabilidade*

Em contraste à Classe I, para os fármacos da Classe II, a dissolução é um fator limitante à absorção do fármaco no organismo. Logo, a importância da escolha do meio e do método de dissolução utilizado nos testes *in vitro* que devem representar as condições fisiológicas, refletindo o comportamento *in vivo* e garantindo uma boa CIVIV cuja probabilidade para essa classe é alta (AMIDON *et al.*, 1995; GALIA *et al.*, 1998).

- CLASSE III: *Alta solubilidade - Baixa permeabilidade*

O perfil de dissolução pode até ser bem definido, mas a absorção *in vivo* é dependente da permeabilidade do fármaco às membranas, assim a probabilidade da CIVIV é baixa (AMIDON *et al.*, 1995).

- CLASSE IV: *Baixa solubilidade - Baixa permeabilidade*

A probabilidade de CIVIV para essa classe é limitada, sendo insuficiente para as formas sólidas orais (AMIDON *et al.*, 1995).

## 4.2 Níveis de correlação

Quatro níveis de correlação são sugeridos (UPPOOR, 2001).

### 4.2.1 Correlação nível A

É um alto nível de correlação. Nesse caso, a curva concentração plasmática do fármaco *versus* tempo é convertida para o percentual de fármaco absorvido por meio da aplicação de um modelo farmacocinético ou de um método modelo-independente (SHARGEL & YU, 1999a).

Este nível representa uma relação ponto a ponto entre os dados da dissolução *in vitro* e a velocidade de absorção *in vivo* do fármaco na forma de dosagem (THE UNITED, 2004b).

O percentual de fármaco absorvido pode ser calculado através de Wagner-Nelson ou Loo-Riegelman, ou através, de deconvolução matemática (SHARGEL & YU, 1999a).

Para o cálculo da fração absorvida *in vivo* utilizando Wagner-Nelson, aplica-se a equação abaixo:

$$F_{a(t)} = \frac{C_{p(t)} + K_e \cdot ASC_{0-t}}{K_e \cdot ASC_{0-\infty}} \quad (\text{equação 3})$$

Em que,

$F_{a(t)}$  = fração absorvida relativa para determinado tempo

$C_{p(t)}$  = concentração plasmática da GLB para determinado tempo

$K_e$  = constante de eliminação da fase terminal

$ASC_{0-t}$  = área sob a curva do tempo zero até o tempo determinado

$ASC_{0-\infty}$  = área sob a curva do tempo zero até o infinito

A correlação nível A é geralmente linear, apresentando uma equação do tipo:

$$y = ax + b \quad (\text{equação 4})$$

Em que,

y = fração absorvida do fármaco em diferentes tempos *in vivo*;

x = percentual dissolvido do fármaco em diferentes tempos *in vitro*;

a = coeficiente angular de inclinação da reta;

b = intercepto

O ideal seria obter uma relação de 1/1 ( $y = x$ ), com intercepto igual a zero (CARDOT, & BEYSSAC, 1993).

#### 4.2.2 Correlação nível B

Este nível de correlação é baseado no princípio da análise do momento estatístico. Determina-se o tempo médio de residência do fármaco *in vivo* e o tempo médio de dissolução *in vitro*, realizando-se correlação desses dados.

É considerado um nível de menor correlação do que o nível A, pois não reflete de modo completo a curva de concentração plasmática do fármaco *versus* tempo (SHARGEL & YU, 1999a; THE UNITED, 2004b).

#### 4.2.3 Correlação nível C

A correlação é feita através de um ponto do perfil de dissolução com um parâmetro farmacocinético, tais como: ASC,  $C_{\max}$  ou  $T_{\max}$ . Portanto, caracteriza-se como um baixo nível de correlação devido a uma relação parcial entre absorção e dissolução (SHARGEL & YU, 1999a).

Os níveis de correlação B e C podem falhar em refletir a complexidade dos mecanismos de liberação e absorção. Duas formulações podem ter diferentes perfis de liberação, mas o mesmo valor em um único ponto medido, como o tempo médio de dissolução (CUTLER, BEYSSAC, & AIACHE, 1997).

#### **4.2.4 Correlação nível C múltipla**

Relaciona um ou vários parâmetros farmacocinéticos de interesse à quantidade de fármaco dissolvida em vários pontos do perfil de dissolução. Havendo a correlação nível C múltiplo, a CIVIV nível A poderia ser obtida (UPPOOR, 2001).

## **5 Justificativa**

Assim, diante do exposto, pretendeu-se desenvolver uma metodologia para a dissolução de comprimidos de GLB de liberação imediata, ainda não oficializado por nenhuma Farmacopéia, estabelecendo-se condições que *in vitro* poderão servir de base para prever o comportamento desses medicamentos no organismo e, conseqüentemente, utilizar tal método em análises de rotina do Controle de Qualidade. Para essa correlação *in vivo/in vitro*, foram utilizadas duas formulações de GLB 5 mg, sendo uma determinada de medicamento teste e a outra, de medicamento referência, cujo estudo comparativo dos perfis farmacocinéticos, após a administração oral em voluntários sadios, determinou a não BE de tais formulações.

## **OBJETIVOS**

## 1 OBJETIVOS GERAIS

Sugerir e validar uma metodologia de dissolução para comprimidos de glibenclamida de liberação imediata, uma vez que não consta em monografia oficial tal teste para esse medicamento, utilizando-se nos experimentos, duas formulações, cujo estudo de bioequivalência demonstrou perfis farmacocinéticos com diferença significativa.

Validar o método proposto, estabelecendo-se uma correlação entre os dados obtidos *in vivo* e *in vitro*, de modo que o perfil de dissolução *in vitro* de comprimidos de glibenclamida de liberação imediata, possa indicar de maneira mais fidedigna o comportamento *in vivo* dos produtos.

## 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Validar a metodologia cromatográfica de análise quantitativa da glibenclamida a ser aplicada aos estudos de dissolução, de modo a garantir, principalmente, especificidade, precisão.

Conhecer a solubilidade da glibenclamida em diferentes meios propostos para o estudo de dissolução.

Tratar os dados de biodisponibilidade das formulações teste e referência de modo a obter a cinética de absorção da glibenclamida de cada formulação.

Estabelecer condições para o teste de dissolução, definindo o pH do meio, a adição de surfactante (tipo e concentração), que façam com que o teste *in vitro* se aproxime o máximo da resposta obtida *in vivo*, refletindo o melhor possível o meio fisiológico.

**MATERIAIS**

**E**

**MÉTODOS**

## 1 MATERIAIS

### 1.1 Equipamentos e acessórios

- Agitador de tubos PHOENIX – AP56;
- Agitador magnético com banho termostaticado MARTE – MAG15;
- Amostrador automático VANKEL VK8000;
- Balança analítica METTLER TOLEDO – AG204;
- Balança de precisão METTLER TOLEDO – PB3002;
- Centrífuga HERMLE – Z 200A;
- Coluna SULPECO® supelcosil™ LC-8 , 4,6 x 150 mm, 5 µm, 5-8220, COL: 003007AF;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência SHIMADZU – bomba modelo LC-10AD VP, auto injetor modelo SIL – 10AD VP, detector de arranjo de fotodiodos modelo SPD – M10A VP e sistema de dados (*software*) modelo CLASS – VP versão 6.1;
- Desintegrador ERWEKA – ZT 53;
- Destilador QUIMIS;
- Dissolutor VANKEL VK7010
- Durômetro ERWEKA – TBH20;
- Filtro para coleta de dissolução, 10 µm de poro, VANKEL;
- Friabilômetro ERWEKA – TA10;
- Placa aquecedora com agitação CORNING;
- Potenciômetro METTLER TOLEDO MPC 227;
- Ultra-som THORNTON – 14;
- Unidade filtrante descartável, 0,45 µm de poro, MILLIPORE;

## 1.2 Reagentes

- Acetonitrila para CLAE (TEDIA);
- Ácido acético para CLAE (TEDIA);
- Cloreto de sódio (MERCK);
- Dihidrogeno fosfato de potássio (VETEC) ;
- Dihidrogeno fosfato de sódio monohidratado p.a. (MERCK);
- Etanol p.a.(VETEC);
- Laurilsulfato de sódio (SYNTH);
- Metanol p.a. (VETEC);
- Monohidrogeno fosfato de dissódio p.a. (MERCK);
- Polissorbato 80 (VETEC);
- Soluções tampão pH 4,0 e 7,0 (QM Reagentes);

### 1.3 Produtos farmacêuticos e Substância química de referência

- Glibenclamida Substância química de referência, fornecida pela Farmacopéia Brasileira, lote: 1018, teor declarado: 99,84%.
- Glibenclamida matéria-prima: fornecida pela Knoll Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda (atual Abbott do Brasil), fabricante Cadilla, lote: 10989.
- Medicamento Teste:

Glibenclamida - comprimidos 5 mg, fabricado por Knoll Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda (atual Abbott do Brasil), lote 0101001, produzidos em janeiro/2001 e válidos por 4 anos.

- Medicamento Referência:

Daonil® - comprimidos 5 mg, fabricado por *Aventis Pharma*, lote 301352, produzidos em março/2003 e válidos por 3 anos.

## 2 MÉTODOS

### 2.1 Determinação da Solubilidade da GLB em diferentes meios

Procurou-se trabalhar, para os meios de dissolução, com soluções de diferentes valores de pH, além do uso dos tensoativos Polissorbato 80 (Poli 80) e Laurilsulfato de Sódio (LSS). Portanto, para a realização do teste de solubilidade, os meios de escolha foram: suco entérico simulado (SES) sem e com tensoativo (adicionado de Poli 80 e LSS nas concentrações de 0,1% e 1%), tampão acetato pH 4,5 e tampão pH 5,5 adicionados com os mesmos tensoativos, nas mesmas concentrações do SES (ver item 2.2).

#### 2.1.1 Procedimento

Para cada tubo de ensaio contendo, aproximadamente, 100 mg de GLB, foram adicionados 10 mL do meio a ser avaliado, garantindo dessa forma, um excesso de GLB no sistema.

Os tubos foram levados a um banho-maria a 37 °C, sob agitação magnética constante de 800 rpm. Após um período de 24 horas, os tubos foram centrifugados por 5 minutos, numa velocidade de 500 rpm e, imediatamente, o sobrenadante foi filtrado através de membrana de 0,45 µm de poro. A solução resultante da filtração foi analisada quantitativamente por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (ver item 2.3).

O teste foi realizado em duplicata para cada meio.

### 2.1.2 *Curva Padrão*

Para cada meio testado, preparou-se uma curva padrão para a quantificação da GLB solubilizada. As concentrações definidas foram escolhidas de forma a englobar pontos de baixa, média e alta solubilidade da GLB na solução em teste.

Para a obtenção desses pontos, pesou-se, aproximadamente, cerca de 25 mg de GLB padrão de trabalho com teor de 99,89% (Lote: 0GC031), transferidos para balão volumétrico de 50 mL contendo acetonitrila para CLAE. A partir dessa Solução Estoque (SE), alíquota de 1 mL foi transferida para balão volumétrico de 50 mL e alíquotas de 3 mL foram transferidas para balões volumétricos de 50 e 25 mL contendo meio. Dessa forma, foram obtidas as concentrações de 10, 30 e 60  $\mu\text{g/mL}$  do fármaco, respectivamente.

### 2.1.3 *Cálculo*

Com os valores de áreas obtidos de cada amostra injetada e a equação da reta, obtida pela curva padrão (ver item 2.1.2) de cada meio, foram calculadas as concentrações em  $\mu\text{g/mL}$  de GLB por meio testado, fornecendo, assim, a concentração de saturação do fármaco nestes meios, nas condições empregadas.

## 2.2 Procedimento de preparo dos meios de dissolução

Os meios empregados no estudo de solubilidade (ver item 2.1) e na determinação do perfil de dissolução dos comprimidos de GLB (ver item 2.6), foram preparados como descritos a seguir:

- *Suco Entérico Simulado (SES)*: em 250 mL de água destilada, dissolviam-se 6,8 g de fosfato de potássio monobásico. Na mistura, eram adicionados 77 mL de hidróxido de sódio 0,2 N e 500 mL de água destilada. O ajuste do pH era feito com hidróxido de sódio 0,2 N ou ácido clorídrico 0,2 N para  $6,8 \pm 0,1$ . O volume era completado para 1000 mL com água destilada (THE UNITED, 2004c).
- *Suco Entérico Simulado Modificado*: pesavam-se 7,0g de dihidrogeno fosfato de sódio monoidratado e 6,0 g de monoidrogeno fosfato dissódico, misturava-se com 500 mL de água destilada. O pH era ajustado com hidróxido de sódio 0,2 N ou ácido clorídrico 0,2 N para  $6,8 \pm 0,1$  e o volume completado a 1000 mL com água destilada (MORITA, 2001; SILVA, 2003).
- *Tampão Acetato 1*: misturavam-se 2,99 g de acetato de sódio triidratado com 14 mL de ácido acético p.a., completando-se o volume para 1000 mL com água destilada. Quando necessário, o ajuste de pH era feito com ácido acético 0,2 N para  $4,5 \pm 0,1$  (THE UNITED, 2004c).
- *Tampão Acetato 2*: misturavam-se 5,98 g de acetato de sódio triidratado com 3 mL de ácido acético p.a., completando-se o volume para 1000 mL com água destilada. Quando necessário, o ajuste de pH era feito com ácido acético 0,2 N para  $5,5 \pm 0,1$  (THE UNITED, 2004c).

O pH dos meios foi determinado através de potenciômetro, previamente calibrado com soluções tampão pH 7,0 e pH 4,0 (QM Reagentes), à temperatura ambiente. As leituras de pH foram feitas após a adição dos tensoativos ao meio, quando da adição dos mesmos.

As concentrações de 0,1% e 1% (p/V) dos tensoativos foram selecionadas com o intuito de avaliar a influência de concentrações extremas dos surfactantes (Poli 80 e LSS).

### **2.3 Análise Quantitativa da Glibenclamida**

Devido ao fato da GLB apresentar uma baixa absorvidade no ultravioleta e a dosagem do comprimido a ser empregado nos testes ser apenas de 5 mg, as soluções resultantes da dissolução desse apresentariam melhor quantificação quando empregada a CLAE, o que levou ao desenvolvimento de uma metodologia baseada nas condições encontradas na literatura e que foi empregada para a análise de solubilidade do fármaco em diferentes meios (ver item 2.1), nos testes de dissolução (ver item 2.6.4), padronização da matéria-prima (ver item 2.4) e doseamento dos comprimidos teste e referência (ver item 2.5.6) (BRITISH PHARMACOPOEIA, 1998; EL-MASSIK *et al.*, 1996; LOBENBERG *et al.*, 2000).

### 2.3,1 Estabelecimento das condições cromatográficas

A análise procedeu-se em cromatógrafo SHIMADZU, com injetor automático e provido de detector ultravioleta com arranjo de diodos, conforme descrito em 1.1, coluna Sulpeco<sup>®</sup> (supelcosil TM LC-8, de 4,6 mm de diâmetro interno e 150 mm de comprimento), empacotada com sílica (5 µm) quimicamente ligada a grupo octilsilano mantida à temperatura ambiente.

Em testes preliminares foram definidos a fase móvel (FM), o fluxo, o volume de injeção e o comprimento de onda, descritos a seguir.

#### 2.3.1.1 Fase móvel (FM)

Baseando-se nas técnicas descritas por EL-Massik *et al.* (1996) e Lobenberg *et al.* (2000), decidiu-se testar como FM, uma mistura de acetonitrila e solução aquosa de ácido acético a 1% (50:50), observando-se o tempo de retenção da substância, pratos teóricos e assimetria do pico e pressão resultante no sistema.

#### 2.3.1.2 Fluxo

Com o intuito de obter um menor tempo de corrida, sem perder a qualidade da resposta gerada e uma pressão do sistema controlada, foram testadas três velocidades, 1,0 mL/minuto, 1,2 mL/minuto e 1,5 mL/minuto.

#### 2.3.1.3 *Volume de injeção*

Observando-se a integração do pico da GLB e o limite de quantificação, testaram-se os volumes de 20  $\mu\text{L}$  e 40  $\mu\text{L}$  da solução em análise.

#### 2.3.1.4 *Comprimento de onda*

Foi realizada uma varredura na faixa do ultravioleta entre 190 a 390 nm, observando o comprimento de onda que apresentaria maior sensibilidade para a GLB, nas condições empregadas.

### **2.3.2 Validação da Metodologia**

Para a validação da metodologia de quantificação de GLB por CLAE, foram realizados testes que comprovassem a especificidade do método, a linearidade de resposta e a precisão intra e inter-dia.

Todas as informações necessárias para se validar o teste, foram retiradas do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, anexo da Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil. Resolução – RE nº 899, 2003).

### 2.3.2.1 *Especificidade frente a composição dos meios de dissolução*

Para comprovar a capacidade do método em medir exatamente a GLB, mesmo na presença dos demais componentes do meio, amostras contendo os tampões a serem empregados nos testes, foram injetadas nas condições descritas em 2.3.1.

Não foi possível avaliar a interferência dos excipientes das formulações, pois seria preciso um lote placebo dos comprimidos.

### 2.3.2.2 *Linearidade de resposta e precisão intra e inter-dia*

Para certificarmos a linearidade e a precisão intra e inter-dia do método, foram preparadas três SE de 400  $\mu\text{g/mL}$ , cada solução foi diluída de forma a obter soluções na faixa de 0,64 a 8,0  $\mu\text{g/mL}$  de GLB. Tal procedimento foi realizado em dois dias diferentes.

A análise de precisão foi feita através do desvio padrão (dp) e desvio padrão relativo (DPR) dos valores de área encontrados. A linearidade do método foi determinada pela análise de regressão linear com o auxílio do *software* Excel® (MICROSOFT, 2002).

### 2.3.2.3 *Precisão do volume de injeção*

A precisão de injeção foi avaliada através de duas amostras de concentrações 0,64  $\mu\text{g/mL}$  e 4  $\mu\text{g/mL}$ , com dez réplicas cada, segundo a metodologia cromatográfica descrita em 2.3.1

A precisão foi avaliada pelo desvio padrão relativo (DPR) calculado a partir das áreas obtidas.

