UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Correlação *in vitro* - *in vivo* de comprimidos matriciais de
furosemida complexada à hidroxipropil- β -ciclodextrina: métodos *in*
vitro, *in vivo* e *in silico*

Marina de Freitas Silva

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra

Co-orientador:

Profa. Dra. Valentina Porta

São Paulo

2014

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

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Silva, Marina de Freitas

S586co Correlação *in vitro* - *in vivo* de comprimidos matriciais de furosemida complexada à hidroxipropil-β-ciclodextrina : métodos *in vitro*, *in vivo* e *in silico* / Marina de Freitas Silva. -- São Paulo, 2014.
257p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.

Orientador: Serra, Cristina Helena dos Reis

Co-orientador: Porta, Valentina

1. Farmacotécnica 2. Biodisponibilidade : Farmacocinética
I. T. II. Serra, Cristina Helena dos Reis, orientador. III. Porta, Valentina, co-orientador.

615.4 CDD

Marina de Freitas Silva

Correlação *in vitro* - *in vivo* de comprimidos matriciais de furosemida complexada à hidroxipropil- β -ciclodextrina: métodos *in vitro*, *in vivo* e *in silico*

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra
orientador/presidente

José Carlos Saraiva Gonçalves
1º. examinador

Hérída Regina Nunes Salgado
2º. examinador

Leticia Norma Carpentieri Rodrigues
3º. examinador

Eunice Kazue Kano
4º. examinador

São Paulo, 14 de fevereiro de 2014.

**“Tu te tornas eternamente responsável
por aquilo que cativas”**

Antoine de Saint-Exupéry

**À Deus,
pelo dom da vida.**

**Aos meus pais, Vilma e César,
pelo eterno apoio e pelo amor incondicional.**

**À minha irmã, Maísa,
pela amizade e amor infinito.**

**À minha vó, Áurea,
pelo enorme carinho.**

**Às minhas afilhadas, Lara e Beatriz,
pela alegria contagiante.**

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra, pela oportunidade, pelo incentivo, pela dedicação e por sua compreensão em todos os momentos.

À Profa. Dra. Valentina Porta, pela atenção, carinho e nobres conselhos.

À Profa. Dra. Jennifer B. Dressman, pela oportunidade de realizar o doutorado sanduíche e apreender muito sobre modelagem farmacocinética baseada em fisiologia.

Ao Prof. Dr. Newton Andreo Filho e à Dra. Karin Jannet Vera Lopéz, pelos valiosos comentários e sugestões na banca de Qualificação.

Ao Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz, por sempre ter aberto as portas do laboratório e pelo apoio durante o processo de seleção do doutorado sanduíche.

À Profa. Dra. Elizabeth Igne Ferreira, pelo apoio no processo de seleção do doutorado sanduíche.

Ao Pesquisador Dr. Robson Lopes de Melo, do Instituto Butantã, pelo apoio na etapa de liofilização, por sua disponibilidade e interesse sempre pelo que estava sendo feito.

À Coordenação, professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos.

À minha família, pelo amor, pela paciência, pela presença em todos os momentos e pela torcida constante.

Às minhas amigas de infância, Fabíola, Bárbara e Daiana, por estarem sempre presentes.

Aos amigos de Ribeirão Preto, Bárbara, Paula, Tharin, Maira, Marília, Renata, Roberta, Letícia, Priscila, Turma 75 e muitos outros, pelos momentos inesquecíveis.

Às amigas do antigo Biofar, Eunice Kano, Eremita, Simone, Eunice Emiko, Val e Tati, pelos ensinamentos e pela amizade.

Ao aluno de iniciação científica, Caio, por toda ajuda e amizade.

Aos amigos da pós-graduação, Michelle, Fran, Du, Mariane, Guilherme, Marc, Rafael Paraíso, Rafael Melo, Karin, Marcelo, Michelle Issa, Marcelo Duque, Milton, por todo amor e companheirismo.

Aos meus amigos brasileiros na Alemanha, Wesley e Bruno, pelo companheirismo em terras estrangeiras, pela amizade, pelos muitos passeios juntos, pelas risadas e histórias compartilhadas.

Aos colegas do LPB, Michelle, Caio, Fran, Rafael Paraíso, Rafael Melo, Ruberlan, João, Juliana Maura, Juliana Barbosa, Mônica, Juliana Reis, Thaisa e André pela grande ajuda e amizade.

Ao Hospital Universitário, pela disponibilização da área para realização do estudo clínico, e aos funcionários envolvidos.

Aos coletores Alessandro e Vanessa, pelo carinho e dedicação.

Aos voluntários que participaram da etapa clínica deste estudo.

Às técnicas do laboratório de farmacotécnica, Claudinéia e Edgar, pela amizade e disponibilidade em todos os momentos.

Aos secretários, David, Bete, Jorge, Elaine e Marjô, pela competência profissional e prestatividade.

Às bibliotecárias, Leila e Maria Luiza, pela revisão das referências bibliográficas e elaboração da ficha catalográfica.

À FAPESP, Capes, CNPq e DAAD, pelo suporte financeiro, que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao Instituto de Tecnologia Farmacêutica e a Goethe Universität (Frankfurt am Main, Alemanha), pelo acolhimento durante o doutorado sanduíche.

À todos aqueles que direta ou indiretamente, tornaram possível a conclusão deste trabalho.

Sumário

	Pág.
Sumário.....	V
Lista de Figuras.....	XV
Lista de Tabelas.....	XXII
Lista de Abreviaturas	XXIX
Resumo.....	XXXIV
Abstract.....	XXXVI
Introdução	1
Objetivos	7
Objetivo geral	8
Objetivos específicos.....	8
Capítulo 1: Correlação <i>in vitro</i> – <i>in vivo</i>	9
1.1. Conceitos e Definições de Correlação <i>in vitro</i> – <i>in vivo</i>	10
1.2. Considerações sobre o delineamento do estudo para desenvolvimento da CIVIV.....	12
1.2.1. Estudo de dissolução <i>in vitro</i>	12
1.2.2. Estudo de biodisponibilidade <i>in vivo</i>	19
1.3. Obtenção da correlação <i>in vitro</i> – <i>in vivo</i> (CIVIV) por meio de deconvolução dos dados de biodisponibilidade.....	21
1.4. Níveis de correlação	26
1.4.1. Nível A.....	27
1.4.2. Nível B.....	27
1.4.3. Nível C	27
1.4.4. Nível C múltipla.....	28
1.5. Avaliação da previsibilidade das correlações <i>in vitro</i> – <i>in vivo</i> (CIVIV)	28
1.5.1. Validação interna	29
1.5.2. Validação externa	30
1.6. Sistema de classificação biofarmacêutica e correlação <i>in vitro</i> – <i>in vivo</i>	30
1.7. Aplicações das correlações <i>in vitro</i> - <i>in vivo</i>	34
1.7.1. Bioisensões.....	34

1.7.2.	Estabelecimento de especificações para estudos de dissolução	36
1.7.3.	Conceito de mapeamento	37
1.8.	Estudos de correlação <i>in vitro</i> – <i>in vivo</i>	38
1.9.	Considerações finais	45
Capítulo 2: Métodos <i>in vitro</i> - Obtenção e caracterização do complexo de furosemida e hidroxipropil- β -ciclodextrina e dos comprimidos matriciais obtidos a partir deste complexo		46
Resumo		47
2.1.	Introdução	48
2.1.1.	Ciclodextrinas	48
2.1.2.	Comprimidos matriciais contendo hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)	51
2.1.3.	Estudos de dissolução <i>in vitro</i>	54
2.1.4.	Furosemida	57
2.2.	Objetivos	58
2.3.	Materiais e Métodos	58
2.3.1.	Materiais e Reagentes	58
2.3.2.	Equipamentos e vidrarias	59
2.3.3.	Obtenção dos complexo de furosemida e HP- β -CD	60
2.3.4.	Caracterização do complexo de furosemida e HP- β -CD	60
2.3.4.1.	Teor	60
2.3.4.2.	Ensaio termogravimétrico	61
2.3.4.2.1.	Calorimetria Exploratória Diferencial	61
2.3.4.2.2.	Termogravimetria	62
2.3.4.3.	Estudo de solubilidade	62
2.3.4.4.	Estudo de permeabilidade – PAMPA	63
2.3.5.	Obtenção dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD	66
2.3.6.	Caracterização física dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD	67
2.3.6.1.	Peso médio	67

2.3.6.2.	Dureza	68
2.3.6.3.	Friabilidade	68
1.1.1.	Teor de furosemida nos comprimidos	68
2.3.7.	Avaliação do perfil de dissolução da furosemida nos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD	69
2.3.7.1.	Dissolução com Aparato II (pá)	69
2.3.7.2.	Dissolução com Aparato IV (<i>Flow-cell</i>)	70
2.3.8.	Avaliação da eficiência de dissolução da furosemida nos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD	72
2.3.9.	Validação do método analítico espectrofotométrico	73
2.3.9.1.	Preparo de Soluções Padrão	73
2.3.9.2.	Condições para Análise no Espectrofotômetro UV-vis	73
2.3.9.3.	Parâmetros avaliados na validação do método	74
2.3.9.3.1.	Especificidade	74
2.3.9.3.2.	Linearidade	74
2.3.9.3.3.	Precisão	74
2.3.9.3.4.	Exatidão	75
2.4.	Resultados e discussão	75
2.4.1.	Caracterização dos complexo de furosemida e HP- β -CD	75
2.4.1.1.	Teor	75
2.4.1.2.	Ensaio termoanalítico	76
2.4.1.3.	Estudo de Solubilidade	80
2.4.1.4.	Estudo de permeabilidade – PAMPA	86
2.4.2.	Caracterização dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD	89
2.4.3.	Avaliação do perfil de dissolução da furosemida nos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD	91
2.4.4.	Avaliação da eficiência de dissolução da furosemida em comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD	100

2.4.5.	Validação do método analítico espectrofotométrico	111
2.4.5.1.	Especificidade	111
2.4.5.2.	Linearidade.....	111
2.4.5.3.	Precisão.....	115
2.4.5.4.	Exatidão.....	115
2.5.	Conclusões	117
Capítulo 3: Métodos <i>in vivo</i> - Correlação <i>in vitro</i> – <i>in vivo</i> : Estudo de biodisponibilidade <i>in vivo</i> a partir de comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD		
	Resumo.....	120
3.1.	Introdução.....	121
3.1.1.	Correlação <i>in vitro</i> – <i>in vivo</i> (CIVIV)	121
3.1.2.	Estudo de Biodisponibilidade	123
3.1.3.	Farmacocinética da furosemida	124
3.2.	Objetivos.....	125
1.2.	Materiais e métodos	125
3.3.1.	Materiais, Reagentes e Medicamentos.....	125
3.3.2.	Equipamentos	126
3.3.3.	Ensaio de biodisponibilidade.....	126
3.3.3.1.	Etapa clínica	126
3.3.3.1.1.	Casuística.....	127
3.3.3.1.2.	Procedimento do ensaio de biodisponibilidade	129
3.3.3.1.3.	Colheita e processamento das amostras	130
3.3.3.2.	Etapa analítica	131
3.3.3.2.1.	Análise dos perfis de biodisponibilidade	132
3.3.3.3.	Etapa estatística.....	133
3.3.4.	Correlação <i>in vitro</i> – <i>in vivo</i>	133
3.3.5.	Validação Interna	134
3.3.6.	Desenvolvimento e validação do método bioanalítico para a quantificação de furosemida em plasma	135
3.3.6.1.	Preparação das soluções padrão.....	135

3.3.6.2. Preparação das amostras de plasma para a obtenção da curva analítica	136
3.3.6.3. Preparação das amostras de controle de qualidade	137
3.3.6.4. Extração dos fármacos a partir de amostras de plasma para quantificação de furosemida	138
3.3.6.5. Condições para a análise cromatográfica em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	139
3.3.6.6. Validação do Método Analítico para Quantificação de Furosemida em Plasma Humano	140
3.3.6.6.1. Especificidade	140
3.3.6.6.2. Linearidade	140
3.3.6.6.3. Limite de Detecção	141
3.3.6.6.4. Limite de Quantificação	141
3.3.6.6.5. Recuperação	142
3.3.6.6.6. Precisão	142
3.3.6.6.7. Exatidão	143
3.3.6.6.8. Estabilidade	143
3.3.6.6.8.1. Estabilidade de Curta Duração	144
3.3.6.6.8.2. Estabilidade de Longa Duração	144
3.3.6.6.8.3. Estabilidade das Soluções Padrão	145
3.3.6.6.8.4. Estabilidade de Ciclos de Congelamento e Descongelamento	145
3.3.6.6.8.5. Estabilidade Pós-Processamento	145
3.3.6.6.9. Validação do processo de diluição	146
3.4. Resultados e Discussão	146
3.4.1. Ensaio de Biodisponibilidade	146
3.4.2. Correlação <i>in vitro</i> – <i>in vivo</i>	158
3.4.3. Validação interna	169

3.4.4. Desenvolvimento e validação do método bioanalítico para quantificação de furosemida em plasma humano	175
3.4.4.1. Especificidade	175
3.4.4.2. Linearidade.....	176
3.4.4.3. Limite de Detecção.....	178
3.4.4.4. Limite de Quantificação	178
3.4.4.5. Recuperação	178
3.4.4.6. Precisão.....	179
3.4.4.7. Exatidão.....	179
3.4.4.8. Estabilidade	180
3.4.4.8.1. Estabilidade de curta duração	180
3.4.4.8.2. Estabilidade de Longa Duração	181
3.4.4.8.3. Estabilidade de soluções-padrão	182
3.4.4.8.4. Estabilidade de ciclos de congelamento e descongelamento	182
3.4.4.8.5. Estabilidade Pós-Processamento.....	184
3.4.4.9. Validação do processo de diluição	186
3.4.4.10. Considerações finais sobre a metodologia desenvolvida.	186
3.5. Conclusões	188
Capítulo 4: Método <i>in silico</i> - Modelagem farmacocinética.....	189
Resumo.....	190
4.1. Introdução.....	191
4.1.1. Modelagem farmacocinética <i>in silico</i>	191
4.1.2. STELLA®	193
4.1.3. Simcyp®.....	194
4.2. Objetivos.....	195
4.3. Materiais e métodos	195
4.3.1. STELLA®	196
4.3.2. Simcyp®.....	199
4.4. Resultados e discussão.....	200

4.4.1. STELLA®	200
4.4.2. Simcyp®	205
4.4.3. Avaliação dos programas utilizados.....	212
4.5. Conclusões	214
Conclusões	216
Referências Bibliográficas.....	219
Anexos	242
ANEXO A	243
ANEXO B	245
ANEXO C	250
ANEXO D	254

Lista de Quadros

Quadro 1.1. Classes do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (Amidon <i>et al.</i> , 1995).	31
Quadro 1.2. Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) e CIVIV esperada para fármacos de liberação imediata (Demirtürk; Öner, 2003).	32
Quadro 1.3. SCB e expectativa CIVIV para produtos de sistema de liberação modificada (Demirtürk; Öner, 2003).....	34
Quadro 1.4. Estudos de CIVIV publicados na literatura nos últimos cinco anos (2009-2013).	42
Quadro 4.1. Comparativo dos programas utilizados no presente trabalho... ..	213

Lista de Figuras

Figura 1. Fórmula estrutural da furosemida.....	5
Figura 1.1. Três passos clássicos da deconvolução e obtenção da CIVIV a partir do perfil de absorção <i>in vivo</i> (Qiu <i>et al.</i> , 2009).....	23
Figura 1.2. Procedimento de convolução para a obtenção da curva de concentração plasmática calculada (Qiu <i>et al.</i> , 2009).....	25
Figura 2.1. Esquematização do ensaio de permeabilidade utilizando a técnica de PAMPA.....	65
Figura 2.2. Curvas termoanalíticas de DSC referente à furosemida, HP- β -CD e amostras do complexo de furosemida e HP- β -CD (amostras 1, 2 e 3) obtido conforme descrito no item 2.3.3 por liofilização em quantidades equimolares, obtidos sob atmosfera dinâmica de N ₂ (50 mL/min) e razão de aquecimento de 20 °C/min.	78
Figura 2.3. Curvas termoanalíticas de TG referente à furosemida, HP- β -CD e amostras do complexo de furosemida e HP- β -CD (Amostras 1, 2, 3) obtido conforme descrito no item 2.3.3 por liofilização em quantidades equimolares, obtidos sob atmosfera dinâmica de N ₂ (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.	79
Figura 2.4. Solubilidade da furosemida e do complexo de furosemida e HP- β -CD em meios com diferentes pHs, sob a temperatura de 37,0 °C e após agitação por 72 horas com emprego da técnica de <i>Shake Flask</i> . Os valores representam média de três determinações.	84
Figura 2.5. Permeabilidade efetiva (*10 ⁻⁶ cm/s) dos fármacos metoprolol, ranitidina, furosemida, mistura física (MF) de furosemida e HP- β -CD, e complexo de furosemida e HP- β -CD (obtida por liofilização) utilizando pH 7,4 no compartimento doador.....	87
Figura 2.6. Perfis de dissolução em função do tempo, em meio tampão fosfato 0,05 M, pH 6,8, com o emprego de aparato II a 75 rpm, a partir dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD obtidos com diferentes porcentagens de HPMC (30%; 20%; 17,5% 15% e 10%) e designados de A1, A2, A2a, A2b e A3, respectivamente. A1 = 30% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 4,5% C.M.; A2 = 20% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 14,5% C.M.; A2a = 17,5% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 17% C.M.; A2b = 15% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est.	

Mg.; 19,5% C.M.; A3 = 10% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 24,5% C.M. 94

Figura 2.7. Perfis de dissolução da furosemida em função do tempo obtidos a partir dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD obtidos com diferentes porcentagens de HPMC (30%; 17,5% e 10%) e designados de A1, A2a e A3, respectivamente, em experimento empregando o aparato IV, fluxo de 8 mL/min e gradiente de pH como apresentado a seguir: tampão de HCl pH 1,2 nos primeiros 60 minutos, solução de meio acetato pH 4,5 nos 60 minutos seguintes e sistema tampão fosfato pH 6,8 em até 8 horas (esquematizado na Tabela 2.2). Os perfis representam os valores médios obtidos a partir da avaliação de 06 amostras. A1 = 30% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 4,5% C.M.; A2a = 17,5% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 17% C.M.; A3 = 10% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 24,5% C.M. 97

Figura 2.8. Valores de eficiência de dissolução (ED%), calculados a partir dos perfis de dissolução *versus* tempo, dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD com diferentes porcentagens de HPMC (30%; 20%; 17,5%; 15% e 10%), designados de A1, A2, A2a, A2b e A3, respectivamente. Os resultados referem-se aos ensaios de dissolução em meio tampão fosfato 0,05 M, pH 6,8, com emprego do aparato II a 75 rpm. A1 = 30% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 4,5% C.M.; A2 = 20% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 14,5% C.M.; A2a = 17,5% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 17% C.M.; A2b = 15% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 19,5% C.M.; A3 = 10% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 24,5% C.M. 103

Figura 2.9. Valores de eficiência de dissolução (ED%), calculados a partir dos perfis de dissolução *versus* tempo, dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD com diferentes porcentagens de HPMC (30%; 17,5% e 10%), designados de A1, A2a e A3, respectivamente. Os resultados referem-se aos ensaios de dissolução com o emprego do aparato IV, com fluxo de 8 mL/min e gradiente de pH como apresentado a seguir: tampão de HCl pH 1,2 nos primeiros 60 minutos, solução de meio acetato pH 4,5 nos 60 minutos seguintes e sistema tampão fosfato pH 6,8 em até 8 horas (esquematizado na Tabela 2.2). A1 = 30% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 4,5% C.M.; A2a = 17,5% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est.

Mg.; 17% C.M.; A3 = 10% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 24,5% C.M.

..... 108

Figura 2.10. Curva analítica do método analítico de quantificação de furosemida em água por espectrofotômetro UV-vis na faixa de concentração 2 a 20 $\mu\text{g/mL}$. Cada ponto representa a média de 3 determinações ($n=3$). x = Concentração ($\mu\text{g/mL}$); y = Absorbância (UV-vis), r^2 = coeficiente de determinação. 112

Figura 2.11. Curva analítica do método analítico de quantificação de furosemida em tampão HCl pH 1,2 por espectrofotômetro UV-vis na faixa de concentração 2 a 20 $\mu\text{g/mL}$. Cada ponto representa a média de 3 determinações ($n=3$). x = Concentração ($\mu\text{g/mL}$); y = Absorbância (UV-vis), r^2 = coeficiente de determinação. 113

Figura 2.12. Curva analítica do método analítico de quantificação de furosemida em tampão acetato pH 4,5 por espectrofotômetro UV-vis na faixa de concentração 2 a 20 $\mu\text{g/mL}$. Cada ponto representa a média de 3 determinações ($n=3$). x = Concentração ($\mu\text{g/mL}$); y = Absorbância (UV-vis), r^2 = coeficiente de determinação. 113

Figura 2.13. Curva analítica do método analítico de quantificação de furosemida em tampão fosfato pH 6,8 por espectrofotômetro UV-vis na faixa de concentração 2 a 20 $\mu\text{g/mL}$. Cada ponto representa a média de 3 determinações ($n=3$). x = Concentração ($\mu\text{g/mL}$); y = Absorbância (UV-vis), r^2 = coeficiente de determinação. 114

Figura 2.14. Curva analítica do método analítico de quantificação de furosemida em tampão fosfato pH 7,5 por espectrofotômetro UV-vis na faixa de concentração 2 a 20 $\mu\text{g/mL}$. Cada ponto representa a média de 3 determinações ($n=3$). x = Concentração ($\mu\text{g/mL}$); y = Absorbância (UV-vis), r^2 = coeficiente de determinação. 114

Figura 3.1. Curvas de decaimento plasmático médio da furosemida após administração das formulações desenvolvidas contendo complexos de furosemida e HP- β -CD (A1, A2a e A3) (50 mg furosemida) e do medicamento de referência (Furosemida IV Teuto[®]) (20 mg furosemida) aos 12 voluntários. 148

Figura 3.2. Fração absorvida percentual média *versus* tempo a partir das formulações administradas aos 12 voluntários sadios. Cada ponto representa a média obtida a partir de 12 medições. 161

Figura 3.3. Correlação entre a porcentagem de fração absorvida, obtida a partir do ensaio de BD com os 12 voluntários, após a administração das formulações desenvolvidas (A1, A2a e A3) e do medicamento de referência

(Furosemida IV Teuto[®]), e a porcentagem de fração dissolvida, obtida a partir do estudo de dissolução das formulações desenvolvidas (A1, A2a e A3) utilizando o Aparato II com tampão fosfato pH 6,8..... 164

Figura 3.4. Correlação entre a porcentagem de fração absorvida, obtida a partir do ensaio de BD com os 12 voluntários, após a administração das formulações desenvolvidas (A1, A2a e A3) e do medicamento de referência (Furosemida IV Teuto[®]) e a porcentagem de fração dissolvida, obtida a partir do estudo de dissolução das formulações desenvolvidas (A1, A2a e A3) utilizando o Aparato IV com gradiente de pH e fluxo de 8 mL/min..... 166

Figura 3.5. Perfis de decaimento plasmático previsto pelo CIVIV estabelecida e observado experimentalmente após a ingestão de comprimidos matriciais da formulação A1 contendo 50 mg de fármaco em complexo de furosemida e HP- β -CD. 171

Figura 3.6. Perfis de decaimento plasmático previsto pelo CIVIV estabelecida e observado experimentalmente após a ingestão de comprimidos matriciais da formulação A2a contendo 50 mg de fármaco em complexo de furosemida e HP- β -CD. 171

Figura 3.7. Perfis de decaimento plasmático previsto pelo CIVIV estabelecida e observado experimentalmente após a ingestão de comprimidos matriciais da formulação A3 contendo 50 mg de fármaco em complexo de furosemida e HP- β -CD. 172

Figura 3.8. Cromatogramas obtidos por CLAE com detector de fluorescência referente à: (A) plasma branco e (B) Controle de Qualidade Alto (CQA, 1,50 μ g/mL) – plasma branco adicionado de padrões – furosemida (t_r = 8,6 min) e propranolol (t_r = 4,3 min), obtido conforme descrito no item 3.3.6.3. 176

Figura 4.1. Modelo esquemático usado no programa STELLA[®] para a obtenção dos perfis plasmáticos simulados. 198

Figura 4.2. Esquema para a simulação utilizando o Simcyp[®] (adaptado de Chen *et al.*, 2012). 200

Figura 4.3. Perfil de decaimento plasmático previsto pelo modelo utilizando o programa STELLA[®] comparado ao perfil de decaimento plasmático observado experimentalmente, por meio do estudo de BD, após a ingestão de

comprimidos matriciais da formulação A1 contendo 50 mg de fármaco em complexo de furosemida e HP- β -CD.....201

Figura 4.4. Perfil de decaimento plasmático previsto pelo modelo utilizando o programa STELLA[®] comparado ao perfil de decaimento plasmático observado experimentalmente, por meio do estudo de BD, após a ingestão de comprimidos matriciais da formulação A2a contendo 50 mg de fármaco em complexo de furosemida e HP- β -CD.....201

Figura 4.5. Perfil de decaimento plasmático previsto pelo modelo utilizando o programa STELLA[®] comparado ao perfil de decaimento plasmático observado experimentalmente, por meio do estudo de BD, após a ingestão de comprimidos matriciais da formulação A3 contendo 50 mg de fármaco em complexo de furosemida e HP- β -CD.....202

Figura 4.6. Perfil de decaimento plasmático previsto a partir dos dados de dissolução (aparato II) obtido pelo programa Simcyp[®] comparado ao perfil de decaimento plasmático observado experimentalmente, por meio do estudo de BD, após a ingestão de comprimidos matriciais da formulação A1 contendo 50 mg de fármaco em complexo de furosemida e HP- β -CD.....206

Figura 4.7. Perfil de decaimento plasmático previsto a partir dos dados de dissolução (aparato II) obtido pelo programa Simcyp[®] comparado ao perfil de decaimento plasmático observado experimentalmente, por meio do estudo de BD, após a ingestão de comprimidos matriciais da formulação A2a contendo 50 mg de fármaco em complexo de furosemida e HP- β -CD.....207

Figura 4.8. Perfil de decaimento plasmático previsto a partir dos dados de dissolução (aparato II) obtido pelo programa Simcyp[®] comparado ao perfil de decaimento plasmático observado experimentalmente, por meio do estudo de BD, após a ingestão de comprimidos matriciais da formulação A3 contendo 50 mg de fármaco em complexo de furosemida e HP- β -CD.....207

Figura 4.9. Perfil de decaimento plasmático previsto a partir dos dados de dissolução (aparato IV) obtido pelo programas Simcyp[®] comparado ao perfil de decaimento plasmático observado experimentalmente, por meio do estudo de BD, após a ingestão de comprimidos matriciais da formulação A1 contendo 50 mg de fármaco em complexo de furosemida e HP- β -CD.....209

Figura 4.10. Perfil de decaimento plasmático previsto a partir dos dados de dissolução (aparato IV) obtido pelo programas Simcyp[®] comparado ao perfil de decaimento plasmático observado experimentalmente, por meio do estudo de BD, após a ingestão de comprimidos matriciais da formulação A2a contendo 50 mg de fármaco em complexo de furosemida e HP- β -CD.....209

Figura 4.11. Perfil de decaimento plasmático previsto a partir dos dados de dissolução (aparato IV) obtido pelo programas Simcyp[®] comparado ao perfil de decaimento plasmático observado experimentalmente, por meio do estudo de BD, após a ingestão de comprimidos matriciais da formulação A3 contendo 50 mg de fármaco em complexo de furosemida e HP- β -CD.....210

Lista de Tabelas

Tabela 2.1. Composição percentual das formulações dos comprimidos matriciais contendo os complexo de furosemida e HP- β -CD	67
Tabela 2.2. Programação do aparato IV (<i>Flow-cell</i>) considerando o meio de dissolução, intervalos de tempos de coleta e quantidade de meio recolhida e descartada.....	71
Tabela 2.3. Valores médios de teor de furosemida obtidos para a matéria-prima e para o complexo de furosemida e HP- β -CD obtido conforme descrito no item 2.3.3	76
Tabela 2.4. Valores de solubilidade e a respectiva relação dose/solubilidade (dose = 40 mg) para a furosemida e o complexo de furosemida e HP- β -CD, obtidos por meio do estudo de solubilidade em diferentes meios, sob temperatura de 37,0°C e após 72 horas de agitação. Os resultados de solubilidade foram comparados e expressos em incremento de solubilidade	83
Tabela 2.5. Valores médios de permeabilidade efetiva em função do gradiente de pH e valores de desvio padrão (DP) dos resultados. Os valores de permeabilidade estão expressos em $\times 10^{-6}$ cm/s.....	86
Tabela 2.6. Influência da HP- β -CD na permeabilidade da furosemida. Os valores de permeabilidade estão expressos em $\times 10^{-6}$ cm/s	88
Tabela 2.7. Valores médios do peso e dureza dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD	89
Tabela 2.8. Teor de furosemida nos comprimidos das formulações A1, A2a e A3	90
Tabela 2.9. Porcentagem de furosemida dissolvida em função do tempo, em meio tampão fosfato 0,05 M, pH 6,8, com emprego do aparato II a 75 rpm, a partir dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD, obtidos com diferentes porcentagens de HPMC (30%; 20%; 17,5%; 15% e 10%) e designados de A1, A2, A2a, A2b e A3, respectivamente, em meio tampão fosfato 0,05 M, pH 6,8, aparato II, 75 rpm.....	93
Tabela 2.10. Porcentagem de furosemida dissolvida em função do tempo a partir dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD obtidos com diferentes porcentagens de HPMC (30%; 17,5% e 10%) e	

designados de A1, A2a e A3, respectivamente, em experimento empregando o aparato IV, fluxo de 8 mL/min e gradiente de pH como apresentado a seguir: solução de HCl pH 1,2 nos primeiros 60 minutos, solução de meio acetato pH 4,5 nos 60 minutos seguintes e sistema tampão fosfato pH 6,8 em até 8 horas de estudo (esquematizado na Tabela 2.2) 96

Tabela 2.11. Valores de área sob a curva *versus* tempo (ASC_{0-480}) e de eficiência de dissolução (ED%) calculados a partir dos perfis de dissolução *versus* tempo, em meio tampão fosfato 0,05 M, pH 6,8, com emprego do aparato II a 75 rpm, dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD obtidos com diferentes porcentagens de HPMC (30%; 20%; 17,5%; 15% e 10%) e designados de A1, A2, A2a, A2b e A3, respectivamente 102

Tabela 2.12. Valores dos índices de significância (p) obtidos pela comparação entre os valores de eficiência de dissolução (ED%) dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD com diferentes porcentagens de HPMC (30%; 20%; 17,5%; 15% e 10%), designados de A1, A2, A2a, A2b e A3, respectivamente. Os resultados referem-se aos ensaios de dissolução em meio tampão fosfato 0,05 M, pH 6,8, com emprego do aparato II a 75 rpm 105

Tabela 2.13. Valores de área sob a curva (ASC_{0-480}) e da eficiência de dissolução (ED%), calculados a partir dos perfis de dissolução *versus* tempo, dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD com diferentes porcentagens de HPMC (30%; 17,5% e 10%), designados de A1, A2a e A3, respectivamente. Os resultados referem-se aos ensaios de dissolução com o emprego do aparato IV, com fluxo de 8 mL/min e gradiente de pH como apresentado a seguir: tampão de HCl pH 1,2 nos primeiros 60 minutos, solução de meio acetato pH 4,5 nos 60 minutos seguintes e sistema tampão fosfato pH 6,8 em até 8 horas (esquematizado na Tabela 2.2) 107

Tabela 2.14. Valores dos índices de significância (p) obtidos pela comparação entre os valores de eficiência de dissolução (ED%) dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD com diferentes porcentagens de HPMC (30%; 17,5% e 10%), designados de A1, A2a e A3, respectivamente. Os resultados referem-se aos ensaios de

dissolução com o emprego do aparato IV, com fluxo de 8 mL/min e gradiente de pH como apresentado a seguir: tampão de HCl pH 1,2 nos primeiros 60 minutos, solução de meio acetato pH 4,5 nos 60 minutos seguintes e sistema tampão fosfato pH 6,8 em até 8 horas (esquematizado na Tabela 2.2) 109

Tabela 2.15. Comparativo da porcentagem de furosemida dissolvida e eficiência de dissolução (ED%) obtidos com o aparato II (meio de dissolução - tampão fosfato pH 6,8) e aparato IV (meio de dissolução com gradiente de pH conforme descrito na Tabela 2.2a) a partir dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD obtidos com diferentes porcentagens de HPMC (30%; 20%; 17,5%; 15% e 10%) e designados de A1, A2, A2a, A2b e A3, respectivamente 110

Tabela 2.16. Precisão e exatidão intradia e interdias referentes ao método analítico para quantificação de furosemida em água por espectrofotômetro UV-vis 115

Tabela 2.17. Precisão e exatidão intradia e interdias referentes ao método analítico para quantificação de furosemida em tampão HCl pH 1,2 por espectrofotômetro UV-vis 116

Tabela 2.18. Precisão e exatidão intradia e interdias referentes ao método analítico para quantificação de furosemida em tampão acetato pH 4,5 por espectrofotômetro UV-vis 116

Tabela 2.19. Precisão e exatidão intradia e interdias referentes ao método analítico para quantificação de furosemida em tampão fosfato pH 6,8 por espectrofotômetro UV-vis 116

Tabela 2.20. Precisão e exatidão intradia e interdias referentes ao método analítico para quantificação de furosemida em tampão fosfato pH 7,5 por espectrofotômetro UV-vis 117

Tabela 3.1. Desenho amostral para o ensaio de biodisponibilidade de comprimidos contendo 50 mg de fármaco em complexo de furosemida e HP- β -CD (Fases 1, 2 e 3), produzidos com composição percentual conforme descrito no item 2.3.5 (Capítulo 2), e de Furosemida IV Teuto[®] (Fase 4) 130

Tabela 3.2. Descrição dos volumes empregados da solução padrão de furosemida e da mistura de água e metanol na proporção de 90:10 (v/v) para a obtenção das soluções padrões de trabalho de furosemida 136

Tabela 3.3. Descrição dos volumes empregados da solução padrão de furosemida e de plasma branco para a obtenção das soluções padrão de furosemida para a construção da curva analítica..... 137

Tabela 3.4. Descrição dos volumes da solução padrão de furosemida 200 µg/mL e do plasma branco para a obtenção dos controles de qualidade, baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA)..... 138

Tabela 3.5. Parâmetros farmacocinéticos obtidos a partir da análise da furosemida nos plasmas dos 12 voluntários após a administração da formulação desenvolvida A1 149

Tabela 3.6. Parâmetros farmacocinéticos obtidos a partir da análise da furosemida nos plasmas dos 12 voluntários após a administração da formulação desenvolvida A2a 150

Tabela 3.7. Parâmetros farmacocinéticos obtidos a partir da análise da furosemida nos plasmas dos 12 voluntários após a administração da formulação desenvolvida A3 151

Tabela 3.8. Parâmetros farmacocinéticos obtidos por extrapolação da equação de decaimento plasmático da furosemida nos 12 voluntários após a administração solução de Furosemida IV Teuto® (10 mg/mL) 152

Tabela 3.9. Valores médios, desvio padrão e coeficiente de variação dos parâmetros farmacocinéticos comparativos obtidos a partir da análise da furosemida nos plasmas dos 12 voluntários após a administração das formulações desenvolvidas A1, A2a e A3 e da solução de Furosemida IV Teuto® (10 mg/mL) 153

Tabela 3.10. Avaliação comparativa dos parâmetros farmacocinéticos (C_{max} , T_{max} e ASC_{0-t}) por ANOVA fator único para as formulações A1, A2a, A3 e IV administradas aos 12 voluntários..... 157

Tabela 3.11. Equações de decaimento plasmático obtidas a partir das curvas de concentração plasmática *versus* tempo para cada um dos voluntários do estudo, após administração do Furosemida IV Teuto® 20 mg a voluntários sadios 159

Tabela 3.12. Concentrações plasmáticas determinadas e extrapoladas utilizando as equações de decaimento plasmático obtida pela curva de

concentração plasmática <i>versus</i> tempo após administração intravenosa da Furosemida IV Teuto® 20 mg para cada um dos voluntários	160
Tabela 3.13. Valores de BD absoluta obtidos para as formulações A1, A2a e A3 a partir da administração intravenosa da Furosemida IV Teuto® 20 mg.	162
Tabela 3.14. Fração dissolvida (aparato II) e fração absorvida a partir das formulações A1, A2a e A3 no intervalo de tempo de 0-8 horas	163
Tabela 3.15. Fração dissolvida (aparato IV) e fração absorvida a partir das formulações A1, A2a e A3 no intervalo de tempo de 0-8 horas	165
Tabela 3.16. Frações absorvidas extrapoladas pela CIVIV e concentrações plasmáticas de furosemida previstas para as formulações A1, A2a e A3 no intervalo de 0 a 8 horas	170
Tabela 3.17. Estimativa de erros de predição (EP%) para os parâmetros farmacocinéticos C_{max} e ASC_{0-t} , para as formulações A1, A2a e A3 na validação interna da CIVIV.	173
Tabela 3.18. Parâmetros relativos à equação obtida a partir da curva analítica do método para quantificação de furosemida em plasma por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência na faixa de 0,05 e 2,00 µg/mL.....	177
Tabela 3.19. Recuperação média do procedimento de purificação das amostras de plasma para furosemida (padrão) e para propranolol (padrão interno)	179
Tabela 3.20. Precisão e exatidão intradia e interdias referentes ao método analítico para quantificação de furosemida em amostras de plasma por CLAE com detecção por fluorescência.....	180
Tabela 3.21. Resultados referentes ao estudo de estabilidade da furosemida em amostras analisadas após manutenção à temperatura ambiente por 4 horas	181
Tabela 3.22. Resultados referentes ao estudo de estabilidade da furosemida em amostras de plasma de controle de qualidade, analisadas logo após o preparo e mantidas a -20°C por 60 dias.....	182
Tabela 3.23. Resultados referentes ao estudo de estabilidade de furosemida em amostras de plasma, analisadas imediatamente após o preparo,	

mantidas a temperatura de -20°C e submetidas a sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento.....183

Tabela 3.24. Resultados referentes a estudo de estabilidade da furosemida em amostras de plasma analisadas 24 e 48 horas após o procedimento de purificação185

Tabela 3.25. Resultados referentes ao processo de validação da diluição186

Tabela 4.1. Parâmetros farmacocinéticos calculados a partir da curva média de decaimento plasmático após a administração intravenosa do medicamento referência, a Furosemida IV Teuto[®] (10 mg/mL) conforme dados apresentados no item 3.4.1 do Capítulo 3.....197

Tabela 4.2. Estimativa de erro de predição (EP%) para os parâmetros farmacocinéticos C_{max} e ASC_{0-t} , para as formulações A1, A2a e A3 a partir do modelo utilizando o programa STELLA[®] comparado ao valores observados experimentalmente203

Tabela 4.3. Estimativa de erro de predição (EP%) para os parâmetros farmacocinéticos C_{max} e ASC_{0-t} , para as formulações A1, A2a e A3 a partir dos dados de dissolução (aparato II) obtido pelo programa Simcyp[®] comparado aos valores observados experimentalmente208

Tabela 4.4. Estimativa de erro de predição (EP%) para os parâmetros farmacocinéticos C_{max} e ASC_{0-t} , para as formulações A1, A2a e A3 a partir dos dados de dissolução (aparato IV) obtido pelo programa Simcyp[®] comparado aos valores observados experimentalmente210

Lista de Abreviaturas

A_N – número de absorção

ANOVA – análise de variância em fato único

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASC – área sob a curva “concentração plasmática *versus* tempo”

ASC_{0-t} – área sob a curva “concentração plasmática *versus* tempo” do tempo zero ao tempo t

$ASC_{0-\infty}$ – área sob a curva “concentração plasmática *versus* tempo” do tempo zero extrapolada ao infinito

BD – biodisponibilidade

BE – bioequivalência

CD – ciclodextrina

CDs – ciclodextrinas

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CHO – colesterol

CIVIV – correlação *in vitro* - *in vivo*

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

CI – clearance

cm – centímetros

C_{max} – concentração plasmática máxima

Conc. – concentração

Conc. det. – concentração determinada

Conc. nom. – concentração nominal

CQA – controle de qualidade alta

CQB – controle de qualidade baixo

CQM – controle de qualidade médio

CV – coeficiente de variação

D_N – número de dissolução

D_0 – número de dose

DP – desvio-padrão

DMSO – dimetilsulfóxido

DSC – calorimetria exploratória diferencial

ED% – eficiência de dissolução em porcentagem

EMA – European Medicines Agency

EP% – erro de predição dado em porcentagem

EV – extravascular

FaSSIF – fluido intestinal simulado no estado de jejum

FDA – Food and Drug Administration

FeSSIF – fluido intestinal simulado no estado alimentado

FF – forma farmacêutica

FFs – formas farmacêuticas

FL – detector de fluorescência

FR – furosemida

FURP – Fundação para o Remédio Popular

g – gramas

GI – gastrintestinal

h – horas

H – altura

HP- β -CD – hidroxipropil- β -ciclodextrina

HPMC – hidroxipropilmetilcelulose

IC 90% – intervalo de confiança de 90%

ICH – International Conference on Harmonisation

IV – intravenosa

K_{10} – constante de eliminação no fármaco

K_{12} – constante de distribuição do fármaco da circulação sistêmica para os órgãos e tecidos

K_{21} – constante de distribuição do fármaco dos órgãos e tecidos para a circulação sistêmica

K_a – constante de absorção

K_{el} – constante de eliminação

Kg – quilogramas

L – litro

LD – limite de detecção

LQ – limite de quantificação

M – molar

MF – mistura física

mg – miligramas

µg – microgramas

Min. – minutos

mL – mililitros

µL – microlitros

mM – milimolar

MS/MS – detector de massas

nm – nanometro

OMS – Organização Mundial da Saúde

p – intervalo de confiança

P – padrão

PAMPA – ensaio de membranas paralelas artificiais (*Parallel Artificial Membrane Permeation Assay*)

PBPK – farmacocinética baseado na fisiologia (*physiologically based pharmacokinetic*)

PC – fosfatidilcolina

PI – padrão interno

pi – peso ideal

PVDF – polivinildifluorideno

p/p – peso/peso

p/v – peso/volume

R – medicamento referência

rpm – rotações por minuto

SCB – sistema de classificação biofarmacêutica

SCoF – fluido colônico simulado

SGF – fluido gástrico simulado

SIF – fluido intestinal simulado

t – tempo

tr – tempo de retenção

T – medicamento teste

$t_{(1/2)el}$ – meia-vida eliminação

t_{max} – tempo correspondente à concentração plasmática máxima

TCLE – termo de consentimento livre e esclarecido

TDM – tempo de dissolução médio

TG – termogravimetria

TGI – trato gastrintestinal

TRM – tempo de residência médio

USP – Farmacopeia americana

UV-vis – detector ultravioleta-vísivel

V – volume

V_d – volume de distribuição

V_{ss} – volume de distribuição no estado de equilíbrio

WHO – World Health Organization

Resumo

SILVA, M.F. **Correlação *in vitro* - *in vivo* de comprimidos matriciais de furosemida complexada à hidroxipropil- β -ciclodextrina: métodos *in vitro*, *in vivo* e *in silico***. 2014. 257p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A correlação *in vitro* - *in vivo* (CIVIV) refere-se ao estabelecimento de uma relação racional entre uma propriedade *in vitro* de uma forma farmacêutica (FF) e uma característica biológica, ou parâmetros derivados destas, produzidas a partir da absorção do fármaco, liberado por uma FF. Para o desenvolvimento de uma CIVIV, são necessárias três ou mais formulações, as quais são avaliadas em relação ao comportamento de dissolução e à biodisponibilidade (BD), e por meio do cálculo de deconvolução, estimam-se as frações absorvidas. A furosemida, fármaco modelo, é um diurético usado no tratamento de hipertensão. Este fármaco é classificado como classe IV do sistema de classificação biofarmacêutico (SCB) (Amidon *et al.*, 1995). O objetivo do presente trabalho foi estabelecer uma CIVIV para formas farmacêuticas (FFs) de liberação modificada contendo complexo de furosemida e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD), a partir de ensaios de dissolução e estudos de BD. O complexo de furosemida e HP- β -CD foi obtido por liofilização e caracterizado por análise térmica, solubilidade e permeabilidade. A partir do complexo, foram produzidas cinco formulações de comprimidos de liberação modificada, com diferentes concentrações de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) (10-30%). Estas foram submetidas aos estudos de dissolução com o aparato II. Destas, foram selecionadas três formulações com perfis distintos e submetidas ao estudo com o aparato IV e posteriormente ao estudo de BD. A partir destes resultados foi estabelecida uma CIVIV e esta foi avaliada por meio da validação interna. Foi realizado o estudo *in silico* de previsão das curvas de decaimento plasmático com emprego dos programas, STELLA[®] e Simcyp[®], a partir dos dados: solubilidade da furosemida; dissolução a partir das formulações e dados farmacocinéticos obtidos a partir da injeção intravenosa do medicamento referência. Quanto à caracterização do complexo, os ensaios termoanalíticos sugerem que a furosemida forme complexo de inclusão com a HP- β -CD pela técnica da liofilização. Observou-se o aumento da solubilidade em relação ao fármaco puro. Entretanto, quanto à permeabilidade, avaliada por meio do PAMPA (permeabilidade em membrana artificial paralela), os resultados foram semelhantes entre o fármaco puro e o complexo. Quanto ao comportamento de dissolução, avaliado com emprego dos aparatos II e IV, observou-se que as formulações apresentaram perfis de dissolução distintos. Os resultados do estudo de BD indicaram que a concentração do HPMC tem impacto relevante na absorção da furosemida. Foram obtidas correlações lineares a partir dos dados de fração absorvida e de dissolução, com coeficiente de determinação de 0,7662 para o aparato II e de 0,96017 para o IV. A validação interna da CIVIV empregando o aparato IV indicou que a correlação foi satisfatória. O estudo *in silico* de previsão das curvas de decaimento plasmático demonstrou que, nas condições empregadas, o modelo desenvolvido com o STELLA[®] foi mais preditivo do que o obtido pelo Simcyp[®].

