UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIENCIAS FARMACEUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Combinação dose fixa de hidroclorotiazida (12,5 mg) e valsartana (160 mg): Desenvolvimento de metodologia de dissolução *in vitro* e *in silico* para avaliar os perfis de dissolução dos produtos comercializados no Brasil e no Perú

Rosmery Merma Leon

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz

São Paulo

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIENCIAS FARMACEUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Combinação dose fixa de hidroclorotiazida (12,5 mg) e valsartana (160 mg): Desenvolvimento de metodologia de dissolução *in vitro* e *in silico* para avaliar os perfis de dissolução dos produtos comercializados no Brasil e no Perú

Rosmery Merma Leon

Versão Original

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

L579c

Leon, Rosmery Merma
Combinação dose fixa de hidroclorotiazida (12,5 mg) e valsartana (160 mg): Desenvolvimento de metodologia de dissolução in vitro e in silico para avaliar os perfis de dissolução dos produtos comercializados no Brasil e Peru / Rosmery Merma Leon. - São Paulo, 2019.
98 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Ferraz, Humberto Gomes

1. Perfil de dissolução. 2. in silico. 3. valsartana. 4. hidroclorotiazida. 5. DDDplus. I. T. II. Ferraz, Humberto Gomes, orientador.

Rosmery Merma Leon

Combinação dose fixa de hidroclorotiazida (12,5 mg) e valsartana (160 mg): Desenvolvimento de metodologia de dissolução *in vitro* e *in silico* para avaliar os perfis de dissolução dos produtos comercializados no Brasil e no Perú

Comissão Julgadora da Dissertação para a obtenção do Título de Mestre

_____

Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz

Orientador/Presidente

_____

1° Examinador

_____

2° Examinador

_____

3° Examinador

São Paulo, _____de_____2019.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Julia Angélica e Raimundo,

Por todo amor e sacrifício pela minha educação.

Os meus logros são sempre de vocês

A minha Avô Celia,

Por teu imenso amor “ mamitay”.

Aos meus irmãos, Alfredo, Henry e Vanessa,

Por estar sempre comigo, por ser exemplo e me inspirar.

Só posso dizer eu amo vocês, com vocês a minha vida é linda.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Humberto Gomes Ferraz pela grande oportunidade de conhecer e formar parte do DEINFAR, pela orientação no caminho deste trabalho.

A Professora Dra Michele Issa, primeiro pela amizade, pela colaboração e pelas palavras de incentivo nos momentos que precisei (gracias). Ao Prof. Dr. Marcelo Duque, pelos ensinamentos e pela vontade de ajudar sempre.

As pessoas que conheci no DEINFAR a TODOS eu agradeço imensamente pela acolhida, amizade, e por me ajudarem sempre. Em especial a Natalia agradeço muito pela companhia e amizade desde sempre obrigada a sua família também, a Eremita pelo carinho e os conselhos, a Leandro pela colaboração e amizade.

A Leandro Ticlia, obrigada pela amizade, por estar sempre a disposição de me ajudar, pelas risadas e pela paciência. À PhD Gari Ccana pelas palavras de motivação antes de começar o mestrado até o final. Ao pessoal do Programa de Fármacos e medicamentos, Professores obrigada pelos ensinamentos compartidos, aos técnicos e funcionários pela boa disposição para ajudar. Aos alunos da pós-graduação Katherine, Aline, Diego, Ilia, Eduardo, Edilson, Franklin, Lina, Paloma por ter colaborado comigo, pelas palavras de incentivo, eu aprendi muito junto a vocês.

A Marina e Elisabete por ter me ajudado em uma parte importante da execução do meu trabalho e pelas risadas.

As minhas amigas do Perú: Líbia, Vianney e Betty, muito obrigada por escutar, por me fazer companhia ainda desde longe e por me dar coragem sempre, muito obrigada mesmo.

Ao pessoal do no INS- CNCC em especial a Carlos, Sandra, Maria e Dr. Tabuchi, por me apoiar e me incentivar no começo desta aventura.

A todas as personas que Deus colocou no meu caminho desde que eu cheguei no Brasil que de muitas formas me ajudaram a me sentir em casa, aos que estudaram ou trabalharam do meu lado, muito obrigado mesmo.

A meus Tios Juana, Manuel, Juan, a minha cunhada Danis e meu sobrinho Ian e primos obrigada por torcer por mim e me dar força.

EPÍGRAFE

“Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais”.

“Nunca desista de seus sonhos”.

Augusto Cury

RESUMO

LEON, R.M. **Combinação dose fixa de hidroclorotiazida (12,5 mg) e valsartana (160 mg): Desenvolvimento de metodologia de dissolução *in vitro* e *in silico* para avaliar os perfis de dissolução dos produtos comercializados no Brasil e Peru.** 2019. 98p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Hidroclorothiazida (HTZ) e valsartana (VAL) são fármacos pouco solúveis em meio aquoso e pertencem às classes IV e II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), respectivamente. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método para avaliar o perfil de dissolução de formas farmacêuticas sólidas de dose fixa combinada contendo HTZ (12,5 mg) e VAL (160 mg) usando ferramentas *in silico* para avaliar os perfis de dissolução de produtos comercializados no Brasil e Peru. O presente trabalho foi dividido em 4 capítulos. No Capítulo I, foi determinada a solubilidade da HTZ e VAL pelo método *shake-flask* e potenciométrico, no qual foi possível demonstrar que existe correlação entre ambos os métodos e que HTZ e VAL são solúveis em tampão fosfato pH 6,8. No Capítulo II, um método cromatográfico em HPLC foi desenvolvido com base em *Quality by Design* (QbD), com auxílio do software Fusion®, no qual foi estabelecido uma zona de confiança dos parâmetros, que garantiu a robustez do método. O Capítulo III descreve o desenvolvimento de um método de dissolução utilizando ferramenta *in silico* (DDDplus®) na qual foi definido um delineamento experimental do tipo fatorial completo 3^3 usando como fatores a formulação, utilização de âncora e velocidade de agitação. Para os ensaios de dissolução *in vitro,* foi proposto um outro delineamento fatorial $3^{(3-1)}$ com o intuito de obter as constantes de calibração das simulações *in silico*. Através de uma análise estatística das eficiências de dissolução obtidas nas simulações, foram avaliados os efeitos e as interações entre os fatores. Assim, as condições finais do método de dissolução estabelecidas foram: 900 mL de tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução, 75 rpm de velocidade de agitação, e utilização de âncora para evitar a flutuação das formulações. O método desenvolvido foi empregado, no contexto do Capítulo IV, para avaliar o perfil de dissolução dos produtos contendo HTZ e VAL comercializados no Brasil e no Peru. Por análise multivariada, a eficiência de dissolução (ED), tempo médio de dissolução (MDT) e as porcentagens de dissolução de 5 até 60 minutos foram utilizadas para agrupar as formulações em grupos distintos. Embora os perfis de dissolução mostrem similaridade entre todas as formulações avaliadas, o produto referência se destacou por apresentar uma maior ED comparado com as outras formulações, devido à maior liberação nos primeiros 5 minutos de ensaio. Concluiu-se que o método proposto, além de garantir a liberação total de HTZ e VAL a partir das formulações, possui adequado poder discriminativo.

Palavras chave: DDDplus, *in silico*, perfil de dissolução, dose fixa combinada, hidroclorotiazida, valsartana.

ABSTRACT

LEON, R.M. **Fixed dose combination of hydrochlorothiazide (12.5 mg) and valsartan (160 mg): Development of *in vitro* and *in silico* dissolution methodology to evaluate the dissolution profiles of products marketed in Brazil and Peru.** 2019. 98p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Hydrochlorothiazide (HTZ) and valsartan (VAL) are poorly soluble drugs in aqueous medium and belong to classes IV and II of the Biopharmaceutical Classification System (BCS), respectively. The objective of this study was to develop a dissolution method to evaluate the dissolution profile of solid pharmaceutical forms of combined dose containing HTZ (12.5 mg) and VAL (160 mg) using in silico tools to evaluate the dissolution profiles of products sold in Brazil and Peru. The present study was divided into four chapters. In Chapter I, the HTZ and VAL solubility were determined by the shake-flask and potentiometric methods, in which it was possible to demonstrate that there is a correlation between both methods and that HTZ and VAL are soluble in pH 6.8 phosphate buffer. In Chapter II, a chromatographic method in HPLC was developed based on Quality by Design (QbD), using the Fusion® software, in which a zone of confidence of the parameters was established, which ensured the robustness of the method. Chapter III presents the development of a dissolution method using *in silico* (DDDplus™) as a tool, in which an experimental design of the complete factorial type 3^3 was defined using as factors: the formulation, use of sinker and agitation speed. For in vitro dissolution assays, another factor design $3^{(3-1)}$ was proposed to obtain the calibration constants of the *in silico* simulations. Through a statistical analysis of the dissolution efficiencies obtained in the simulations, the effects and interactions between the factors were evaluated. Thus, the final conditions of the dissolution method established were: 900 mL of pH 6.8 phosphate buffer as a dissolution medium, 75 rpm of stirring speed, and use of sinker to avoid the fluctuation of the formulations. The method developed was used, in the context of Chapter IV, to evaluate the dissolution profile of HTZ and VAL products marketed in Brazil and Peru. By multivariate analysis, the dissolution efficiency (ED), mean dissolution time (MDT) and the dissolution percentages from 5 to 60 minutes were used to group the formulations in different groups. Although the dissolution profiles show a similarity between all the evaluated formulations, the reference product stood out for presenting a higher ED compared to the other formulations, due to the higher release in the first 5 minutes of the test. It was concluded that the proposed method, besides guaranteeing the total release of HTZ and VAL from the formulations, has adequate discriminatory capacity.

Keywords: DDDplus™, *in silico*, dissolution profile, combined fixed-dose, hydrochlorothiazide, valsartan.

SUMÁRIO

CAPITULO I - DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DE HIDROCLOROTIAZIDA E VALSARTANA PELO MÉTODO POTENCIOMÉTRICO E SHAKE FLASK

1 INTRODUÇÃO..... 14

2 MATERIAL E MÉTODOS..... 16

2.1 Material..... 16

2.2 Método..... 17

2.2.1 Análise de solubilidade pelo método Shake-flask..... 17

2.2.2 Validação de filtro..... 17

2.2.3 pKa e solubilidade por análise potenciométrica..... 17

2.2.4 Análise estatística..... 18

3 RESULTADOS E DISCUSÃO..... 19

3.1 Validação de filtro..... 19

3.2 Solubilidade pelo método shake-flask..... 20

3.3 pKa e solubilidade por análise potentiométrica.....21

4 CONCLUSÕES.....25

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....26

CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC) PARA QUANTIFICAÇÃO DA DISSOLUÇÃO DA HIDROCLOROTIAZIDA E VALSARTANA USANDO *QUALITY BY DESIGN*

1 INTRODUÇÃO..... 30

2 MATERIAL E MÉTODO..... 31

2.1 Material..... 31

2.2 Método..... 31

2.2.1 Instrumentação..... 31

2.2.2 Condições analíticas..... 32
2.2.3 Transferência de método para sistema HPLC..... 35
2.2.4 Preparação de amostras..... 35
2.2.5 Software..... 35
2.2.6 Validação do método..... 37
2.3 Análise estatística..... 37
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 38
3.1 Etapa da Triagem (screening) no sistema UHPLC..... 38
3.2 Etapa de otimização no sistema UHPLC..... 43
3.3 Etapa de transferência do método para sistema HPLC..... 45
3.4 Validação do método desenvolvido no sistema HPLC..... 45
3.4.1 Seletividade e especificidade..... 45
3.4.2 Adequação do sistema (system suitability)..... 46
3.4.3 Linearidade..... 47
3.4.4 Precisão..... 48
3.4.5 Exatidão..... 49
3.4.6 Robustez..... 50
4 CONCLUSÕES..... 50
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS...... 51

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO PARA AVALIAR O PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE FORMULAÇÕES DE DOSE FIXA COMBINADA CONTENDO VALSARTANA E HIDROCLOROTIAZIDA (160 mg + 12,5 mg) UTILIZANDO FERRAMENTAS *IN SILICO* ATRAVÉS DE DELINEAMENTO FATORIAL

1 INTRODUÇÂO..... 55
2 MATERIAL E MÉTODO..... 56
2.1 Material..... 56

2.2 Excipientes..... 56

2.3 Reagentes..... 57

2.4 Método..... 57

2.4.1 Preparação das formulações dos comprimidos..... 57

2.4.2 Teor dos comprimidos..... 58

2.4.3 Desenvolvimento do método de dissolução..... 58

2.5 Análise estatística 61

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 62

4 CONCLUSSOES 82

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 82

CAPÍTULO IV - PERFIL DE DISSOLUÇÃO DAS FORMULAÇÕES DOSE FIXA COMBINADA DE VALSARTANA (160 mg) + HIDROCLOROTIAZIDA (12,5 mg) COMERCIALIZADAS NO BRASIL E PERÚ

1 INTRODUÇÂO..... 87

2 MATERIAL E MÉTODO..... 88

2.1 Material..... 88

2.2 Método..... 89

2.2.1 Teor das formulações comerciais..... 89

2.2.2 Ensaio de dissolução..... 89

2.2.2 Análise estatística 90

3 RESULTADOS E DISCUSÃO..... 90

4 CONCLUSÔES..... 95

5 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS...... 96

ANEXOS 98

Ficha do Aluno

CAPÍTULO I

Determinação da solubilidade de hidroclorotiazida e valsartana pelo método potenciométrico e shake flask

DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DE HIDROCLOROTIAZIDA E VALSARTANA PELO MÉTODO POTENCIOMÉTRICO E SHAKE FLASK

RESUMO

Hidroclorotiazida (HTZ) e valsartana (VAL) são fármacos pouco solúveis em meio aquosos.Assim, a análise de aspectos fisicoquímicos é fundamental, tal como a solubilidade que está fortemente ligada com sua eficácia terapêutica, de modo que é essencial conhece-la. O objetivo do presente estudo foi avaliar a solubilidade de HTZ e VAL por shake flask e titulação potenciométrica e estabelecer uma correlação entre os dois métodos. A solubilidade de HTZ e VAL foi determinada pelo método de equilíbrio em soluções aquosas com uma faixa de pH de 1.2 a pH 6.8 em um agitador orbital de temperatura controlada. O valor de pKa para cada um dos fármacos foi definido pelo método potenciométrico usando o titulador automático Sirius T3 com metanol como co-solvente e calculadas com a extrapolação Yasuda-Shedlovski. Como HTZ e VAL são ácidos fracos foram titulados com KOH 0,5M de acordo com o método Chasing Equilibrium Solubility (Cheqsol). Foi observado a correlação nos resultados obtidos por ambos métodos, entretanto, o método potenciométrico apresentou vantagens no menor tempo de análise e da pequena quantidade de amostra utilizada, indicando que o HTZ foi mais solúvel em HCl 0,1 M e VAL em tampão fosfato pH 6,8. Portanto, o método potenciométrico oferece uma alternativa eficaz e barata ao método tradicional do shake flask.

Palavras chave: equilibrium solubility, potenciométrico, shake-flask, psKa, pKa, solubilidade

1 INTRODUÇÃO

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) leva em consideração três fatores imprescindiveis na absorção dos fármacos: dissolução, solubilidade e permeabilidade intestinal. Deste modo, os medicamentos são classificados em quatro grupos, onde uma substância é considerada de alta solubilidade quando a maior dose é solubilizada em menos de 250 mL de um meio aquoso na faixa de pH de 1,2 a 6,8 a 37 ± 0,5 ° C (AVDEEF; BERGER, 2001; TSUME et al., 2014; CDER/FDA, 2015). A solubilidade é a característica físico-química da qual depende a dissolução e absorção dos fármacos; portanto, está diretamente associada à biodisponibilidade e eficácia terapêutica. Neste campo, é importante determinar a solubilidade dos fármacos de maneira exata (AVDEEF; BERGER; BROWNELL, 2000; LÖBENBERG; AMIDON, 2000).

A literatura científica descreve variados métodos que são aplicados para avaliar a solubilidade dos fármacos. Um exemplo é o método de equilíbrio, também nomeado de shake-flask, no qual um excesso de fármaco é adicionado a um meio aquoso com pH na faixa de 1,2 a 6,8, até a saturação. O sistema é submetido a agitação durante um certo período a uma temperatura apropriada (geralmente 37 °C), e a quantidade de fármaco dissolvido é quantificado por um método analítico apropriado. A principal limitação deste método é a exigência de uma grande quantidade de matéria-prima necessária para atingir a saturação, especialmente para fármacos altamente solúveis (SILVA et al., 2016).

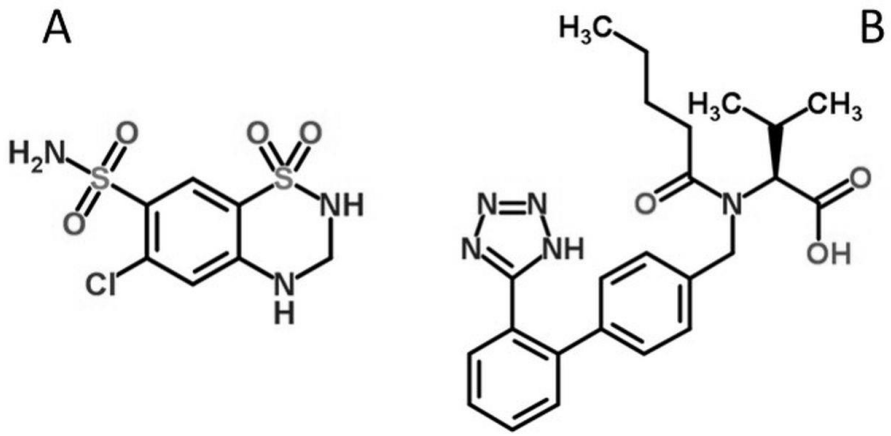
Outros fatores a serem considerados envolvem variáveis experimentais como temperatura, necessidade de filtração da amostra e fatores característicos da própria substância, como a transição da forma polimórfica ou a formação de hidratos. Além disso, quando um método shake-flask é bem projetado, fornece dados com um baixo desvio padrão (BOX et al., 2003; STUART; BOX, 2005). Deste modo, o método shake-flask é reconhecido oficialmente pela Farmacopeia Americana (USP 39 NF 34, 2018), e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a qual recomenda o ensaio para avaliar a solubilidade da droga, conforme a Nota Técnica 003/2013 (MINISTÉRIO DA SAÚDE - MS - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2003).

Outra alternativa para determinar a solubilidade dos fármacos é a titulação potenciométrica, este método baseia-se no deslocamento do gráfico de Bjerrum pela titulação quando um precipitado está presente. Envolve a dissolução do material em água e busca a precipitação na solução por retro-titulação (adição de alíquotas medidas de titulante base ou ácido) até identificar a primeira precipitação. Após a precipitação inicial e as espécies neutras aparecerem, se volta para à solução a partir da solução supersaturada e vice-versa repetidas vezes, buscando o pH do equilíbrio, onde a amostra não consegue se precipitar mais nem redissolver (AVDEEF et al., 2016).

O método potenciométrico tem algumas vantagens interessantes quando comparado ao ensaio de shake flask. A quantidade de amostra é consideravelmente menor (2 a 10 mg) e a curva $\log S_0$ versus pH é obtida pelo software do equipamento logo após o tempo de titulação (45 a 60) minutos (STUART; BOX, 2005). Atualmente, o método potenciométrico é mencionado na Farmacopeia Americana como uma ferramenta para medir a solubilidade dos fármacos (USP 39 NF 34, 2018). Por outro lado, a agência reguladora brasileira, ANVISA, ainda não reconhece essa técnica nos seus textos normativos oficiais.

O presente estudo avaliou a hidroclorotiazida (HTZ, Figura 1A) a qual é um ácido fraco com pKa 7,9 e contém em sua estrutura um cloreto na posição orto em relação à sulfonamida, o que torna a droga mais lipossolúvel (RANJAN et al., 2017). E a Valsartana (VAL, Figura 1B) é um ácido fraco composto por um grupo tetrazole e um grupo carboxil com pKa 4.73 e 3.90 respectivamente. O grupo ácido carboxílico é responsável pela baixa solubilidade deste fármaco em pH baixo, pelo qual VAL é definido como um fármaco de solubilidade dependente do pH (PARK et al., 2010).

Figura 1. Estrutura química de HTZ (A) e VAL (B). Fonte: Chemspider



Por tanto o objetivo deste estudo foi avaliar a solubilidade de HTZ e VAL por titulação potenciométrica e shake Flask, a fim de estabelecer uma correlação entre os dois métodos para ambos os fármacos. Isto é importante para demonstrar que o método potenciométrico poderia ser utilizado como uma ferramenta em processos farmacêuticos, tais como pré-formulação, desenvolvimento analítico e para ser considerado como uma alternativa do método shake-flask.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

A HTZ (pureza de 100,1% em base seca) e a VAL (pureza de 101,2% em base seca) foram fornecidas pela Aché Laboratorios SA (SP, Brasil). A água foi purificada utilizando o sistema de filtração Milli-Q (Millipore, Alemanha). As soluções tampão foram preparadas de acordo com a Farmacopeia Americana (USP 39 NF 34, EUA) com ácido clorídrico 37% (HCl), hidróxido de sódio (NaOH) e de di-hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4), para o método potenciométrico foi utilizado cloreto de potássio (KCl) 0,15 M, hidróxido de potássio (KOH) 0,5 M e metanol como co-solvente fornecidos por LabSynth, São Paulo.

2.2 Método

2.2.1 Análise de solubilidade método Shake-flask

A solubilidade da HTZ e VAL pelo método shake-flask foi realizada em triplicata. Um excesso de cada um dos fármacos foi adicionado em frascos de vidro hermético contendo 20 mL dos seguintes meios aquosos: água ultrapura, HCl 0,1 M; tampão citrato pH 3,5; tampão acetato pH 4,5 e tampão fosfato pH 6,8.

As amostras foram colocadas em um agitador orbital (Tecnal TE-420, São Paulo) a 37 ± 0,5 ° C, sob agitação constante de 150 rpm durante 72 horas, para garantir o equilíbrio de saturação do meio. No final do ensaio, após filtração com filtro fluoreto de polivinilideno PVDF, as concentrações de HTZ e VAL foram determinadas por espectrofotometria UV a 250 e 270 nm respectivamente, através de um percurso óptico de 10 mm em espectrofotômetro UV-vis (Thermo Scientific Evolution 201, EUA). Usando as curvas padrão (faixa de linearidade 2 a 29 µg/mL para VAL e 2 a 13 µg/mL para HTZ) que foram preparadas com tampão fosfato pH 6. 8 e os valores foram expressados em média ± desvio padrão.

2.2.2 Validação de filtro

Foi realizado utilizando filtros de seringa de PVDF e de nylon (NY) ambos com 0,45 µm de tamanho de poro e 25 mm de diâmetro, utilizando soluções com concentração de (1, 8 e 13 µg/mL) para HTZ e (5, 11 e 23 µg/mL) para VAL, a porcentagem de recuperação para cada solução foi obtida após o descarte de 0 mL, 2 mL e 4 mL de amostra filtrada. Como referência, soluções padrão de cada fármaco e cada concentração foram medidas em triplicada sem filtração.

2.2.3 pKa e solubilidade por análise potenciométrica

A análise potenciométrica dos fármacos foi realizada no sistema de titulação automática Sirius T3 (Sirius Analytical Instruments Ltd., Reino Unido) fornecido com o eletrodo Ag/AgCl para medição de pH. Para cada ensaio, uma pequena quantidade

de fármaco (1 mg para análise de pKa e 10 mg para ensaios de solubilidade) foi cuidadosamente pesada em balança analítica AUW220D (Shimadzu, Japão).

Como HTZ e VAL são pouco solúveis em meio aquoso e é requisito a solubilização completa do fármaco para determinar o pKa, foi necessário utilizar metanol como co-solvente nas proporções de 20, 30 e 40%, para avaliar os valores de psKa (constante de dissociação com co-solvente) dos fármacos. As titulações foram conduzidas em uma faixa de pH de 2 - 12, com uma força iônica constante (1,5 mL de KCl 0,15 M) e 37,0 ± 0,5 °C de temperatura (AVDEEF; BERGER, 2001) . Os valores de pKa da HTZ e VAL (cada um obtido por triplicata) foram calculados a partir de misturas de água-metanol por dados pH-métricos (mL de titulante versus pH) extrapolados para condições aquosas por refinamento segundo a equação de Yasuda-Shedlovsky através do software Sirius T3 versão 1.1.2.0.

O teste de solubilidade por titulação ácida-básica (faixa de pH 2- 12) foi executada usando 1,5 mL de solução a 0,15 M de KCl em 37,0 ± 0,5 ° C com agitação constante e sob uma atmosfera de nitrogênio. Posteriormente, pequenas quantidades de ácido e/ou base foram adicionadas alternadamente para dissolver e precipitar o material repetidamente. Quando o gradiente de pH estabiliza após as adições de ácido ou base, ocorre um equilíbrio entre os estados molecular e ionizado do fármaco, permitindo assim o cálculo da sua solubilidade por equilíbrio de massa e carga com o qual é construído o perfil de solubilidade.

A titulação potenciométrica para HTZ foi conduzida pelo Chasing equilibrium method (Cheqsol) e para VAL pelo *Curve Fitting* method. Os resultados, obtidos por triplicata para HTZ e VAL, foram calculados e refinados no software Sirius T3 Refine, versão 1.1.2.0.

2.2.4 Análise estatística

A fim de avaliar a significância dos resultados e comparar os perfis de solubilidade dos métodos shake-flask e potenciométrico nos mesmos valores de pH, análises estatísticas como ANOVA ($p \leq 0,05$) e regressão linear foram aplicadas usando o software Minitab 18 Statistical (State College, Pensilvânia, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Validação de filtro

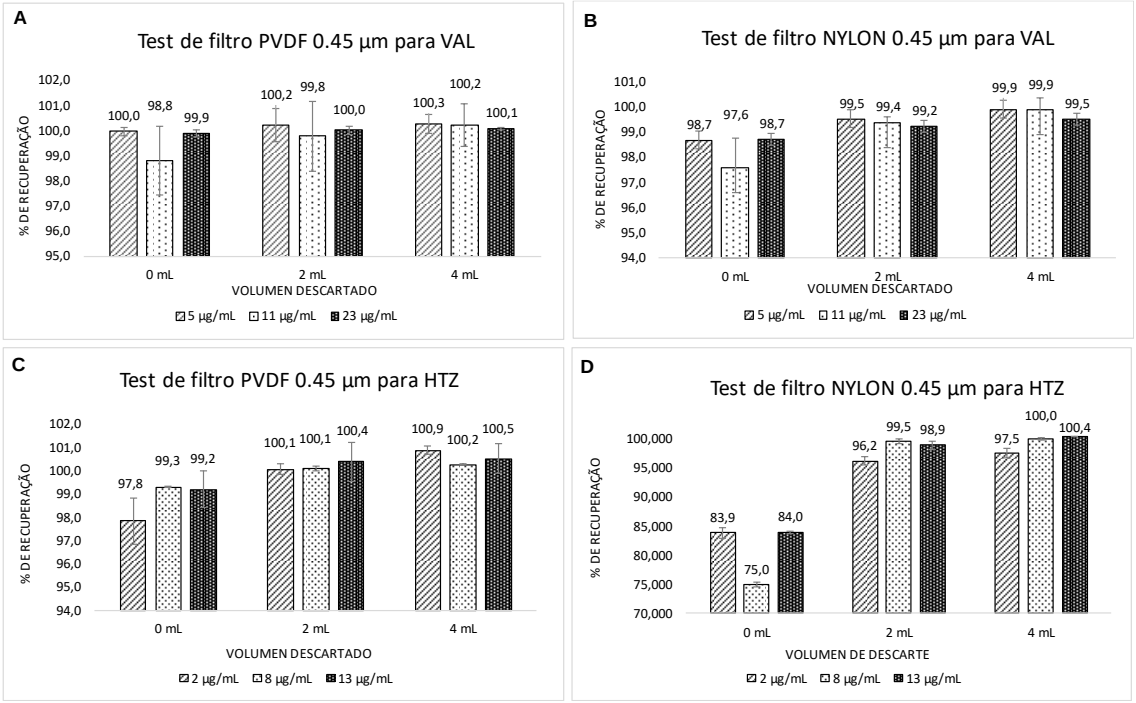
Para HTZ com 0 mL de descarte observou-se que ambos filtros retiveram o fármaco, cerca de 1% com PVDF e mais de 15% com NY, descartando 2 mL de descarte obteve-se 100% de recuperação com PVDF enquanto com NY houve 2% de retenção de HTZ em média. Para ambos fármacos se obteve 100% de recuperação com 4 mL de descarte, exceto para a concentração de 2 µg/mL que ainda apresentou um 2,5% de retenção (Figuras 2A e 2B). Isso pode ocorrer devido ao fenômeno físico de adsorção.