#### 2.3.2.4 *Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)*

A estimativa dos limites pode ser feita com base na equação da reta, aplicando-se as equações:

$$LD = \frac{dp_a \cdot 3}{IC}$$

(equação 5)

$$LQ = \frac{dp_a \cdot 10}{IC}$$

(equação 6)

Em que,

dP = é o desvio padrão do intercepto com o eixo do y

IC = inclinação da curva de calibração

## 2.4 **Caracterização da matéria-prima**

Para a padronização da GLB matéria-prima a ser utilizada como padrão de trabalho foi realizada a análise de identificação por infravermelho descrita na monografia da Farmacopéia Brasileira (2001) e o doseamento, por CLAE (ver item 2.3.1). Como substância química de referência (SQR), foi utilizado padrão Farmacopéia Brasileira com teor de 99,84% (Lote: 1018).

## **2.5 Caracterização dos comprimidos de GLB**

A caracterização dos comprimidos teste e referência, foi realizada por meio dos ensaios descritos na monografia da Farmacopéia Brasileira (2001), sendo todos os testes clássicos para essa forma farmacêutica.

Os testes, descritos detalhadamente abaixo são: peso médio e uniformidade de peso, uniformidade de dose por conteúdo, dureza, friabilidade, desintegração e teor.

### **2.5.1 Determinação de peso e peso médio**

Foram pesados, individualmente, 20 comprimidos, permitindo-se uma variação de  $\pm 7,5\%$  em relação ao peso médio (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988b).

### **2.5.2 Uniformidade de conteúdo**

De acordo com a Farmacopéia Brasileira, o teste foi realizado com 10 comprimidos. Porém, a metodologia de escolha empregada para a análise dos comprimidos teste e referência, não seguiu a descrita pelo compêndio, optando-se pela análise quantitativa por CLAE, descrita em 2.3.1. (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1996)

#### *2.5.2.1 Procedimento*

Cada comprimido foi transferido para balão volumétrico de 50 mL. Adicionou-se 1 mL de ácido clorídrico 0,5 N, após a desintegração total do comprimido,

acrescentaram-se 25 mL de acetonitrila para CLAE. O balão permaneceu sob agitação mecânica por 15 minutos e em ultra-som por mais 15 minutos. O volume foi completado com solução aquosa de ácido acético 1%, prosseguindo conforme descrito em doseamento (ver 2.5.6).

### **2.5.3 Dureza**

Foi medida através do Durômetro ERWEKA – TBH20, de acordo com a metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira (1988c), utilizando 10 comprimidos.

### **2.5.4 Friabilidade**

Realizada de acordo com a Farmacopéia Brasileira (1988c), utilizando Friabilômetro ERWEKA – TA10 e 20 comprimidos.

### **2.5.5 Desintegração**

O teste foi realizado de acordo com a metodologia geral descrita na Farmacopéia Brasileira (1988d). Utilizaram-se 6 comprimidos e água como meio de desintegração a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ .

### **2.5.6 Doseamento**

A análise do teor dos comprimidos teste e referência, foi realizada com a mesma metodologia analítica desenvolvida para a análise quantitativa de GLB (ver

item 2.3.1), empregada nos ensaios de dissolução dos comprimidos e teste de solubilidade da matéria-prima.

#### 2.5.6.1 *Procedimento*

Foram utilizados 20 comprimidos para o ensaio, os quais foram pesados e pulverizados. Uma quantidade de pó equivalente a um peso médio do comprimido foi transferida para balão volumétrico de 100 mL contendo 50 mL de acetonitrila para CLAE. O balão volumétrico foi levado ao ultra-som por 15 minutos e agitação mecânica por mais 15 minutos, para garantir a completa solubilização da GLB. O volume foi completado com solução aquosa de ácido acético 1%. Prosseguindo a análise cromatográfica como descrito anteriormente.

## 2.6 Determinação do perfil de dissolução dos comprimidos de GLB

A cinética de liberação dos comprimidos de GLB, teste e referência, foi realizada, tomando-se por base os parâmetros que influenciam a dissolução dos comprimidos.

Os testes foram desenvolvidos no Dissolutor *VankeI*, cuja coleta das alíquotas é feita automaticamente.

### 2.6.1 Meio de dissolução

Para a escolha dos meios a serem testados, considerou-se o pKa de 5,3 da GLB, ácido fraco, e sua baixa solubilidade, assim os valores de pH determinados e a presença de tensoativos nos meios.

Os meios escolhidos foram: suco entérico simulado (SES) pH 6,8 sem tensoativo e adicionado de Poli 80 nas concentrações de 0,1% e 1%, tampão acetato pH 4,5 com Poli 80 1% e tampão acetato pH 5,5 com Poli 80 nas concentrações de 0,1% e 1%. Também foram testados os mesmos meios, porém substituindo o tensoativo Poli 80 por LSS nas mesmas concentrações (p/V), sendo que o SES sofreu algumas modificações para que os íons potássio, presentes na solução, não reagissem com o LSS (ver item 2.2). Também foi utilizado nos ensaios de perfil de dissolução, o tampão borato pH 9,5, sugerido na USP 23 NF18 (1995) como meio de dissolução para comprimidos de GLB, metodologia retirada do compêndio nas edições seguintes e também discutida por EL-MASSIK *et al.* (1996).

Os tensoativos, Poli 80 e LSS, foram escolhidos de acordo com o estudo realizado por Silva (2001) que detectou entre as monografias oficiais uma maior

predileção por tais substâncias. As concentrações empregadas (0,1% e 1%), foram determinadas conforme descrito anteriormente (ver 2.2).

O volume empregado nas cubas de dissolução, seguiu o mais recomendado na literatura, 900 mL.

### **2.6.2 Tipo de agitador e velocidade de agitação**

Face a baixa solubilidade da GLB, optou-se pelo Método 2, também conhecido como pá, com velocidade de 75 rpm.

### **2.6.3 Tempo de ensaio e coleta das amostras**

Baseando-se em um estudo de bioequivalência (BE) (SYNCHROPHAR, 2001), procurou-se estabelecer um tempo de ensaio e intervalos de coleta de amostras que permitissem construir uma correlação *in vivo/ in vitro*, preferencialmente, tempo a tempo. Portanto, o tempo total de ensaio foi de três horas e o tempo para as coletas foram: 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 180 minutos.

A coleta das amostras, foi realizada automaticamente pelo dissolutor, através de um programa elaborado exclusivamente para os testes, no qual constam cada tempo de coleta e o volume de 10 mL das alíquotas a serem retiradas, sem reposição do meio.

### 2.6.3.1 *Calibração do volume amostrado*

Antes de iniciar o teste de dissolução, realizava-se a calibração do volume amostrado. O módulo VK 8000 (amostrador automático), dispõe de dois recursos para tal procedimento, uma forma manual e a outra automática.

Optando-se pela calibração automática, com o auxílio de um recipiente adequado ao aparelho e as cânulas de amostragem, utilizava-se água destilada como meio para a calibração, de acordo com o recomendado pelo manual do fabricante. Esporadicamente, após o término do processo, o volume coletado para o bloco calibrador, referente a cada cuba, era conferido com pipeta volumétrica de 10 mL. Aspirava-se completamente o líquido do compartimento do bloco e o menisco não distava da marca mais do que 2 mm, de modo a certificar a calibração realizada.

### **2.6.4 Procedimento de ensaio de dissolução e quantificação da GLB dissolvida**

Os ensaios iniciavam-se pela preparação do meio a ser testado. Após o ajuste do pH, o meio era pré-aquecido em placa aquecedora a aproximadamente 37 °C, dessa forma, agilizando o tempo de análise. Pela presença dos tensoativos, não foi realizada a degaseificação dos meios, pois haveria a excessiva formação de espuma. Utilizando proveta de 1000 mL, o meio era medido (900 mL) e colocado nas cubas do dissolutor *VankeI*. Após a temperatura de todas as cubas (6 cubas), tornar-se estável (37 °C  $\pm$  0,5), iniciava-se o programa e os comprimidos eram simultaneamente adicionados nas cubas, seguido do acionamento da rotação das

pás. Nos tempos determinados, a coleta das amostras era feita através de cânulas cuja extremidade continha filtros cilíndricos de 10  $\mu\text{m}$  de porosidade. Alíquotas de 10 mL eram retiradas e colocadas em tubos numerados. Todo o processo era feito automaticamente. Em seguida, as soluções era transferidas para *vials*, de uso exclusivo do cromatógrafo líquido *Shimadzu*, prosseguindo com a análise quantitativa (ver item 2.3.1).

A cada dia de ensaio, realizava-se o perfil de dissolução com 3 comprimidos teste e 3 comprimidos referência, executando o mesmo procedimento duas vezes para cada meio, totalizando 6 réplicas para cada medicamento, e garantindo que ambos sofressem as mesmas influências na análise.

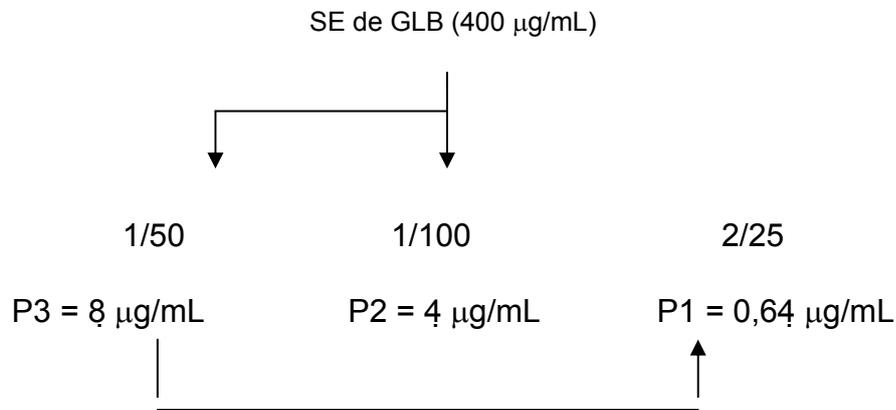
#### 2.6.4.1 *Curvas Padrão*

A cada dia de análise, realizava-se uma curva padrão com o intuito de avaliar a qualidade de todo o sistema e a boa execução dos procedimentos.

As curvas padrão, eram preparadas a partir de uma SE de GLB padrão de trabalho com teor de 99,89% (Lote: 10989). Para a obtenção de uma SE com concentração de 400  $\mu\text{g/mL}$ , pesavam-se, analiticamente, cerca de 20 mg de GLB e transferiam-se para balão volumétrico de 50 mL contendo acetonitrila para CLAE, dissolvendo-se toda a massa pesada com a ajuda do ultra-som e completando-se o volume do balão com o mesmo solvente. Para a obtenção da concentração real da SE, a correção da massa pesada era feita de acordo com o seu teor.

Um esquema de diluição da SE foi planejado com o intuito de englobar na faixa da curva padrão, todas as concentrações possíveis para as soluções a serem

analisadas na determinação do perfil de dissolução dos comprimidos de GLB (ver 2.6). O esquema de diluição encontra-se detalhado na Figura 4:



**Figura 4:** Esquema de diluição da SE de GLB para curva-padrão empregada nos estudos de perfil de dissolução.

O solvente de diluição foi sempre o mesmo meio empregado nos testes de dissolução.

### 2.6.5 Cálculo

Utilizando-se o programa Excel® (MICROSOFT, 2002), foi desenvolvida uma planilha de cálculos para a qual os dados obtidos na análise quantitativa de GLB eram transferidos. Para cada ensaio, eram relacionados os valores de área obtidos com a curva padrão referente ao dia para calcular a concentração de GLB nas alíquotas. Também considerava-se o volume amostrado das cubas, o volume de meio de dissolução empregado nos testes e a quantidade declarada de GLB nos comprimidos, conforme a equação a seguir:

$$GLB_{diss} (\%) = \frac{C_{a(t)} \cdot V_c + \sum_{t=0}^{t-1} C_{a(t)} \cdot V_a}{D} \cdot 100 \quad (\text{equação 7})$$

Em que,

$C_{a(t)}$  = concentração de GLB nas alíquotas diluídas (mg/mL) no tempo t;

$V_c$  = volume do meio de dissolução nas cubas (900 mL);

$V_a$  = volume da alíquota retirada das cubas (10 mL);

D = quantidade declarada de GLB nos comprimidos (5 mg).

## 2.7 Tratamento dos dados *in vivo* e estabelecimento da correlação *in vivo/in vitro*

O estudo de BE da GLB foi conduzido pela Synchrophar – Assessoria e Desenvolvimento de Projetos Clínicos S/C Ltda e pela Unidade Analítica Cartesius – USP. Os dados foram cedidos pela indústria fabricante da formulação candidata a genérico.

O teste de BE entre as formulações foi realizado com 24 voluntários de ambos os sexos, considerados sadios através de exames médicos e laboratoriais. O desenho foi de um estudo aberto, cruzado de duas fases, com administração de dose única de cada formulação por período a cada voluntário, de acordo com a lista de randomização. As amostras de sangue para determinação da GLB foram colhidas previamente à administração e até 24 horas após, em intervalos pré-determinados. A concentração plasmática de GLB foi determinada através de CLAE acoplada a um sistema de espectrometria de massas (SYNCHROPHAR, 2001).

A média da concentração plasmática de GLB nos indivíduos, de ambas formulações, é apresentada na Figura 5.

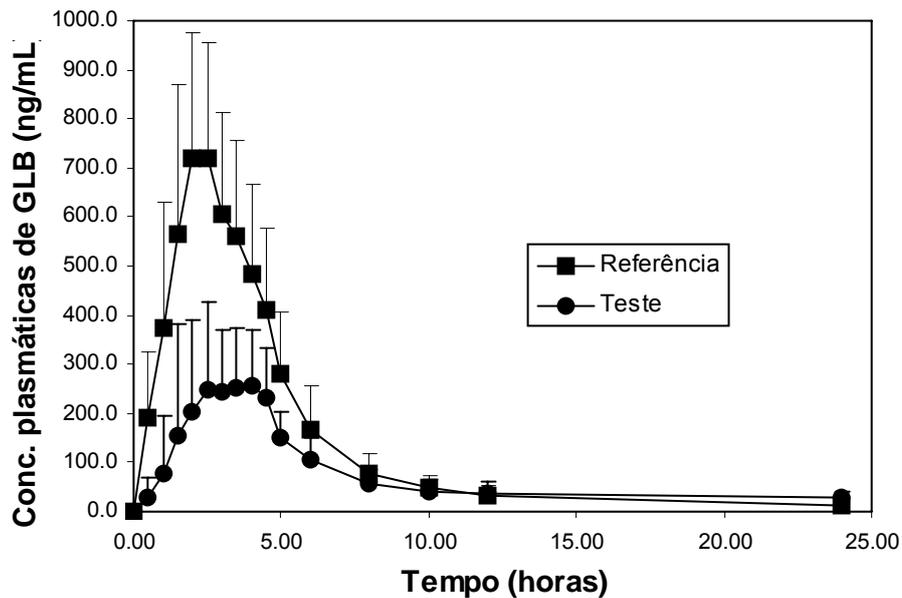


Figura 5: Curva média da concentração plasmática de GLB *versus* tempo nos voluntários; administração de dose única dos medicamentos referência e teste, comprimidos de 5 mg. Fonte: Synchrophar, 2001.

Na Tabela 2, seguem os valores médios para alguns parâmetros farmacocinéticos analisados no estudo de BE.

Tabela 2: Parâmetros farmacocinéticos obtidos a partir da curva média de concentração plasmática da GLB *versus* tempo

<b>Parâmetros farmacocinéticos</b>	<b>Daonil® (média)</b>	<b>mida</b>	<b>Glibenclá (média)</b>
ASC infinito	3450		2296
$C_{max}$ (ng/mL)	840		332
$T_{max}$ (h) – média	2.25		3.65
$T_{1/2}$ (h) – média	6.52		9.47

$C_{máx}$  = concentração plasmática máxima

$T_{máx}$  = tempo para alcançar  $C_{máx}$

ASC = área sob a curva da concentração plasmática *versus* tempo

$T_{1/2}$  = meia-vida de eliminação

Fonte: Adaptado de Synchrophar, 2001

De acordo com a especificação adotada pelo laboratório responsável pelos estudos *in vivo* dos comprimidos de GLB, o qual seguiu as recomendações do *Food and Drug Administration* (FDA), foi concluído que os medicamentos não eram BE (SYNCHROPHAR, 2001).

Para obter correlação nível A dos dados *in vivo* com os dados *in vitro*, foi necessário estabelecer qual o melhor método para se calcular a fração absorvida média de GLB nos indivíduos. Os métodos testados foram Wagner-Nelson e Loo-Riegelman, dependendo se o fármaco seguia o modelo de um ou dois compartimentos, respectivamente.

A modelização da curva concentração plasmática *versus* tempo, foi determinada através da regressão não linear dos dados com o auxílio do programa estatístico *WinNonlin Professional*, versão 3.0 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA).

O método de escolha é dependente dos resultados obtidos com a modelização. Para cada método, uma equação diferente determina a fração absorvida em cada tempo. A correlação dos percentuais dissolvidos *in vitro* com os dados *in vivo* foi realizada em tempos iguais como apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Associação de tempos para correlação dos dados obtidos no estudo de BE com os percentuais de GLB dissolvidos.

In vivo (min)	In vitro Tempos iguais (min)
0	0
30	30
60	60
90	90
120	120
180	180

Os valores correspondentes nesses tempos formam pares de coordenadas para a CIVIV. O mesmo procedimento deve ser realizado para medicamento teste e referência em todas as condições de dissolução propostas.

Optou-se trabalhar também com um outro tipo de correlação, a nível C múltiplo, correlacionando os percentuais dissolvidos com um dado menos refinado que a fração absorvida, mas também capaz de fornecer informações relevantes das formulações, o dado de escolha foi a ASC parcial do gráfico concentração plasmática *versus* tempo. Os pontos de coordenada se deram nos mesmos tempos apresentados na Tabela 3.

## **RESULTADOS**

## 1 Determinação da solubilidade da GLB em diferentes meios

Procurou-se testar as influências do pH e a presença de tensoativos, em concentrações diferentes, na solubilidade da GLB.

Os resultados obtidos para a concentração de saturação da GLB nos meios avaliados são apresentados na Tabela 4 e ilustrados na Figura 6.

Tabela 4– Solubilidade da GLB nos meios avaliados, expressa como concentração de saturação (Cs) a 37 °C.