Palavras chaves: correlação *in vitro* - *in vivo*, dissolução, biodisponibilidade, modelagem farmacocinética, furosemida.

Abstract

SILVA, M.F. ***In vitro - in vivo correlation of matrix tablets of furosemide complexed with hidroxypropyl- β -cyclodextrin: in vitro, in vivo and in silico methods.*** 2014. 257p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The *in vitro - in vivo* correlation (IVIVC) refers to the establishment of a rational relationship between a *in vitro* property of a pharmaceutical form (PF) and a biological characteristic or parameters derived from those, produced from the absorption of a drug released from a PF. For the development of an IVIVC, it is necessary three or more formulations, which are evaluated in relation to the dissolution behavior and for bioavailability (BA), calculating by deconvolution, an estimated absorbed fractions. Furosemide, a model drug, is a diuretic used in the treatment of hypertension. This drug is classified as class IV from biopharmaceutical classification system (BCS) (Amidon *et al.*, 1995). The objective of this study was to establish an IVIVC for pharmaceutical forms (PFs) with modified release containing furosemide complexed with hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD), from dissolution tests and BA studies. The complex of furosemide and HP- β -CD was obtained by freeze-drying and characterized by thermal analysis, the solubility and the permeability. From the complex were produced five modified release tablet formulations, with different concentrations of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) (10-30%). These formulations were subjected to dissolution studies with the apparatus II. From these, three formulations with distinct profiles were selected and subjected to dissolution study with apparatus IV and subsequently to the BA study. From these results, an IVIVC was established and this was evaluated by internal validation. The *in silico* study was conducted to predict plasma decay curves with employment programs, STELLA[®] and Simcyp[®], from the following data: furosemide solubility, dissolution from the formulations evaluated and pharmacokinetic data obtained from intravenous drug reference. From characterization of the complex, the thermoanalytical tests suggest that furosemide form inclusion complex with HP- β -CD by freeze-drying technique. It was observed an increased solubility compared to the pure drug. However, permeability results, as assessed by the PAMPA (Parallel artificial membrane permeability), were similar for both furosemide and the complex. As for the dissolution behavior, evaluated with apparatus II and IV, so it was observed that the formulations showed an distinct profile. it was observed that the formulations produced showed different dissolution profiles. The results from BA assays indicated that the HPMC concentration has an important impact on the furosemide absorption. It was obtained a linear correlation from absorption fraction and dissolution data, with the determination coefficient of 0.7662 to apparatus II and 0.96017 from apparatus IV. Internal validation, with the IVIVC obtained from apparatus IV, indicated that the correlation obtained was satisfactory. The *in silico* study predicted plasma decay curves, showed that under the conditions used, the model developed with STELLA[®] was more predictive than the model obtained by Simcyp[®].

Keywords: *in vitro - in vivo* correlation, dissolution, bioavailability, pharmacokinetic modeling, furosemide.

Introdução

A via oral é a principal via de administração de medicamentos em função da facilidade de administração, baixo custo e por permitir maior adesão ao tratamento (Shargel; Yu, 2012; Storpirtis *et al.*, 2009). Entretanto, o processo de absorção de fármacos no trato gastrointestinal (TGI) é extremamente complexo, influenciado por fatores como: dissolução do fármaco nos líquidos do TGI, velocidade de esvaziamento gástrico, motilidade intestinal, pH do TGI, metabolismo pré-sistêmico, proteínas de efluxo presentes no intestino, entre outros (Mourão, 2009). A eficácia dos medicamentos administrados por esta via depende da capacidade da forma farmacêutica (FF) liberar o fármaco em quantidade suficiente para que este seja absorvido e se torne disponível no local de ação para exercer seu efeito farmacológico (Shargel; Yu, 2012; Storpirtis *et al.*, 2009). Assim, a adequada biodisponibilidade (BD) oral é atingida quando um fármaco tem máxima solubilidade e permeabilidade no local de absorção. Portanto, a solubilidade do fármaco nos líquidos gastrintestinais e a sua permeabilidade através das membranas biológicas são fundamentais para o processo de absorção e, conseqüentemente, para a BD (Volpe, 2010; Custodio; Wu; Benet, 2008; Egan; Lauri, 2002; Amidon *et al.*, 1995).

Os ensaios de bioequivalência (BE) são empregados na análise comparativa dos produtos candidatos a genéricos e similares, com os respectivos produtos de referência, e permitem avaliar, em condições pré-estabelecidas, a concentração plasmática do fármaco em função do tempo para um medicamento teste e um medicamento referência (Armando, 2008; Serra *et al.*, 2008; Brasil, 2006; Kano *et al.*, 2005). A eficácia dos medicamentos genéricos e similares é comprovada principalmente por meio da comparação da BD com o medicamento referência através dos ensaios *in vivo*. Estes estudos são realizados para: 1) a aprovação de um novo fármaco ou substância ativa (registro de um novo produto), 2) a aprovação e registro de uma nova formulação, ou 3) para a aprovação e registro dos medicamentos genéricos (Lennernäs; Abrahamsson, 2005). Neste sentido, a eficácia terapêutica e a segurança de formulações farmacêuticas são governadas por fatores relacionados tanto às características de dissolução do fármaco *in vitro*, que é capaz de estimar o comportamento da dissolução do fármaco *in vivo*,

quanto por sua BD *in vivo* (Otsuka; Shono; Dressman, 2013; Demirtürk; Öner, 2003). Entretanto, estes estudos estão sujeitos à elevada variabilidade intra e interindividual de alguns fármacos, apresentam custo mais elevado, geralmente envolvem a participação de indivíduos saudáveis, geram grande número de amostras, que são analisadas por técnicas cromatográficas e normalmente empregam elevado volume de solventes orgânicos. A inclusão de voluntários nos ensaios de BD/BE tem gerado muitas discussões decorrentes dos aspectos éticos que envolvem a participação destes indivíduos nestes estudos (Porta *et al.*, 2008; Hellriegel; Bjornsson; Hauck, 1996; Jackson, 1994).

Considerando estas questões, buscam-se alternativas que permitam a substituição dos ensaios *in vivo* por estudos *in vitro* através de resultados confiáveis e seguros, e que garantam a eficácia e segurança dos medicamentos. Nesse sentido, busca-se o desenvolvimento de métodos *in vitro* capazes de isentar produtos farmacêuticos dos ensaios de BE. Dentre estes, os estudos de correlação *in vivo* - *in vitro* (CIVIV) aparecem como uma importante estratégia para a definição de métodos *in vitro* adequados capazes de substituírem os estudos *in vivo* de BD/BE (Campos *et al.*, 2011; Volpe, 2010; Kasim *et al.*, 2004; Marcolongo, 2003; Burton *et al.*, 2002; United States, 2000; Sinko; Leesman; Amidon, 1991). São estudos extremamente vantajosos, apesar das dificuldades para estabelecer uma correlação preditiva, pois podem proporcionar o desenvolvimento racional de novas FFs. Adicionalmente, estes estudos permitem bioisentar os medicamentos genéricos e similares dos estudos de BE (United States, 2000).

A correlação *in vitro* – *in vivo* (CIVIV) pode ser definida como uma ferramenta matemática preditiva que descreve uma relação entre as propriedades de dissolução *in vitro* de um fármaco a partir de uma FF e sua BD *in vivo* (Cardot; Davit, 2012; Qiu *et al.*, 2009; Cardot; Beyssac; Alric, 2007; Emami, 2006; Brasil, 2002). O principal objetivo do desenvolvimento de uma CIVIV é possibilitar que o ensaio de dissolução substitua os estudos de BD *in vivo*, reduzindo desta forma, o número destes ensaios exigidos na ocasião do registro de medicamentos genéricos e similares, de formulações de liberação modificada, e no caso de alterações pós-registro (Eddington *et al.*, 1998).

Os estudos de CIVIV apresentam importantes aplicações nas áreas de farmacotécnica e biofarmácia, por permitirem a avaliação e elucidação dos mecanismos envolvidos na liberação *in vivo* do fármaco a partir de uma FF e a correlação do comportamento *in vivo* com aquele observado *in vitro* (Yasir *et al.*, 2010; Mourão, 2009; Pró-genéricos, 2009; Porta *et al.*, 2008; Kano, 2002).

Diante deste contexto, os ensaios de dissolução constituem importante ferramenta no desenvolvimento de novas FFs e na garantia de qualidade dos medicamentos. Estes testes adquirem maior relevância quando podem ser correlacionados com dados obtidos em testes *in vivo*, o que permite prever o comportamento de uma formulação específica no organismo a partir de dados obtidos *in vitro* (Porta; Yamamichi; Storpirtis, 2002).

Outra ferramenta útil para biofarmácia é o estudo *in silico* que envolve a modelagem farmacocinética, e permite prever a concentração e a distribuição de fármacos no organismo. O desenvolvimento destes modelos matemáticos que permitem a predição da concentração de fármacos pode ser extremamente vantajoso em diversas aplicações, como por exemplo: em estudos preditivos da curva de decaimento plasmático, em ajuste de doses de medicamentos de baixo índice terapêutico, em análise de entorpecentes ou substâncias tóxicas ao organismo e permitindo reduzir número de animais e voluntários em estudo. Essa abordagem tem sido cada vez mais utilizada em estudos prospectivos, pois possibilita realizar testes sem que haja a exposição desnecessária de indivíduos e em estudos retrospectivos, na tentativa de entender melhor essas ferramentas *in silico* e elaborar protocolos da técnica (Otsuka; Shono; Dressman, 2013; Gallo-Neto, 2012; Wagner *et al.*, 2012).

A furosemida (Figura 1), quimicamente denominada Ácido 5-(aminosulfonil)-4-cloro-2-((furanilmetil)amino)benzóico, pertence à família das sulfonamidas. É um fármaco que atua como inibidor do transporte simultâneo dos íons sódio, potássio e cloreto no ramo ascendente espesso da alça de Henle (Spricigo *et al.*, 2008; Jackson, 2003; Merck Index, 1996).

A furosemida é um ácido fraco e de baixa solubilidade e baixa permeabilidade, portanto pertence a classe IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (Granero *et al.*, 2010; Amidon *et al.*, 1995). Sua solubilidade é reduzida em meios aquosos, sendo pH-dependente, ou seja, o

fármaco apresenta baixa solubilidade em meios ácidos, e a sua solubilidade aumenta em meios básicos. A permeabilidade do fármaco é errática e sua absorção ocorre na porção superior do TGI (Granero *et al.*, 2010).

Figura 1. Fórmula estrutural da furosemida.

O fármaco apresenta taxa e velocidade de extensão de absorção complexa de alta variabilidade intra e interindividual, com biodisponibilidade irregular (Granero *et al.*, 2010; Najib *et al.*, 2003). Os problemas relacionados à baixa solubilidade e à baixa permeabilidade podem ser superados, como apresentado no trabalho publicado por Kaukonen e colaboradores (2007), onde o grupo complexou furosemida em uma matriz de sílica porosa termicamente carbonizada e com os resultados, concluiu-se que houve melhoras tanto na solubilidade quanto na permeabilidade do fármaco.

Adicionalmente, o estudo publicado por Spricigo e colaboradores (2008) sugere que a complexação da furosemida com as ciclodextrinas (CDs) pode favorecer a liberação pH-independente do fármaco pelos comprimidos matriciais. Com estas observações, pode-se inferir que a complexação do fármaco com as CDs contribui para o desenvolvimento de formas de liberação modificada de furosemida mais eficientes, considerando-se a melhor conformidade do processo de liberação com as condições fisiológicas de pH do TGI, sugerindo melhor BD do fármaco. Trata-se, inclusive, de alternativa útil para o desenvolvimento de comprimidos de liberação modificada contendo outros fármacos de baixa solubilidade (Spricigo *et al.*, 2008; Spricigo, 2006).

Neste contexto, o presente trabalho apresenta um estudo de CIVIV, utilizando como fármaco modelo a furosemida em complexo com a

hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD), conforme descrito por Spricigo e colaboradores (2008). Para apresentar este estudo, o trabalho está dividido em quatro Capítulos, conforme descrito a seguir:

- ✓ O Capítulo 1 apresenta uma revisão da literatura sobre o tema CIVIV;
- ✓ O Capítulo 2 apresenta os métodos empregados para a obtenção de complexo de furosemida e HP- β -CD, e as análises que foram realizadas para sua avaliação e caracterização. Neste Capítulo, também estão detalhados a obtenção e caracterização dos comprimidos matriciais, os resultados do estudo de dissolução *in vitro* com o emprego dos aparatos II e IV e a validação do método analítico;
- ✓ O Capítulo 3 contempla o estabelecimento da CIVIV utilizando os dados dos ensaios de dissolução *in vitro* descritos no Capítulo 2 e os dados de fração absorvida obtidos a partir do estudo de BD *in vivo*. Neste Capítulo, está detalhado o estudo de BD, incluindo as etapas: clínica, analítica e estatística e a validação do método bioanalítico;
- ✓ Por fim, o Capítulo 4 trata do estudo de modelagem farmacocinética por meio do uso de dois programas (STELLA[®] e Simcyp[®]) para avaliar a obtenção das respostas das curvas de decaimento plasmático *versus* tempo *in silico* a partir dos dados de dissolução (*in vitro*) de comprimidos matriciais.

Objetivos

Objetivo geral

Estabelecer uma correlação *in vitro* – *in vivo* (CIVIV) para formas farmacêuticas sólidas de liberação modificada contendo furosemida complexada à hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) a partir de ensaios de dissolução (estudo *in vitro*) e de estudos de biodisponibilidade (estudo *in vivo*).

Objetivos específicos

1. Desenvolver e caracterizar o complexo de furosemida e HP- β -CD;
2. Desenvolver formulações de comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD;
3. Obter os parâmetros de dissolução por meio de avaliação do perfil de dissolução dos comprimidos matriciais;
4. Obter os parâmetros farmacocinéticos por meio dos estudos de biodisponibilidade a partir de comprimidos matriciais;
5. Estabelecer as relações matemáticas para obtenção da CIVIV e avaliar a previsibilidade da correlação obtida, através da validação interna;
6. Avaliar a aplicação de dois programas (STELLA[®] e Simcyp[®]) na obtenção das curvas de decaimento plasmático *versus* tempo *in silico* a partir dos dados de dissolução (*in vitro*) de comprimidos matriciais.

Capítulo 1: Correlação *in vitro* – *in vivo*

1.1. Conceitos e Definições de Correlação *in vitro* – *in vivo*

A correlação *in vitro* – *in vivo* (CIVIV) pode então ser definida como um modelo matemático preditivo que descreve a relação entre uma característica *in vitro* da forma farmacêutica (FF) e uma resposta variável *in vivo*. Geralmente, a característica *in vitro* corresponde à velocidade de dissolução ou liberação do fármaco, e a resposta *in vivo* equivale à concentração plasmática do fármaco ou à quantidade absorvida de fármaco em função do tempo (Koono, 2005; Brasil, 2002).

No Brasil, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a correlação *in vitro* - *in vivo* refere-se ao estabelecimento de uma relação racional entre as propriedades biológicas, ou parâmetros derivados destas, obtidos a partir de uma FF e suas propriedades ou características físico-químicas. As propriedades biológicas mais comumente utilizadas são um ou mais parâmetros farmacocinéticos, tais como área sob a curva de decaimento plasmático do fármaco (ASC) ou concentração plasmática máxima (C_{max}), obtidos após a administração por via extravascular da FF. A característica físico-química mais empregada é o comportamento de dissolução *in vitro* (isto é, porcentagem do fármaco dissolvido em condições experimentais determinadas). A relação entre as duas propriedades, biológica e físico-química é, então, expressa quantitativamente (Brasil, 2002).

Segundo o *Food and Drug Administration* (FDA) (United States, 1997a), o conceito de correlação *in vitro* – *in vivo*, particularmente para formulações farmacêuticas (FFs) de liberação modificada, é a habilidade de prever as características de biodisponibilidade (BD) esperadas, com precisão e exatidão, a partir das características de perfis de dissolução.

Já a Farmacopeia Americana (USP, 2012) define CIVIV como o estabelecimento de uma relação racional entre as propriedades biológicas: parâmetros farmacocinéticos, tais como concentração plasmática máxima (C_{max}) ou ASC, ou algum parâmetro derivado desta, produzido a partir da

administração de uma FF e uma propriedade físico-química ou outra característica desta mesma FF.

O objetivo do desenvolvimento de produtos farmacêuticos nestes estudos é permitir o entendimento do comportamento *in vivo* e *in vitro*. Esse conhecimento pode ser particularmente valioso para FFs de liberação modificada, uma vez que permitiria prever o desempenho de maneira preditiva e consistente (Modi, 2007).

Neste sentido, busca-se o desenvolvimento de testes *in vitro* e de modelos que permitam prever o desempenho *in vivo* de uma FF. Para FFs sólidas de uso oral, as correlações são estabelecidas a partir da concentração de fármaco liberada da FF nos ensaios de dissolução *in vitro* comparativamente aos dados obtidos no estudo de BD *in vivo*. Essas relações podem ser qualitativas ou de natureza quantitativa, dependendo do nível da correlação estabelecida (Qiu *et al.*, 2009; Modi, 2007).

Usualmente podem ser estabelecidos quatro níveis de correlação: C que avalia um único ponto entre um parâmetro de dissolução e um parâmetro farmacocinético; C múltipla, quando dois ou mais parâmetros *in vitro* podem ser correlacionados com algum parâmetro *in vivo*; B, que se baseia no tempo de dissolução médio (TDM) *in vitro* comparada ao tempo de residência médio (TRM) ou ao TDM *in vivo*; e A que é obtida pela sobreposição do perfil de dissolução *in vitro* com a curva de concentração plasmática *versus* tempo *in vivo* (Brasil, 2002).

O desenvolvimento e validação de uma CIVIV, através de um método de dissolução *in vitro*, servem como substituto do estudo de bioequivalência (BE), após alterações de formulação. Isto por que estes estudos de CIVIV fornecem dados de medida de velocidade e extensão da absorção oral, ou seja, da BD *in vivo*, por meio da previsão das curvas de decaimento plasmático através da relação matemática estabelecida. O desenvolvimento de uma CIVIV pode ser útil para a seleção das melhores condições de um ensaio de dissolução capaz de ser utilizado como um método de controle de qualidade do desempenho do produto (Thelen *et al.*, 2012; Sirisuth & Eddington, 2002).

Adicionalmente, o estabelecimento de uma CIVIV pode orientar o desenvolvimento de uma formulação (Thelen *et al.*, 2012; Qiu *et al.*, 2009), ou

ainda, ser empregado na bioisenção de medicamentos em estudos de BE que são normalmente exigidos para determinados escalonamentos de produção e alterações pós-aprovação, na ocasião da renovação de registro junto às agências regulatórias (Qiu *et al.*, 2009).

1.2. Considerações sobre o delineamento do estudo para desenvolvimento da CIVIV

O desenvolvimento de uma CIVIV requer dados obtidos por meio de estudos *in vitro* e *in vivo* a partir de formulações com variadas taxas de liberação *in vitro*. No estabelecimento da CIVIV espera-se que as diferenças observadas nos estudos de dissolução *in vitro* em relação à liberação do fármaco, sejam correspondentes aos resultados *in vivo* (Qiu *et al.*, 2009; United States, 1997a; United States, 1997b).

Quando do desenvolvimento da CIVIV, as curvas de dissolução *in vitro* e fração absorvida *in vivo* não forem sobreponíveis, algumas estratégias podem ser adotadas, como a otimização do ensaio de dissolução por meio da variação das condições experimentais ou o desenvolvimento de modelos matemáticos alternativos para descrição da relação entre estas curvas (Dunne; O'Hara; Devane, 1999).

O estabelecimento de uma CIVIV envolve quatro etapas: 1) obtenção dos perfis de dissolução, 2) obtenção dos perfis de decaimento plasmático a partir do estudo de BD, 3) construção da correlação *in vitro* – *in vivo* pela técnica de deconvolução e 4) avaliação da CIVIV obtida, por meio de validações interna e externa (Emami, 2006). Essas etapas encontram-se detalhadas a seguir.

1.2.1. Estudo de dissolução *in vitro*

Dissolução é definida como um processo no qual uma substância sólida se dissolve e é controlado, principalmente, pela afinidade entre o sólido e o solvente (Banakar, 1992; Abdou 1989). Após a administração de uma FF sólida

por via oral, esta passa pelos processos de desintegração, desagregação e dissolução. Estes processos podem ocorrer simultaneamente e resultam na liberação do fármaco a partir da FF. A velocidade com que ocorre esse processo determinará a velocidade com que o fármaco é absorvido, portanto esta é uma propriedade que contribui para a BD. Pode-se concluir que este parâmetro está diretamente ligado à qualidade do produto e à eficácia clínica (Mourão, 2009; Serra; Storpirtis, 2007; Dressman *et al.*, 1998; Serra, 1998; Abdou, 1989).

Os ensaios de dissolução são métodos padrões aceitos pelas agências regulatórias para avaliar a qualidade biofarmacêutica dos produtos farmacêuticos (Wei, Löbenberg, 2006). Sendo assim, são relevantes os estudos para o desenvolvimento de sistemas de dissolução que forneçam informações fundamentais do processo e que possam ser correlacionadas com o desempenho *in vivo* (Mourão, 2009; Banakar, 1992). As curvas de dissolução *in vitro* obtidas a partir dos ensaios de dissolução dependem das características da formulação e do fármaco, do aparato de dissolução empregado e dos parâmetros estabelecidos, tais como meio de dissolução, rotação ou fluxo selecionado, tempo de ensaio, entre outros. Essas curvas são expressas como porcentagem de fármaco dissolvido em função do tempo, e devem atingir 100% no tempo infinito. Vários parâmetros cinéticos podem ser calculados a partir desta curva, como tempo médio de dissolução, tempo para dissolver 10, 50 ou 90%, velocidade e eficiência de dissolução. Nos estudos de CIVIV, podem utilizar alguns ou vários desses parâmetros dependendo do nível de correlação a serem desenvolvidos, estando detalhados a seguir no item 1.4 (Cardot; Beyssac; Alric, 2007; Emami, 2006; Abdou, 1989).

O ensaio de dissolução é um teste farmacopeico que avalia a liberação de fármacos, a partir de sua FF. Os ensaios de dissolução foram desenvolvidos para quantificar a velocidade e extensão da liberação do fármaco a partir especialmente de FFs sólidas, como por exemplo: cápsulas e comprimidos, de liberação imediata ou modificada (Azarmi; Roa; Löbenberg, 2007). A determinação da dissolução de um fármaco a partir de uma FF é realizada por meio de estudos os quais apresentam diversas aplicações, tais como: desenvolvimento e seleção de formulações, controle de qualidade, mudanças

no processo de fabricação, CIVIV, bioisenção, estudos de equivalência farmacêutica e suporte aos estudos de BD/BE e simulação dos possíveis efeitos dos alimentos na BD (Gray *et al.*, 2009; Jamzad; Fassihi, 2006). O ensaio de dissolução tem sido utilizado como uma excelente ferramenta no controle de qualidade lote a lote de FFs sólidas, pois permite detectar alterações entre as formulações que poderiam ocasionar uma mudança na liberação do fármaco comprometendo assim o desempenho do medicamento. A principal meta do ensaio de dissolução *in vitro* é indicar potenciais problemas de BD *in vivo* em uma determinada formulação (Brasil, 2004; de la Penã *et al.*, 2003). Para estudos de CIVIV, o melhor método de dissolução descreve o comportamento do fármaco na FF *in vivo*. Os principais fatores que podem influenciar a liberação do fármaco *in vivo* são: pH, surfactante/bile, força iônica, enzimas e trânsito no trato gastrointestinal (TGI) nos estados jejum e alimentado; e a presença de alimentos. Todos estes fatores não podem ser facilmente reproduzidos *in vitro* por um método de dissolução simples. Além disso, a importância relativa destes fatores não é semelhante, nos estados alimentado ou jejum (Cardot; Beyssac; Alric, 2007).

Para os ensaios de dissolução de FFs sólidas de uso oral podem ser utilizados alguns dispositivos descritos na farmacopeia americana (USP, 2012), os aparatos mais utilizados são descritos a seguir. Os aparatos I (cesta) e II (pá) são os mais rotineiramente utilizados para formas sólidas (Pezzini; Silva; Ferraz, 2007; Wei; Löbenberg, 2006). São basicamente constituídos por uma cuba contendo o meio de dissolução que é agitado pelo cesto ou pela pá e a cuba permanece imersa em um banho com temperatura controlada. Usualmente, a velocidade de agitação no aparato I é 50, 75 ou 100 rpm e no aparato II é 50 ou 75 rpm (USP, 2012). Esses dispositivos são simples, robustos e adequadamente padronizados, por esta razão são globalmente utilizados. Em função destas vantagens, a cesta ou a pá são recomendadas em diversos guias como aparatos de primeira escolha para os ensaios de dissolução para FFs de liberação imediata *in vitro*, bem como para aquelas de liberação modificada. No entanto, como este aparato utiliza um único recipiente, esta técnica apresenta algumas limitações, que podem surgir quando existir a necessidade de uma alteração do pH do meio de dissolução,

ou ainda quando o ensaio envolve fármacos fracamente solúveis ou FFs que tendem a flutuar inicialmente (International Pharmaceutical Federation, 1996).

Os pesquisadores Ameer e Bouzit (2013) realizaram um estudo para avaliar o impacto de algumas mudanças realizadas no aparato II, dentre elas foram realizadas mudanças geométricas na pá, mudança no formato da cuba e alterações no rotor e foi avaliado o impacto na hidrodinâmica. Observando os resultados das mudanças realizadas, o grupo concluiu que as introduções destas pequenas mudanças apresentam grande impacto sobre a dissolução. Portanto, estes experimentos devem ser realizados em equipamentos qualificados e operados por analistas treinados, para que haja confiabilidade nos resultados.

O aparato III, também chamado de *Bio-dis*, é um derivado do clássico aparelho de desintegração, constitui numa série de frascos de fundo redondo e tubos cilíndricos com tela de polipropileno na face superior e inferior apresentando movimento oscilatório vertical e deslocamento horizontal dos cilindros entre os frascos. É geralmente empregado para perfil de liberação/dissolução com alteração de pH e para grânulos de liberação modificada (USP, 2012).

Já o aparato IV, também chamado de *flow-cell*, consiste em um conjunto de células de fluxo por onde o meio de dissolução é bombeado e passa no interior da célula sob velocidade constante. Este aparato foi introduzido mais recentemente nos métodos de dissolução da USP e traz uma série de vantagens sobre os demais métodos no estabelecimento de perfis de dissolução discriminativos especialmente para fármacos de baixa solubilidade (de la Penã *et al.*, 2003). Isto tem sido observado, pois nestes casos de fármacos que apresentam solubilidade reduzida, este aparato possui a grande vantagem de manter as condições *sink* (USP, 2012).

A condição *sink* é o distanciamento da condição de saturação do meio com o fármaco. Esta situação é atingida quando o volume do meio utilizado é superior a três vezes à concentração de saturação do fármaco. Portanto, o objetivo da condição *sink* é garantir que a velocidade de dissolução não seja diminuída em decorrência da aproximação com a concentração de saturação (United States, 1997b).

Com o aparato IV, a FF é colocada numa pequena célula por onde passa continuamente uma corrente de meio de dissolução, proporcionando, simultaneamente, a agitação mecânica e o meio para a dissolução do fármaco. Este pode ser executado como um sistema aberto, renovando o meio de dissolução continuamente, bem como um sistema fechado, onde este é recirculado através das células. A concepção do sistema aberto proporciona várias vantagens tais como simular a alteração de pH ou em casos onde o fármaco apresente baixa solubilidade. Este sistema permite passar grandes volumes de meio pela FF (FIP, 1996). Usualmente, o fluxo utilizado no aparato IV é de 4, 8 ou 16 mL/min (USP, 2012).

No ensaio de dissolução, são relevantes as informações relativas aos fatores fisiológicos do TGI: pH, viscosidade, concentração de sais biliares, presença de enzimas, volume, fluxo hidrodinâmico e motilidade mecânica (Serra, 1998), e neste sentido deve-se observar a composição e o volume do meio e as condições hidrodinâmicas (Dressman *et al.*, 1998). Normalmente, são utilizados meios aquosos, que em sua maioria descritos em farmacopeias. Para simular meios fisiológicos, o mais simples é constituído por uma solução de HCl a 0,1 N ou um meio mais complexo que pode ser o fluido intestinal simulado (SIF), pois este meio é preparado a partir de uma solução de fosfato com adição de pancreatina (USP, 2012). Para os outros valores de pH, soluções tampão de acetato ou de fosfato são geralmente utilizadas. Os meios de dissolução destinados a aplicações específicas (por exemplo, fármacos pouco solúveis) podem conter enzimas ou tensoativos, conforme recomendado pelas farmacopeias (USP, 2012; Farmacopeia Brasileira, 2010). Os meios que simulam o estado de jejum e alimentado têm sido empregados pela literatura científica em estudos de dissolução, apesar de não estarem descritos nos compêndios oficiais, são eles: fluido intestinal simulado no estado de jejum (FaSSIF) e fluido intestinal simulado no estado alimentado (FeSSIF) (Dressman *et al.*, 1998). Estes meios tentam reproduzir a composição dos líquidos intestinais, considerando as secreções que ocorrem em ambos os estados, jejum ou alimentado, no intestino delgado (Cardot; Beyssac; Alric, 2007).

A escolha do meio de dissolução utilizado é realizada de acordo com a solubilidade do fármaco a ser analisado. O pH é escolhido de maneira a

simular as condições *in vivo*, neste caso sugere-se utilizar um pH que esteja numa faixa biorrelevante, ou seja, entre 1,2 e 7,5. Além disso, na escolha do meio é recomendável manter a condição *sink* durante todo o ensaio. Usualmente, o volume do meio de dissolução é 500, 900 ou 1000 mL (United States, 1997b).

Alguns fármacos de baixa solubilidade, que não apresentam dissolução adequada em meio aquoso, na faixa fisiológica de pH, podem requerer o uso de tensoativos (Fonseca, 2006). Estes compostos têm como função diminuir a tensão interfacial entre o soluto e o solvente em que está contido. Os mecanismos envolvidos podem ser relacionados com a molhabilidade da partícula, pois o tensoativo favorece o contato entre a partícula e o solvente, ou com a solubilização micelar, ou seja, aumentando a solubilidade de fármacos insolúveis pela formação de micelas (Dressman *et al.*, 1998; United States, 1997b).

A temperatura e a agitação ou o fluxo do meio são fatores que podem influenciar a dissolução do fármaco. É muito importante que se mantenha uma temperatura de 37°C com variação máxima de $\pm 0,5^\circ\text{C}$. Este parâmetro deve ser cuidadosamente controlado uma vez que existe uma relação entre a temperatura e a solubilidade do fármaco (Abdou, 1989).

Nos últimos anos, com o avanço no desenvolvimento de novas formulações de liberação modificada, expandiram-se as tecnologias de dissolução. Os protocolos para estas formulações requerem ensaios de dissolução com coletas multipontos, ou seja, em intervalos de tempos regulares, com o intuito de caracterizar o perfil de dissolução (Manadas; Pina; Veiga, 2002).

Para a obtenção de dados úteis destinado ao desenvolvimento de uma CIVIV, é essencial o estabelecimento de uma metodologia de dissolução que seja discriminatória para as diferentes formulações. Baseado em guias internacionais bem estabelecidos como, por exemplo, o guia de dissolução e as diretrizes para o estabelecimento de uma CIVIV, ambos publicados pelo FDA, recomenda-se a utilização de pelo menos 12 unidades de cada formulação no ensaio de dissolução e que a variação de teor do fármaco, entre as unidades avaliadas, seja menor do que 10%. A dissolução pode ser realizada variando

as condições do teste, tais como meios de dissolução, velocidade de rotações ou aparato (Qiu *et al.*, 2009; United States, 1997a; United States, 1997b).

Os estudos de dissolução utilizando os aparatos I e II são os métodos mais fáceis e exequíveis, portanto são os mais disseminados e amplamente usados nos estudos de CIVIV (Melo, 2012; Mourão, 2009; Ghosh *et al.*, 2008; Balan *et al.*, 2001; Balan *et al.*, 2000). No entanto, novas tecnologias de dissolução vêm sendo empregadas neste tipo de estudo, como o caso dos aparatos III (Klein *et al.*, 2008) e IV (Štefanič *et al.*, 2012).

Após a obtenção dos perfis de dissolução, outro aspecto fundamental é a forma como estes perfis serão avaliados e comparados. Os perfis de dissolução podem ser avaliados comparativamente por vários métodos, como descrito a seguir: 1) método estatístico baseado na análise de variância (ANOVA); 2) método modelo independente; 3) método modelo dependente (Serra; Storpirtis, 2007).

Os métodos baseados na análise de variância determinam, através de repetidos ensaios, as fontes de variação (tempo, produto e interação entre tempo *versus* produto) (Serra; Storpirtis, 2007; Yuksel; Kanik; Baykara, 2000). Dentre os métodos designados de modelo independente destacam-se os testes combinados como os fatores de diferença (f1) e de similaridade (f2), que comparam diretamente a diferença entre a porcentagem de fármaco dissolvida em uma unidade de tempo para os produtos teste e referência, que são recomendados pela ANVISA (Brasil, 2004).

Por sua vez, os métodos modelo dependentes são baseados em funções matemáticas distintas que descrevem o perfil de dissolução. Os exemplos mais comuns encontrados na literatura são: ordem zero, primeira ordem, Hixon-Crowell, Higushi, Korsmeyer-Peppas, Noyes-Withney entre outros (Mourão, 2009; Serra; Storpirtis, 2007; Nicolaidis *et al.*, 2001; Serra, 1998).

Além dos modelos cinéticos traçados a partir do perfil de dissolução, a eficiência de dissolução dada em porcentagem (ED%) sugerida inicialmente por Khan (1975) pode ser incluída como um importante parâmetro de cinética de dissolução. Este termo pode ser definido como a área sob a curva de dissolução em um determinado intervalo de tempo. A ED% permite a

comparação mais fidedigna entre dois produtos, pois utiliza a ASC para o cálculo deste parâmetro. Além disso, este parâmetro está relacionado com a quantidade real de fármaco que se encontra dissolvida no meio e, desta forma, poderá ter um melhor prognóstico dos resultados *in vivo* (Serra; Storpirtis, 2007; Serra, 1998; Khan, 1975).

1.2.2. Estudo de biodisponibilidade *in vivo*

Os estudos de BD/BE de medicamentos envolvem as etapas: clínica, analítica e estatística. O estudo convencional é do tipo aberto, aleatório, cruzado. Os voluntários recebem os medicamentos teste e referência em fases distintas, em esquema de dose simples ou múltipla, se necessário. Podendo ainda ser realizado em paralelo, quando se fizer necessário, como, por exemplo, em estudos que envolvam fármacos com meia-vida de eliminação muito longa (Brasil, 2006; Demirtürk; Öner, 2003).

Para o desenvolvimento de uma CIVIV, o estudo de BD relativa deve ser realizado com o emprego de voluntários sadios em número estatisticamente adequado para permitir a caracterização do perfil de absorção do fármaco presente na formulação, bem como a comparação com o medicamento referência contendo o mesmo fármaco, que pode ser um produto intravenoso, uma solução aquosa ou um comprimido de liberação imediata em jejum (Qiu *et al.*, 2009; Demirtürk; Öner, 2003).

O cronograma de colheitas deve caracterizar o perfil plasmático do fármaco ou do metabólito adequadamente (concentração *versus* tempo) contemplando um tempo de três a cinco meias-vidas de eliminação ou um tempo superior. O período de eliminação (*wash out*), intervalo entre uma fase e outra, deve ser de no mínimo sete meias-vidas de eliminação (Brasil, 2006).

Em geral, os resultados de um estudo de BD/BE são avaliados a partir do estabelecimento de padrões de proximidade entre os perfis de BD. Cada padrão estabelecido é constituído de um ou mais critérios de aceitação para cada medida de BD considerada necessária na avaliação, como por exemplo, C_{max} , área sob a curva de 0 a t (ASC_{0-t}) e área sob a curva de 0 a infinito ($ASC_{0-\infty}$) (Brasil, 2006).

Além disso, o estudo deve ser fundamentado em guias internacionais para a condução de estudos clínicos, bem como respeitar os aspectos éticos de acordo com os guias estabelecidos internacionalmente como a Declaração de Helsinki e o guia de boas práticas clínicas publicadas pela *International Conference on Harmonisation* (ICH) (WMA, 2008; United States, 2003; ICH, 1996).

Para a obtenção de resultados aceitáveis em um estudo de BD, o número de voluntários sadios deve estar entre 6 a 36 voluntários (Demirtürk; Öner, 2003). Os voluntários do sexo masculino, feminino ou de ambos os sexos devem ter idade superior a 18 anos e estarem aptos a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Quando forem selecionados voluntários de ambos os sexos, a seleção deve ser feita de forma que o número de voluntários do sexo masculino seja igual ao número de voluntários do sexo feminino, e que esteja distribuído aleatoriamente pelas sequências do estudo. Em casos em que o medicamento é de uso de uma população específica, como por exemplo, de um determinado sexo e/ou faixa etária, o estudo deve ser conduzido com voluntários que atendam estes critérios (Brasil, 2006; Midha; Rawson; Hubbard, 1998; Serra, 1998; Consiglieri, 1996; Hellriegel; Bjornsson; Hauck, 1996; Storpirtis; Consiglieri, 1995; Jackson, 1994; Powers, 1993).

Os voluntários devem ser saudáveis, e estarem dentro do peso normal, sendo aceitos desvios de 15%, levando-se em consideração altura e estrutura física. A ANVISA recomenda que sejam evitados voluntários com histórico de abuso de álcool e fumantes, e no caso de serem incluídos indivíduos fumantes, deve-se identificá-los (Brasil, 2006).

Em relação à etapa analítica, o método analítico para a quantificação do fármaco ou metabólito deve ser específico para cada analito, preciso, exato e relativamente simples, de modo a minimizar erros. A metodologia deve ser validada antes do início da etapa clínica, com os parâmetros previamente estabelecidos (Brasil, 2012), garantindo que o método analítico seja confiável e reprodutível quando utilizado para quantificar determinado analito em uma matriz biológica (Briscoe; Stiles; Hage, 2007).

Os parâmetros farmacocinéticos são obtidos a partir das curvas de concentração sanguínea do fármaco *versus* tempo, e analisados estatisticamente para estabelecimento da BE (Shargel; Yu, 2012; Brasil, 2006; Nation; Sansom, 1994; Ritschel, 1992) e descritos a seguir:

- ✓ ASC_{0-t} , obtido através do gráfico de concentração plasmática *versus* tempo;
- ✓ $ASC_{0-\infty}$, obtido por extrapolação utilizando a constante de eliminação (K_{el}), este parâmetro deve ser igual ou superior a 80% ASC_{0-t} , exceto em casos em que é feita ASC truncada;
- ✓ C_{max} e tempo para atingir o C_{max} (t_{max}), referentes ao pico de concentração máxima do fármaco, estes parâmetros são obtidos diretamente sem interpolação dos dados;
- ✓ $t_{1/2el}$ (meia-vida de eliminação), porém não há necessidade de tratamento estatístico para este parâmetro (Shargel; Yu, 2012; Brasil, 2006; Nation; Sansom, 1994; Ritschel, 1992).

Deve-se justificar a exclusão de voluntários que apresentam dados discrepantes, até o limite de 5% do número de voluntários (Brasil, 2006). Os estudos de BE comparam o produto referência e o candidato à genérico e são considerados bioequivalentes quando os valores de intervalo de confiança de 90% (IC 90%) estão entre 80 e 125% (Brasil, 2006; Benet, 1999).

No estudo de CIVIV, são utilizados os dados de concentração plasmática *versus* tempo, bem como parâmetros farmacocinéticos obtidos a partir do estudo de BD, os principais são: C_{max} e ASC_{0-t} (Emami, 2006).

1.3. Obtenção da correlação *in vitro* – *in vivo* (CIVIV) por meio de deconvolução dos dados de biodisponibilidade

Os estudos de CIVIV são realizados em quatro etapas. A etapa 1 envolve a obtenção ou seleção das formulações e obtenção dos perfis de dissolução descrita no item 1.2.1. A etapa 2 refere-se a obtenção das curvas de decaimento plasmático *versus* tempo (item 1.2.2). Na sequência, a etapa 3

envolve à obtenção da fração absorvida do fármaco usando a técnica de deconvolução (Wagner-Nelson, Loo-Riegelman ou deconvolução numérica) que serão descritas a seguir. A partir desses dados é possível estabelecer uma relação matemática entre a fração dissolvida *in vitro* e a fração dissolvida *in vivo* (CIVIV). Por fim, a etapa 4 detalha a avaliação da CIVIV conforme será apresentado no item 1.5 (Emami, 2006; Brasil, 2002).

Os modelos utilizados, para estimar a fração absorvida do fármaco e em seguida permitir a construção de uma CIVIV, são deconvolução e convolução. Sendo que a deconvolução pode ser feita de acordo com os modelos de Wagner-Nelson, de Loo-Riegelman ou de deconvolução numérica (Emami, 2006).

A deconvolução é dividida em três passos conforme descrito a seguir e ilustrado na Figura 1.1 (Qiu *et al.*, 2009):

- ✓ 1º passo: A partir da curva de concentração plasmática é calculada a fração absorvida *in vivo*;
- ✓ 2º passo: Realiza-se a adaptação do perfil de dissolução *in vitro* para que este permita a comparação com a fração absorvida;
- ✓ 3º passo: Estabelece-se uma regressão linear entre a porcentagem absorvida e a porcentagem dissolvida.

Figura 1.1. Três passos clássicos da deconvolução e obtenção da CIVV a partir do perfil de absorção *in vivo* (Qiu *et al.*, 2009).

O modelo de Wagner-Nelson é um modelo dependente utilizado para modelos mono-compartimentais. Neste modelo empregam-se dados de concentração plasmática obtida a partir da administração de FFs pela via oral. Neste caso, não se utiliza dados obtidos a partir de estudos com FFs administradas pela via intravenosa e pode estar sujeito à interpretação errônea na fase terminal na qual a velocidade de absorção é menor que a velocidade de eliminação. Nesta condição, a fração absorvida acumulada é calculada pela Equação 1.1 (Eq. 1.1) (Mourão, 2009; Emami, 2006; Gibaldi; Perrier, 1982):

$$F_T = \frac{C_T + K_E \int_0^T C dt}{K_E \int_0^\infty C dt} \text{ (Eq. 1.1)}$$

Em que:

F_T = fração absorvida no tempo T;

C_T = concentração no tempo T;

K_E = constante de velocidade de eliminação.