Para VAL uma alta variabilidade na média de recuperação foi observada quando não houve descarte de amostra tanto com PVDF como com NY na concentração de 11 µg/mL (Figuras 2C e 2D). A análise estatística mostra que não há diferença descartando 2 e 4 mL para os filtros PVDF e NY na média de recuperação da VAL.

Comprovou-se que 4 mL é o volume que satura todos os locais de adsorção ativos do filtro e subsequentemente, a filtração não diminui a concentração destes fármacos em solução, o que leva a menos variabilidade na porcentagem de recuperação de ambos fármacos.

De acordo com a análise estatística ANOVA, a média de recuperação da HTZ com filtro PVDF foi de 99,83 ± 1,00% e com filtro NY foi de 92,83 ± 9,00%. Como o valor de p calculado foi menor que 0,05 há diferenças significativas entre a recuperação dos fármacos nesses filtros. Para VAL, a média de recuperação foi de (99,99 ± 0,76%) com PVDF e (97,96 ± 2,66%) com NY, e a comparação das médias indicou diferenças significativas entre o uso desses filtros. Portanto, o filtro mais adequado para HTZ e VAL é o PVDF, sendo que este garante à recuperação completa destes fármacos no processo após a filtração.

Figura 2. (A) Teste de filtro de PVDF para HTZ, (B) Teste de filtro de NYLON para HTZ, (C) teste de filtro de PVDF para VAL, (D) Teste de filtro de NYLON para VAL

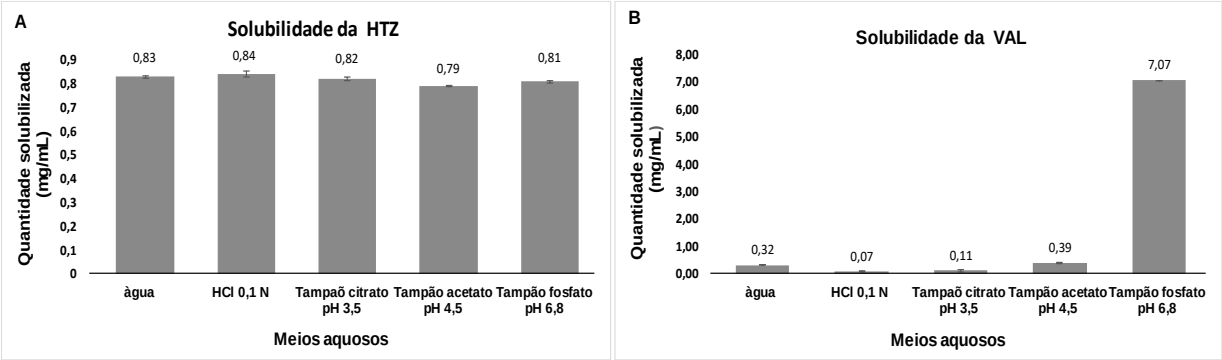


Certamente, nem todos os materiais filtrantes são adequados para o teste de solubilidade, além disso muitos materiais não dissolvidos podem influenciar os resultados. Por isso a importância de validar a recuperação do fármaco na amostra. De acordo com a afinidade das partículas, estas poderiam ser adsorvidas ou interagir com o material filtrante (KIEHM; DRESSMAN, 2008).

3.2 Solubilidade pelo método shake-flask

Após a quantificação das amostras submetidas ao método shake flask, pode-se perceber que a solubilidade da HTZ é independente do pH na faixa de 1,2 até 6,8 (Figura 3A). Para todos os meios aquosos, os resultados variaram entre 0,79 e 0,84 mg/mL portanto se confirma a HTZ como uma droga de baixa solubilidade, como demostrado pelo SCB. Por outro lado, VAL (dose máxima = 320 mg) apresenta baixa solubilidade em HCl 0,1M, tampão citrato pH 3,5 e tampão acetato pH 4,5, enquanto em tampão fosfato pH 6,8 a quantidade de fármaco solubilizado aumenta para 7,07 mg/mL (Figura 3B). Este comportamento dependente do pH pode ser explicado pela ionização da VAL em valores superiores a pH 4,5 (TOSCO et al., 2008)

Figura 3. Solubilidade das amostras HTZ e VAL pelo método do frasco agitado (150 rpm por 72h a 37ºC).



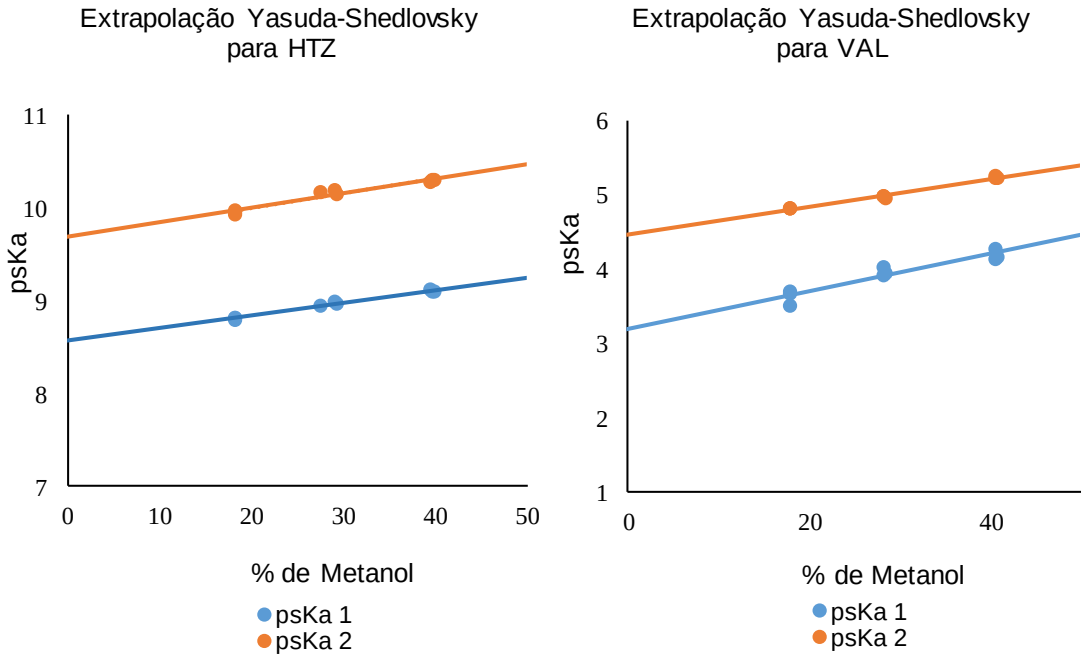
3.3 pKa e solubilidade por análise potentiométrica

Valores de correlação linear r^2 = 0,9872 e r^2 = 0,9604 foram obtidos para a psKa1 e psKa2 da HTZ. Para VAL, as correlações obtidas foram r^2 = 0,9303 e r^2 = 0,9468, respectivamente (Figura 4). Os valores extrapolados representam o valor de pKa em 100% de água e 0% de co-solvente orgânico (HOSSAIN et al., 2014). Como o teste foi realizado com diferentes concentrações de metanol, a extrapolação de Yasuda-Shedlovsky (AVDEEF; COMER; THOMSON, 1993) foi aplicada, resultando em valores de pKa de 8,57 ± 0,02 e 9,68 ± 0,04 para HTZ e 3,37 ± 0,06 e 4,48 ± 0,03 para VAL.

De acordo com os valores calculados de pKa, HTZ e VAL são compostos ácidos fracos. Neste caso, ambos foram dissolvidos e titulados até que as espécies neutras aparecessem como um precipitado.

Para HTZ, pouco antes da precipitação, a solução aquosa atinge condições supersaturadas relativas às espécies neutras. Neste ponto, pelo método CheqSol, a solução foi titulada de volta até que o composto começou a se dissolver novamente e atingiu um estado sub-saturação (STUART; BOX, 2005) . Com base nos princípios de balanço de massa e carga, e constante mudança entre o estado saturado e o não saturado, foi possível encontrar o valor de 772,1 μg/ mL a pH 5,6 como a solubilidade natural da HTZ onde este composto passou a ser ionizado (Figura 5 A e 5B).

Figura 4. A extrapolação de Yasuda-Shedlovsky por Sirius T3 refina o software versão 1.1.2.0 para HTZ e VAL



Após a titulação completa da amostra, o perfil de solubilidade e pH para HTZ mostra que no pH fisiológico (pH 1 - 6,8) não há diferença significativa nos valores de LogS, que determinou a solubilidade para HTZ em 0,79 mg/mL , e seus valores de pKa foram 9,96 e 8,87 (AVDEEF; BERGER; BROWNELL, 2000), isso é semelhante aos nossos resultados.

O perfil de solubilidade de VAL (Tabela I) mostra que tem uma baixa solubilidade sob condições não tamponadas ou ácidas e este aumento até a completa solubilização acima de pH 4,5 (PARK et al., 2010). A titulação de VAL foi conduzida pelo modelo de *Curve Fitting*, cujo pH é ajustado apenas em uma direção, e uma curva Bjerrum teórica representa a precipitação da amostra em relação ao pH (Figura 5 C e 5D). Neste caso, a solubilidade é ajustada manualmente aos pontos de dados selecionados. Este método foi recomendado para compostos amorfos (COMER et al., 2014).

No perfil obtido para VAL os valores de solubilidade são medidos apenas até o pH 4,84 e acima dele a solubilidade é influenciada pela formação de sais no meio de titulação, onde então calculada por extrapolação. Também é notado que VAL exibe um perfil de pH de solubilidade típico de um composto ácido fraco (AVDEEF, 2007).

Tabela 1. Solubilidade de HTZ e VAL (em termos de LogS e mg/mL) em diferentes valores de pH pelo método potenciométrico

pH	Hydroclorotiazida		Valsartana	
	LogS	mg/mL	LogS	mg/mL
1,2	-2,587	0,771	-3,908	0,054
3,5	-2,587	0,771	-3,515	0,133
4,5	-2,587	0,771	-2,454	1,530
6,8	-2,580	0,783	1,044	4,821

O método shake-flask e titrimétrico mostraram similaridade nos perfis de solubilidade de Val e HTZ na faixa de pH avaliada (Figura 6). As diferenças entre os resultados podem ser justificadas pelo meio empregado, o processo de filtração e os métodos de quantificação. Com auxílio do software Minitab 18 uma análise de correlação entre ambos os métodos mostrou um coeficiente de Pearson (R^2) de 0,966 com um valor de p= 0,0001, o que confirma que ambos resultados se correlacionam.

O método shake-flask trabalha com sistemas heterogêneos (solução saturada), onde a cautela é essencial com valores de pH que convertem a droga de sal em base ou ácido livre. Estas espécies podem revestir o sal, dando origem a um maior desvio nos resultados de solubilidade. Além disso, o método shake-flask requer, necessariamente, um método analítico (espectrofotométrico ou cromatográfico) para detectar e quantificar o fármaco solubilizado, cujos parâmetros e condições devem ser bem selecionados para fornecer dados confiáveis. Adicionalmente, neste método, a Nota Técnica 03 da ANVISA no Brasil requer justificativa para o meio aquoso utilizado de acordo com a natureza química, pKa e farmacocinética do fármaco.

Assim como o estudo da estabilidade a cada pH, a filtração e seleção do melhor material e porosidade para a membrana filtrante é imperativa, a fim de evitar interferências na quantificação da substância. Em muitos casos, onde há interações com os materiais filtrantes, a centrifugação é necessária como técnica de separação. Para ajustar os dados à linearidade do método analítico validado, às vezes, a diluição das amostras filtradas é necessária. Assim, apesar dos resultados obtidos, o shake flask pode ser considerado um método laborioso, dando os mesmos dados de solubilidade fornecidos pela titulação potenciométrica (AVDEEF et al., 2016).

Figura 5. O perfil de pH da solubilidade e curva de titulação de perseguição de HTZ; perfil de solubilidade-pH e titulação de ajuste de curva de VAL. Fonte: Sirius T3 software

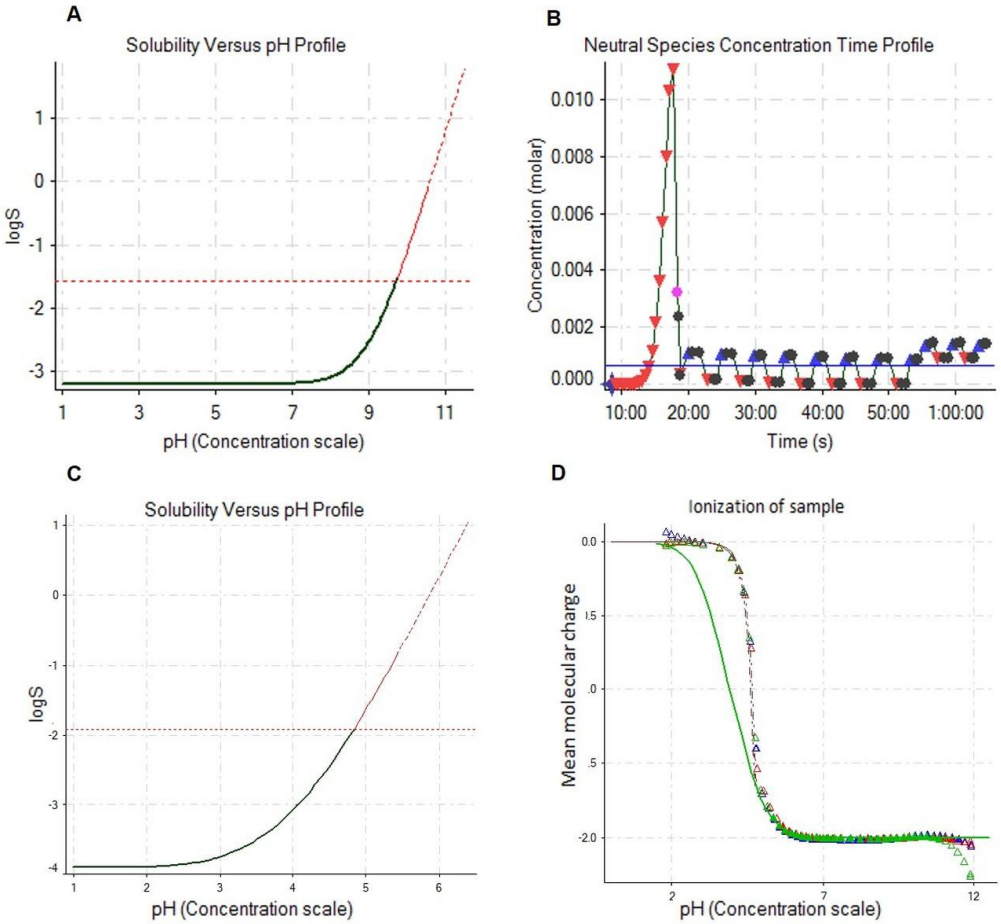
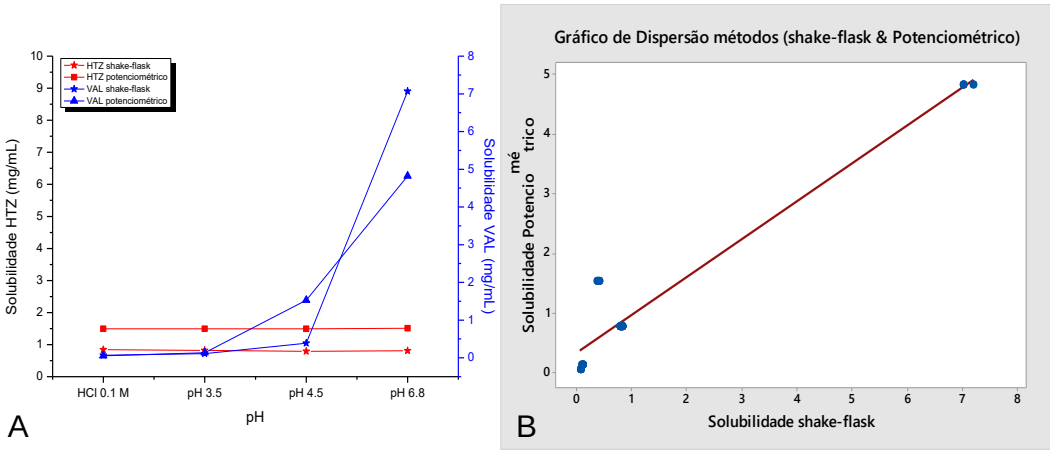


Figura 6. Perfis de solubilidade (A) e gráfico de dispersão dos resultados de solubilidade de HTZ e VAL por métodos shake-flask e titulação potenciométrica (mg/mL) (B)



Além disso, o método potenciométrico pode analisar, em uma única execução, dados relacionados à solubilidade cinética, solubilidade natural e pH natural, o que permite conhecer a distribuição das espécies iônicas das moléculas na faixa de pH que a análise foi realizada. Ao mesmo tempo, o sistema é capaz de medir outras propriedades, como a log P, que é útil para determinar a lipofilicidade e a permeabilidade do fármaco (FROST et al., 2016 ; CARON; ERMONDI, 2017).

O perfil de solubilidade e pH, fornecido pelo método potenciométrico pode ser utilizado como alternativa ao método do shake flask, uma vez que a correlação é adequada, como foi demonstrado com a HTZ e VAL. Os resultados foram obtidos em um sistema totalmente automático, sem necessidade de filtração ou diluição da amostra, nenhum equipamento dedicado à quantificação. A análise de titulação pode ser realizada em uma hora no máximo, permitindo a rápida determinação da solubilidade do fármaco com baixo custo. Assim, de maneira mais rápida, o método potenciométrico pode ser indicado como ferramenta para determinar a partir do estágio de desenvolvimento de um novo fármaco a solubilidade, sua classificação biofarmacêutica e, posteriormente, em estágios de formulação e desenvolvimento analítico dos produtos finais, como métodos de dissolução, por exemplo.

4 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no teste de solubilidade pelos métodos de shake flask e titulação potenciométrica, uma boa correlação entre os dois métodos pode ser estabelecida. Portanto, o uso de métodos potenciométricos devem ser considerados para a determinação da solubilidade do fármaco, uma vez que utiliza um sistema automático que fornece resultados confiáveis em um curto período de tempo, com baixo custo e sem necessidade de procedimentos complementares. Tal como quantificação de amostras por métodos analíticos, diluição ou filtração.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVDEEF, A. Solubility of sparingly-soluble ionizable drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 568–590, 2007.

AVDEEF, A. et al. Equilibrium solubility measurement of ionizable drugs – consensus recommendations for improving data quality. **ADMET and DMPK**, v. 4, n. 2, p. 117, 2016.

AVDEEF, A.; BERGER, C. M. pH-metric solubility.: 3. Dissolution titration template method for solubility determination. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 4, p. 281–291, 2001.

AVDEEF, A.; BERGER, C. M.; BROWNELL, C. pH-metric solubility. 2: Correlation between the acid-base titration and the saturation shake-flask solubility-pH methods. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 1, p. 85–89, 2000.

AVDEEF, A.; COMER, J. E. A.; THOMSON, S. J. pH-Metric log P. 3. Glass Electrode Calibration in Methanol-Water, Applied to pKa Determination of Water-Insoluble Substances. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 1, p. 42–49, 1993.

BOX, K. et al. High-throughput measurement of pKa values in a mixed-buffer linear pH gradient system. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 4, p. 883–892, 2003.

CARON, G.; ERMONDI, G. Updating molecular properties during early drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 6, p. 835–840, 2017.

CDER/FDA. Guidance for Industry, Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. **Center for Drug Evaluation and Research**, 2015.

COMER, J. et al. The intrinsic aqueous solubility of indomethacin. **Admet & Dmpk**, v. 2, n. 1, p. 18–32, 2014.

FROST, L. et al. Synthesis of diacylated γ-glutamyl-cysteamine prodrugs, and in vitro evaluation of their cytotoxicity and intracellular delivery of cysteamine. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 109, n. 2, p. 206–215, 2016.

HOSSAIN, M. F. et al. UV-Metric , pH-Metric and RP-HPLC Methods to Evaluate the Multiple pKa Values of a Polyprotic Basic Novel Antimalarial Drug Lead , Cyclen Bisquinoline. **Modern Chemistry & Applications**. v. 2, n. 4, 2014.

KIEHM, K.; DRESSMAN, J. B. Evaluation of drug adsorption to membrane filters under biowaiver test conditions. **Dissolution Technologies**, v. 15, n. 4, p. 13–17, 2008.

LÖBENBERG, R.; AMIDON, G. L. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 3–12, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - MS - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Guia para elaboração de relatorio técnico de estudo de biodisponibilidade relativa/bioequivalencia**, 2003.

PARK, Y. J. et al. Improved pH-independent dissolution and oral absorption of valsartan via the preparation of solid dispersion. **Archives of Pharmacal Research**, v. 33, n. 8, p. 1235–1240, 2010.

RANJAN, S. et al. Three new hydrochlorothiazide cocrystals: Structural analyses and solubility studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1133, p. 405–410, 2017.

SILVA, M. S. et al. Comparação da solubilidade de diferentes amostras de glibenclamida pelo método “shake-flask”. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 97, n. 3, p. 78–90, 2016.

STUART, M.; BOX, K. Chasing equilibrium: Measuring the intrinsic solubility of weak acids and bases. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 4, p. 983–990, 2005.

TOSCO, P. et al. Physicochemical profiling of sartans: A detailed study of ionization constants and distribution coefficients. **Helvetica Chimica Acta**, v. 91, n. 3, p. 468–482, 2008.

TSUME, Y. et al. The Biopharmaceutics Classification System: Subclasses for in vivo predictive dissolution (IPD) methodology and IVIVC. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57, n. 1, p. 152–163, 2014.

CAPÍTULO II

Desenvolvimento de metodologia de cromatografia liquida de alta eficiência (HPLC) para quantificação da dissolução da hidroclorotiazida 12,5 mg e valsartana 160 mg usando o conceito de *Quality by Design*

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC) PARA QUANTIFICAÇÃO DA DISSOLUÇÃO DA HIDROCLOROTIAZIDA E VALSARTANA USANDO O CONCEITO DE *QUALITY BY DESIGN*

RESUMO

Sendo a dissolução um ensaio crítico na avaliação da qualidade e desempenho de uma formulação, é indispensável contar com uma metodologia adequada para a quantificação da porcentagem dissolvida de fármacos no meio empregado no teste. Com esse objetivo, foi desenvolvido um novo metodo de quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) através do software *Fusion*®, o qual baseia-se nos princípios do *Quality by Design* (QbD), abordagem sistemática de desenvolvimento baseada na compreensão da operação e das variáveis que afetam o método e alinhada com análise estatística multivariada. A etapa inicial consistiu em uma triagem (*screening*), um delineamento experimental através do qual foram selecionadas as melhores condições de separação e identificados os parâmetros críticos do método. A partir dessas condições preliminares, foi realizado um segundo delineamento experimental para otimização das variáveis do método e configuração do seu *Design Space*. Dessa forma, o novo método foi delineado em uma área na qual já foi delimitada sua zona de robustez. Posteriormente, a validação do método prosseguiu, conforme as diretrizes do ICH Q2 (R1) e RDC 166/17 para assegurar que o atendimento às exigências da aplicação analítica pretendida, bem como a confiabilidade dos resultados (ANVISA – RDC 166/17).

Palavras chave: HPLC, Quality by Design, Hidroclorotiazida, Valsartana, cromatografia

1 INTRODUÇÃO

Por décadas o desenvolvimento de métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi realizado na abordagem de tentativa e erro, este sistema envolve a modificação de um fator por vez, enquanto os outros se mantem constantes, o que certamente pode nos conduzir às condições desejadas, mas, que nem sempre serão as ideais (KUMAR et al., 2015). Esta abordagem tradicional apresenta desvantagens, tais como, a grande demanda de tempo, dinheiro e trabalho, sendo crítica para corrigir erros imprevisíveis. Um grande número de variáveis precisam ser cuidadosamente identificados, estudados e controlados para superar essas dificuldades (SAHU et al., 2018).

No desenvolvimento de métodos de dissolução é fundamental a exata quantificação dos ativos, pois muitas vezes a metodologia empregada para avaliar o teor não é adequada, dado que na dissolução o pH dos meios pode representar uma interferência na detecção dos picos ou na estabilidade do cromatograma (GUMIENICZEK et al., 2013; ÇELEBIER et al., 2010).

A *Food and Drug Administration* (FDA) e a *Intenational Conference on Harmonization* nas guias Q8 (ICH, 2009) , Q9 (ICH, 2013), Q10 (ICH, 2008) e Q11 (ICH, 2012), definem o *Quality by Design* (QbD) como: “uma abordagem sistemática para o desenvolvimento que começa com objetivos predefinidos e enfatiza a compreensão do produto e controle de processo baseado em ciência sólida e gerenciamento do risco de qualidade” (ROZET et al., 2013).

O delineamento de experimentos (DOE) é parte fundamental do QbD, quando usada na cromatografia líquida o DOE permite a identificação e a otimização de fatores significativos de forma mais eficaz e com menos ensaios (HIBBERT, 2012). Esse delineamento é classificado em duas categorias : a triagem ou *screening* e a otimização, ambas etapas com o auxílio de ferramentas estatísticas podem estimar os efeitos das respostas das variáveis estudadas (KRISHNA et al., 2016, SAHU et al., 2018).

Com o QbD baseado na correta identificação dos Atributos Críticos de Qualidade (ACQ) da adequabilidade do método ou *system suitability* (resolução, assimetria, pratos teóricos) e confiabilidade (exatidão, precisão, especificidade, etc.)

Assim, considerando a variabilidade desses, focado também na definição de uma faixa de operação dentro da qual se assegura a qualidade dos resultados equivalente ao *Design Space* (DS) o qual outorga suporte em obter um método robusto desde o início do desenvolvimento do método (DEBRUS; GUILLARME; RUDAZ, 2013; ROZET et al., 2013 ; PARR; SCHMIDT, 2018).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método cromatográfico baseado no Quality by Design, para que o mesmo possa ser utilizado na quantificação da porcentagem dissolvida de hidroclorotiazida (HTZ) e valsartana (VAL) nos ensaios de dissolução.

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 Material

Hidroclorotiazida (Pureza 100,1 % base seca) e valsartana (101,2 % como base seca) foram fornecidas por Aché Laboratorios S.A. (SP, Brasil). A água foi purificada usando sistema Milli-Q (Millipore, Alemanha). Formiato de amônio (97 %) (Sigma-Aldrich Brasil), acetonitrila e metanol grau HPLC (Merck, Brasil).