Meio	Concentração de GLB ( $\mu\text{g/mL}$ )
Tampão pH 4,5	ND
Tampão pH 4,5 + Poli 80 0,1%	<b>3,49</b>
Tampão pH 4,5 + Poli 80 1%	12,82
Tampão pH 4,5 + LSS 0,1%	8,79
Tampão pH 4,5 + LSS 1%	74,63
Tampão pH 5,5	ND
Tampão pH 5,5 + Poli 80 0,1%	8,85
Tampão pH 5,5 + Poli 80 1%	29,02
Tampão pH 5,5 + LSS 0,1%	43,81
Tampão pH 5,5 + LSS 1%	<b>290,01</b>
SES	9,80
SES + Poli 80 0,1%	46,22
SES + Poli 80 1%	86,82
SES + LSS 0,1%	71,87
SES + LSS 1%	161,65

Numeração em negrito: valores máximo e mínimo de solubilidade da GLB

ND= Não determinado (solução  $\ll 10 \mu\text{g/ml}$ ). Face à impossibilidade de preparo de curva-padrão no meio de dissolução, uma vez observada precipitação na faixa 10-30  $\mu\text{g/ml}$  a 25 °C

Na presença de surfactante, todos os meios promoveram uma melhor solubilidade sendo esta crescente com o aumento da concentração de Poli 80 e LSS.

Comparando-se os tensoativos empregados no teste, nos meios contendo LSS, a GLB apresentou maior solubilidade que nos meios contendo as mesmas concentrações de Poli 80.

Observa-se nos resultados da Tabela 4, a máxima solubilização da GLB de 290,01  $\mu\text{g/mL}$ , em tampão pH 5,5 contendo LSS 1% (p/V), e a mínima concentração obtida de 3,49  $\mu\text{g/mL}$ , em tampão pH 4,5 contendo Poli 80 0,1% (p/V).

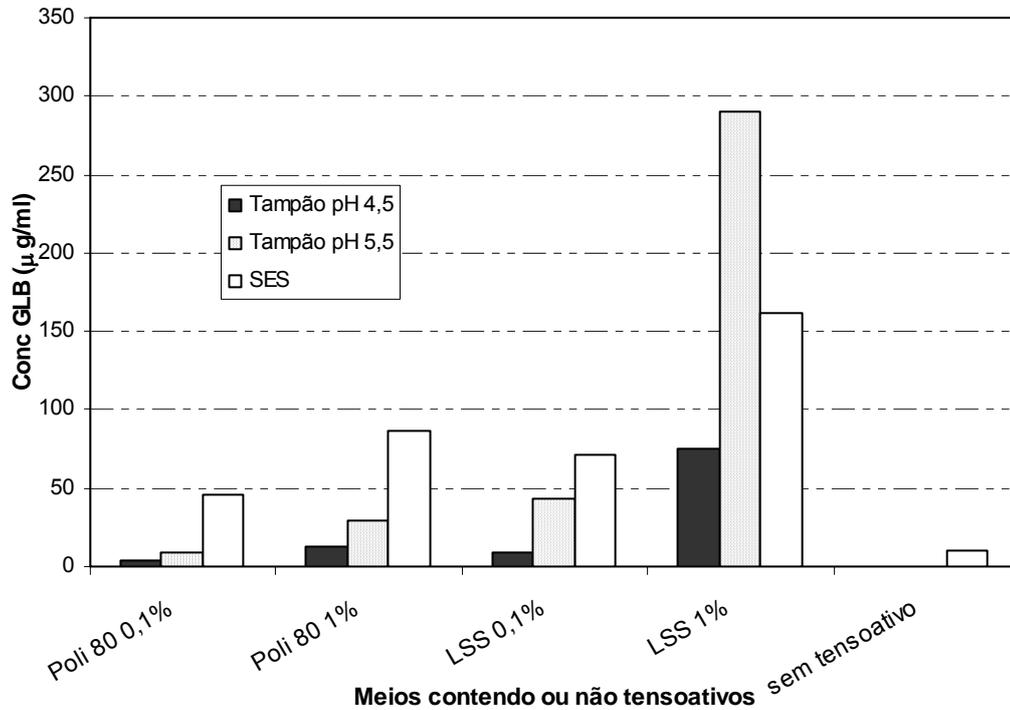


Figura 6 – Concentração de saturação da GLB em diferentes meios.

Por meio da Tabela 5, podemos analisar a influência do aumento na concentração de tensoativo, Poli 80 e LSS, na solubilidade da GLB obtendo a razão entre a  $C_s$  do fármaco no meio com 1% (p/V) e no meio com 0,1% (p/V) do mesmo tensoativo.

Tabela 5 – Promoção da solubilidade da GLB nos meios de dissolução contendo Poli 80 e LSS expressos como razão entre as concentrações de saturação do fármaco

Meio	Cs <sub>1%</sub> /Cs <sub>0,1%</sub>	
	Poli 80	LSS
4,5	3,67	8,49
5,5	3,27	6,62
SES	1,88	2,25

Quanto maior o valor representado na Tabela 5, mais relevante é a presença do tensoativo na promoção da solubilidade da GLB no respectivo meio. Logo, à medida que o pH aumenta, a alteração na concentração de 0,1% (p/V) para 1% (p/V) de tensoativo, torna-se menos significativa, principalmente para o LSS e menos para o Poli 80.

## 2 Análise Quantitativa

### 2.1 Estabelecimento das condições cromatográficas

#### 2.1.1 Fase Móvel

A fase móvel testada, acetonitrila e solução aquosa de ácido acético 1% (50:50), permitiu seletividade à amostra, além de proporcionar uma pressão do sistema de, aproximadamente, 1500 psi, que permaneceu estável durante todos os experimentos.

### **2.1.2 Fluxo**

O fluxo de escolha da fase móvel foi 1,5 mL/minuto, apresentando um tempo de retenção de, aproximadamente, 3,4 minutos, para a glibenclamida, e pressão do sistema controlada.

### **2.1.3 Volume de injeção**

Para as análises das alíquotas originadas do teste de dissolução dos comprimidos, foram injetados 40  $\mu$ L. Nas análises do teste de solubilidade, optou-se por injetar 20  $\mu$ L. Os volumes foram determinados, baseando-se nas concentrações estimadas das soluções a serem analisadas.

### 2.1.4 Comprimento de onda

O comprimento de onda selecionado, de acordo com os cromatogramas obtidos, foi 227 nm, assim como ilustrado na Figura 7.

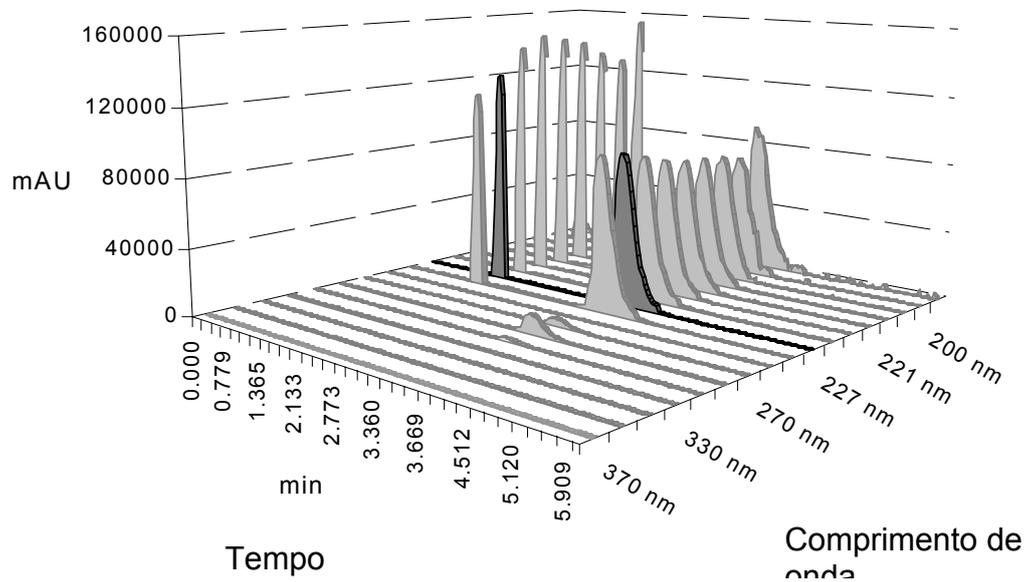


Figura 7 – Cromatograma tridimensional da GLB demonstrativo do comprimento de onda escolhido, 227 nm.

## 2.1.6 Validação da Metodologia

### 2.1.6.1 Especificidade frente a composição dos meios de dissolução

Os cromatogramas obtidos com a análise dos tampões acrescidos dos tensoativos, meio em que a amostra era dissolvida, não apresentaram interferentes na região de retenção da GLB, nas condições empregadas, como pode ser verificado pela comparação das Figuras 8 e 9.

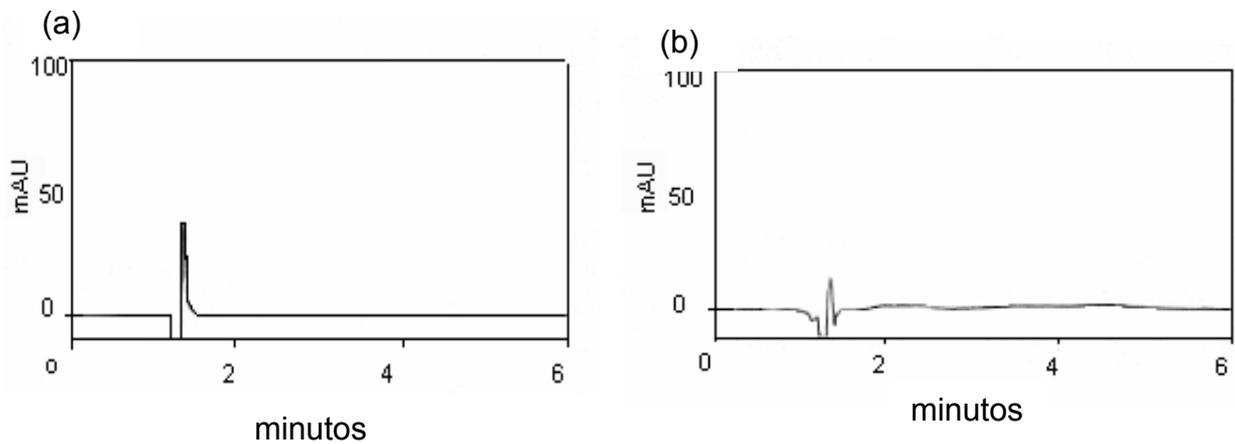


Figura 8 – Cromatogramas representativos: (a) amostra de meio tampão pH 5,5 com Poli 80 0,1% (b) amostra de meio SES com Poli 80 1%

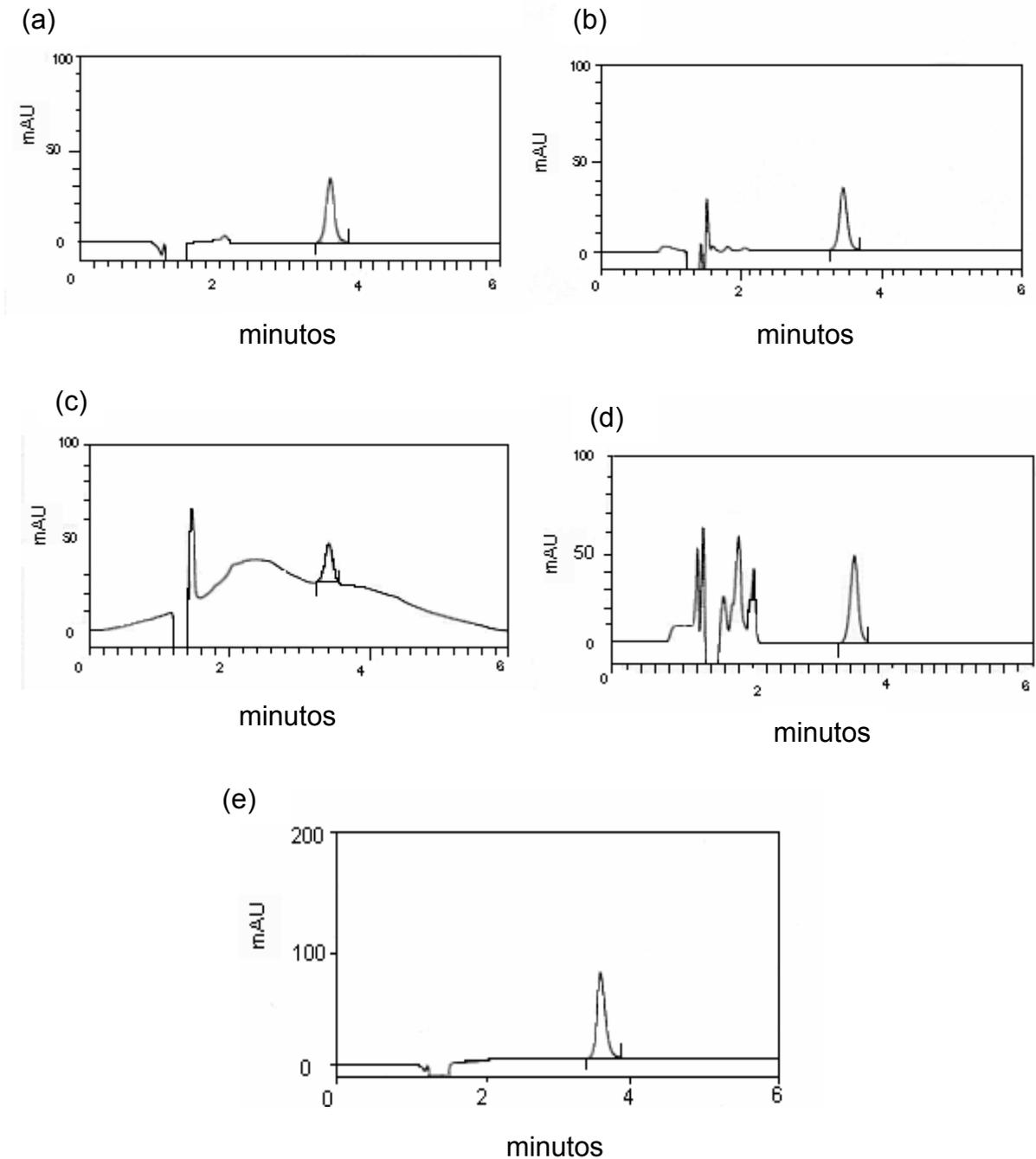


Figura 9 – Cromatogramas representativos: (a) alíquota do meio de dissolução SES com Poli 80 0,1% (medicamento teste), (b) alíquota do meio de dissolução tampão pH 5,5 com LSS 0,1% (medicamento referência) (c) alíquota do meio de dissolução tampão pH 4,5 com Poli 80 1% (medicamento teste) (d) alíquota do meio de dissolução SES com LSS 1% (medicamento teste) (e) GLB na concentração de 8  $\mu\text{g/mL}$  em SES sem tensoativo (curva padrão).

### 2.1.6.2 Precisão e Linearidade de resposta

A precisão intra e inter-dia foi avaliada segundo os valores do DPR apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultados do teste de precisão intra e inter-dia.

Concentração (µg/mL)	Dia	Área sob o pico	Área sob o pico média ± dp	Precisão intra-dia DPR (%)	Precisão inter-dia DPR (%)
0,64	1	41539	35980,33 ± 4943,43	13,74	13,53
		32077			
		34325			
	2	33877	36723,67 ± 5969,81	16,26	
32710					
43584					
2,0	1	141299	144297,7 ± 6054,25	4,19	6,11
		140328			
		151266			
	2	139791	142747,7 ± 12412,97	8,70	
132080					
156372					
4,0	1	290878	290538 ± 2561,98	0,88	1,38
		292913			
		287823			
	2	285017	284163 ± 1207,74	0,42	
283309					
<b>387793</b>					
6,0	1	433099	430578,7 ± 9852,32	2,29	2,58
		438926			
		419711			
	2	418759	432408,7 ± 14436,11	3,34	
430947					
447520					
8,0	1	577523	577494,7 ± 11607,53	2,01	2,11
		589088			
		565873			
	2	557781	574543,7 ± 15116,71	2,63	
578709					
587141					

Valor em negrito: descartado com base no teste Q ( $\alpha=0,05$ )

dp = desvio padrão

DPR = desvio padrão relativo

A análise, realizada em dois dias diferentes, apresentou valores elevados de DPR para as concentrações de 0,64  $\mu\text{g/mL}$  e 2  $\mu\text{g/mL}$ , fato que já era esperado, diante das baixas concentrações.

As curvas padrão médias, referentes aos dados apresentados na Tabela 6, encontram-se na Figura 10.

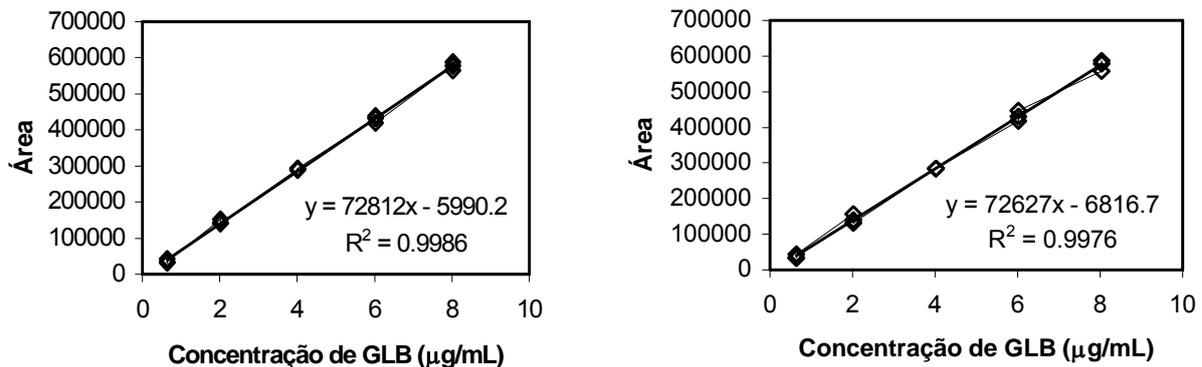


Figura 10: Curva padrão média do 1º e 2º dia de testes.

Os dados apresentados na Figura 10 estão destacados na Tabela 7, de forma mais detalhada, com intuito de demonstrar a linearidade do método.

Tabela 7 – Análise de Linearidade do método

	Dia 1	Dia 2
a	-59902	-6816,7
b	72812	72827
r	0,9993	0,9988
r <sup>2</sup>	0,9986	0,9976
<b>EP regressão</b>	7706,44	10592,97
EP intercepto	3681,18	5120,41
IC intercepto	-13942.94 – 1962.45	-17973.17 – 4339.67
Valor P– intercepto	0,1277 <sup>NS</sup>	0,2078 <sup>NS</sup>
EP inclinação	747,27	1027,25
IC inclinação	71197.67 – 74426.44	70388.37 – 74864.76
Valor P– inclinação	5,25.10 <sup>-20</sup> *	4,26.10 <sup>-17</sup> *

NS = Não significativo

\* = Significativo para  $\alpha = 0,05$

EP = Erro padrão

IC = intervalo de confiança de 95%

A linearidade foi comprovada face ao valor não significativo para o valor P do intercepto, valores de inclinação significativos e ao coeficiente de determinação superior a 0,99.