Já o modelo de Loo-Riegelman, que também é um modelo dependente, mas aplicado aos modelos cinéticos multicompartmentais, necessita dos dados de concentração plasmática obtida a partir da administração de FFs tanto pela via oral, quanto pela via intravenosa, em um mesmo sujeito. Nesta condição a fração absorvida é calculada pela Equação 1.2 (Eq. 1.2) (Mourão, 2009; Emami, 2006; Gibaldi; Perrier, 1982):

$$F_T = \frac{C_T + K_{10} \int_0^T C dt + (X_P)_T / V_C}{K_{10} \int_0^\infty C dt} \quad (\text{Eq. 1.2})$$

Em que:

F_T = fração absorvida no tempo T

C_T = concentração plasmática no tempo T;

$(X_P)_T$ = quantidade de fármaco no compartimento periférico;

V_C = volume aparente do compartimento central;

K_{10} = constante de primeira ordem de eliminação no compartimento central.

Os métodos de Wagner-Nelson e Loo-Riegelman são modelo-dependentes, enquanto o modelo da deconvolução numérica é um método modelo-independente. A deconvolução numérica utiliza dados da concentração plasmática obtida a partir de uma formulação de absorção instantânea (administração intravenosa, solução oral ou comprimido de liberação imediata) e da formulação oral em estudo em um mesmo sujeito. Este modelo não considera o número de compartimentos e assume distribuição e eliminação linear. A fração absorvida é calculada a partir da Equação 1.3 (Eq. 1.3) (Emami, 2006; Gibaldi; Perrier, 1982; Cutler, 1981):

$$C_{VO\ tn} = \frac{1}{D_{IV}} \sum_{i=1}^n \frac{\Delta A_i}{\Delta t_i} \times \Delta ASC_{(t_n - t_i)}^{(t_n - t_{i-1})} \quad (\text{Eq. 1.3})$$

Em que:

$C_{VO\ tn}$ = concentração via oral (VO) no tempo n;

D_{IV} = dose administrada por IV;

$\Delta A_i / \Delta t_i$ = diferença na velocidade de absorção;

Δ ASC = diferença na área sob a curva após administração do produto referência.

Por outro lado, a convolução é o processo inverso, na qual se realiza a conversão do perfil de dissolução *in vitro* em perfil de concentração plasmática. A vantagem da convolução é dispensar estudos *in vivo* adicionais, uma vez que a partir do perfil de dissolução *in vitro* torna-se possível prever o comportamento da formulação *in vivo*. O processo de convolução está ilustrado na Figura 1.2 e descrito a seguir (Qiu *et al.*, 2009):

- ✓ 1º passo: A partir do perfil de dissolução *in vitro*, calcula-se o perfil de dissolução adaptado;
- ✓ 2º passo: Calcular o perfil de absorção *in vivo* a partir do perfil de dissolução adaptado;
- ✓ 3º passo: Obter a curva de concentração plasmática a partir do perfil de absorção *in vivo* calculado.

Figura 1.2. Procedimento de convolução para a obtenção da curva de concentração plasmática calculada (Qiu *et al.*, 2009).

Caso não seja possível estabelecer uma CIVIV, devido às diferenças que podem ocorrer entre a dissolução *in vitro* e *in vivo*, o perfil de dissolução pode ser corrigido por uma ferramenta matemática descrita pela Equação 1.4 (Eq. 1.4) (Qiu *et al.*, 2009):

$$X_{vivo}(t) = a_1 + a_2 \times X_{vitro}(b_1 + b_2 \times t) \text{ (Eq. 1.4)}$$

se:

$t > T$ então $t = T$;

$b_1 < b_2 \times t$ então $b_1 + b_2 \times t = 0$.

Em que:

$X_{vivo}(t)$ = perfil de absorção em função do tempo;

a_1 = intercepto com a função de ligar os perfis;

a_2 = inclinação da regressão linear que compara os perfis de dissolução *in vitro* e a absorção *in vivo*;

b_1 = tempo de latência no perfil de absorção *in vivo* devido ao tempo antes do início da absorção decorrente da passagem pelo estômago;

b_2 = fator de escalonamento de tempo;

T = fator de corte para acomodar a diferença mais lenta do que trânsito GI.

1.4. Níveis de correlação

O nível da correlação indica a capacidade preditiva de uma CIVIV (Cardot; Beyssac; Alric, 2007; Emami, 2006; United States, 1997a). Isto é, a CIVIV de níveis mais altos (Nível A) apresenta dados mais informativos e mais úteis do ponto de vista regulatório e as correlações de níveis mais baixos (Nível C) apresentam dados de caráter mais qualitativo (Uppoor, 2001). De acordo com os dados utilizados para estabelecer a CIVIV, é possível definir quatro níveis de correlação, que são níveis A, B, C e C múltipla (USP, 2012; Qiu *et al.*, 2009; Mourão, 2009; Brasil, 2002; United States, 1997a).

1.4.1. Nível A

A correlação nível A é a categoria mais elevada e representa uma correlação ponto-a-ponto entre a velocidade de dissolução *in vitro* e a velocidade de absorção *in vivo* do fármaco a partir da FF (United States, 1997a). A quantidade absorvida não é medida diretamente, mas obtida através de deconvolução, por exemplo, a partir do perfil plasmático de concentração *versus* tempo. Esta correlação é a relação mais direta com o perfil de concentração plasmática, e fornece maior vantagem frente às agências regulatórias, uma vez que a bioisenção é aceita no processo de registro de medicamentos. Esta correlação é mais tipicamente desenvolvida para FFs de liberação modificada e deve ser validada. A CIVIV pode ser usada para prever a absorção do fármaco, definir as especificações de dissolução, obter isenção de estudos de BE, e formam a base para justificar escalonamento e as mudanças de produção de medicamentos pós-registro (Qiu *et al.*, 2009).

1.4.2. Nível B

A correlação nível B utiliza o princípio da análise estatística de momentos. Nesta condição, estabelece-se uma relação entre o tempo de dissolução médio *in vitro* (TDM_{vitro}) do produto e o tempo de residência médio *in vivo* (TRM) ou o tempo de dissolução médio *in vivo* (TDM_{vivo}). Esta correlação não é muito significativa para fins de registro e, portanto, raramente utilizada, uma vez que não reflete as concentrações plasmáticas reais (Qiu *et al.*, 2009; Emami, 2006).

1.4.3. Nível C

A correlação de nível C é uma categoria na qual um elemento particular do perfil de dissolução (por exemplo, velocidade de dissolução ou tempo para dissolver 50% do fármaco a partir da FF – $t_{50\%}$) está relacionado a um único

parâmetro farmacocinético (por exemplo, $C_{\max}$ ou ASC). Esta representa uma relação de ponto único e não reflete todo o perfil de concentração plasmática, sendo considerada a de nível mais fraco de correlação. Assim como a de nível B, também é pouco utilizada por ser menos descritiva do perfil da concentração plasmática em relação à correlação de nível A (Qiu *et al.*, 2009). Apresenta limitações na previsão do desempenho *in vivo*, não podendo ser usada para justificar alterações pós-registro. Pode ser útil no desenvolvimento de formulações (Cardot; Beyssac; Alric, 2007; Emami, 2006).

1.4.4. Nível C múltipla

A utilidade de uma correlação de nível C pode ser reforçada pelo uso de informações provenientes de vários pontos de tempo, criando uma correlação de nível C múltipla, ou seja, relacionada um ou vários parâmetros farmacocinéticos ($C_{\max}$, ASC) à quantidade de fármaco dissolvido em vários pontos do perfil de dissolução. Este tipo de correlação pode ser mais adequado para os produtos de liberação imediata, pois o tempo de absorção é de curta duração, e obtenção de um número suficiente de pontos de dados no perfil *in vivo* para a obtenção de uma correlação nível A é mais difícil. As correlações nível C múltipla podem ser usadas para orientar o desenvolvimento da formulação e, como justificativa serve de apoio para definição de especificações de dissolução (Qiu *et al.*, 2009; Cardot; Beyssac; Alric, 2007; Emami, 2006). Assim quando uma correlação de nível C múltipla é estabelecida, o desenvolvimento de uma correlação de nível A também é possível (Melo, 2012; Modi, 2007).

1.5. Avaliação da previsibilidade das correlações *in vitro* – *in vivo* (CIVIV)

A avaliação ou validação da previsibilidade de uma CIVIV corresponde à etapa 4 de estabelecimento deste modelo matemático. O objetivo da avaliação da CIVIV é estimar a magnitude do erro na previsão dos resultados de BD *in*

vivo a partir dos dados de dissolução *in vitro*. Este objetivo deve guiar a escolha e interpretação dos métodos de avaliação da CIVIV (Emami, 2006).

1.5.1. Validação interna

A validação interna, também denominada como previsibilidade interna, é aplicada à CIVIV estabelecida com três ou mais formulações do mesmo fármaco e que apresentem taxas de liberação diferenciadas para fármacos, que não sejam de estreita faixa terapêutica, com estimativas de erros que sejam conclusivas e deve ser aplicada a todas as CIVIV. Recomenda-se que a CIVIV desenvolvida seja aplicada a cada perfil de concentração plasmática obtida por uma formulação diferente a partir de seu respectivo perfil de dissolução *in vitro* (Emami, 2006).

A previsibilidade das concentrações plasmáticas a partir dos correspondentes perfis de dissolução *in vivo* é realizada por convolução a partir das velocidades de dissolução *in vivo* e por modelos farmacocinéticos para os resultados *in vivo* derivados de administração IV, solução oral ou formulação de liberação rápida. A porcentagem de erro de predição (EP%) pode ser determinada a partir da Equação 1.5 (Eq. 1.5) (Emami, 2006):

$$EP\% = \frac{(\text{Parâmetro observado} - \text{Parâmetro previsto}) \times 100}{\text{Parâmetro previsto}} \quad (\text{Eq. 1.5})$$

A porcentagem média de erro de predição (EP%) não deve ser superior a 10% tanto para $C_{\max}$ quanto para ASC. Além disso, a EP% para cada formulação não deve exceder 15%. Se esses critérios não forem atendidos ou forem inconclusivos, deve-se avaliar a previsibilidade externa para que a CIVIV possa ser utilizada com o propósito de substituir um teste de BE (Emami, 2006).

1.5.3. Validação externa

A validação externa, ou previsibilidade externa, é aplicada quando o fármaco utilizado no estudo é de estreita faixa terapêutica, no caso de apenas duas formulações com taxas de liberação diferentes tenham sido usadas para o desenvolvimento de CIVIV ou nos casos onde a previsibilidade interna for inconclusiva ou não atender os critérios de estimativa de erros (Emami, 2006).

Para um bom resultado de previsibilidade externa, EP% deve ser inferior a 10% para C_{max} e para ASC. Resultados de EP% variando de 10 a 20% indicam que a previsibilidade é inconclusiva e são necessários estudos adicionais utilizando um novo conjunto de dados. Resultados de EP% superiores a 20% demonstram previsibilidade inadequada (Emami, 2006).

A validação externa é útil para complementar a interna, pois é realizada em condições não utilizadas no desenvolvimento inicial de uma CIVIV, tais como formulações com diferentes velocidades de liberação do fármaco, formulações com pequenas mudanças no processo de produção ou mudanças de excipientes utilizados na formulação. No entanto, para fármacos com baixo índice terapêutico, a validação externa é indispensável, visto que este procedimento aumenta a confiabilidade dos dados (Melo, 2012; United States, 1997a).

1.6. Sistema de classificação biofarmacêutica e correlação *in vitro* – *in vivo*

O Sistema de classificação biofarmacêutica (SCB) foi proposto por Amidon e colaboradores (1995). Esse sistema corresponde a um esquema de classificação dos fármacos baseado nos dados físico-químicos, por meio da solubilidade e nos dados de absorção através de estudos de permeabilidade. As classes do SCB estão representadas no Quadro 1.1.

Quadro 1.1. Classes do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB)
(Amidon *et al.*, 1995).

	Alta solubilidade	Baixa solubilidade
Alta permeabilidade	I	II
Baixa permeabilidade	III	IV

Este SCB define três números adimensionais, que são número de dose (D_O), número de dissolução (D_N) e número de absorção (A_N), para caracterizar os fármacos. Estes números são combinações de parâmetros físico-químicos e fisiológicos e representam uma visão fundamental sobre a absorção dos fármacos no TGI (Demirtürk; Öner, 2003; Amidon *et al.*, 1995).

O termo solubilidade indica a quantidade de soluto que pode ser dissolvida em um volume especificado de solvente. O fator predominante para a dissolução de um fármaco nos líquidos do TGI é a sua solubilidade aquosa. No entanto, a solubilidade no TGI também pode ser influenciada por: variação de pH (faixa de pH de 1,2 a 7,5), efeito dos tensoativos dos sais biliares, presença de alimentos, formação de complexos insolúveis com componentes naturais do TGI e mesmo alimentos (Storpiertis *et al.*, 2009).

Segundo o SCB, solubilidade não é definida em números absolutos, mas sim em função da maior dosagem comercializada para cada fármaco. Por esta razão, o ensaio de solubilidade é realizado em meios aquosos a 37 °C e os fármacos são considerados de alta solubilidade quando sua maior dosagem é solubilizada em 250 mL de cada meio testado (Storpiertis *et al.*, 2009; United States, 2000). As faixas de pH estabelecidas para a realização do teste variam entre as diferentes agências regulatórias. De acordo com o FDA, o intervalo de pH preconizado deve ser de 1,0 a 7,5 (United States, 2000), contudo, o intervalo estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é de 1,2 a 6,8 (WHO, 2006) e pela European Medicines Agency (EMA), este deve estar compreendido na faixa de 1,0 a 8,0, sendo que preferencialmente recomenda-se que deve ser empregado pH 1,0, 4,6 e 6,8 (European Medicines Agency, 2001).

A permeabilidade, por sua vez, é baseada indiretamente na extensão da absorção (fração absorvida e fração não-sistêmica) de um fármaco em

humanos e diretamente através da medida da velocidade de transferência de massa através da membrana intestinal humana. Alguns métodos não envolvendo seres humanos, são capazes de prever a extensão da absorção e podem ser utilizados como alternativa para determinação da permeabilidade, dentre esses temos: estudos de perfusão intestinal em modelos animais; estudos *in vitro* usando tecido ou com culturas celulares, tais como Caco-2 ou MDCK (Bonamici, 2009; United States, 2000).

A partir de dados do SCB é possível prever se a CIVIV pode ser esperada, conforme apresentado a seguir no Quadro 1.2, no qual apresenta a correlação esperada para formas de liberação imediata de acordo com o SCB (Demirtürk; Öner, 2003).

Quadro 1.2. Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) e CIVIV esperada para fármacos de liberação imediata (Demirtürk; Öner, 2003).

Classe	Solubilidade	Permeabilidade	CIVIV
I	Alta	Alta	Correlação esperada (se a dissolução é a etapa limitante)
II	Baixa	Alta	Correlação esperada
III	Alta	Baixa	Correlação baixa ou nula
IV	Baixa	Baixa	Correlação baixa ou nula

Para fármacos classe I (alta solubilidade e alta permeabilidade), em sistemas de liberação imediata, portanto com dissolução rápida a partir da FF ($Q \geq 85\%$ em 15 minutos), propõe-se que a dissolução garanta a BE (Amidon *et al.*, 1995). Nesta classe, é possível a bioisenção (Cook, 2012; United States, 2000).

A CIVIV para fármacos de classe II é esperada quando a dissolução *in vitro* corresponder à dissolução *in vivo*. A obtenção da correlação é dependente do desenvolvimento e avaliação das condições do ensaio de dissolução *in vitro* (Mourão, 2009; Amidon *et al.*, 1995).

Nas classes III e IV, que apresentam baixa permeabilidade, o estabelecimento da CIVIV é limitado ou não esperado (Amidon *et al.*, 1995). A partir de dados do SCB é possível prever também que tipo de CIVIV esperar, conforme apresentado no Quadro 1.3, que indica a correlação esperada para formas de liberação modificada. Neste quadro, sugere-se que as classes do SCB apresentem subdivisões de acordo com as características de solubilidade e permeabilidade. Para fins didáticos, quanto à permeabilidade, tem-se que fármacos que têm permeabilidade elevada e local independente são classificados como classes IA e IIA, respectivamente. Já fármacos que apresentam permeabilidade local-dependente e estreita faixa de absorção são classificados como classes IB ou IIB, respectivamente. Considerando que para os fármacos de classe III ou IV são esperadas CIVIV nula ou limitada, inexistem outras subclassificações para estes grupos. Para aqueles que apresentam solubilidade e permeabilidade variáveis são classificados como classe V: VA incluem fármacos ácidos e VB incluem fármacos básicos. Desta maneira, dependendo do sítio de absorção e da sua especificidade, a correlação pode ser esperada ou não (Demirtürk; Öner, 2003).

Para as formulações de liberação modificada contendo fármacos de classe I, estas são potenciais candidatos para o desenvolvimento de CIVIV, se a velocidade de dissolução for menor que a velocidade de esvaziamento gástrico. Neste caso, temos que a etapa limitante da absorção é a dissolução do fármaco a partir da FF (Amidon *et al.*, 1995).

Quadro 1.3. SCB e expectativa CIVIV para produtos de sistema de liberação modificada (Demirtürk; Öner, 2003).

Classe	Solubilidade	Permeabilidade	CIVIV
IA	Alta e local independente	Alta e local independente	Correlação nível A esperada
IB	Alta e local independente	Local dependente e estreita janela de absorção	Correlação nível C esperada
IIA	Baixa e local independente	Alta e local independente	Correlação nível A esperada
IIB	Baixa e local independente	Local dependente e estreita faixa de absorção	Correlação baixa ou nula
VA ácido	Variável	Variável	Correlação baixa ou nula
VB base	Variável	Variável	Correlação nível A esperada

1.7. Aplicações das correlações *in vitro* - *in vivo*

O desenvolvimento de uma correlação *in vitro* – *in vivo* apresenta uma série de aplicações e vantagens. Dentre elas, a CIVIV permite bioisentar uma FF de um estudo de BD, criar especificações de dissolução que tenham caráter biorrelevante e criar um mapeamento do processo produtivo, indicando quais etapas são críticas durante este processo (Emami, 2006). Estas aplicações estão detalhadas a seguir.

1.7.1. Bioisenções

A bioisenção é a não exigência de um estudo de BD ou BE *in vivo* para a aprovação de um produto farmacêutico pela agência regulatória: (1) em razão

da FF, como por exemplo, soluções, gases, pós para reconstituição que resultem em soluções, entre outras; (2) para FFs de menor dosagem, quando a maior dose foi submetida à BE e as menores doses são bioisentas por meio de estudos de dissolução comparativo; (3) baseado nos SCB, por meio de estudos de solubilidade, permeabilidade e estudos de dissolução; (4) em estudos de CIVIV, desde que um teste *in vitro* apropriado (dissolução) possa ser usado em substituição ao *in vivo* (Brasil, 2011; EMA, 2010; Uppoor, 2001; United States, 2000).

Bioisenções podem ser concedidas para mudanças no local de produção, de equipamentos, no processo de produção e na composição da formulação de acordo com uma CIVIV preditiva e confiável (Nível A). Essas mudanças podem variar de pequenas alterações que não alterem significativamente o desempenho do produto até grandes mudanças nas quais uma CIVIV não é suficiente para demonstrar que estas não terão impacto sobre a BD do produto e, portanto, justificar tal alteração para uma decisão regulatória (Emami, 2006).

O guia do FDA (United States, 1997a) delimita cinco categorias de bioisenções descritas a seguir:

1. Bioisenção sem CIVIV: em casos de alterações pós-registro de fármacos de menores dosagens que tenham passado por ensaios de BE na maior dosagem;
2. Bioisenção usando CIVIV – fármacos que não são de estreita faixa terapêutica: a CIVIV pode auxiliar no delineamento do que ocorreria *in vivo* partindo de dados de dissolução *in vitro*.
3. Bioisenção usando CIVIV – fármacos de estreita faixa terapêutica: uma CIVIV pode ser usada para fármacos de baixo índice terapêutico desde que seja estabelecida a previsibilidade externa dessa correlação;
4. Bioisenção quando a dissolução *in vitro* é independente das condições utilizadas no ensaio de dissolução: em caso de fármacos de classe I do SCB, em que o estudo de dissolução que apresentam rápida dissolução – mínimo de 85%, dissolvidos em 30

min em 3 diferentes meios (pHs 1,2 ; 4,5 e 6,8) empregando 900 mL, usando a pá a 50 rpm ou a cesta a 100 rpm a 37 °C;

5. Situações para as quais uma CIVIV não é recomendada: aprovações de novas formas de liberação, cujo mecanismo de absorção seja desconhecido.

Segundo o guia da EMA, as biosenções são aceitas mediante a apresentação de uma CIVIV de Nível A e adicionalmente para fármacos de classe I e III do SCB. No caso de fármacos da classe I, o estudo de dissolução deve ser rápida, ou seja, mínimo de 85%, dissolvidos em 30 min em 3 diferentes meios (pHs 1,2 ; 4,5 e 6,8) empregando 900 mL, usando a pá a 50 rpm ou a cesta a 100 rpm a 37 °C. Para fármacos de classe III, o estudo de dissolução, realizado nas mesmas condições, deve ser muito rápida dissolução, isto é, dissolver no mínimo de 85% em 15 (EMA, 2010).

Já, a OMS aceita as biosenções para mudanças pós-registro através de CIVIV de liberação modificada, desde que não seja o primeiro registro da FF, e para fármacos de classe I, II e III do SCB. Para fármacos de classe I, requisita-se que o estudo de dissolução seja rápida dissolução (mínimo de 85% de dissolução em 30 min) em 3 diferentes meios (pHs 1,2 ; 4,5 e 6,8) e para fármacos de classe II, a dissolução deve ser rápida em meio com pH 6,8. Já para os fármacos da classe III, o estudo de dissolução deve ser muito rápida dissolução, ou seja, mínimo de 85%, dissolvidos em 15 min em 3 diferentes meios (pHs 1,2 ; 4,5 e 6,8) (WHO, 2006).

Por fim, a ANVISA considera as biosenções baseadas na CIVIV de nível A e para fármaco de classe I do SCB, em casos no qual o estudo de dissolução que apresentam rápida dissolução – mínimo de 85%, dissolvidos em 30 min em 3 diferentes meios (pHs 1,2 ; 4,5 e 6,8) empregando 900 mL, usando a pá a 50 rpm ou a cesta a 100 rpm a 37 °C (Brasil, 2011).

1.7.2. Estabelecimento de especificações para estudos de dissolução

Estabelecer uma especificação para estudos de dissolução para uma formulação de liberação imediata é relativamente simples. O comportamento

em relação à dissolução para cada biolote, lote usado no estudo de BD, pode ser definido pela quantidade de fármaco liberado em cada ponto. Entretanto, a dificuldade surge na definição da variação aceita em cada ponto. O guia do FDA descreve procedimentos para definir especificações de dissolução nos casos de CIVIV níveis B, C e C múltipla e em situações onde não haja correlação (Emami, 2006; United States, 1997a).

As condições usadas no desenvolvimento da correlação devem ser aproveitadas para estabelecer as especificações do ensaio de dissolução e o nível de aceite para prever o C_{max} e ASC deve ter uma variação máxima de 20%. Enquanto em situações na qual não houve o estabelecimento de uma CIVIV, o limite de tolerância pode ser derivado dos dados de dissolução *in vitro* de diferentes lotes que tiveram um desempenho *in vivo* aceitável (biolotes) ou pela demonstração da BE entre lotes com limites propostos de dissolução inferior e superior (Emami, 2006).

1.7.3. Conceito de mapeamento

Emami (2006) ainda descreve o mapeamento como importante aplicação da CIVIV. Este se refere a um estudo no qual são relacionados às variáveis críticas no processo de produção, incluindo formulação, procedimentos e equipamentos, que possam afetar significativamente a liberação do fármaco a partir da FF. Essas variáveis críticas podem ser avaliadas utilizando os dados de dissolução *in vitro* e os dados de BD *in vivo* (CIVIV). Esta técnica define limites para os perfis de dissolução no controle de qualidade baseando-se em critérios de aceite para BE de acordo com os dados de uma CIVIV. O objetivo deste processo é criar especificações para o produto que irão garantir que os futuros lotes sejam aprovados em um estudo de BE (Emami, 2006).

1.8. Estudos de correlação *in vitro* – *in vivo*

Existem poucos trabalhos científicos de CIVIV, que apresentam uma correlação nível A desenvolvida a partir de três formulações testes e uma referência (Campos *et al.*, 2011).

Uma das razões para isto é a dificuldade no delineamento do ensaio de dissolução *in vitro* para estabelecer a correlação *in vivo*, uma vez que as condições fisiológicas no processo de liberação devem ser consideradas na seleção das condições do ensaio de dissolução. Entretanto, a complexidade do mecanismo de liberação e a falta de conhecimento sobre as condições em que estas ocorrem são fatores que limitam o estabelecimento de especificações para este teste (Lu; Kim; Park, 2011; Siewert *et al.*, 2003).

Estes estudos apresentam elevada relevância, pois permitem utilizar os resultados obtidos de CIVIV com a finalidade de proporcionar o desenvolvimento racional de novas formulações farmacêuticas e podem ser utilizados principalmente com a finalidade de isentar os medicamentos genéricos e similares dos estudos de BE, conforme descrito no guia do FDA (United States, 2000). Apesar da grande importância dos estudos de BE na comprovação da segurança e eficácia dos medicamentos por meio de comparação de perfil de BD das formulações teste e referência, estes estudos apresentam uma série de desvantagens: alta variabilidade; custo elevado; sua realização implica na utilização de voluntários sadios e, portanto, envolve questões éticas; geram grande número de amostras, que normalmente são analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, com emprego de grandes quantidades de solventes orgânicos o que traz consequências em relação aos aspectos ecológicos. Ressaltando que, um estudo de CIVIV poderia substituir um estudo de BE garantindo eficácia e segurança sem envolver grande número de voluntários, sem gerar grande número de amostras biológicas e com um menor custo (Cook, 2012; United States, 2000).

Em 2000, Balan e colaboradores desenvolveram uma CIVIV para glibenclamida a partir de comprimidos contendo metformina e glibenclamida. Foram desenvolvidas três formulações, que diferenciavam entre si, principalmente, em relação ao tamanho de partículas da glibenclamida. As

formulações desenvolvidas foram submetidas à dissolução com aparato II a 75 rpm empregando 1000 mL de solução tampão fosfato pH 7,4. O estudo *in vivo* foi realizado com 24 voluntários. A partir dos resultados *in vitro* e *in vivo* foram estabelecidas CIVIV níveis A e C, sendo que a CIVIV nível A com escalonamento de tempo, apresentou coeficiente de determinação (r^2) de 0,97.

Em 2001, este mesmo grupo realizou um estudo avaliando a CIVIV para três formulações de cápsulas de metformina contendo o fármaco microencapsulado e revestido. As cápsulas foram submetidas à dissolução utilizando aparato II, a 100 rpm, em 1000 mL de solução tampão fosfato pH 6,8. O estudo *in vivo* foi conduzido com oito voluntários que receberam as três formulações e o medicamento referência de liberação imediata (Glucophage®). Tentou-se estabelecer correlações níveis A e C. Porém, apenas a CIVIV nível C apresentou erros de previsibilidade inferiores a 5% na validação interna e coeficiente de determinação (r^2) superior 0,90 utilizando o parâmetro $ASC_{0-\infty}$ *versus* porcentagem dissolvida ou TDM (Balan *et al.*, 2001).

Pode-se citar também o trabalho elaborado pelo grupo de Kortejärvi e colaboradores (2002), onde seis formulações de cápsulas de liberação modificada contendo levosimendan foram desenvolvidas. Essas cápsulas foram submetidas a ensaio de dissolução com aparato II com 500 mL de solução tampão de fosfato pH 5,8 a 100 rpm. O estudo *in vivo* foi realizado com nove voluntários do sexo masculino. Este foi conduzido em quatro fases, onde os voluntários receberam três formulações e um medicamento referência (solução oral) em cada uma das fases. A partir destes dados, o grupo estabeleceu a CIVIV de nível A com (r^2) de 0,997. A correlação de nível B foi estabelecida a partir do TDM_{vitro} e o TRM_{vivo} , com coeficientes de correlação variando entre 0,74 e 0,98. Para a correlação de nível C, estabelecida entre os parâmetros de dissolução $T_{80\%}$ e C_{max} , os coeficientes de correlação variaram de 0,52 a 1.

Dando continuidade a este estudo, o mesmo grupo publicou em 2006, a validação externa para avaliar a correlação de nível A, na qual as outras três formulações foram submetidas ao ensaio de dissolução. O estudo de BD foi realizado também com nove voluntários. Os EP% obtidos foram inferiores a 10%. Portanto o grupo concluiu que esta correlação pode ser utilizada para

embasar estudos de bioisenção. Adicionalmente, o estudo de dissolução desenvolvido pode definir uma nova especificação biorrelevante (Kortejärvi *et al.*, 2006).

Štefanič e colaboradores (2012) publicaram um trabalho cujo objetivo foi prever a dissolução *in vivo* de comprimidos orodispersíveis contendo grânulos de lanzoprazol com revestimento gastrorresistente e estabelecer uma boa correlação *in vitro* - *in vivo*, com a média de perfis de absorção *in vivo*, obtidos em um estudo farmacocinético com emprego de 35 voluntários sadios em estado de jejum. Os ensaios de dissolução dos comprimidos orodispersíveis foram realizados utilizando o aparato IV. Os resultados obtidos neste estudo, mostraram que quantidade de fármaco liberada diminui com o aumento do tempo de exposição ao meio ácido, e segundo os autores, isto ocorreu em função da degradação do fármaco. O grupo obteve uma CIVIV adequada considerando as médias dos perfis de dissolução *in vivo*, baseados nos perfis de dissolução determinados experimentalmente, e um modelo matemático de esvaziamento gástrico dos grânulos, uma vez que este fator apresentava forte influência sobre o processo de absorção *in vivo*, porém dados matemáticos da correlação não foram publicados neste trabalho. Portanto, os autores concluem que essas condições do ensaio de dissolução podem ser estabelecidas para a rotina de controle de qualidade do fármaco.

Considerando estes desafios, alguns estudos têm sido publicados, e o Quadro 1.4 resume algumas publicações nos últimos cinco anos (2009-2013). A pesquisa foi realizada no Isi Web of Knowledge e PubMed, considerando os anos de 2009 a 2013 e as seguintes palavras chaves: IVIVC, *in vitro* – *in vivo* correlation and *in vitro* - *in vivo* evaluation. Porém, nesta lista não foram incluídos os seguintes tipos de estudos: aqueles que obtiveram dados *in vivo* por extrapolação, com emprego de ferramentas de modelagem farmacocinética; que utilizaram animais para obtenção dos dados *in vivo*. Conforme se pode observar no Quadro 1.4, a deficiência de informações relevantes nos trabalhos publicados na literatura, destaque-se aqui: ausência da descrição das formulações usadas; não trabalhar com pelo menos três formulações para a construção da CIVIV; baixo detalhamento do estudo *in vitro* ou *in vivo*; não apresentar a CIVIV ou o coeficiente de determinação obtido

para a CIVIV. Visto isso, ressalta-se a importância desses estudos como forma de estabelecer protocolos de estudos de CIVIV.

Quadro 1.4. Estudos de CIVIV publicados na literatura nos últimos cinco anos (2009-2013).

Referência	Fármaco e FF	Estudo de dissolução	Estudo de BD	CIVIV
Mirza <i>et al.</i> , 2013	Fármaco de classe I segundo o SCB; Comprimidos de liberação modificada com velocidades rápida e lenta (50, 100 e 200 mg) – 5 Te 2 R	Ap. II, 50rpm, 500 mL tp fosfato pH 6,8	Estudos com 24 a 36 voluntários feitos pelo patrocinador	Deconvolução por Wagner-Nelson. CIVIV estabelecida para cada formulação com r^2 variando de 0,8942 a 0,9967
Klančar <i>et al.</i> , 2012	Comprimidos de Sulfonamida- 2 T	Diversas condições empregadas: Ap I: 100rpm, tp fosfato pH 6,8; 100rpm, água; 100rpm; SIF e FaSSIF Ap II: 100 rpm, água Ap III: 20 MPM, água; 20:40:25 MPM, água	26 vol.	Deconvolução por Wagner-Nelson. Nível A VI: EP% entre -7,7 a 7,7%
Štefanič <i>et al.</i> , 2012	Comprimidos orodispersíveis contendo grânulos de lansoprazol com revestimento entérico - 2T	Ap. IV; variação de pH: meio ácido e tp fosfato pH 6,8; fluxo: 5,5 ou 11 mL/min	35 vol.	Nível A (dissolução – fluxo: 11 mL/min)
Buch <i>et al.</i> , 2010	Comprimidos contendo dispersões solidas de fenofibrato – 6T	Ap. II, 50 rpm, 500mL FaSSIF _{mod}	1. 12 vol. – 3T 2. 20 vol. – 4T	CIVIV entre C_{max} e solubilidade x permeabilidade – r^2 0,94

Soto <i>et al.</i> , 2010	Comprimidos de pramipexol – 1 R (LI) e 4 T (LM)	Ap. I, 100 rpm, 500 mL tp fosfato pH 6,8	15 vol.	Nível A. VI (3T): EP% entre 0,36 e 10,38; VE (1T): entre 0,27 e 3,08
Fotaki <i>et al.</i> , 2009	Comprimidos LM – T: 1. Salbutamol – Bomba osmótica 2. BRL-49653 – comprimido matricial	Ap II, 50 ou 150 rpm, 500 mL meio (SGF, FaSSIF ou SCoF) Ap III, 15dpm(60 min, SGF), 10dpm(240min, FaSSIF e 180min, SCoF) Ap. IV, 8 mL/min(60 min, SGF), 4mL/min(240min, FaSSIF e 180min, SCoF)	IV (Salbutamol) – 10 vol. BRL-49653 – 20 vol. Salbutamol – 18 vol.	Todos os resultados de dissolução forneceram boa CIVIV Valores f1 entre 0,24 e 0,39
Macha <i>et al.</i> , 2009	Comprimidos de LM de nevirapina – 4T e 1 R (LI - Viramune®)	Ap. I, 100 rpm, 900mL tp fosfato pH 6,8 (2% lauril sulfato de sódio)	17 vol.	Nível A – $r^2 > 0,97$ VI: EP% < 10%
Ostrowski; Wilkowska; Baczek, 2009	Comprimidos dispersíveis de amoxicilina - 3T	Ap. II, 25 ou 85rpm, água	24 vol.	Nível A – r^2 entre 0,9472 e 0,9978 VI: EP% entre 5,28 e 44,74%

Shah <i>et al.</i> , 2009	Comprimidos de LM de lamotrigina – 3T	Ap. II, 50 rpm 1. 900mL HCl 0,1 N 2. 900mL tp fosfato pH 4,5 3. 900mL tp fosfato pH 6,8 4. 1000mL HCl 0,1 N/tp pH 6,8: 1h de HCl, então adicionou 150mL tp fosfato trissódico e ajustou o pH	12 vol.	Nível A – $r^2 > 0,989$ VI: EP% < 15%
---------------------------	---------------------------------------	---	---------	--

T = medicamento teste; R= medicamento referência; LI = liberação imediata; LM = liberação modificada; vol. = voluntários; Ap. = Aparato; tp = tampão; SGF = Fluido gástrico simulado; SIF = Fluido intestinal simulado; FaSSIF = fluido intestinal simulado no estado de jejum; SCoF = fluido colônico simulado; mod = modificado; MPM = mergulhos/minuto; vol. = voluntários; (r^2) = coeficiente de determinação; ASC = área sob a curva; VI = validação interna; VE = validação externa; EP% = erro de predição em porcentagem; f1 = fator de diferença.

1.9. Considerações finais

Apesar das vantagens que a CIVIV apresenta, existem ainda poucos estudos que trazem uma correlação preditiva capaz de ser utilizada com o objetivo de bioisentar um medicamento em alterações pós-registro ou estabelecer as especificações adequadas para um estudo de dissolução preditivo. Visto isso, observa-se a relevância do tema e a necessidade de realizar mais estudos como forma de agregar conhecimento científico.

**Capítulo 2: Métodos *in vitro* - Obtenção e
caracterização do complexo de furosemida e
hidroxipropil- β -ciclodextrina e dos comprimidos
matriciais obtidos a partir deste complexo**

Resumo

O presente capítulo descreve a obtenção e caracterização de complexo de furosemida e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD), destacando sobretudo o impacto da complexação na solubilidade e permeabilidade, parâmetros relevantes adotados pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB). A solubilidade foi avaliada pelo método do equilíbrio e a permeabilidade por meio do ensaio em membranas paralelas artificiais (*Parallel Artificial Membrane Permeation Assay* – PAMPA). A partir do complexo obtido (furosemida e HP- β -CD) foram desenvolvidas cinco formulações contendo hidroximetilpropilcelulose K4M (HPMC K4M), em diferentes concentrações (30%; 20%; 17,5%; 15% e 10%) as quais foram designadas de A1, A2, A2a, A2b e A3, respectivamente. Estas formulações foram caracterizadas quanto à dissolução com o emprego do aparato II nas seguintes condições: 75 rpm; 900 mL de meio (tampão fosfato pH 6,8). Posteriormente, em função de seu comportamento de dissolução, as formulações A1, A2a e A3 foram selecionadas e submetidas ao estudo de dissolução com emprego do aparato IV, nas seguintes condições: fluxo de 8 mL/min; com gradiente de pH em meio HCl pH 1,2 por 1 hora, seguido de tampão acetato pH 4,5 por 1 hora e por fim tampão fosfato pH 6,8 por 6 horas. Os resultados do estudo de solubilidade indicaram que o complexo de furosemida e HP- β -CD apresentou uma melhora na solubilidade quando comparado ao fármaco puro. Já os resultados de permeabilidade, obtidos por meio do PAMPA, não indicaram diferenças significativas entre o fármaco puro e o complexo de furosemida e HP- β -CD. Com relação ao comportamento de dissolução obtido com emprego do aparato II, as formulações produzidas apresentaram perfis de dissolução distintos sendo que maior velocidade de dissolução foi observada a partir da formulação A3, enquanto que A1 apresentou menor velocidade de dissolução e, portanto menor eficiência de dissolução. Dentre as formulações A2, A2a e A2b a formulação A2a mostrou caráter intermediário, quando comparada às formulações A1 e A3. Assim, foram submetidas ao estudo de dissolução com aparato IV, as formulações A1, A2a e A3, e estas apresentaram perfis distintos de dissolução e os resultados mostraram-se de acordo com aqueles obtidos com aparato II. Os resultados de

dissolução, obtidos tanto com aparato II quanto com o aparato IV, mostram que as concentrações de HPMC impactaram na dissolução da furosemda.

2.1. Introdução

2.1.1. Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CDs) constituem uma classe de excipientes farmacêuticos compostas por unidades de D-glucopiranoose, que unidas originam estruturas cíclicas tronco-cônicas. As CDs obtidas com maior rendimento, conhecidas como naturais, contêm seis, sete e oito unidades de glicose, sendo denominadas de α -ciclodextrina (α -CD), β -ciclodextrina (β -CD) e γ -ciclodextrina (γ -CD), respectivamente. A estrutura espacial cônica e a orientação dos grupos hidroxílicos para o exterior conferem a estes açúcares cíclicos, propriedades físico-químicas únicas, sendo capazes de solubilizar-se em meio aquoso e ao mesmo tempo encapsular no interior da sua cavidade moléculas hidrofóbicas (Gamsiz *et al.*, 2009; Cunha-Filho; Sá-Barreto, 2007).

Na área farmacêutica, este excipiente tem sido explorado principalmente quanto ao incremento da solubilidade, da estabilidade e da biodisponibilidade (BD) de fármacos. Também se pode destacar sua utilização para mascarar odores e sabores desagradáveis de certos fármacos, para reduzir ou eliminar irritações oculares ou gastrintestinais, e na prevenção de interações e incompatibilidades (Cunha-Filho; Sá-Barreto, 2007).

Conforme relatos da literatura as ciclodextrinas têm sido empregadas no aumento da solubilidade aquosa de fármacos. Neste sentido, a solubilidade aquosa de fármacos lipofílicos pode ser melhorada sem alterar sua capacidade intrínseca de permear membranas biológicas. Assim, através de complexação à ciclodextrina é possível que fármacos de classe II, e às vezes fármacos de classe IV, passem a apresentar comportamento semelhante a fármacos de classe I. Ressalta-se aqui a importância da solubilidade aquosa e também da permeabilidade, pois estes parâmetros afetam a BD de fármacos (Loftsson, 2002).

Este aumento da solubilidade pode levar ao aumento da BD, isto decorrente do incremento de molhabilidade, de solubilidade, de dissolução e de permeabilidade que estes complexos promovem indiretamente ao fármaco. Isto pode ser explicado pela presença das hidroxilas livres na parte externa das CDs que conferem aos fármacos, um caráter hidrofílico, permitindo a dissolução de compostos de baixa solubilidade em meio aquoso (Guedes *et al.*, 2008). O incremento na biodisponibilidade é maior, sobretudo em formas farmacêuticas (FFs) sólidas, uma vez que, a solubilidade do fármaco e a velocidade de dissolução a partir da forma farmacêutica (FF) são determinantes deste parâmetro (Frijlink *et al.*, 1990).

Destaca-se que estudos de toxicidade envolvendo as CDs demonstram que a administração oral destas não oferecem riscos de intoxicação, sendo consideradas praticamente atóxicas, mesmo em elevadas doses, isto porque as CDs apresentam limitada absorção gastrointestinal (Guedes *et al.*, 2008; Spricigo *et al.*, 2008).

Os complexos podem ser obtidos na forma de solução aquosa ou na forma de um produto em estado sólido. As técnicas empregadas para a obtenção de complexos de ciclodextrina na forma de um produto em estado sólido são: liofilização, atomização, co-precipitação, fluidização supercrítica, maxalagem e mistura física (Cunha-Filho; Sá-Barreto, 2007). Por outro lado, para a obtenção de complexos fármaco-CD em solução é relativamente simples e rápida. O procedimento de preparação mais habitual consiste na solubilização da CD em água ou em solução tampão e posterior adição do composto ativo em excesso. A suspensão resultante permanece à temperatura constante, sob agitação, por um intervalo de tempo suficiente para atingir o equilíbrio termodinâmico de encapsulação (Cunha-Filho; Sá-Barreto, 2007). A formação de complexos é um processo exotérmico e a redução de temperatura normalmente favorece esta interação (Cunha-Filho; Sá-Barreto, 2007; Loftsson; Brewster, 1996). A adição de co-solventes, na maioria das ocasiões, diminui a capacidade de encapsulação de fármacos, devido à competição que se estabelece pela cavidade hidrofóbica da CD (Cunha-Filho; Sá-Barreto, 2007).

A caracterização dos complexos de ciclodextrina em solução é usualmente realizada por meio das seguintes técnicas: diagramas de

solubilidade em fases, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de fluorescência e de ultravioleta-vísivel (UV-vis) e modelagem molecular. Para os complexos em estado sólido, as principais técnicas empregadas na caracterização são: análise térmica, incluindo termogravimetria (TG), sistemas termoanalíticos, cromatografia pirolítica de gases e calorimetria exploratória diferencial (DSC); técnicas espectroscópicas, incluindo espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e RAMAN; técnicas cristalográficas com raios-X, incluindo difração de raio-X do pó; tamanho e morfologia das partículas; molhabilidade; propriedades de dissolução (Cunha-Filho; Sá-Barreto, 2007). Os complexos podem ainda ser caracterizados seguindo os parâmetros de classificação do SCB, isto é, por determinação de solubilidade e de permeabilidade (Loftsson, 2002; Amidon *et al.*, 1995).

A avaliação do impacto da CD sobre a absorção é relevante, porém representa grande desafio. Na tentativa de transpor esse obstáculo, Gamsiz e colaboradores (2009) desenvolveram um modelo matemático teórico para prever o efeito da CD sobre os fármacos de baixa solubilidade, em geral. Os autores utilizaram como exemplo, um fármaco hipotético, sem especificar nenhuma molécula. Baseado nos cálculos realizados, os pesquisadores concluíram que o modelo foi capaz de prever se a CD apresenta efeito positivo, negativo ou nulo sobre o fármaco analisado e que, portanto, pode ser extrapolado para outros fármacos.

Por exemplo, o praziquantel, principal fármaco de escolha no tratamento de esquistossomose, é altamente lipofílico e classificado como fármaco da Classe II, de acordo com o SCB, em função da alta permeabilidade e baixa solubilidade. Por esta razão este fármaco foi estudado por Maragos e colaboradores (2009). Os pesquisadores avaliaram o impacto da complexação com as CDs, β -CD e HP- β -CD, sobre a solubilidade aquosa do praziquantel. Foi utilizada a técnica de liofilização para a preparação de complexo de inclusão. A capacidade de aumentar a eficiência de solubilização do fármaco puro e dos complexos obtidos foi avaliada em tampão fosfato pH 7,4. Os resultados demonstraram uma melhoria significativa na solubilidade do fármaco na presença das CDs.