2.2 Método

2.2.1 Instrumentação

Foi utilizado equipamento Waters Acquity UHPLC (Waters Corporation, Milford, United States), equipado com um detector de arranjo de fotodiodos (DAD) e os dados foram coletados através do software EMPOWER 3. As quatro colunas avaliadas foram: Acquity UPLC HSS PFP 1,8 µm, 2,1 x 100 mm; ACQUITY UPLC CSH C18 1,7 µm, 2,1x 100 mm; ACQUITY UPLC CSH Phenyl- Hexyl 1,7 µm, 2,1 x 100 mm; ACQUITY UPLC BEH C8 1,7 µm, 2,1 x 100 mm, fornecidas pela Waters Technologies do Brasil LTDA (Waters Corporation, Barueri, São Paulo).

2.2.2 Condições analíticas

O método foi desenvolvido em três etapas (Figura 1) que inclui também a validação. A primeira delas foi a triagem ou *screening*, na qual foram avaliados a força do solvente orgânico na fase móvel, utilizando para isso substancias de diferentes polaridades, o uso de soluções tampão abrangendo uma ampla faixa de pH, e quatro tipos de colunas de variada afinidade, conforme descrito na Tabela 1. Os fatores que se mantiveram constantes estão descritos na Tabela 2. O tipo do delineamento empregado nesta etapa foi *A* e *G Optimal Process* (Modelo Robusto) (CORNEL, 2002) e o modelo do delineamento foi o quadrático, 2 pontos centrais e 4 pontos de graus de liberdade para a falta de ajuste, resultando em 43 experimentos (Tabela 3).

Figura 1. Estrutura analítica do desenvolvimento de método cromatográfico

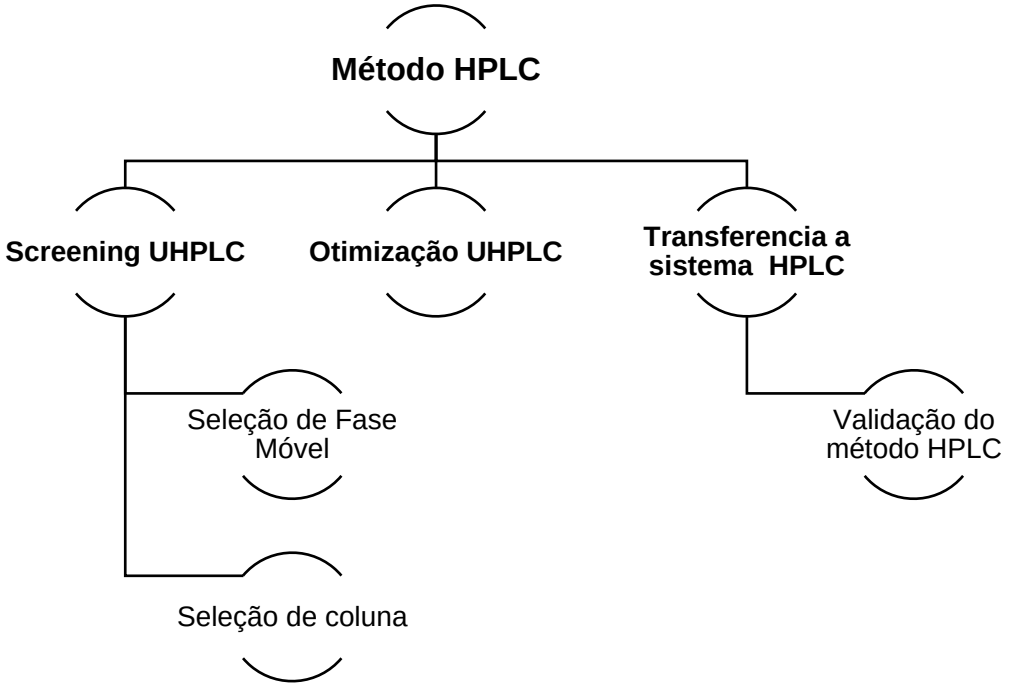


Tabela 1. Variáveis do delineamento experimental na etapa da triagem

Fatores	Níveis
Tipo de solvente orgânico	Acetonitrila, Metanol
Tempo de gradiente (minutos)	2,0 até 5,0
pH	2,6; 5,40; 10,20
Tipo de Coluna	UPLC HSS PFP 1,8 µm ACQUITY UPLC CSH C18 1,7 µm ACQUITY UPLC CSH™ Phenyl- Hexyl 1,7 µm ACQUITY UPLC BEH C8 1,7 µm

Tabela 2. Constantes do experimento na etapa de triagem do desenvolvimento do método em sistema UHPL

Nome da Constante	Valor da constante
Fluxo da fase móvel (mL/minuto)	0,35
Volume de injeção (µL)	1,0
Temperatura da coluna (°C)	35,0
Comprimento de Onda (nm)	230,0
Tempo de espera fase orgânica (%)	15,0
Tempo de espera final (minutos)	1,0
Tempo de espera fase orgânica final (minutos)	70,0
Tempo da lavagem de coluna (minutos)	2,0
Lavagem da coluna fase orgânica (%)	99,0

Com base nos resultados obtidos na etapa de triagem iniciou-se a segunda etapa de otimização do método. As variáveis avaliadas estão descritas na Tabela 4, nesta etapa foi empregado o delineamento de Superfície de resposta – Composto Central Completo, de modelo quadrático, resultando em 30 experimentos, com 3 pontos centrais, todos detalhados na Tabela 5. As respostas avaliadas foram número de picos, resolução, assimetria e altura de pico, segundo as especificações da Farmacopeia Americana (USP 39 NF 34, EUA).

Tabela 3. Matriz do delineamento experimental na etapa da triagem

Ensaio N°	Tipo de solvente orgânico	Tempo de gradiente	pH	Tipo de coluna
1	Acetonitrila	2,8	2,6	CSH C18
2	Acetonitrila	5,0	2,6	BEH C8
3	Acetonitrila	2,0	2,6	BEH C8
4	Acetonitrila	5,0	2,6	HSS PFP
5	Acetonitrila	3,5	2,6	CSH Fenil Hexil
6	Acetonitrila	3,5	5,4	BEH C8
7	Acetonitrila	3,5	5,4	CSH Fenil Hexil
8	Acetonitrila	3,5	5,4	HSS PFP
9	Acetonitrila	3,5	5,4	CSH C18
10	Acetonitrila	5,0	5,4	CSH C18
11	Acetonitrila	2,0	5,4	CSH C18
12	Acetonitrila	2,0	5,4	HSS PFP
13	Acetonitrila	3,5	5,4	CSH C18
14	Acetonitrila	3,5	5,4	BEH C8
15	Acetonitrila	3,5	5,4	CSH Fenil Hexil
16	Acetonitrila	3,5	5,4	HSS PFP
17	Acetonitrila	3,5	10,2	CSH C18
18	Acetonitrila	2,8	10,2	BEH C8
19	Acetonitrila	4,3	10,2	BEH C8
20	Acetonitrila	5,0	10,2	CSH Fenil Hexil
21	Acetonitrila	2,0	10,2	CSH Fenil Hexil
22	Acetonitrila	5,0	10,2	CSH Fenil Hexil
23	Acetonitrila	2,0	10,2	CSH Fenil Hexil
24	Metanol	2,0	2,6	HSS PFP
25	Metanol	3,5	2,6	CSH C18
26	Metanol	5,0	2,6	CSH Fenil Hexil
27	Metanol	5,0	2,6	CSH Fenil Hexil
28	Metanol	2,0	2,6	CSH Fenil Hexil
29	Metanol	4,3	2,6	BEH C8
30	Metanol	5,0	5,4	HSS PFP
31	Metanol	3,5	5,4	BEH C8
32	Metanol	3,5	5,4	HSS PFP
33	Metanol	3,5	5,4	CSH Fenil Hexil
34	Metanol	3,5	5,4	CSH C18
35	Metanol	3,5	5,4	HSS PFP
36	Metanol	3,5	5,4	CSH Fenil Hexil
37	Metanol	3,5	5,4	BEH C8
38	Metanol	3,5	5,4	CSH C18
39	Metanol	5,0	10,2	CSH C18
40	Metanol	2,0	10,2	CSH C18
41	Metanol	5,0	10,2	BEH C8
42	Metanol	3,5	10,2	CSH Fenil Hexil
43	Metanol	2,0	10,2	BEH C8

Tabela 4. Variáveis para o delineamento experimental na etapa de otimização do desenvolvimento

Fatores	Níveis
Fluxo de fase móvel (mL/minuto)	0,35 até 5,00
% final do solvente orgânico	70 até 95
Temperatura da coluna (°C)	35,0 até 50,0
pH	4,77 até 6,01

2.2.3 Transferência de método para sistema HPLC

A conclusão da etapa de otimização do método em um sistema de UHPLC, deu passo a terceira etapa: a transferência do método para sistema HPLC. Foram necessários ajustes no volume de injeção, fluxo da fase móvel e tempo de gradiente para assegurar um bom desempenho do método em um sistema diferente daquele no qual fora desenvolvido, isso foi realizado com o auxílio do software online Acquity UPLC Columns Calculator 2.0 (Waters, United States).

2.2.4 Preparação de amostras

Foram preparadas soluções estoque de HTZ e VAL, individualmente, em metanol, ambas na concentração de 1,0 mg/mL. A seguir, foram feitas diluições em tampão pH 6,8 para obtenção de uma solução mista que tivesse a concentração de 12,5 µg/mL de HTZ e 160 µg/mL de VAL.

2.2.5 Software

Para o desenvolvimento do método foi empregado o software *Fusion Method Development*™ de S-Matrix (California, USA) e os resultados gerados foram tratados pelo mesmo software.

Tabela 5. Matriz do delineamento experimental na etapa da otimização no desenvolvimento do método em UHPLC

Ensaio N°	Fluxo da fase móvel (mL/minuto)	% final de solvente orgânico	Temperatura do forno do equipamento	pH
1	0,500	95,0	35,0	4,77
2	0,500	70,0	35,0	4,77
3	0,350	95,0	35,0	4,77
4	0,350	70,0	35,0	4,77
5	0,350	70,0	35,0	4,77
6	0,500	70,0	35,0	4,77
7	0,350	95,0	35,0	4,77
8	0,425	82,5	35,0	5,50
9	0,350	70,0	35,0	6,01
10	0,500	70,0	35,0	6,01
11	0,350	95,0	35,0	6,01
12	0,500	95,0	35,0	6,01
13	0,425	82,5	42,5	4,77
14	0,350	82,5	42,5	5,50
15	0,425	82,5	42,5	5,50
16	0,425	82,5	42,5	5,50
17	0,425	82,5	42,5	5,50
18	0,500	82,5	42,5	5,50
19	0,425	70,0	42,5	5,50
20	0,425	95,0	42,5	5,50
21	0,425	82,5	42,5	6,01
22	0.350	70,0	50,0	4,77
23	0,500	70,0	50,0	4,77
24	0.350	95,0	50,0	4,77
25	0,500	95,0	50,0	4,77
26	0,425	82,5	50,0	5,50
27	0,350	95,0	50,0	6,01
28	0,500	95,0	50,0	6,01
29	0,500	70,0	50,0	6,01
30	0,350	70,0	50,0	6,01

2.2.6 Validação do método

O método foi otimizado e validado de acordo com as normas ICH Q2 (R1). Os parâmetros avaliados foram linearidade, precisão, exatidão, robustez. A validação foi conduzida em sistema HPLC no equipamento Merck Hitachi Elite Lachrom 2400.

2.2.6.1 Adequabilidade do sistema (System suitability)

Soluções de 80 µg/mL de VAL e 6,25 µg/mL de HTZ foram injetadas no equipamento em seis réplicas. A partir destes dados foram avaliadas as áreas dos picos, a assimetria e o número de pratos teóricos.

2.2.6.2 Seletividade

Para avaliar a seletividade do método foram comparadas as retas de concentração *versus* resposta da solução padrão e da solução da amostra fortificada com padrão tal qual está disposto na ICH Q2 (R1).

2.2.6.3 Linearidade

A partir de uma solução estoque de 1,0 mg/mL para cada um dos fármacos utilizados, foram feitas diluições apropriadas com tampão fosfato pH 6,8 de tal forma que se obtiveram concentrações na faixa de 2,0 a 28,0 µg/mL para HTZ e 10 a 170 µg/mL para VAL em triplicata. Em seguida, foram injetadas no sistema HPLC. A curva de calibração foi construída com as áreas dos picos resultante a cada concentração avaliada.

2.3 Análise estatística

As respostas obtidas nas etapas de triagem e otimização foram analisadas pelo software *Fusion Method Development*™ (S-Matrix®, California, USA). Os dados da validação do método foram avaliados pelo software *Action Stat* 3 Ink, (Statcamp, São Carlos, SP) conforme os critérios de validação de métodos analíticos dispostos pela ICH Q2.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Etapa da Triagem *(screening)* no sistema UHPLC

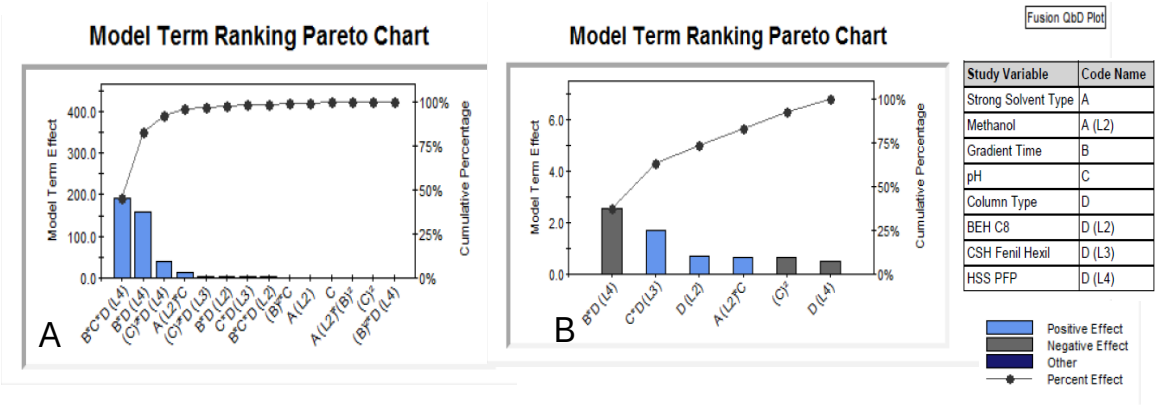
Na etapa da triagem foram feitas 43 corridas, as especificações das respostas esperadas estão descritas na Tabela 6, para as quais foram estabelecidos limites. Posteriormente o software *Fusion*™ avaliou estatisticamente os efeitos e interações, sendo adequado para todos os fatores o modelo quadrático.

Tabela 6. Respostas esperadas na etapa de triagem

Resposta	Limite Inferior	Limite Superior
N° de picos com assimetria menor ou igual a 1,2	2	3
N° de picos com altura maior que 20000 mUA	2	3

Os gráficos de Pareto mostram que os fatores de maior impacto na resolução dos picos (Figura 2A), foram o tempo de início do gradiente e pH, enquanto que para a assimetria (Figura 2B) a interação entre tempo de gradiente e coluna (D L4) efeito negativo acumulado superior al 50 %, o que se vê refletido em uma assimetria superior ao valor esperado.

Figura 2. Gráfico de Pareto para a etapa da triagem (A) Resolução e (B) Assimetria



Fonte: *Fusion QbD* Software

A coluna CSH C18 mostrou ter um efeito negativo na assimetria dos cromatogramas conforme observado na Figura 2B, após a avaliação visual dos picos obtidos observou-se que com a coluna CSH Phenyl Hexil havia presença de picos

partidos para algumas corridas com metanol, por outro lado com a BEH C8 os picos cumpriam com assimetria e resolução com ACN, porém com metanol observou-se que a resolução era comprometida de forma negativa, assim a coluna ACQUITY UPLC BEH C8 1,7 µm foi selecionada e a acetonitrila como solvente orgânico.

Tabela 7. Gradiente no sistema de UHPLC na etapa de triagem

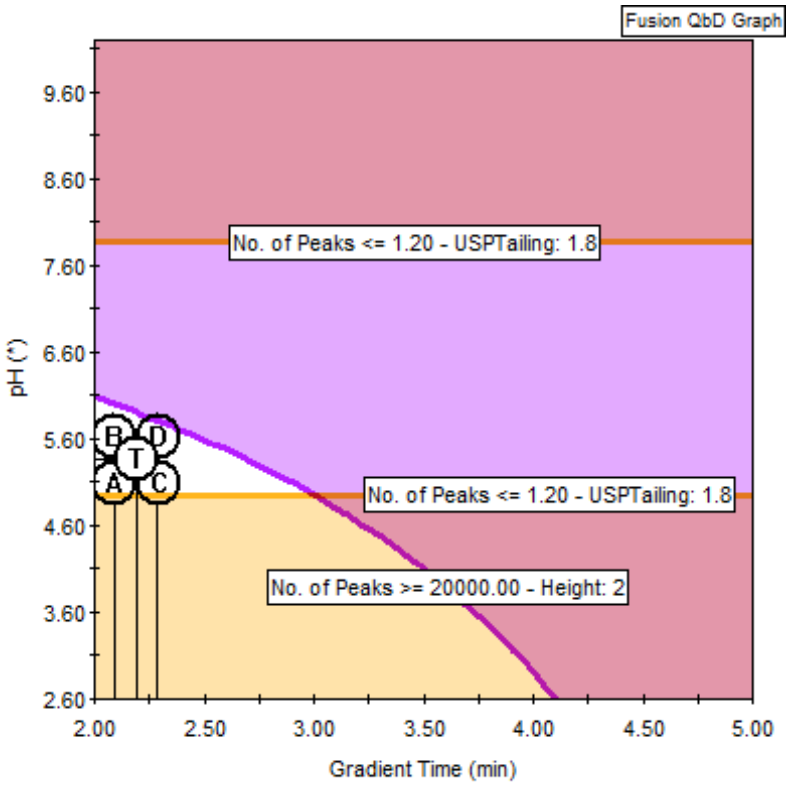
Tempo	Fluxo (mL/minuto)	Tampão formiato de amônio (%)	Acetonitrila (%)
inicial	0,4	15,0	85,0
0,2	0,4	15,0	85,0
2,4	0,4	95,0	5,0
3,4	0,4	95,0	5,0
3,9	0,4	99,0	1,0
5,9	0,4	99,0	1,0

Com os resultados obtidos na otimização, foi elaborado um gráfico de Design space (DS) em função do pH (eixo “y”) e o tempo de início do gradiente (eixo “x”) (Figura 3) que foram os fatores com maior impacto positivo em obter as respostas (número de picos, assimetria e altura) especificadas no início do desenvolvimento. A área da cor branca expressa a região de confiança, na qual foram estabelecidos limites e um ponto central (Tabela 8) onde é possível obter as melhores condições de pH e tempo de início do gradiente para o método cromatográfico.

Tabela 8. Parâmetros para o Design Space da etapa da triagem no desenvolvimento em sistema UHPLC

Eixo	Nome	Lim. Inferior	Lim. Superior	Ponto central
X	Tempo de gradiente	2,10	2,29	2,20
Y	pH	5,10	5,63	5,36

Figura 3. *Design space* da etapa de triagem para o desenvolvimento em sistema UHPLC



Fonte: *Fusion QbD* Software

Dentro da região de confiança estabelecido pelo DS foi estabelecido um conjunto de parâmetros para testar a robustez do método (Tabela 9), em função dos quais foi feita uma simulação para prever as respostas dentro desta região no ponto T, as respostas previstas dentro do design space (Tabela 10) estão dentro dos limites de confiança estabelecidos.

Tabela 9. Condições cromatográficas simuladas no *Design Space* na triagem

Ponto	Tempo de gradiente	pH	Solvente Organico	Coluna
A	2,1	5,10	Acetonitrila	BEH C8
B	2,1	5,63	Acetonitrila	BEH C8
C	2,29	5,10	Acetonitrila	BEH C8
D	2,29	5,63	Acetonitrila	BEH C8
T	2,20	5,36	Acetonitrila	BEH C8

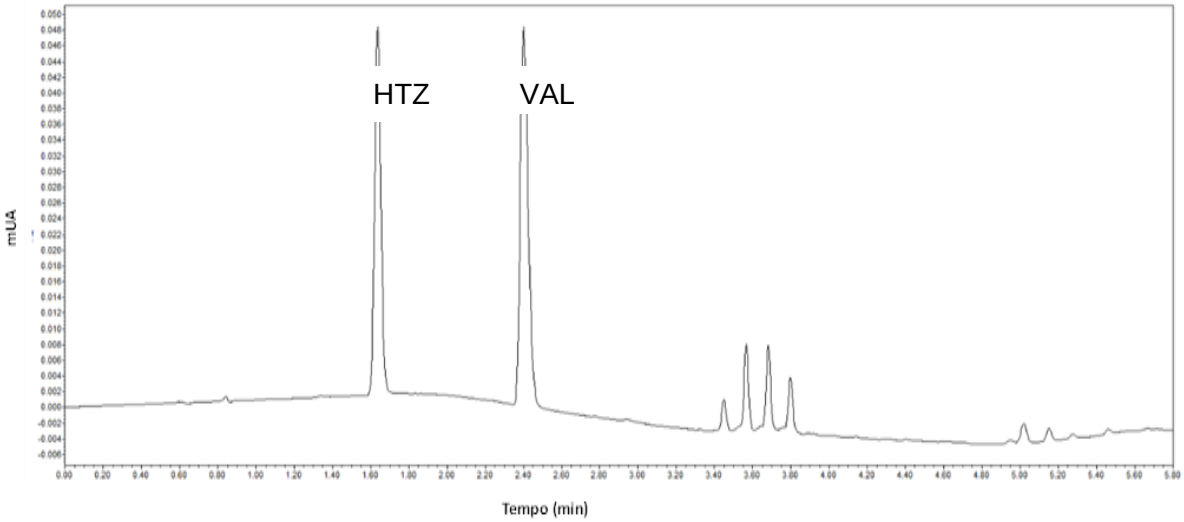
Tabela 10. Respostas previstas no ponto T, através do *Design space* para HTZ e VAL

Nome da resposta	Valor da resposta prevista	-2 α limite de confiança.	+2 α limite de confiança.
Número de Picos	1,920	1,837	2,002
N° de picos com assimetria menor o igual a 1,2	1,933	1,253	2,613
N° de picos com altura maior que 20000	2,068	1,977	2,159

O cromatograma no sistema UHPLC para HTZ com um tempo de retenção de 1,65 minutos e VAL aos 2,42 minutos (Figura 4). Na cromatografia em fase reversa o grau de ionização influencia sob a retenção dos analitos na fase estacionária. Considerando-se que para HTZ logP= -0,58 e para VAL logP= 5,27, vários artigos reportam que o incremento no logP significa no aumento do tempo de retenção (SMAJIĆ; VUJIĆ, 2018) o que explica o fato da VAL ter um maior tempo de retenção. Portanto conhecer esta característica em diferentes pH e variadas proporções de solvente orgânico é fundamental para determinar as condições ótimas de separação (KALARIYA et al., 2017).

Embora os picos de HTZ e VAL cumpram com as especificações esperadas, no cromatograma (Figura 4) observou-se que a estabilidade da linha base não é adequada, podendo interferir na quantificação dos fármacos, principalmente nos perfis de dissolução naqueles pontos onde a concentração dos fármacos é muito baixa (primeiros 15 minutos).

Figura 4. Cromatograma da melhor resposta da triagem no sistema UHLPC para os picos de HTZ (1,65 minutos) e VAL (2,42 minutos) com coluna BEH C8



Fonte: *Fusion QbD* Software

A triagem indicou como resultado para uma boa separação dos picos da HTZ e VAL Acetonitrila como solvente orgânico, tampão formiato de amônio com valor de pH de 4,77 a 6,01 e coluna ACQUITY UPLC BEH C8 1,7 µm 2,1 por 100 mm.

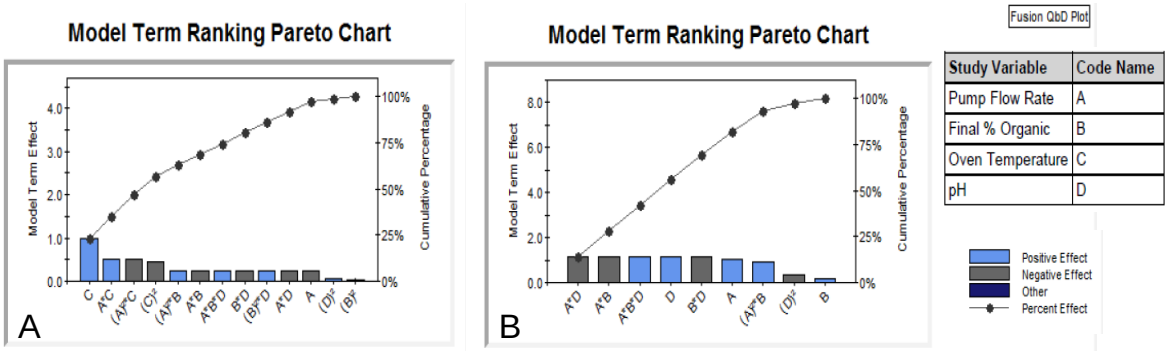
Na busca de um método robusto KALARIYA et al., 2017 observaram que mudanças na temperatura ou na composição da fase móvel, tinham um efeito combinado nas mudanças da seletividade no HPLC, assim como, no comportamento de retenção dos analitos. Esses parâmetros devem ser considerados na otimização da seletividade do método (ÇELEBIER et al., 2010 ; KUMAR et al., 2015 ; SHAALAN et al., 2017). O pH é outro fator cuja mudança ocasiona variações no grau de ionização dos fármacos, afetando principalmente a interação com a fase estacionária que conjuntamente com a temperatura da coluna, afeta o tempo de retenção (SMAJIĆ; VUJIĆ, 2018).

Considerando ainda que alguns parâmetros não foram avaliados e que poderiam ter interferência no método cromatográfico (temperatura da coluna, o tempo final do gradiente da fase móvel e um pH mais ajustado) uma nova etapa de otimização foi realizada.

3.2 Etapa de otimização no sistema UHPL

Os resultados da análise estatística das respostas nesta etapa mostram que a temperatura da coluna teve maior impacto na altura dos picos (Figura 5A), sendo que para a assimetria (Figura 5B) os fatores e as suas interações contribuem na mesma proporção à exceção da porcentagem final de fase orgânica cuja contribuição é menor. O fluxo da fase móvel e a porcentagem final da fase orgânica foram definidos em 0,4 mL/min e 95 % respectivamente nesta etapa, estes parâmetros foram selecionados em função da melhor resposta prevista pelo software *Fusion*.