A precisão de injeção do cromatógrafo pode ser demonstrada quando os valores de DPR encontrados forem menores que 2%. Para as baixas concentrações, como 0,64 µg/mL, consideram-se aceitáveis valores inferiores a 10%. Logo, através dos resultados apresentados na Tabela 8, concluímos que os resultados são satisfatórios.

Tabela 8 – Resultados do teste de precisão de injeção.

Concentração (µg/mL)	Área sob o pico	Área sob o pico média ± dp	DPR (%)
0,64	32077	35130,6 ± 2610,41	7,43
	34325		
	39222		
	32629		
	35653		
	34956		
	34564		
	39988		
	33130		
	34762		
4,0	290878	289978,3 ± 3545,172	1,22
	292913		
	287823		
	286746		
	289875		
	294422		
	290940		
	291988		
	282236		
	291962		

### 2.1.6.3 *Limite de Detecção e Limite de Quantificação*

Utilizando-se os dados apresentados na Tabela 7 e as equações 4 e 5 (ver Métodos item 2.3.2.4) foram calculados LD e LQ da GLB por CLAE. A menor quantidade de GLB que poderia ser detectada para as condições estabelecidas no presente trabalho foi de 0,20  $\mu\text{g/mL}$ . E a menor quantidade de GLB que poderia ser determinada com precisão aceitável sob as condições estabelecidas é de 0,60  $\mu\text{g/mL}$ .

Baseando-se no LQ determinado, pode-se explicar o elevado valor de DPR encontrado para o teste de precisão de injeção para a concentração de 0,64  $\mu\text{g/mL}$ , apresentado anteriormente.

#### 2.1.6.4 Curvas padrão

Na Tabela 9 encontram-se os dados de coeficiente angular e de determinação das curvas padrão obtidas ao longo do trabalho em diferentes meios.

Tabela 9 – Coeficiente angular e coeficiente de determinação das curvas padrão obtidas ao longo do trabalho quando da utilização dos diferentes meios nos ensaios de dissolução e no preparo das soluções padrão.

Meios	b	r <sup>2</sup>
Tampão pH 4,5 + poli 80 1%	69198 77497	0,9968 0,9892
Tampão pH 5,5 + poli 80 0,1%	70698	0,9984
Tampão pH 5,5 + poli 80 1%	71301 73205	0,9966 0,9988
Tampão pH 5,5 + LSS 0,1%	72144 64895	0,9983 0,9994
Tampão pH 5,5 + LSS 1%	74375 72840	0,9996 0,9990
SES sem adição de tensoativo	71502 73299	0,9999 0,9996
SES + poli 80 0,1%	76792 74420	0,9994 0,9999
SES + poli 80 1%	76658 73736	0,9999 0,9949
SES + LSS 0,1%	73983 73736	0,9996 1,0000
SES + LSS 1%	76477 73529	0,9997 1,0000

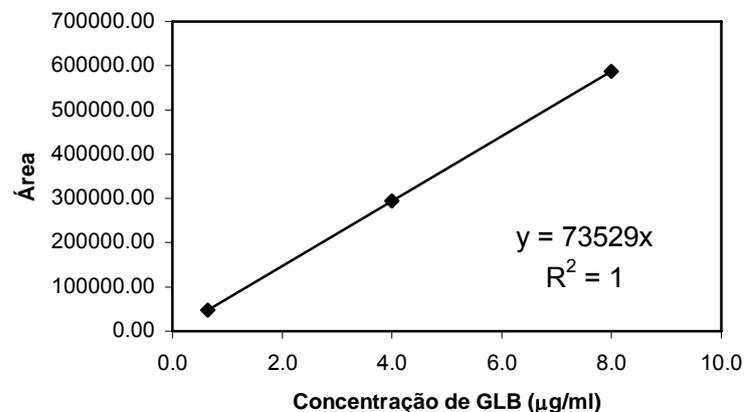


Figura 11 – Ilustração da curva padrão de GLB em meio de dissolução SES + LSS 1% (p/V).

### 3 Caracterização da matéria-prima

A matéria-prima foi aprovada nos testes de identificação e doseamento. O espectro no infravermelho para a matéria-prima e a substância química de referência encontra-se no Anexo 3.

O teor encontrado para a matéria-prima foi de 99,89%.

### 4 Caracterização dos Comprimidos de GLB

Os medicamentos, referência e teste, foram aprovados nos testes de caracterização de comprimidos, como apresentado a seguir.

#### 4.1 Determinação de peso e peso médio

Os resultados, encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10 – Peso médio e valores mínimos e máximos encontrados nas amostras dos comprimidos

Medicamento	Especificação geral (pm $\pm$ 7,5%)	Resultados
Referência	Entre 149,89 e 174,89 mg	Média = 162,05 mg Min = 157,20 mg Máx = 169,0 mg
Teste	Entre 149,34 e 173,55 mg	Média = 161,44 mg Min = 149,40 mg Máx = 172,40 mg

pm = peso médio

## 4.2 Uniformidade de conteúdo

A especificação geral para uniformidade de conteúdo (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1996) preconiza que o teor realizado para cada comprimido esteja compreendido na faixa de 85,0% a 115,0% e o DPR entre os resultados deve ser inferior a 6,0%.

Os resultados encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11 - Resultados obtidos no teste de uniformidade de conteúdo

Medicamentos	Resultados
Referência	Máx = 100,12 Mín = 86,31 DPR = 4,12%
Teste	Máx = 101,89 Mín = 95,94 DPR = 2,07%

## 4.3 Dureza

Seguindo a especificação, o valor mínimo para dureza é de 45 N. (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988c)

Os resultados, encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12 – Resultados obtidos no teste de dureza

Medicamentos	Resultados
Referência	Média = 314,4 N Min = 263 N Máx = 358 N
Teste	Média = 81,6 N Min = 67 N Máx = 99 N

#### 4.4 Friabilidade

De acordo com compêndio oficial nacional, para o ensaio de friabilidade, é permitida uma perda de peso de 1,5%. (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988c)

Os resultados, encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13 - Resultados obtidos no teste de friabilidade

Medicamentos	Resultados
Referência	0,35%
Teste	0,44%

#### 4.5 Desintegração

De acordo com as especificações, os comprimidos de GLB, deveriam desintegrar-se no máximo em 15 minutos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988d). O medicamento referência levou 2 minutos e o genérico, 9 minutos para a desintegração total.

#### 4.6 Doseamento

De acordo com especificação oficial, os comprimidos de GLB devem conter, no mínimo, 90,0% e, no máximo, 110,0%, da quantidade declarada de ativo. (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2001)

Para o medicamento referência, o teor encontrado foi de 101,17% e para o medicamento teste, 96,39%.

## 5 Determinação do perfil de dissolução dos comprimidos de GLB

Na determinação do perfil de dissolução, os meios testados foram: SES sem adição de tensoativo e adicionado de Poli 80 e LSS nas concentrações de 0,1% (p/V) e 1% (p/V), tampão acetato pH 4,5 com Poli 80 1% (p/V) e tampão acetato pH 5,5 com Poli 80 e LSS nas concentrações de 0,1% (p/V) e 1% (p/V). Entre as condições sugeridas na literatura, o tampão borato pH 9,5, foi testado. Todos os meios foram avaliados para o medicamento referência e teste.

Por meio da Figura 12, observa-se que o maior percentual de ativo dissolvido foi alcançado no meio tampão pH 5,5 contendo 1% de tensoativo, embora não tenha ultrapassado 75% do declarado. Tanto na concentração de 0,1% quanto 1%, o medicamento referência, apresentou um maior percentual dissolvido durante as 3 horas de teste. Para a concentração de 0,1% de Poli 80, percebe-se que a dissolução dos comprimidos, principalmente para o referência, permanece em torno de 20%.

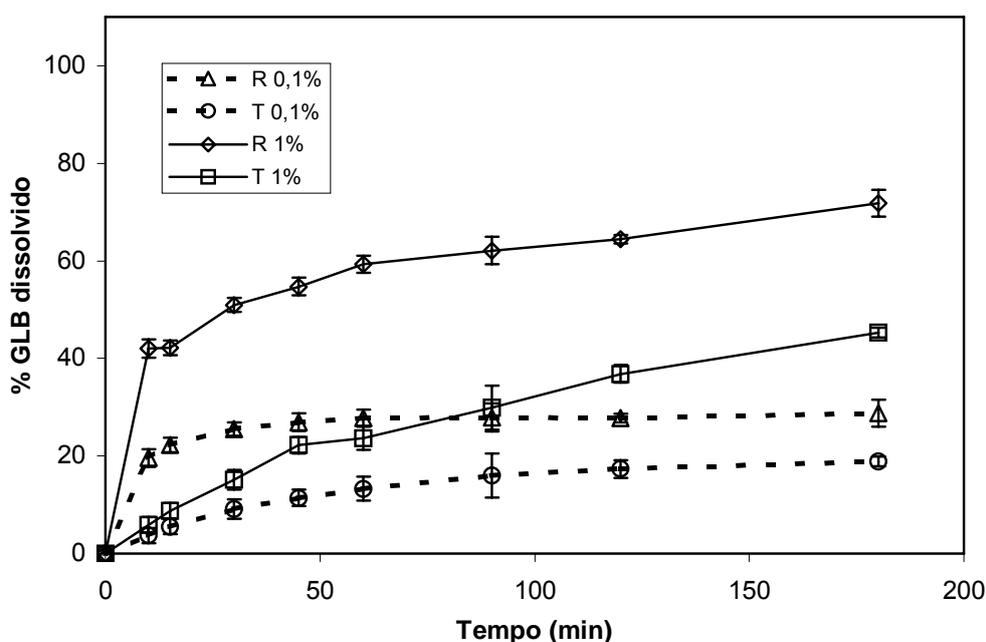


Figura 12 – Perfis de dissolução da GLB dos comprimidos referência (R) e teste (T) em meio tampão acetato pH 5,5 adicionado de Poli 80 0,1% e 1% (p/V). (valores médios  $\pm$  dp; n = 6).

Assim como para o tensoativo Poli 80, observamos na Figura 13, que o maior percentual dissolvido foi obtido para a concentração de 1% de LSS. Nessas condições, a liberação do ativo atingiu em 60 minutos o superior a 90% de dissolução para o medicamento referência, sendo que no primeiro ponto de coleta, 10 minutos, tal valor era maior que 70%.

Na concentração de 0,1% de LSS, a liberação se deu de forma mais gradativa, em 60 minutos, o referência havia liberado, aproximadamente, 54%, atingindo no final das 3 horas, aproximadamente, 65%.

Analisando as Figuras 12 e 13, nota-se que o LSS promoveu maior liberação de GLB tanto do medicamento referência quanto do teste, comparando-se com o Poli 80 quando em concentrações iguais, em pH 5,5.

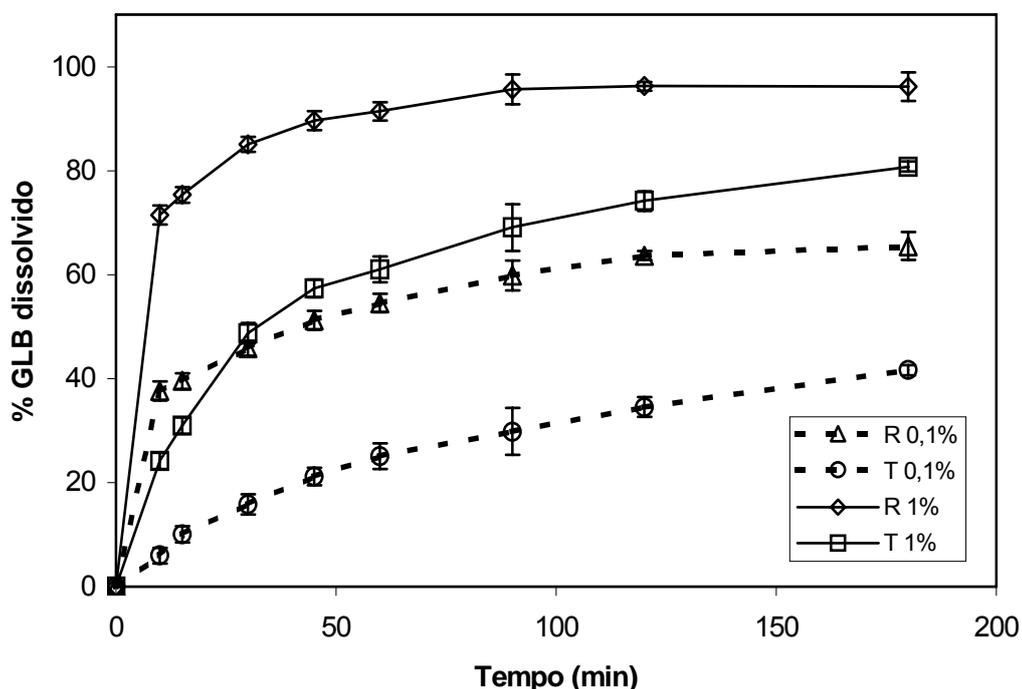


Figura 13 - Perfis de dissolução da GLB dos comprimidos referência (R) e teste (T) em meio tampão acetato pH 5,5 adicionado de LSS 0,1% e 1% (p/V) (valores médios  $\pm$  dp; n=6).

A Figura 14, demonstra o comportamento dos medicamentos no meio SES na presença do tensoativo Poli 80. Na concentração de 0,1% a liberação do ativo foi mais lenta para ambas formulações. Adicionando 1% de Poli 80, a dissolução atinge 70,45% em 10 minutos para o medicamento referência que ao final dos 180 minutos, dissolveu-se totalmente.

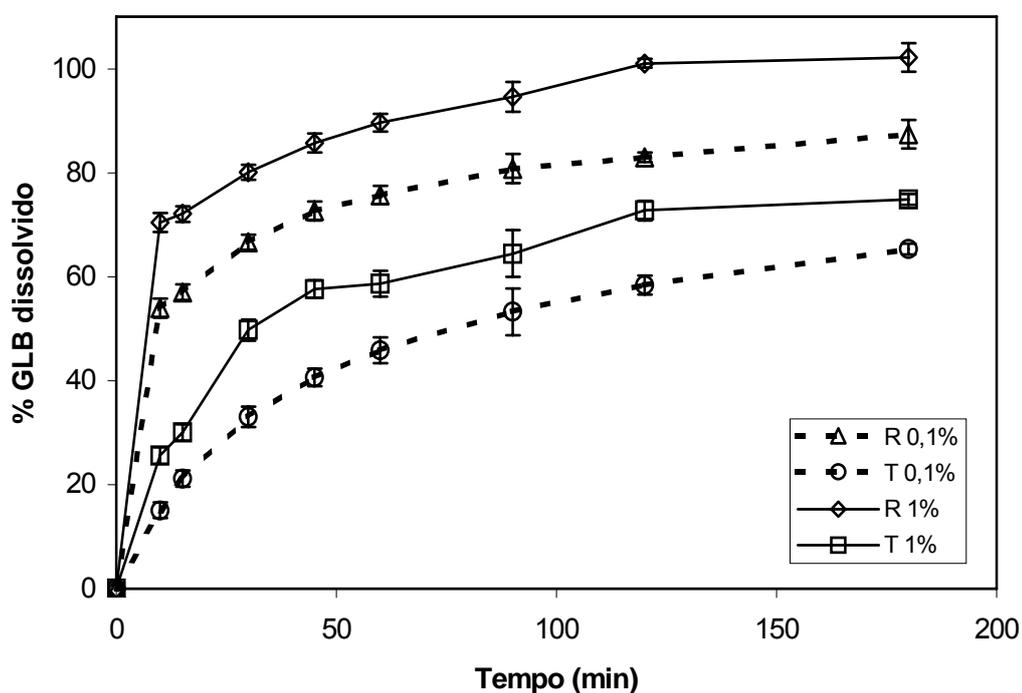


Figura 14 - Perfis de dissolução da GLB dos comprimidos referência (R) e teste (T) em meio SES adicionado de Poli 80 0,1% e 1% (p/V) (valores médios  $\pm$  dp; n= 6).

De forma semelhante aos resultados obtidos com Poli 80, nos meios SES contendo LSS, a dissolução foi mais gradativa com a formulação teste (Figura 15). Analisando a concentração de 1% de LSS, nos primeiros 10 minutos, o referência havia liberado o superior a 75% de GLB.

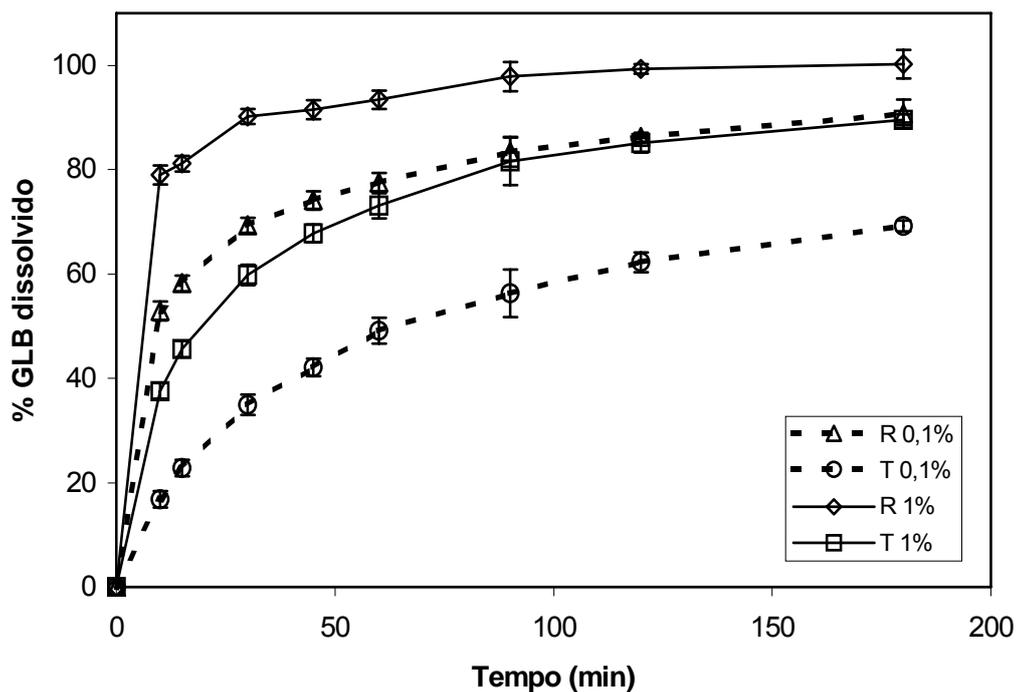


Figura 15 - Perfis de dissolução da GLB dos comprimidos referência (R) e teste (T) em meio SES adicionado de LSS 0,1% e 1% (p/V) (valores médios  $\pm$  dp; n = 6).