2.1.2. Comprimidos matriciais contendo hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)

As FFs de uso oral são comumente utilizadas por serem mais convenientes ao paciente e por apresentarem relativamente menor custo de produção (Shargel; Yu, 2012; Storpirtis *et al.*, 2009).

Os produtos de liberação modificada ganham destaque na terapêutica e no desenvolvimento de novas FFs. Estes são projetados para fornecer uma quantidade de fármaco terapeuticamente eficaz ao longo de um período de tempo e assim melhorar o tratamento e a adesão do paciente. Os comprimidos de liberação modificada são desenvolvidos para modular a liberação e/ou alterar o sítio de absorção do fármaco, com um objetivo clínico específico que não pode ser atingindo por meio de uma forma convencional (Qiu *et al.*, 2009). Os possíveis benefícios de um sistema de liberação modificada são: reduzir o número de doses ao longo do tratamento, melhorar eficiência e reduzir efeitos adversos, aumentar a conveniência e a adesão do paciente ao tratamento, melhorar desempenho e a seletividade de uma atividade farmacológica (Qiu *et al.*, 2009; Spricigo, 2006; Collett; Moreton, 2005; Ansel *et al.*, 2000).

Os sistemas de liberação modificada envolvem vários mecanismos de liberação de fármacos que podem ocorrer isolados ou em conjunto, tais como difusão (através de poros de uma barreira, canais tortuosos ou pela formação de uma camada de gel viscoso entre cadeias poliméricas), intumescimento (difusão e/ou erosão e dissolução) ou liberação por indução da pressão osmótica (fármaco em solução ou suspensão é liberado do sistema) (Qiu *et al.*, 2009).

Uma das estratégias para a fabricação de FFs de liberação modificada é o uso de comprimidos matriciais, que são unidades monolíticas compostas por um agente formador de matriz, geralmente insolúvel, no qual o fármaco encontra-se disperso (Spricigo, 2006). O objetivo principal deste tipo de sistema é obter perfis de liberação prolongada para manter a concentração plasmática *in vivo* uniforme e um efeito farmacológico estável, decorrente de um menor acúmulo de fármaco no organismo e menos reações adversas (Shin

et al., 2011; Qiu *et al.*, 2009; Spricigo, 2006; Collett; Moreton, 2005; Ansel *et al.*, 2000).

Por serem de baixo custo, fácil desenvolvimento, fácil transposição de escala (*scale-up*) e manufatura, estes sistemas são amplamente utilizados. Entretanto, as características de liberação do fármaco a partir da FF geralmente são dependentes das propriedades físico-química do fármaco, tais como solubilidade, estabilidade, coeficiente de partição e peso molecular (Qiu *et al.*, 2009; Spricigo, 2006).

Para a obtenção dos comprimidos matriciais podem ser empregados diferentes tipos de matrizes, tais como: matrizes inertes, matrizes hidrofóbicas e matrizes hidrofílicas. Os tipos de matrizes terão impacto sobre as características de liberação do fármaco e os mecanismos de intumescimento (Qiu *et al.*, 2009; Spricigo, 2006), conforme descrito a seguir:

- ✓ Matrizes inertes: polietileno, cloreto de polivinila, copolímero acrilato-metacrilato, etilcelulose;
- ✓ Matrizes hidrofóbicas: cera de carnaúba, triglicerídeos, óleo de rícino hidrogenado;
- ✓ Matrizes hidrofílicas: metilcelulose, hidroxietilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, carboximetilcelulose sódica, carboxipolimetileno, galactomanose, alginato de sódio (Qiu *et al.*, 2009; Mourão, 2009; Spricigo, 2006).

As matrizes hidrofílicas recebem esta denominação pela capacidade que suas estruturas possuem de hidratar-se e formar barreiras intumescidas e geleificadas (Collett; Moreton, 2005; Salsa; Veiga; Pina, 1997). Dentre os materiais geleificantes de natureza celulósica, a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) é dos mais utilizados. O Methocel™, como é conhecido comercialmente, é um éter semi-sintético derivado de celulose, não tóxico e não iônico. É solúvel em água e, quando disperso, é capaz de modificar o comportamento reológico dos meios nos quais é incorporado, sendo que variações do pH não afetam sua viscosidade. Apresenta fácil compressibilidade e capacidade de incorporar grandes quantidades do fármaco. A HMPMC caracteriza-se de acordo com a natureza dos substituintes, seu grau de substituição e viscosidade nominal. Apresenta diferentes graus de hidratação,

em decorrência dos graus de substituição, identificados pelas letras E, F e K. O tipo K é o mais indicado para preparação de matrizes devido à sua rápida hidratação, a qual é essencial para a imediata formação de uma camada homogênea de gel e retenção do fármaco (Spricigo, 2006; Colorcon, 2000) e portanto, é largamente utilizado em formulações de uso tópico e oral. São empregados os derivados de maior viscosidade, em concentrações de 10 a 80% (Rowe; Sheskey; Owen, 2003).

Vários trabalhos têm descrito o emprego de matrizes poliméricas no desenvolvimento de comprimidos de liberação prolongada. Dentre eles, destaca-se um trabalho recente dos pesquisadores, Yadav, Yadav e Srivastana (2013), que descreve a avaliação de diferentes polímeros: HPMC (Methocel™ K4M), polivinilcloreto, etilcelulose, álcool estearato, ácido esteárico, álcool cetílico, cera de abelha, cera de carnaúba, parafina e acetato de celulose em formulações de liberação modificada de venlafaxina. Estas formulações foram submetidas aos estudos de dissolução *in vitro* empregando o aparato II, nas seguintes condições: velocidade de agitação de 100 rpm e 900 mL de água por 14 horas. Os pesquisadores concluíram, a partir dos resultados dos ensaios de dissolução do fármaco *in vitro*, que os polímeros HPMC e álcool cetílico foram adequados no desenvolvimento de FFs de liberação modificada para o fármaco venlafaxina. Segundo os pesquisadores, os mecanismos envolvidos na liberação do fármaco a partir destes sistemas matriciais foram: erosão e difusão. As formulações obtidas com os demais polímeros apresentaram rápida liberação do fármaco e, portanto, estes não foram indicados para o desenvolvimento de FFs de liberação modificada.

Mohamed e colaboradores (2013) avaliaram a influência das concentrações de HPMC em mini-comprimidos de liberação prolongada e compararam as formulações com dois fármacos diferentes, a teofilina e a hidrocortisona. A HPMC utilizada foi o Methocel™ K15M, nas proporções de, 30, 40, 50 e 60%, p/p. A dissolução dos fármacos foi avaliada empregando o aparato II a 50 rpm, em 900 mL de água por um período de 12 horas. Considerando os resultados do estudo de dissolução, os pesquisadores concluíram que o aumento na concentração de HPMC resultou em diminuição na quantidade de fármaco liberado a partir das FFs desenvolvidas.

Alguns trabalhos têm associado polímeros hidrofílicos com ciclodextrinas. A incorporação de ciclodextrina em sistemas poliméricos de liberação de fármacos pode influenciar o mecanismo pelo qual o fármaco é liberado. Estes sistemas apresentam o potencial de aumentar a velocidade de liberação em função da formação de canais ou pela promoção da erosão da matriz (Qiu *et al.*, 2009). É o que demonstra o trabalho de Zugasti e colaboradores (2009). Nele, o fármaco modelo, diflunisal, foi complexado à β -CD por co-evaporação. O complexo foi avaliado por análise térmica diferencial, difração de raio-X e a espectroscopia de infravermelho. Foram desenvolvidas formulações usando HPMC (30% e 50%). Para verificar a influência da β -CD sobre a formulação contendo HPMC foram utilizados a mistura física e o complexo de diflunisal e β -CD. Os comprimidos foram submetidos ao estudo de dissolução empregando aparato II a 100 rpm e 900 mL de solução tampão fosfato, pH 5,8, como meio de dissolução. Fundamentado nos resultados, os autores concluíram que o fármaco formou um complexo com β -CD. Os pesquisadores também observaram que o complexo de inclusão com o fármaco e a β -CD presente nas formulações proporcionou o aumento da velocidade de dissolução da formulação tanto nos comprimidos com 30% ou 50% de HPMC, quando comparado com a mistura física de diflunisal e a β -CD.

2.1.3. Estudos de dissolução *in vitro*

FFs sólidas administradas por via oral geralmente passam pelos processos de desintegração e dissolução para liberar o fármaco, para que este possa então ser absorvido e chegar à circulação sistêmica e ao local de ação. No caso de fármacos com baixa solubilidade aquosa, a dissolução muitas vezes é a etapa limitante e que afeta diretamente a velocidade e a extensão de absorção do fármaco. Vários ensaios de dissolução têm sido desenvolvidos como ferramentas para prever o desempenho da FF *in vivo*, além de monitoramento da qualidade do produto (Qiu *et al.*, 2009).

Para avaliar a dissolução das FFs, os aparatos mais empregados são o I (cesta) e II (pá). Estes aparatos utilizam cuba única e hemisférica contendo o meio de dissolução com um eixo central. Por sua vez, aparatos III (Bio-Dis) e IV

(*Flow-cell*) foram posteriormente incluídos nos métodos farmacopéicos e estudos com estes sistemas são bem menos comuns. Os aparatos III e IV foram desenvolvidos a partir de limitações da técnica de dissolução com o emprego dos aparatos I e II (Qiu *et al.*, 2009). No presente trabalho, os ensaios de dissolução com enfoque na aplicação dos estudos de CIVIV foram abordados no Capítulo 1 (item 1.2.1).

Cabe ressaltar que as metodologias para avaliar FFs de liberação modificada apresentam algumas peculiaridades e devem considerar as características individuais de cada tecnologia envolvida em uma FF com liberação diferenciada. O estudo de dissolução de FFs de liberação colônica, por exemplo, deve ser realizado em três meios: meio ácido e tampão pH 6,8 nos quais o fármaco não deve ser liberado; e tampão pH 7,4, onde o fármaco passa a ser liberado. Para realizar este teste, é mais conveniente o uso de aparatos III ou IV, isto porque estes aparatos permitem a troca de meio de dissolução facilmente (de la Penã *et al.*, 2003). Destacando-se os resultados do ensaio de dissolução empregando o aparato IV, que notoriamente apresentou uma série de vantagens sobre os demais métodos, no estabelecimento de perfis de dissolução mais discriminativos, especialmente para fármacos de baixa solubilidade, uma vez que permite manter as condições *sink* durante todo o estudo (Qiu *et al.*, 2009). Isto é relevante no presente trabalho, porque a furosemida é um fármaco de baixa solubilidade, pertencendo à classe IV de acordo com Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (Granero *et al.*, 2010; Amidon *et al.*, 1995). A utilização deste aparato permite o desenvolvimento de estudos que simulem de forma mais fidedigna as condições *in vivo* do trato gastrointestinal (TGI), isto é realizar um ensaio com gradiente de pH simulando as condições encontradas no TGI durante a dissolução do fármaco *in vivo*, podendo permitir uma melhor correlação dos dados *in vitro* e *in vivo* (de la Penã *et al.*, 2003).

O trabalho de de la Penã e colaboradores (2003) descreve um estudo comparativo entre os aparatos de dissolução II e IV. Foram utilizados três formulações comerciais de comprimidos de liberação imediata contendo alendazol (Classe II do SCB). Para permitir o estudo comparativo, o grupo utilizou como meio a solução de HCl 0,1 N, com os dois aparatos. Os perfis de

dissolução obtidos foram avaliados por análise estatística (ANOVA). Com o emprego do aparato II, apenas a formulação referência e uma das formulações teste cumpriram os critérios farmacopeicos (dissolução de 80% em 30 minutos). Por outro lado, com o emprego do aparato IV, apenas o produto referência cumpriu este critério. Avaliando os perfis de dissolução por ANOVA, o grupo concluiu que o estudo de dissolução com o aparato IV permitiu perfis mais discriminativos em relação àqueles obtidos com o aparato II.

Por outro lado, o trabalho do grupo de Fotaki e colaboradores (2009) apresentou um estudo comparativo do comportamento de dissolução com os aparatos II, III e IV. O objetivo foi estabelecer uma CIVIV a partir de comprimidos de liberação modificada utilizando duas formulações: 1) comprimidos matriciais de um novo composto denominado BRL-49653 (fármaco de baixa solubilidade) e 2) sistema de bomba osmótica de salbutamol (fármaco de alta solubilidade). As condições dos ensaios de dissolução *in vitro*, para cada um dos aparatos, foram descritas no Quadro 1.4 do Capítulo 1 e os resultados foram comparados por fator de diferença (f_1). Para o composto BRL-49653, fármaco de baixa solubilidade, a composição do meio afetou significativamente as velocidades de dissolução. Para este composto, quando se empregou como meio de dissolução o fluido gástrico simulado (SGF), a velocidade dos perfis de dissolução foi comparativamente mais rápida, independente da condição experimental utilizada. Isto pode ser justificado pelas características do fármaco que é uma base fraca, apresentando maior solubilidade em meios ácidos. O resultado de f_1 para a comparação dos dados obtidos com os aparatos III e IV foi de 42%, considerando o aparato III como referência. Já para o fármaco salbutamol, o meio de dissolução ou as condições em que os estudos foram realizados, não foram relevantes para a sua dissolução a partir da FF, por tratar-se de um fármaco de alta solubilidade. O valor de f_1 foi de 5%, quando foram comparados os dados obtidos com os aparatos III e IV, e considerado o aparato III como referência. Os pesquisadores concluíram que todos os ensaios de dissolução realizados podem ser úteis no estabelecimento de uma CIVIV para as formulações avaliadas e, portanto, nenhum dos aparatos demonstrou resultados mais discriminativos para os fármacos BRL-49653 e salbutamol.

2.1.4. Furosemida

A furosemida (Figura 1) é um diurético de alça de Henle potente usado no tratamento de estados edematosos associados com insuficiência cardíaca, renal e hepática, e no tratamento da hipertensão (Spamer *et al.*, 2002). O fármaco é quimicamente denominado ácido 5-(aminosulfonil)-4-cloro-2-((furanilmetil)amino)benzoico. A furosemida é um ácido fraco ($pK_a = 3,9$), com log P de 2,56, com peso molar de 330,77 g/mol e ponto de fusão de 206 °C. É praticamente insolúvel em água (<1 mg/mL) e em meios ácidos, pouco solúvel em clorofórmio e em éter e livremente solúvel em soluções alcalinas, etanol, metanol, acetona e em dimetilformamida (Avdeef, 2003; Merck Index, 1996).

Considerando o sistema de classificação biofarmacêutica (SCB) proposto por Amidon e colaboradores (1995), a furosemida tem sido classificada pela maioria dos autores como fármaco de classe IV, em função de sua baixa solubilidade e baixa permeabilidade. A furosemida apresenta solubilidade pH-dependente, portanto em meios ácidos, o fármaco é pouco solúvel, porém, em pH mais alcalino, observa-se o aumento da solubilidade (Granero *et al.*, 2010).

Vários autores têm apontado que as limitações de solubilidade e de permeabilidade dos fármacos, geralmente, são responsáveis pela baixa biodisponibilidade (BD) (Bragatto *et al.*, 2011; Granero *et al.*, 2010; Najib *et al.*, 2003; Ponto; Schoenwald, 1990; McNamara *et al.*, 1987; Benet, 1979). No caso da furosemida, isto tem sido atribuído aos seguintes aspectos: baixa solubilidade aquosa; absorção sítio-específico, ocorrendo principalmente nas porções superiores do intestino delgado; por suscetibilidade a ação das proteínas de efluxo (Al-mohizea, 2010; Granero *et al.*, 2010); suscetibilidade ao metabolismo pré-sistêmico (Spamer *et al.*, 2002; McNamara *et al.*, 1987). A melhora das suas propriedades de dissolução é essencial uma vez que o comportamento de dissolução de comprimidos *in vitro* está diretamente ligado à BD do fármaco (Spamer *et al.*, 2002; McNamara *et al.*, 1987). Alguns pesquisadores já fizeram o uso de CD complexada à furosemida com o intuito de melhorar as características de solubilidade e dissolução. Estes trabalhos

concluíram que os complexos de inclusão do fármaco melhoram a solubilidade da furosemida (Spricigo *et al.*, 2008; Spamer *et al.*, 2002).

Na literatura encontram-se descritas sete formas polimórficas para a furosemida, sendo quatro polimorfos verdadeiros (I, II, III e IV), dois solvatos (V – dioxano e VI – DMS) e uma forma amorfa. No entanto, não existem relatos de diferenças na biodisponibilidade do fármaco dependente do polimorfismo (Granero *et al.*, 2010).

A incorporação da furosemida em uma forma de liberação modificada é adicionalmente justificável por permitir a obtenção de perfis de dissolução distintos. Isto possibilitará o desenvolvimento de um estudo de CIVIV.

2.2. Objetivos

O objetivo do presente capítulo foi a obtenção de comprimidos matriciais com perfis de dissolução distintos, a partir do complexo furosemida e HP- β -CD, devidamente caracterizado, com a finalidade de obter formulações adequadas para o estudo de CIVIV. Como objetivos específicos deste capítulo destacam-se: a obtenção e a caracterização do complexo de furosemida e HP- β -CD; estudo de dissolução das formulações desenvolvidas utilizando os aparatos II e IV; desenvolvimento e validação do método analítico.

2.3. Materiais e Métodos

2.3.1. Materiais e Reagentes

- ✓ Furosemida: Substância Química de Referência (lote: 410128/2, teor: 99,6%, gentilmente doado pela FURP) e Matéria Prima (fabricante: HEM-DEEP Organisc; lote: SRF0100709; Validade: 01/05/2014; teor: 97,4%);
- ✓ Hidroxipropil- β -ciclodextrina (Wacker, Alemanha, gentilmente doado por ISP Brasil; lote: 73B041; validade: 29/03/2013);

- ✓ Hidroxipropilmetilcelulose K4M (Methocel™, HPMC K4M, gentilmente doado por Colorcon®; lote: yi24012n01; validade: 23/09/2015);
- ✓ Celulose microcristalina (Fabricante: MIMG TAE; lote: C1011080; validade: 26/11/2013); e Estearato de Magnésio (Fabricante: PETER GREBEN; lote: c115753; validade: 15/09/2013),
- ✓ Metoprolol (controle de alta permeabilidade) e ranitidina (controle de baixa permeabilidade), Sigma Aldrich;
- ✓ Ácido clorídrico, Ácido acético glacial, Acetato de sódio tri-hidratado, Fosfato de potássio monobásico, Cloreto de Potássio, Hidróxido de sódio, Metanol, diclorometano, clorofórmio, DMSO (dimetilsulfóxido) grau cromatográfico;
- ✓ Água ultra pura (Milli Q®, USA).

2.3.2. Equipamentos e vidrarias

- ✓ Cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de fluorescência – Merck Hitashi, composto por bomba L-7100, injetor automático de amostras L-7200, detector de fluorescência L-7485, forno de coluna L-7300 e interface D-7000;
- ✓ Espectrofotômetro UV-vis – Varian;
- ✓ Plataforma de agitação com incubadora *Shaker* – Tecnal;
- ✓ Espectrofotômetro UV-vis - fluorescência Infinite M200 – Tecan;
- ✓ Prensa hidráulica – Nova Ética;
- ✓ Dissolutor aparato II, modelo VK 7000 – Vankel;
- ✓ Dissolutor aparato IV, Flow-cell – Sotax;
- ✓ Liofilizador, modelo Supermodulyo – Thermo Electron;
- ✓ Micropipetas variáveis 100-1000 µL e 500-5000 µL – Brand;
- ✓ Balões volumétricos, Béqueres, Provetas de volumes adequados;
- ✓ Microplacas com 96 poços, microplacas com 96 poços contendo um filtro composto por Polivinildifluorideno (PVDF) com 125 µm de espessura e tamanho de poro de 0,45 µm e microplacas transparentes para leitura UV-vis.

2.3.3. Obtenção dos complexo de furosemida e HP- β -CD

O preparo do complexo de furosemida e HP- β -CD foi baseado na metodologia e resultados prévios obtidos por Spricigo (2006) e Spricigo e colaboradores (2008).

Para preparação de 3 g de mistura binária equimolar (1:1) de furosemida e HP- β -CD, procedeu-se do seguinte modo: foram preparados 150 mL de tampão fosfato pH 6,8, adicionaram-se 0,607 g (PM = 330,77 g/mol; $1,84 \times 10^{-3}$ M) de furosemida sob agitação constante, até a completa solubilização. Na sequência, adicionou-se 2,393 g (PM = 1300 g/mol; $1,84 \times 10^{-3}$ M) de HP- β -CD. Esta solução permaneceu sob agitação por 24 horas em agitador magnético a 900 rpm. Após o período de agitação, a solução foi congelada em frascos apropriados utilizando gelo seco e álcool, e submetida ao processo de liofilização a -40°C . Depois de seco, o material sólido foi removido da parede do frasco usado na liofilização sendo, em seguida, pulverizado manualmente com auxílio de gral e pistilo, e mantido em dessecador até o momento de sua utilização nos experimentos.

2.3.4. Caracterização do complexo de furosemida e HP- β -CD

2.3.4.1. Teor

Para determinação do teor de furosemida na matéria-prima e produtos obtidos da liofilização de furosemida e HP- β -CD, pesou-se, em balança analítica, quantidade de pó equivalente a 50,0 mg de furosemida; transferiu-se a amostra para balão volumétrico de 100 mL e adicionou-se solução aquosa de hidróxido de sódio 1 M. Em seguida, agitou-se a 900 rpm por 30 min e completou-se o volume; diluiu-se a solução com tampão fosfato 0,05 M pH 6,8 até a concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$. Paralelamente, preparou-se o padrão nas

mesmas condições da amostra. Executou-se a quantificação do fármaco por espectrofotometria a 280 nm (Spricigo, 2006).

As análises foram realizadas em triplicata e calculou-se o teor de furosemida pela Equação 2.1 (Eq. 2.1):

$$T(\%) = C \times F_d \times V_d \times \frac{100}{50} \text{ (Eq. 2.1)}$$

Em que:

T(%) = teor em porcentagem

C = concentração do fármaco na solução de leitura (mg/mL)

F_d = fator de diluição das alíquotas (igual a 1 caso sem diluição)

V_d = volume do meio de dissolução (mL)

2.3.4.2. Ensaios termoanalíticos

Para avaliar a formação de complexo entre o fármaco e a HP-β-CD pela técnica descrita no item 2.3.3, amostras de furosemida, HP-β-CD e complexo de furosemida e HP-β-CD obtidos por liofilização foram submetidas às análises por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG).

2.3.4.2.1. Calorimetria Exploratória Diferencial

A caracterização por DSC foi realizada empregando-se equipamento TA-2920 (TA Instruments®, New Castle, DE, EUA) no intervalo de 25 a 300 °C, utilizando cápsulas de alumínio seladas, com massa de amostra de aproximadamente 3,0 mg, razão de aquecimento de 20 °C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min.

2.3.4.2.3. Termogravimetria

A caracterização por TG foi realizada empregando-se termobalança TA-2950 (TA Instruments®, New Castle, DE, EUA) na faixa de 25 a 800 °C, utilizando cadinho de platina, massa de aproximadamente 20,0 mg, razão de aquecimento 10 °C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 100 mL/min.

2.3.4.3. Estudo de solubilidade

Os ensaios de solubilidade da furosemida e complexo de furosemida e HP- β -CD foram conduzidos utilizando o método do equilíbrio, empregando a técnica *shake-flask* (agitação de frascos) no equipamento *shaker* (incubadora com plataforma de agitação orbital com controle de temperatura), conforme preconizados pelo guia da FDA (United States, 2000). Os ensaios foram executados em frascos plásticos com tampa e capacidade de 50 mL. Em cada frasco, foram adicionados 25 mL dos meios: água destilada; tampão HCl pH 1,2; tampão acetato pH 4,5; tampão fosfato pH 6,8 ou tampão fosfato pH 7,5. As soluções tampão foram obtidas conforme descritas na Farmacopeia Americana (USP, 2012). Em seguida, foram adicionados o fármaco ou o complexo de fármaco e HP- β -CD em quantidade suficiente para saturar cada meio, o que é caracterizado pelo depósito da fração não solubilizada no fundo do recipiente. Os frascos foram adaptados ao equipamento devidamente programado para manter a temperatura em $37,0 \pm 0,5$ °C e agitação de 150 rpm pelo período de 72 horas (Pereira, 2011; Dezani, 2010; United States, 2000; Stavchansky, Pade, 1998).

As amostras foram retiradas do equipamento e filtradas imediatamente com auxílio do filtro de seringa com porosidade de 0,45 μ m. Do volume filtrado, foram realizadas as diluições necessárias com os meios correspondentes a fim de obter uma solução na faixa de trabalho conforme método previamente validado em espectrofotômetro UV-vis, conforme item 2.3.9.

A partir dos resultados de solubilidade, calculou-se a razão dose/solubilidade (D:S) do fármaco e do complexo de furosemida e HP- β -CD,

que é obtida dividindo a maior dose comercial do fármaco (mg) pela solubilidade (mg/mL) obtida no estudo, fornecendo unidades volumétricas (mL). A Equação 2.2 (Eq. 2.2) descreve a razão D:S e encontra-se descrita a seguir (United States, 2000):

$$D:S = \frac{D}{S} \text{ (Eq. 2.2)}$$

Em que:

D = Dose de 40 mg, refere-se a maior dose comercializada no país;

S = Solubilidade da furosemida no respectivo meio.

Os valores da razão D:S foram, então, comparados com os critérios estabelecidos pelo FDA para determinar se o fármaco é altamente solúvel ou não. Um fármaco é considerado altamente solúvel quando a razão D:S é inferior a 250 mL (United States, 2000).

2.3.4.4. Estudo de permeabilidade – PAMPA

O ensaio de permeabilidade por meio de membranas paralelas artificiais (*Parallel Artificial Membrane Permeation Assay* – PAMPA) foi executado, utilizando como compartimento receptor uma placa de 96 poços contendo, em cada poço, 300 µL de solução de tampão fosfato pH 7,4 (Reis, 2013; Reis *et al.*, 2013; Reis; Sinko; Serra, 2010). A solução de tampão fosfato pH 7,4 foi preparada conforme descrito na USP (2012). Como compartimento doador, empregou-se uma placa de 96 poços contendo um filtro hidrofóbico composto por polivinildifluorideno (PVDF) com 125 µm de espessura e tamanho de poro de 0,45 µm. Os fármacos objetos do presente ensaio foram: furosemida; complexo de furosemida e HP-β-CD; mistura física (MF) de furosemida e HP-β-CD; metoprolol (controle de alta permeabilidade) e ranitidina (controle de baixa permeabilidade). Estes fármacos em estudo foram diluídos até uma concentração de 250 µM em solução tampão fosfato pH 7,4, a partir de uma solução estoque a 20 mM em DMSO. Tanto as soluções estoque quanto as soluções diluídas dos fármacos foram preparadas no dia do uso. Foram

adicionados 300 μ L das soluções diluídas dos fármacos em solução tampão pH 7,4 em cada um dos 96 poços do compartimento doador (Reis, 2013).

Os filtros presentes no compartimento receptor foram impregnados com 5 μ L/poço. O processo de impregnação ocorreu a partir de um posicionamento perpendicular da ponteira no centro do filtro de PVDF, sem tocá-lo, com posterior deposição das soluções lipídicas. Logo após, as amostras foram observadas contra a luz, objetivando avaliar a aparência translúcida e uniforme dos filtros contendo a mistura lipídica. A composição da membrana era quanto à presença/ausência de colesterol e presença/ausência de fosfolípido negativamente carregado, aqui representado pelo fosfatidilinositol (PI). O solvente empregado na solubilização de todas as misturas lipídicas avaliadas foi o n-dodecano. A definição da composição lipídica empregada foi de 10% de fosfatidilcolina (PC) e 5 % de colesterol (CHO) em dodecano, p/v (Reis, 2013).

Antes do acoplamento das placas doadora e receptora, para a formação do sanduíche, foi realizada a leitura da placa doadora em UV-vis/fluorescência, sendo esta considerada, portanto, a placa referência. O sanduíche foi então formado e o tempo de incubação do sistema foi de 6 horas. A temperatura de incubação foi fixada em 37 °C e a agitação, quando presente, foi a 100 rpm com auxílio de agitador orbital do tipo *shaker*.

A umidade foi controlada com o auxílio de folhas de papel filtro levemente umedecidas, situadas no topo da placa receptora e sob a tampa. Adicionalmente, a umidade foi monitorada com o auxílio de termo-higrômetros presentes dentro da incubadora de placas. Após período de incubação, cerca de 150 μ L das soluções receptoras e doadoras, presentes em cada poço da placa, foram transferidos para diferentes placas de 96 poços transparentes e foram quantificadas sob espectro UV-vis, utilizando os seguintes comprimentos de onda: metoprolol (padrão de alta permeabilidade; λ = 270 nm), ranitidina (padrão de baixa permeabilidade; λ = 310 nm) e furosemida (fármaco a ser avaliado; λ = 280 nm). A Figura 2.1 é a representação esquemática do ensaio de permeabilidade por meio do PAMPA.

Figura 2.1. Esquematização do ensaio de permeabilidade utilizando a técnica de PAMPA.

Para o cálculo de permeabilidade efetiva (P_e) obtida dos ensaios de PAMPA (P_e) empregou-se a equação 2.3 (Eq. 2.3), descrita abaixo (Reis, 2013; Reis *et al.*, 2013; Reis; Sinko; Serra, 2010).

$$Pe = \frac{2,303 V_D}{A (t - \tau_{SS}) \cdot \varepsilon_a} \cdot \left(\frac{1}{1 + r_V} \right) \cdot \log_{10} \left[1 - \left(\frac{1 + r_V^{-1}}{1 - R_M} \right) \cdot \frac{C_A(t)}{C_D(0)} \right] \quad (\text{Eq. 2.3})$$

Em que:

r_V = Razão do volume dos compartimentos doador e receptor (V_D/V_A), em mL

A = área da membrana ($0,3 \text{ cm}^2$)

ε_a = porosidade aparente do filtro de PVDF (0,76) (Nielsen; Avdeef, 2004)

$C_D(0)$ = concentrações (mol/mL) das amostras presentes no compartimento doador no tempo $t = 0$

$C_A(t)$ = concentrações (mol/mL) das amostras presentes no compartimento receptor no tempo t (s)

τ_{SS} = Tempo de equilíbrio necessário para saturar a membrana com o soluto, estimado em $(54 R_M + 1) \cdot 60s$ (Reis, 2013; Reis *et al.*, 2013; Reis; Sinko; Serra, 2010; Chen, 2007; Avdeef, 2003; Ruell; Tsinman; Avdeef, 2003; Avdeef; Testa, 2002).

Além da P_e , foi também calculada a retenção dos fármacos na membrana (R_M), presente em valores de 0 a 11. A R_M corresponde à fração molar da amostra retida na membrana, e é definida em unidade mols (m) conforme a Equação 2.4 (Eq. 2.4).

$$R_M = 1 - \left(\frac{m_D(t)}{m_{D(0)}} \right) - \left(\frac{m_A(t)}{m_{D(0)}} \right) \text{ (Eq. 2.4)}$$

Para avaliar os resultados de diferentes amostras de furosemida (furosemida, MF de furosemida e HP- β -CD, complexo de furosemida e HP- β -CD); os valores permeabilidade efetiva foram submetidos à análise de variância em fator único (ANOVA), com o auxílio do programa Microsoft Excel 2010[®], para analisar diferenças significativas entre os mesmos e influência das variáveis avaliadas. O índice de significância utilizado foi $p < 0,05$ (Niazi, 2007).

2.3.5. Obtenção dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD

Para o preparo dos comprimidos matriciais contendo o complexo furosemida e HP- β -CD, as formulações foram desenvolvidas a partir do trabalho publicado por Spricigo (2006). Para tanto, empregou-se a hidroxipropilmetilcelulose K4M (HPMC K4M, Colorcon[®]) como agente formador de matriz, a celulose microcristalina (CM) como diluente e o estearato de magnésio (Est. Mg.) como lubrificante.

Com a finalidade de se obter produtos com perfis de dissolução distintos, foram desenvolvidas cinco formulações contendo diferentes concentrações de HPMC (30,0%; 20,0%; 17,5%; 15,0% e 10,0%), as quais foram designadas de A1, A2, A2a, A2b e A3, respectivamente. Os comprimidos matriciais foram produzidos com peso final de 500 mg, de maneira a conter 50 mg de furosemida. As composições percentuais destas formulações estão descritas na Tabela 2.1. Os comprimidos foram avaliados quanto ao aspecto físico, peso médio e dureza, segundo os métodos farmacopeicos (Farmacopeia Brasileira, 2010).

As quantidades dos componentes das formulações, descritas na Tabela 2.1, foram pesadas em balança analítica, para a produção de lotes de 75 g. Com exceção do estearato de magnésio, os componentes da formulação foram acondicionados em recipiente plástico de 0,5 L e homogeneizados

manualmente, por 10 minutos. Em seguida, tamisou-se a mistura em malha de 0,250 mm, de maneira a reduzir a agregação eletrostática. Adicionou-se, em seguida, o estearato de magnésio e procedeu-se com agitação por mais 5 minutos.

Tabela 2.1. Composição percentual das formulações dos comprimidos matriciais contendo os complexo de furosemida e HP- β -CD

Código	Porcentagem de contribuição dos componentes da formulação				
	HPMC K4M	Furosemida	HP- β -CD	Est. Mg.	CM
A1	30,0	10	55	0,5	4,5
A2	20,0	10	55	0,5	14,5
A2a	17,5	10	55	0,5	17,0
A2b	15,0	10	55	0,5	19,5
A3	10,0	10	55	0,5	24,5

HP- β -CD = Hidroxipropil- β -Ciclodextrina; Est. Mg. = Estearato de Magnésio; C.M. = Celulose Microcristalina. A1 = 30% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 4,5% C.M.; A2 = 20% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 14,5% C.M.; A3 = 10% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 24,5% C.M.

As misturas resultantes das formulações A1, A2, A2a, A2b e A3 foram comprimidas em prensa hidráulica Nova Ética com punção de 12 mm, com pressão de 500 psi por 1 minuto.

2.3.6. Caracterização física dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD

2.3.6.1. Peso médio

O peso médio foi determinado pelo cálculo da média aritmética de 20 comprimidos para cada formulação. Estes foram individualmente pesados em balança analítica. Adotou-se como critério de aceitação a variação máxima de

$\pm 5\%$, seguindo a especificação da 5ª edição da Farmacopeia Brasileira (2010).

2.3.6.2. Dureza

Para esta análise foram empregados 10 comprimidos de cada formulação, que foram avaliados em aparelho durômetro Nova Ética (Farmacopeia Brasileira, 2010). Como critério de aceitação adotou-se a dureza mínima de 3 kgf.

2.3.6.3. Friabilidade

A resistência ao choque e atrito dos comprimidos produzidos foi avaliada com friabiliômetro a 25 rpm por 4 minutos (Farmacopeia Brasileira, 2010). Para esta análise foram utilizados 20 comprimidos de cada formulação. Adotou-se como critério de aceitação perda máxima de 1,5 % de peso.

2.3.6.4. Teor de furosemida nos comprimidos

Para determinação do teor de furosemida nas formulações obtidas, trituraram-se os comprimidos em gral de porcelana, com o auxílio de pistilo, e quantidade equivalente à massa teórica de um comprimido foi pesado e transferido para um balão volumétrico de 100 mL, adicionando-se solução de hidróxido de sódio a 1M até completar o volume. A preparação foi então homogeneizada. Filtrou-se, transferiu-se 1 mL do filtrado para balão volumétrico de 50 mL e completado com o mesmo solvente. Preparou-se a solução padrão (10 µg/mL) nas mesmas condições da amostra. A quantificação do fármaco foi determinada por espectrofotometria de absorção UV-vis, em 271 nm (Farmacopeia Brasileira, 2010).

2.3.7. Avaliação do perfil de dissolução da furosemida nos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD

Os ensaios de dissolução foram realizados em equipamentos de dissolução adequadamente calibrados conforme especificações dos fabricantes. Nestes ensaios foram empregados os aparatos descritos na USP (2012): aparato II (pá) e aparato IV (*flow-cell*). As condições usadas nos testes realizados por 8 h estão descritas a seguir.

2.3.7.1. Dissolução com Aparato II (pá)

Seis réplicas de comprimidos de cada formulação desenvolvida (A1, A2, A2a, A2b e A3) foram submetidas ao ensaio de dissolução utilizando o aparato II, dissolutor Vankel, nas seguintes condições: 900 mL de meio de dissolução tampão fosfato 0,05M pH 6,8, degaseificado, preparado conforme descrito na USP (2012); temperatura mantida em $37 \pm 0,5$ °C; velocidade de agitação do aparato de 75 rpm; condução do ensaio por um período contínuo de 8 horas, sob condições *sink*, por conta da alta solubilidade do complexo de furosemida e HP- β -CD.

Alíquotas de 10 mL foram coletadas nos seguintes intervalos de tempo: 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300, 360, 420 e 480 minutos. A reposição do meio foi realizada imediatamente após a coleta das amostras. As amostras foram filtradas em membranas com poros de 0,45 μ m. A quantidade de fármaco dissolvida foi determinada na região do ultravioleta-vísivel (UV-vis), em comprimento de onda fixo de 276 nm, utilizando-se espectrofotômetro e cubeta de quartzo de 1 cm. As amostras foram devidamente diluídas, quando necessário, de maneira a contemplar o intervalo de linearidade do ensaio. O método de quantificação foi devidamente validado conforme descrito no item 2.3.9.

As concentrações do fármaco dissolvido foram calculadas a partir das absorbâncias determinadas e da curva analítica da furosemida. A porcentagem

de furosemida dissolvida nos diferentes intervalos foi calculada com a Equação 2.5 (Eq. 2.5):

$$\% \text{ dissolvida} = C \times Fd \times Vd \times 100/m \text{ (Eq. 2.5)}$$

Em que:

C = concentração do fármaco na solução de leitura (mg/mL)

Fd= fator de diluição das alíquotas (igual a 1 caso não haja diluição)

Vd= volume do meio de dissolução (mL)

m = massa do fármaco por amostra (mg)

Os perfis de dissolução da furosemida a partir dos comprimidos matriciais foram estabelecidos pela construção de curvas de porcentagem cumulativa de fármaco dissolvido em função do intervalo de tempo em minutos, com auxílio do programa Microsoft Excel[®].

2.3.7.2. Dissolução com Aparato IV (*Flow-cell*)

Das cinco formulações, foram selecionadas três delas (A1, A2a e A3) para serem submetidas ao ensaio de dissolução com emprego do Aparato IV. Seis réplicas de comprimidos de cada formulação desenvolvida (A1, A2a, e A3) foram submetidas ao ensaio de dissolução utilizando o aparato. O ensaio foi conduzido empregando o aparato IV, Dissolutor SOTAX CE7 Smart. Os meios de dissolução foram mantidos a 37 °C e foram bombeados para as células sob o fluxo de 8 mL/min. Como meios de dissolução foram empregados os sistemas convencionais, conforme segue: solução de HCl pH 1,2 nos primeiros 60 minutos; solução de meio acetato pH 4,5 nos 60 minutos seguintes e solução tampão fosfato pH 6,8 em até 8 horas do ensaio de dissolução. Os meios de dissolução foram preparados de acordo com a USP (2012). O equipamento é composto por degaseificador, que realiza tal procedimento quando vai utilizar o meio no ensaio. As alíquotas foram retiradas por coletor automático nos seguintes intervalos, conforme o esquema apresentado na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Programação do aparato IV (*Flow-cell*) considerando o meio de dissolução, intervalos de tempos de coleta e quantidade de meio recolhida e descartada

Meio de Dissolução	Período	Intervalos	Amostra recolhida	Amostra descartada
Tampão HCl pH 1,2	60 min	4 coletas de 15 min	50%	50%
Tampão acetato pH 4,5	60 min	2 coletas de 30 min	25%	75%
Tampão fosfato pH 6,8	120 min	4 coletas de 30 min	25%	75%
Tampão fosfato pH 6,8	240 min	4 coletas de 60 min	12,5%	87,5%

A quantidade de fármaco dissolvida foi determinada na região do ultravioleta-vísivel (UV-vis), em comprimento de onda fixo de 276 nm, utilizando-se equipamento espectrofotômetro e cubeta de quartzo. As amostras foram devidamente diluídas, quando necessário, de maneira a contemplar o intervalo de linearidade do método. O método de quantificação foi devidamente validado conforme descrito no item 2.3.9.

As concentrações do fármaco dissolvido foram calculadas a partir das absorbâncias determinadas e da curva analítica da furosemida. A porcentagem de furosemida dissolvida nos diferentes intervalos foi calculada com a equação 2.6 (Eq. 2.6):

$$\% \text{ dissolvida} = \frac{F \times I \times C}{2 \times Q} \times 100 \text{ (Eq. 2.6)}$$

Em que:

F = fluxo (ml/min)

I = intervalo (min)

C = Concentração (g/ml)

Q = Quantidade de fármaco (g)

Os perfis de dissolução da furosemida a partir dos comprimidos matriciais foram estabelecidos pela construção de curvas de porcentagem cumulativa de fármaco dissolvido *versus* o intervalo de tempo em minutos, com auxílio do programa Microsoft Excel®.

2.3.8. Avaliação da eficiência de dissolução da furosemida nos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP-β-CD

A eficiência de dissolução do fármaco (ED%) foi determinada pela razão entre a área sob a curva de dissolução entre os tempos 0 e 480 minutos (ASC_{0-480}), calculada empregando-se o método dos trapézios, e a área total do gráfico (superfície) definido pela ordenada (100% de dissolução) e pela abscissa ($t = 480$ minutos) (Serra; Storpirtis, 2008; Khan, 1975).

Os valores de ED da furosemida foram obtidos a partir das diferentes formulações, por meio do cálculo com a Equação 2.7 (Eq. 2.7):

$$ED = ASC / Atot. \times 100 \text{ (Eq. 2.7)}$$

Em que:

ED = eficiência de dissolução (%)

ASC = área sob a curva de dissolução no intervalo de tempo avaliado calculado pelo método dos trapezóides

Atot = área total do gráfico (superfície) definido pela ordenada e abscissa

Os valores de ED% foram submetidos à análise de variância em fator único (ANOVA), com o auxílio do programa Microsoft Excel 2010®, para avaliar a existência de diferenças significativas entre os mesmos e a influência das variáveis avaliadas. O índice de significância utilizado foi $p < 0,05$ (Niazi, 2007). A ANOVA foi utilizada para confirmar se havia diferenças estatisticamente significativas. As análises foram feitas comparando duas formulações entre si, avaliando todas as combinações possíveis, gerando 10 análises para o ensaio

de dissolução empregando o aparato II e 3 análises para o ensaio de dissolução empregando o aparato IV.

2.3.9. Validação do método analítico espectrofotométrico

A espectrofotometria de absorção no UV-vis é um método útil na identificação de fármacos e oferece precisão adequada para medidas quantitativas destes tanto da matéria-prima quanto para as FFs. Além disso, é um método simples, de baixo custo e fácil execução (Watson, 1999).

A validação foi conduzida de acordo com a Resolução RE n° 899/2003 da ANVISA. Os parâmetros de validação utilizados foram: especificidade, linearidade, precisão e exatidão intra e interensaios (ICH, 2005, Brasil, 2003a).

2.3.9.1. Preparo de Soluções Padrão

Foram utilizados na validação do método os meios: água destilada e as soluções tampão, preparadas conforme detalhado na USP (2012), meio HCl pH 1,2, tampão acetato pH 4,5; tampão fosfato pH 6,8 e pH 7,5.

Foi preparada uma solução estoque de 200 µg/mL em metanol, a partir do padrão de furosemida. Esta solução foi armazenada em frasco âmbar em freezer a -20 °C. A partir desta solução estoque, foram feitas as respectivas diluições, nos diferentes meios em que o método foi validado, para a obtenção das seguintes concentrações: 2, 6, 10, 15 e 20 µg/mL.

2.3.9.2. Condições para Análise no Espectrofotômetro UV-vis

Os espectros de absorção de furosemida foram obtidos a partir das leituras das absorbâncias das soluções contendo o fármaco na faixa de 200 - 500 nm, em espectrofotômetro UV-vis. Conforme descrito no item 2.3.9.1, as soluções analisadas foram preparadas com o fármaco e os seguintes meios de

dissolução: água; soluções tampão de HCl pH 1,2; acetato pH 4,5; fosfato pH 6,8 e pH 7,5. Foi utilizada cubeta de quartzo com 10 mm de comprimento e os tampões acima descritos como branco.