Figura 5. Gráfico de Pareto para a etapa da triagem (A) Altura de picos; (B) Assimetria



Fonte: *Fusion QbD* Software

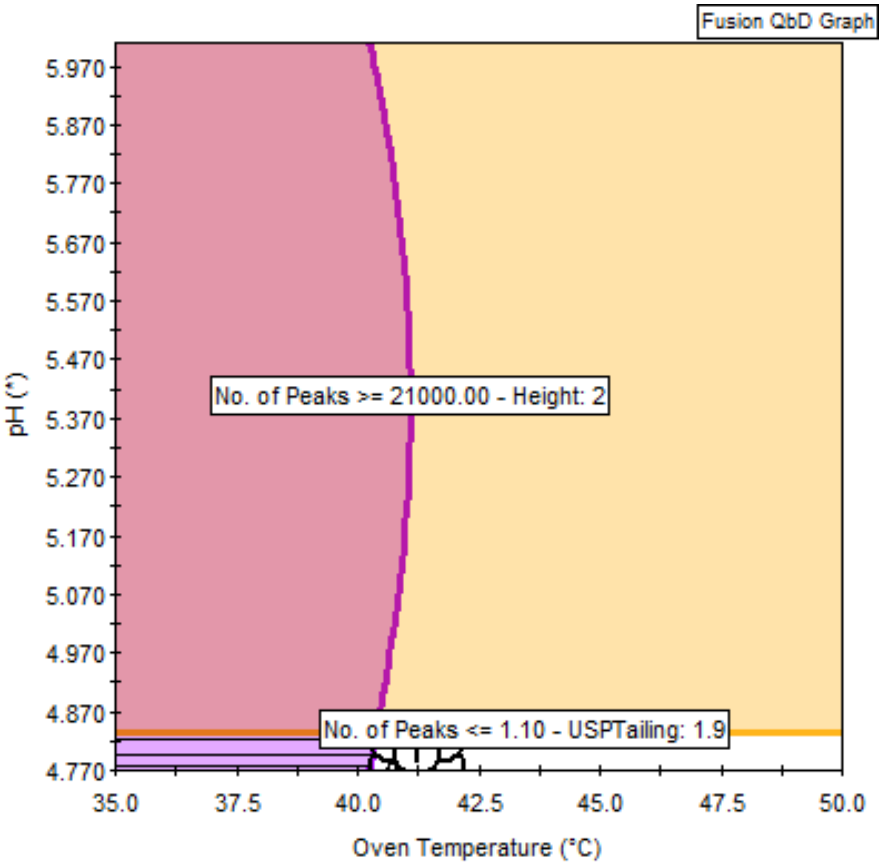
Dado que a temperatura da coluna influencia significativamente na altura dos picos e que está diretamente relacionada com os pratos teóricos, foi construído um segundo gráfico de DS (Figura 6) para a etapa de otimização em função da temperatura da coluna (Eixo “x”) e o pH da fase aquosa (eixo “y”) cujas especificações e limites são descritos na Tabela 11. As respostas esperadas foram: 2 picos com assimetria menor ou igual a 1,10 e altura de pico maior que 21000 unidades mUA.

Tabela 11. Parâmetros avaliados no Design Space na otimização

Eixo	Nome	Lim. Inferior	Lim. Superior	Ponto central
X	Temperatura do forno	40,7	41,7	41,2
Y	pH	4,775	4,823	4,799

O DS obtido segundo a otimização fornece um espaço onde foram delimitados 5 pontos (A, B, C, D e T) cada um com suas condições específicas (Tabela 12). Onde o ponto T estabelece as condições ideais para garantir a robustez do método dentro da região de confiança (DS) obtido na otimização.

Figura 6. *Design Space* na otimização do método no UHPLC



Fonte: Fusion QbD

Tabela 12. Corridas de verificação nos pontos do *Design space* na etapa da otimização do método no sistema UHPLC

Ponto	Temperatura da coluna	pH	Fluxo da fase móvel	% final fase orgânica
A	40,7	4,775	0,400	95
B	40,7	4,823	0,400	95
C	41,7	4,77	0,400	95
D	41,7	4,823	0,400	95
T	**41,2**	**4,799**	**0,400**	**95**

O método de gradiente com acetonitrila como solvente orgânico, tampão formiato de amônio pH 4,79 como solvente aquoso, coluna ACQUITY UPLC BEH C8 1,7 µm, 2,1 por 100 mm, temperatura de coluna de 40 °C, fluxo de fase móvel 0,4 mL/min, é adequado para quantificar HTZ e VAL pelo método UHPLC. O tampão formiato por ser um tampão volátil abre a possibilidade de empregar este método na quantificação por espectrometria de massas, o que representa uma vantagem se for preciso quantificar HTZ e VAL em estudos de bioequivalência a partir de uma matriz biológica como o sangue (BORGES; GORAIEB; COLLINS, 2012).

3.3 Etapa de transferência do método para sistema HPLC

Ao estabelecer as condições apropriadas para o método, foi feita a transferência do sistema UHPLC para o sistema HPLC. Foi selecionada a coluna Sunfire™ C8 3,5 um 4,6 x 75 mm, que é equivalente a uma ACQUITY UPLC® BEH C8 1,7; 2,1 x 100 mm. O software Acquity UPLC Columns Calculator 2.0 (Waters, United States) recalculou as condições cromatográficas (tempo de gradiente e fluxo da fase móvel) segundo as características da nova coluna a ser empregada, resultando nas condições descritas na Tabela 14.

Tabela 14. Gradiente do método HPLC

Tempo	Fluxo (mL/min)	Tampão formiato de amônio (%)	Acetonitrila (%)
inicial	0,93	15	85
3,7	0,93	95	5
4,5	0,93	95	5
4,6	0,93	15	85
8	0,93	15	85

3.4 Validação do método no sistema HPLC

3.4.1 Seletividade e especificidade

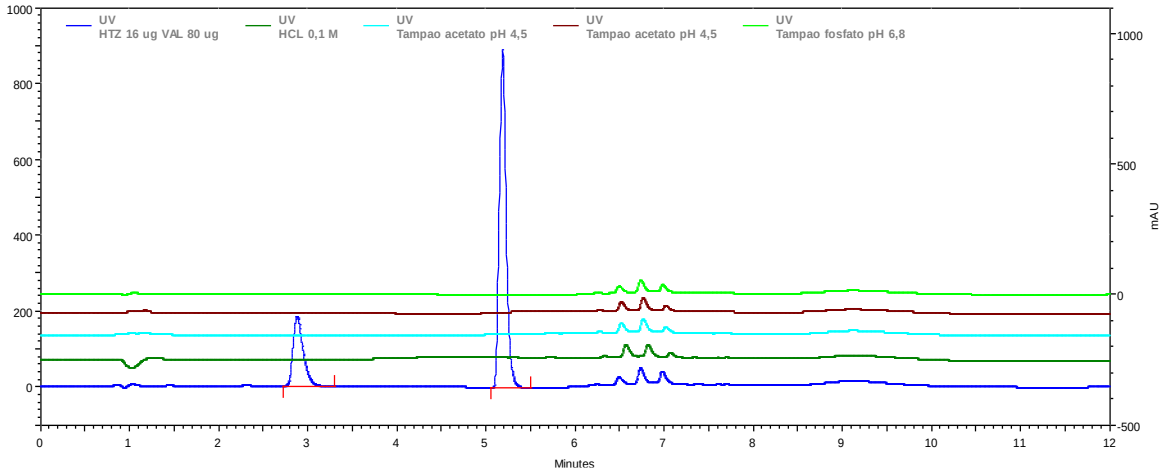
A seletividade do método foi avaliada comparando-se os cromatogramas do branco (fase móvel) e soluções tampão empregadas como meios de dissolução,

solução estoque de matriz (formulação comercial contendo VAL e HTZ). A Figura 7 mostra os cromatogramas onde não se observa interferência nos mesmos tempos de retenção dos picos de VAL e HTZ. Graças a ausência de interferência o método pode ser empregado na quantificação de HTZ e VAL nos ensaios de dissolução em diferentes pH.

O tempo de retenção da VAL e HTZ são 2,9 e 5,2 minutos respectivamente. Este ensaio foi feito segundo as normas do ICH Q2 R_1 (ICH) *Harmonized Tripartite Guideline and Methodology* Q2 R1, estabelecendo-se o tempo total de corrida em 12 minutos, para garantir a limpeza e acondicionamento adequado do gradiente.

Figura 7. Cromatograma de HTZ, VAL e dos tampões de diferente pH no sistema HPLC para avaliar a seletividade

VAL



Fonte: *EZChrom* software

3.4.2 Adequação do sistema (system suitability)

O *system suitability* foi avaliado na etapa de validação do método depois de fazer a transferência para verificar se os parâmetros avaliados no desenvolvimento estavam dentro dos valores corretos (fator de assimetria e número de pratos teóricos). O *System suitability* foi executado a partir de seis replicatas de uma solução padrão (Tabela 15).

Tabela 15. Parâmetros finais para o System Suitability no método HPLC

Amostra	Assimetria	Pratos teóricos	Fator de capacidade	Resolução
Hidroclorotiazida	1,42 +/-	3714	3,42	-
Valsartana	1,36	24188	6,24	12

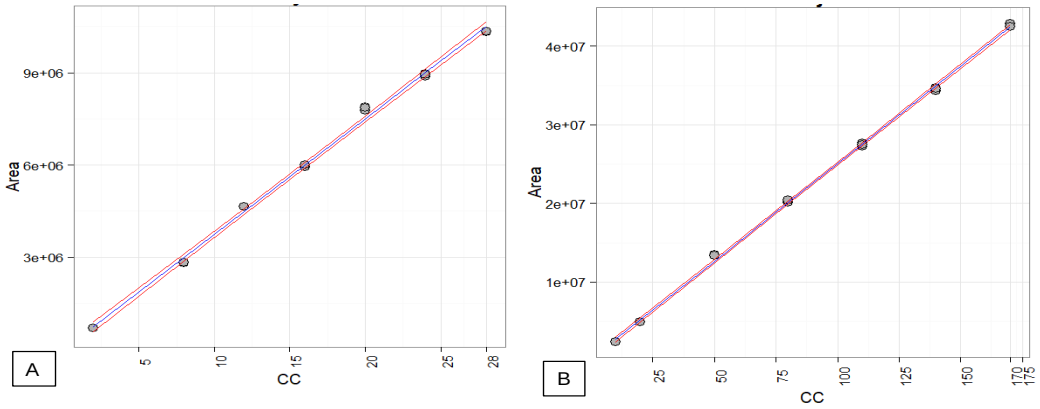
3.4.3 Linearidade

As curvas de calibração feitas nas concentrações de 2 a 28 µg/mL para HTZ e 10 a 170 µg/mL para VAL, mostraram um R^2 = 0,9993 para VAL e R^2 = 0,9969 para HTZ, esses valores são aceitáveis e indicam que existe uma adequada correlação linear. As equações de regressão linear resultantes são y = 376010x-18568 e y = 248263x + 230291 para HTZ e VAL, respectivamente, conforme a Tabela 16 e Figura 8. A partir destes dados também foi avaliada a distribuição normal dos resíduos (Figura 9), o que indicou que o modelo estatístico empregado é adequado. Na tabela 17 através de p valor indica que os dados tanto para HTZ e para VAL são homocedásticos.

Tabela 16. Medida Descritiva da Qualidade do Ajuste

Fármaco	Desvio Padrão dos Resíduos	Graus de Liberdade	R^2	Coeficiente de Correlação
HTZ	187372,6168	19	0,9969	0,9984
VAL	413728,3337	19	0,9992	0,9996

Figura 8. Diagrama da linearidade para Hidroclorotiazida (A) e valsartana (B) com os valores ajustados dos residuos



Fonte: ActionStat Software

Figura 9. Diagnóstico de resíduos do modelo estatístico para A. Hidroclorotiazida e B. Valsartana

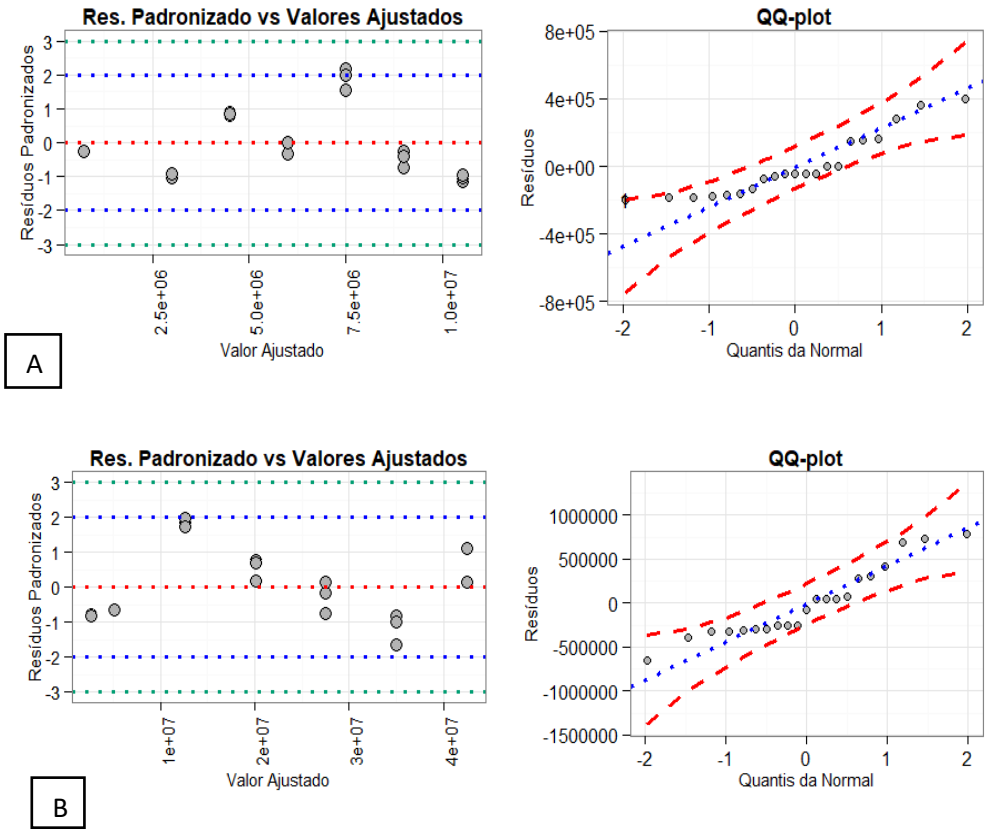


Tabela 17. Teste de Cochran para avaliar homocedasticidade

Fármaco	Estatística	GL	p.valor
Hidroclorotiazida	0,3847	7	1
Valsartana	0,4563	7	0,6284

3.4.4 Precisão

Os dados obtidos nos experimentos de precisão são mostrados na Tabela 18. Os valores de DPR tanto da precisão intradia como na precisão interdia foram menores do que 2,0 %, o que demonstra que o método é suficientemente preciso.

Tabela 18. Repetitividade e precisão intermediaria para HTZ e VAL com o desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR)

Amostra	Conc. µg/mL	Precisão Intradia		Precisão Interdia	
		Média ± DP	DPR	Média ± DP	DPR
HTZ	2	474899 ± 3485	0,73	462815 ± 1065	0,23
	16	4924978 ± 19327	0,39	4860806 ± 42225	0,87
	28	7619371 ± 20472	0,27	8004142 ± 25591	0,32
VAL	10	2619382 ± 39792	1,52	2529530 ± 1033	0,04
	80	21861795 ± 43127	0,19	21535170 ± 261471	1,21
	170	42896379 ± 354797	0,83	42506256 ± 122601	0,29

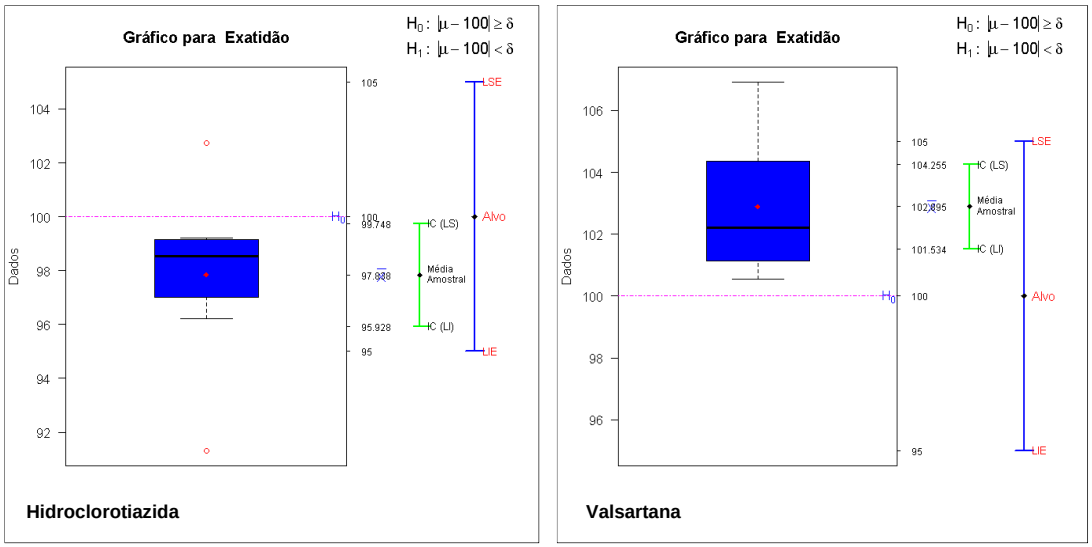
3.4.5 Exatidão

A exatidão avaliou as porcentagens de recuperação a partir de uma amostra enriquecida com solução padrão. Observou-se uma média de recuperação de 97,84 % para as concentrações testadas de HTZ e uma recuperação média de 102,89 % para VAL. Conforme se verifica na Tabela 19, esses valores estão dentro das especificações e, portanto, o método atende aos critérios de aceitação da exatidão (Figura 8).

Tabela 19. Resultados da avaliação da exatidão para HTZ e VAL

Resultados da Exatidão	HTZ	VAL
Recuperação (%)	97,84	102,89
Desvio Padrão	3,08	2,19
Graus de Liberdade	8	8
Limite inferior (%)	95,93	101,53
Limite superior (%)	99,75	104,25
Limite inferior (especificação)	95,00	95,00
Limite superior (especificação)	105,00	105,00

Figura 8. Boxplot da exatidão ou porcentagem de recuperação da HTZ e VAL



Fonte: ActionStat Software

3.4.6 Robustez

A robustez do método foi avaliada em ambas etapas do desenvolvimento (triagem e otimização), os parâmetros cromatográficos monitorados foram: assimetria, altura dos picos, resolução, em função de mudanças no pH da fase móvel, temperatura da coluna e fluxo de fase móvel como está descrito nas Tabelas 3 e 5. Rozet e colaboradores (2013) e Hubert e colaboradores (2014) demostraram que com ajuda do QbD e o *design space* pode se avaliar os efeitos e as suas interações para posteriormente criar um modelo de correlação entre os fatores e as respostas e assim garantir a robustez do método.

4 CONCLUSÕES

Através do uso do QbD, foi possível desenvolver de forma mais eficiente um método cromatográfico HPLC específico, exato, preciso e robusto para quantificar hidroclorotiazida e valsartana em ensaios de perfiles de dissolução. Utilizando coluna Sunfire BEH C8 1,7µm; 2,1; 100 mm, em gradiente de formiato pH 4,77 e acetonitrila com 0,9 mL/min de fluxo de fase móvel a 40 °C e 230 nm.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BORGES, E. M.; GORAIEB, K.; COLLINS, C. H. O Desafio de analisar solutos básicos por cromatografia líquida em modo reverso: Algumas alternativas para melhorar as separações. **Quimica Nova**, v. 35, n. 5, p. 993–1003, 2012.

ÇELEBIER, M. et al. HPLC method development for the simultaneous analysis of amlodipine and valsartan in combined dosage forms and in vitro dissolution studies. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 4, p. 761–768, 2010.

DEBRUS, B.; GUILLARME, D.; RUDAZ, S. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Improved quality-by-design compliant methodology for method development in reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 84, p. 215–223, 2013.

GUMIENICZEK, A. et al. New HPLC method for in vitro dissolution study of antihypertensive mixture amlodipine and perindopril using an experimental design. **Open Chemistry**, v. 11, n. 5, p. 717–724, 1 jan. 2013.

HIBBERT, D. B. Experimental design in chromatography: A tutorial review. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 910, p. 2–13, 2012.

HUBERT, C. et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Improvement of a stability-indicating method by Quality-by-Design versus Quality-by-Testing : A case of a learning process. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 88, p. 401–409, 2014.

ICH. Q10 - Pharmaceutical Quality System. **International conference on harmonisation**, 2008.

ICH. **International conference on harmonisation Q8 (R2) - Requirements for registration of pharmaceuticals for human use - ICH Harmonised Tripartite Guideline**, 2009.

ICH. Q11 - Development and manufacture of drug substances (Chemical and biotechnological entities). **International conference of harmonisation**, 2012.

ICH. Q9- Quality Risk Management. **International conference on harmonisation**, 2013.

JA, C. **Experiments with Mixtures: Designs, Models and the Análysis of Mixture Data**. 3. ed. New York: [s.n.].

KALARIYA, P. D. et al. Application of experimental design and response surface technique for selecting the optimum RP-HPLC conditions for the determination of moxifloxacin HCl and ketorolac tromethamine in eye drops. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 21, p. S373–S382, 2017.

KRISHNA, M. V. et al. Quality by Design (QbD) approach to develop HPLC method for eberconazole nitrate: Application oxidative and photolytic degradation kinetics. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 20, p. 313–322, 2016.

KUMAR, L. et al. Full factorial design for optimization, development and validation of HPLC method to determine valsartan in nanoparticles. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 5, p. 549–555, 2015.

PARR, M. K.; SCHMIDT, A. H. Life cycle management of analytical methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 506–517, 2018.

ROZET, E. et al. Design Spaces for analytical methods. **Trends in Analitycal Chemistry**, v. 42, p. 157–167, 2013.

SAHU, P. K. et al. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 590–611, 2018.

SHAALAN, R. A. et al. Validated stability-indicating HPLC-DAD method of analysis for the antihypertensive triple mixture of amlodipine besylate, valsartan and hydrochlorothiazide in their tablets. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S1381–S1394, 2017.

SMAJIĆ, M.; VUJIĆ, Z. Application of central composite design and structural analysis to the optimization of HPLC method for simultaneous analysis of hydrochlorothiazide, amlodipine besylate and valsartan. **Main Group Chemistry**, v. 17, n. 2, p. 165–180, 2018.

CAPÍTULO III

Desenvolvimento de método de dissolução para avaliar o perfil de dissolução de formulações de dose fixa combinada contendo Hidroclorotiazida 12,5mg e valsartana 160 mg utilizando ferramentas *in silico* e delineamento experimental (DOE)

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO PARA AVALIAR O PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE FORMULAÇÕES DE DOSE FIXA COMBINADA CONTENDO HIDROCLOROTIAZIDA 12,5 mg E VALSARTANA 160 mg UTILIZANDO FERRAMENTAS *IN SILICO* E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL (DOE)

RESUMO

Embora o uso de formulações de dose fixa combinada seja vantajoso do ponto de vista clínico, a formulação e a avaliação do perfil de dissolução de tais produtos se constituem num desafio considerável para os fabricantes, inclusive de genéricos. O objetivo do trabalho foi desenvolver um método de dissolução para avaliar o perfil de dissolução de formulações de dose fixa combinada contendo Hidroclorotiazida 12,5 mg e valsartana 160 mg, este desenvolvimento foi feito utilizando um delineamento fatorial fracionado 3^{3-1} para os testes *in vitro*, os resultados desta etapa foram utilizados para o desenvolvimento *in silico* com o software DDDplus™, no qual foi empregado um delineamento fatorial completo 3^3. As variáveis avaliadas foram a velocidade de agitação, a utilização de âncoras e formulações contendo valsartana (160 mg) + hidroclorotiazida (12,5 mg) na forma de comprimidos. A eficiência de dissolução foi a resposta avaliada estatisticamente para determinar a significância dos fatores que influenciaram na dissolução, e assim, as condições sob as quais o método de dissolução demostrou ser discriminativo foram: 900 mL de solução tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução, 75 rpm de velocidade de agitação e o uso de *sinker* devido a flutuação das formulações. O desenvolvimento *in silico* demonstrou ser uma ferramenta que pode fornecer dados suficientes e confiáveis para o desenvolvimento de um método de dissolução para formulações contendo combinação de dose fixa com um menor número de ensaios *in vitro*.

Palavras chave: Dissolução, *in silico*, desenvolvimento, delineamento fatorial

1 INTRODUÇÂO

Para garantir a eficácia de uma formulação, a substancia que está nela contida deve primeiro deve ser dissolvida para que aconteça a absorção (ASHOKRAJ et al., 2016; CASCONE, 2017), assim é evidente a necessidade de uma metodologia de dissolução capaz de fornecer informação confiável da liberação do fármaco nas condições do trato gastrointestinal.

O teste de dissolução assiste no desenvolvimento de produtos farmacêuticos para demonstrar o desempenho do produto, por outro lado, pode ser usado como ferramenta para identificar formulações com problemas. É considerado o ensaio mais importante para predizer a biodisponibilidade *in vivo* e em muitos casos até pode substituir estudos clínicos de bioequivalência, minimizando a probabilidade de erro no produto final (LOBO; COSTA, 2001 ; NASSER et al., 2012).

As guias da Food and Drug Administration (FDA) estabelecem que o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) deve ser considerado para demonstrar a biodisponibilidade de formulações de liberação imediata (FDA, 1997; MAHESHWARI et al., 2018; SIMIONATO et al., 2018). Assim a solubilidade, que está relacionada com a afinidade do fármaco pelo meio de dissolução é um fator determinante para a absorção (CDER/FDA, 2015 ; MEHTANI et al., 2018 ; TSUME et al., 2018).

O método de dissolução deve ser capaz de discriminar as diferenças entre as formulações com matérias primas de atributos de qualidade diferentes, mas também deve manter uma precisão e robustez aceitável. Este processo se torna ainda mais complicado quando envolve fármacos de baixa solubilidade, classe II e IV. Ademais é valioso avaliar se um fármaco terá ou não impacto no perfil de dissolução in vitro do outro fármaco com ou sem alterações do pH no caso das formulações de dose fixa combinada (DESAI et al., 2013) .

Dependendo dos parâmetros avaliados, o delineamento fatorial de experimentos contribui para estabelecer uma relação entre as propriedades do fármaco, as variáveis da formulação e os parâmetros do processo, ajudando na seleção do método de dissolução mais adequado que satisfaça os requerimentos da correlação *in vivo-in vitro* na liberação do fármaco. O ensaio de dissolução da suporte

na associação das variáveis do desenho e manufatura do produto com a eficácia e segurança clínica (MEHTANI et al., 2018).

Uma ferramenta muito útil que além de fornecer resultados confiáveis e rápidos, auxilia na redução do número de ensaios *in vitro*, são as simulações em computador. O programa de computador DDDPlus™ (Simulations Plus, Lancaster, CA, EUA) tem a capacidade de simular ensaios de dissolução de formulações contendo fármacos usando dados físico-químicos dos mesmos, assim como dos excipientes usando aparatos descritos na Farmacopeia Americana (DUQUE et al., 2017; DUQUE et al., 2018).

O DDDPlus™ calcula as porcentagens dissolvidas por meio de integrações numéricas de variadas equações. Para isso o software precisa informação referente a formulação e dados experimentais da dissolução que serão necessários para calibrar e otimizar o modelo de dissolução para as posteriores simulações (ALMUKAINZI et al., 2015 ; DUQUE et al., 2018).

O objetivo do trabalho foi desenvolver um método de dissolução discriminativo para avaliar o perfil de dissolução de formulações contendo dose fixa combinada de Hidroclorotiazida (HTZ) e valsartana (VAL) os dois de 12,5 mg e 160 mg respectivamente.

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 Material

Hidroclorotiazida (Pureza 100,1 % base seca) e valsartana (101,2 % como base seca) foram fornecidas pelo Aché Laboratorios S.A. (SP, Brasil).

2.2 Excipientes

Os excipientes empregados nas formulações dos comprimidos foram: celulose microcristalina (CMC) PH 200 (Avicel PH 200 LM NF, FMC Corporation, United State); Celulose microcristalina PH 302 (Avicel PH 302 NF, FMC Corporation, United State); croscarmelose sódica (Blanver Farmoquímica LTDA, Taboão da Serra, SP, Brasil);

dióxido de silício coloidal (Aerosil 200, Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Cambuci, São Paulo, SP); lactose monoidratada (Tablettose ® 70, Meggle Pharma – Excipients & Technology, Wasserburg, Alemanha); estearato de magnésio (Meggle Pharma – Excipients & Technology, Wasserburg, Alemanha).