No meio SES, sem a adição de tensoativo, de modo semelhante ao comportamento da formulação teste e ao contrário dos meios adicionados de surfactante, o medicamento referência apresentou uma liberação mais gradativa nos primeiros pontos de coleta (Figura 16). Nessas condições, o máximo dissolvido foi 76,74% para o referência e 50,96% para o teste.

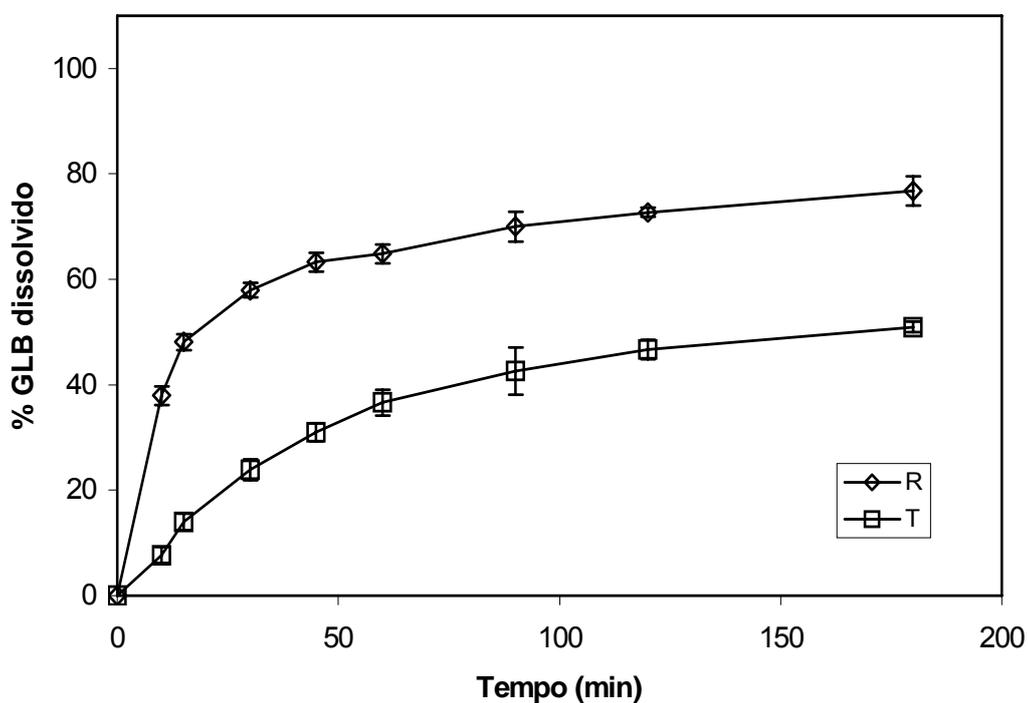


Figura 16 - Perfis de dissolução da GLB dos comprimidos referência (R) e teste (T) em SES sem adição de tensoativo (valores médios  $\pm$  dp; n = 6).

Em tampão acetato pH 4,5 com Poli 80 1% as formulações atingiram baixos percentuais dissolvidos, principalmente o medicamento teste que em 15 minutos, não liberou 5% de GLB e em 180 minutos não ultrapassou 33% de fármaco dissolvido.

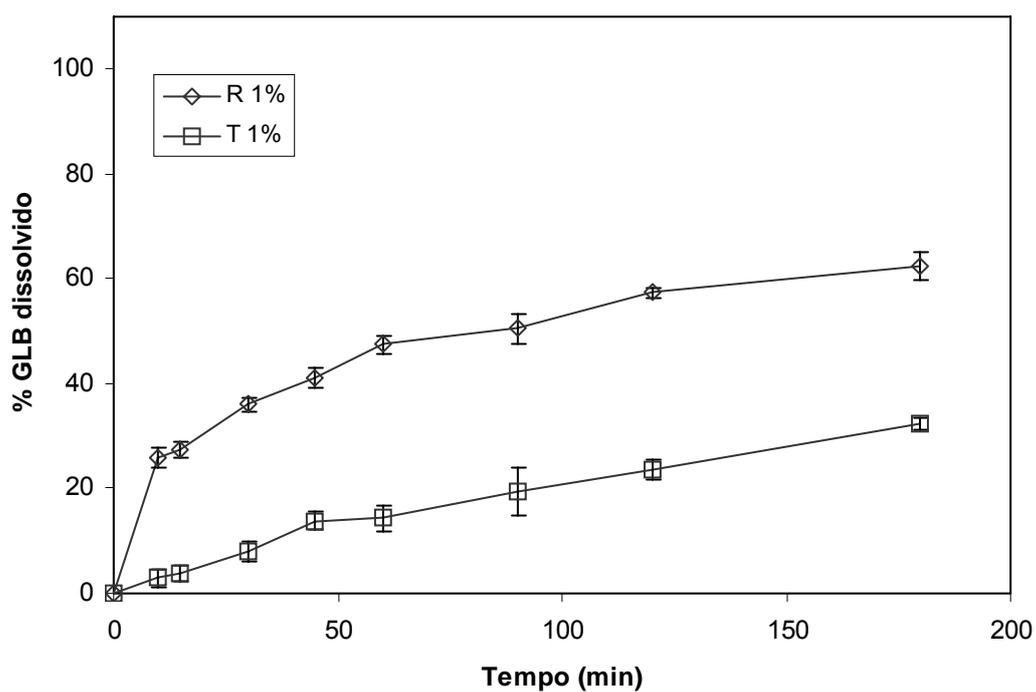


Figura 17 - Perfis de dissolução da GLB dos comprimidos referência (R) e teste (T) em tampão acetato pH 4,5 adicionado de Poli 80 1% (valores médios  $\pm$  dp; n = 6).

Diferente de todas as outras condições testadas anteriormente, em pH elevado (meio tampão borato pH 9,5), as formulações apresentaram percentuais dissolvidos semelhantes em praticamente todos os pontos (Figura 18). Esta foi a única condição em que o medicamento teste atingiu 100% de liberação de GLB. O mesmo percentual foi obtido para o referênciã no primeiro ponto de coleta.

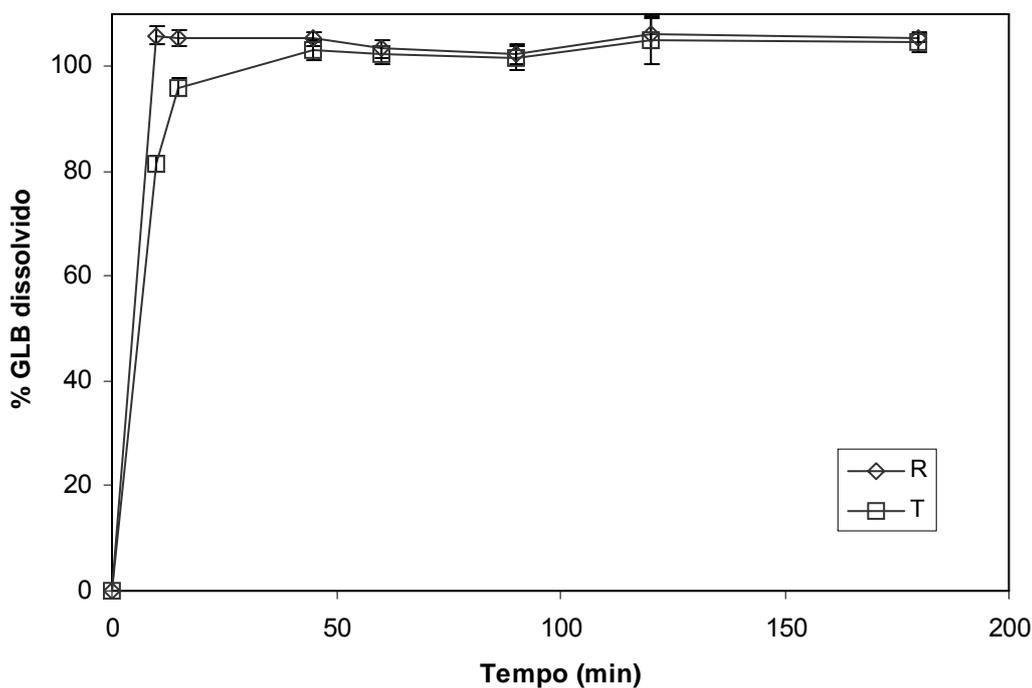


Figura 18 – Perfil de dissolução de GLB dos comprimidos referênciã (R) e teste (T) em meio tampão borato pH 9,5 sem adição de tensoativo (valores médios  $\pm$  dp; n = 6).

### 5.1 Comparação entre os perfis de dissolução

Para expressar matematicamente as diferenças entre os perfis de dissolução obtidos, utilizamos como ferramenta os fatores  $f_1$  e  $f_2$ , denominados, fator de diferença e semelhança, respectivamente (Tabela 14).

Tabela 14: Valores de  $f_1$  e  $f_2$  para os diferentes meios analisados.

Meio		$f_1$	$f_2$
pH 4,5	Poli 80 1%	64,24	27,76
	Poli 80 0,1%	51,00	44,27
pH 5,5	Poli 80 1%	55,15	26,10
	LSS 0,1%	53,15	28,36
	LSS 1%	32,94	26,94
SES	Sem tensoativo	45,83	27,66
	Poli 80 0,1%	39,28	27,79
	Poli 80 1%	34,73	26,61
	LSS 0,1%	37,61	28,02
	LSS 1%	23,12	33,23

$f_1$  = fator de diferença, deve estar compreendido entre 0 – 15%

$f_2$  = fator de semelhança, deve estar compreendido entre 50 – 100%

Analisando os dados apresentados na Tabela 14, podemos observar que de acordo com o modelo matemático aplicado <sup>(1)</sup>, todos os meios apresentaram valores fora do limite especificado tanto para  $f_1$  quanto para  $f_2$ .

<sup>(1)</sup> Os fatores  $f_1$  e  $f_2$  foram calculados de acordo com as fórmulas (CDER/FDA, 1997):

$$f_1 = \left\{ \frac{[\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|]}{[\sum_{t=1}^n R_t]} \right\} \cdot 100$$

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \cdot 100 \right\}$$

## 6 Estabelecimento da correlação *in vivo/in vitro*

De posse dos dados *in vivo*, seguiu-se a modelização da curva concentração plasmática de GLB *versus* tempo através do *software WinNoLin Professional*, versão 3.0 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA).

A modelização dos dados não foi conclusiva quanto ao modelo farmacocinético que o fármaco segue (um ou dois compartimentos). Porém, baseando-se na literatura (SHARGEL & YU, 1999d), foi testado o método de Wagner-Nelson para fármacos que possuem a farmacocinética de um compartimento, pois de acordo com a teoria, tal método é freqüentemente usado mesmo para substâncias que não seguem tal modelo, pois os desvios são menos significativos.

Após a realização dos cálculos de fração absorvida através do programa Excel® (MICROSOFT, 2002), a tentativa de correlação nível A não foi realizada, pois os resultados encontrados não foram satisfatórios, optando-se somente pela correlação C múltiplo.

O dado farmacocinético escolhido para correlacionarmos com o percentual dissolvido foi ASC, parâmetro representativo da quantidade de fármaco absorvido (SHARGEL & YU, 1999c).

Todos os perfis obtidos nos testes de dissolução foram utilizados na construção da correlação *in vivo/in vitro*, apresentada nas Figuras 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28.

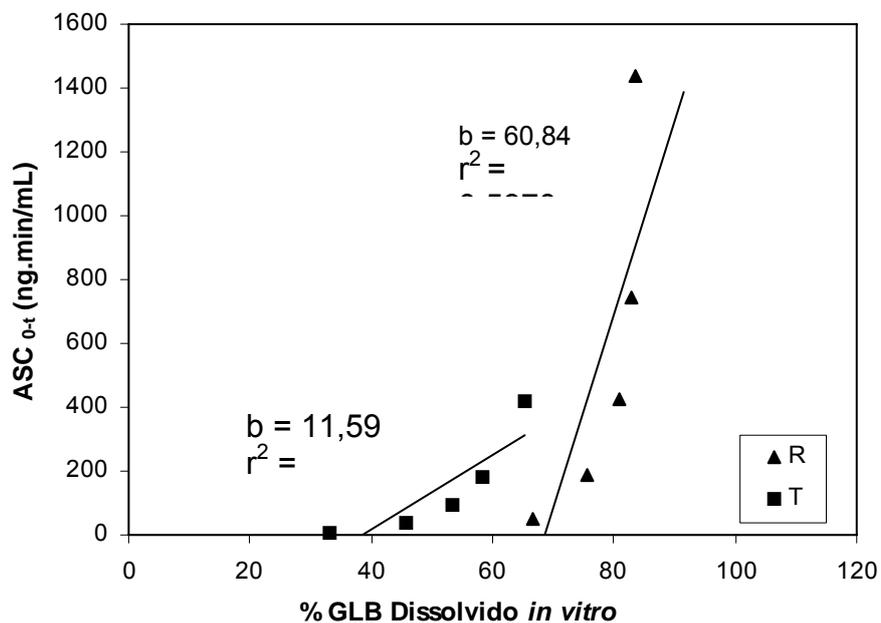


Figura 19 – Correlação da ASC conc. plasmática *versus* tempo e o % de dissolução de GLB obtido no meio SES + Poli 80 0,1% (p/V) ( $b$  = inclinação e  $r^2$  = coeficiente de determinação).

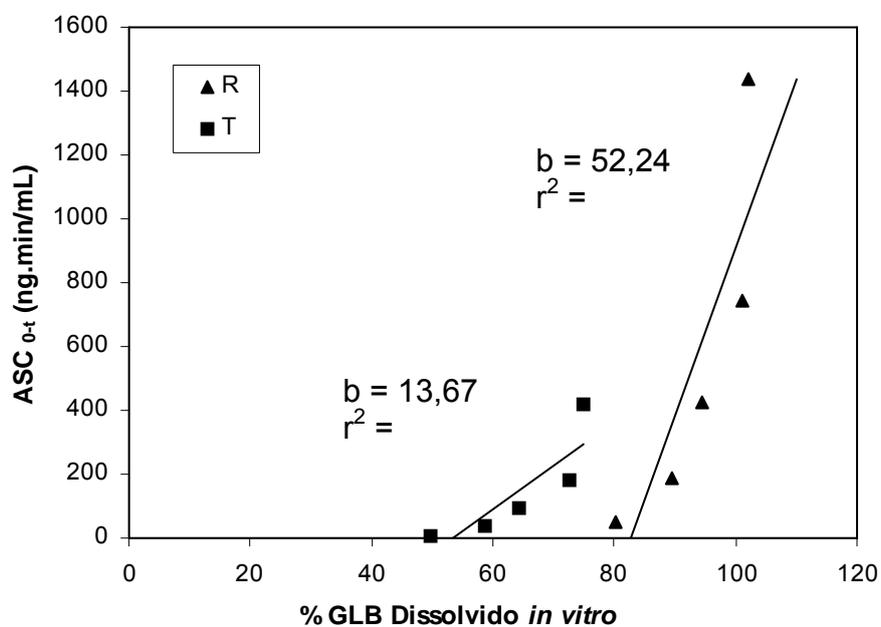


Figura20 – Correlação da ASC conc. plasmática *versus* tempo e o % de dissolução de GLB obtido no meio SES + Poli 80 1% (p/V) ( $b$  = inclinação e  $r^2$  = coeficiente de determinação).

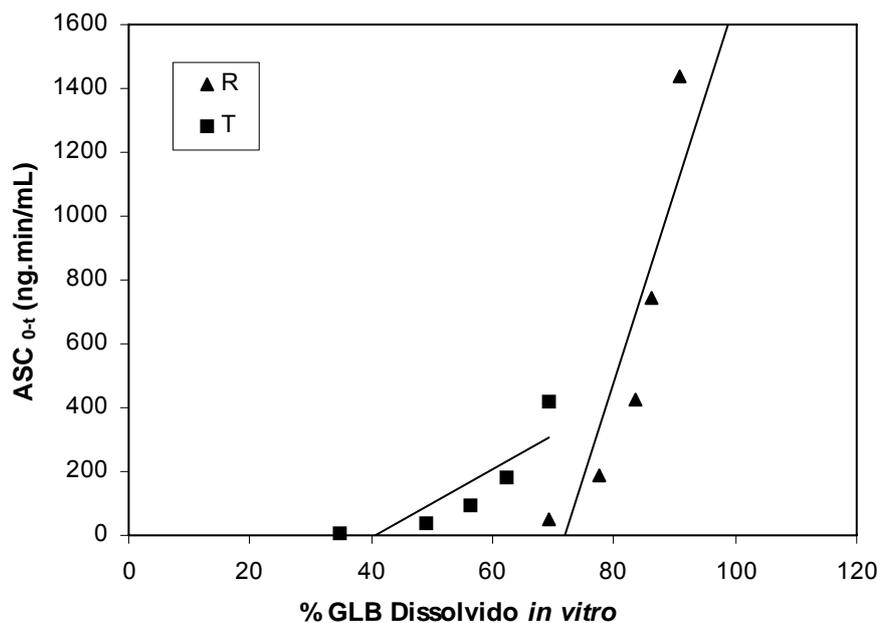


Figura 21 – Correlação da ASC conc. plasmática *versus* tempo e o % de dissolução de GLB obtido no meio SES + LSS 0,1% (p/V) ( $b$  = inclinação e  $r^2$  = coeficiente de determinação).