2.3.9.3. Parâmetros avaliados na validação do método

2.3.9.3.1. Especificidade

Os meios, que são selecionados para simular a variação de pH do TGI, foram utilizados no ensaio de solubilidade e dissolução. Estes meios foram avaliados por varredura com comprimentos de onda variando entre 200 e 500 nm, com a finalidade de garantir que o método analítico não sofria interferências dos componentes que estão presentes nos meios avaliados.

2.3.9.3.2. Linearidade

A linearidade indica que a faixa de concentração do fármaco em respostas obtidas pela metodologia são diretamente proporcionais à quantidade de fármaco presente na amostra (USP, 2012; ICH, 2005; Brasil, 2003a).

A curva analítica foi obtida no intervalo de 2 a 20 µg/mL e a equação da reta por regressão linear, através do método dos mínimos quadrados (Brasil, 2003a).

2.3.9.3.3. Precisão

A repetibilidade do método foi determinada por meio dos resultados encontrados a partir da análise de amostras em três concentrações diferentes em triplicata por concentração (ICH, 2005; Brasil, 2003a), conforme a Equação 2.8 (Eq. 2.8):

$$CV (\%) = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Média}} \times 100 \text{ (Eq. 2.8)}$$

As análises foram feitas comparando-se os resultados obtidos em um mesmo dia (precisão intradia) e em dias diferentes (precisão interdias).

2.3.9.3.4. Exatidão

A exatidão é definida como a proximidade entre os resultados obtidos no método proposto e o valor real, podendo ser expressa em termos de porcentagem em relação a concentração determinada (USP, 2012; ICH, 2005; Brasil, 2003a).

Este parâmetro foi determinado pela análise de três concentrações diferentes em triplicata em um mesmo dia (exatidão intradia) ou em dias distintos (exatidão interdia), e calculando utilizando a Equação 2.9 (Eq. 2.9):

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{Concentração média determinada}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \text{ (Eq. 2.9)}$$

2.4. Resultados e discussão

2.4.1. Caracterização dos complexo de furosemida e HP-β-CD

2.4.1.1. Teor

A Tabela 2.3 sumariza os resultados de teor de furosemida obtidos a partir da matéria-prima e para o complexo de furosemida e HP-β-CD, obtido conforme descrito no item 2.3.3. Os valores foram obtidos a partir de triplicatas.

Tabela 2.3. Valores médios de teor de furosemida obtidos para a matéria-prima e para o complexo de furosemida e HP- β -CD obtido conforme descrito no item 2.3.3

Produto	Teor médio (%)	DP	Precisão
Furosemida (matéria-prima)	99,95	1,80	1,99
Complexo furosemida e HP- β -CD	101,15	0,13	0,12

DP = desvio-padrão (n=3); HP- β -CD = hidroxipropil- β -ciclodextrina.

O teor para a matéria-prima estava dentro da especificação farmacopéica de 98 a 101% (Farmacopeia Brasileira, 2010). Já no caso do complexo de furosemida e HP- β -CD, o teste de teor indica o quanto o processo foi eficiente, desta maneira, pode se observar que não houve perdas.

2.4.1.2. Ensaios termoanalíticos

A análise térmica abrange um grupo de técnicas, onde uma propriedade física de uma substância e/ou seus produtos é mensurada em função da temperatura ou do tempo, sendo essa substância submetida a uma programação de temperatura controlada (Wendlant, 1986).

Dentre as técnicas, as mais empregadas são a calorimetria exploratória diferencial (DSC), a termogravimetria (TG), a análise térmica diferencial (DTA), a análise termomecânica (TMA) e a análise dinâmico-mecânica (DMA) (Wendlant, 1986).

No presente trabalho, com o objetivo de caracterizar o comportamento térmico do complexo de furosemida e HP- β -CD, frente à furosemida e a HP- β -CD puros, foram empregadas a DSC e a TG.

A DSC é a técnica pela qual se mede a diferença de energia fornecida à substância e a um material de referência, termicamente inerte, em função da temperatura, enquanto a substância e a referência são submetidas a uma programação controlada de temperatura (Matos; Mercuri; Barros, 2009).

Já a TG é a técnica de análise térmica na qual a variação de massa do analito, perda ou ganho de massa, é definida em função da temperatura e/ou tempo, à medida que a amostra é submetida a uma programação controlada da temperatura (Giolito; Ionashiro, 1988). Essa técnica, portanto, permite avaliar a estabilidade térmica da amostra e acompanhar o andamento de reações de oxidação, desidratação, combustão e decomposição (Matos; Mercuri; Barros, 2009).

Na Figura 2.2 estão apresentadas as curvas DSC, obtidas sob as condições descritas no item 2.3.4.2.1, referentes à furosemida (matéria-prima), HP- β -CD e amostras do complexo furosemida e HP- β -CD (Amostras 1, 2 e 3 – diferentes lotes de produto liofilizado), obtidos conforme descrito no item 2.3.3. Na Figura 2.3 estão apresentadas as curvas TG, obtidas conforme condições detalhadas no item 2.3.4.2.2, também referentes à furosemida, HP- β -CD e amostras de complexo de furosemida e HP- β -CD (Amostras 1, 2 e 3 – diferentes lotes de produto liofilizado), obtidos conforme descrito no item 2.3.3.

Na Figura 2.2, é apresentada a curva DSC da furosemida, a HP- β -CD e do complexo de furosemida e HP- β -CD. A furosemida expressa um evento endotérmico, com pico fino, bem definido, em torno de 225 °C. Esse tipo de evento bem delimitado é característico da fusão. Por volta de 235 °C, dois eventos exotérmicos, são notados, e correspondem à decomposição do fármaco (Spricigo *et al.*, 2008; Spricigo, 2006; Spamer *et al.*, 2002; Özdemir; Ordu, 1998).

Figura 2.2. Curvas termoanalíticas de DSC referente à furosemida, HP- β -CD e amostras do complexo de furosemida e HP- β -CD (amostras 1, 2 e 3) obtido conforme descrito no item 2.3.3 por liofilização em quantidades equimolares, obtidos sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL/min) e razão de aquecimento de 20 °C/min.

Quando se avalia a curva TG da furosemida, ilustrada na Figura 2.3, percebe-se que por volta de 225 °C, onde ocorre a fusão, não há perda de massa. Isto por que uma substância quando sofre um processo de fusão, ocorre apenas uma mudança física, sem alteração da massa, corroborando, assim com o resultado da curva DSC. A partir dessa temperatura, ainda na curva TG, ocorre uma perda gradativa de massa, totalizando em cerca de 70%, que corresponde à degradação do fármaco (Matos; Mercuri; Barros, 2009).

Figura 2.3. Curvas termoanalíticas de TG referente à furosemida, HP- β -CD e amostras do complexo de furosemida e HP- β -CD (Amostras 1, 2, 3) obtido conforme descrito no item 2.3.3 por liofilização em quantidades equimolares, obtidos sob atmosfera dinâmica de N_2 (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.

Retomando a curva DSC, e ao avaliar a HP- β -CD, não foram registrados picos bem definidos. Na verdade, os eventos foram mais sutis, endotérmicos, e largos, que se apresentaram por volta de 60, 125, 160, 200 e 250 °C. Entre 60 e 125 °C, os eventos correspondem à desidratação da HP- β -CD, que foi evidenciado quando na curva TG. Na mesma faixa de temperatura, ocorreu uma pequena perda de massa, que condiz com a perda de água (Takahashi, 2009; Spricigo *et al.*, 2008; Spricigo, 2006). Na curva TG da HP- β -CD, o segundo evento ocorre entre as temperaturas de 350 e 400 °C, mais acentuado, bem definido e corresponde à degradação do composto, levando a uma perda de massa quase total (Trotta; Zanetti; Camino, 2000).

Na curva DSC dos complexo furosemida e HP- β -CD, percebeu-se que seu comportamento é bem distinto da furosemida e da HP- β -CD puras, indicando a interação entre as substâncias e, demonstrando a formação do

complexo de inclusão, o que resulta em uma proteção do fármaco pela macromolécula de HP- β -CD (Giordano; Novak; Moyano, 2001). Já na curva TG das amostras do complexo, também se verificou um comportamento semelhante entre elas, porém distinto dos produtos de partida (furosemida e HP- β -CD), o qual corrobora com o resultado da inclusão da furosemida na HP- β -CD. Além disso, ainda na curva TG das amostras do complexo, nota-se que houve um deslocamento da temperatura.

De fato, a furosemida inicia o processo de decomposição por volta de 235 °C, porém, quando se analisa as amostras do complexo, verifica-se que a temperatura para esse processo inicia em torno de 350 °C para as amostras 2 e 3, e 375 °C para a amostra 1. Isso indica que o complexo de furosemida e HP- β -CD garantiu uma maior estabilidade térmica ao fármaco, o que corrobora com a sua inclusão, pois a HP- β -CD protegeu o fármaco do processo de degradação (Giordano; Novak; Moyano, 2001).

Resultados semelhantes também foram observados por outros pesquisadores que trabalharam com a furosemida e com diferentes CDs (Spricigo *et al.*, 2008; Spricigo, 2006; Spamer *et al.*, 2002; Ózdemir; Ordu, 1998).

Observando as curvas de DSC e TG, nota-se comportamento distintos entre o fármaco e a HP- β -CD puros e o complexo de furosemida e HP- β -CD. Portanto, os resultados do estudo termoanalítico sugerem a formação de complexo de inclusão entre a furosemida e a HP- β -CD nos produtos obtidos por liofilização.

2.4.1.3. Estudo de Solubilidade

Do ponto de vista biofarmacotécnico, o termo solubilidade indica a quantidade de um dado soluto que pode ser dissolvida em um volume especificado de solvente aquoso (Pereira, 2011; Dezani, 2010). Este parâmetro é um fator determinante para a liberação do fármaco e também para sua absorção, portanto, tem um papel importante na BD. Para que o fármaco possa ser absorvido ele tem que estar na forma de solução aquosa no sítio de absorção, não importando o mecanismo de absorção (Bonamici, 2009).

Soluções tampão descritas na USP (2012) são consideradas apropriadas para o uso em ensaios de solubilidade pelo método saturação em *shake-flask* (método do equilíbrio) a 37 °C (United States, 2000).

O número de diferentes faixas de pH a serem testados depende das características de ionização do fármaco e de seu pKa. Por exemplo, se o pKa do fármaco variar na faixa de 3 a 5, a solubilidade deverá ser determinada em: pH = pKa, pH = pKa – 1, pH = pKa + 1 e nos pH = 1,0 a 7,5, devendo ser realizado em triplicatas, sendo o pH verificado após a adição do fármaco na solução tampão (United States, 2000).

Conforme apresentado na Tabela 2.4 e Figura 2.4, a furosemida, que é um ácido fraco, apresentou baixa solubilidade na água e em meios com pH abaixo ou próximos ao pKa do fármaco (pKa = 3,9) (Merck Index, 1996) o que determinou valores da razão dose/solubilidade maiores do que 250 mL. Em meios cujos pHs são básicos, a furosemida apresentou alta solubilidade e a razão dose/solubilidade foi menor do que 250 mL. Tal fato foi observado, uma vez que em meios no qual pH está abaixo ou próximo do pKa do fármaco, as moléculas estão menos ionizadas em relação aos meios em que o pH é maior do que o pKa do fármaco. Portanto, a furosemida apresenta solubilidade pH-dependente com o aumento do pH, conforme observado por outros autores (Granero *et al.*, 2010).

De acordo com o guia do FDA (United States, 2000), o critério de solubilidade definido para classificar um fármaco como altamente solúvel requer que a dose mais alta comercializada do fármaco seja solúvel em um volume igual ou menor que 250 mL de uma solução aquosa com pH na faixa de 1,0 – 7,5, na temperatura de 37 °C ± 1 °C. Portanto, conforme preconizado pelo guia do FDA (United States, 2000) e, de acordo com o Sistema de classificação biofarmacêutica (SCB), proposto por Amidon e colaboradores (1995) que classifica os fármacos em quatro classes (I - alta solubilidade/alta permeabilidade; II - baixa solubilidade/alta permeabilidade; III - alta solubilidade/baixa permeabilidade e IV - baixa solubilidade/baixa permeabilidade), os resultados de solubilidade e de razão dose/solubilidade permitem classificar a furosemida como um fármaco de baixa solubilidade,

podendo este pertencer às classes II ou IV, dependendo de suas características de permeabilidade.

Tabela 2.4. Valores de solubilidade e a respectiva relação dose/solubilidade (dose = 40 mg) para a furosemida e o complexo de furosemida e HP- β -CD, obtidos por meio do estudo de solubilidade em diferentes meios, sob temperatura de 37,0°C e após 72 horas de agitação. Os resultados de solubilidade foram comparados e expressos em incremento de solubilidade

Meio	Furosemida			Complexo furosemida - HP- β -CD			Incremento de solubilidade
	Solubilidade (mg/mL)	DP	dose/ solubilidade (mL)	Solubilidade (mg/mL)	DP	dose/ solubilidade (mL)	
Água (pH 5,5)	0,044	0,004	908,959	>38,402	1,212	>1,042	x873,0
Tampão HCl pH 1,2	0,024	0,002	1653,169	0,056	0,004	706,546	x2,3
Tampão Acetato pH 4,5	0,112	0,008	358,399	33,144	0,968	1,207	x29,5
Tampão fosfato pH 6,8	6,775	0,515	5,904	>38,402	1,186	>1,042	x5,5
Tampão fosfato pH 7,5	12,686	1,102	3,153	>38,402	1,256	>1,042	x3,0

DP = Desvio Padrão (n=3).

Figura 2.4. Solubilidade da furosemida e do complexo de furosemida e HP-β-CD em meios com diferentes pHs, sob a temperatura de 37,0 °C e após agitação por 72 horas com emprego da técnica de *Shake Flask*. Os valores representam média de três determinações.

A Tabela 2.4 e Figura 2.4 apresentam os resultados de solubilidade para a furosemida a partir do complexo de furosemida e HP- β -CD. Em meios cujo pH está abaixo ou próximo ao valor de pKa do fármaco, observou-se que a furosemida apresentou solubilidade menor, mesmo no complexo de furosemida e HP- β -CD. Já em pHs acima do pKa e em água, o complexo apresentou alta solubilidade. Ou seja, nestas amostras do complexo de furosemida e HP- β -CD, o fármaco apresentou baixa solubilidade apenas para o meio ácido (meio HCl pH 1,2), portanto, a razão dose/solubilidade para este meio foi maior do que 250 mL. Por outro lado, nos demais meios (água, soluções tampão acetato pH 4,5, tampão fosfato pHs 6,8 e 7,5), observou-se maior solubilidade do fármaco e as razões dose/solubilidade apresentaram valores menores do que 250 mL. Em função desta característica de maior solubilidade não foi possível saturar os meios constituídos por água e soluções tampão fosfato nos pHs 6,8 e 7,5, com as amostras de complexo de furosemida e HP- β -CD.

Um comparativo entre os valores de solubilidade da furosemida e do complexo de furosemida e HP- β -CD está detalhado na Tabela 2.4. Tais resultados indicam que houve um incremento da solubilidade da furosemida no complexo de furosemida e HP- β -CD, em relação aos valores para o fármaco isolado. Tal fato foi evidenciado em todos os meios de solubilização empregados neste estudo. Este aumento da solubilidade foi de 2,3 a 873 vezes, dependendo do meio testado, quando foram comparados a furosemida (fármaco isolado) e complexo de furosemida e HP- β -CD. Portanto, a partir dos resultados de solubilidade e da razão dose/solubilidade, obtidos em conformidade com o FDA (United States, 2000) e com o proposto por Amidon e colaboradores (1995), concluiu-se que apesar da melhora no parâmetro de solubilidade, a complexação da furosemida à HP- β -CD, não foi capaz de permitir a mudança de classificação do fármaco segundo o SCB. Portanto, a furosemida, mesmo em complexo com a HP- β -CD continua comportando-se como um fármaco de baixa solubilidade, podendo ser classificado como pertencente à classe II ou IV.

2.4.1.4. Estudo de permeabilidade – PAMPA

O PAMPA é uma técnica simples, rápida e reprodutível (Reis, 2013; Reis *et al.*, 2013; Reis, Sinko, Serra, 2010; Avdeef; Testa, 2002) e por isso foi selecionada para avaliar a influência da HP- β -CD através da permeabilidade da furosemida.

O ensaio de permeabilidade foi conduzido de acordo com o descrito no item 2.3.4.4. A membrana escolhida, 10% de PC e 5% de CHO, foi baseada na composição da membrana fisiológica (Reis, 2013; Brasitus; Dudeja, 1985; Proulx, 1981). O experimento foi composto por metoprolol (padrão de alta permeabilidade); ranitidina (padrão de baixa permeabilidade); furosemida; furosemida e HP- β -CD em uma mistura física (MF) e o complexo de furosemida e HP- β -CD. Na Tabela 2.5 e na Figura 2.5 estão apresentados os resultados de permeabilidade efetiva obtidos por meio do método de PAMPA.

Tabela 2.5. Valores médios de permeabilidade efetiva em função do gradiente de pH e valores de desvio padrão (DP) dos resultados. Os valores de permeabilidade estão expressos em $\cdot 10^{-6}$ cm/s

Compartimento receptor (pH)	FR		FR – HP- β -CD (MF)		Complexo FR e HP- β -CD		Ranitidina		Metoprolol	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
7,4	0,302	0,03	0,265	0,16	0,287	0,21	3,022	0,53	40,621	2,00

DP = Desvio padrão (n= 3); FR = furosemida; HP- β -CD = hidroxipropil- β -ciclodextrina; MF = mistura física

Figura 2.5. Permeabilidade efetiva (*10⁻⁶ cm/s) dos fármacos metoprolol, ranitidina, furosemida, mistura física (MF) de furosemida e HP-β-CD, e complexo de furosemida e HP-β-CD (obtida por liofilização) utilizando pH 7,4 no compartimento doador.

De acordo com os resultados, as amostras de furosemida apresentaram baixa permeabilidade, uma vez que os valores obtidos ficaram abaixo dos valores do padrão de baixa permeabilidade (ranitidina). Os resultados aqui obtidos são compatíveis proporcionalmente aos dados de permeabilidade efetiva ($Pe \pm DP$, *10⁻⁶cm/s) apresentados por Avdeef (2003): metoprolol ($2,0 \pm 0,7$), ranitidina ($0,04 \pm 0,01$) e furosemida ($0,002 \pm 0,005$).

Com o intuito de avaliar se houve diferenças entre as amostras de furosemida resultantes da influência da HP-β-CD, os valores de permeabilidade foram submetidos à análise estatística ANOVA e estão apresentados na Tabela 2.6.

Tabela 2.6. Influência da HP- β -CD na permeabilidade da furosemida. Os valores de permeabilidade estão expressos em $\cdot 10^{-6}$ cm/s

	FR	FR- HP- β -CD (MF)	Resultado	Valor-p
	0,302 $\pm$ 0,03	0,265 $\pm$ 0,16	Semelhante	0,598832
	FR	Complexo FR - HP-β-CD		
Pe $\pm$ DP	0,302 $\pm$ 0,03	0,287 $\pm$ 0,21	Semelhante	0,776079
	FR- HP-β-CD (MF)	Complexo FR - HP-β-CD		
	0,265 $\pm$ 0,16	0,287 $\pm$ 0,21	Semelhante	0,618984

p = índice de significância ANOVA – fator único; DP = desvio-padrão da média (n=3). Pe = Permeabilidade efetiva; FR= furosemida; HP- β -CD = Hidroxipropil- β -ciclodextrina; MF = mistura física.

A partir dos resultados da análise estatística por ANOVA, nota-se que não houve diferenças entre a permeabilidade das diversas amostras de furosemida (furosemida; furosemida e HP- β -CD em uma MF e o complexo de furosemida e HP- β -CD). Portanto, essa técnica sugere que a complexação da furosemida e HP- β -CD não altera a permeabilidade do fármaco. Entretanto, cabe lembrar que a técnica PAMPA é indicada, sobretudo, para fármacos cuja permeação se dá por difusão passiva através da membrana dos enterócitos, de forma que este método pode subestimar a absorção de compostos que são transportados ativamente, ou ainda que utilizem outros mecanismos para permear (Balimane; Han; Chong, 2005). A absorção da furosemida no TGI ocorre nas porções superiores do intestino delgado, por transporte paracelular. Estudos têm relatado que a furosemida é substrato de proteínas de efluxo (Al-mohizea, 2010; Granero *et al.*, 2010). Por estas razões sugere-se o estudo do fármaco e do complexo por outras técnicas de avaliação da permeabilidade com o intuito de complementar os resultados obtidos no presente trabalho.

2.4.2. Caracterização dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD

A furosemida é um potente diurético de alça usado nos tratamentos de estados edematosos associados com problemas cardíacos, renais e hepáticos, e para o tratamento de hipertensão. Entretanto, este fármaco apresenta meia-vida curta variando de 30 a 120 minutos (Ponto; Schoenwald, 1990). Por conta da meia-vida curta, a furosemida é um potencial candidato para o desenvolvimento de formulações de liberação modificada, de modo a diminuir o número de administrações diárias, aumentar eficácia e adesão ao tratamento (Spricigo, 2006; Hylander *et al.*, 1987; Verhoeven *et al.*, 1988; Ebihara; Tawara; Oka, 1983).

Os comprimidos foram adequadamente obtidos por compressão direta e foram submetidos aos testes físico-químicos de acordo com o preconizado pela 5ª edição da Farmacopeia Brasileira (2010) para verificar os parâmetros indicados para estas formulações.

A Tabela 2.7 sumariza os resultados dos ensaios de peso médio e dureza dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD.

Tabela 2.7. Valores médios do peso e dureza dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD

Código	Peso Médio (mg) $\pm$ DP	Dureza (kgf) $\pm$ DP	Friabilidade (%)
A1	506,97 $\pm$ 0,40	4,33 $\pm$ 0,29	0,38
A2	507,47 $\pm$ 0,35	4,17 $\pm$ 0,29	0,57
A2a	509,30 $\pm$ 0,30	4,07 $\pm$ 0,99	0,29
A2b	509,40 $\pm$ 0,20	3,15 $\pm$ 0,89	0,50
A3	507,10 $\pm$ 0,26	3,67 $\pm$ 0,29	0,49

DP = Desvio Padrão, n = dez comprimidos (dureza) e 20 comprimidos (peso médio e friabilidade). HP- β -CD = hidropil- β -ciclodextrina. A1 = 30% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 4,5% C.M.; A2 = 20% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 14,5% C.M.; A2a = 17,5% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 17% C.M.; A2b = 15% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 19,5% C.M.; A3 = 10% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 24,5% C.M.

Os valores obtidos no teste de dureza foram superiores às recomendações da Farmacopeia Brasileira (2010), sendo o mínimo aceitável uma dureza de 30 N (aproximadamente 3 kgf). Em relação à friabilidade, os valores obtidos para os comprimidos estão dentro dos padrões descritos na Farmacopeia Brasileira (2010), que considera aceitável comprimidos com perda igual ou inferior a 1,5% do seu peso.

A Tabela 2.8 sumariza os resultados de teor de furosemida determinado nos comprimidos obtidos, conforme descrito no item 2.3.6.4.

Tabela 2.8. Teor de furosemida nos comprimidos das formulações A1, A2a e A3

Formulação	Teor médio (%)	DP
A1	104,26	0,22
A2a	104,80	0,12
A3	96,55	0,84

DP = desvio-padrão; HP- β -CD = Hidroxipropil- β -Ciclodextrina; A1 = 30% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 4,5% C.M.; A2a = 17,5% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 17% C.M.; A3 = 10% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 24,5% C.M.

Conforme os valores apresentados na Tabela 2.8, observa-se que as três formulações de comprimidos apresentaram teor de furosemida dentro dos limites aceitáveis propostos pela Farmacopeia Brasileira (2010) (90 a 110%).

Os produtos obtidos por liofilização apresentam aparentemente características de um produto com baixa fluidez e densidade reduzida, gerando uma dificuldade no preenchimento da matriz em máquinas de compressão para obtenção de comprimidos. Em razão disso, optou-se por realizar a compressão com emprego de prensa manual visto que os ganhos obtidos com este produto eram positivos, isto por conta das características do complexo que melhoram a dissolução e proporcionam a obtenção de um perfil de dissolução pH-independente (Spricigo *et al.*, 2008; Spricigo, 2006).

Os ensaios físicos com os comprimidos demonstram que o método de compressão, quando aplicado às formulações testadas, permite obter comprimidos com peso médio, dureza, friabilidade e teor do fármaco dentro das exigências estabelecidas pela Farmacopeia Brasileira (2010).

2.4.3. Avaliação do perfil de dissolução da furosemida nos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD

O ensaio de dissolução é de fundamental importância para a indústria farmacêutica, sendo que as principais aplicações são: controle de qualidade de produtos farmacêuticos, equivalência farmacêutica, desenvolvimento de novas FFs e estudos de bioisenção por meio de correlação *in vitro* – *in vivo* (CIVIV) ou considerando o SCB. Portanto, esta ferramenta apresenta elevada relevância no fornecimento de indícios do comportamento do fármaco *in vivo* (Qiu *et al.*, 2009; Serra; Storpirtis, 2007; Baptista; Volpato, 2007, Cardot; Beyssac; Alric, 2007; Emami, 2006; de la Penã *et al.*, 2003).

Os métodos adotados para o estudo de dissolução *in vitro*, devem ser preditivos, constituindo de modelos experimentais capazes de refletir com fidedignidade as condições *in vivo*, especialmente aquelas que podem afetar a velocidade de dissolução e por conseguinte a BD dos fármacos (Cardot; Beyssac; Alric, 2007; Serra; Storpirtis, 2007; Emami, 2006).

Para um adequado desenvolvimento da condição do estudo de dissolução, avaliou-se as características do fármaco. A furosemida é um ácido fraco ($pK_a = 3,9$), portanto apresenta baixa solubilidade em meios com pHs próximos ou abaixo do pK_a , como verificado nos resultados do ensaio de solubilidade (apresentado no item 2.4.1.3) (Granero *et al.*, 2010). Por esta razão, optou-se por empregar 900 mL de solução tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução no aparato II, a fim de manter as condições *sink* durante todo o ensaio.

A definição dos pontos de coleta empregados nos ensaios com o aparato II foi baseada nas características do fármaco (Granero *et al.*, 2010), das formulações de comprimidos matriciais de furosemida (Spricigo, 2006) e nos tempos de coleta do estudo clínico, pois estes são fundamentais no estabelecimento da CIVIV entre pontos analisados e evitando-se o uso de concentrações extrapoladas.

Na Tabela 2.9 e Figura 2.6 estão descritos os resultados referentes aos ensaios de dissolução a partir dos comprimidos matriciais contendo 50 mg de

fármaco em complexo de furosemida e HP- β -CD empregando-se o aparato II. Conforme apresentado anteriormente, os comprimidos foram obtidos por compressão direta com diferentes porcentagens de HPMC (30%; 20%; 17,5%; 15% ou 10%) e designados de A1, A2, A2a, A2b e A3, respectivamente (descritos na Tabela 2.1). O ensaio de dissolução foi conduzido conforme detalhado no item 2.3.7.1. Os resultados encontrados demonstraram diferenças entre os perfis de dissolução das cinco formulações (A1, A2, A2a, A2b e A3).

Tabela 2.9. Porcentagem de furosemida dissolvida em função do tempo, em meio tampão fosfato 0,05 M, pH 6,8, com emprego do aparato II a 75 rpm, a partir dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD, obtidos com diferentes porcentagens de HPMC (30%; 20%; 17,5%; 15% e 10%) e designados de A1, A2, A2a, A2b e A3, respectivamente, em meio tampão fosfato 0,05 M, pH 6,8, aparato II, 75 rpm

Tempo	A1	A2	A2a	A2b	A3
	% dissolvida				
0	0	0	0	0	0
15	8,02	15,15	25,29	44,40	76,70
30	12,22	18,07	29,77	50,13	80,89
45	14,40	19,17	33,92	56,26	84,91
60	15,07	20,40	36,67	60,68	89,03
90	15,24	24,13	47,83	68,51	90,56
120	16,16	27,12	49,25	71,69	92,88
150	18,20	30,99	52,52	79,74	96,52
180	25,54	33,34	58,19	82,81	97,20
210	30,12	36,72	60,74	85,97	99,65
240	33,39	38,26	63,96	88,40	101,07
300	35,36	40,07	69,36	90,58	102,76
360	36,18	40,86	78,91	94,22	104,25
420	38,31	44,14	89,48	96,08	105,68
480	40,48	50,98	93,04	99,08	105,94

Os resultados representam os valores médios obtidos a partir da avaliação de 6 comprimidos. HP- β -CD = hidroxipropil- β -ciclodextrina. A1 = 30% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 4,5% C.M.; A2 = 20% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 14,5% C.M.; A2a = 17,5% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 17% C.M.; A2b = 15% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 19,5% C.M.; A3 = 10% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 24,5% C.M.

Figura 2.6. Perfis de dissolução em função do tempo, em meio tampão fosfato 0,05 M, pH 6,8, com o emprego de aparato II a 75 rpm, a partir dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD obtidos com diferentes porcentagens de HPMC (30%; 20%; 17,5% 15% e 10%) e designados de A1, A2, A2a, A2b e A3, respectivamente. A1 = 30% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 4,5% C.M.; A2 = 20% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 14,5% C.M.; A2a = 17,5% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 17% C.M.; A2b = 15% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 19,5% C.M.; A3 = 10% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 24,5% C.M.

Foram desenvolvidas, inicialmente, três formulações (A1, A2 e A3) contendo diferentes proporções de HPMC (30%, 20% e 10%, respectivamente). Observando os resultados destas três formulações, na Tabela 2.9 e Figura 2.6, nota-se que a formulação A2 (50,98%) apresentou valores de porcentagem de dissolução próximos aos obtidos para a formulação A1 (40,48%), enquanto a formulação A3 apresentou maior porcentagem de dissolução (105,94%). Em decorrência destes resultados, foram desenvolvidas mais duas formulações contendo 17,5% e 15,0% de

HPMC e estas foram denominadas A2a e A2b, respectivamente. O objetivo destas alterações era diferenciar ainda mais os perfis de dissolução. Comparando os resultados obtidos a partir das cinco formulações (A1, A2, A2a, A2b e A3), evidencia-se que o perfil de dissolução para a formulação A2b (99,08%) foi muito próximo ao obtido para a formulação A3, e o perfil da A2a (93,04%) ficou intermediário aos obtidos para as formulações A1 e A3.

Assim, foram selecionadas as formulações que apresentaram perfis de dissolução mais distintos (A1, A2a e A3), com o emprego do aparato II, para serem submetidas ao estudo de dissolução com o aparato IV. O emprego deste aparato teve como finalidade a obtenção de perfil de dissolução *in vitro* mais fidedigno às condições *in vivo*, ou seja, à dissolução *in vivo*, uma vez que permite a realização de um ensaio com gradiente de pH (Emara; El-Menshaw; Estefan, 2000). Desta maneira, pretendeu-se obter resultados que pudessem agregar informações quanto ao comportamento das formulações.

Para um adequado desenvolvimento da condição do estudo de dissolução empregando um gradiente de pH no aparato IV, avaliou-se os meios escolhidos baseados na variação de pH do TGI e em trabalhos publicados na literatura (Fotaki *et al.*, 2009; Spricigo, 2006; Emara; El-Menshaw; Estefan, 2000). O fluxo escolhido para representar as condições do TGI foi de 8,0 mL/min empregando esferas de vidro para que não houvesse turbulência excessiva no sistema (Fotaki, *et al.*, 2009; Emara; El-Menshaw; Estefan, 2000).

Na Tabela 2.12 e Figura 2.8 estão apresentados os resultados referentes aos ensaios de dissolução realizados com o aparato IV a partir dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD. As formulações foram obtidas contendo diferentes porcentagens de HPMC (30%; 17,5% e 10%) e designados de A1, A2a e A3, respectivamente (conforme descrito na Tabela 2.1). O experimento foi realizado como detalhado no item 2.3.7.2.

Tabela 2.10. Porcentagem de furosemida dissolvida em função do tempo a partir dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD obtidos com diferentes porcentagens de HPMC (30%; 17,5% e 10%) e designados de A1, A2a e A3, respectivamente, em experimento empregando o aparato IV, fluxo de 8 mL/min e gradiente de pH como apresentado a seguir: solução de HCl pH 1,2 nos primeiros 60 minutos, solução de meio acetato pH 4,5 nos 60 minutos seguintes e sistema tampão fosfato pH 6,8 em até 8 horas de estudo (esquematizado na Tabela 2.2)

Tempo	A1	A2a	A3
	% dissolvida		
0-15	2,75	9,04	14,03
15-30	5,66	10,69	28,53
30-45	7,53	15,28	38,43
45-60	9,04	20,91	45,21
60-90	13,35	30,47	56,40
90-120	16,93	36,89	59,38
120-150	20,32	41,96	80,21
150-180	23,73	45,43	86,60
180-210	26,69	47,94	86,81
210-240	29,24	50,19	86,88
240-300	33,49	53,14	87,04
300-360	36,91	54,41	87,79
360-420	39,68	55,02	88,74
420-480	42,60	56,97	89,70

Os resultados representam os valores médios obtidos a partir da avaliação de 6 comprimidos; HP- β -CD = hidroxipropil- β -ciclodextrina. A1 = 30% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 4,5% C.M.; A2a = 17,5% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 17% C.M.; A3 = 10% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 24,5% C.M

Figura 2.7. Perfis de dissolução da furosemida em função do tempo obtidos a partir dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD obtidos com diferentes porcentagens de HPMC (30%; 17,5% e 10%) e designados de A1, A2a e A3, respectivamente, em experimento empregando o aparato IV, fluxo de 8 mL/min e gradiente de pH como apresentado a seguir: tampão de HCl pH 1,2 nos primeiros 60 minutos, solução de meio acetato pH 4,5 nos 60 minutos seguintes e sistema tampão fosfato pH 6,8 em até 8 horas (esquematizado na Tabela 2.2). Os perfis representam os valores médios obtidos a partir da avaliação de 06 amostras. A1 = 30% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 4,5% C.M.; A2a = 17,5% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 17% C.M.; A3 = 10% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 24,5% C.M.

Na Tabela 2.10 e na Figura 2.7 estão apresentados os resultados dos perfis de dissolução empregando o aparato IV. Os perfis de dissolução obtidos com este aparato apresentaram comportamento semelhante ao observado nos

perfis de dissolução obtidos com o aparato II (Tabela 2.9 e Figura 2.6). Assim, a formulação A1 apresentou o menor valor de porcentagem de dissolução (42,60%), a formulação A2a teve dissolução intermediária (56,97%), e a formulação A3 apresentou o maior valor de porcentagem de dissolução (89,70%).

As diferenças observadas em relação às porcentagens de dissolução para as formulações desenvolvidas, deve-se à presença de diferentes concentrações do Methocel™ (HPMC), polímero formador de matriz, que inicialmente age hidratando-se e formando uma camada superficial de gel, capaz de reduzir a velocidade de liberação do fármaco. À medida que o comprimido vai se hidratando, essa camada se expande em direção ao seu interior, consolidando a estrutura matricial, promovendo um ambiente propício para a difusão e dissolução do fármaco (Spricigo, 2006). Portanto, em concentrações elevadas, o HPMC origina uma camada gelatinosa bastante consistente quando em contato com a água, reduzindo a liberação do fármaco. Em contrapartida, em concentrações mais baixas, a viscosidade do gel também é reduzida, permitindo uma liberação quase imediata do fármaco (Mourão, 2009; Lopes; Lobo; Costa, 2005).

Conforme apresentado nas Tabelas 2.10 e 2.11 e nas Figuras 2.7 e 2.8, as porcentagens dissolvidas de furosemida a partir das diferentes formulações, indicam que o aumento da concentração de HPMC promoveu uma menor dissolução ou liberação do fármaco. Observou-se que o intumescimento e desagregação dos comprimidos foi diretamente proporcional à quantidade de HPMC, ou seja, quanto maior a concentração de HPMC, maior o intumescimento da camada gelatinosa formada pelo polímero, aumentando assim o tempo de desagregação do comprimido. Então, os comprimidos da formulação A1 apresentaram perfil de liberação mais lento, A2a intermediário e A3 mais rápido, decorrente das concentrações distintas de HPMC. Nota-se, portanto, que a formulação com menor concentração de HPMC (A3) apresentou um comportamento semelhante a uma formulação de liberação imediata. Tal fato pode ter ocorrido por haver uma rápida desintegração e pelo fato de existir baixa concentração do polímero formador de matriz, o que diminuiu a formação da camada contínua de gel, responsável pelo controle da

liberação (Li *et al.*, 2005). Resultados semelhantes aos observados neste trabalho encontram-se também descritos na literatura (Mohamed *et al.*, 2013; Ghimire *et al.*, 2010; Mourão *et al.*, 2010).

Considerandos os resultados aqui apresentados, concluiu-se que os perfis de dissolução obtidos a partir do emprego dos aparatos II e IV, discriminaram o comportamento das formulações avaliadas e reproduziram a influência do HPMC no perfil de liberação do fármaco.

Conforme exposto anteriormente no início deste capítulo, a furosemida apresenta problemas de solubilidade pH-dependente, ou seja, o fármaco apresenta baixa solubilidade em meios ácidos (Granero *et al.*, 2010). Porém, os perfis de dissolução dos comprimidos matriciais contendo complexo do fármaco e HP- β -CD, obtidos com o aparato IV, com emprego de gradiente de pH, indicam que a liberação do fármaco comportou-se como pH-independente. Este mesmo comportamento foi descrito por Spricigo (2006). Neste trabalho, o pesquisador avaliou a dissolução de comprimidos matriciais contendo complexos de furosemida e CDs com o emprego do aparato III e gradiente de pH. Como descrito anteriormente, a complexação da furosemida com a HP- β -CD proporcionou o aumento da solubilidade do fármaco em todos os meios avaliados, sendo o aumento menos expressivo em meio ácido (pH 1,2), conforme visto nos resultados do ensaio de solubilidade (apresentado no item 2.4.1.3).

Por fim, o estudo publicado na literatura demonstrou que o emprego do aparato IV mostrou-se útil na obtenção de perfis de dissolução mais discriminativos (de la Penã *et al.*, 2003). Também se verifica a obtenção de perfis preditivos no trabalho publicado por Emara, El-Menshawi e Estefan (2000). O grupo publicou um estudo de CIVIV com formulações de uso prolongado de vincamina, onde descreveram o emprego do aparato IV, com gradiente de pH e fluxo de 8mL/min, para os estudos de dissolução. Estas condições do estudo de dissolução permitiram um comportamento preditivo do método *in vitro*. Após a realização do ensaio de BD com 16 voluntários sadios, os autores obtiveram uma CIVIV de nível A, com coeficiente de determinação (r^2) de 0,98.

Em alguns casos, apesar de observar que os perfis de dissolução empregando os aparatos II e IV foram coerentes entre si, o uso de diferentes aparatos se faz necessário em estudos de CIVIV, pois estes apresentam diferentes condições hidrodinâmicas e, portanto, os resultados dos perfis de dissolução apresentam particularidades que podem melhor se correlacionar com o estudo *in vivo*. Por esta razão, ensaios de CIVIV costumam empregar diferentes aparatos nestes estudos (Cardot; Beyssac; Alric, 2007; Emami, 2006; de la Penã *et al.*, 2003).

Concluiu-se assim, que os métodos escolhidos para o ensaio de dissolução foram satisfatórios ao distinguir as diferenças existentes entre as formulações e podem ser usados para o estabelecimento de uma CIVIV, que será descrita no Capítulo 3.

2.4.4. Avaliação da eficiência de dissolução da furosemida em comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD

A eficiência de dissolução (ED%) é uma importante ferramenta farmacotécnica, por ser um parâmetro simples de comparação, direto e robusto entre perfis de dissolução. Este parâmetro é vantajoso quando se deseja comparar a influência das variáveis de formulação ou processo de dissolução de uma FF, proporcionando comparações mais realistas, uma vez que o dado é obtido a partir do perfil todo (Serra; Storpirtis, 2007; Costa; Lobo, 2001; Serra, 1998).

Por esta razão, optou-se por utilizar o parâmetro ED% para comparar os perfis de dissolução. Uma vez que este parâmetro relaciona a quantidade real dissolvida no meio e estes dados podem estar relacionados com o desempenho *in vivo* (Mourão, 2009; Serra; Storpirtis, 2007). O trabalho publicado por Serra e Storpirtis (2007) apresentou um estudo comparativo de perfis de dissolução empregando o aparato I a 100 rpm e 900 mL de água para avaliar comprimidos de liberação imediata de cefalexina. Os pesquisadores concluíram que os valores de ED% foram mais discriminativos em detectar

diferenças do que os resultados dos fatores de diferença (f_1) e de similaridade (f_2).

Na Tabela 2.11 e na Figura 2.8 encontram-se os resultados referentes a determinação da eficiência de dissolução, calculados a partir da área sob a curva (ASC), conforme equação 2.7. Os perfis de dissolução dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD com diferentes porcentagens de HPMC (30%; 20%; 17,5%; 15% e 10%), foram obtidos com emprego do aparato II, de acordo com descrito no item 2.3.7.1.

Tabela 2.11. Valores de área sob a curva *versus* tempo (ASC_{0-480}) e de eficiência de dissolução (ED%) calculados a partir dos perfis de dissolução *versus* tempo, em meio tampão fosfato 0,05 M, pH 6,8, com emprego do aparato II a 75 rpm, dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD obtidos com diferentes porcentagens de HPMC (30%; 20%; 17,5%; 15% e 10%) e designados de A1, A2, A2a, A2b e A3, respectivamente

	A1	A2	A2a	A2b	A3
Δt (min)	ASC Média				
0-15	60,18	113,60	189,69	333,03	575,23
15-30	151,85	249,15	412,98	708,70	1181,93
30-45	199,69	279,36	477,67	797,92	1243,51
45-60	221,04	296,83	529,44	877,05	1304,55
60-90	454,64	668,02	1267,56	1937,89	2693,81
90-120	470,99	768,75	1456,16	2103,11	2751,57
120-150	515,47	871,58	1526,59	2271,49	2841,04
150-180	656,12	964,87	1660,81	2438,30	2905,81
180-210	834,83	1050,85	1784,08	2531,83	2952,75
210-240	952,63	1124,69	1870,51	2615,55	3010,82
240-300	2062,55	2349,94	3999,44	5369,37	6114,91
300-360	2146,30	2428,03	4448,16	5544,13	6210,39
360-420	2234,92	2550,11	5051,88	5709,08	6298,07
420-480	2363,81	2853,75	5475,52	5854,93	6348,78
0-480	13325,03	16569,54	30150,50	39092,70	46433,18
	ED%				
	27,76	34,52	62,81	81,44	96,74

Os resultados representam os valores médios obtidos a partir da avaliação de 6 comprimidos; HP- β -CD = Hidroxipropil- β -ciclodextrina. A1 = 30% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 4,5% C.M.; A2 = 20% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 14,5% C.M.; A2a = 17,5% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 17% C.M.; A2b = 15% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 19,5% C.M.; A3 = 10% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 24,5% C.M.

Figura 2.8. Valores de eficiência de dissolução (ED%), calculados a partir dos perfis de dissolução *versus* tempo, dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD com diferentes porcentagens de HPMC (30%; 20%; 17,5%; 15% e 10%), designados de A1, A2, A2a, A2b e A3, respectivamente. Os resultados referem-se aos ensaios de dissolução em meio tampão fosfato 0,05 M, pH 6,8, com emprego do aparato II a 75 rpm. A1 = 30% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 4,5% C.M.; A2 = 20% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 14,5% C.M.; A2a = 17,5% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 17% C.M.; A2b = 15% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 19,5% C.M.; A3 = 10% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 24,5% C.M.

Os resultados de ED% obtidos com o emprego do aparato II (A1 = 27,76%; A2 = 34,52%; A2a = 62,81%; A2b = 81,44% e A3 = 96,74%) demonstraram que a presença do HPMC em diferentes proporções foi capaz de gerar perfis de liberação distintos. Destacando que a formulação A1, com maior porcentagem de HPMC, apresentou menor ED%, enquanto a formulação A3, com menor porcentagem de HPMC, apresentou maior ED%. Por meio de análise estatística (ANOVA), avaliou-se a significância destas diferenças e os resultados estão apresentados na Tabela 2.12. O estudo estatístico demonstrou que as formulações (A1, A2, A2a, A2b e A3), quando comparadas

entre si, apresentam diferenças significativas em relação aos perfis de dissolução obtidos com o aparato II. Desta forma, conforme os resultados de ED%, todas as formulações desenvolvidas apresentaram perfis de dissolução distintos, podendo ser utilizadas no estudo de CIVIV.