2.3 Reagentes

O meio de dissolução foi preparado utilizando reagentes de grau analítico, agua de osmose, fosfato monobásico de potássio K_2PO_4 (LabSynth Produtos para Laboratórios LTDA, Diadema, SP, Brasil); hidróxido de sódio NaOH (LabSynth Produtos para Laboratórios LTDA, Diadema, SP, Brasil); para a fase móvel foram utilizados formiato de amônio (LabSynth Produtos para Laboratórios LTDA, Diadema, SP, Brasil); e acetonitrila, grau HPLC (Merck KGaA, Darmstad, Alemanha). Para o ensaio de solubilidade foram empregados ácido clorídrico (Casa Americana, São Paulo, SP, Brasil); cloreto de sódio, citrato de Sódio Anidro, fosfato de potássio monobásico e acetato de potássio (LabSynth Produtos para Laboratório Ltda., Diadema, SP, Brasil).

Para a fase móvel foram empregados os reagentes descritos item de material e métodos do Capítulo II.

2.4 Método

2.4.1 Preparação das formulações dos comprimidos

Foram preparadas três formulações diferentes com o objetivo de obter um método de dissolução capaz de discriminá-las. Os componentes para as formulações foram pesados em balança analítica AUW220D (Shimadzu, Kyoto, Japão), as misturas foram feitas em sacos de polietileno por 5 minutos, o estearato de magnésio foi adicionado por último e misturadas por 5 minutos adicionais para finalmente ser comprimidos na prensa hidráulica (América Lab., São Paulo, SP); com a pressão de 1000 psi, punção de 12 mm de diâmetro.

Tabela 1. Formulações simuladas de comprimidos de VAL e HTZ para o desenvolvimento do método de dissolução *in vitro* e *in silico*

Formulação	**F1**		**F2**		**F3**	
Componente	**%**	**mg**	**%**	**mg**	**%**	**mg**
Valsartana	45.7	160.0	45.7	160.0	45.7	160.0
Hidroclorotiazida	3.6	12.5	3.6	12.5	3.6	12.5
Celulose Microcristalina PH 200	48.7	170.5				
Celulose Microcristalina PH 302			47.7	167.0		
Croscarmelose sódica			1.0	3.5	2.0	7.0
Aerosil 200	1.0	3.5	1.0	3.5	1.0	3.5
Lactose (Tabletose 70)					46.7	163.5
Estearato de Magnésio	1.0	3.5	1.0	3.5	1.0	3.5
Total	100.0	350.0	100.0	350.0	100.0	350.0

2.4.2 Teor dos comprimidos

O teor foi quantificado por método de cromatografia liquida de alta eficiência (HPLC) desenvolvido no Capítulo II. Foram pesados e depois triturados 20 comprimidos até obter um pó fino, e pesadas quantidades equivalentes a 12,5 mg de HTZ e 160 mg de VAL que foram adicionadas em um balão volumétrico, sendo a primeira diluição foi feita em metanol e as posteriores diluições com tampão fosfato pH 6,8. As amostras foram filtradas por filtros de seringa PVDF de 0,45 µm, a concentração final foi de 6,5 µg/mL para HTZ e 80 µg/mL para VAL. O conteúdo dos fármacos foi expresso em mg e como porcentagem do conteúdo teórico.

2.4.3 Desenvolvimento do método de dissolução

Cada ensaio foi realizado em triplicata, utilizando o aparato 2 (pá) da Farmacopeia Americana (USP 39 NF 34), em equipamento de dissolução Agilent Technologies 708 DS (Agilent Technologies, Santa Clara, United States), em cubas

com 900 mL de meio de dissolução tampão fosfato pH 6,8 a 37 °C de temperatura. Foi necessária a avaliação do emprego de âncora para o desenvolvimento do método de dissolução devido a flutuação dos comprimidos. A quantificação dos fármacos dissolvidos foi realizada segundo o item 2.4.2.

Com os resultados, as porcentagens dissolvidas de cada uma das alíquotas de amostra, foram construídos os perfis de dissolução para cada um dos fármacos (HTZ e VAL), a partir desses perfis, as eficiências de dissolução (ED) foram calculadas com auxílio do suplemento do Excel DDsolver®.

2.4.3.1 Delineamento experimental para o desenvolvimento do método de dissolução

Foi feito um delineamento experimental do tipo fatorial fracionado 3^{3-1} para o desenvolvimento *in vitro* utilizando como ferramenta o software Statistica® 13.0 foram definidos três fatores: velocidade de rotação, formulações e âncoras, em três níveis cada um (Tabela 2), sendo a matriz contendo o detalhe dos ensaios que foram realizados apresentada na Tabela 3.

Tabela 2. Fatores e níveis do delineamento experimental para o desenvolvimento do método de dissolução i*n vitro*

Fatores	Níveis		
Velocidade de rotação	50	75	100
Ancora	ausência	sinker	cesta japonesa
Formulação	F1	F2	F3

Tabela 3. Matriz do delineamento Fatorial Fracionado $3^{3-1,}$ três fatores e três níveis.

N° de ensaio	RPM	Ancora	Formulação
1	50	ausência	F1
2	50	sinker	F3
3	50	cesta japonesa	F2
4	75	ausência	F3
5	75	sinker	F2
6	75	cesta japonesa	F1
7	100	ausência	F2
8	100	sinker	F1
9	100	cesta japonesa	F3

Para as simulações *in silico* foi necessário obter dados adicionais (Tabela 4), referidos às características físico-químicas dos ingredientes ativos e dos excipientes que formaram parte das formulações, esses dados foram calculados a partir da estrutura química da HTZ e da VAL no DDDplus pelo ADMET Preditor™ e outros como a distribuição do tamanho de partícula, a densidade verdadeira e o tempo de desintegração foram experimentais.

No desenvolvimento *in silico* foi feito um delineamento fatorial completo 3^3, utilizando os fatores e níveis da Tabela 2, dando como resultado 27 experimentos descritos na Tabela 5. O software utilizado para fazer as simulações foi o DDDPlus™ versão 5.0 (Simulations Plus, Lancaster, CA, EUA).

A distribuição do tamanho de partícula foi obtida no equipamento de difração de raios laser Granulometer Cilas 1900 (Cilas Orleans, Franca) no método de via úmida. A densidade verdadeira foi determinada empregando o picnômetro de gás Hélio Ultrapicometer 1000 (Quanta Chrome Corporation, Boyton Beach, FL, Estados Unidos), conforme descrito na Farmacopeia Americana USP 39 NF 34.

O ensaio de desintegração foi realizado conforme na Farmacopeia Brasileira Quinta Edição (2010), utilizando equipamento desintegrador 301 (Ethik Technology, São Paulo, Brasil). Com 6 unidades de cada formulação, o meio utilizado foi tampão fosfato pH 6,8 (750mL) a 37°C com discos, para reduzir a variabilidade nos resultados (NICKERSON et al., 2018).

Tabela 4. Dados físicoquímicos da HTZ e VAL utilizados para as simulações no DDDPlus

Informação físicoquímica	**VAL**	**HTZ**
Quantidade (mg)	160	12.5
Tipo de ingrediente	Ativo	Ativo
Peso molecular (g/mol)	435,53 (b)	297,74 (b)
Solubilidade de referência (mg/mL)	0,072 (a)	0,81 (a)
pH para a solubilidade de referência	3,77 (b)	5,67 (b)
Densidade (g/mL)	1,2 (c)	1,5 (c)
Coeficiente de difussão ($cm^2/sx10^5$)	0,59 (b)	0,50 (b)
LogP	3.55 (b)	-0,0523(b)

(a) Calculado a partir dos resultados do Sirius T3, no capítulo I
(b) Calculado a partir da estrutura das moléculas pelo ADMET® Preditor
(c) Dados experimentais

Tabela 5. Matriz do delineamento fatorial completo 3^3 para o desenvolvimento *in sílico*.

N° de ensaio	Formulação	Velocidade	Âncora
1	F1	50	ausência
2	F1	50	sinker
3	F1	50	cesta japonesa
4	F1	75	ausência
5	F1	75	sinker
6	F1	75	cesta japonesa
7	F1	100	ausência
8	F1	100	sinker
9	F1	100	cesta japonesa
10	F2	50	ausência
11	F2	50	sinker
12	F2	50	cesta japonesa
13	F2	75	ausência
14	F2	75	sinker
15	F2	75	cesta japonesa
16	F2	100	ausência
17	F2	100	sinker
18	F2	100	cesta japonesa
19	F3	50	ausência
20	F3	50	sinker
21	F3	50	cesta japonesa
22	F3	75	ausência
23	F3	75	sinker
24	F3	75	cesta japonesa
25	F3	100	ausência
26	F3	100	sinker
27	F3	100	cesta japonesa

2.5 Análise estatística

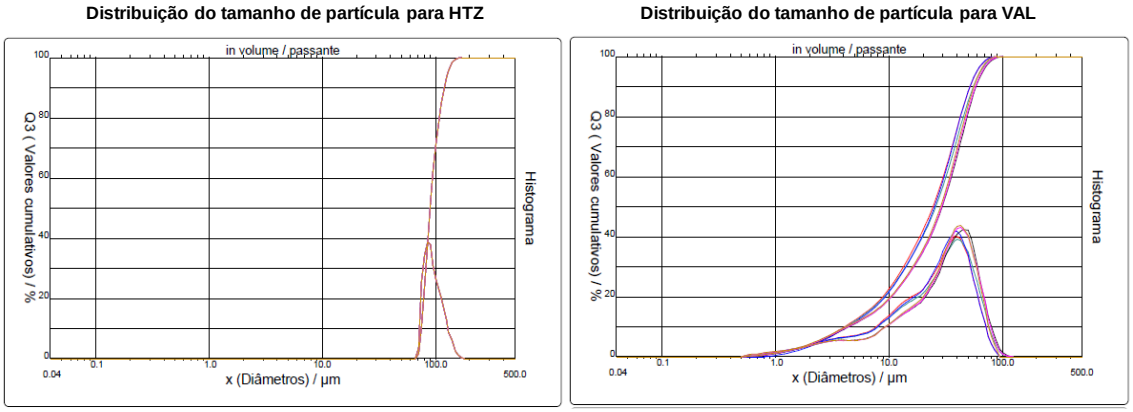
As respostas avaliadas foram as eficiências de dissolução, através da ANOVA utilizando o software Statistica 13, e teste de Tukey com o Minitab 18.

3 RESULTADOS E DISCUSÃO

O meio de dissolução foi selecionado após os ensaios de solubilidade pelo método de shake-flask apresentado no Capítulo I, no qual foi possível demonstrar que o tampão pH 6,8 é capaz de solubilizar a dose proposta do fármaco, foi demostrado que com o tampão pH 6,8 a HTZ e VAL conseguem solubilizar a dose proposta dos fármacos do Capítulo I, cumprindo a condição de não saturação do meio. A densidade verdadeira (n=3) foi de (1,78 ± 0,01) e (1,42 ± 0,01) para HTZ e VAL correspondentemente.

O resultado da medição da distribuição do tamanho de partícula (93,51 ± 0,07) µm e (29,25 ± 0,83) µm para HTZ e VAL respectivamente, indica que as amostras são apropriadas para processos de compressão direta de formas farmacêuticas de administração oral (SHEKUNOV et al., 2007).

Figura 1. Histograma da distribuição do tamanho de partícula para HTZ em água sem ultrassom e 30 segundos de medição e VAL em água e tween 80 com ultrassom e 30 segundos de medição



Os resultados do teor das formulações F1(108,47± 1,25), F2 (108,38 ± 0,73) e F3 (107,30 ± 0,42) mostram que as três formulações cumprem com as especificações de teor para HTZ e VAL da Farmacopeia Americana USP 39, que estabelece que deve estar entre 90 e 110 % do conteúdo.

O tempo de desintegração para F3 foi abaixo de 1 minuto, menor que 3 minutos para F2 e menor que 5 minutos para F1, isso está relacionado com as diferenças nos excipientes e nas quantidades dos mesmos na formulação. Esses resultados são

coerentes com a composição das formulações, a formulação F1 não possui desintegrante, por esse motivo desintegra em um tempo maior, enquanto que a F2 e F3 que possuem 1,0 e 2,0 % de desintegrante respectivamente, apresentam menor tempo de desintegração.

Yarce e colaboradores em 2016 observaram que existe uma correlação linear entre a desintegração e a dissolução nas formulações que contém o mesmo princípio ativo em diferentes concentrações, sugerem que a desintegração é um fator limitante na dissolução do fármaco a partir de formulações de liberação imediata.

As condições de dissolução definidas na matriz do delineamento experimental foram executadas para HTZ e VAL respectivamente (Tabela 6 e 7). Segundo a Farmacopeia Américana USP 39 NF 34, as formulações em comprimidos de dose fixa combinada contendo HTZ e VAL devem liberar menos que 80 % (Q) em 30 minutos de tempo de dissolução.

Nos resultados apresentados para HTZ (Tabela 6) aquelas formulações avaliadas na presença de sinker ou cesta (âncora) japonesa (E2, E8, E6, E9) chegaram a liberar mais do 85 % do fármaco em 30 minutos. Já com a VAL só no ensaio E2 (Tabela 7), que também utiliza o sinker a 50 rpm, consegue liberar o 86 % de fármaco em 30 minutos de dissolução.

Tabela 6. Porcentagens de dissolução nos 15 minutos (Q%15), 30 minutos (Q%30) e eficiência da dissolução (ED). Os resultados são apresentados pelo valor médio e desvio padrão de três determinações.

Ensaio	Form.	Rotação	Âncora	Q%15	Q%30	ED
E1	F1	50	ausência	16,1 ± 0,2	27,5± 0,9	25,2 ± 0,1
E2	F3	50	sinker	94,7 ± 0,5	97,7 ± 3,8	92,5 ± 0,1
E3	F2	50	cesta japonesa	36,0 ± 5,3	63,0 ± 7,7	51,6 ± 0,1
E4	F3	75	ausência	49,1 ± 0,1	76,4 ± 4,0	63,7 ± 0,1
E5	F2	75	sinker	39,8 ± 5,7	78,9 ± 4,0	60,61 ± 0,1
E6	F1	75	cesta japonesa	84,8 ± 3,2	94,2 ± 6,9	82,32 ± 0,1
E7	F2	100	ausência	35,6 ± 2,8	61,7 ± 4,6	56,65 ± 0,1
E8	F1	100	sinker	81,7 ± 1,0	85,7 ± 0,4	76,84 ± 0,1
E9	F3	100	cesta japonesa	87,6 ± 8,7	88,7 ± 9,6	83,94 ± 0,1

Form: Formulação

Tabela 7. Porcentagens de dissolução nos 15 minutos (Q%15), 30 minutos (Q%30) e eficiência da dissolução (ED). Os resultados são apresentados pelo valor médio e desvio padrão de três determinações.

Ensaio	Form	Rotação	Âncora	Q%15	Q%30	ED
E1	F1	50	ausência	11,5 ± 0,4	21,4 ± 0,9	19,6 ± 0,01
E2	F3	50	sinker	75,6 ± 2,6	86,0 ± 2,4	76,9 ± 0,02
E3	F2	50	cesta japonesa	28,4 ± 4,3	58,5 ± 4,8	45,0 ± 0,1
E4	F3	75	ausência	41,3 ± 7,7	76,2 ± 8,1	57,4 ± 0,1
E5	F2	75	sinker	30,9 ± 6,7	79,4 ± 5,8	56,8 ± 0,1
E6	F1	75	cesta japonesa	70,5 ± 2,4	81,1 ± 2,7	70,6 ± 0,1
E7	F2	100	ausência	33,6 ± 5,8	60,2 ± 6,2	58,1 ± 0,1
E8	F1	100	sinker	76,0 ± 1,1	80,8 ± 3,1	73,7 ± 0,1
E9	F3	100	cesta japonesa	77,4 ± 1,4	79,2 ± 0,7	75,1 ± 0,1

Form: Formulação

A característica de flutuação dos comprimidos pode ser por causa do grau de hidrofobicidade na superfície dos mesmos, já que o 50,28 % do comprimido é ingrediente ativo de baixa densidade, e isso tem influência no mecanismo de liberação do fármaco a partir da formulação no meio de dissolução (YARCE et al., 2016).

Segundo o observado nas Figuras 1 e 2 no caso da formulação F1, a liberação da HTZ e da VAL é muito influenciada pela presencia do sinker ou da âncora japonesa sendo que a formulação que não possui âncora, libera menos do 50 % dos fármacos HTZ e VAL, por causa da flutuação da formulação que atrapalha a hidratação do comprimido e a hidrodinâmica na cuba de dissolução. Com as formulações F2 a liberação dos fármacos é independente da presença do sinker ou ancora japonesa e da velocidade de rotação, sendo que nas três condições testadas o perfil de dissolução é similar, enquanto que com a formulação F3, não está muito claro o efeito da velocidade de agitação, mas sim o efeito positivo da presencia de sinker e âncora japonesa.

Figura 1. Perfis de dissolução das formulações F1, F2, F3 nas condições definidas no delineamento fatorial fracionado para HTZ

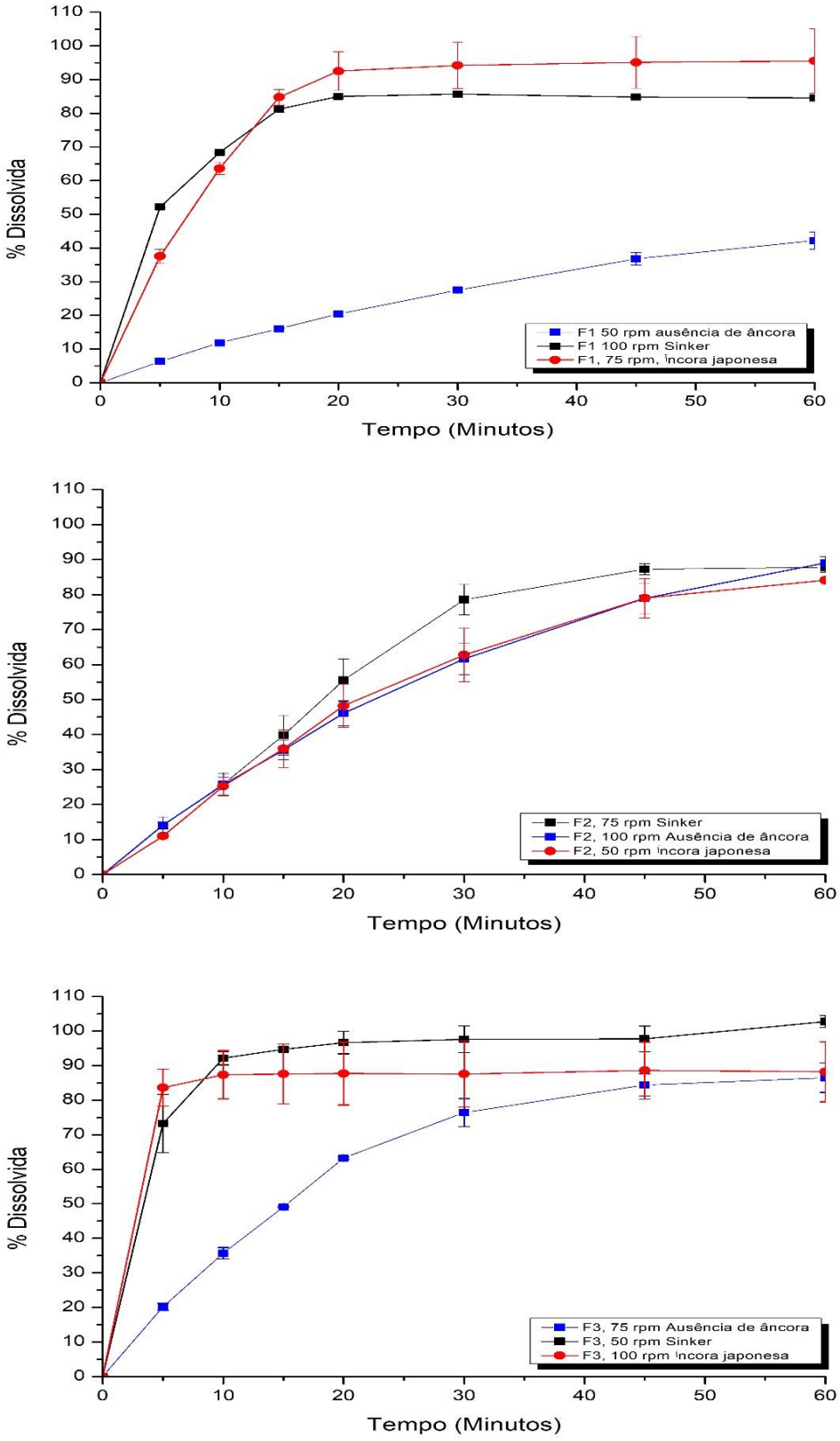
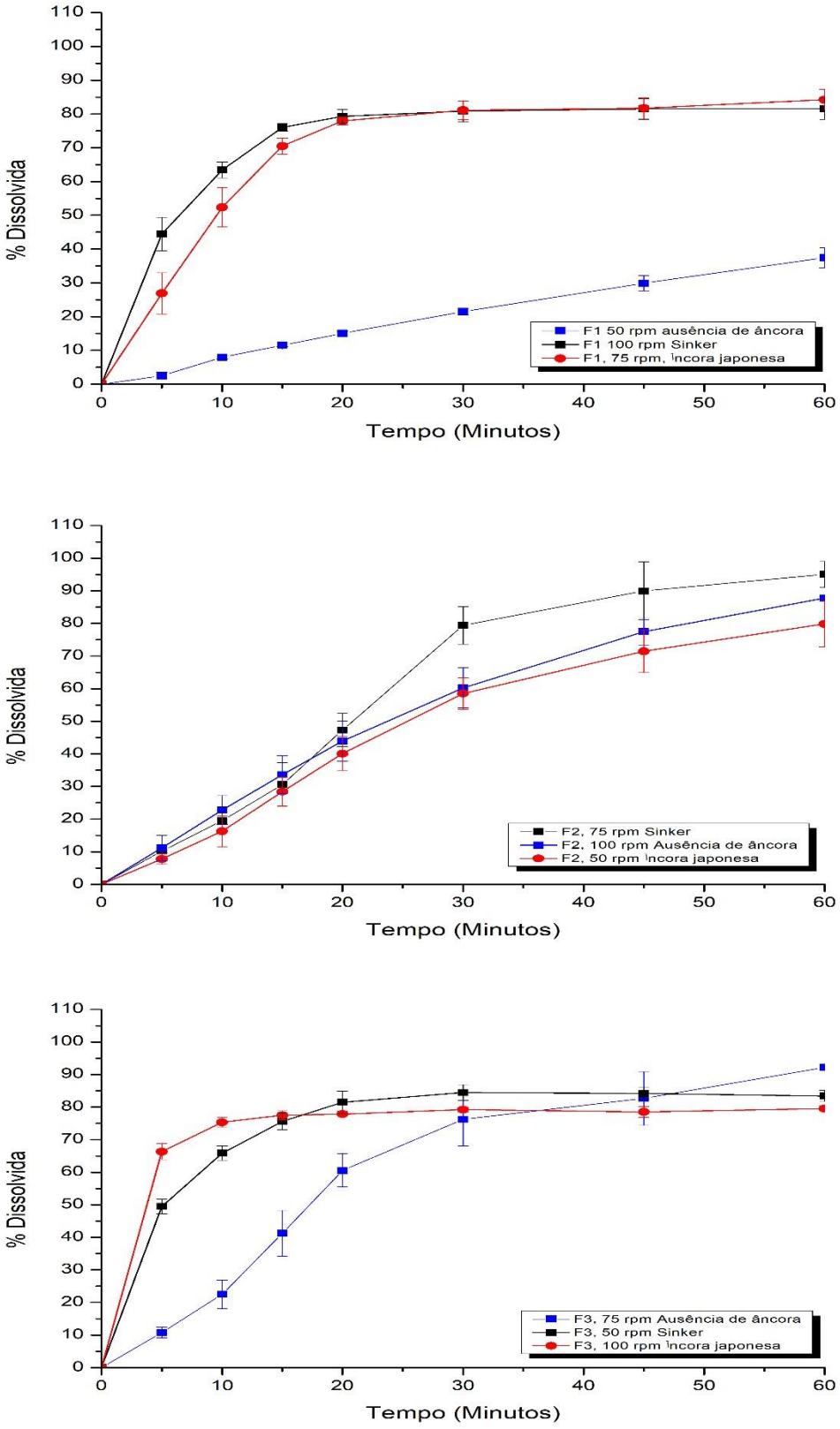
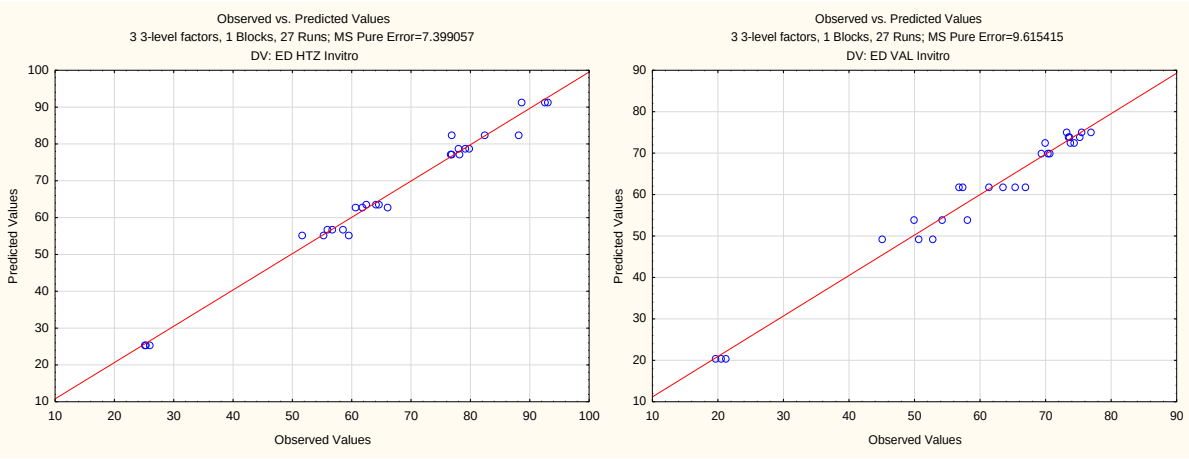


Figura 2. Perfis de dissolução das formulações F1, F2, F3 nas condições definidas no delineamento fatorial fracionado para VAL



Em uma primeira avaliação estatística foram avaliados os resíduos observados e preditos (Figura 3) das ED *in vitro,* tanto para HTZ como para VAL, desta forma foi observado que a distribuição dos resíduos da ED de ambos os fármacos além dos valores de R^2 obtidos na análise de variância (ANOVA), R^2 = 0,9793 e R^2 = 0,9663 para ED da HTZ e da VAL respectivamente são indicadores que o modelo é adequado.

Figura 3. Distribuição dos resíduos observados e preditos dos valores de ED *in vitro* da HTZ e VAL



Os efeitos dos fatores: formulação, velocidade de agitação e a presença ou ausência de âncora para HTZ e VAL foram testados através do valor de (p) que deve ser menor de 0,05, se o fator tiver influência significativa com um nível de confiança de 95 %.

A análise de variância (ANOVA) nas Tabelas (8 e 9) mostrou que os efeitos de todos os fatores avaliados são significativos, embora não tenha sido possível a medida de todas as interações entre eles, devido a provavelmente ao número reduzido de ensaios realizados no fatorial fracionado. As interações (1Q*2L; 1Q*2Q; 2L*3L; 2L*3Q; 2Q*3L; 3Q*3L; 1L*3L; 1L*3Q; 1Q*3L; 1Q*3Q) não foram mensuradas dado que a ANOVA identificou que os seus efeitos são lineares com os outros entre si.