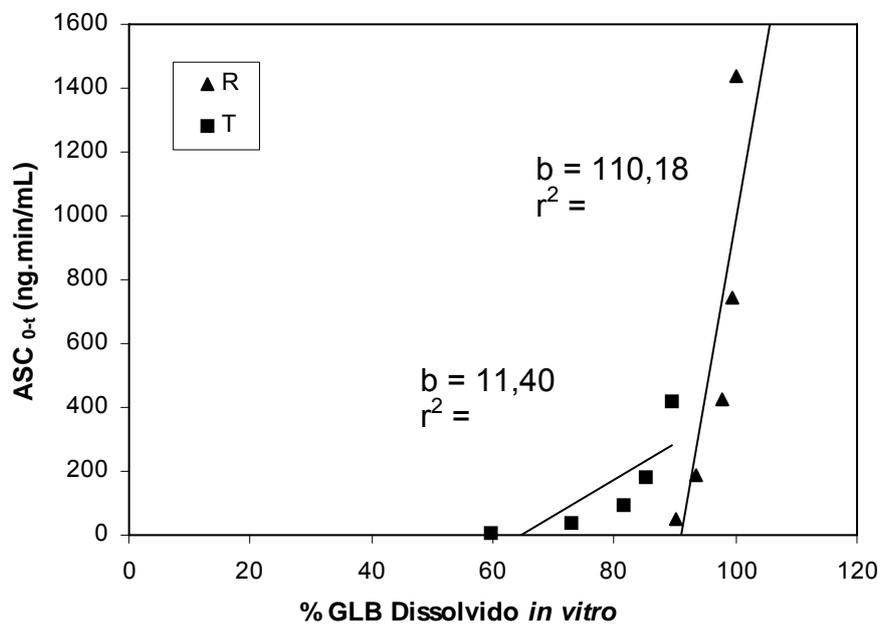


Figura 22 – Correlação da ASC conc. plasmática *versus* tempo e o % de dissolução de GLB obtido no meio SES + LSS 1% (p/V) ( $b$  = inclinação e  $r^2$  = coeficiente de determinação).

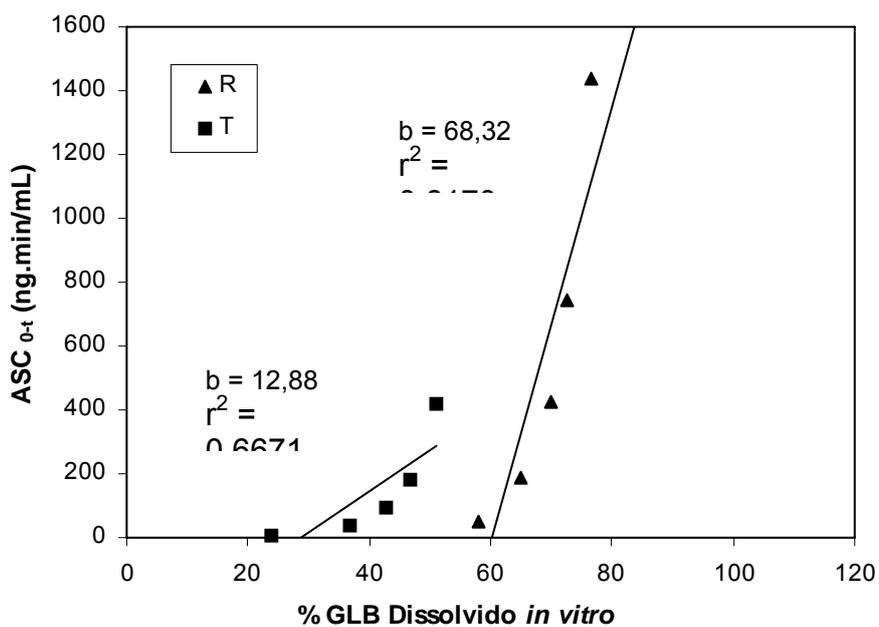


Figura 23 – Correlação da ASC conc. plasmática *versus* tempo e o % de dissolução de GLB obtido no meio SES sem adição de tensoativo ( $b$  = inclinação e  $r^2$  = coeficiente de determinação).

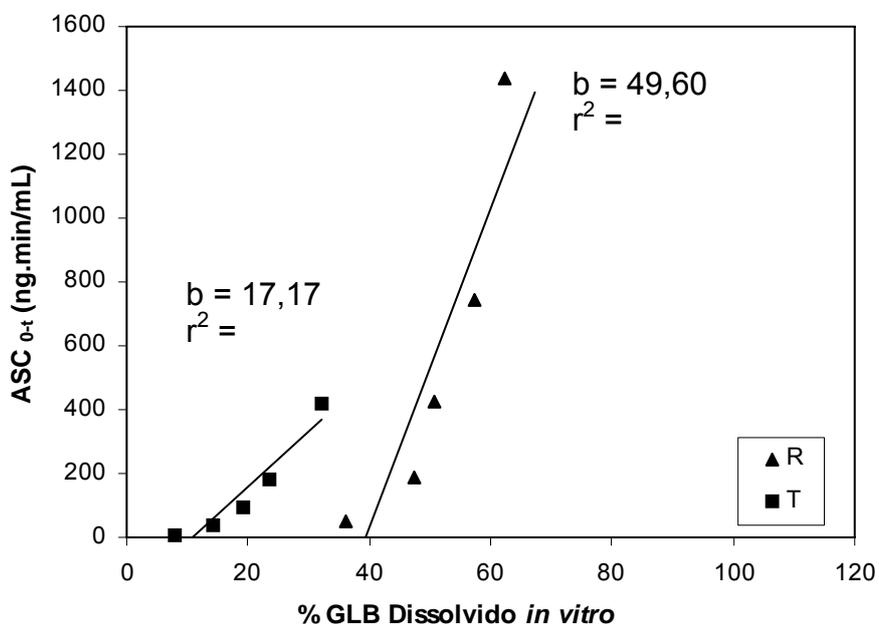


Figura 24 – Correlação da ASC conc. plasmática *versus* tempo e o % de dissolução de GLB obtido no meio tampão acetato pH 4,5 + Poli 80 1% (p/V) ( $b$  = inclinação e  $r^2$  = coeficiente de determinação).

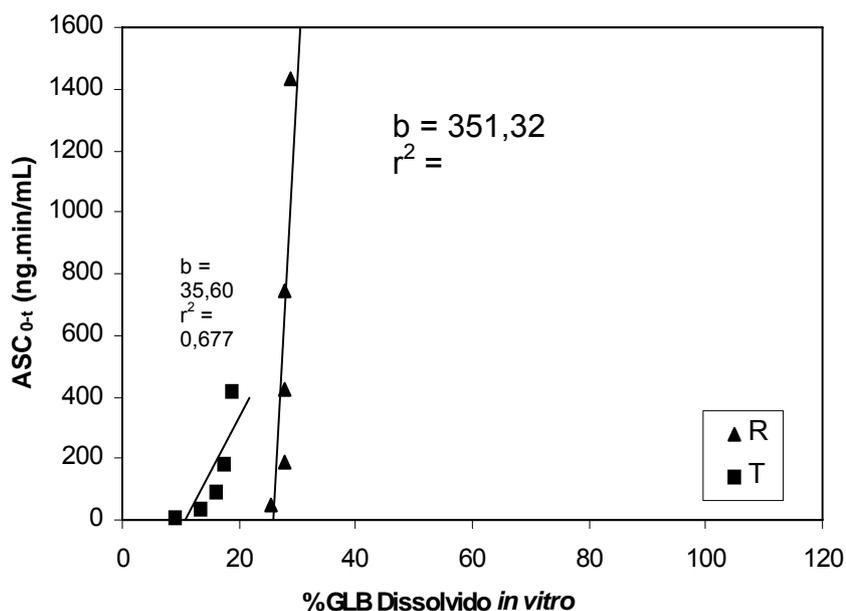


Figura 25 – Correlação da ASC conc. plasmática *versus* tempo e o % de dissolução de GLB obtido no meio tampão acetato pH 5,5 + Poli 80 0,1% (p/V) ( $b$  = inclinação e  $r^2$  = coeficiente de determinação).

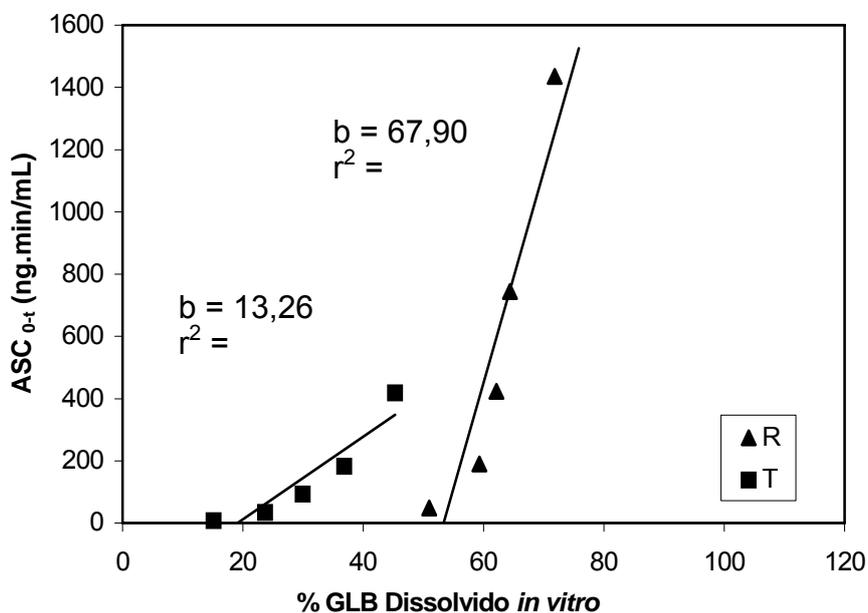


Figura 26 – Correlação da ASC conc. plasmática *versus* tempo e o % de dissolução de GLB obtido no meio tampão acetato pH 5,5 + Poli 80 1% (p/V) ( $b$  = inclinação e  $r^2$  = coeficiente de determinação).

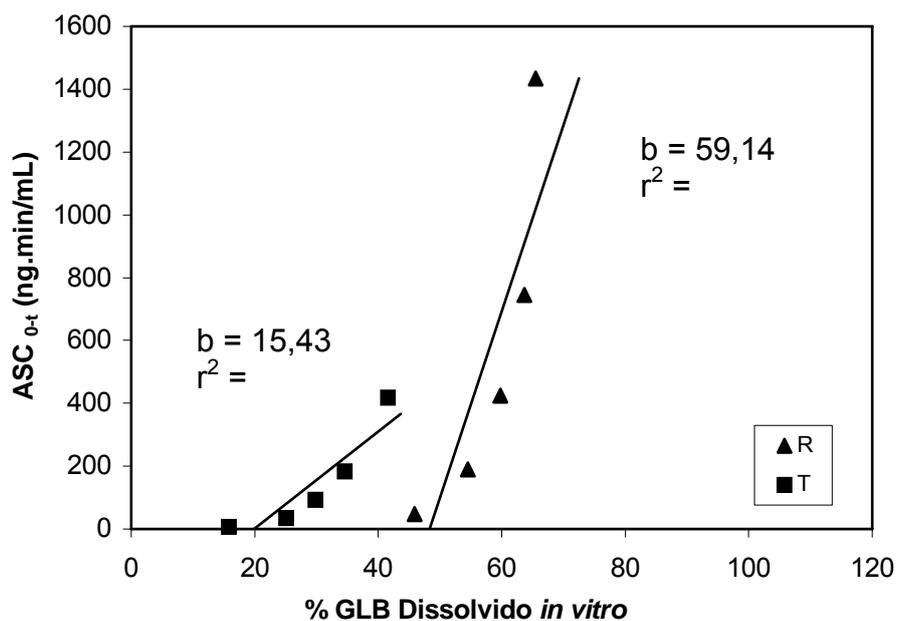


Figura 27 – Correlação da ASC conc. plasmática *versus* tempo e o % de dissolução de GLB obtido no meio tampão acetato pH 5,5 + LSS 0,1% (p/V) ( $b$  = inclinação e  $r^2$  = coeficiente de determinação).

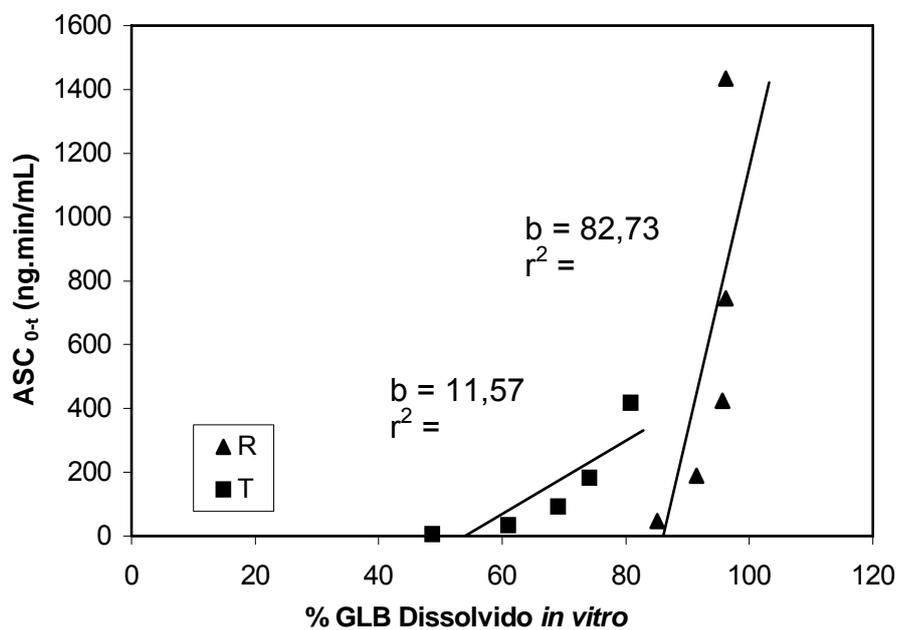


Figura 28 – Correlação da ASC conc. plasmática *versus* tempo e o % de dissolução de GLB obtido no meio tampão acetato pH 5,5 + LSS 1% (p/V) ( $b$  = inclinação e  $r^2$  = coeficiente de determinação).

## **DISCUSSÃO**

## DISCUSSÃO

O teste de dissolução é uma ferramenta largamente empregada pelo controle de qualidade na avaliação rotineira das formulações, sendo de grande utilidade ao setor de desenvolvimento de novas formas farmacêuticas como um indicador da BD do fármaco *in vivo*. Porém, para alguns fármacos, as condições para o teste *in vitro* ainda não são bem definidas, portanto não constam nos compêndios oficiais.

Esse é o caso da GLB, fármaco cuja forma de dosagem comprimidos não possui metodologia de dissolução farmacopéica, portanto surgiu o interesse em propor condições de dissolução para tal medicamento, baseando-se em resultados obtidos com a correlação dos dados *in vivo/in vitro*.

Lindenberg, Kopp & Dressman (2004) classificaram em seu trabalho a GLB como sendo um fármaco classe II ou IV, de acordo com o SCB, porém adotaremos a postura daqueles que consideram a GLB apenas como fármaco classe II.

De acordo com os conceitos descritos por Amidon (1995), um fármaco da classe II apresenta baixa solubilidade e alta permeabilidade. Dessa forma, a dissolução para a GLB pode ser considerada como o passo limitante para que a molécula seja absorvida e possa exercer a função hipoglicemiante. Assim, uma variedade de fatores como a presença de tensoativos, pH do meio, capacidade tampão, força iônica e volume do meio podem alterar drasticamente o comportamento das formulações *in vitro*. Diversos trabalhos exploram esses fatores e suas conseqüências, como Galia *et al.* (1998), que avaliaram diferentes meios de dissolução com intuito de predizer a performance *in vivo* de diversas substâncias designadas da classe II, concluindo que as condições mais próximas à fisiológica são aquelas que fornecem informações mais condizentes com o comportamento *in vivo*.

Acreditando que de fato as condições fisiológicas são as mais adequadas ao teste de dissolução, foram selecionados meios cujos valores de pH estavam englobados na faixa 1,0 – 6,8 (CDER/FDA, 1997), iniciando o estudo através do teste de solubilidade da substância.

De acordo com as recomendações do CDER (2000), o número de condições a serem testadas depende das características de ionização da substância, se o pKa estiver compreendido entre 3 – 5, podendo se aplicado à GLB, a solubilidade pode ser determinada num pH = pKa, pH = pKa ± 1 e também em pH = 1 e 7,5.

Sendo um ácido fraco de pKa 5,3 e de baixa solubilidade em meios aquosos, foram descartados os testes com pH muito baixo, como pH = 1, pois tal condição não favoreceria a dissolução, assim foram selecionados pH 4,5, pH 5,5 e pH 6,8, este último descrito como SES (THE UNITED, 2004c).

O uso de tensoativos nos meios, agindo como promotores de dissolução, é descrito por diversos autores. Dressman & Reppas (2000) discutem o efeito do surfactante no meio de dissolução referenciando o trabalho de Galia *et al.* (1998) em que formulações de albendazol foram avaliadas na presença e ausência de tensoativos e, assim como Löbenberg *et al.* (2000), os autores concluem a importância dos promotores na solubilidade dos fármacos pouco solúveis, porém seus trabalhos sugerem o uso de tensoativos endógenos como meios biorrelevantes, apontando que essas condições refletiriam melhor o comportamento *in vivo* das formulações.

De acordo com Löbenberg *et al.* (2000), os melhores meios para discriminar as formulações de GLB empregadas em seu trabalho, foram aqueles que continham lecitina e taurocolato de sódio. Porém, tais tensoativos são custosos ao desenvolvimento das análises e também acredita-se que surfactantes sintéticos

como Poli 80, quando empregados em concentrações adequadas, podem refletir com sucesso o meio fisiológico.

Os dados apresentados na Tabela 4, demonstram a influência dos tensoativos Poli 80 e LSS em meios de diferentes pH na promoção da solubilidade. O maior poder de solubilização do LSS pode ser evidenciado pelos maiores valores de Cs de GLB quando esse foi empregado.

De modo similar, Löbenberg *et al.* (2000), em seus estudos, demonstraram um aumento na solubilidade da griseofulvina em meio contendo LSS de até 150 vezes quando comparado com o meio contendo simplesmente água. Assim como, Silva & Volpato (2002) que na determinação do perfil de dissolução de comprimidos de Nimesulida observaram que altas concentrações de tensoativos, entre eles LSS, poderiam superestimar a liberação e dissolução do fármaco *in vivo*.

Outros pesquisadores estudaram a influência dos tensoativos na solubilização de substâncias. El-Massik *et al.* (1996) com o objetivo de propor um meio de dissolução para formulações de GLB, testaram diferentes combinações de pH com Poli 80 e etanol, ambos em diferentes concentrações. Embora os autores tenham utilizado também etanol, observa-se tanto pelos seus resultados, como pelos apresentados na Figura 6, que o poder solubilizante dos tensoativos LSS e Poli 80, variavam de acordo com o pH do meio.