Tabela 2.12. Valores dos índices de significância (p) obtidos pela comparação entre os valores de eficiência de dissolução (ED%) dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD com diferentes porcentagens de HPMC (30%; 20%; 17,5%; 15% e 10%), designados de A1, A2, A2a, A2b e A3, respectivamente. Os resultados referem-se aos ensaios de dissolução em meio tampão fosfato 0,05 M, pH 6,8, com emprego do aparato II a 75 rpm

	A1	A2	Resultado	Valor-p
	27,76 $\pm$ 0,45	34,52 $\pm$ 0,33	Diferente	< 0,00001
	A1	A2a		
	27,76 $\pm$ 0,45	62,81 $\pm$ 0,76	Diferente	< 0,00001
	A1	A2b		
	27,76 $\pm$ 0,45	81,44 $\pm$ 0,62	Diferente	< 0,00001
	A1	A3		
	27,76 $\pm$ 0,45	96,74 $\pm$ 0,52	Diferente	< 0,00001
	A2	A2a		
	34,52 $\pm$ 0,33	62,81 $\pm$ 0,76	Diferente	< 0,00001
ED $\pm$ DP	A2	A2b		
	34,52 $\pm$ 0,33	81,44 $\pm$ 0,62	Diferente	< 0,00001
	A2	A3		
	34,52 $\pm$ 0,33	96,74 $\pm$ 0,52	Diferente	< 0,00001
	A2a	A2b		
	62,81 $\pm$ 0,76	81,44 $\pm$ 0,62	Diferente	< 0,00001
	A2a	A3		
	62,81 $\pm$ 0,76	96,74 $\pm$ 0,52	Diferente	< 0,00001
	A2b	A3		
	81,44 $\pm$ 0,62	96,74 $\pm$ 0,52	Diferente	< 0,00001

p = índice de significância ANOVA – fator único; DP = desvio-padrão da média (n=6). HP- β -CD = Hidroxipropil- β -ciclodextrina. A1 = 30% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 4,5% C.M.; A2 = 20% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 14,5% C.M.; A2a = 17,5% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 17% C.M.; A2b = 15% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 19,5% C.M.; A3 = 10% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 24,5% C.M.

Os resultados de eficiência de dissolução (ED%) dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD com diferentes porcentagens de HPMC (30%; 17,5% e 10,0%) e designados de A1, A2a e A3, respectivamente, obtidos a partir dos ensaios com o aparato IV, conforme descrito no item 2.3.7.2, estão apresentados na Tabela 2.13 e na Figura 2.9.

Tabela 2.13. Valores de área sob a curva (ASC_{0-480}) e da eficiência de dissolução (ED%), calculados a partir dos perfis de dissolução *versus* tempo, dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD com diferentes porcentagens de HPMC (30%; 17,5% e 10%), designados de A1, A2a e A3, respectivamente. Os resultados referem-se aos ensaios de dissolução com o emprego do aparato IV, com fluxo de 8 mL/min e gradiente de pH como apresentado a seguir: tampão de HCl pH 1,2 nos primeiros 60 minutos, solução de meio acetato pH 4,5 nos 60 minutos seguintes e sistema tampão fosfato pH 6,8 em até 8 horas (esquematisado na Tabela 2.2)

Δt	A1	A2a	A3
	ASC Média		
0-15	20,61	67,78	105,20
15-30	63,05	147,96	319,14
30-45	98,89	194,81	502,15
45-60	124,24	271,44	627,31
60-90	335,81	770,74	1524,20
90-120	454,14	1010,50	1736,74
120-150	558,72	1182,74	2093,92
150-180	660,73	1310,75	2502,14
180-210	756,34	1400,43	2601,24
210-240	838,97	1471,97	2605,52
240-300	1881,75	3100,03	5211,60
300-360	2111,86	3226,45	5208,83
360-420	2297,75	3282,84	5206,60
420-480	2468,63	3329,78	5203,29
0-480	12671,50	20768,22	35447,34
ED%			
	26,40	43,27	73,85

Os resultados representam os valores médios obtidos a partir da avaliação de 6 comprimidos; HP- β -CD = Hidroxipropil- β -ciclodextrina. A1 = 30% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 4,5% C.M.; A2a = 17,5% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 17% C.M.; A3 = 10% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 24,5% C.M.

Figura 2.9. Valores de eficiência de dissolução (ED%), calculados a partir dos perfis de dissolução *versus* tempo, dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD com diferentes porcentagens de HPMC (30%; 17,5% e 10%), designados de A1, A2a e A3, respectivamente. Os resultados referem-se aos ensaios de dissolução com o emprego do aparato IV, com fluxo de 8 mL/min e gradiente de pH como apresentado a seguir: tampão de HCl pH 1,2 nos primeiros 60 minutos, solução de meio acetato pH 4,5 nos 60 minutos seguintes e sistema tampão fosfato pH 6,8 em até 8 horas (esquemático na Tabela 2.2). A1 = 30% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 4,5% C.M.; A2a = 17,5% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 17% C.M.; A3 = 10% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 24,5% C.M.

Os resultados de ED% obtidos com emprego do aparato IV (A1 = 26,40%; A2a = 43,27% e A3 = 73,85%), de forma semelhante àqueles obtidos com o aparato II, demonstraram que a presença do HPMC em diferentes proporções foi capaz de gerar perfis de liberação distintos. Destacando que a formulação A1, com maior porcentagem de HPMC, apresentou menor ED%, enquanto a formulação A3, com menor porcentagem de HPMC, apresentou maior ED%. Por meio de análise estatística (ANOVA), avaliou-se a significância destas diferenças e os resultados estão apresentados na Tabela 2.14. O estudo estatístico demonstrou que as formulações apresentaram diferenças

significativas entre os perfis de dissolução das três formulações (A1, A2a e A3), quando foi utilizado o aparato IV. Desta forma, semelhante ao observado quando o estudo de dissolução foi conduzido com o aparato II, todas as formulações desenvolvidas apresentaram perfis de dissolução distintos, podendo ser utilizadas no estudo de CIVIV.

Tabela 2.14. Valores dos índices de significância (p) obtidos pela comparação entre os valores de eficiência de dissolução (ED%) dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD com diferentes porcentagens de HPMC (30%; 17,5% e 10%), designados de A1, A2a e A3, respectivamente. Os resultados referem-se aos ensaios de dissolução com o emprego do aparato IV, com fluxo de 8 mL/min e gradiente de pH como apresentado a seguir: tampão de HCl pH 1,2 nos primeiros 60 minutos, solução de meio acetato pH 4,5 nos 60 minutos seguintes e sistema tampão fosfato pH 6,8 em até 8 horas (esquemático na Tabela 2.2)

	A1	A2a	Resultado	Valor-p
	26,40 $\pm$ 0,58	43,62 $\pm$ 0,62	Diferente	< 0,00001
	A1	A3		
ED $\pm$ DP	26,40 $\pm$ 0,58	73,85 $\pm$ 0,45	Diferente	< 0,00001
	A2a	A3		
	43,62 $\pm$ 0,62	73,85 $\pm$ 0,45	Diferente	< 0,00001

p = índice de significância ANOVA – fator único; DP = desvio-padrão da média (n=6). HP- β -CD = Hidroxipropil- β -ciclodextrina. A1 = 30% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 4,5% C.M.; A2a = 17,5% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 17% C.M.; A3 = 10% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 24,5% C.M.

Tabela 2.15. Comparativo da porcentagem de furosemida dissolvida e eficiência de dissolução (ED%) obtidos com o aparato II (meio de dissolução - tampão fosfato pH 6,8) e aparato IV (meio de dissolução com gradiente de pH conforme descrito na Tabela 2.2a) a partir dos comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD obtidos com diferentes porcentagens de HPMC (30%; 20%; 17,5%; 15% e 10%) e designados de A1, A2, A2a, A2b e A3, respectivamente

Formulações	Aparato II		Aparato IV	
	%	ED%	%	ED%
A1	40,48	27,76	42,60	26,40
A2	50,98	34,52	-	-
A2a	93,01	62,81	55,97	43,27
A2b	99,08	81,44	-	-
A3	105,94	96,74	86,70	73,85

Os resultados representam os valores médios obtidos a partir da avaliação de 6 comprimidos; HP- β -CD = Hidroxipropil- β -ciclodextrina. A1 = 30% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 4,5% C.M.; A2 = 20% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 14,5% C.M.; A2a = 17,5% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 17% C.M.; A2b = 15% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 19,5% C.M.; A3 = 10% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 24,5% C.M.

Na comparação dos resultados de porcentagem dissolvida e ED% (Tabela 2.15), obtidos com os aparatos II e IV, para uma mesma formulação, observa-se diferenças. Neste sentido, tanto o aparato II quanto o aparato IV, permitiram resultados que indicaram diferenças significativas entre as formulações A1, A2a e A3. Enfatizando que a porcentagem dissolvida e a ED% diminuíram à medida que houve o aumento da concentração de HPMC. Diante do exposto, conclui-se que as formulações selecionadas, A1, A2a e A3 estão adequadas para serem submetidas ao estudo de CIVIV, a ser apresentado no Capítulo 3.

2.4.5. Validação do método analítico espectrofotométrico

No método utilizando varredura por espectrofotômetro UV-vis, os valores de absorbâncias encontrados foram 275 e 280 nm para água, nos tampões ácido clorídrico pH 1,2; acetato pH 4,5 e fosfato pH 6,8 e 7,5, respectivamente.

2.4.5.1. Especificidade

Na avaliação da especificidade, a absorção dos meios utilizados para o desenvolvimento do método nos comprimentos de onda da furosemida foi desprezível tanto no comprimento de onda de 275 nm que foi empregado na avaliação dos meios água, tampão HCl pH 1,2 e tampão acetato pH 4,5 e quanto para o comprimento de onda de 280 nm que foi utilizado na avaliação dos tampões fosfato pH 6,8 e 7,5, o que comprova a especificidade dos métodos.

2.4.5.2. Linearidade

Com o propósito de avaliar a linearidade do método, foram construídas curvas analíticas que relacionaram absorbância *versus* concentração ($\mu\text{g/mL}$) da furosemida em cada meio utilizado no estudo (água, tampão HCl pH 1,2, tampão acetato pH 4,5 e tampões fosfato pHs 6,8 e 7,5) obtendo-se a curva analítica, a respectiva equação da reta e o seu correspondente coeficiente de correlação linear. Esta última foi determinada pela regressão linear, da qual se obteve o coeficiente de correlação linear. Adotou-se como critério de aceitação, coeficiente de correlação linear (r^2) maior ou igual a 0,99 (Brasil, 2003a; AOAC, 1995). As Figuras 2.10, 2.11, 2.12, 2.13 e 2.14 apresentam estes resultados.

Foram determinados o desvio padrão e o coeficiente de variação dos pontos da curva de linearidade e considerado aceitáveis valores de desvio padrão e coeficientes de variação abaixo de 5% como preconizada pela norma vigente RE 899/2003 (Brasil, 2003a).

Os métodos de quantificação para a furosemida por espectrofotometria no UV-vis demonstraram linearidade na faixa de 2 – 20 µg/mL quando utilizados os seguintes meios de dissolução: água, tampão HCl pH 1,2, tampão acetato pH 4,5, tampão fosfato pHs 6,8 e 7,5 como diluentes, atendendo ao critério estabelecido r^2 superior a 0,99 (Brasil, 2003a).

Figura 2.10. Curva analítica do método analítico de quantificação de furosemida em água por espectrofotômetro UV-vis na faixa de concentração 2 a 20 µg/mL. Cada ponto representa a média de 3 determinações (n=3). x= Concentração (µg/mL); y = Absorbância (UV-vis), r^2 = coeficiente de determinação.

Figura 2.11. Curva analítica do método analítico de quantificação de furosemida em tampão HCl pH 1,2 por espectrofotômetro UV-vis na faixa de concentração 2 a 20 µg/mL. Cada ponto representa a média de 3 determinações (n=3). x= Concentração (µg/mL); y = Absorbância (UV-vis), r^2 = coeficiente de determinação.

Figura 2.12. Curva analítica do método analítico de quantificação de furosemida em tampão acetato pH 4,5 por espectrofotômetro UV-vis na faixa de concentração 2 a 20 µg/mL. Cada ponto representa a média de 3 determinações (n=3). x= Concentração (µg/mL); y = Absorbância (UV-vis), r^2 = coeficiente de determinação.

Figura 2.13. Curva analítica do método analítico de quantificação de furosemida em tampão fosfato pH 6,8 por espectrofotômetro UV-vis na faixa de concentração 2 a 20 µg/mL. Cada ponto representa a média de 3 determinações (n=3). x= Concentração (µg/mL); y = Absorbância (UV-vis), r^2 = coeficiente de determinação.

Figura 2.14. Curva analítica do método analítico de quantificação de furosemida em tampão fosfato pH 7,5 por espectrofotômetro UV-vis na faixa de concentração 2 a 20 µg/mL. Cada ponto representa a média de 3 determinações (n=3). x= Concentração (µg/mL); y = Absorbância (UV-vis), r^2 = coeficiente de determinação.

2.4.5.3. Precisão

A precisão do método analítico para quantificação de furosemida, considerando todos os meios utilizados no estudo de solubilidade, variou entre 0,1 e 2,9 % para as amostras analisadas no mesmo dia (intradia) e entre 0,5 e 4,3 % para as amostras analisadas em dias diferentes (interdias). Os resultados estão apresentados nas Tabelas 2.16, 2.17, 2.18, 2.19 e 2.20.

2.4.5.4. Exatidão

A exatidão do método analítico de quantificação de furosemida, considerando todos os meios utilizados no estudo de solubilidade, variou entre 95,5 e 102,3 % para as amostras analisadas no mesmo dia (intradia) e entre 98,3 e 101,9 % para as amostras analisadas em dias diferentes (interdias). Os resultados estão apresentados nas Tabelas 2.16, 2.17, 2.18, 2.19 e 2.20.

Tabela 2.16. Precisão e exatidão intradia e interdias referentes ao método analítico para quantificação de furosemida em água por espectrofotômetro UV-vis

Concentração de furosemida (µg/mL)	Precisão (%)		Exatidão (%)	
	Intradia	Interdias	Intradia	Interdias
6	1,8	3,5	95,5	98,7
10	1,7	2,2	96,6	98,6
15	1,1	1,2	98,0	99,0

Cada valor representa uma média de três determinações (n=3) para precisão e exatidão intradia e três determinações por 4 dias para precisão e exatidão interdias.

Tabela 2.17. Precisão e exatidão intradia e interdias referentes ao método analítico para quantificação de furosemida em tampão HCl pH 1,2 por espectrofotômetro UV-vis

Concentração de furosemida (µg/mL)	Precisão (%)		Exatidão (%)	
	Intradia	Interdias	Intradia	Interdias
6	1,9	1,6	102,3	101,9
10	2,0	1,4	100,7	101,2
15	0,9	0,9	101,4	101,1

Cada valor representa uma média de três determinações (n=3) para precisão e exatidão intradia e três determinações por 4 dias para precisão e exatidão interdias.

Tabela 2.18. Precisão e exatidão intradia e interdias referentes ao método analítico para quantificação de furosemida em tampão acetato pH 4,5 por espectrofotômetro UV-vis

Concentração de furosemida (µg/mL)	Precisão (%)		Exatidão (%)	
	Intradia	Interdias	Intradia	Interdias
6	0,1	2,4	101,3	99,7
10	0,3	1,5	101,6	100,6
15	0,1	1,0	99,8	100,3

Cada valor representa uma média de três determinações (n=3) para precisão e exatidão intradia e três determinações por 4 dias para precisão e exatidão interdias.

Tabela 2.19. Precisão e exatidão intradia e interdias referentes ao método analítico para quantificação de furosemida em tampão fosfato pH 6,8 por espectrofotômetro UV-vis

Concentração de furosemida (µg/mL)	Precisão (%)		Exatidão (%)	
	Intradia	Interdias	Intradia	Interdias
6	1,4	2,6	97,0	98,3
10	1,6	3,0	95,7	98,5
15	0,6	0,5	98,8	99,1

Cada valor representa uma média de três determinações (n=3) para precisão e exatidão intradia e três determinações por 4 dias para precisão e exatidão interdias.

Tabela 2.20. Precisão e exatidão intradia e interdias referentes ao método analítico para quantificação de furosemida em tampão fosfato pH 7,5 por espectrofotômetro UV-vis

Concentração de furosemida (µg/mL)	Precisão (%)		Exatidão (%)	
	Intradia	Interdias	Intradia	Interdias
6	1,6	1,8	97,7	98,7
10	2,9	2,1	96,7	97,6
15	1,4	4,3	96,4	99,8

Cada valor representa uma média de três determinações (n=3) para precisão e exatidão intradia e três determinações por 4 dias para precisão e exatidão interdias.

O método de quantificação de furosemida foi validado nos diferentes meios (água; HCl pH 1,2; tampão acetato pH 4,5; tampão fosfato pHs 6,8 e 7,5). Em todos os meios, o método demonstrou-se linear na faixa de 2 a 20 µg/mL, atendendo aos critérios mínimos estabelecidos para métodos analíticos ($r^2 \geq 0,99$), conforme observado nas Figuras 2.10, 2.11, 2.12, 2.13 e 2.14. O método demonstrou especificidade em todos os meios, com absorção desprezível dos demais componentes utilizados. Os valores de precisão e exatidão foram calculados para experimentos realizados em um único dia (intradia) e para experimentos realizados em diferentes dias (interdias), sendo os desvios aceitos inferiores a 5% para precisão e exatidão (ICH, 2005; Brasil, 2003a). Portanto, o método validado foi considerado adequado para as análises realizadas neste capítulo.

2.5. Conclusões

- ✓ O complexo de furosemida e HP-β-CD foi adequadamente obtido pela técnica da liofilização e a sua caracterização através de ensaios termoanalíticos sugerem que houve a formação de complexo de inclusão da HP-β-CD com o fármaco;
- ✓ Em relação ao ensaio de solubilidade, observou-se um aumento da solubilidade do complexo de furosemida e HP-β-CD em relação ao fármaco puro. No entanto, de acordo com os critérios do guia do FDA

(United States, 2000) e de acordo com SCB (Amidon *et al.*, 1995), pode-se afirmar que tanto a furosemida, quanto o complexo de furosemida e HP- β -CD foram considerados de baixa solubilidade. Portanto, tanto o fármaco puro ou o complexo de furosemida e HP- β -CD podem ser classificados Classe II ou IV do SCB, dependendo da determinação da permeabilidade;

- ✓ Com relação à permeabilidade avaliada por meio da técnica de PAMPA, tanto a furosemida, quanto o complexo de furosemida e HP- β -CD apresentaram baixa permeabilidade, nas condições adotadas para o ensaio;
- ✓ Os comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD, formulações A1, A2, A2a, A2b e A3, foram adequadamente obtidos por compressão direta. Sua caracterização física demonstrou que estas formulações estão de acordo com as especificações da Farmacopeia Brasileira (2010).
- ✓ As formulações produzidas apresentaram perfis de dissolução distintos sendo que maior porcentagem de dissolução e ED% foi observada a partir da formulação A3, enquanto que A1 apresentou menor porcentagem de dissolução e, portanto menor ED%. Dentre as formulações A2, A2a e A2b, a formulação A2a mostrou-se o melhor caráter intermediário para uma alta distinção dos perfis de dissolução utilizando os aparato II. Os resultados do ensaio de dissolução para as formulações A1, A2a e A3 com o aparato IV corroboram com os dados observados no ensaio de dissolução com o aparato II. Baseado nestes resultados, foram selecionadas as formulações A1, A2a e A3 para o estudo de CIVIV;
- ✓ Os métodos propostos para a quantificação da furosemida por espectrofotometria na região do UV-vis cumpriram com as especificações estabelecidas para a validação de métodos analíticos, como especificidade, linearidade, precisão e exatidão, nos meios propostos para o estudo de solubilidade e dissolução: água, tampão HCl pH 1,2, tampão acetato pH 4,5, tampão fosfato pHs 6,8 e 7,5.

Capítulo 3: Métodos *in vivo* - Correlação *in vitro* – *in vivo*: Estudo de biodisponibilidade *in vivo* a partir de comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD

Resumo

O objetivo do presente capítulo é apresentar a condução e os resultados do estudo de correlação *in vitro* – *in vivo* (CIVIV), com emprego de comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD a partir da determinação da biodisponibilidade (BD). O estudo de BD foi realizado com 12 voluntários sadios, que receberam dose única das formulações A1, A2a e A3 (50 mg de furosemida), por via oral, e da formulação referência, Furosemida IV Teuto[®] (10 mg/mL, sendo 20 mg de furosemida), por via intravenosa. O estudo foi distribuído em 4 fases. E foi executado com colheitas de amostras de sangue em um intervalo de tempo de 8 horas, com período de *wash out*, empregou-se um período de 7 dias entre as fases. Não houve intercorrências durante o ensaio e todos os voluntários incluídos puderam finalizar a etapa clínica. O estudo de BD refletiu os estudos de dissolução, assim concentrações mais altas de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) (formulação A1) impactaram na absorção da furosemida, provavelmente em função da diminuição da dissolução (liberação do fármaco), e promoveu redução de C_{max} e ASC_{0-t} . Este comportamento, assim como no estudo de dissolução, foi inversamente proporcional à quantidade de HPMC. A fração absorvida percentual foi determinada pela técnica de deconvolução. Para o estabelecimento da correlação, foram utilizados os dados de dissolução obtidos pelos aparatos II e IV, e apresentados no Capítulo 2. O resultado de correlação linear utilizando o aparato IV foi mais preditivo do que empregando o aparato II. Considerando a fração dissolvida obtida com o aparato IV e a fração absorvida, o estudo apresentou um coeficiente de determinação de 0,96017. A validação interna desta CIVIV obtiveram erros de predição (EP%) inferiores a 12%. Observando a alta variabilidade do fármaco estudado, pode-se considerar que a CIVIV foi adequadamente obtida e pode ser empregada para substituir um novo ensaio de BD, pois esta correlação reflete o estudo de BD *in vivo*.

3.1. Introdução

3.1.1. Correlação *in vitro* – *in vivo* (CIVIV)

O principal objetivo do estudo de CIVIV é o estabelecimento de uma relação entre as características de liberação *in vitro* e a BD *in vivo* (Cardot; Beyssac; Alric, 2007; Emami, 2006). Este tipo de correlação pode ser utilizado para bioisentar estudos *in vivo* por meio de estudos de dissolução *in vitro*, servindo de fundamento para as bioisenções. Pode ser empregada na etapa de desenvolvimento, reduzindo o número de testes em humanos durante esta etapa, e auxiliar no estabelecimento das especificações e validação do método de dissolução (Emami, 2006).

No sentido de minimizar o número de estudos realizados em voluntários sadios, é importante a obtenção de parâmetros que indiquem, por meio de testes *in vitro*, tais como os ensaios de dissolução e perfis de dissolução, o comportamento *in vivo* para determinado fármaco. O estabelecimento de correlações entre os dados *in vitro* e *in vivo* possibilita a substituição dos estudos de BD *in vivo*, necessários para comprovar a bioequivalência (BE), pelos estudos *in vitro* (Mourão, 2009; Uppoor, 2001).

A correlação quantitativa entre os dados *in vitro* e *in vivo* é conhecida como correlação *in vitro* – *in vivo* (CIVIV). O estudo de CIVIV apresenta inúmeras vantagens, tais como otimização da forma farmacêutica (FF) efetiva com um número mínimo de estudos em voluntários, permite criar especificações de critérios de aprovação para o ensaio de dissolução e pode ser usado para substituir ensaios de BE adicionais (Thelen *et al.*, 2012).

É de conhecimento geral na área farmacêutica que, os ensaios de dissolução *in vitro* são amplamente utilizados para prever o desempenho *in vivo* do fármaco a partir da FF, uma vez que o perfil de dissolução deste no trato gastrointestinal (TGI) determina diretamente a concentração intestinal da substância (Takano; Kataoka; Yamashita, 2012). Os ensaios de dissolução *in vitro* são utilizados em várias etapas do processo de desenvolvimento de um fármaco, como por exemplo, para o aperfeiçoamento de novos produtos

farmacêuticos, para o controle de qualidade de formulações de uso oral, e para dar assistência ao teste de BE. Um ponto chave é relacionar a informação de liberação do fármaco *in vitro* com o perfil de absorção *in vivo* (Thelen *et al.*, 2012).

São definidos quatro níveis de CIVIV, A, B, C e C múltipla. A CIVIV de nível A é o mais alto que pode ser obtido e representa uma relação ponto a ponto entre a dissolução *in vitro* do fármaco, a partir da FF, e a velocidade de entrada do fármaco no organismo *in vivo*. Neste nível, as curvas de dissolução *in vitro* e *in vivo* são sobreponíveis (Mourão, 2009; Brasil, 2002).

O nível B de CIVIV utiliza os princípios da análise estatística de momentos, como o tempo médio de dissolução *in vitro* que é comparado ao tempo de residência médio (TRM) ou ao tempo de dissolução médio (TDM) *in vivo*. A CIVIV de nível C relaciona um ponto de dissolução de 50% ($t_{50\%}$) ou 90% ($t_{90\%}$) do fármaco presente na FF *in vivo*, com a área sob a curva de concentração plasmática em função do tempo (ASC_{0-t}), o pico de concentração plasmática máxima (C_{max}) ou o tempo para atingir o C_{max} (T_{max}) (Mourão, 2009; Brasil, 2002).

O nível C múltipla de correlação relaciona um ou vários parâmetros farmacocinéticos (C_{max} , ASC_{0-t} ou qualquer outro parâmetro de interesse) com a quantidade de fármaco dissolvida em vários pontos do perfil de dissolução. Este nível de correlação pode ser avaliado a cada tempo, para um mesmo parâmetro farmacocinético, de modo que as alterações no perfil de dissolução podem refletir no comportamento *in vivo* de uma formulação. Assim, quando uma correlação de nível C múltipla é estabelecida, o desenvolvimento de uma correlação nível A também é possível (Melo, 2012; Modi, 2007).

Para a obtenção de uma adequada CIVIV, deve-se considerar as características físico-químicas do fármaco, especialmente a solubilidade em líquidos biológicos e a permeabilidade no TGI. É possível esperar que uma CIVIV preditiva seja estabelecida para casos em que a etapa limitante seja a dissolução do fármaco a partir da FF, ou seja, em casos em que utilizam fármacos de classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutico (SCB) ou fármacos da classe I do SCB em FF de liberação modificada (Melo, 2012; Mourão, 2009; Emami, 2006; Amidon *et al.*, 1995).

Apesar das vantagens dos estudos de CIVIV e do amplo reconhecimento de que existem correlações entre os dados de dissolução e de absorção do fármaco *in vivo* baseados na dissolução *in vitro*, um limitado progresso foi feito para o desenvolvimento de modelos abrangentes capazes de prever o comportamento do fármaco *in vivo* baseado nos ensaios de dissoluções. Isto acontece por conta do complexo conjunto de fatores que contribuem tanto para a dissolução, quanto para a absorção dos fármacos *in vivo*, tais como motilidade no TGI, diferenças de expressão de proteínas transportadoras e proteínas de efluxo no TGI e diferenças no metabolismo dos fármacos (Lu; Kim; Park, 2011).

Nos últimos anos, foram publicados muitos estudos de CIVIV, porém muitos destes falham em fornecer um modelo matemático preditivo para descrever a comprovada correlação entre os dados *in vitro* e *in vivo* (Nainar *et al.*, 2012; Takano; Kataoka; Yamashita, 2012; Lu; Kim; Park, 2011). Portanto, faz-se necessário não apenas que haja mais estudos de CIVIV, mas também maior aperfeiçoamento de modelos matemáticos e melhores técnicas de simulação para descrever essas relações (Lu; Kim; Park, 2011).

3.1.2. Estudo de Biodisponibilidade

A BD é definida pelo *Food and Drug Administration* (FDA) como sendo a velocidade e a extensão pelas quais um fármaco é absorvido a partir de um produto farmacêutico e torna-se disponível no sítio de ação (United States, 2004). A BD, portanto, é um parâmetro relacionado ao processo de absorção (Abdou, 1989). Este processo refere-se à transferência do local de administração para a corrente sanguínea (Bonamici, 2009).

A absorção oral de fármacos envolve vários processos que podem ocorrer paralelamente e/ou de forma sequencial, iniciando-se pela desintegração da forma farmacêutica e dissolução do fármaco no líquido presente no TGI, trânsito deste no TGI, permeação de suas moléculas através das membranas intestinais e metabolismo no intestino e/ou fígado. A velocidade e a extensão da absorção de fármacos dependem do conjunto destes processos (Takano; Kataoka; Yamashita, 2012).

A ação terapêutica de um fármaco depende da existência de uma concentração efetiva no local de ação durante certo período de tempo. A quantificação da concentração plasmática é uma medida indireta preditiva, uma vez que a concentração da corrente sanguínea entra em equilíbrio com o local de ação. Deste modo, a BD de um fármaco a partir de uma FF assume um papel crítico na eficácia clínica, sendo imprescindível a caracterização da formulação adequadamente (Shargel; Yu, 2012).

Os estudos de BD, por meio da determinação da concentração sanguínea de fármaco em função do tempo, permitem avaliar a farmacocinética, determinar o coeficiente de variação deste intra e interindividual, investigar as diversas variáveis envolvidas na sua administração (por exemplo, administração concomitante de fármacos, efeito da alimentação, estado do paciente, entre outros) e comparar medicamentos (por exemplo, medicamento teste e referência em um teste de BE) (Welling; Tse; Dighe, 1991), visando garantir eficácia e segurança ao paciente por meio da intercambiabilidade (Storpiotis *et al.*, 2008).

3.1.3. Farmacocinética da furosemida

Neste estudo foi utilizada a furosemida como fármaco-modelo. A furosemida é um diurético de alça, empregado por via oral, normalmente na dosagem de 40-120 mg/dia, para o tratamento de hipertensão e de estados edematosos associados à insuficiência cardíaca, renal, hepática (Granero *et al.*, 2010).

Na administração oral, a furosemida é rapidamente absorvida no TGI, porém a absorção é variável e irregular (Granero *et al.*, 2010; Ponto; Schoenwald, 1990). Tem sido relatada BD em torno de 60-70%, sendo relatado na literatura variações de 11 até 84% (Granero *et al.*, 2010; Korolkovas, 2007; Kim *et al.*, 2000). Após a administração por via oral, o C_{max} é atingindo em 30 a 90 minutos, o efeito diurético máximo ocorre em uma a duas horas e a meia-vida é de 30 a 60 minutos, em voluntários sadios (Granero *et al.*, 2010; Korolkovas, 2007).

De acordo com os dados da literatura, após a administração intravenosa de furosemida em voluntários sadios jovens, o *clearance* renal obtido foi de 96 a

194 mL/minuto, e o volume de distribuição relatado para estes voluntários foi de 7,9 a 9,4 L ou 0,11 a 0,13 L/Kg (Hammarlund-Udenaes; Benet, 1989; Benet, 1979). O volume de distribuição no estado de equilíbrio (V_{ss}) relatado na literatura para pacientes saudáveis é de 0,091 a 0,174 L/Kg ou 4,81 a 13,81 L (Ponto; Schoenwald, 1990).

O fármaco é fortemente ligado às proteínas plasmáticas, em especial à albumina (91 a 99%), a eliminação ocorre prioritariamente na forma inalterada pela urina, e de forma secundária através da via fecal/biliar. O metabolismo do fármaco é predominantemente hepático (Korolkovas, 2007). A furosemida apresenta dois metabólitos: furosemida glucoronida e saluamina (Ponto; Schoenwald, 1990).

A furosemida apresenta alta variabilidade intra e intersujeitos. Porém esta variabilidade na BD não é decorrente da baixa solubilidade em meios aquosos. Isso aparentemente ocorre por conta do esvaziamento gástrico e da velocidade limitada de absorção ao longo do TGI (Najib *et al.*, 2003; Ponto; Schoenwald, 1990; Hammarlund; Paalzow; Odling, 1984).

3.2. Objetivos

Os objetivos do presente capítulo foram o estabelecimento e a avaliação de uma correlação *in vitro* – *in vivo* de nível A, utilizando os dados de dissolução *in vitro* apresentados no Capítulo 2 e os dados do estudo de BD *in vivo* apresentados no presente capítulo a partir da formulação referência intravenosa e das formulações desenvolvidas e selecionadas conforme apresentado no Capítulo 2.

1.2. Materiais e métodos

3.3.1. Materiais, Reagentes e Medicamentos

- ✓ Furosemida: Substância Química de Referência (Sigma);

- ✓ Propranolol: Substância Química de Referência Secundária;
- ✓ Fosfato de potássio monobásico grau cromatográfico (Merck);
- ✓ Ácido clorídrico e ácido fosfórico (Synth);
- ✓ Metanol e Acetonitrila grau cromatográfico (Merck);
- ✓ Acetato de etila (Synth);
- ✓ Água ultrapura (Milli Q[®], USA);
- ✓ Formulações desenvolvidas: A1, A2a e A3;
- ✓ Solução injetável: Furosemida IV Teuto[®] 10 mg/mL.

3.3.2.Equipamentos

- ✓ Cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de fluorescência – Merck Hitachi, composto por bomba L-7100, injetor automático de amostras L-7200, detector de fluorescência L-7485, forno de coluna L-7300 e interface D-7000;
- ✓ Balança analítica Shimadzu, modelo AX 200;
- ✓ Banho ultrassônico Unique;
- ✓ Banho termostático Fanem, modelo 102R;
- ✓ Centrífuga Heraeus, Megafune 2.0;
- ✓ pHmetro Hanna Instruments, modelo HI221;
- ✓ Sistema de filtração à vácuo Vacuubrand, modelo ME2;
- ✓ Agitadores de tubo tipo vórtex Phoenix, modelo AP 56;
- ✓ Micropipetas variáveis 10-100 µL, 100-1000 µL e 500-5000 µL – Brand;
- ✓ Pipetador automático de 0,5 a 5 mL – Brand Dispensette;
- ✓ Balões volumétricos, Béqueres e Provetas de volumes adequados.

3.3.3. Ensaio de biodisponibilidade

3.3.3.1. Etapa clínica

O estudo clínico foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP)

(CEP/FCF 533) e pelo CEP do Hospital Universitário da USP (CEP/HU 942/09) (ambos apresentados no ANEXO B).

A etapa clínica do estudo de BD foi realizada no Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário, do campus da Universidade de São Paulo (USP). A unidade possui área exclusiva para ensaios clínicos, posto de enfermagem, laboratório de processamento de amostra e sala de lazer.

3.3.3.1.1. Casuística

O protocolo de estudo foi elaborado conforme a Resolução RE 894, de 29 de maio de 2003, *Guia para elaboração de protocolo de estudo de biodisponibilidade relativa/BE* (Brasil, 2003b).

O estudo foi realizado em humanos de acordo com as seguintes normas: 1) Resolução 196, de 10 de outubro de 1996, que estabelece os requisitos para realização de pesquisa clínica de produtos para saúde utilizando seres humanos (Brasil, 1996); 2) *Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade e BE* (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002); 3) Resolução RE 1170, *Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos* (Brasil, 2006).

O estudo foi divulgado através de e-mail para a comunidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e para a comunidade USP. Os interessados puderam sanar suas dúvidas e as pessoas que demonstraram interesse foram convidadas a participar da pesquisa. Os voluntários foram reunidos na Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelos pesquisadores para mais esclarecimentos, elucidar eventuais dúvidas e aplicar o TCLE. Após a divulgação do estudo, foram selecionados 15 voluntários sadios, sendo que destes apenas 12 cumpriram todas as exigências nos exames clínicos e laboratoriais. Estes voluntários foram devidamente informados sobre as características da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), em duas vias (ANEXO C).

Os voluntários selecionados para o presente estudo satisfizeram os seguintes critérios:

- ✓ Não fumantes ou fumantes até 10 cigarros/dia;
- ✓ Bom estado de saúde, idade entre 18 e 45 anos e IMC até 30 calculado pela fórmula, onde P é o peso (Kg) e H é altura do voluntário em (cm);
- ✓ Ausência de patologias cardíacas, renais, gastrintestinais, neurológicas ou metabólicas;
- ✓ Sem antecedentes de hipersensibilidade aos medicamentos;
- ✓ Não estar em tratamento com medicamentos;
- ✓ Voluntárias do sexo feminino não se encontrar em estado de gravidez (comprovada por meio de exame laboratorial) ou em período de amamentação.

A inclusão do voluntário também foi fundamentada nos seguintes exames laboratoriais:

- ✓ Hemograma Completo
- ✓ Glicose
- ✓ Ureia
- ✓ Creatinina
- ✓ Fosfatase Alcalina
- ✓ Bilirrubina Total e Frações
- ✓ Proteínas Totais e Frações
- ✓ AST
- ✓ ALT
- ✓ Ácido úrico
- ✓ Colesterol Total
- ✓ Triglicérides
- ✓ Urina Tipo I
- ✓ Sorologia para Hepatite B
- ✓ Sorologia para Hepatite C
- ✓ Sorologia para HIV
- ✓ HCG Total, para mulheres
- ✓ Eletrocardiograma

Todos os voluntários foram assegurados por seguro coletivo com vigência para o período do ensaio (Porto Seguro – Apólice: 0093.00.63 7.157-0). De acordo com a Resolução 196, de 10 de outubro de 1996, para garantir a confidencialidade dos dados obtidos e a privacidade dos voluntários, estes foram identificados apenas por números (Brasil 1996).

3.3.3.1.2. Procedimento do ensaio de biodisponibilidade

A internação dos voluntários foi feita no Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário, do campus da Universidade de São Paulo, São Paulo (HU/USP – SP), situado à Av. Prof. Lineu Prestes, 2565, Cidade Universitária, Butantã, São Paulo, SP. Conforme exposto anteriormente, a unidade possui área exclusiva para ensaios clínicos, posto de enfermagem, laboratório de processamento de amostra e sala de lazer, estando de acordo com os recursos exigidos pela ANVISA para a realização de estudos clínicos desta natureza.

O estudo foi conduzido em quatro fases com *wash out* de sete dias entre as fases. Em uma das fases os voluntários receberam 20 mg do medicamento referência, a Furosemida IV Teuto[®] (10 mg/mL), que foi administrado por via intravenosa. Nas outras três fases, os voluntários receberam diferentes formulações contendo 50 mg de fármaco em complexo de furosemida e HP- β -CD (Formulações A1, A2a e A3), administrados por via oral, de acordo com a Tabela 3.1. Os comprimidos foram produzidos conforme apresentado no Capítulo 2 no item 2.3.5 e conforme a composição percentual descrita na Tabela 2.1 (Capítulo 2).

Os produtos de uso oral foram administrados aos voluntários pela manhã, após jejum de 8 horas, e foram ingeridos com auxílio de 200 mL de água. A fim de padronizar a ingestão de líquidos no início do estudo, após a administração do medicamento referência, administrado por via intravenosa, os voluntários também receberam um copo de 200 mL de água. A ingestão de água foi liberada de acordo com a necessidade individual após duas horas da administração dos medicamentos. Os voluntários receberam almoço e lanche

padronizados, respectivamente, quatro e sete horas após a administração dos medicamentos.

Os voluntários ainda foram orientados a não ingerirem bebidas alcoólicas, café e outras bebidas xânticas, por pelo menos 48 horas antes do ensaio, e estas não foram oferecidas durante a realização do estudo. Além disso, foram recomendados a não fazerem uso de qualquer medicação uma semana antes do estudo, e durante a sua realização. Qualquer intercorrência deveria ser imediatamente comunicada ao médico de plantão.

Tabela 3.1. Desenho amostral para o ensaio de biodisponibilidade de comprimidos contendo 50 mg de fármaco em complexo de furosemida e HP- β -CD (Fases 1, 2 e 3), produzidos com composição percentual conforme descrito no item 2.3.5 (Capítulo 2), e de Furosemida IV Teuto[®] (Fase 4)

Fase	Formulação	HPMC (%)	Furosemida (mg)
1	A1	30	50
2	A2a	17,5	50
3	A3	10	50
4	Solução Injetável (10mg/mL)	0	20

Um profissional médico, devidamente provido de instrumentos e de medicamentos, para uso em caso de emergência, acompanhou a execução do ensaio. Durante o período de internação o médico registrou o estado geral, pressão e temperatura dos voluntários nos seguintes formulários: *Avaliação clínica do voluntário* e *Registro de eventos adversos*. Os voluntários foram ressarcidos de todos os gastos e prejuízos associados ao ensaio, tais como transporte e ausência do trabalho.

3.3.3.1.3. Colheita e processamento das amostras

Foram colhidas amostras de 5 mL de sangue em tubo heparinizado nos seguintes intervalos de tempos: 0:00, 0:30, 1:00, 1:30, 2:00, 2:30, 3:00, 3:30, 4:00, 5:00, 6:00, 7:00, 8:00 horas após a administração dos produtos. Assim, foi

retirado de cada voluntário um volume de 70 mL de sangue por etapa, totalizando 280 mL ao final do ensaio.

As amostras de sangue colhidas foram centrifugadas por 10 minutos a 3500 rpm para separação do plasma, que posteriormente foi congelado a -20°C e mantido nesta condição até a realização da quantificação do fármaco.

Ao final do estudo as amostras de plasma foram transportadas até o laboratório analítico na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, localizado à Av. Prof. Lineu Prestes, 580, bloco 15, Cidade Universitária, Butantã, São Paulo, SP, em caixas com isolamento térmico, sendo o congelamento garantido com o auxílio de gelo seco. Por ocasião do recebimento das amostras pela unidade analítica, as mesmas foram avaliadas em relação às suas condições gerais (integridade do frasco, congelamento ou descongelamento e presença de vazamento).

As amostras de plasma dos voluntários foram armazenadas em freezer a -20°C , o qual conta com termo-higrômetro em tempo integral, por um período após o final do estudo e serão descartadas após a conclusão do trabalho.

3.3.3.2. Etapa analítica

As amostras de plasma dos voluntários foram descongeladas à temperatura ambiente e submetidas à extração da furosemida pelo processo líquido-líquido com 5 mL de acetato de etila, e uso de propranolol como padrão interno. A metodologia de extração das amostras está descrita neste capítulo e detalhada no Desenvolvimento e validação do método bioanalítico através do item 3.3.6.4.

A análise das amostras dos voluntários foi realizada paralelamente à curva analítica com oito pontos e amostras de plasma de controle de qualidade em três concentrações, em triplicata.

3.3.3.2.2. Análise dos perfis de biodisponibilidade

Os perfis de BD foram analisados a partir dos parâmetros farmacocinéticos relativos à absorção e eliminação do fármaco (Shargel; Yu, 2012; Brasil, 2006; Nation; Sansom, 1994; Ritschel, 1992):

- ✓ ASC_{0-t} : área parcial sob a curva de decaimento plasmático do fármaco (concentração *versus* tempo), calculada pelo método dos trapezóides do tempo zero ao tempo t , onde t é o tempo relativo à última concentração determinada experimentalmente;
- ✓ $ASC_{0-\infty}$: área total sob a curva de decaimento plasmático do fármaco (concentração *versus* tempo), calculada do tempo zero extrapolada ao tempo infinito, ou seja, $80 ASC_{0-t} + C_t/K_{el}$, no qual C_t corresponde à última concentração quantificável do fármaco, determinada experimentalmente e K_{el} é a constante de velocidade de eliminação da fase terminal;
- ✓ C_{max} : concentração plasmática máxima que o fármaco atinge após a administração, determinada diretamente a partir das curvas de concentração plasmática *versus* tempo, sem interpolação dos dados na administração por via oral. No caso da administração intravenosa, este parâmetro foi determinado a partir da obtenção da equação de decaimento plasmático;
- ✓ T_{max} : tempo necessário para C_{max} , determinado diretamente a partir das curvas de concentração plasmática *versus* tempo, sem interpolação dos dados;
- ✓ $t_{(1/2)el}$: meia-vida de eliminação plasmática do fármaco, determinada a partir do valor da constante de velocidade de eliminação rápida ($t_{(1/2)el} = 0,693/K_{el}$);
- ✓ K_{el} : constante de velocidade correspondente à fase de eliminação rápida do fármaco, determinada a partir da equação que define a parte inicial de decaimento plasmático em função do tempo ($C = C_0 e^{-K_{el} \cdot t}$) (Shargel; Yu, 2012; Brasil, 2006; Nation; Sansom, 1994; Ritschel, 1992).