Tabela 8. Análise de variância (ANOVA) para os dados de ED da HTZ. Os valores com p< 0,05 são considerados significativos

Fator	SQ	GL	Média dos quadrados	F	p
Formulação (L+Q)	1980,06	2	990,03	133,8	0
Agitação (L+Q)	1008,73	2	504,36	68,17	0
Ancora (L+Q)	329,35	2	164,67	22,26	0,000014
1*2	2032,65	2	1016,33	137,36	0
Erro Puro	133,18	18	7,39		

SQ: Soma de quadrados; GL: Graus de liberdade; porcentagem de variação explicada (R^2 ajustado = 97,93)

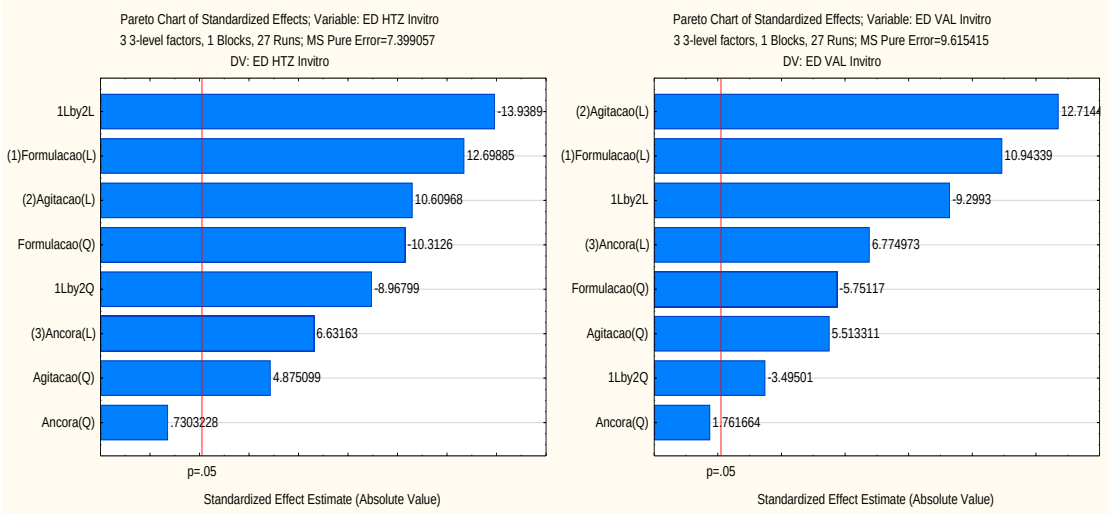
Tabela 9. Análise de variância (ANOVA) para os dados de ED da VAL. Os valores com p< 0,05 são considerados significativos

Fator	SQ	GL	Média dos quadrados	F	p
Formulação (L+Q)	1469,56	2	734,78	76,42	0
Agitação (L+Q)	1846,68	2	923,34	96,03	0
Ancora (L+Q)	471,19	2	235,59	24,5	0,000007
1*2	948,97	2	474,48	49,35	0
Erro Puro	173,08	18	9,61		

SQ: Soma de quadrados; GL: graus de liberdade; porcentagem de variação explicada (R^2 ajustado = 96,63)

Através do gráfico de Pareto (Figura 4) observou-se que a interação linear entre o fator formulação e agitação foi aquela com maior efeito na ED da HTZ, por outro lado, para VAL o efeito linear da agitação teve maior significância na ED.

Figura 4. Gráfico de Pareto para as influências dos fatores e suas interações, sendo aquelas que atravessam a linha vermelha os efeitos significativos



Na Figura 5 confirmou-se que a presença de sinker e âncora japonesa tem efeito positivo na ED da HTZ e VAL. Das formulações avaliadas, F3 teve os valores de ED maiores o que corrobora com a sua composição, que apresenta 2 % de croscarmelose, também contém lactose, que é solúvel em agua, O gráfico mostra também que a ED de HTZ e VAL aumenta de forma proporcional ao aumento da velocidade de agitação de 50 a 75 rpm e o sinker é aquele que tem melhor efeito comparado com a âncora japonesa, os mesmos efeitos podem ser observados nos gráficos de superfície da Figura 6.

Figura 5. Gráfico das medias para a interação entre (Velocidade de agitação, uso de âncora e formulações) com um nível de confiança do 95 % *in vitro*.

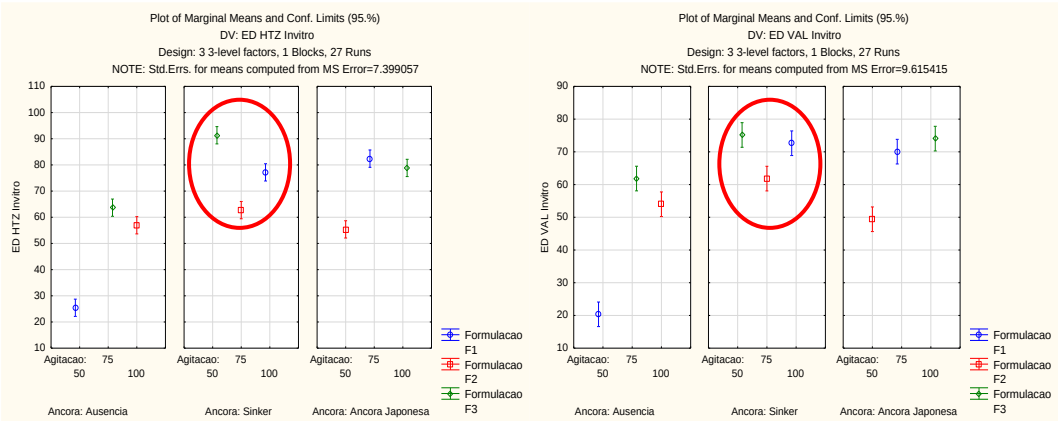
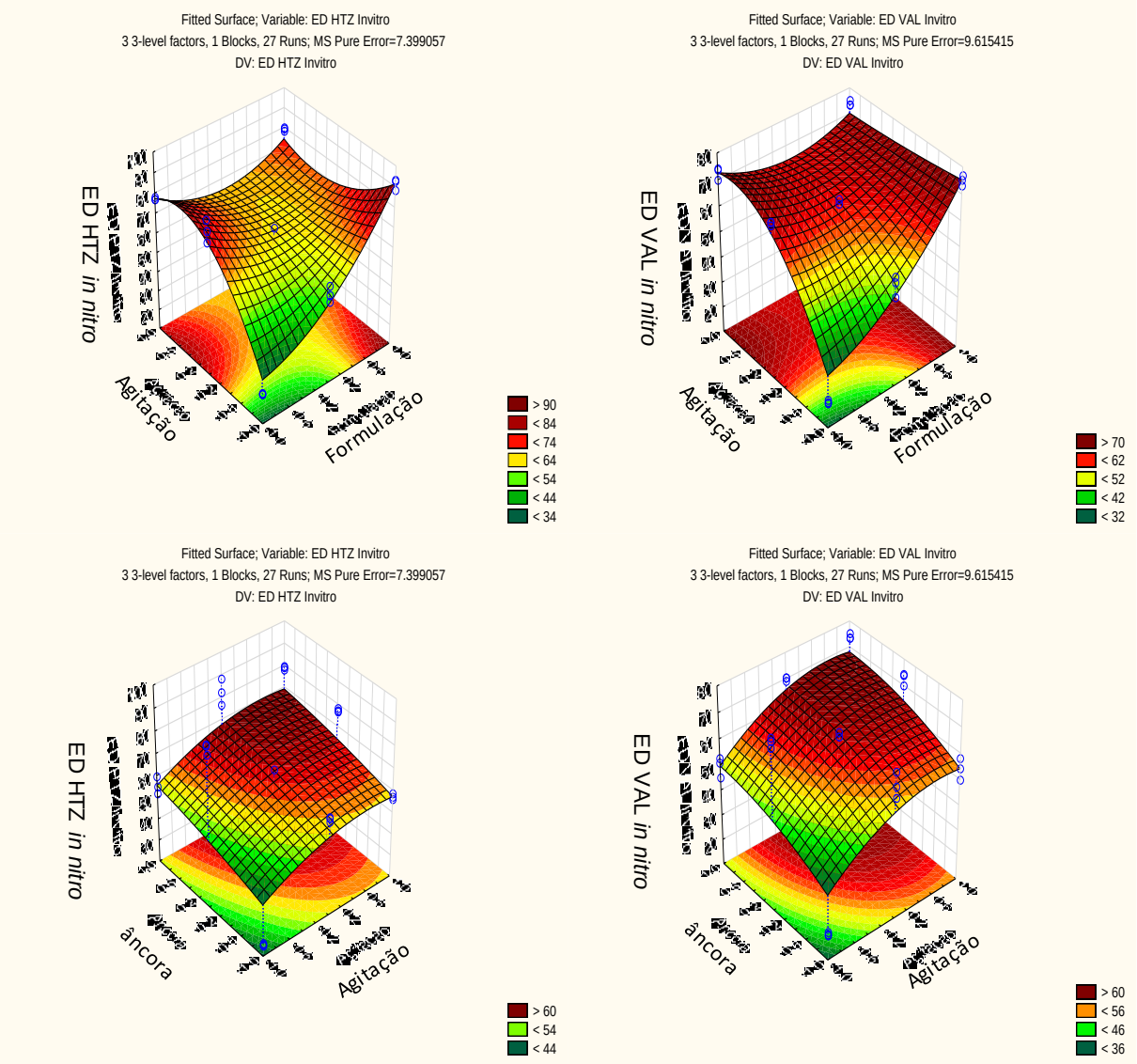


Figura 6. Gráficos de superfície dos efeitos na ED para HTZ e VAL no desenvolvimento *in vitro*.



Na etapa do desenvolvimento *in silico* com o DDDplus, foram obtidas as porcentagens de dissolução simulados pata HTZ e VAL, a partir dos quais foram calculadas as ED para cada um dos perfis simulados, além dos coeficientes de determinação (R^2, que mostram se o ajuste entre os valores observados e os simulados são adequados (Tabela 9).

Tabela 9. Eficiência de dissolução (ED) e valores de R^2 calculadas a partir das porcentagens de dissolução simulados no DDDplus para HTZ e VAL

Condições do ensaio				ED		R^2	
Ordem	**Form.**	**Rotação**	**Âncora**	**HTZ**	**VAL**	**HTZ**	**VAL**
1	F1	50	ausência	28,6	21,9	0,97	0,96
2	F1	50	sinker	83,6	70,5	0,59	0,60
3	F1	50	cesta japonesa	85,2	76,2	0,96	0,93
4	F1	75	ausência	29,6	22,8	0,97	0,95
5	F1	75	sinker	85,1	72,2	0,62	0,59
6	F1	75	cesta japonesa	86,5	76,2	0,95	0,93
7	F1	100	ausência	28,6	26,6	0,97	0,86
8	F1	100	sinker	87,1	73,7	0,61	0,57
9	F1	100	cesta japonesa	87,5	75,4	0,92	0,93
10	F2	50	ausência	48,5	51,4	0,92	0,98
11	F2	50	sinker	56,7	56,8	0,92	0,96
12	F2	50	cesta japonesa	54,2	48,6	0,99	0,98
13	F2	75	ausência	57,7	53,9	0,99	1,00
14	F2	75	sinker	60,9	57,5	0,96	0,97
15	F2	75	cesta japonesa	58,4	51,4	0,97	0,98
16	F2	100	ausência	55,9	56,2	1,00	0,99
17	F2	100	sinker	64,0	62,3	0,96	0,97
18	F2	100	cesta japonesa	61,6	53,6	0,93	0,95
19	F3	50	ausência	59,9	58,7	0,90	0,92
20	F3	50	sinker	92,7	75,4	0,98	0,61
21	F3	50	cesta japonesa	73,5	72,1	0,56	0,59
22	F3	75	ausência	64,9	61,5	0,94	0,96
23	F3	75	sinker	93,3	85,7	0,94	0,61
24	F3	75	cesta japonesa	75,5	74,3	0,53	0,65
25	F3	100	ausência	67,9	63,6	0,93	0,97
26	F3	100	sinker	93,7	86,5	0,87	0,61
27	F3	100	cesta japonesa	79,4	75,1	0,57	0,61

Segundo os valores de coeficiente de determinação (R^2), a formulação F2 foi aquela que melhor ajuste teve entre os valores de porcentagem de dissolução observados e simulados. Isso poderia estar explicado com o que foi observado na avaliação estatística dos ensaios *in vitro*, onde a ED da F2 não era influenciada pela presencia de sinker.

Algumas simulações com F1 apresentaram um menor coeficiente de determinação ($R^2 < 0,9$), isso poderia ser explicado pela presença de cone, dado que em baixas velocidades de agitação, a formação do cone mais a presença de sinker ou ancora japonesa podem alterar ainda mais a hidrodinâmica da dissolução e isso é algo que não pode ser previsto pelo software. Embora cada perfil obtido tinha sido simulado a partir de um perfil de dissolução observado usando o sinker ou a ancora japonesa respectivamente.

O DDDplus além de calcular as porcentagens de dissolução durante os 60 minutos, também é capaz de fornecer informação sobre a influência de fatores próprios do processo de dissolução e das propriedades fisicoquímicas das substancias ativas a traves da função Parameters Sensitivity Analysis (PSA) (Figura 7).

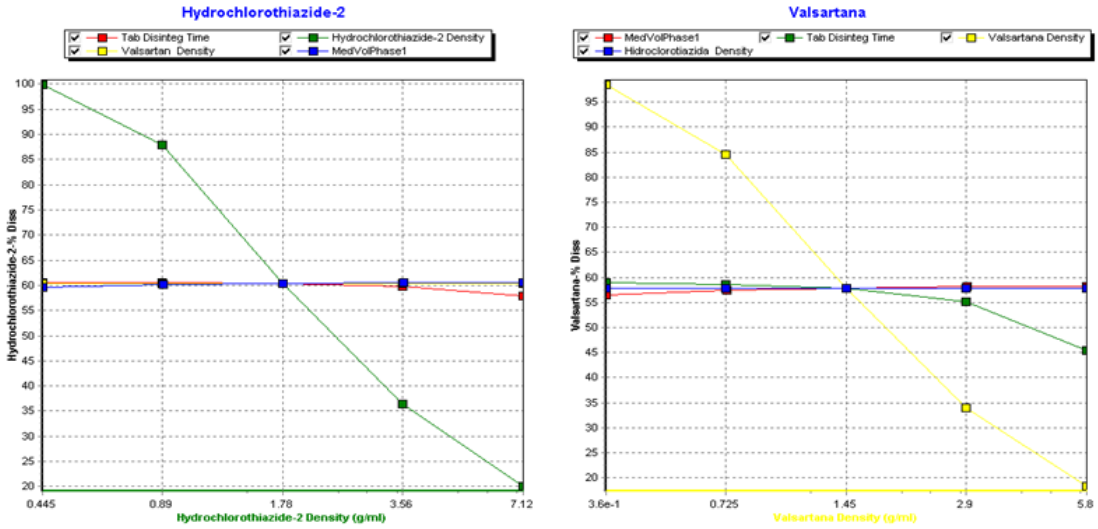
Referente ao processo de dissolução observou-se que para HTZ e VAL a liberação de ambos fármacos é dependente do tempo de desintegração da formulação, o volume do meio de dissolução não tem influência significativa na liberação da HTZ e VAL.

A propriedade físicoquímica que influencia na liberação de HTZ e VAL foi a densidade, quanto maior a densidade de ambos a porcentagem dissolvida do fármaco é menor, isso só foi observado uma vez que foram utilizados nas simulações os valores de densidade observados experimentalmente.

Num estudo com um outro fármaco de baixa solubilidade demostrou-se que trabalhar com os dados corretos permite que as simulações reflitam o que acontece *in vitro* (NJOKU et al., 2019), portanto apesar do ADMET preditor consiga fornecer resultados calculados a partir da estrutura, é necessário muitas vezes realizar ensaios complementários adicionais para alimentar o software e otimizar as simulações.

Nas Figuras (8 e 9) mostram-se os perfis de dissolução em cada uma das condições definidas no delineamento fatorial completo, sendo os pontos vermelhos as porcentagens de dissolução observadas e as linhas contínuas vermelhas os pontos simulados de 0 a 60 minutos.

Figura 7. Gráfico de PSA da interação de fatores da densidade da HTZ e VAL, tempo de desintegração do comprimido, volume do meio de dissolução na dissolução da F1



Diferentes resultados de dissolução podem ser obtidos de acordo com o tamanho, forma e densidade da entidade a ser dissolvida, assim como também da sua posição e distribuição na cuba de dissolução, outro fator que pode ocasionar diferenças nos resultados de dissolução é o fenômeno chamado cone que é mais frequente com o uso do aparato II, este é um problema frequentemente achado no desenvolvimento de métodos de dissolução, e se não for corretamente tratada pode gerar falsos resultados *in vitro*, o cone pode ser solucionado incrementando a velocidade de agitação a 75 o 100 rpm ou substituindo a cuba tradicional pela cuba " Peak vessel " (FDA, 1997) ; KOSTEWICZ et al., 2014 ; ALMUKAINZI et al., 2015; BREDAEL; LIANG; HAHN, 2015 ; BREDAEL; LIANG; HAHN, 2015 ; EMA 2017)

Figura 8. Perfis de dissolução para HTZ obtidos no DDDplus a partir de um delineamento fatorial completo 3^3

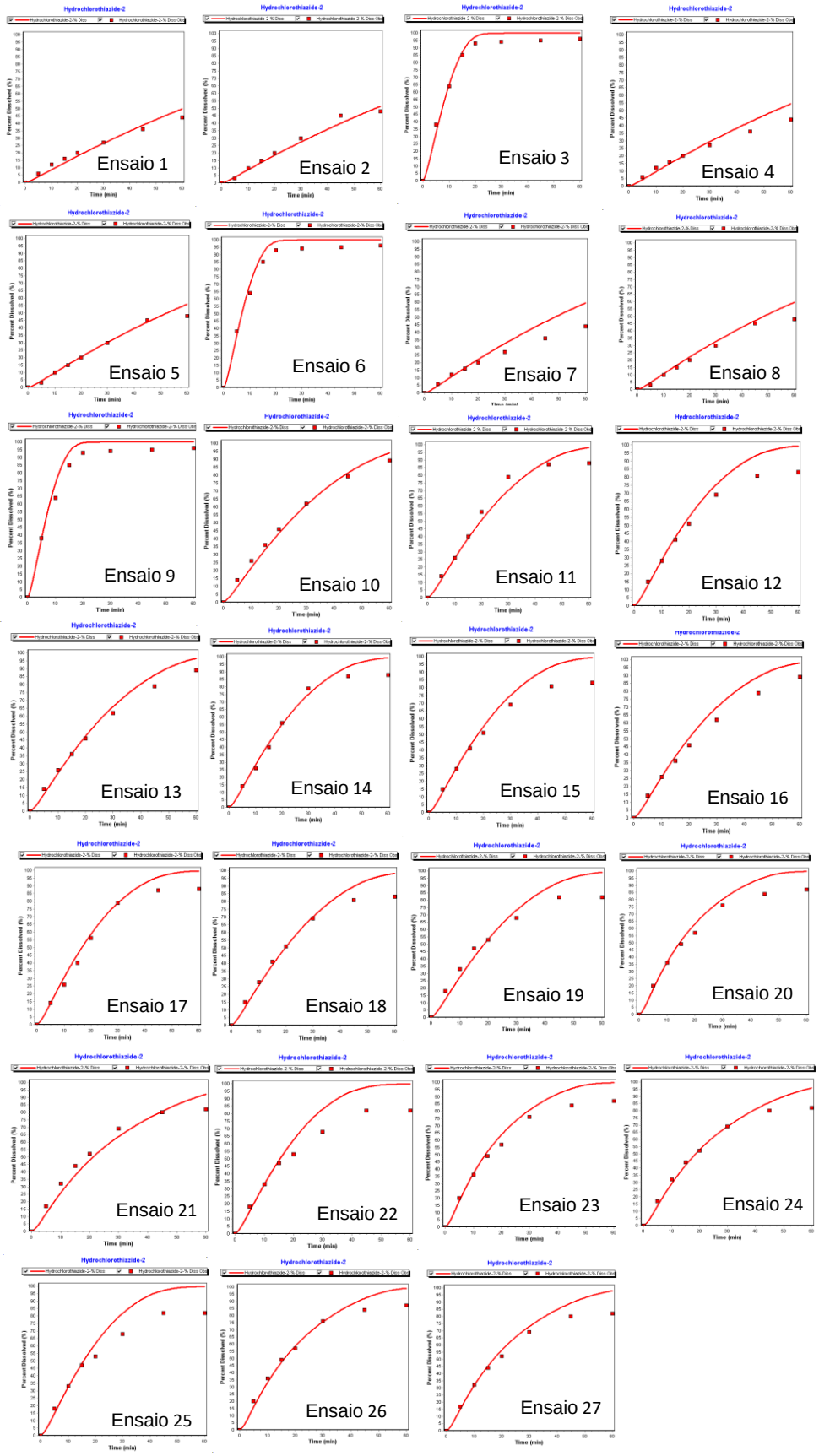
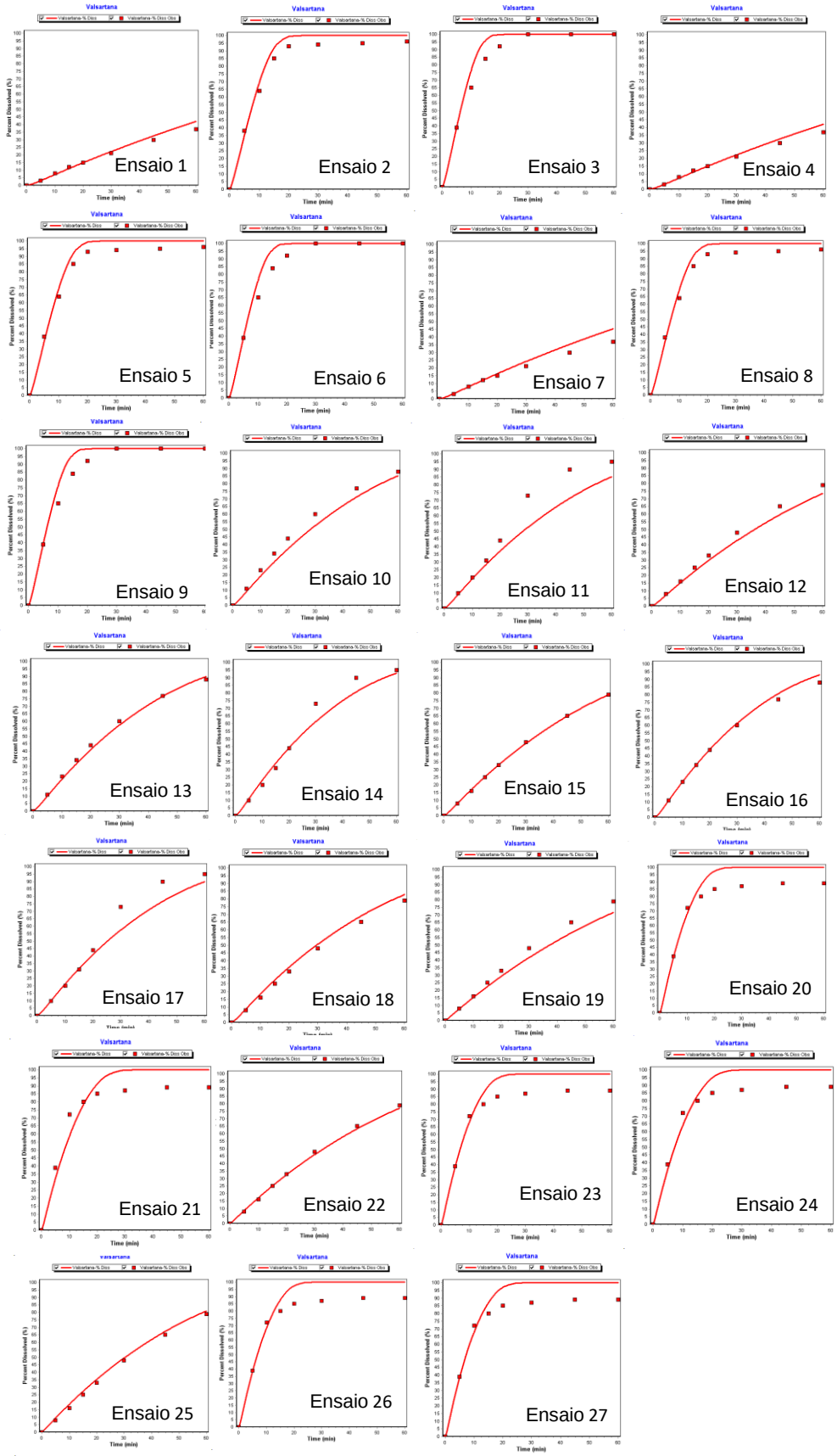
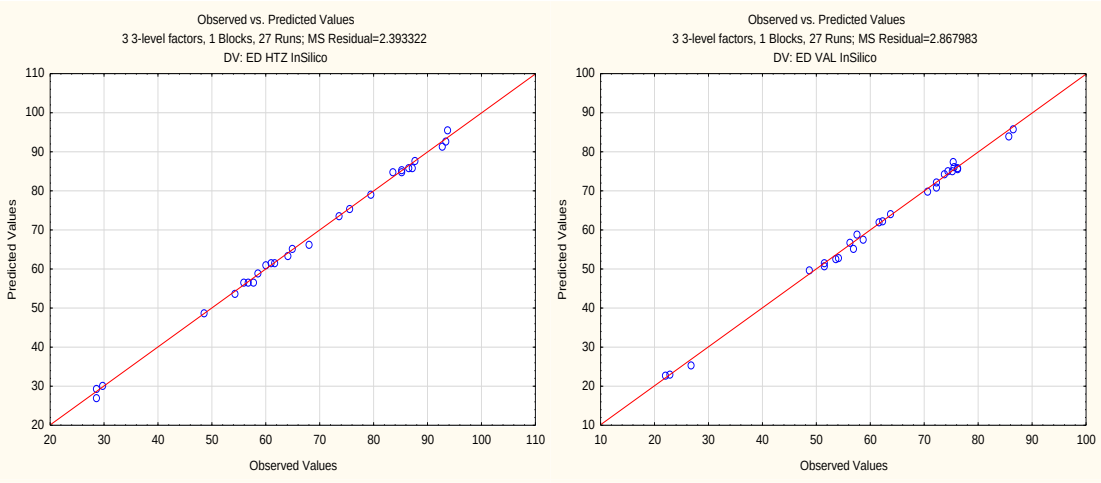


Figura 9. Perfis de dissolução da VAL obtidos no DDDplus a partir de um delineamento fatorial completo 3^3



O valor de R^2 na análise de variância (ANOVA) da ED de HTZ e VAL foram R^2= 0,9937 e R^2= 0,9903 e a distribuição dos resíduos observados versus os preditos (Figura 10) indicam que o modelo de avaliação estatística dos dados obtidos no desenvolvimento *in silico* é adequado

Figura 10. Distribuição dos resíduos observados e preditos dos valores de ED in vitro da HTZ e VAL



Com os valores de “p” obtidos na análise de variância (ANOVA) Tabelas (11 e 12) observamos que a presença de âncora seguido da formulação e a interação entre estes dois fatores são os que tem maior efeito na ED de HTZ e VAL.