Portanto é interessante analisarmos o efeito combinado do pH e surfactante na solubilização da GLB. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4, os menores valores de Cs são para o pH 4,5 e para as menores concentrações de tensoativo. Tal fato já era esperado, pois nesse pH a GLB encontra-se quase 100% não-ionizada, o que dificulta sua solubilização, ao contrário, em pH superior ao pKa as moléculas encontram-se ionizadas, facilitando a dissolução (JINNO *et al.* 2000).

Para discutirmos os efeitos do pH juntamente com o tensoativo, foram apresentados na Tabela 5 dados que demonstram a promoção da solubilidade da GLB nos diferentes meios utilizados. Esses dados foram também expressos graficamente.

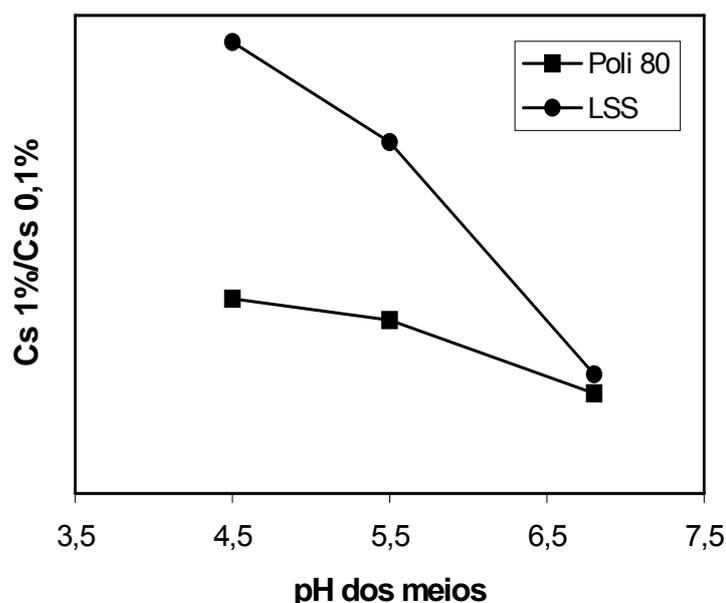


Figura 29 – Promoção da solubilidade da GLB nos meios de dissolução contendo Poli 80 e LSS expressos como razão entre as concentrações de saturação do fármaco.

Analisando a Figura 29, percebe-se que a influência do surfactante é muito mais importante para os menores valores de pH, pois no meio tampão acetato pH 4,5, além das razões de Cs serem maiores do que as encontradas para pH 5,5 e 6,8, o LSS, reconhecido pelo seu poder detergente superior ao do Poli 80, tem seu efeito drasticamente reduzido em pH 6,8. Logo, pode-se concluir que com o aumento do pH, o surfactante exerceu menor efeito na solubilização da GLB e seu impacto foi, principalmente, na solubilização das espécies não-ionizadas, levando-nos a acreditar que as concentrações máximas atingidas para a solubilidade da GLB nos testes de solubilidade e dissolução, deveram-se, principalmente ao pH. Tal fato pode

ser exemplificado com o meio SES sem tensoativo que nos perfis de dissolução para ambos medicamentos atingiu percentuais dissolvidos maiores que os meios pH 4,5 e 5,5 adicionados de Poli 80 e LSS, com exceção do pH 5,5 com LSS 1%, o qual apresentou a maior  $C_s$  para GLB.

De forma semelhante, Löbenberg & Amidon (2000) discutiram a influência de ambos fatores (pH e tensoativo) na solubilização do piroxicam, concluindo que o aumento na dissolução deveu-se muito mais ao aumento de pH do que ao efeito do surfactante, porém os autores afirmam que há uma resposta conjunta. Isso também pôde ser comprovado na dissolução da GLB.

Na Figura 30, fixamos o pH do meio em 6,8 e comparamos os diferentes perfis de dissolução do medicamento referência à medida em que eram adicionados os tensoativos Poli 80 e LSS nas concentrações de 0,1% e 1% .

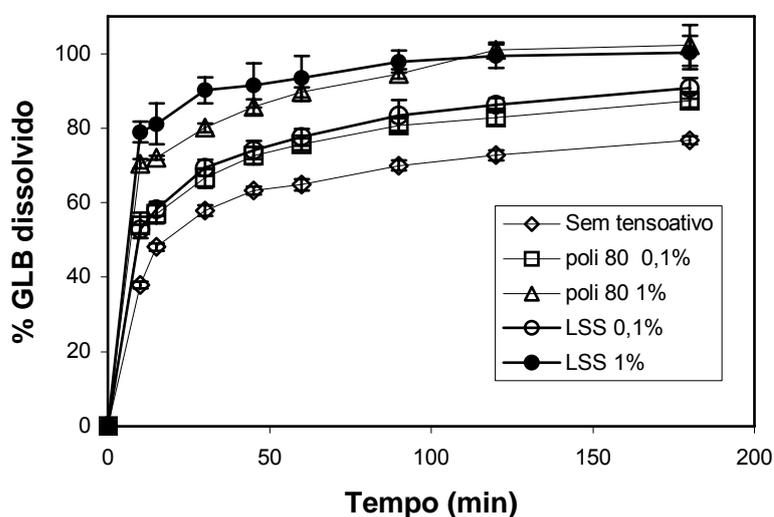


Figura 30 – Perfis de dissolução da GLB do comprimido referência em meio SES na ausência de tensoativo e adicionado dos tensoativos Poli 80 e LSS nas concentrações de 0,1% e 1% (p/V) (valores médios  $\pm$  dp, n=6).

Analisando os diferentes perfis de dissolução da GLB do comprimido referência, percebe-se um aumento na quantidade de fármaco dissolvido quando adicionados os tensoativos, o que pode confirmar sua contribuição à solubilização do fármaco que se mostrou superior nas maiores concentrações de surfactante (1%). Situação semelhante foi encontrada para a formulação teste, porém com menores valores percentuais globais dissolvidos de GLB.

Quanto a maior influência do pH na dissolução da GLB discutida acima, este efeito pode ser evidenciado, fixando o tensoativo e a concentração utilizada e variando os valores de pH dos meios.

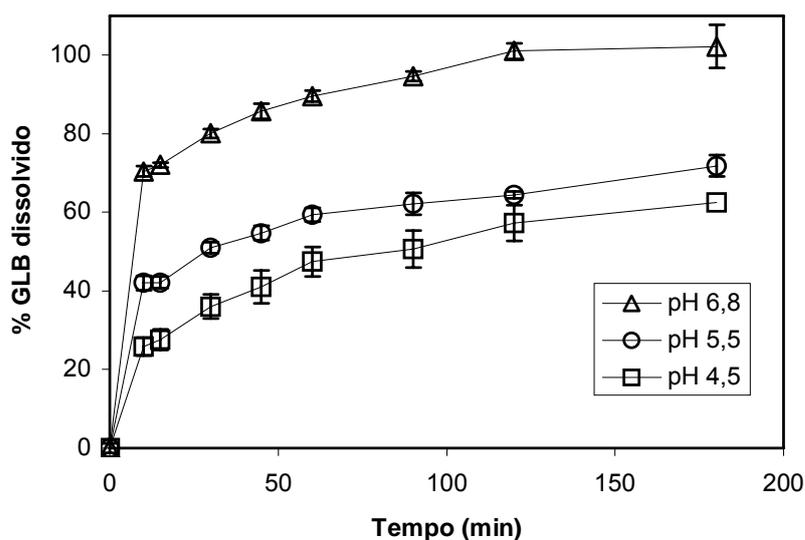


Figura 31: Perfis de dissolução da GLB do comprimido referência nos meios SES, tampão acetato pH 5,5 e tampão acetato pH 4,5 adicionados de Poli 80 na concentração de 1% (p/V) (valores médios  $\pm$  dp, n=6).

Analisando os perfis de dissolução da GLB dos comprimidos referência para meios contendo o mesmo tensoativo na mesma concentração, fica evidenciado que o maior percentual dissolvido foi para o pH 6,8 e mesmo em pH 4,5 onde haveria mais influência do surfactante, este não foi suficiente para promover dissolução da

GLB. As mesmas conclusões podem ser obtidas quando analisados os perfis do medicamento teste, porém menores percentuais dissolvidos foram alcançados.

Face ao apresentado e discutido anteriormente, vários métodos de dissolução descrevem condições em que os meios empregados apresentam elevado valor de pH (algumas vezes superior a faixa recomendada) e/ou tensoativos em altas concentrações. Para a própria GLB, na USP 23 – NF 18 (1995) foi proposto o meio tampão borato pH 9,5 para o teste de dissolução, embora tal meio tenha sido retirado do compêndio nas edições posteriores e contestado por outros autores como, EL – Massik *et al.* (1996). A utilização dessas condições, é um ótimo exemplo da influência do pH na dissolução e ainda, demonstra que garantir a solubilização de uma formulação em um meio não é, necessariamente, reflexo do comportamento dessa forma farmacêutica *in vivo*.

Condições aceleradas de dissolução que podem ser obtidas com tensoativo em concentrações elevadas, excesso na velocidade de rotação do aparato e outros, além de pH elevado (no caso de ácidos fracos), podem não distinguir a dissolução e GLB em formulações diferentes. Na Figura 18, foi apresentado o perfil de dissolução no meio tampão borato pH 9,5 para as formulações de GLB, que *in vivo* não foram bioequivalentes. Nessas condições elas seriam consideradas semelhantes, e a formulação teste reprovada no estudo de BD, teria alcançado, tranqüilamente, 100% de dissolução.

Vários trabalhos questionam métodos de dissolução de medicamentos, alguns farmacopéicos. Swanepoel, Liebenberg & Villiers (2003), após identificar e caracterizar três formas polimórficas para o mebendazol, tendo apenas um polimorfo características terapêuticas, testaram um método de dissolução que se mostrou insatisfatório para distinguir entre as propriedades de dissolução dos polimorfos.

Quando os produtos foram novamente testados, porém sem a presença do LSS no meio de dissolução, a distinção foi possível. Da mesma forma, Volpato *et al.* (2004) compararam os perfis de dissolução de comprimidos de levotiroxina obtidos quando empregadas as condições propostas na USP 24 (2000) e as condições reformuladas na USP 26 (2003). Os resultados demonstraram que o método da USP 24 apresentava um maior poder discriminatório entre as formulações, dado comprovado através do estabelecimento de uma CIVIV.

Outros pesquisadores também buscam condições capazes de identificar as possíveis diferenças entre formulações. Takka, Sakr & Golberg (2003), trabalharam com duas formulações de cloreto de bupiriona. Nos testes os autores variaram pH e velocidade de rotação das pás. O pH demonstrou ter maior influência sobre o perfil de dissolução quando comparado à velocidade de rotação das pás.

Todos os meios apresentados em Métodos item 2.6, de metodologias que foram testados para as formulações de GLB, mostraram-se satisfatórios quanto a capacidade de distinguir as formulações. Tal fato pôde ser demonstrado matematicamente através da aplicação de  $f_1$  e  $f_2$  (Tabela 14). Porém, partindo-se da premissa que o percentual máximo dissolvido de GLB para o medicamento referência nos meios deveria estar próximo de 100%, tal fato não foi observado em alguns meios como tampão pH 5,5 adicionado de Poli 80 0,1% e tampão pH 4,5 com Poli 80 1%. Os baixos percentuais dissolvidos nessas condições eram esperados face aos valores de  $C_s$  de GLB encontrados no estudo de solubilidade.

Os meios de dissolução que apresentaram os maiores percentuais dissolvidos também foram os de maior  $C_s$  de GLB. Pode-se concluir que houve boa correlação entre os dados encontrados nos testes de solubilidade e determinação do perfil de dissolução da GLB.

Comparando as formulações referência e teste, percebe-se que o comportamento diante dos meios foi semelhante no que diz respeito a afinidade de solubilização da GLB, ou seja, os meios de maior percentual dissolvido para o medicamento referência também o foram para o medicamento teste, da mesma forma para os de menor percentual dissolvido. Porém, nas condições testadas para determinação dos perfis de dissolução da GLB, o medicamento referência apresentou uma aceleração nos primeiros pontos de dissolução mesmo para aqueles meios de menor  $C_s$ , enquanto que para o medicamento teste a liberação do ativo foi mais gradativa. Tal fato pode ser evidenciado nos gráficos de CIVIV.

Na CIVIV buscou-se atingir um nível C múltiplo uma vez que não houve sucesso em aplicar o nível A face à dificuldade de definir o modelo de compartimento farmacocinético da GLB. Niopas & Daftsios (2002) em seu trabalho estimaram os parâmetros farmacocinéticos através de métodos não compartimentais. Löbenberg *et al.* (2000) descreveram a GLB como fármaco que segue o modelo de dois compartimentos e usaram a equação de Loo-Riegelman para o cálculo da fração absorvida.

No presente trabalho, além de não poder afirmar que a GLB segue o modelo de dois compartimentos, o relatório do estudo de BD não fornece informações sobre administração intravenosa do fármaco e aplicando-se os dados da administração via oral no *software WinNolin*, não são fornecidos todos os parâmetros necessários para a aplicação da equação de Loo-Riegelman.

De acordo com a literatura (SHARGEL & YU, 1999d) a equação de Wagner-Nelson para o cálculo da  $F_a$  é frequentemente utilizada para esses casos, porém os valores estimados para a  $K_e$  foram contraditórios dependendo do método de cálculo empregado, logo os valores de  $F_a$  não foram conclusivos. Portanto, sabendo que

ASC pode ser considerada representativa da quantidade de fármaco absorvido após a administração de dose única de um medicamento que alcança a circulação sistêmica (DI SANTO, 1995), esse foi o parâmetro farmacocinético escolhido para a CIVIV C múltiplo, embora quando tal correlação é desenvolvida com sucesso, uma CIVIV nível A também poderia ter sido alcançada (UPPOOR, 2001).

A interpretação dos gráficos de CIVIV foi realizada avaliando-se o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) conjuntamente com a inclinação da reta (b) e os perfis de dissolução. O  $r^2$  é descrito por Cutler, Beyssac & Aiache (1997) como medida da proporção total da variância e o b aparece como um dado razoável da extensão da CIVIV.

Takka, Saker & Goldberg (2003) utilizam o  $r^2$  como avaliação da CIVIV nível A proposta para comprimidos de cloreto de buspirona. Da mesma forma, Löbenberg *et al.* (2000) sugerem as melhores condições de dissolução para comprimidos de GLB, com meios biorrelevantes, através da análise do  $r^2$  obtido nos gráficos de CIVIV.

Para uma CIVIV C múltiplo, os dados *in vivo* constam de valores de área, e não  $F_a$  como nos exemplos acima, logo a interpretação dos parâmetros estatísticos torna-se mais complexa, principalmente para b. Cardot & Beyssac (1993) apontaram  $b=1$  como indicativo da correlação ponto-a-ponto, mas no caso da CIVIV C múltiplo seu valor não possui a referência ideal que seria desejada em gráficos onde se correlaciona  $F_a$  (%) *versus* quantidade dissolvida (%).

De qualquer modo, procurou-se interpretar a inclinação obtida para os dois medicamentos de modo que não fornecessem valores muito distantes entre si, ou seja, pudessem sugerir, ainda que de longe, um paralelismo entre os dados.

Assim, foram consideradas como não adequadas as condições que forneceram baixa quantidade dissolvida para o medicamentos referência (Figuras: 23, 24, 25,

26, 27) bem como aquelas que forneceram inclinação muito diferente entre os produtos e/ou de elevado valor (quase uma linha vertical), ver Figuras 22 e 28.

Quanto ao  $r^2$ , aqueles superiores a 0,7 foram considerados razoavelmente adequados para o caso.

Desse modo, a condição de SES adicionado de Poli 80 1% desponta como a mais promissora dentre as testadas, uma vez que apresentou, para ambas formulações,  $r^2$  superior a 0,7 e semelhantes entre si, inclinação das retas relativamente próximas, quando comparadas às outras condições, e ainda, percentual dissolvido para o medicamento referência próximo a 100%.

## **CONCLUSÃO**

## CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados e discutidos, pode-se concluir:

- Para todos os meios, quando na presença de tensoativo, houve uma promoção da solubilidade da GLB que foi crescente com o aumento da concentração de Poli 80 e LSS. Nos meios contendo LSS, a Cs foi superior à dos meios com Poli 80;
- Os meios de maior Cs de GLB também foram os meios de maiores percentuais dissolvidos do fármaco nos medicamentos referência e teste;
- À medida que o pH do meio de dissolução aumenta, o surfactante exerce menor efeito na solubilização da GLB;
- Entre os meios testados na dissolução dos medicamentos referência e teste, os menores percentuais dissolvidos foram encontrados no meio tampão pH 5,5 adicionado de Poli 80 0,1% que também apresentou uma das menores Cs de GLB;
- Todos os meios testados com pH entre 4,5 e 6,8 foram capazes de distinguir as formulações referência e teste;
- O método para a análise quantitativa de GLB por CLAE demonstrou satisfatória precisão inter e intra-dia, adequadas especificidade e sensibilidade e boa linearidade;
- Através da análise do coeficiente de determinação conjuntamente com a inclinação e os perfis de dissolução, o meio SES adicionado de Poli 80 1% é considerado adequado como meio de dissolução para comprimidos de GLB.

**REFERÊNCIAS**  
**BIBLIOGRÁFICAS**

ABDOU, H.M. Dissolution. In: MISCHER, A. (Ed.). *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 19th ed. Easton: Mack Publishing Company, 1995. v.1. cap.34, p.593-604.

AMIDON, G.L.; LENNERNAS, H.; SAH, V.P., CRISON, J.R. A theoretical basic for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm. Res.*, 12, n.3, p.413-420, 1995.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, L.V. Formas farmacêuticas: considerações biofarmacêuticas. In: \_\_ *Farmacotécnica formas farmacêuticas e sistema de liberação de fármacos*. 6. ed. Editorial Premier, 2000. p.65-112.

AULTON. M.E. Delineamento de formas farmacêuticas. In: \_\_ *Dissolução e solubilidade*. 2.ed. Artmed Editora S.A., 2005, p.31-47.

BRASIL. Resolução nº 896, de 29 de maio de 2003. Estabelece regulamento Técnico para medicamentos genéricos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 02 jun. 2003.

BRASIL. Resolução nº 897, de 29 de maio de 2003. Guia para isenção e substituição de estudos de bioequivalência. *Diário Oficial da União*, Brasília, 02 jun. 2003.

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 02 jun. 2003.

BRASIL. Resolução nº 901, de 29 de maio de 2003. Estabelece regulamento Técnico para medicamentos genéricos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 02 jun. 2003.