3.3.3.3. Etapa estatística

Os valores de $C_{\max}$, $T_{\max}$ e ASC_{0-t} foram submetidos à análise de variância em fator único (ANOVA), com o auxílio do programa Microsoft Excel 2010®, para avaliar diferenças significativas entre os mesmos e influência das variáveis avaliadas. O índice de significância utilizado foi $p < 0,05$ (Niazi, 2007).

3.3.4. Correlação *in vitro* – *in vivo*

As curvas de concentração plasmática em função do tempo, obtidas do estudo de BD a partir das formulações desenvolvidas e apresentadas no item 3.4.1, foram submetidas ao processo de deconvolução, onde a fração absorvida foi calculada a partir da seguinte Equação 1.3 (Eq. 1.3) (Emami, 2006):

$$C_{VO\ tn} = \frac{1}{D_{IV}} \sum_{i=1}^n \frac{\Delta A_i}{\Delta t_i} \times \Delta ASC_{IV}^{(t_n - t_{i-1})} \quad (\text{Eq. 1.3})$$

Em que:

$C_{VO\ tn}$ = concentração via oral (VO) no tempo n;

D_{IV} = dose administrada por IV;

$\Delta A_i / \Delta t_i$ = diferença na velocidade de absorção (desconhecido);

ΔASC_{IV} = diferença na área sob a curva após administração do produto referência.

O cálculo da fração absorvida por este método requer a comparação entre os dados de concentração plasmática da FF a ser analisada e os dados de uma formulação de referência (Demirturk; Oner, 2003).

Foram utilizados como referência os dados da curva de decaimento plasmático *versus* tempo obtidos após a administração do medicamento referência por via intravenosa (Furosemida IV Teuto® 10 mg/mL).

A fração absorvida (ΔA_i) da furosemida a partir das formulações desenvolvidas e administradas aos voluntários do estudo foi determinada em função da velocidade de absorção ($\Delta A_i / \Delta t_i$). A correlação *in vitro* - *in vivo* foi

estabelecida comparando-se os valores da fração absorvida com os valores da fração dissolvida (porcentagem da quantidade de fármaco dissolvida em função do tempo). Por meio da análise de regressão linear, foi estabelecido o coeficiente de determinação.

Com o intuito de verificar se os cálculos das frações absorvidas estavam corretos, utilizou-se a Equação 3.1 (Eq. 3.1) de cálculo de BD absoluta, dado em porcentagem, conforme apresentada a seguir (Shargel; Yu, 2012):

$$F (\%) = \frac{ASC_{0-t (EV)} \times Dose_{IV}}{ASC_{0-t (IV)} \times Dose_{EV}} \times 100 \text{ (Eq. 3.1)}$$

Em que:

F (%) = BD absoluta dada em porcentagem

$ASC_{0-t (EV)}$ = Área sob a curva de decaimento plasmático *versus* tempo de zero ao tempo t na formulação extravascular

$ASC_{0-t (IV)}$ = Área sob a curva de decaimento plasmático *versus* tempo de zero ao tempo t na formulação intravenosa

$Dose_{EV}$ = Dose administrada por via extravascular (50 mg de furosemida)

$Dose_{IV}$ = Dose administrada por via intravenosa (20 mg de furosemida)

3.3.5. Validação Interna

Para realizar a avaliação da previsibilidade da correlação, foi empregada a correlação estabelecida e apresentada no item 3.4.2, para prever as curvas de decaimento plasmático a partir dos perfis de dissolução das formulações A1, A2a e A3.

Desta forma a fração absorvida prevista (ΔA_{ip}) do fármaco foi obtida para cada formulação avaliada a partir dos dados de dissolução *in vitro*, por meio da aplicação da CIVIV. Em seguida, a técnica de convolução, conforme a Equação 1.3 (Eq. 1.3), foi aplicada para obtenção das curvas previstas de concentração plasmática em função do tempo.

A validação interna da CIVIV foi estabelecida a partir da semelhança entre as curvas previstas e as curvas reais de decaimento plasmático da furosemida

para as formulações avaliadas (A1, A2a e A3). A porcentagem de erro de predição (EP%) foi determinada, para os parâmetros $C_{\max}$ e ASC_{0-t} , a partir da Equação 1.5 (Eq. 1.5), apresentada a seguir (Emami, 2006):

$$EP\% = \frac{(\text{Parâmetro observado} - \text{Parâmetro previsto}) \times 100}{\text{Parâmetro previsto}} \quad (\text{Eq. 1.5})$$

3.3.6. Desenvolvimento e validação do método bioanalítico para a quantificação de furosemida em plasma

No presente trabalho, desenvolveu-se e validou-se um método que atende aos critérios de precisão, exatidão, sensibilidade e reprodutibilidade para quantificação de furosemida em plasma humano com emprego de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência, utilizando propranolol como padrão interno (Brasil, 2012). O método está descrito a seguir.

3.3.6.1. Preparação das soluções padrão

Foi preparada solução padrão estoque de furosemida na concentração de 2000 µg/mL em metanol e esta foi armazenada em frasco âmbar em freezer a -20°C. A partir da solução padrão estoque, prepararam-se as soluções padrões de trabalho, as quais foram diluídas em uma mistura de água e metanol na proporção de 90:10 (v/v), nas seguintes concentrações 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0 e 20,0 µg/mL. Estas soluções foram armazenadas em frasco âmbar e conservadas em geladeira a 4°C, sendo que a estabilidade das mesmas foi monitorada diariamente em corrida analítica. A Tabela 3.2 apresenta as diluições realizadas para a obtenção das soluções padrões de trabalho.

Tabela 3.2. Descrição dos volumes empregados da solução padrão de furosemida e da mistura de água e metanol na proporção de 90:10 (v/v) para a obtenção das soluções padrões de trabalho de furosemida

Concentração de solução padrão de furosemida (µg/mL)	Alíquota (µL)	Volume final em mistura de água e metanol 90:10 (v/v) final (mL)	Concentração final de furosemida (µg/mL)
2000	25	100	0,50
2000	50	100	1,00
2000	125	100	2,50
2000	250	100	5,00
2000	375	100	7,50
2000	500	100	10,00
2000	750	100	15,00
2000	1000	100	20,00

A solução padrão estoque de propranolol (padrão interno) de 2,5 mg/mL foi preparada em metanol e armazenada em frasco âmbar em freezer a -20°C. A partir desta solução, preparou-se a solução padrão de trabalho na concentração de 100 µg/mL, da qual foi retirada uma alíquota de 4 mL, e transferida para balão volumétrico de 100 mL. Completou-se então o volume até o menisco com uma mistura de água e metanol 90:10 (v/v). Esta solução foi armazenada em frasco âmbar e conservada em geladeira a 4°C, sendo que a estabilidade da mesma foi monitorada diariamente em corrida analítica.

3.3.6.2. Preparação das amostras de plasma para a obtenção da curva analítica

Para garantir a estabilidade das amostras de plasma, as curvas analíticas foram preparadas diariamente a partir das soluções padrão de furosemida preparadas conforme descrito no item 3.3.6.1. Para a obtenção de cada ponto

da curva analítica, pipetou-se 50 μL de cada uma das soluções padrão de furosemida preparadas e descritas no item 3.3.6.1. A estas soluções adicionaram-se 450 μL de plasma branco e as amostras foram homogeneizadas em agitadores de tubos do tipo vórtex por 30 segundos. A Tabela 3.3 apresenta as diluições realizadas para a obtenção das amostras de plasma padrão de furosemida em plasma para a construção da curva analítica.

Tabela 3.3. Descrição dos volumes empregados da solução padrão de furosemida e de plasma branco para a obtenção das soluções padrão de furosemida para a construção da curva analítica

Concentração de solução padrão de furosemida ($\mu\text{g/mL}$)	Alíquota (μL)	Volume de plasma branco (μL)	Concentração final de furosemida em plasma ($\mu\text{g/mL}$)
0,5	50	450	0,05
1,0	50	450	0,10
2,5	50	450	0,25
5,0	50	450	0,50
7,5	50	450	0,75
10,0	50	450	1,00
15,0	50	450	1,50
20,0	50	450	2,00

3.3.6.3. Preparação das amostras de controle de qualidade

Preparou-se uma solução estoque de 200 $\mu\text{g/mL}$ para a obtenção das amostras de controle de qualidade em plasma, pesando 20 mg de padrão de furosemida em balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com metanol. Para a obtenção das amostras de controles de qualidade em plasma, com diferentes concentrações, e designados de controle de qualidade baixo (CQB), controle de qualidade médio (CQM) e controle de qualidade alto (CQA),

transferiram-se alíquotas da solução estoque de furosemida em metanol (200 µg/mL) em balão volumétrico e adicionou-se plasma branco. O plasma branco foi adicionado e homogeneizado lentamente para que não houvesse formação de espuma. Após atingir o menisco, as amostras de controle de qualidade foram agitadas vigorosamente, garantindo assim a homogeneidade das soluções. A Tabela 3.4 descreve as quantidades empregadas da solução padrão e do plasma branco para o preparo das amostras de controle de qualidade.

Após o preparo, as amostras foram separadas em frascos criogênicos de polipropileno de 4 mL, devidamente identificados. Um conjunto de amostras recém-preparadas (amostra zero) foi analisado e as demais foram armazenadas no freezer a -20°C.

Tabela 3.4. Descrição dos volumes da solução padrão de furosemida 200 µg/mL e do plasma branco para a obtenção dos controles de qualidade, baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA)

Controle de Qualidade	Alíquota	Volume final em plasma branco (mL)	Concentração
	Furosemida 200 µg/mL (µL)		final de furosemida (µg/mL)
CQB	12,5	25	0,10
CQM	37,5	10	0,75
CQA	75,0	10	1,50

3.3.6.4. Extração dos fármacos a partir de amostras de plasma para quantificação de furosemida

A extração dos fármacos a partir das amostras: plasma branco, curva analítica, amostras de controle de qualidade e plasma de voluntários que receberam medicamentos contendo furosemida foram realizadas por meio de extração líquido-líquido com acetato de etila (Abdel-Hamid, 2000).

Adicionaram-se 500 µL de plasma a tubos de ensaio contendo 50 µL de propranolol (padrão interno) na concentração de 100 µg/mL em uma mistura de

água e metanol na proporção de 90:10 (v/v). Essas amostras foram acidificadas com 50 µL de HCl 1 N e foram homogeneizadas por 30 segundos em agitadores de tubo do tipo vórtex. A extração do plasma foi feita por adição de 5,0 mL de acetato de etila. Os tubos de ensaio foram fechados com o auxílio de rolhas esmerilhadas e homogeneizados por 60 segundos em agitadores de tubo do tipo vórtex em velocidade intermediária, para evitar perdas de amostra. Em seguida, os tubos contendo o material foram centrifugados por 10 minutos a 3500 rpm e a fase aquosa foi congelada utilizando gelo seco. Filtrou-se a fase orgânica com filtros de 0,45 µm da Millex® para tubos cônicos e a fase aquosa foi desprezada. Posteriormente, o solvente da fase orgânica foi evaporado sob corrente de nitrogênio em banho-maria a 40°C. O resíduo seco foi ressuspensionado em 250 µL da fase móvel para serem injetados 50 µL no sistema cromatográfico.

3.3.6.5. Condições para a análise cromatográfica em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A fase móvel utilizada foi constituída por uma mistura de tampão fosfato 20 mM com pH 3,0 e acetonitrila na proporção de 70:30 (v/v), que foi filtrada em membrana filtrante de 47 mm de diâmetro e poros de 0,22 µm e posteriormente degaseificada em banho ultrassônico por 10 minutos. A fase móvel foi eluída com fluxo de 1 mL/minuto.

Como fase estacionária, empregou-se a pré-coluna e coluna da marca Phenomenex®, modelo Synergy Fusion RP®, C18, com poros de 5 µm e dimensões de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro, com temperatura do forno da coluna em 40°C.

O sistema cromatográfico foi acoplado a um detector de fluorescência, que foi ajustado com comprimentos de onda de excitação de 268 nm e de emissão de 410 nm.

3.3.6.6. Validação do Método Analítico para Quantificação de Furosemida em Plasma Humano

A validação foi realizada seguindo as diretrizes do Guia para Validação de métodos bioanalíticos do FDA (United States, 2001) e da RDC 27/2012 da ANVISA (Brasil, 2012). Para esta etapa, foram determinados os parâmetros de especificidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, estabilidade, recuperação, precisão e exatidão.

3.3.6.6.1. Especificidade

Os termos especificidade ou seletividade referem-se à sua capacidade de resposta a um determinado composto de interesse associado a uma matriz com várias substâncias químicas detectáveis ou não. Como existem poucos métodos que respondem a um único analito, o termo seletividade é usualmente o mais empregado (Borges, 2006).

Este parâmetro foi investigado pela análise de seis amostras de plasma diferentes, quatro amostras de plasma branco, uma amostra de plasma hemolisado e uma amostra de plasma lipêmico, em comparação com uma solução contendo o padrão (furosemida), em concentração próxima ao limite de quantificação, e o padrão interno.

O plasma branco foi obtido de voluntários sadios após a centrifugação de sangue colheita do em tubo contendo anticoagulante, neste caso heparina, e isento do fármaco e de padrão interno. O plasma lipêmico foi obtido da mesma maneira após o voluntário receber uma refeição rica em gordura. O plasma hemolisado foi obtido após o congelamento de amostra de sangue e posterior centrifugação por 10 minutos a 3500 rpm.

3.3.6.6.2. Linearidade

Por linearidade, entende-se como sendo a capacidade de um método analítico em demonstrar que os resultados obtidos são diferentes e diretamente

proporcionais à concentração do analito da amostra, dentro de um intervalo especificado (Brasil, 2012).

Para a construção da curva analítica adicionou-se padrão de furosemida às amostras de plasma branco de voluntários em oito concentrações diferentes (0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50 e 2,00 µg/mL), em seis repetições. Na análise da curva analítica ainda foram incluídas amostras de plasma branco e de plasma branco adicionado de padrão interno. O intervalo da curva analítica incluiu o limite de quantificação e os valores de 80% da concentração mais baixa e 120% da concentração mais alta do intervalo que se pretendiam analisar. As amostras utilizadas na curva analítica cuja linearidade está na faixa de 0,05 a 2,00 µg/mL, foram preparadas conforme descrito no item 3.3.6.2.

3.3.6.6.3. Limite de Detecção

Segundo a RDC 27/2012, o limite de detecção é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (Brasil, 2012).

Para estabelecer este parâmetro, utilizaram-se amostras de plasma branco com concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível observado, em triplicata.

3.3.6.6.4. Limite de Quantificação

É definido como a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (Brasil, 2012).

Para estabelecer este parâmetro, utilizaram-se amostras de plasma com concentrações decrescentes do fármaco, em seis repetições, até o menor nível quantificado com precisão e exatidão aceitáveis, que, de acordo com a legislação vigente, deve ser menor ou igual a 20% (Brasil, 2012).

3.3.6.6.5. Recuperação

A recuperação indica a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. São desejáveis valores próximos a 100% de recuperação para o fármaco e para o padrão interno, no entanto admitem-se valores menores desde que sejam obtidos resultados precisos e exatos (Brasil, 2012).

A recuperação foi determinada comparando-se os resultados obtidos pela quantificação das amostras de controle de qualidade submetidas ao processo de extração, conforme descrito no item 3.3.6.4, aos resultados de análises de amostras não submetidas ao processo de extração, ou seja, os analitos foram adicionados ao plasma branco extraído previamente. Este parâmetro foi determinado a partir da análise das amostras de controle de qualidade em três concentrações diferentes de furosemida (CQB, CQM, CQA), preparados conforme descrito no item 3.3.6.3, em seis repetições.

Para este parâmetro deseja-se respostas próximas a 100% para a recuperação a partir do processo de extração do padrão e do padrão interno. Entretanto, admitem-se valores menores de recuperação, desde que o método seja preciso e exato (Brasil, 2012).

3.3.6.6.6. Precisão

A precisão do método analítico é o grau de concordância entre resultados de medidas independentes em torno de um valor central, efetuadas repetidas vezes à mesma amostra (USP, 2012). Lembrando que o desvio não deve exceder 15%, exceto para o limite de quantificação que é de 20% (Brasil, 2012).

A precisão foi determinada por meio da repetibilidade do método. Foi avaliada por meio dos resultados obtidos em análises das amostras de controle de qualidade em três concentrações diferentes (CQB, CQM, CQA), preparados conforme descrito no item 3.3.6.3, em seis repetições por concentração e foi calculada utilizando a seguinte equação 2.8 (Eq. 2.8):

$$CV (\%) = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Média}} \times 100 \text{ (Eq. 2.8)}$$

As análises foram feitas comparando-se os resultados obtidos a partir de uma mesma corrida cromatográfica (precisão intradia) e de corridas em dias diferentes (precisão interdias).

3.3.6.6.7. Exatidão

A exatidão do método deve ser determinada utilizando-se, no mínimo, três concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de variação do procedimento, realizando-se, no mínimo, seis repetições por concentração. Tal parâmetro é determinado em uma mesma corrida analítica (exatidão intradia) e em corridas diferentes (exatidão interdias). Lembrando que o desvio não deve exceder 15%, exceto para o limite de quantificação que é de 20% (Brasil, 2012).

Este parâmetro foi determinado pela análise de três concentrações diferentes de amostras de controle de qualidade (CQB, CQM, CQA), preparados conforme descrito no item 3.3.6.3, com seis repetições em uma mesma corrida (intradia) ou em três corridas diferentes (interdias), e calculado utilizando a seguinte equação 2.9 (Eq. 2.9):

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{Concentração média determinada}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \text{ (Eq. 2.9)}$$

3.3.6.6.8. Estabilidade

A estabilidade é avaliada de acordo com as condições de manuseio e armazenamento da amostra (United States, 2001) e visa garantir que o fármaco não sofra alterações entre a colheita e a análise da amostra (Causon, 1997).

Conforme recomendado pela RDC 27/2012, foram analisados os seguintes parâmetros de estabilidade (Brasil, 2012):

- ✓ Estabilidade à temperatura ambiente por 4 horas, denominada de curta duração;

- ✓ Estabilidade de longa duração, que deve exceder o tempo entre a primeira colheita e a análise da última amostra, de acordo com o protocolo de BE;
- ✓ Estabilidade das soluções-padrão utilizadas na preparação diária da curva analítica;
- ✓ Estabilidade de amostras de plasma, mantidas a -20°C e submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento;
- ✓ Estabilidade de pós-processamento, ou seja, amostras pós-processadas são mantidas à temperatura ambiente por 24 e 48 horas.

Em todos os critérios analisados, foram aceitos desvios inferiores a 15% em relação a amostra recém-preparada e imediatamente quantificada (Brasil, 2012).

3.3.6.6.8.1. Estabilidade de Curta Duração

A avaliação foi realizada em triplicata utilizando amostras de plasma de controle de qualidade em três concentrações diferentes (CQB, CQM, CQA), preparadas conforme descrito no item 3.3.6.3, submetidas ao descongelamento natural e mantidas à temperatura ambiente por 4 horas. Após este período as amostras foram analisadas e os resultados comparados com os das amostras recém-preparadas e imediatamente analisadas.

3.3.6.6.8.2. Estabilidade de Longa Duração

Este parâmetro permitiu a avaliação da estabilidade das amostras durante o período de tempo em que foram mantidas em congelador, compreendido entre a data da colheita das amostras de plasma de voluntários que receberam os comprimidos contendo a furosemida e a data de término da etapa analítica. Este período foi de 60 dias. Os resultados das amostras de controle de qualidade (CQB, CQM, CQA), preparados conforme descrito no item 3.3.6.3, analisadas, em triplicatas, logo ao final do preparo das amostras e após serem mantidas a -20°C por 60 dias. Os resultados das análises das diferentes amostras foram posteriormente comparados entre si.

3.3.6.6.8.3. Estabilidade das Soluções Padrão

A avaliação da estabilidade das soluções padrão de furosemida em mistura de água e metanol, na proporção de 90:10 (v/v), foi feita diariamente durante a validação e análise das amostras de voluntários, através do monitoramento das áreas dos sinais cromatográficos obtidos. Os resultados foram comparados aos obtidos a partir das soluções padrão recém-preparadas e analisadas em seguida.

3.3.6.6.8.4. Estabilidade de Ciclos de Congelamento e Descongelação

A determinação deste parâmetro foi feita utilizando amostras de controle de qualidade em triplicata e em três concentrações diferentes (CQB, CQM, CQA), preparados conforme descrito no item 3.3.6.3, submetidas a ciclos com as seguintes condições: congelamento à -20°C por 12 horas e descongelamento em temperatura ambiente, e repetidos sucessivamente até completar três ciclos. A concentração do fármaco nas amostras de plasma de controle de qualidade foi determinada nos três ciclos e, no tempo zero, correspondente ao momento em que as amostras de controle de qualidade foram preparadas e analisadas, antes do congelamento.

3.3.6.6.8.5. Estabilidade Pós-Processamento

Este parâmetro permitiu a avaliação da estabilidade das amostras processadas, contemplando o período de espera no auto-injetor do cromatógrafo. Foram analisadas amostras de controle de qualidade (CQB, CQM, CQA), preparadas conforme descrito no item 3.3.6.3, em triplicata processadas e mantidas por 24 e 48 horas em temperatura ambiente.

3.3.6.6.10. Validação do processo de diluição

Algumas amostras de voluntários apresentaram concentrações acima do limite máximo de quantificação de 2,0 µg/mL, nestes casos efetuou-se a diluição tomando-se 167 µL da amostra do voluntário e adicionando-se 333 µL de plasma branco do próprio voluntário. A validação deste processo de diluição foi realizada pela análise da amostra diluída paralelamente com a análise de CQA diluído em triplicata, tomando-se 167 µL do CQA e adicionando-se 333 µL de plasma branco. Após agitação em vórtex por 10 segundos, prosseguiu-se a extração conforme descrito na metodologia analítica 3.3.6.4.

Para a validação desse processo de diluição, foram aceitos resultados com precisão, exatidão e desvios em relação à concentração média obtida inferiores a 15 % a partir de uma triplicata de CQA.

3.4. Resultados e Discussão

3.4.1. Ensaio de Biodisponibilidade

O estudo clínico foi realizado no Hospital Universitário da USP em quatro fases. Entre as fases do estudo houve um período de eliminação (*wash out*) adequado, correspondente a, no mínimo, 10 vezes o valor da meia-vida de eliminação do fármaco. Assim, no caso da furosemida, o *wash out* deve ser no mínimo um dia (Korolkovas, 2007; Brasil, 2006). No presente estudo, este período foi de sete dias. Os voluntários foram submetidos à avaliação clínica no início de cada fase e no final do estudo. Não houve desistências e nem intercorrências que pudessem levar a exclusão de um voluntário.

Usualmente, os estudos de correlação *in vitro* – *in vivo* são realizados com pelo menos 6 voluntários (Demirtürk; Öner, 2003). Portanto, foram inicialmente selecionados 15 voluntários sadios para o estudo, destes apenas 12 voluntários foram incluídos pois cumpriram com todos os critérios de inclusão conforme exposto no item 3.3.3.1.1. Destes 12 voluntários, com idade média de

27,7 anos, peso e altura médios de 69,5 Kg e 171,6 cm, respectivamente, 5 eram do sexo masculino e 7 do sexo feminino.

A solução injetável de furosemida (Furosemida IV Teuto® 10 mg/mL), disponível no mercado, foi empregada como referência, em uma das fases do estudo. A administração intravenosa foi utilizada com a finalidade de minimizar erros decorrentes da baixa BD oral e da alta variabilidade na extensão de absorção da furosemida. Conforme os dados da literatura, os valores de BD da furosemida se apresentam entre 11 e 84%, com médias de 40% (Kim *et al.*, 2000). Desta forma, o procedimento de incluir no estudo a administração intravenosa, possibilitou isolar os parâmetros de eliminação do fármaco para cada voluntário, tais como K_{el} e $t_{(1/2)el}$. Os voluntários foram acompanhados pelo médico, responsável pela etapa clínica, durante todo o estudo.

As amostras de plasma foram obtidas e analisadas conforme descrito nos itens 3.3.6.4 e 3.3.6.5. A Figura 3.1. apresenta os perfis de decaimento plasmático médios (12 voluntários) da furosemida obtidos após a administração das formulações contendo 50 mg de fármaco em complexo de furosemida e HP- β -CD e com diferentes concentrações de HPMC (A1 – 30%, A2a – 17,5% e A3 – 10%) e do produto referência com 20 mg de furosemida (Furosemida IV Teuto® 10 mg/mL). Os parâmetros farmacocinéticos derivados dos perfis de decaimento plasmático e determinados conforme descrito no item 3.3.3.2.1 são apresentados nas Tabelas 3.5 a 3.8. As curvas individuais de decaimento plasmático *versus* tempo estão apresentadas no ANEXO D.

Figura 3.1. Curvas de decaimento plasmático médio da furosemida após administração das formulações desenvolvidas contendo complexos de furosemida e HP- β -CD (A1, A2a e A3) (50 mg furosemida) e do medicamento de referência (Furosemida IV Teuto[®]) (20 mg furosemida) aos 12 voluntários.

Tabela 3.5. Parâmetros farmacocinéticos obtidos a partir da análise da furosemida nos plasmas dos 12 voluntários após a administração da formulação desenvolvida A1

Voluntário	C _{max} (µg/mL)	T _{max} (h)	t _{(1/2)el}	K _{el}	ASC _{0-t}	ASC _{0-∞}
1	0,70	4,00	1,19	0,58	2,57	2,65
2	0,83	4,00	1,19	0,58	2,20	2,61
3	0,55	1,00	2,63	0,26	1,10	1,27
4	0,82	2,50	1,69	0,41	1,81	1,87
5	0,78	1,00	0,91	0,76	1,56	1,62
6	0,38	1,00	1,01	0,69	0,77	0,77
7	0,90	3,00	0,77	0,90	1,30	1,32
8	0,86	1,00	0,86	0,80	1,83	1,83
9	0,46	1,50	3,11	0,22	1,21	1,47
10	0,37	1,50	3,47	0,20	1,03	1,29
11	0,72	3,00	3,48	0,20	1,32	1,64
12	0,54	1,50	3,71	0,19	1,15	1,44
Média	0,66	2,08	2,00	0,48	1,49	1,65
DP	0,19	1,16	1,18	0,27	0,52	0,54
CV	28,74	55,90	58,83	55,36	35,19	32,83

A1 = 30% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP-β-CD; 0,5% Est. Mg.; 4,5% C.M.; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação (%); C_{max} = concentração plasmática máxima; T_{max} = tempo necessário para atingir C_{max}; t_{(1/2)el} = meia-vida de eliminação; K_{el} = constante de eliminação; ASC_{0-t} = área sob a curva de zero ao tempo t; ASC_{0-∞} = área sob a curva de zero ao infinito

Tabela 3.6. Parâmetros farmacocinéticos obtidos a partir da análise da furosemida nos plasmas dos 12 voluntários após a administração da formulação desenvolvida A2a

Voluntário	C_{max} (µg/mL)	T_{max} (h)	t_{(1/2)el}	K_{el}	ASC_{0-t}	ASC_{0-∞}
1	0,98	1,50	2,11	0,33	2,13	2,34
2	1,20	2,50	2,52	0,28	2,73	3,02
3	1,28	2,50	3,48	0,20	2,44	2,75
4	1,18	2,00	1,13	0,61	3,18	3,20
5	1,10	2,00	0,93	0,75	2,83	2,84
6	1,23	3,00	1,99	0,35	2,13	2,24
7	2,10	1,50	3,15	0,22	2,44	2,97
8	1,23	1,50	1,02	0,68	1,22	1,25
9	1,24	2,50	3,05	0,23	2,94	3,18
10	0,59	1,50	3,01	0,23	1,16	1,43
11	1,34	3,00	5,06	0,14	1,96	2,45
12	1,09	1,50	3,65	0,19	1,34	1,62
Média	1,21	2,08	2,59	0,35	2,21	2,44
DP	0,34	0,60	1,23	0,21	0,68	0,68
CV	28,18	28,64	47,49	59,86	30,90	28,07

A2a = 17,5% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP-β-CD; 0,5% Est. Mg.; 17% C.M.; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação (%); C_{max} = concentração plasmática máxima; T_{max} = tempo necessário para atingir C_{max}; t_{(1/2)el} = meia-vida de eliminação; K_{el} = constante de eliminação; ASC_{0-t} = área sob a curva de zero ao tempo t; ASC_{0-∞} = área sob a curva de zero ao infinito

Tabela 3.7. Parâmetros farmacocinéticos obtidos a partir da análise da furosemida nos plasmas dos 12 voluntários após a administração da formulação desenvolvida A3

Voluntário	C_{max} (µg/mL)	T_{max} (h)	t_{(1/2)el}	K_{el}	ASC_{0-t}	ASC_{0-∞}
1	1,85	1,50	1,59	0,44	4,31	4,48
2	1,31	1,50	1,70	0,41	3,04	3,19
3	2,06	1,00	2,46	0,28	2,74	2,88
4	2,51	0,50	0,73	0,95	3,78	3,79
5	1,58	3,00	1,33	0,52	2,63	2,64
6	2,10	1,00	1,26	0,55	3,80	3,83
7	3,04	2,00	1,06	0,66	3,13	3,14
8	2,12	1,00	3,85	0,18	2,18	2,30
9	2,78	1,50	2,59	0,27	2,92	3,15
10	2,03	2,50	2,58	0,27	2,83	3,07
11	2,58	2,50	3,48	0,20	2,51	2,80
12	1,75	1,50	3,73	0,19	2,08	2,38
Média	2,14	1,63	2,19	0,41	3,00	3,14
DP	0,51	0,74	1,08	0,23	0,67	0,63
CV	23,60	45,69	49,13	56,59	22,43	20,23

A3 = 10% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP-β-CD; 0,5% Est. Mg.; 24,5% C.M.; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação (%); C_{max} = concentração plasmática máxima; T_{max} = tempo necessário para atingir C_{max}; t_{(1/2)el} = meia-vida de eliminação; K_{el} = constante de eliminação; ASC_{0-∞} = área sob a curva de zero ao tempo t; ASC_{0-t} = área sob a curva de zero ao infinito

Tabela 3.8. Parâmetros farmacocinéticos obtidos por extrapolação da equação de decaimento plasmático da furosemida nos 12 voluntários após a administração solução de Furosemida IV Teuto® (10 mg/mL)

Voluntário	C _{max} (µg/mL)	T _{max} (h)	t _{(1/2)el}	K _{el}	ASC _{0-t}	ASC _{0-∞}
1	4,31	0,00	1,04	0,68	4,59	4,63
2	8,06	0,00	0,58	1,20	7,70	7,93
3	5,11	0,00	0,61	1,14	4,93	5,00
4	2,83	0,00	0,55	1,27	2,59	2,61
5	4,45	0,00	0,49	1,42	4,94	4,99
6	3,07	0,00	0,61	1,14	2,98	3,01
7	4,01	0,00	0,88	0,79	5,33	5,34
8	4,21	0,00	0,67	1,04	4,28	4,29
9	1,79	0,00	0,63	1,10	2,02	2,24
10	2,45	0,00	0,56	1,24	2,77	3,05
11	3,22	0,00	0,81	0,86	3,34	3,94
12	3,30	0,00	0,55	1,26	3,33	3,66
Média	3,90	0,00	0,66	1,09	4,07	4,22
DP	1,61	0,00	0,16	0,22	1,56	1,54
CV	41,31	0,00	24,37	19,97	38,46	36,49

IV = medicamento referência intravenoso; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação (%); C_{max} = concentração plasmática máxima; T_{max} = tempo necessário para atingir C_{max}; t_{(1/2)el} = meia-vida de eliminação; K_{el} = constante de eliminação; ASC_{0-∞} = área sob a curva de zero ao tempo t; ASC_{0-t} = área sob a curva de zero ao infinito

A Tabela 3.9 apresenta um resumo de todos os valores médios, desvios padrões e coeficientes de variação dos parâmetros farmacocinéticos contendo os valores médios, desvios padrões e coeficientes de variação obtidos a partir da análise da furosemida nos plasmas dos 12 voluntários após a administração das formulações desenvolvidas A1, A2a e A3 e da solução injetável de Furosemida IV Teuto® (10 mg/mL).

Tabela 3.9. Valores médios, desvio padrão e coeficiente de variação dos parâmetros farmacocinéticos comparativos obtidos a partir da análise da furosemida nos plasmas dos 12 voluntários após a administração das formulações desenvolvidas A1, A2a e A3 e da solução de Furosemida IV Teuto® (10 mg/mL)

Formulação		$C_{\max}$ ($\mu\text{g/mL}$)	$T_{\max}$ (h)	$t_{(1/2)el}$	K_{el}	ASC_{0-t}	$ASC_{0-\infty}$
A1	Média	0,66	2,08	2,00	0,48	1,49	1,65
	DP	0,19	1,16	1,18	0,27	0,52	0,54
	CV	28,74	55,90	58,83	55,36	35,19	32,83
A2a	Média	1,21	2,08	2,59	0,35	2,21	2,44
	DP	0,34	0,60	1,23	0,21	0,68	0,68
	CV	28,18	28,64	47,49	59,86	30,90	28,07
A3	Média	2,14	1,63	2,19	0,41	3,00	3,14
	DP	0,51	0,74	1,08	0,23	0,67	0,63
	CV	23,60	45,69	49,13	56,59	22,43	20,23
IV	Média	3,90	0,00	0,66	1,09	4,07	4,22
	DP	1,61	0,00	0,16	0,22	1,56	1,54
	CV	41,31	0,00	24,37	19,97	38,46	36,49

A1 = 30% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 4,5% C.M.; A2a = 17,5% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 17% C.M.; A3 = 10% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 24,5% C.M.; IV = medicamento referência intravenoso; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação (%); $C_{\max}$ = concentração plasmática máxima; $T_{\max}$ = tempo necessário para atingir $C_{\max}$; $t_{(1/2)el}$ = meia-vida de eliminação; K_{el} = constante de eliminação; ASC_{0-t} = área sob a curva de zero ao tempo t; $ASC_{0-\infty}$ = área sob a curva de zero ao infinito

A maioria dos trabalhos publicados que abordam estudos BD/BE *in vivo* com o fármaco furosemida utiliza formas farmacêuticas (FFs) de liberação imediata (Bragatto *et al.*, 2011; Sora *et al.*, 2010; Najib *et al.*, 2003; McNamara *et al.*, 1987). Apenas estudos que tentam estabelecer algum tipo de correlação com dados obtidos *in vitro*, desenvolveram e utilizaram alguma FF de liberação modificada no ensaio *in vivo* (Özdemir; Ordu; Özkan, 2000; Santus *et al.*, 1997).

O trabalho publicado pelo grupo de Özdemir, Ordu e Özkan (2000) compara uma FF convencional com uma FF flutuante de liberação modificada ambas contendo 40 mg de furosemida. As FFs foram submetidas ao estudo de dissolução e também foram administradas a seis voluntários sadios. Os parâmetros farmacocinéticos obtidos para as formas convencionais e para a FF flutuante obtidos foram, respectivamente: C_{max} (0,807 a 1,129 $\mu\text{g/mL}$; 0,897 a 1,537 $\mu\text{g/mL}$); T_{max} (1,10 h; 2,10 h) e ASC_{0-8} ($3,46 \pm 0,052 \mu\text{g.h/mL}$; $6,30 \pm 0,17 \mu\text{g.h/mL}$). Comparando a formulação flutuante de liberação modificada com a desenvolvida no presente trabalho (formulação A2a contendo 50 mg de furosemida), verifica-se que os valores obtidos para C_{max} e T_{max} são compatíveis com o descrito na literatura. No entanto, os valores obtidos para o parâmetro ASC_{0-8} , a partir da formulação A2a foi inferior ao encontrado a partir da FF flutuante. Isto pode ter ocorrido principalmente em decorrência das diferentes tecnologias utilizadas para o desenvolvimento das FFs, uma vez que estes autores trabalharam com FF flutuante de liberação modificada e no presente trabalho foi utilizado a formulação de comprimidos matriciais. É importante ressaltar que a furosemida é um fármaco que apresenta alta variabilidade em relação à sua BD e que diferentes fatores podem aumentar esta variabilidade, tais como: diferenças nas populações que participaram dos estudos *in vivo*; diferenças em relação às formulações desenvolvidas e tecnologia empregadas; os aspectos relacionados à absorção sítio-específica e ao metabolismo pré-sistêmico, entre outros (Hite; Turner; Federici, 2003; Özdemir; Ordu; Özkan, 2000; Ponto, Schoenwald, 1990).

Em outro estudo, os pesquisadores Santus e colaboradores (1997), desenvolveram um trabalho com duas FFs de liberação modificada, contendo 40

mg de furosemida, sendo que uma delas tinha propriedades bioadesivas. Essas formulações foram submetidas ao estudo de dissolução e ao estudo *in vivo* com seis voluntários. Os parâmetros farmacocinéticos para as formas de liberação modificada e liberação modificada bioadesiva obtidos após a administração pela via oral foram, respectivamente: $C_{\max}$ ($0,260 \pm 0,102 \mu\text{g/mL}$; $0,193 \pm 0,110 \mu\text{g/mL}$); $T_{\max}$ ($2,40 \pm 1,40 \text{ h}$; $2,20 \pm 0,40 \text{ h}$) e ASC_{0-12} ($1,170 \pm 0,449 \mu\text{g/mL}$; $0,911 \pm 0,438 \mu\text{g.h/mL}$). Considerando estes valores e realizando uma comparação com os resultados obtidos no presente trabalho, verifica-se que os valores de $T_{\max}$ obtidos para as formulações de comprimidos matriciais, A1 e A2a, são semelhantes àqueles obtidos pelos referidos autores. Por outro lado, em relação ao $C_{\max}$, observa-se que os valores descritos pelos autores são inferiores aos valores obtidos no presente trabalho, para a formulação A1, com 30% de HPMC. Porém, as formulações desenvolvidas no presente trabalho continham 50 mg de furosemida. No entanto o grupo de Santus e colaboradores (1997) obtiveram valores inferiores aos publicados pelo grupo de Özdemir, Ordu e Özkan (2000) para os parâmetros $C_{\max}$ e $T_{\max}$ em formulações contendo 40 mg de furosemida e administradas por via oral.

Os valores de precisão (CV) para os parâmetros farmacocinéticos das formulações administradas durante o ensaio de BD do presente estudo, apresentados na Tabela 3.9, são um indício de que este estudo refletiu as características da furosemida descritas na literatura. Considera-se que este fármaco apresenta absorção errática e irregular e alta variabilidade intra e intervoluntários (Granero *et al.*, 2010; Ponto; Schoenwald, 1990).

Considerando os parâmetros, $C_{\max}$ e Asc_{0-t} , nota-se grande diferença entre os resultados obtidos pela administração das formulações A1, A2a, A3 e furosemida IV. A formulação Furosemida IV foi administrada pela via intravenosa e, nesta circunstância, as etapas de liberação e absorção inexistem. Tal fato pode ser verificado na Figura 3.1, por meio de seu perfil de decaimento plasmático. Por outro lado, as formulações A1, A2a e A3 são comprimidos de liberação modificada, que apresentam diferentes concentrações de HPMC, polímero utilizado para modificar a liberação do fármaco e que apresenta impacto significativo na cinética de liberação

(Siepmann; Peppas, 2012). O comportamento observado em relação à dissolução (*in vitro*), dados apresentados no Capítulo 2 – item 2.3.7, foi coerente com os resultados de BD obtidos a partir destas formulações. Conforme demonstrado na Figura 3.1, concentrações mais altas de HPMC (formulação A1) impactaram na absorção da furosemida, provavelmente em função da diminuição da dissolução (liberação do fármaco), parte deste não se dissolve e conseqüentemente não é absorvido. Os perfis de decaimento plasmático indicam que a quantidade absorvida de furosemida é menor quanto maior é a concentração de polímero (HPMC) na formulação. Diante do exposto, identifica-se que o aumento da concentração de HPMC, promoveu redução de C_{max} e ASC_{0-t} .

Portanto, as formulações A1, A2a e A3 apresentaram perfis distintos de dissolução nos ensaios com os aparatos II e IV, conforme item 2.3.7. Assim, a liberação da furosemida a partir da formulação A1 mostrou-se mais lenta com menor porcentagem dissolvida, uma vez que esta tem o maior percentual de HPMC (30%). Por outro lado a furosemida foi rapidamente liberada, com maior porcentagem dissolvida a partir da formulação A3, que apresentou o menor percentual de HPMC (10%).

Este mesmo comportamento foi observado no trabalho de Ghimire e colaboradores (2010). Os pesquisadores desenvolveram duas formulações contendo diferentes quantidades de HPMC (20 e 40%) e um radiofármaco (^{99m}TC -DTPA). O estudo de dissolução, com aparato II, com velocidade de agitação de 50 e 100 rpm e meio de dissolução de água destilada (1 L), demonstrou que quanto maior a quantidade de HPMC menor é a quantidade de fármaco liberada a partir da formulação. Essas formulações foram administradas em um grupo de 11 voluntários. Os autores concluíram, baseados nos resultados obtidos por cintilografia, que a quantidade de fármaco absorvida era inversamente proporcional a quantidade de HPMC na formulação, portanto quantidades maiores de HPMC levam a uma diminuição no pico plasmático.

O mesmo comportamento foi descrito no trabalho de Mourão (2009), onde foram desenvolvidas formulações de diclofenaco sódico e diferentes proporções de HPMC (10 a 50%). Foram realizados estudos de dissolução empregando diferentes

condições e com os aparatos I, II, III e IV. Estes ensaios demonstraram que o perfil de liberação do fármaco a partir dos comprimidos foi maior quanto menor a proporção de HPMC presente na formulação. Neste estudo, foram selecionadas três formulações que foram administradas a seis voluntários sadios. Os perfis de decaimento plasmático obtidos após a administração dos comprimidos corroboraram os perfis de dissolução, portanto formulações contendo maior quantidade de HPMC apresentaram concentrações menores do fármaco em plasma.

A partir dos coeficientes de variação (CV) das formulações A1, A2a, A3 e IV, observa-se que a variação foi maior na solução IV do que nas formulações desenvolvidas (A1, A2a e A3). Portanto, os resultados sugerem que a ciclodextrina auxiliou na diminuição da variabilidade da furosemida no estudo de biodisponibilidade *in vivo*.

Os parâmetros C_{max} , T_{max} e ASC_{0-t} foram submetidos à análise de variância (ANOVA) fator único conforme apresentado na Tabela 3.10.

Tabela 3.10. Avaliação comparativa dos parâmetros farmacocinéticos (C_{max} , T_{max} e ASC_{0-t}) por ANOVA fator único para as formulações A1, A2a, A3 e IV administradas aos 12 voluntários

	C_{max}	T_{max}	ASC_{0-t}
A1 – A2a	< 0,00001	0,99999	0,00814
A1 – A3	< 0,00001	0,26262	< 0,00001
A1 – IV	< 0,00001	< 0,00001	0,00002
A2a – A3	0,00003	0,10970	0,00933
A2a – IV	< 0,00001	< 0,00001	0,00105
A3 – IV	0,00032	< 0,00001	0,04060

p = índice de significância ANOVA – fator único; DP = desvio-padrão da média (n=12); A1 = 30% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 4,5% C.M.; A2a = 17,5% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 17% C.M.; A3 = 10% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 24,5% C.M.; IV = medicamento referência intravenoso.

Considerando os valores de $C_{\max}$ e ASC_{0-t} , é observada diferença significativa entre as formulações A1, A2a, A3 e IV. Para o parâmetro $T_{\max}$, que apresentou maior variação entre os voluntários, visualizado a partir dos altos valores de coeficiente de variação (CV), foi observada diferença significativa apenas entre as formulações A1 – IV ($p < 0,00001$), A2a – IV ($p < 0,00001$) e A3 – IV ($p < 0,00001$).

Em relação aos parâmetros $C_{\max}$ e ASC_{0-t} , verifica-se grande diferença entre as formulações A1, A2a e A3. Estas diferenças, somadas às distinções entre os perfis de dissolução, demonstram que os dados obtidos a partir dos estudos *in vitro* (dissolução) e dos estudos *in vivo* (BD) das formulações desenvolvidas, A1, A2a e A3, estão adequados para o estabelecimento da CIVIV.