No gráfico de Pareto (Figura 11) foram mostradas todas as interações (lineares e quadráticas) entre os fatores. A velocidade de agitação tem influência como fator isolado, mas não é significativo o efeito na sua interação com a formulação ou com a utilização de ancora, o que faz diferença com o observado na avaliação da ED no desenvolvimento *in vitro* onde a agitação era aquela que tinha maior efeito na ED da VAL. Tal fato poderia ter sido por causa do número pequeno de dados fornecidos pelo delineamento fatorial fracionado, não sendo possível a medição de todas as interações e seus efeitos. Daqui a importância de que muitas vezes é necessário um delineamento fatorial completo para conseguir entender melhor alguns processos, neste caso por tratar-se de um método de dissolução que implica dois fármacos, a simulação *in silico* com o DDDplus foi de muita utilidade.

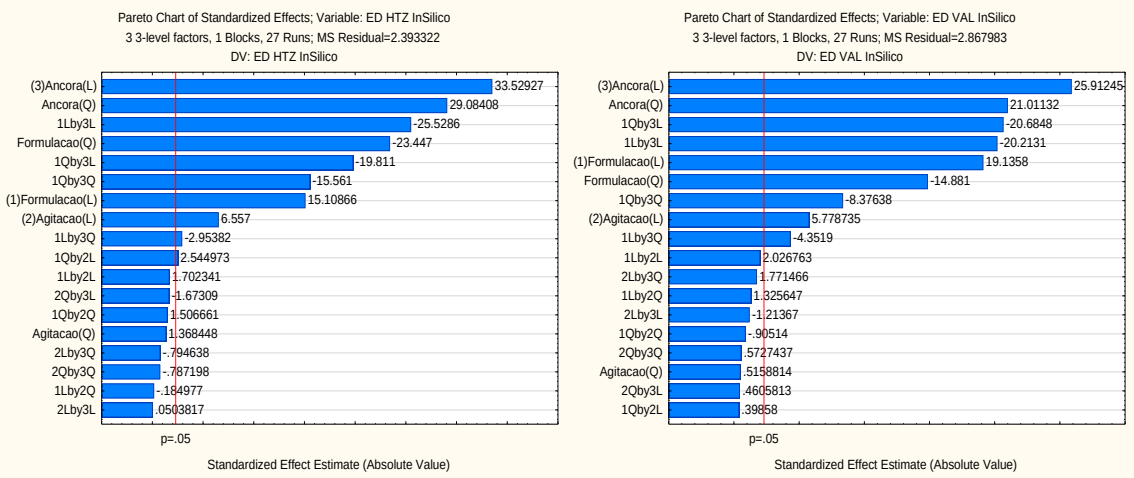
Tabela 11. Análise de variância (ANOVA) para a ED da HTZ *in silico*. Os valores com p< 0,05 são considerados significativos

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	p
Formulação	1862.09	2	931.04	389.02	0.00000
Agitação	107.38	2	53.69	22.43	0.00052
Âncora	4715.07	2	2357.54	985.05	0.00000
1*2	27.95	4	6.99	2.92	0.09214
1*3	3099.48	4	774.87	323.76	0.00000
2*3	9.70	4	2.42	1.01	0.45513
Erro	19.15	8	2.39		
Total Soma dos quadrados	9840.82	26			

Tabela 12. Análise de variância (ANOVA) para os dados de ED da VAL *in silico*. Os valores com p< 0,05 são considerados significativos

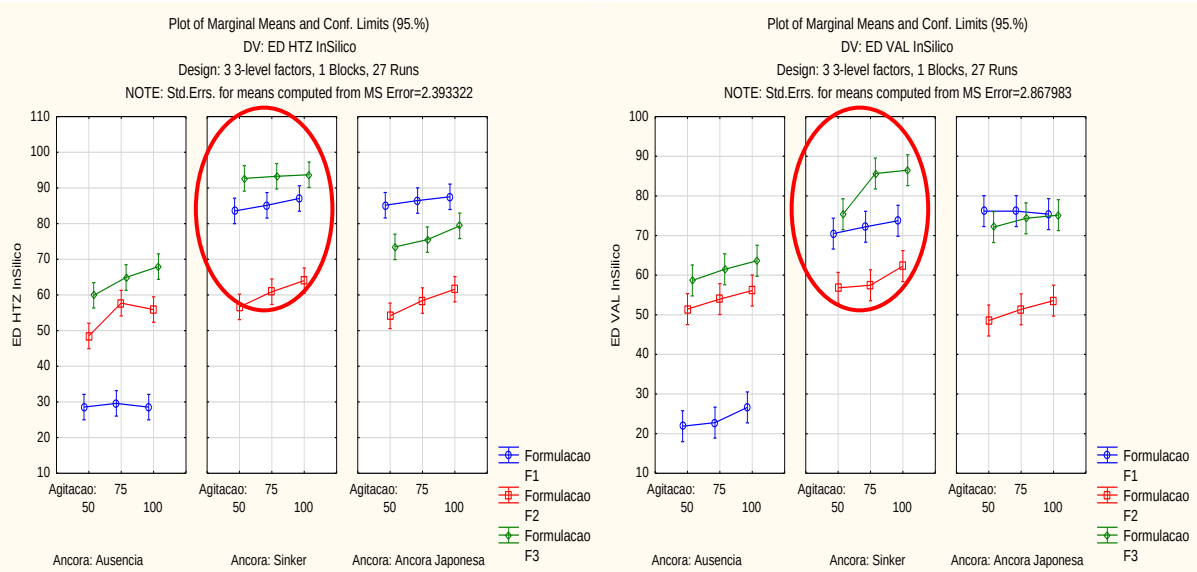
Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	p
Formulação	1685.29	2	842.64	293.81	0.00000
Agitação	96.54	2	48.27	16.83	0.00136
Âncora	3191.86	2	1595.93	556.47	0.00000
1*2	19.63	4	4.91	1.71	0.23999
1*3	2654.41	4	663.60	231.38	0.00000
2*3	14.77	4	3.69	1.29	0.35146
Erro	22.94	8	2.87		
Total Soma dos quadrados	7685.45	26			

Figura 11. Gráfico de Pareto para as influencias dos fatores e suas interações do desenvolvimento *in silico*, sendo aquelas que atravessam a linha vermelha os efeitos significativos



A Figura 12, mostra a avaliação das medias para a ED de HTZ e VAL, aqui que consegue se observar que com 50 rpm não se consegue discriminar entre as formulações principalmente no caso da VAL, embora que com a HTZ isso não represente um problema para o método. Portanto a velocidade de agitação mais adequada seria 75 rpm que oferece um poder discriminativo tanto para HTZ como para VAL, isto foi confirmado nos gráficos de superfície obtidos (Figura 13).

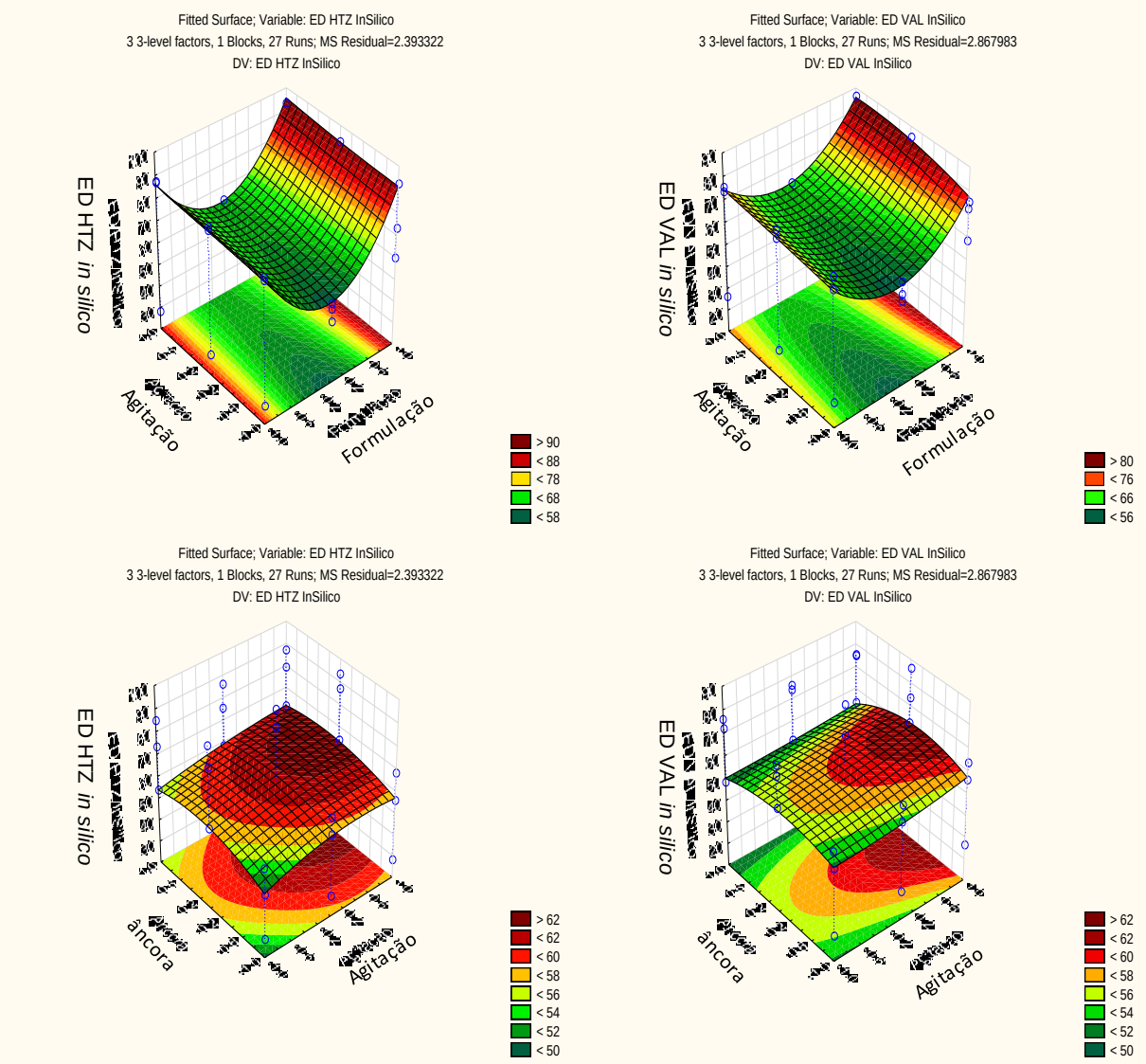
Figura 12. Gráfico das medias para a interação entre os efeitos dos fatores no desenvolvimento *in silico* com um nível de confiança do 95 %



O gráfico das medias (Figura 12), revela que o uso de sinker na sua interação com as velocidades de agitação (50, 75 e 100) rpm foi aquela que conseguiu mostrar uma maior diferenciação entre as formulações F1, F2 e F3, tanto para HTZ como para VAL na Figura 13.

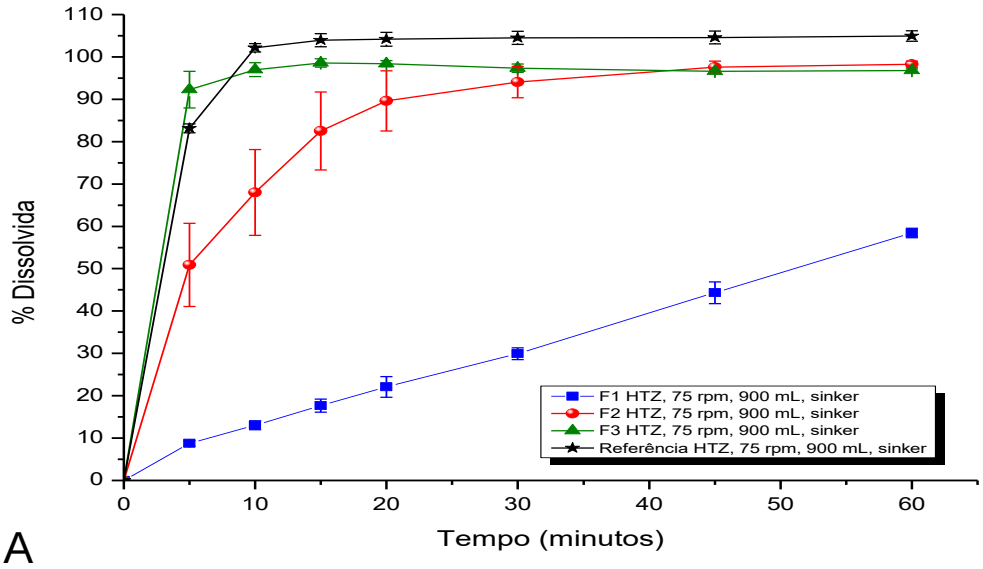
Nos gráficos de superfície (Figura 14) observou-se que a ED da HTZ e VAL tiveram comportamentos similares, a ED das três formulações avaliadas não varia de forma significativa conforme a velocidade de agitação aumenta.

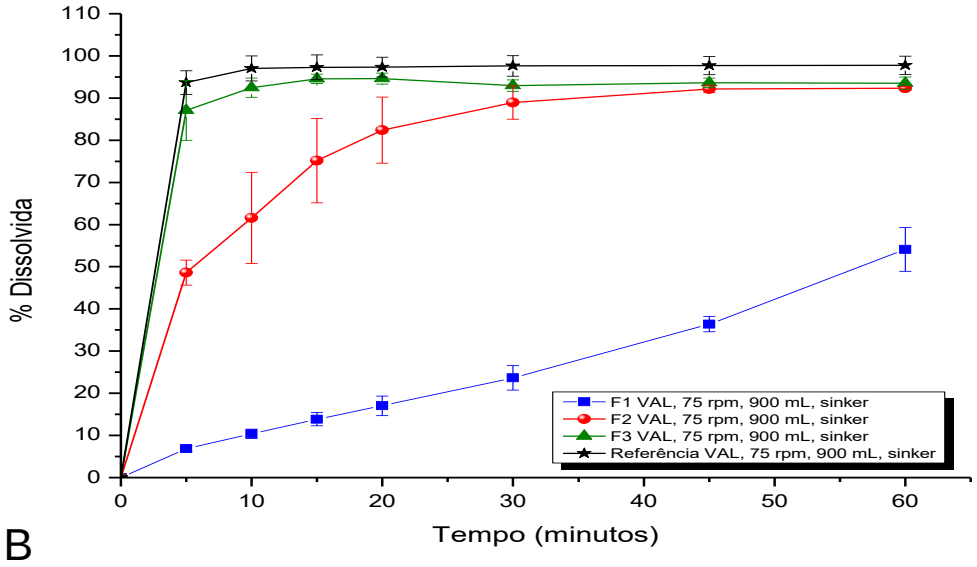
Figura 13. Gráficos de superfície dos efeitos na ED para HTZ e VAL no desenvolvimento *in silico*



Após a avaliação estatística as condições definidas para um método de dissolução foram: tampão fosfato pH 6,8 como méio de dissolução, 900 ml, 75 rpm de velocidade de agitação e o uso de sinker para evitar a flutuação das formulações. Uma vez definidas estas condições as três formulações foram avaliadas para mostrar o poder discriminativo do método, com as porcentagens de dissolução foram construídos os perfis de dissolução (Figura 14 e Figura 15).

Figura 14. Perfis de dissolução para as formulações F1, F2, F3 e do medicamento de referência no desafio do método de dissolução para HTZ (A) e VAL (B)



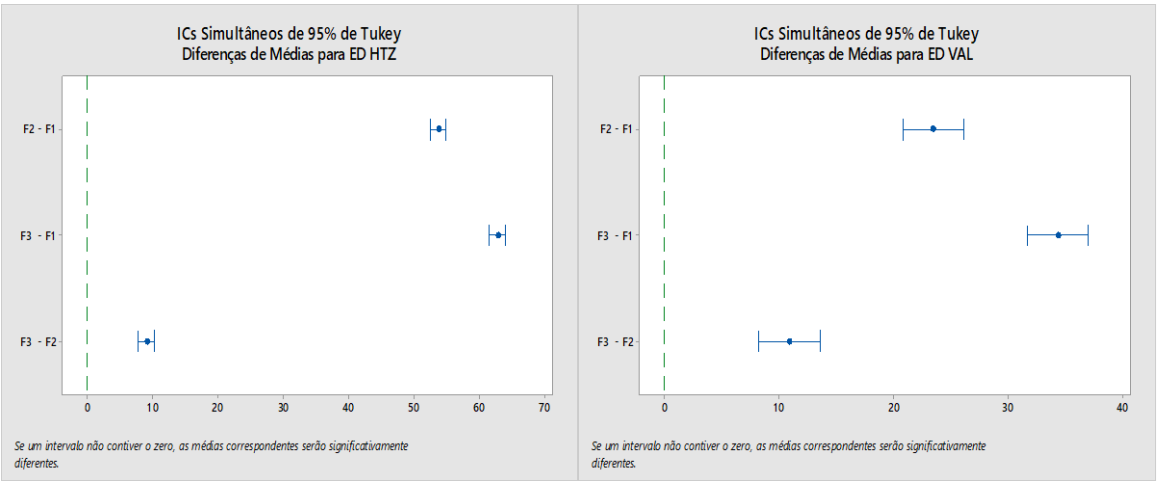


Foi feito um analise de ANOVA com o software Minitab 18, das ED obtidas para a HTZ e VAL nas três formulações em ambos casos se obteve um valor de ($p < 0,05$), com um R^2 de (99,98 %; 99,97 5 % ajustado) para HTZ e (99,63 % ; 99,51 % ajustado) para VAL, esse resultado indica que existe diferenças entre as formulações, logo foi feito um análise de teste de Tukey (Figura 16), tanto para HTZ como para VAL, as ED foram agrupadas em três grupos diferentes, confirmando assim que o método selecionado consegue discriminar entre as três formulações .

Entretanto, um método de dissolução bem desenvolvido, é extremamente útil na avaliação da liberação in vitro dos medicamentos, indicando quais formulações teriam melhor potencial de desempenho nos posteriores estudos de bioequivalência (LOBO; COSTA, 2001 ; SIMIONATO et al., 2018)

Foi demonstrado que conforme à mudanças na formulação ao nível do lubrificante e desintegrante há diferenças nos perfis de dissolução da HTZ e VAL, com o caso do lubrificante não teve diferenças significativas no perfil de dissolução, no entanto, mudanças na quantidade desintegrante teve diferenças no perfil de dissolução, observou-se que o tempo de desintegração foi dependente do tipo e quantidade de desintegrante utilizado (AMERI et al., 2012) .

Figura 16. Gráfico de análise de medias de Tukey paras as ED de HTZ e VAL no desafio do método de dissolução



Fonte: Minitab 18

Uma vez que o poder discriminativo do método de dissolução é estabelecido este pode ser empregado nos estágios iniciais do desenvolvimento de produtos, para selecionar a melhor formulação, avaliar os excipientes com diferentes atributos de qualidade, além de avaliar pequenas mudanças nas formulações (SAKORE; CHAKRABORTY, 2012).

Os métodos de modelagem e simulação *in silico*, ao ser usados, podem complementar no desenvolvimento de formulações aumentando a probabilidade de sucesso na formulação como nos estudos de bioequivalência e biodisponibilidade (MITRA et al., 2019). É importante avaliar a inter-relação entre as características de solubilidade, tamanho de partícula, dissolução, permeabilidade do fármaco e as características da formulação para atingir ao desenvolvimento racional de um método de dissolução discriminativo, o que pode ser avaliado de forma pratica na modelagem in *silico* com o DDDplus (DUQUE et al., 2018).

4 CONCLUSÕES

No desenvolvimento de um método de dissolução para avaliar os perfis de dissolução de formulações de dose fixa combinada apresentam-se vários desafios, que foram enfrentados com o uso de ferramentas *in silico* e o delineamento experimental. Assim foi desenvolvido um método de dissolução discriminativo para formulações contendo hidroclorotiazida 12,5 mg e valsartana 160 mg em dose fixa combinada, nas seguintes condições: 900 mL de tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução, 75 rpm de velocidade de agitação com o uso de sinker.

5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMUKAINZI, M. et al. Simulation of In Vitro Dissolution Behavior Using DDDPlus™. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 1, p. 217–221, 2015.

AMERI, M. N. AL et al. The differences between the branded and generic medicines using solid dosage forms: In-vitro dissolution testing. **Results in Pharma Sciences**, v. 2, n. 1, p. 1–8, 2012.

ASHOKRAJ, Y. et al. Discriminatory dissolution method development and validation of etoricoxib tablets. **Dissolution Technologies**, v. 23, n. 2, p. 30–34, 2016.

BREDAEL, G. M.; LIANG, S.; HAHN, D. A Strategy for Quality Control Dissolution Method Development for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms. **Dissolution Technologies,** v. 22, n. 3, p. 10-16, 2015.

CASCONE, S. Modeling and comparison of release pro fi les : E ff ect of the dissolution method. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, n. March, p. 352–361, 2017.

CDER/FDA. Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. **Guidance for Industry - Center for Drug Evaluation and Research**, 2015.

DESAI, D. et al. Formulation design, challenges, and development considerations for fixed dose combination (FDC) of oral solid dosage forms. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 18, n. 6, p. 1265–1276, 2013.

DUQUE, M. D. et al. Intrinsic dissolution simulation of highly and poorly soluble drugs for BCS solubility classification. **Dissolution Technologies**, v. 24, n. 4, p. 6–11, 2017.

DUQUE, M. D. et al. In Silico Simulation of Dissolution Profiles for Development of Extended-Release Doxazosin Tablets. **Dissolution Technologies**, v. 25, n. 4, p. 14–21, 2018.

CDER/FDA. Dissolution Testing of Immediate release solid oral dosage forms. **Guidance for Industry - Center for Drug Evaluation and Research**,, p. 1-11, August, 1997.

KOSTEWICZ, E. S. et al. In vitro models for the prediction of in vivo performance of oral dosage forms. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57, p. 342–366, 2014.

LOBO, M. S.; COSTA, P. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 13, p. 123–133, 2001.

MAHESHWARI, R. et al. In vitro models for the prediction of in vivo performance of oral dosage forms : Recent progress from partnership through the IMI OrBiTo collaboration. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 121, p. 456–464, March, 2018.

MEHTANI, D. et al. Chapter 9 - Dissolution Profile Consideration in Pharmaceutical Product Development. In: **Dosage Form Design Considerations**. Elsevier Inc., 2018. p. 287–336.

MITRA, A. et al. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Physiologically based absorption modeling to predict bioequivalence of controlled release and immediate release oral products. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 134, n. October 2018, p. 117–125, 2019.

NICKERSON, B. et al. Correlation of dissolution and disintegration results for an immediate-release tablet. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 150, p. 333–340, 2018.

NJOKU, J. O. et al. In silico Tools at Early Stage of Pharmaceutical Development: Data Needs and Software Capabilities. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 6, p. 243, 2019.

SAKORE, S.; CHAKRABORTY, B. Journal of Bioequivalence & Bioavailability In Vitro – In Vivo Correlation (IVIVC): A Strategic Tool in Drug Development. p. 1–12, 2012.

SHEKUNOV, B. Y. et al. Particle size analysis in pharmaceutics: Principles, methods and applications. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 2, p. 203–227, 2007.

SIMIONATO, L. D. et al. Comparison between the dissolution profiles of nine meloxicam tablet brands commercially available in Buenos Aires , Argentina. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 4, p. 578–584, 2018.

TSUME, Y. et al. In Vivo Predictive Dissolution and Simulation Workshop Report: Facilitating the Development of Oral Drug Formulation and the Prediction of Oral Bioperformance. **The AAPS Journal**, v. 20, n. 6, p. 100, 2018.

YARCE, C. J. et al. Relationship between surface properties and in Vitro drug release from a compressed matrix containing an amphiphilic polymer material. **Pharmaceuticals**, v. 9, n. 3, 2016.

CAPÍTULO IV

Perfil de dissolução de formulações dose fixa combinada de hidroclorotiazida (12,5 mg) mais valsartana (160 mg) + comercializados no Brasil e Perú

PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE FORMULAÇÕES DOSE FIXA COMBINADA DE VALSARTANA (160 MG) + HIDROCLOROTIAZIDA (12,5 MG) COMERCIALIZADOS NO BRASIL E PERÚ

RESUMO

O método de dissolução que emprega 900 mL de tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução, 75 rpm de velocidade de agitação, e sinker foi empregado para avaliar o perfil de dissolução de produtos contendo hidroclorotiazida (HTZ) 12,5 mg mais valsartana (VAL) 160 mg comercializados no Brasil e no Perú. Por análise multivariada, a eficiência de dissolução (ED), tempo médio de dissolução (MDT) e as porcentagens de dissolução de 5 até 60 minutos foram as variáveis a partir das quais foram obtidos os componentes principais utilizados para agrupar as formulações. Embora os perfis de dissolução mostrem similaridade entre todas as formulações avaliadas, o produto referência se destacou por apresentar uma maior ED comparado com as outras formulações, devido à maior liberação nos primeiros 5 minutos de ensaio. Concluiu-se que o método proposto, além de garantir a liberação total de HTZ e VAL a partir das formulações, possui adequado poder discriminativo.

Palavras chave: Dose fixa combinada, perfil de dissolução, analise multivariada, medicamentos comerciais, Brasil, Perú.

1 INTRODUÇÂO

O perfil de dissolução é um importante parâmetro à avaliar durante o processo de desenvolvimento para demonstrar o desempenho de uma forma farmacêutica de administração oral, além de poder ser empregado com fins regulatórios nos processos das bioisenções (formulações que contém fármacos de classe I e III) (EMA, 2017, FDA, 2018, PAIXÃO et al., 2017 ; MEHTANI et al., 2018). As comparações dos perfis de dissolução são muito empregadas em diferentes condições relacionadas à formulação, variação de lote a lote, entre fabricantes, por exemplo para demonstrar similaridade entre medicamentos pré-registro e pos-registro se houver mudanças na formulação (ZHANG et al., 2010).

Muitos estudos demostraram que o perfil de dissolução *in vitro* fornece uma rápida e extensa informação da liberação do fármaco (MA et al., 2000). Quando em uma formulação são veiculados dois fármacos de baixa solubilidade esta informação torna-se mais importante ainda, já que poderia ser empregada para definir por exemplo: na etapa de desenvolvimento qual formulação poderia ter maior probabilidade de êxito em um posterior ensaio de bioequivalência e no caso de formulações comerciais, avaliar se o desempenho delas se mantem estável após a sua liberação para o mercado (RUIZ; VOLONTÉ, 2014).

Embora os perfis de dissolução em meios de dissolução aquoso em função do tempo das formulações contendo fármacos de baixa solubilidade não substitui os ensaios *in vivo* (WEBSTER et al., 2017; NJOKU et al., 2019) são uma ferramenta muito importante pela quantidade e qualidade de informação que é possível obter a partir deles, se o método for desenvolvido de forma adequada.

No Brasil a exigência da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para o registro de medicamentos genéricos é demonstrar bioequivalência com os inovadores desde o 2003 (MINISTÉRIO DA SAÚDE - MS - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2003). No caso do Perú, a normativa que regula a bioequivalência e biodisponibilidade dos medicamentos genéricos foi aprovada em 2018 pela Dirección General de Medicamentos y Drogas (DIRECCIÓN GENERAL DE MEDICAMENTOS INSUMOS Y DROGAS - DIGEMID, 2018). Assim, no Perú são comercializadas formulações de valsartana (VAL) 160 mg + hidroclorotiazida (HTZ) 12,5mg, mas não se dispõe de informação que demonstre se eles são

bioequivalentes. O estudo do perfil de dissolução deve ser identificado como uma oportunidade de entender se as formulações já existentes no mercado cumprem com as novas exigências regulatórias no Perú. Em alguns casos tal vez seja preciso fazer mudanças nas formulações para atingir esse objetivo.