BRITISH PHARMACOPOEIA 1998. London: The stationery office, 1998. V II. Appendix XII D Dissolution test for tablets and capsules (Dissolution test for solid dosage forms).

CARDOT, J. M.; BEYSSAC, E. In vitro/in vivo correlations: Scientific implications and standardisation. *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacok.*, v.18, nº 1, p. 113-120, 1993.

CDER/FDA. Guidance for industry. Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms. 1997 Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>>. Arquivo consultado em Mai. 2003.

\_\_\_\_\_. Guidance for industry. Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate – release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. 2000. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>>. Arquivo consultado em Mai. 2003.

CUTLER, D. J.; BEYSSAC, E.; AIACHE, J.M. Level B and C in vivo/in vitro correlations: statistical considerations. *Int. J. Pharm.*, v.158, p. 185-193, 1997.

*Dicionário de Especialidades Farmacêuticas*: DEF 2004/05. 29. ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 2005.

DI SANTO, A.R. Bioavailability and Bioequivalency Testing. In: MISCHER, A. (Ed.). *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 19th ed. Easton: Mack Publishing Company, 1995. v.1. cap.35, p.605-612.

DRESSMAN, J.B.; REPPAS, C. In vivo-in vitro correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 11, suppl. 2, p.S73-S80, 2000.

EL-MASSIK, M.A.; DARWISH, I.A.; HASSAN, E.E.; EL-KHORDAGUI, L.K. Development of a dissolution medium for glibenclamide. *Int. J. Pharm.*, v.140, p.69-76, 1996.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo: Atheneu Ed. São Paulo, 1988a.v.1 V.1.5. Determinação do tempo de dissolução para comprimidos e cápsulas.

\_\_\_\_\_.4 ed. São Paulo: Atheneu Ed. São Paulo,1988b. V.1. V.1.1. Determinação de peso em formas farmacêuticas.

\_\_\_\_.4 ed. São Paulo: Atheneu Ed. São Paulo, 1988c. V.1. V.1.3. Determinação da resistência mecânica em comprimidos.

\_\_\_\_.4 ed. São Paulo: Atheneu Ed. São Paulo, 1988d. V.1. V.1.4. Testes de desintegração.

\_\_\_\_.4 ed. São Paulo: Atheneu Ed. São Paulo, 1996.fasc.1. v.1.6. Uniformidade de doses unitárias.

\_\_\_\_.4 ed. São Paulo: Atheneu Ed. São Paulo, 2001. fasc.3. Monografia Glibenclamida comprimidos 153.1.

GALIA, E.; NICOLAIDES, E.; HORTER, D.; LOBENBERG, R.; REPPAS, C.; DRESSMAN, J.B. Evaluation of various Dissolution Media for Predicting In Vivo Performance of Classe I and II Drugs. *Pharm. Res.*, v.15, nº 5, p.698-705, 1998.

GILMAN, A.,G.; RALL, T.,W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. The pharmacological basis of therapeutics. 10 ed. McGraw-Hill, 2001.

HÖRTER, D.; DRESSMAN, J.B. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, v. 46, p.75-87, 2001.

JINNO, J.; OH, D.; CRISON.J.R.; AMIDON, G. Dissolution of ionizable water-insoluble drugs: The combined effect of pH and surfactant. *J. Pharm. Sci.*, v. 89, nº 2, p.268-274, 2000.

KIRCHHEINER, J.; BROCKMOLLER, J.; MEINEKE, I.; BAUER, S.; ROHDE, W.; MEISEL, C.; ROOTS, I. Impact of CYP2C9 amino acid polymorphism on glyburide kinetics and on the insulin and glucose response in healthy volunteers. *Clin. Pharmacol. Ther.*, p. 286-296, abr., 2002.

KORTEJARVI, H, MIKKOLA, J.; BACKMAN, M.; ANTILA, S.; MARVOLA, M. Development of level A, B and C in vitro-in vivo correlations for modified-release levosimendan capsules. *Int. J. Pharm.*, v. 241, p.87-95, 2002.

LAKE, O.A.; OLLING, M.; BARENDIS, D.M. In vitro/in vivo correlations of dissolution data of carbamazepine immediate release tablets with pharmacokinetic data obtained in healthy volunteers. *Eur. J. Pharmaceut. Biopharm.*, v. 48, p.13-19, 1999.

LEVY, G.; LEONARDS, J.; PROCKNAL. J. Development of in vitro dissolution tests which correlate quantitatively with dissolution rate-limited drug absorption in man. *J. Pharm. Si.*,v. 54, nº 12, p. 1719-1722, 1965.

LINDENBERG, M.; KOPP, S. DRESSMAN, J.B. Classification of orally administered drugs on the World Health organization model list of essential medicines according to the biopharmaceutics classification system. *Eur. J. Pharmaceut. Biopharm.*, v.58, p. 265-278, 2004.

LÖBENBERG, R.; AMIDON, G.L. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *Eur. J. Pharmaceut. Biopharm.*, v.50, p. 3-12, 2000.

LÖBENBERG, R.; KRÄMER,J; SHAH, V.P.; AMIDON, G.L.; DRESSMAN, J.B. Dissolution Testing as a Prognostic tool for Oral Drug Absorption: Dissolution Behavior of Glibenclamide. *Pharm. Res.*, v.17, p. 439-444, 2000.

MANIASSO, N. Ambientes Micelares em Química Analítica. *Quim. Nova.* V.24, n.1, p. 87-93, 2001.

MANUAL DE BOAS PRÁTICAS EM BIODISPONIBILIDADE E BIOEQUIVALÊNCIA. v.1. mod 1: Etapa clínica. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/inspecao/bioequivalencia/index.htm>> Acesso em: 11 mai. 2005a.

\_\_\_\_\_. v.1. mod 3: Etapa estatística. Disponível em:  
<<http://www.anvisa.gov.br/inspecao/bioequivalencia/index.htm>> Acesso em: 11 mai.  
2005b.

MARTINDALE: The Complete Drug Reference. 32th ed. London: Pharmaceutica  
Press, 1999. p.319-320.

MERCK INDEX: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 13 th ed. New  
Jersey: MERCK & CO, 2001. 762p.

MORITA, T. Manual de soluções, reagentes e solventes. Padronização-preparação-  
purificação. Editora Edgard Blücher Ltda. IV.56.11, 2001, p.276.

NEUGEBAUER, J. A guide to the properties and uses of detergents in biology and  
biochemistry. 3 ed. Clarkson University. New York, 1990.

NIEMI, M.; CASCORBI, I.; TIMM, R.; KROEMER, H.K.; NEUVONEN, P.J.; KIVISTO,  
K.T. Glyburide and glimepiride pharmacokinetics in subjects with different CYP2C9  
genotypes. *Clin. Pharmacol. Ther.*, p. 326-332, set., 2002.

NIOPAS, I.; DAFTSIOS, A.C. A validated high-performance liquid chromatographic  
method for the determination of glibenclamide in human plasma and its application to  
pharmacokinetic studies. *J. pharmaceutical and biomedical analysis*, v.28, p.653-657,  
2002.

PIFFERI, G.; SANTORO, P.; PEDRANI, M. Quality and functionality of excipients. //  
*Farmaco*, V.54, p. 1-14, 1999.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. *Farmacologia*. 4.ed. Editora Guanabara  
Koogan S.A., 2001. p.323-329.

SHARGEL, L. & YU, A. B. C. Biopharmaceutic consideration in drug product design.  
In: \_\_\_\_\_. *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*. 4th ed. Stamford: Appleton &  
Lange, 1999b. cap.5, p.99-128.

\_\_\_\_\_. Biopharmaceutic Considerations in Drug Product Design. In: \_\_\_\_\_. *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*. 4th ed. Stamford: Appleton & Lange, 1999a. cap.6, p.129-167.

\_\_\_\_\_. Pharmacokinetics of Oral Absorption. In: \_\_\_\_\_. *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*. 4th ed. Stamford: Appleton & Lange, 1999d. cap.9, p.195-203.

\_\_\_\_\_. Bioavailability and Bioequivalence. In: \_\_\_\_\_. *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*. 4th ed. Stamford: Appleton & Lange, 1999c. cap.10, p.247-279.

SINGHAL, D.; CURATOLO, W. Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, v. 56, p.335-347, 2004.

SILVA, R.L. Dissolução de comprimidos de nimesulida de liberação imediata, biodisponibilidade. 2001. 186f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

SILVA, R.L.; VOLPATO, N.M. Meios de dissolução de comprimidos de nimesulida: ação dos tensoativos. *Rev. Bras. Ciências Farmacêuticas*. v.38, abr./jun.,2002.

SILVA, M.O.R. Estudos de correlação *in vivo/in vitro* empregando comprimidos de nimesulida não bioequivalentes. 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

SNIDER, D.A.; ADDICKS, W.; OWENS W.O. Polymorphism in generic drug product development. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, v. 56, p.391-395, 2004.

STORPIRTIS, S.; CONSIGLIERI, V.O. Biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos: aspectos fundamentais para o planejamento e execução de estudos. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo*, v. 31, n. 2, p.63-70, jul./dez., 1995.

STORPIRTIS, S.; OLIVEIRA, P.G.; RODRIGUES, D.; MARANHO, D. Considerações biofarmacêuticas relevantes na fabricação de medicamentos genéricos: fatores que afetam a dissolução e a absorção de fármacos. *Rev. Bras. Ciên. Farm.*, v.35, n.1, p.1-16, jan/jun. 1999.

SWANEPOEL, E.; LIEBENBERG, W; VILLIERS, M.M. Quality evaluation of generic drugs by dissolution test: changing the USP dissolution medium to distinguish between active and non-active mebendazole polymorphs. *Eur. J. Pharmaceut. Biopharm.*, v.55, p. 345-349, 2003.

SULEIMAN, M.S.; NAJIB, N.M. Isolation and physicochemical characterization of solid forms of glibenclamide. *Int. J. Pharm.* v.50, p. 103-109, 1989.

SYNCHROPHAR – ASSESSORIA E DESENVOLVIMENTO DE PROJETOS CLÍNICOS. *Relatório Final do Estudo de Bioequivalência de Glibenclamida 5 mg.* São Paulo, Set. 2001.

TAKKA, S, SAKR, A.; GOLDBERG, A. Development and validation of an in vitro-in vivo correlation for buspirone hydrochloride extended release tablets. *J. Control. Rel.*, v. 88, p.147-157, 2003.

UNITED STATES PHARMACOPOEIA. 23th ed. NF-18, Supp. 1. Rockville: U.S.P. Convention, 1995.

UNITED STATES PHARMACOPOEIA. 27th ed. Rockville: U.S.P. Convention, 2004a. Cap. 711. Dissolution.

\_\_\_\_\_. In vitro in vivo evaluation of dosage forms. 27th ed. Rockville: U.S.P. Convention, 2004b, Cap. 1088.

\_\_\_\_\_. Buffer solutions. 27th ed. Rockville: U.S.P. Convention, 2004c, p. 2724.

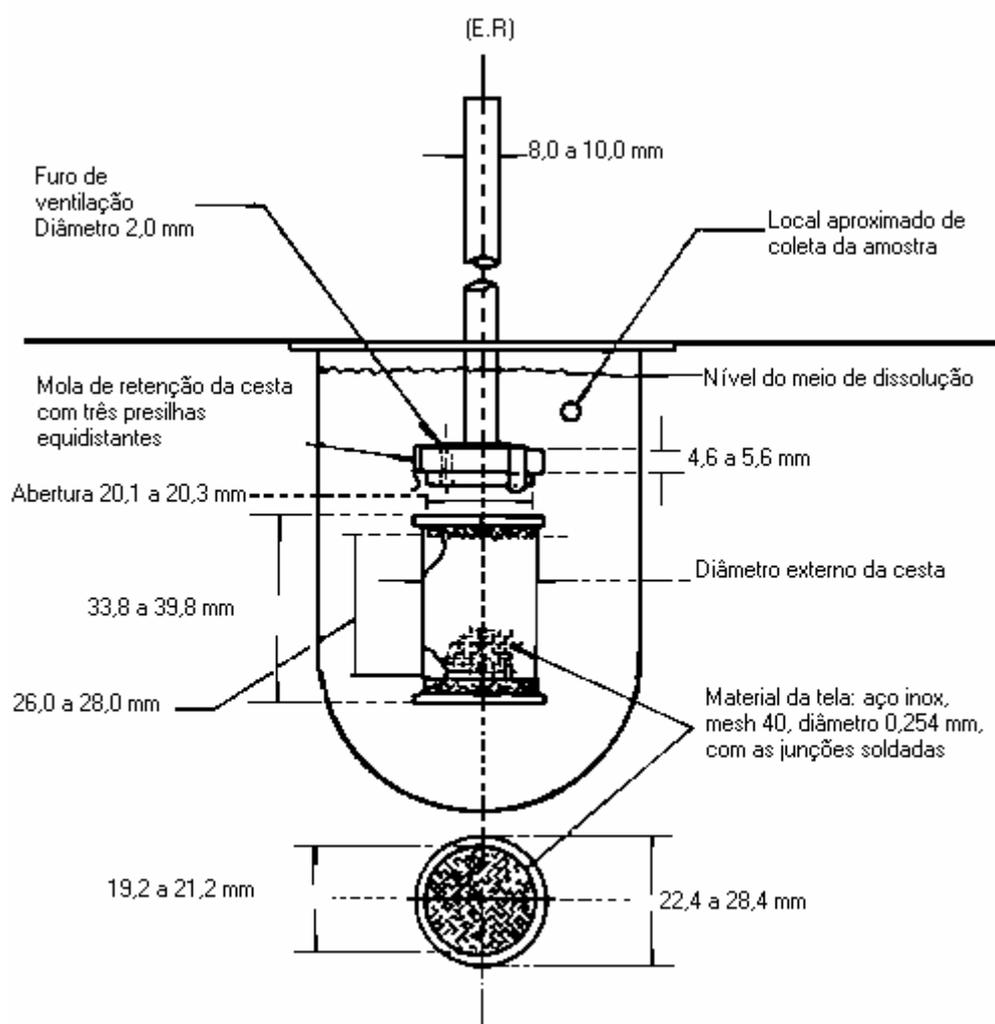
UPPOOR, V.R.S. Regulatory perspectives on in vitro (dissolution)/ in vivo (bioavailability) correlations. *J. of Control. Rel.*, v.72, p.127-132, 2001.

VOLPATO, N.M.; SILVA,R.L.; BRITO, A.P.P.; GONÇALVES, J.C.S.; VAISMAN, M.; NOEL, F. Multiple level C in vitro/in vivo correlation of dissolution profiles of two L-thyroxine tablets with pharmacokinetics data obtained from patients treat for hypothyroidism. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v.21, p. 655-660, 2004.

## **ANEXOS**

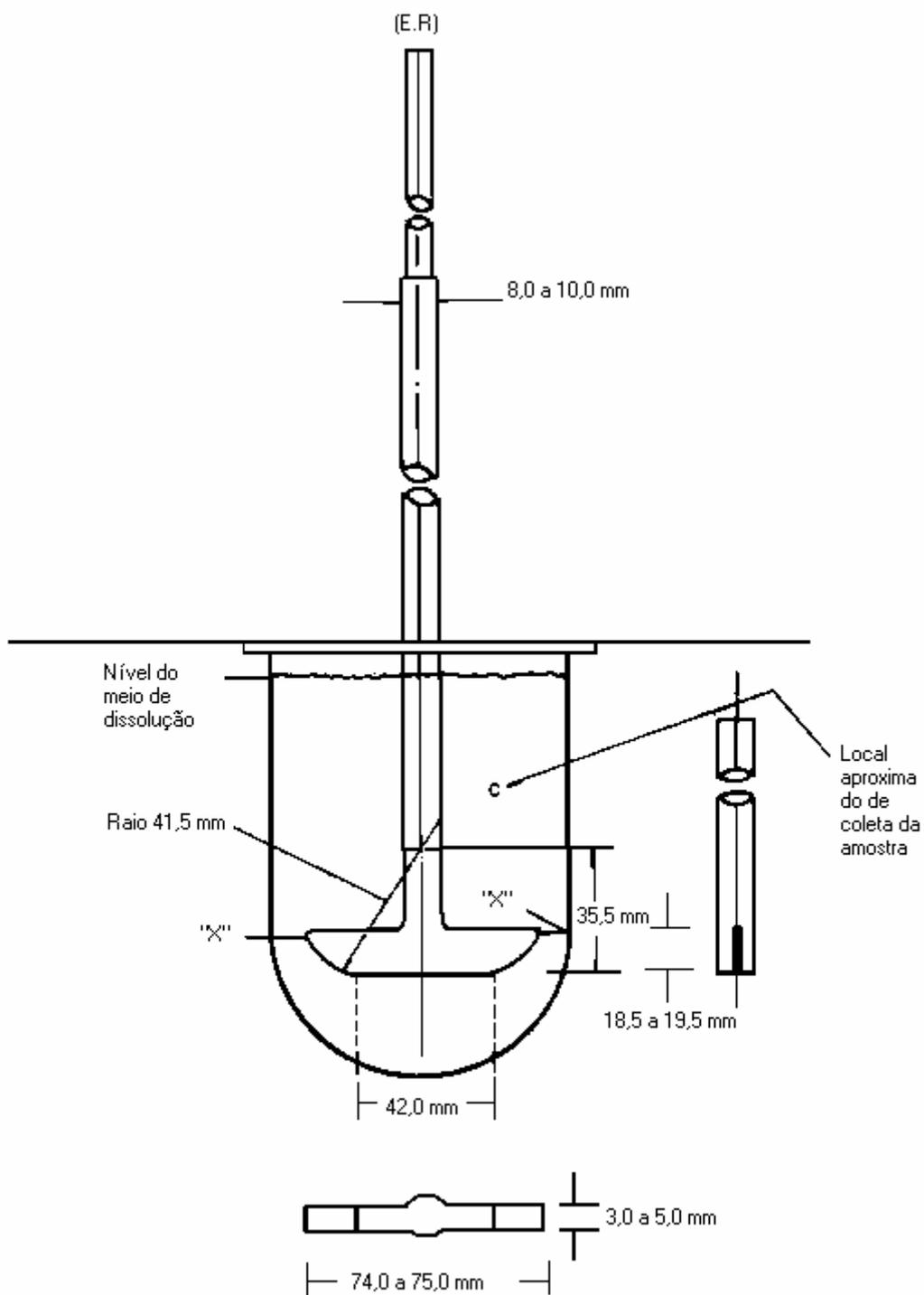
## ANEXO 1

## Método 1



## ANEXO 2

## Método 2



## ANEXO 3

## Espectro de infravermelho