Existe pouca informação na literatura sob a avaliação de perfis de dissolução de produtos já comercializados e menos ainda sob medicamentos de dose fixa combinada. Assim, a importância de pesquisar este campo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os perfis de dissolução de formulações de dose fixa combinada contendo HTZ 12,5 mg e VAL 160 mg comercializados no mercado farmacêutico do Brasil e do Perú utilizando-se um método de dissolução previamente desenvolvido.

2 MATERIAL E METODO

2.1 Material

Formulações contendo VAL (160 mg) + HTZ (12,5 mg) na forma de comprimidos e cápsulas foram adquiridas em drogarias do Brasil e Perú. Diovan HTC comprimidos revestidos (Novartis, Itália), Valsiprel HCT Tabletas recubiertas (IQ Farma, Perú), Avan HCT Cápsula (Farmindustria, Peru), Valtan Cápsula (LaFrancol, Colombia), Brasart HCT (EMS, Brasil), Vartaz H (Eurofarma, Brasil) estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Produtos comercializados no Brasil e Perú, que foram avaliados

N°	Código Produto	Forma Farmacêutica	Pais de Fabricação
1	Referência	Comprimidos revestidos	Itália
2	B1	Comprimidos revestidos.	Brasil
3	B2	Comprimidos revestidos	Brasil
4	C1	Cápsula	Colômbia
5	P1	Cápsula	Perú
6	P2	Comprimidos revestidos	Perú

O meio de dissolução foi preparado utilizando reagentes de grau analítico, água purificada, fosfato monobásico de potássio K_2PO_4 (LabSynth Produtos para Laboratórios LTDA, Diadema, SP, Brasil); hidróxido de sódio NaOH (LabSynth Produtos para Laboratórios LTDA, Diadema, SP, Brasil); para a fase móvel foram utilizados formiato de amônio (LabSynth Produtos para Laboratórios LTDA, Diadema, SP, Brasil); e acetonitrila, grau HPLC (Merck KGaA, Darmstad, Alemanha).

2.2 Método

2.2.1 Teor das formulações comerciais

O teor dos comprimidos foi determinado por HPLC, para o qual foram pesados e depois triturados 20 comprimidos até obter um pó fino, pesou-se o equivalente a 12,5 mg de HTZ e 160 mg de VAL do pó em um balão volumétrico. A primeira diluição foi feita em metanol, e as posteriores diluições com tampão fosfato pH 6,8; as amostras foram filtradas através de filtros de seringa PVDF de 0,45 µm, a concentração final foi de 80 µg/mL de VAL e 6,5 µg/mL de HTZ mg/mL, a quantificação foi feita por analise de HPLC. O conteúdo dos fármacos foi expresso em mg e como porcentagem do conteúdo teórico.

2.2.2 Ensaio de dissolução

As condições dos ensaios de dissolução foram: 900 mL de tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução; 75 rpm de velocidade de agitação e sinker, no equipamento de dissolução Agilent 708 DS acoplado com aparato II (pá).

Doze unidades de cada formulação foram testadas, durante a dissolução tomadas alíquotas de 5 mL, sem reposição do meio de dissolução aos 5,10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos, as amostras foram filtradas usando filtro de seringa de PVDF 0,45 µm, que foi validado no capítulo I, item 3.1.

As formulações também foram avaliadas pelo método de dissolução da monografia correspondente à Farmacopeia Americana (USP 39 NF 34) que emprega 1000 mL de tampão fosfato pH 6,8; 50 rpm de velocidade de agitação, para comparar

o poder discriminativo e a eficácia do método proposto. A quantidade de HTZ e VAL dissolvida foi quantificada pelo método HPLC previamente desenvolvido.

2.2.3 **Análise estatística**

Com o uso do software Statistica 13 (Dell Inc., Tulsa, Estados Unidos) foi feito uma análise multivariada, utilizando como dados originais as porcentagens dissolvidas dos 5 minutos até os 60 minutos, as eficiências de dissolução (ED) e os tempos médios de dissolução ou mean dissolution time (MDT) que foram calculadas com o suplemento do Excel DDsolver (ZHANG et al., 2010). Todos os dados foram previamente padronizados para consequentemente calcular os componentes principais, cada componente principal (CP) é uma combinação linear das variáveis originais. Aqueles que apresentaram os maiores autovalores foram selecionados para a criação dos gráficos, graças a sua capacidade de reter a maior quantidade de informação das variáveis originais. Também foi feito agrupamentos usando o método Cluster (gráfico de dendrograma) ou matriz de semelhança.

3 RESULTADOS E DISCUSÃO

O teor das formulações (Tabela 2) encontra-se dentro dos limites de aceitação estabelecidos na Farmacopeia americana (90 a 110 %) de ambos fármacos declarado no rotulado, os valores estão expressos em mg/comprimido o mg/cápsula e em porcentagem em função da dose.

Tabela 2. Teor de HTZ e VAL nas formulações comercializadas no Brasil e Perú

Código Produto	**hidroclorotiazida**			**valsartana**		
	mg	**%**	**DP**	**mg**	**%**	**DP**
Referência	11,84	94,74	0,66	158,71	99,19	0,39
B1	11,97	95,72	0,14	162,95	101,84	0,09
B2	12,11	96,90	0,26	160,53	100,33	0,35
C1	12,14	97,13	1,35	154,01	97,25	0,34
P1	11,50	92,02	0,37	156,52	108,47	0,51
P2	11,50	91,99	0,41	157,03	98,14	0,79

DP: Desvio padrão

Com os resultados da dissolução foram construídos perfis em função do tempo com o respectivo desvio padrão. A Figura 1, mostra que o método farmacopeico consegue a liberação da totalidade de HTZ e VAL desde os 5 minutos do ensaio só a partir da formulação de referência. As formulações P2, C1, B1 e B2 conseguem liberar mais do 85 % de HTZ, emquanto que a P1 libera só 76,66 % deste fármaco. Na liberação da VAL os resultados mostram que o produto de referência, B1 e B2 liberaram mais do 85 % de VAL, mas P1, P2 e C1 não conseguem alcançar essa porcentagem de liberação. A FDA cita como critério de aceitação o indicado na monografia da farmacopeia americana, para a dissolução de HTZ e VAL a partir de formulações de dose fixa combinada é de no menos de 80 %Q em 30 minutos segundo este critério P1, P2 e C1 seriam produtos rejeitados em termos de não cumprir com controle de qualidade para a sua liberação.

Com o método proposto a média de porcentagem dissolvida de HTZ e VAL aos 30 minutos é de 100,16 ± 4,34 % e 97,11 ± 3,30 % respectivamente (Figura 2). A formação de cone foi observada nos ensaios executados com o método farmacopeico (Figura 3A). O método de dissolução proposto que emprega 75 rpm consegue solucionar o problema do coning, melhorando assim a hidrodinâmica da dissolução tanto para HTZ como para VAL (Figura 3B), favorecendo assim, a solubilização da totalidade da HTZ e VAL a partir das formulações.

Figura 1. Perfis de dissolução das formulações comerciais avaliadas pelo método descrito na Farmacopeia Americana e FDA.

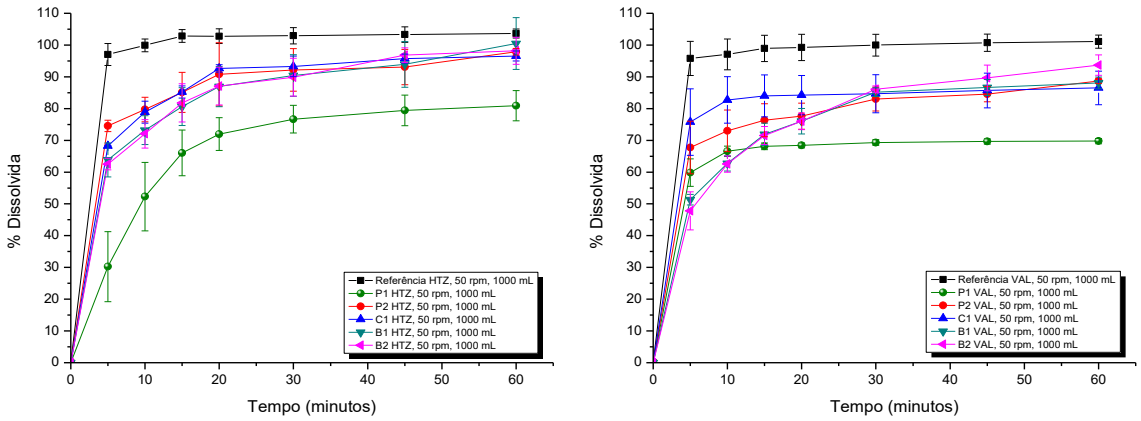


Figura 2. Perfis de dissolução das formulações comerciais avaliadas pelo método proposto

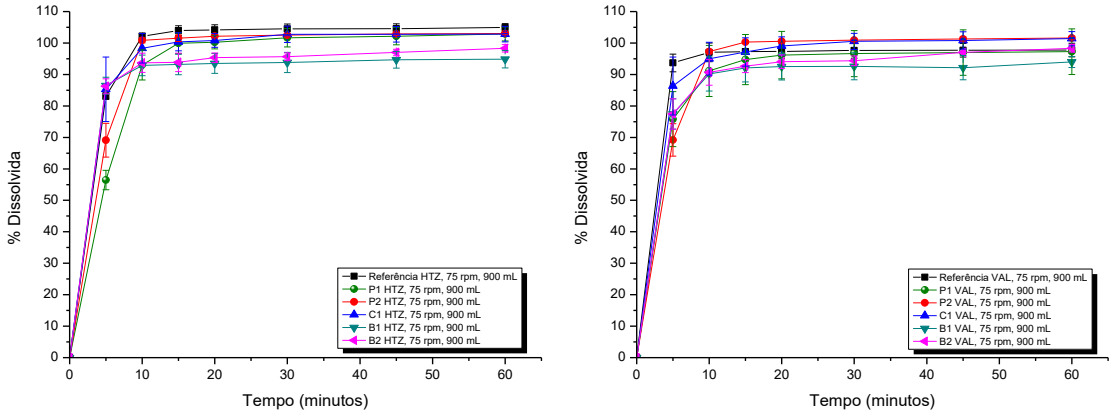
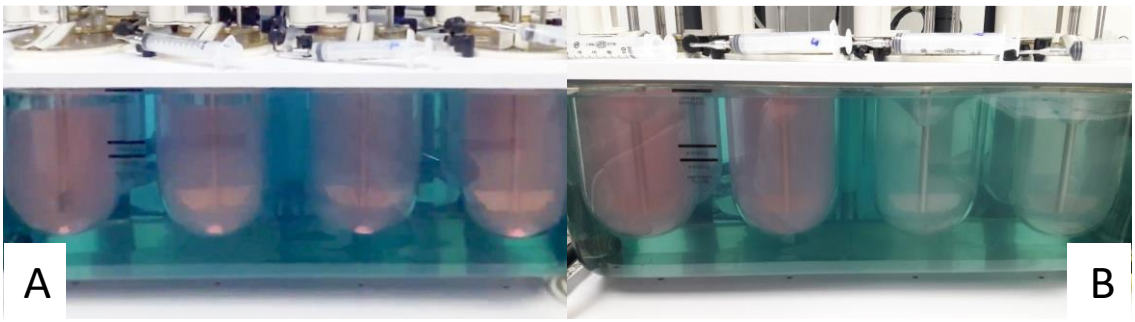


Figura 3. Formação de cone no fundo das cubas de dissolução com 50 rpm de velocidade de agitação (A), Eliminação do cone nas cubas de dissolução com 75 rpm



Demostrar o desempenho de uma formulação em todas as etapas do seu desenvolvimento, é de muita importância, o único método capaz de demostrar isso é o método de dissolução, este deve ser capaz de discriminar entre formulações com atributos de qualidade diferentes (MEHTANI et al., 2018), mas também deve ser capaz de demostrar o real desempenho do produto.

Algumas vezes as diferenças no perfil de dissolução dos medicamentos testados podem estar relacionadas com a composição de excipientes, e fazer com que o desempenho do fármaco dependa grandemente da qualidade dos excipientes utilizados na fabricação como da qualidade do processo (BERTOCCHI et al., 2005). Em outros casos estas mudanças nos dados de dissolução podem ser causadas por uma falta de robustez no método e não por deficiências no produto, embora o método

selecionado deve ter poder discriminatório para detectar mudanças significativas entre os produtos, deve também ser robusto pra evitar a rejeição desnecessária de produtos (CHEN; GAO; DUAN, 2016)

No caso de formulações de dose fixa combinada isto é mais complicado, já que que como foi observado neste trabalho para a HTZ tanto o método de dissolução da Farmacopeia Americana como o método proposto verificam que algumas formulações cumprem especificações de qualidade segundo o estabelecido na farmacopeia americana, mas para a VAL, o método farmacopeico não é adequado, não consegue demostrar a liberação do 100 % do fármaco. Num processo de desenvolvimento da formulação isso poderia ocasionar a rejeição de uma formulação indicando que existe um problema de formulação quando a real causa dos resultados não satisfatórios pode estar no método de dissolução.

A FDA, EMA e demais agências regulatórias reconhecem variados métodos para avaliar os resultados dos perfis de dissolução, no caso da necessidade de comparação de objetos com características similares uma ferramenta usada é a análise multivariada (O'HARA et al., 1998; MA et al., 2000; ICH, 2009).

Segundo os resultados da avaliação estatística de componentes principais para HTZ foram formados 3 grupos (Figura 4) os dois primeiros componentes conseguem reter o 96,98 % da informação contida nas variáveis originais (dados de entrada), no qual se observa que o produto referência, P2 e C1 formam um grupo onde a variávelel comum foi a ED, os três produtos tiveram a maior taxa de ED. B1 e B2 tiveram a maior porcentagem de dissolução nos 5 primeiros minutos de ensaio fato pelo qual formaram um grupo em tanto que P1 com um MDT de 5,82 forma um grupo individual, este valor de MDT indica o produto P1 como aquele com menor velocidade de dissolução.

Para VAL a analise multivariada também classificou os produtos em três grupos sendo que o componente 1 (CP1) e componente 2 (CP2) conseguem reter o 93,10 % da variância contida nos dados originais de entrada (Figura 5). Neste caso o produto de referência foi colocado em um grupo individual, sendo a porcentagem dissolvida nos 5 minutos aquele que maior contribuiu, já que o produto referência liberou 93 % da VAL desde o início do ensaio, fazendo-a a formulação com maior velocidade de dissolução com um valor de MDT de 2,83 min. P2 e C1 foram produtos com um

comportamento mais próximo à referência segundo a ED delas em função do componente 2 (CP2).

Figura 4. Gráfica de componentes principais da analise multivariada dos perfis de dissolução para HTZ

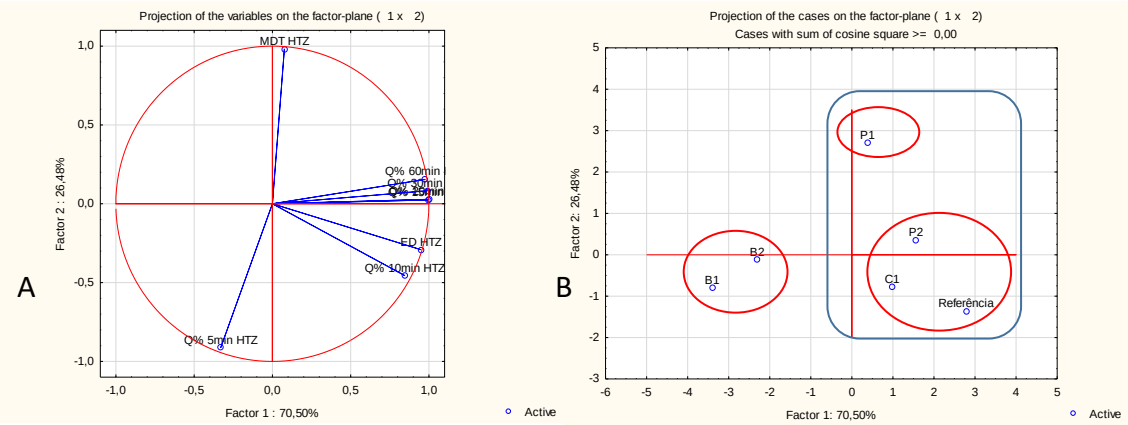
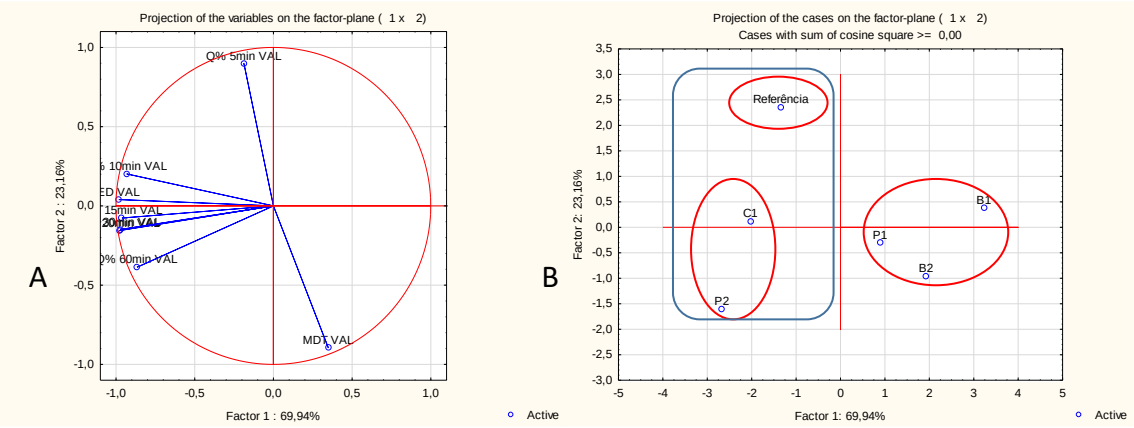


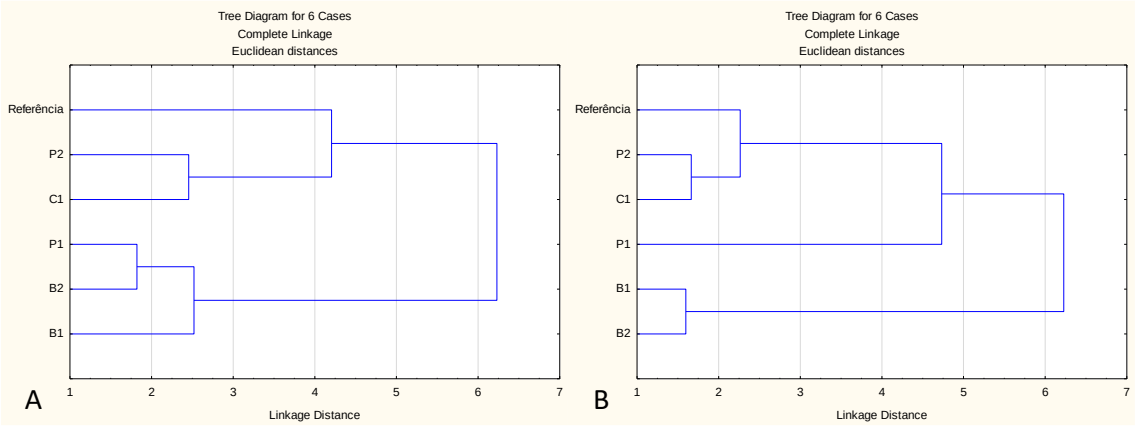
Figura 5. Gráfico de componentes principais da analise multivariada dos perfis de dissolução para VAL



Um analise de agrupamento hierárquico foi feito (Figura 6), observa-se que o produto de referência é diferente das outras formulações. Após a análise dos resultados da avaliação estatística observou-se que as formulações embora tenham perfis de dissolução semelhantes, existe diferenças entre elas, é assim que a porcentagem dissolvida do produto de referência nos primeiros cinco minutos é um

importante parâmetro a ser alcançado pelos demais produtos para melhorar sua equivalência.

Figura 6. Dendrograma da análise de agrupamento hierárquico (Modelo de ligação completa) para HTZ (A) e VAL (B)



Foi observado que existem diferenças entre os métodos desenvolvidos para controle de qualidade (método farmacopeico) cuja finalidade é avaliar a formulação para liberação do lote e o método desenvolvido para avaliar o perfil de dissolução do produto. Este último providencia melhor informação do real desempenho da formulação *in vitro* o qual seria refletido *in vivo*, já que demostrou ser um método que garante a liberação da totalidade da HTZ e VAL a partir das formulações avaliadas sem comprometer a sua capacidade discriminativa.

4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos a partir da aplicação do método de dissolução previamente desenvolvido indicaram que os produtos dose fixa combinada contendo HTZ (12,5) mg e VAL (160 mg) comercializadas tanto no Brasil como no Peru apresentam perfis de dissolução semelhantes. A análise estatística aqui executada foi capaz de agrupar os perfis indicando que os produtos do Brasil são mais semelhantes entre si, o mesmo ocorrendo com os produtos do mercado peruano, quando se utiliza o método aqui desenvolvido. Os resultados também indicaram que a utilização do método farmacopeico não foi adequado para avaliar os perfis de dissolução de alguns produtos, em função do surgimento de cone durante o ensaio.

5 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

(EMA), European Medicines Agenccy. Reflection paper on the dissolution specification for generic solid oral immediate release products with systemic action. v. 44, n. August, 2017.

BERTOCCHI, P. et al. Diclofenac sodium multisource prolonged release tablets - A comparative study on the dissolution profiles. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, n. 4, p. 679–685, 2005.

CHEN, Y.; GAO, Z.; DUAN, J. Z. Dissolution testing of solid products. In: **Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice.** 2 ed., Elsevier Inc., 2016. p. 355–380.

DIRECCIÓN GENERAL DE MEDICAMENTOS INSUMOS Y DROGAS - DIGEMID. **Decreto Supremo 024-2018 SA: Reglameto que regula la intercambiabilidad de Medicamentos**, junio, 2018.

CDRE/FDA. Dissolution Testing and Acceptance Criteria for Immediate-Release Solid Oral Dosage Form Drug Products Containing High Solubility Drug Substances, **Guidance for Industry- Center for Drug Evaluation and Research,** August, 2018.

ICH. Q8(R2) - Pharmaceutical Development. **ICH Harmonised Tripartite Guideline**, v. 8, n. Version 4, p. 1–28, 2009.

MA, M. C. et al. Assessment of similarity between dissolution profiles. **Journal of Biopharmaceutical Statistics**, v. 10, n. 2, p. 229–249, 2000.

MEHTANI, D. et al. Chapter 9 - Dissolution Profile Consideration in Pharmaceutical Product Development. In: **Dosage Form Design Considerations**. Elsevier Inc., p. 287–336. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - MS - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Guia para elaboração de relatorio técnico de estudo de biodisponibilidade relativa/bioequivalencia**, 2003.

NJOKU, J. O. et al. In silico Tools at Early Stage of Pharmaceutical Development: Data Needs and Software Capabilities. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 6, p. 243, 2019.

O'HARA, T. et al. A review of methods used to compare dissolution profile data. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v. 1, n. 5, p. 214–223, 1998.

PAIXÃO, P. et al. Evaluation of dissolution profile similarity – Comparison between the f2, the multivariate statistical distance and the f2 bootstrapping methods. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 112, p. 67–74, 2017.

RUIZ, M. E.; VOLONTÉ, M. G. Biopharmaceutical relevance of dissolution profile comparison: Proposal of a combined approach. **Dissolution Technologies**, v. 21, n. 1, p. 32–43, 2014.

WEBSTER GK, JACKSON, JD, BELL, R. **Poorly Soluble Drugs: Dissolution and Drug Release**. 1. ed. 2017.

ZHANG, Y. et al. DDSolver: An add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. **AAPS Journal**, v. 12, n. 3, p. 263–271, 2010.

ANEXO

Ficha de Aluno

Universidade de São Paulo
Brasil

Login

Aluno(a)
Rosmery Merma Leon
NUSP : 10089631
Sair

Apresentação

- Apresentação
- Vídeos tutoriais

+ Acesso público

+ Senha

+ Pessoa

+ Informações pessoais

- Aluno regular

- Ficha do aluno
- Bolsas
- Emissão de documentos
- Validação de dados

+ PAE

+ Matrícula

+ Cartões USP

- Avisos
- Mapa do *site*
- E-mails automáticos
- Quem São

- Portal Alumni

NUSP: 10089631 Nome: Rosmery Merma Leon

Ficha do Aluno

Curso	Área	Nº Sequencial	Situação	Visualizar
Mestrado	Produção e Controle Farmacêuticos (9139)	1	Matrícula de Acompanhamento	

Preparar para imprimir

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9139 - 10089631/1 - Rosmery Merma Leon

Email:	rosmerymleon@usp.br
Data de Nascimento:	24/06/1986
Cédula de Identidade:	RNE - G336317-X - DF
Local de Nascimento:	Peru
Nacionalidade:	Peruana
Graduação:	Químico Farmacéutico - Universidad Nacional de San Antonio Abad Del Cusco - Peru - 2011

Curso:	Mestrado
Programa:	Fármaco e Medicamentos
Área:	Produção e Controle Farmacêuticos
Data de Matrícula:	10/03/2017
Início da Contagem de Prazo:	10/03/2017
Data Limite para o Depósito:	10/09/2019
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Humberto Gomes Ferraz - 10/03/2017 até o presente. Email: sferraz@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 10/03/2017 Português, Aprovado em 02/04/2018
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 07/05/2018
Data do Depósito do Trabalho:	10/09/2019
Título do Trabalho:	"Combinação dose fixa de hidroclorotiazida (12,5 mg) e valsartana(160 mg): Desenvolvimento de metodologia de dissolução *in vitro* e *in silico* paraavaliar os perfis de dissolução dos produtos comercializados no Brasil e Peru."
Data Máxima para Aprovação da Banca:	25/10/2019
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 10/03/2017

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/07/2019
Impresso em: 10/09/2019 19:50:02

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9139 - 10089631/1 - Rosmery Merma Leon

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5805-2/4	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	03/08/2017	11/10/2017	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5777-3/9	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	03/08/2017	15/11/2017	45	3	93	A	N	Concluída
FBF5751-8/1	Introdução aos Métodos Termoanalíticos	29/08/2017	09/11/2017	150	10	100	A	N	Concluída
FBF5704-7/1	Análise Espectrométrica de Fármacos	05/03/2018	17/06/2018	150	10	95	A	N	Concluída
FBF5800-2/2	Patentes em Fármaco e Medicamentos	15/03/2018	16/05/2018	45	3	100	A	N	Concluída
FBF5779-3/3	Preparo de Artigos Científicos na Área de Farmácia	11/05/2018	13/07/2018	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5821-1/4	Tópicos Avançados em Fármaco e Medicamentos (Avanços e Desafios no Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados para a Liberação Modificada de Fármacos) (1)	03/09/2018	16/09/2018	30	2	100	A	S	Concluída
FBF5837-1/1	Tecnologia do estado-sólido na indústria farmacêutica (1)	31/01/2019	06/02/2019	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	40
Estágios:			
Total:	0	25	40

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Observações:
1) Disciplina(s) cursada(s) voluntariamente pelo(a) candidato(a) após ter cumprido as exigências regulamentares.

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/07/2019
Impresso em: 10/09/2019 19:50:02

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9139 - 10089631/1 - Rosmery Merma Leon

Comissão julgadora da dissertação de mestrado:

NUSP	Nome	Vínculo	Função
93186	Humberto Gomes Ferraz	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/07/2019
Impresso em: 10/09/2019 19:50:02

Fale Conosco: **pgfarma@usp.br** | 2006-2011 - Pós-Graduação/USP | Regimento da Pós-Graduação