3.4.2. Correlação *in vitro* – *in vivo*

Conforme descrito no Capítulo 1, a CIVIV pode ser definida como um modelo matemático preditivo que descreve uma relação racional entre uma propriedade *in vitro* de uma forma farmacêutica e uma resposta biológica *in vivo*. Em geral, a propriedade *in vitro* refere-se às características de dissolução (velocidade ou extensão da dissolução ou liberação do fármaco), enquanto que a resposta *in vivo* é a concentração plasmática do fármaco ou a quantidade absorvida (Cardot *et al.*, 2007; Emami, 2006; United States, 1997a). As CIVIV nível A empregam dados de absorção expressos como porcentagem da dose absorvida em função do tempo. Desta forma, para obtenção dos valores de fração absorvida do fármaco a partir das curvas de decaimento plasmático, são utilizadas as técnicas de deconvolução modelo-dependente (Wagner-Nelson e Loo-Riegelman) ou modelo independente (deconvolução numérica), descritas anteriormente no item 1.3 (Capítulo 1) (Emami, 2006; Brasil, 2002).

No desenvolvimento de um estudo de correlação *in vitro* - *in vivo* (CIVIV), a fração absorvida do fármaco pode ser determinada pela utilização de modelo-independente ou modelo-depedente, que considera o modelo farmacocinético.

Neste estudo, optou-se pelo modelo-independente para o desenvolvimento da CIVIV, que foi realizado pelo método de deconvolução numérica para estimar a fração absorvida. Conforme equação 1.3 (Eq. 1.3), é necessário determinar a diferença da ASC em diversos tempos ($ASC_{tn-(ti-1)} - ASC_{tn-ti}$), incluindo tempos em que não foi realizada a colheita. Deste modo, a concentração plasmática para o cálculo da ASC, foi extrapolada a partir da equação de decaimento plasmático apresentada na Tabela 3.11. A Tabela 3.12 apresenta a concentração extrapolada a partir das equações de decaimento plasmático em cada tempo. A concentração extrapolada foi utilizada no cálculo de fração absorvida.

Tabela 3.11. Equações de decaimento plasmático obtidas a partir das curvas de concentração plasmática *versus* tempo para cada um dos voluntários do estudo, após administração do Furosemida IV Teuto® 20 mg a voluntários sadios

Voluntário	Equação
Voluntário 1	$y = 4,3085e^{-1,035x}$
Voluntário 2	$y = 8,062e^{-1,198x}$
Voluntário 3	$y = 5,1101e^{-1,143x}$
Voluntário 4	$y = 2,8313e^{-1,27x}$
Voluntário 5	$y = 4,4524e^{-1,421x}$
Voluntário 6	$y = 3,0691e^{-1,137x}$
Voluntário 7	$y = 4,0076e^{-0,792x}$
Voluntário 8	$y = 4,2116e^{-1,041x}$
Voluntário 9	$y = 1,7868e^{-1,097x}$
Voluntário 10	$y = 2,4486e^{-1,241x}$
Voluntário 11	$y = 3,2184e^{-1,185x}$
Voluntário 12	$y = 3,3046e^{-1,26x}$

Tabela 3.12. Concentrações plasmáticas determinadas e extrapoladas utilizando as equações de decaimento plasmático obtida pela curva de concentração plasmática *versus* tempo após administração intravenosa da Furosemida IV Teuto® 20 mg para cada um dos voluntários

[illegible]

A partir da Equação 1.3 (Eq. 1.3), apresentada no item 3.3.4, foram determinadas as frações absorvidas (ΔA_i em mg) de furosemida para cada formulação teste e para cada voluntário, utilizando os dados da concentração plasmática nos tempos t após administração das formulações teste A1, A2a e A3 (C_{V0tn}), a dose do produto referência IV ($D_{IV} = 20$ mg) e os valores de ASC_{0-t} após administração do medicamento de referência. Os respectivos percentuais médios de fração absorvida, considerando a dose de 50 mg administrados através das Formulações A1, A2a e A3 estão apresentados na Figura 3.2.

Figura 3.2. Fração absorvida percentual média *versus* tempo a partir das formulações administradas aos 12 voluntários sadios. Cada ponto representa a média obtida a partir de 12 medições.

Na Figura 3.2 observa-se que, os perfis de fração absorvida obtidos a partir da deconvolução utilizando a formulação de referência, são diferentes entre as formulações (A1 = 16,49%; A2 = 25,61%; A3 = 36,6%). Essa diferença permitiu o estabelecimento da correlação entre a fração absorvida e a fração dissolvida.

Os resultados obtidos para o cálculo de BD absoluta, a partir dos dados apresentados na Tabela 3.9, estão apresentados a seguir na Tabela 3.13.

Tabela 3.13. Valores de BD absoluta obtidos para as formulações A1, A2a e A3 a partir da administração intravenosa da Furosemida IV Teuto® 20 mg

Formulações	A1	A2a	A3
F (%)	15,23	22,83	31,04

F(%) = biodisponibilidade absoluta em porcentagem; A1 = 30% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP-β-CD; 0,5% Est. Mg.; 4,5% C.M.; A2a = 17,5% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP-β-CD; 0,5% Est. Mg.; 17% C.M.; A3 = 10% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP-β-CD; 0,5% Est. Mg.; 24,5% C.M.

Observando a Figura 3.2 e a Tabela 3.13, verifica-se que os valores de fração absorvida e a BD absoluta para as formulações A1, A2a e A3 apresentam valores próximos para cada uma das formulações avaliadas. Portanto, confirma-se que os valores de fração absorvida foram corretamente obtidos.

Segundo Emami (2006), a CIVIV pode ser desenvolvida com duas ou mais formulações com comportamentos de liberação distintos. Desta forma, neste trabalho optou-se por utilizar três formulações desenvolvidas contendo 50 mg de furosemida e que apresentaram perfis de dissolução distintos (A1, A2a e A3) e a formulação referência, Furosemida IV Teuto® 20 mg (10 mg/mL).

Para o estabelecimento de uma relação linear (CIVIV) conforme descrito no item 3.3.4, considerando os dados das formulações A1, A2a e A3, empregaram-se os dados de fração dissolvida (Fd_{0-8}), obtido com o aparato II, apresentados na Tabela 2.11, item 2.4.2.1 do Capítulo 2, e os dados de fração absorvida (Fa_{0-8}) apresentados na Tabela 3.14. Conforme apresentado na Figura 3.3, observa-se que o coeficiente de determinação da correlação linear foi de 0,7662. Este coeficiente foi considerado baixo e, portanto, pode não ser adequado para bioisenção de outros estudos de BD (Emami, 2006).

Tabela 3.14. Fração dissolvida (aparato II) e fração absorvida a partir das formulações A1, A2a e A3 no intervalo de tempo de 0-8 horas

tempo(h)	A1		A2a		A3	
	Fa	Fd	Fa	Fd	Fa	Fd
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,50	2,19	12,30	1,26	29,77	3,97	80,89
1,00	5,44	19,54	4,52	36,67	18,31	89,03
1,50	7,98	26,13	12,00	47,83	27,74	90,56
2,00	9,07	30,67	14,49	49,25	26,88	92,88
2,50	11,63	36,94	18,20	52,52	33,87	96,52
3,00	13,50	41,25	21,17	58,19	34,12	97,20
3,50	14,45	43,22	21,51	60,74	34,41	99,65
4,00	14,72	47,37	22,75	63,96	35,33	101,07
5,00	15,43	54,84	23,92	69,36	35,62	102,76
6,00	15,90	63,43	24,70	78,92	36,16	104,25
7,00	16,23	66,28	25,42	89,48	36,54	105,68
8,00	16,49	76,10	25,61	93,04	36,60	106,94

A1 = 30% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 4,5% C.M.; A2a = 17,5% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 17% C.M.; A3 = 10% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 24,5% C.M.; Fa = fração absorvida; Fd = fração dissolvida.

Figura 3.3. Correlação entre a porcentagem de fração absorvida, obtida a partir do ensaio de BD com os 12 voluntários, após a administração das formulações desenvolvidas (A1, A2a e A3) e do medicamento de referência (Furosemida IV Teuto®), e a porcentagem de fração dissolvida, obtida a partir do estudo de dissolução das formulações desenvolvidas (A1, A2a e A3) utilizando o Aparato II com tampão fosfato pH 6,8.

Para o estabelecimento de uma relação linear (CIVIV) conforme descrito no item 3.3.4, considerando os dados das formulações A1, A2a e A3, empregaram-se os dados de fração dissolvida (Fd_{0-8}), obtidos com o aparato IV, apresentado no Capítulo 2, item 2.4.4.2 (Tabela 2.12), e de fração absorvida (Fa_{0-8}) apresentados na Tabela 3.15. Conforme apresentado na Figura 3.4, observa-se que o coeficiente de determinação da correlação linear foi de 0,96017 (Figura 3.4).

Do ponto de vista de biofarmacotécnica, CIVIV de nível A, com coeficientes de determinação superiores a 0,9 são extremamente úteis, pois essas correlações fornecem informações a respeito do comportamento *in vivo* (Emami, 2006).

Tabela 3.15. Fração dissolvida (aparato IV) e fração absorvida a partir das formulações A1, A2a e A3 no intervalo de tempo de 0-8 horas

tempo(h)	A1		A2a		A3	
	Fa	Fd	Fa	Fd	Fa	Fd
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,50	2,19	5,66	1,26	10,69	3,97	28,53
1,00	5,44	9,04	4,52	20,91	18,31	45,21
1,50	7,98	13,35	12,00	30,47	27,74	56,40
2,00	9,07	16,93	14,49	36,89	26,88	59,38
2,50	11,63	20,32	18,20	41,96	33,87	80,21
3,00	13,50	23,73	21,17	45,43	34,12	86,60
3,50	14,45	26,69	21,51	47,94	34,41	86,81
4,00	14,72	29,24	22,75	50,19	35,33	86,88
5,00	15,43	33,49	23,92	53,14	35,62	87,04
6,00	15,90	36,91	24,70	54,41	36,16	87,79
7,00	16,23	39,68	25,42	55,02	36,54	88,74
8,00	16,49	42,60	25,61	56,97	36,60	89,70

A1 = 30% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 4,5% C.M.; A2a = 17,5% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 17% C.M.; A3 = 10% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 24,5% C.M.; Fa = Fração absorvida; Fd = Fração dissolvida.

Figura 3.4. Correlação entre a porcentagem de fração absorvida, obtida a partir do ensaio de BD com os 12 voluntários, após a administração das formulações desenvolvidas (A1, A2a e A3) e do medicamento de referência (Furosemida IV Teuto®) e a porcentagem de fração dissolvida, obtida a partir do estudo de dissolução das formulações desenvolvidas (A1, A2a e A3) utilizando o Aparato IV com gradiente de pH e fluxo de 8 mL/min.

A Farmacopeia Americana (USP, 2012) define CIVIV como o estabelecimento de uma relação racional entre as propriedades biológicas e uma propriedade físico-química ou outra característica desta mesma FF. Assim, os estudos de correlação podem ser utilizados com a finalidade de isentar os medicamentos genéricos e similares dos estudos de BE (United States, 2000).

A furosemida é um ácido fraco e pertencente a classe IV do SCB, ou seja, de baixa solubilidade e baixa permeabilidade, e portanto seria esperado uma correlação nula ou baixa de acordo com a classificação apresentada no Quadro 1.2 (Capítulo 1) (Granero *et al.*, 2010; Demirtürk; Öner, 2003; Amidon *et al.*, 1995). Esta mesma expectativa também aparece no Quadro 1.3

(Capítulo 1), que não apresenta uma subdivisão para as classes III ou IV do SCB, no entanto, este fármaco poderia ser enquadrado na classe Va ácido, uma vez que a furosemida apresenta solubilidade variável e permeabilidade errática (Granero *et al.*, 2010; Demirtürk; Öner, 2003; Ponto; Schoenwald, 1990). Apesar disto, neste trabalho, foi obtido uma correlação de nível A com coeficiente de determinação de 0,96017, a partir de três formulações de comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD, entre os dados do estudo de dissolução *in vitro* obtidos com o aparato IV com fluxo 8 mL/min e gradiente de pH e os dados do estudo de BD *in vivo*, realizado com 12 voluntários. Essa CIVIV foi submetida à validação interna e os resultados estão apresentados na sequência (item 3.4.3).

Alguns trabalhos utilizando furosemida foram publicados anteriormente tentando correlacionar dados obtidos de ensaios *in vitro* e alguns parâmetros obtidos *in vivo* (Özdemir; Ordu; Özkan, 2000; Santus *et al.*, 1997; McNamara *et al.*, 1987). Porém, nenhum destes obtiveram correlações sob a forma de uma equação matemática que descrevesse o comportamento do fármaco *in vivo*, conforme detalhado na sequência.

O trabalho publicado por Özdemir, Ordu e Özkan (2000) utilizou furosemida em FFs flutuantes. O objetivo do trabalho era aumentar a BD do fármaco a partir de FFs flutuantes, quando comparada com a FF tradicional. Para avaliar essas FFs, o método *in vitro* utilizado foi o aparato IV. Foram também administradas a 6 voluntários saudáveis do sexo masculino. No ensaio de BD, concluiu-se que a ASC da forma flutuante é 1,8 vezes maior que a ASC da forma convencional. Os autores ainda concluíram que houve correlação significativa entre os dados *in vivo* e a taxa de dissolução *in vitro*, porém não apresentaram os dados matemáticos referentes a tal conclusão.

Santus e colaboradores (1997) publicaram uma investigação *in vitro* – *in vivo* de formulações de furosemida bioadesiva de liberação modificada. As formulações desenvolvidas foram avaliadas por dissolução através de aparato II o que permitiu verificar que os polímeros que controlam a liberação não eram afetados pelo polímero com propriedade bioadesiva. Para avaliar o tempo de trânsito gastrointestinal *in vivo*, um estudo de cintilografia-y foi realizado em seis voluntários testando as formulações de liberação modificada, com ou sem

polímero bioadesivo. Em função dos níveis plasmáticos e da excreção urinária, de furosemida, e do fluxo urinário dos seis voluntários, os autores correlacionam o trânsito gastrointestinal e absorção furosemida. No entanto, os autores também não apresentaram os dados matemáticos que dão suporte a tal conclusão.

McNamara e colaboradores (1987) realizaram um estudo a partir de dados *in vitro* e *in vivo*, com emprego de seis formulações comerciais de liberação imediata. Os estudos de dissolução foram realizados com aparato II à 50 rpm nos seguintes meios: soluções tampão acetato pHs 4,5 e 5,6. Esses comprimidos foram administrados por via oral a 12 voluntários em um estudo *in vivo* com um *wash out* de uma semana. Conforme descrito no trabalho, os pesquisadores não conseguiram estabelecer uma correlação por meio deste estudo e apesar disto, concluíram que o meio de dissolução tampão acetato pH 5,6 era mais preditivo do comportamento do fármaco *in vivo* quando comparado ao meio tampão acetato pH 4,5.

Alguns grupos conseguiram obter correlações de nível A bem sucedidas em trabalhos com outros fármacos. Este é o caso do trabalho conduzido por Dutta e colaboradores (2005) que desenvolveram três formulações de liberação modificada de divalproex sódico com perfis de dissolução distintos (velocidade de dissolução lenta, média e rápida). O estudo de dissolução *in vitro* foi conduzido em dissolutor com aparato II à 100 rpm e sob temperatura de 37°C,

nas seguintes condições de dissolução: 45 minutos em 500 mL de solução de HCl 0,1 N e 24 horas em 900 mL de solução tampão fosfato pH 5,5 contendo lauril sulfato de sódio a 75 mM, até completar o tempo de 24 horas de ensaio. O estudo *in vivo* foi conduzido em quatro fases com 16 voluntários, e estes receberam em cada uma das fases uma das três formulações desenvolvidas ou o medicamento referência, que neste caso foi uma infusão intravenosa do fármaco por 12 horas. No entanto, os pesquisadores não apresentaram a correlação matemática ou o coeficiente de determinação.

A partir das publicações até aqui citadas, observa-se a dificuldade de obtenção de estudos de CIVIV que apresentem informações relevantes e preditivas que possam ser utilizados para bioisentar um ensaio de BD/BE. Isto ocorre pelas dificuldades citadas como por exemplo, obter pelo menos três

formulações que apresentem perfis distintos de liberação, uma condição de dissolução preditiva, realizar os estudos *in vivo*, obter dados de fração absorvida pelos diferentes modelos de deconvolução, alto custo e elevado tempo para realização do ensaio (USP, 2012; Emami, 2006; Brasil 2002). Além disto, pesquisas bem sucedidas realizadas por companhias farmacêuticas são considerados sigilosas, pois permitem realizar alterações pós-registro sem a necessidade de novos estudos *in vivo*. Portanto, ressalta-se aqui a importância deste tipo de estudo, buscando melhorar as ferramentas já existentes.

O grupo Ghosh e colaboradores (2008) desenvolveu uma CIVIV a partir de três formulações de liberação modificada de glipizida elaborada conforme apresentado no Capítulo 1. O coeficiente de determinação (r^2) para CIVIV nível A foi de 0,95. Esta CIVIV foi obtida a partir do estudo *in vitro* das formulações submetidos à dissolução com aparato II à 100 rpm e tampão fosfato pH 6,8. Já o estudo *in vivo* envolveu a participação de 6 voluntários.

Diferente da maioria dos trabalhos apresentados, este estudo de correlação utilizou três FFs com velocidades de dissolução distintas para a realização dos estudos *in vivo*. Os dados de fração dissolvida *in vitro* empregando o aparato IV e os dados de fração absorvida obtidos pelo modelo de deconvolução numérica foram adequadamente correlacionados, fornecendo um coeficiente de determinação superior a 0,9 ($r^2 = 0,96017$), indicando que a correlação de nível A obtida foi bem elaborada e pode ser utilizada futuramente.

3.4.3. Validação interna

Após o estabelecimento da correlação, é necessário realizar a validação interna, que corresponde a avaliar se esta ferramenta matemática é capaz de prever o comportamento dos dados *in vivo* a partir dos dados *in vitro* de dissolução com precisão e exatidão (Melo, 2012).

O modelo de CIVIV obtido para as três formulações A1, A2a e A3 foi utilizado para prever a fração absorvida do fármaco para cada formulação individual a partir dos dados de fração dissolvida e, em seguida, prever a

concentração plasmática da furosemida, empregando a técnica da convolução. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.16 e nas Figuras 3.5, 3.6 e 3.7.

Tabela 3.16. Frações absorvidas extrapoladas pela CIVIV e concentrações plasmáticas de furosemida previstas para as formulações A1, A2a e A3 no intervalo de 0 a 8 horas

Tempo (horas)	A1		A2a		A3	
	Fa prevista (%)	Concentração Plasmática prevista (µg/mL)	Fa prevista (%)	Concentração Plasmática prevista (µg/mL)	Fa prevista (%)	Concentração Plasmática prevista (µg/mL)
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	0,58	0,10	2,27	0,40	6,05	1,06
1,0	0,62	0,17	2,17	0,61	3,54	1,23
1,5	1,63	0,38	2,03	0,69	2,37	1,08
2,0	0,76	0,34	1,36	0,61	0,63	0,69
2,5	0,72	0,31	1,08	0,52	4,42	1,15
3,0	0,72	0,30	0,74	0,42	1,35	0,90
3,5	0,62	0,28	0,53	0,33	0,05	0,50
4,0	0,53	0,25	0,48	0,27	0,01	0,28
5,0	0,90	0,20	0,62	0,18	0,00	0,11
6,0	0,73	0,17	0,27	0,10	0,00	0,06
7,0	0,59	0,14	0,13	0,06	0,00	0,04
8,0	0,62	0,14	0,00	0,03	0,00	0,03

A1 = 30% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP-β-CD; 0,5% Est. Mg.; 4,5% C.M.; A2a = 17,5% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP-β-CD; 0,5% Est. Mg.; 17% C.M.; A3 = 10% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP-β-CD; 0,5% Est. Mg.; 24,5% C.M.; Fa = fração absorvida.

Figura 3.5. Perfis de decaimento plasmático previsto pelo CIVIV estabelecida e observado experimentalmente após a ingestão de comprimidos matriciais da formulação A1 contendo 50 mg de fármaco em complexo de furosemida e HP- β -CD.

Figura 3.6. Perfis de decaimento plasmático previsto pelo CIVIV estabelecida e observado experimentalmente após a ingestão de comprimidos matriciais da formulação A2a contendo 50 mg de fármaco em complexo de furosemida e HP- β -CD.

Figura 3.7. Perfis de decaimento plasmático previsto pelo CIVIV estabelecida e observado experimentalmente após a ingestão de comprimidos matriciais da formulação A3 contendo 50 mg de fármaco em complexo de furosemida e HP- β -CD.

Os parâmetros farmacocinéticos (como C_{max} e ASC_{0-t}) da curva de decaimento plasmático de furosemida em função do tempo prevista foram comparados aos dados farmacocinéticos obtidos no ensaio de BD apresentado no item 3.4.1. A comparação foi realizada pela avaliação do erro de predição (EP%) de acordo com a Equação 1.5 (Eq. 1.5). Os resultados estão apresentados na Tabela 3.17.

Tabela 3.17. Estimativa de erros de predição (EP%) para os parâmetros farmacocinéticos C_{max} e ASC_{0-t} , para as formulações A1, A2a e A3 na validação interna da CIVIV.

Formulação	C_{max}			ASC_{0-t}		
	Observado ($\mu\text{g/mL}$)	Previsto ($\mu\text{g/mL}$)	EP%	Observado ($\mu\text{g.h/mL}$)	Previsto ($\mu\text{g.h/mL}$)	EP%
A1	0,41	0,38	8,71	1,49	1,63	-8,57
A2a	0,77	0,69	11,95	2,21	1,83	11,95
A3	1,24	1,23	0,77	3,00	2,77	8,39

A1 = 30% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 4,5% C.M.; A2a = 17,5% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 17% C.M.; A3 = 10% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 24,5% C.M.; C_{max} = Concentração plasmática máxima; ASC_{0-t} = área sob a curva de decaimento plasmática *versus* tempo de zero ao tempo t; EP% = erro de predição em porcentagem.

O objetivo da validação de uma CIVIV é estimar a magnitude do erro na previsão dos resultados de BD *in vivo*, a partir dos dados de dissolução *in vitro*. De acordo com Emami (2006), a validação interna é útil para fornecer critérios de aceitação do modelo, através do estabelecimento do EP%, pois ela avalia a qualidade dos dados obtidos.

Portanto, validação interna é utilizada com o propósito de fornecer a base para aceitação do modelo de CIVIV desenvolvido. No entanto, a validação externa é superior, e permite maior confiabilidade nos resultados obtidos (Melo, 2012; United States, 1997a).

Neste estudo valores de EP% foram inferiores a 12%. Segundo Emami (2006), valores de EP% inferiores a 10% são considerados adequados. Levando-se em consideração que a furosemida é um fármaco que apresenta alta variabilidade (Hite; Turner; Federici, 2003; Ponto, Schoenwald, 1990), como observado nos resultados do estudo clínico no item 3.4.1, os valores de EP% abaixo de 12% podem ser considerados adequados para a CIVIV estabelecida no presente estudo.

O grupo de Ghosh e colaboradores (2008) estabeleceu uma correlação de nível A para a glipizida como descrito anteriormente. Com o objetivo de avaliar esta ferramenta, o grupo submeteu a correlação às validações interna e externa. A validação interna foi realizada a partir dos estudos de dissolução utilizados no estabelecimento da CIVIV para predizer o comportamento *in vivo*

de cada uma dessas formulações. Os resultados obtidos pela equipe foram satisfatórios, uma vez que todos os valores de erro de predição (EP%) foram inferiores a 10%. Com o intuito de obter maior confiabilidade nos dados, o grupo também realizou a validação externa da correlação utilizando uma formulação otimizada, considerando os dados previamente obtidos no estudo para estabelecer a CIVIV. O estudo *in vivo* foi realizado com seis voluntários, os resultados obtidos foram novamente submetidos à CIVIV desenvolvida e os resultados de EP% foram inferiores a 10%. Os pesquisadores concluem a CIVIV para a glipizida é válida uma vez que os EP% foram baixos e encontram-se dentro dos critérios descritos no guia do FDA: *Formas farmacêuticas de liberação modificada de uso oral: Desenvolvimento, Avaliação e aplicação em correlações in vitro e in vivo* (United States, 1997a).

A CIVIV desenvolvida pelo grupo de Dutta e colaboradores (2005) foi avaliada através da validação interna a partir dos dados de dissolução e os valores de EP% foram inferiores a 10%. O grupo ainda realizou a validação externa em um estudo envolvendo 36 voluntários e utilizando outras três formulações de liberação modificada, com perfis distintos e denominadas como levemente lenta, média e levemente rápida. Os valores obtidos na comparação dos parâmetros farmacocinéticos, C_{max} e ASC_{0-t} , por EP% foram inferiores a 10%. O grupo concluiu que os resultados poderiam ser aplicados nas especificações para estudo de dissolução biorrelevante, auxiliar no desenvolvimento de novas FFs, aprovarem produtos após alterações no pós-registro e bioisentar produtos do estudo de BE, garantindo ainda assim a qualidade dos produtos.

Outra estratégia pode ser adotada, isto é, calcular os valores de fração absorvida a partir dos valores individuais como foi observado no trabalho publicado por Ostrowski, Wilkowska e Baczer (2010). O grupo estudou a influência de se utilizar as curvas de decaimento plasmático médias para obter as frações absorvidas em comprimidos de liberação imediata de amoxicilina utilizando o modelo de Wagner-Nelson. O grupo observou que os valores de fração absorvida obtidos das curvas de decaimento plasmático individuais apresentaram erros significativamente menores do que os valores obtidos pelas curvas médias.

Neste trabalho, o coeficiente de determinação (r^2) para a CIVIV desenvolvida e os valores de EP% apresentou resultados satisfatórios. Estes são de grande importância, considerando as dificuldades para este tipo de ensaio e a escassez de publicações relevantes.

3.4.4. Desenvolvimento e validação do método bioanalítico para quantificação de furosemida em plasma humano

3.4.4.1. Especificidade

O método desenvolvido mostrou-se específico para furosemida e propranolol (padrão interno), obtendo-se boa separação dos picos entre si e dos componentes do plasma branco, lipêmico ou hemolisado, com tempos de retenção (t_r) de 8,6 minutos para furosemida e 4,3 minutos para propranolol (Figura 3.8).

Figura 3.8. Cromatogramas obtidos por CLAE com detector de fluorescência referente à: (A) plasma branco e (B) Controle de Qualidade Alto (CQA, 1,50 µg/mL) – plasma branco adicionado de padrões – furosemda (tr = 8,6 min) e propranolol (tr = 4,3 min), obtido conforme descrito no item 3.3.6.3.

3.4.4.2. Linearidade

O método apresentou-se linear na faixa de concentração de 0,05 a 2,00 µg/mL, com coeficiente de determinação (r^2) de 0,9896. A curva analítica está representada na Figura 3.9 e os parâmetros relativos à curva estão apresentados na Tabela 3.18.

Figura 3.9. Curva analítica do método para quantificação de furosemida em plasma por CLAE com detector de fluorescência na faixa de concentração de 0,05 µg/mL a 2,00 µg/mL. Cada ponto representa a média de seis repetições (n=6); x= Concentração plasmática (µg/mL); y = Razão entre áreas de pico de furosemida por padrão interno (propranolol); r² = coeficiente de determinação.

Tabela 3.18. Parâmetros relativos à equação obtida a partir da curva analítica do método para quantificação de furosemida em plasma por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência na faixa de 0,05 e 2,00 µg/mL.

Parâmetro	Valor
Coeficiente angular (a)	7,6347
Coeficiente linear (b)	0,1633
Coeficiente de determinação (r²)	0,9896

A faixa de linearidade obtida é adequada à aplicação do método aos estudos de BD e farmacocinética, considerando a possibilidade de diluição de amostras que apresentarem resultados superiores ao último ponto da curva analítica (2,00 µg/mL).

3.4.4.3. Limite de Detecção

O limite de detecção para o método foi 0,01 µg/mL, o qual se mostrou adequado para a realização do estudo.

3.4.4.4. Limite de Quantificação

É importante salientar que o limite de quantificação do fármaco é um parâmetro de grande relevância, visto que no estudo de BE foi administrada dose única (50 mg de furosemida) a cada voluntário em cada uma das fases. O método desenvolvido mostrou-se apropriado, pois apresentou especificidade e sensibilidade adequadas para ser empregado nas análises das amostras de plasma obtidas a partir dos estudos de BD, nos quais a detecção de pequenas concentrações é de extrema importância.

A quantificação do fármaco com precisão e exatidão adequadas é imprescindível para a determinação dos parâmetros farmacocinéticos relativos à absorção e eliminação do fármaco. Neste trabalho, o limite de quantificação foi de 0,05 µg/mL, com precisão de 16,75% e exatidão de 94,60%.

3.4.4.5. Recuperação

Neste estudo, as amostras foram extraídas por um processo simples de extração líquido – líquido, utilizando acetato de etila como solvente extrator, o que possibilitou boa recuperação da furosemida e do padrão interno em relação a outros solventes, tais como acetonitrila, diclorometano e mistura de acetonitrila e acetato de etila.

Com relação ao processo de extração, o método mostrou-se superior a alguns trabalhos publicados na literatura, como por exemplo o processo de extração no estudo de Najib e colaboradores (2003); utilizaram 7 mL de éter metil-terc-butílico para purificar 500 µL de plasma, essa diferença de 2 mL de solvente por amostra, é altamente impactante devido ao seu elevado número de amostras em um estudo de BD (aproximadamente 1000 amostras), além de

uma demora maior na etapa de secagem, ou eliminação do solvente (Porta *et al.*, 2008). A recuperação média com o acetato de etila foi de 108,40% para furosemida e de 88,06% para propranolol, com precisão e exatidão dentro dos limites especificados, indicando que o procedimento de extração descrito para o método bioanalítico apresentou eficiência adequada (Tabela 3.19).

Tabela 3.19. Recuperação média do procedimento de purificação das amostras de plasma para furosemida (padrão) e para propranolol (padrão interno)

Concentração de furosemida (µg/mL)	Recuperação (%)	
	Padrão (CV %)	Padrão Interno (CV%)
CQB (0,10)	110,26 (7,95)	82,68 (8,04)
CQM (0,75)	101,10 (2,62)	83,52 (8,21)
CQA (1,50)	113,83 (3,13)	97,97 (10,07)
Média	108,40 (4,57)	88,06 (8,77)

Cada valor representa uma média de seis repetições (n=6). CV = coeficiente de variação. CQ= Controle de Qualidade; B= Baixo; M= Médio; A = Alto.

3.4.4.6. Precisão

A precisão do método analítico variou entre 12,89 e 14,80% para as amostras analisadas no mesmo dia (intradia) e entre 12,60 e 14,97% para as aquelas analisadas em dias diferentes (interdias). Os resultados estão apresentados na Tabela 3.20.

3.4.4.7. Exatidão

A exatidão do método analítico variou entre 86,89 e 105,26% para as amostras analisadas no mesmo dia (intradia) e entre 93,82 e 97,36% para aquelas analisadas em dias diferentes (interdias). Os resultados estão apresentados na Tabela 3.20.

Tabela 3.20. Precisão e exatidão intradia e interdias referentes ao método analítico para quantificação de furosemida em amostras de plasma por CLAE com detecção por fluorescência

Concentração de furosemida (µg/mL)	Precisão (%)		Exatidão (%)	
	Intradia	Interdias	Intradia	Interdias
CQB (0,10)	12,89	14,06	86,89	96,49
CQM (0,75)	14,80	14,97	105,26	97,36
CQA (1,50)	14,73	12,60	94,18	93,82

Cada valor representa uma média de seis determinações (n=6) para precisão e exatidão intradia e seis determinações por 4 dias para precisão e exatidão interdias. CQ= Controle de Qualidade; B= Baixo; M= Médio; A = Alto.

Os resultados de exatidão e precisão estão de acordo com os desvios aceitos pela agência regulatória (inferiores a 15%) (Brasil, 2012).

3.4.4.8. Estabilidade

3.4.4.8.1. Estabilidade de curta duração

A estabilidade de curta duração foi avaliada conforme descrito no item 3.3.6.6.8.1. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos pela análise de amostras recém-preparadas, sendo aceitos desvios entre $\pm 15\%$ de acordo com a agência regulatória (Tabela 3.21) (Brasil, 2012).

Tabela 3.21. Resultados referentes ao estudo de estabilidade da furosemida em amostras analisadas após manutenção à temperatura ambiente por 4 horas

Conc. Nominal (µg/mL)	Amostras recém-preparadas e imediatamente analisadas			Amostras preparadas após 4 horas à temperatura ambiente			Desvio (%)
	Conc.			Conc.			
	Det.	Precisão (%)	Exatidão (%)	Det.	Precisão (%)	Exatidão (%)	
	(µg/mL)			(µg/mL)			
CQB (0,10)	0,10	13,43	96,81	0,09	5,29	88,88	-7,93
CQM (0,75)	0,78	5,36	104,37	0,82	7,20	109,32	4,95
CQA (1,50)	1,43	7,03	95,41	1,52	10,08	101,05	5,64

Cada resultado representa a média de três determinações (n=3). Conc. = concentração. Det. = determinada. Desvio – desvio em relação à amostra recém-preparada. CQ= Controle de Qualidade; B= Baixo; M= Médio; A = Alto.

3.4.4.8.2. Estabilidade de Longa Duração

As amostras de plasma de controle de qualidade preparadas com a adição de furosemida conforme descrito no item 3.3.6.6.8.2, mantiveram-se estáveis por, pelo menos, 60 dias. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos pela análise de amostras recém-preparadas, sendo aceitos desvios entre $\pm 15\%$ de acordo com a agência regulatória (Tabela 3.22) (Brasil, 2012).

Tabela 3.22. Resultados referentes ao estudo de estabilidade da furosemida em amostras de plasma de controle de qualidade, analisadas logo após o preparo e mantidas a -20°C por 60 dias

Conc. Nominal (µg/mL)	Amostras recém-preparadas e imediatamente analisadas			Amostras armazenadas a -20°C durante 60 dias			
	Conc.			Conc.			Desvio (%)
	Det. (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Det. (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	
CQB (0,10)	0,10	13,43	96,81	0,12	1,26	111,17	14,84
CQM (0,75)	0,78	5,36	104,37	0,82	3,53	109,58	5,21
CQA (1,50)	1,43	7,03	95,41	1,48	3,10	98,85	3,44

Cada resultado representa a média de três determinações (n=3). Conc. = concentração. Det. – determinada. Desvio – desvio em relação à amostra recém-preparada. CQ= Controle de Qualidade; B= Baixo; M= Médio; A = Alto.

3.4.4.8.3. Estabilidade de soluções-padrão

A estabilidade das soluções-padrão de furosemida e de propranolol, em metanol, foi determinada, e os resultados obtidos apresentaram-se dentro dos limites especificados na RDC 27/2012, com desvio médio de 11,75% para o padrão e -3,80% para o padrão interno (Brasil, 2012).

3.4.4.8.4. Estabilidade de ciclos de congelamento e descongelamento

As amostras de controle de qualidade foram conforme descrito no item 3.3.6.6.8.4. Os resultados obtidos foram comparados com as amostras de controle de qualidade recém-preparadas e analisadas imediatamente, sendo aceitos desvios entre $\pm 15\%$ conforme especificado pela agência regulatória (Brasil, 2012), e estão apresentados na Tabela 3.23.

Tabela 3.23. Resultados referentes ao estudo de estabilidade de furosemida em amostras de plasma, analisadas imediatamente após o preparo, mantidas a temperatura de -20°C e submetidas a sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento

Amostras recém-preparadas e Conc. analisadas em seguida				Ciclo 1				Ciclo 2				Ciclo 3			
Nominal	Conc.			Conc.				Conc.				Conc.			
(µg/mL)	Det.	Precisão (%)	Exatidão (%)	Det.	Precisão (%)	Exatidão (%)	Desvio(%)	Det.	Precisão (%)	Exatidão (%)	Desvio(%)	Det.	Precisão (%)	Exatidão (%)	Desvio (%)
	(µg/mL)			(µg/mL)				(µg/mL)				(µg/mL)			
CQB (0,10)	0,10	13,43	96,81	0,10	13,43	96,81	0,00	0,10	11,74	100,37	3,56	0,10	1,63	97,14	0,33
CQM (0,75)	0,78	5,36	104,37	0,76	1,08	101,44	-2,93	0,67	7,77	96,76	-7,61	0,69	4,36	91,35	-13,02
CQA (1,50)	1,43	7,03	95,41	1,46	4,91	97,17	1,76	1,45	6,82	96,78	1,37	1,62	7,93	108,16	13,75

Cada resultado representa a média de três determinações (n=3). Conc. = concentração. Det. – determinada. Desvio – desvio em relação à amostra recém-preparada. CQ= Controle de Qualidade; B= Baixo; M= Médio; A = Alto.

3.4.4.8.5. Estabilidade Pós-Processamento

A estabilidade pós-processamento, representada pela estabilidade ao longo das condições da análise, foi determinada conforme previamente descrito no item 3.3.6.6.8.5. Os resultados obtidos foram comparados com as amostras de controle de qualidade recém-preparadas e analisadas imediatamente, sendo aceitos desvios entre $\pm 15\%$ conforme especificada pela agência regulatória (Brasil, 2012). Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 3.24.

Tabela 3.24. Resultados referentes a estudo de estabilidade da furosemida em amostras de plasma analisadas 24 e 48 horas após o procedimento de purificação

Conc. Nominal (µg/mL)	Amostras recém-preparadas e analisadas em seguida			Amostras analisadas 24 horas após o processamento				Amostras analisadas 48 horas após o processamento			
	Conc. Det. (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc. Det. (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Desvio (%)	Conc. Det. (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Desvio (%)
CQB (0,10)	0,10	13,43	96,81	0,09	13,80	87,00	-9,81	0,11	3,34	110,66	13,85
CQM (0,75)	0,78	5,36	104,37	0,75	12,26	99,72	-4,65	0,74	11,37	99,29	-5,08
CQA (1,50)	1,43	7,03	95,41	1,61	6,05	107,39	11,98	1,48	12,16	98,84	3,43

Cada resultado representa a média de três determinações (n=3). Conc.= concentração. Det.= determinada. Desvio= desvio em relação à amostra recém-preparada. CQ= Controle de Qualidade; B= Baixo; M= Médio; A = Alto.

3.4.4.9. Validação do processo de diluição

Vinte amostras de plasma de voluntários do estudo, após a análise cromatográfica, apresentaram valores de concentração de furosemida acima do último ponto da curva de calibração (2,00 µg/mL) e, portanto foram submetidas ao processo de diluição. A diluição foi feita conforme está descrito no item 3.3.6.6.9. Concomitantemente, foi feita a validação da diluição do CQA que apresenta concentração inicial de 1,50 µg/mL. Foram obtidos resultados com precisão e exatidão dentro dos limites preconizados pela RDC 27/2012 (Brasil, 2012) de no máximo 15% e os resultados da validação estão descritos na Tabela 3.25.

Tabela 3.25. Resultados referentes ao processo de validação da diluição

Corrida analítica	CQA diluído (1:2)						
	CQA inicial (µg/mL)	Conc. exp. (µg/mL)	Conc. corrigida (µg/mL)	Conc. média (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Desvio (%)
Reanálise	1,50	0,44	1,32	1,56	13,80	87,67	-12,32
		0,54	1,64			109,80	9,80
		0,57	1,72			114,68	14,68

Conc. = concentração. Exp. = experimental.

3.4.4.10. Considerações finais sobre a metodologia desenvolvida

O método desenvolvido apresentou-se adequado para a quantificação de furosemida em amostras de plasma provenientes dos ensaios de BD do estudo de correlação CIVIV. Esta adequação é comprovada por meio dos resultados referentes à validação do método, tais como, especificidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação, precisão, exatidão e estabilidade.

Na literatura estão publicados alguns trabalhos que descrevem a quantificação da furosemida em amostras biológicas, tais como plasma (Bragatto *et al.*, 2011; Sora *et al.* 2010; Najib *et al.*, 2003; Özdemir; Ordu; Özkan, 2000;

Walshe; Kelly; Smyth, 1996), soro (Mills *et al.*, 1997), tecidos (Mills *et al.*, 1997) e urina (Bragatto *et al.*, 2011; Özdemir; Ordu; Özkan, 2000).

Os métodos cromatográficos usam diferentes tipos de detectores, tais como ultravioleta-vísivel (UV-vis) na faixa de 230 – 235 nm (Mills *et al.*, 1997; Walshe; Kelly; Smyth, 1996), fluorescência (FL) com comprimentos de onda de emissão de 230 nm e excitação em 410 nm (Najib *et al.*, 2003) e detectores de massas (MS/MS) (Bragatto *et al.*, 2011; Sora *et al.* 2010).

O tempo de corrida do método desenvolvido foi de 10 minutos, que é semelhante com o descrito por Najib e colaboradores (2003); e inferior ao tempo de 14 a 15 minutos apresentado nos trabalhos de Sora e colaboradores (2010) e Walshe; Kelly e Smyth, (1996). Apenas o trabalho de Bragatto e colaboradores (2011) obtiveram tempos de corrida significativamente inferiores (3 minutos), porém o trabalho foi desenvolvido com detector de MS/MS que é altamente específico e possibilita a realização de corridas curtas.

A linearidade do método apresentado no presente trabalho foi de 0,05 a 2,00 µg/mL, o que pode ser considerado adequado, quando comparado ao método desenvolvido por Bragatto e colaboradores (2011), que utiliza um detector considerado de maior sensibilidade (MS/MS), e trabalhou com o parâmetro na faixa de 0,01 a 2,00 µg/mL.

As amostras biológicas obtidas dos voluntários e destinadas aos estudos de BE/BD/farmacocinética devem passar por um tratamento prévio à análise no cromatógrafo. As principais razões que justificam tais procedimentos são: complexidade das matrizes biológicas, a existência de proteínas incompatíveis com as colunas cromatográficas e a baixa concentração das substâncias a serem analisadas. O objetivo do pré-tratamento é uma separação cromatográfica livre de interferentes, com detecção adequada e um tempo razoável de análise (Queiroz *et al.*, 2001).

Os processos de extração mais utilizados nesses trabalhos foram líquido-líquido com acetato de etila (Mills *et al.*, 1997), mistura de éter etílico e hexano (Walshe; Kelly; Smyth, 1996), éter dietílico (Bragatto *et al.*, 2011) e éter metil-terc-butílico (Najib *et al.*, 2003) e por precipitação de proteínas com acetonitrila (Sora *et al.* 2010). No presente estudo, optou-se pela extração líquido-líquido com acetato de etila. Esta escolha foi feita considerando custo e disponibilidade

do solvente, resultados de recuperação satisfatórios durante o desenvolvimento do método e facilidade de execução da técnica, pois seriam analisadas grande número de amostras.

Neste método a fase móvel foi uma mistura tampão fosfato 20 mM com pH 3,0 e acetonitrila na proporção de 70:30, v/v, esta foi eluída com um fluxo de 1,0 mL/min. As corridas cromatográficas foram de 10 minutos e o detector de fluorescência estava ajustado com os comprimentos de onda de emissão de 268 nm e excitação de 410 nm.

3.5. Conclusões

- ✓ Nos estudos de BD *in vivo*, os resultados obtidos a partir dos perfis de decaimento plasmático permitiram observar que a formulação A1 apresentou uma liberação mais lenta, decorrente da concentração de HPMC mais alta (30%), a formulação A2a teve liberação intermediária (17,5% de HPMC) e a formulação A3 apresentou liberação mais rápida, resultado da menor concentração de HPMC (10%);
- ✓ Os dados de fração absorvida das formulações A1, A2a e A3 foram adequadamente obtidos pela técnica de deconvolução numérica;
- ✓ Foram obtidas correlações lineares a partir dos dados de fração absorvida das formulações A1, A2a e A3, obtidos pela técnica de deconvolução, e dos dados de dissolução, com coeficiente de determinação de 0,7662 para o aparato II e de 0,96017 para o aparato IV.
- ✓ A validação interna da CIVIV, obtida com o emprego do aparato IV, apresentou EP% com desvios inferiores a 12%, considerando a alta variabilidade do fármaco, pode-se, portanto, considerar que a CIVIV foi adequada;
- ✓ O método bioanalítico desenvolvido e validado para quantificação de furosemida em plasma humano demonstrou adequada sensibilidade, linearidade, precisão, exatidão, recuperação e estabilidade, utilizando extração líquido-líquido simples e tempo de corrida curto, justificando a sua utilização em ensaios de BD e sua aplicação para o estudo de CIVIV.

Capítulo 4: Método *in silico* - Modelagem farmacocinética

Resumo

O presente capítulo apresenta dados de modelagem farmacocinética a partir de dados referentes aos comprimidos contendo complexo de furosemida e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) utilizando os programas STELLA[®] e Simcyp[®]. O objetivo foi avaliar a aplicação destes programas na obtenção das curvas de decaimento plasmático *versus* tempo *in silico* a partir dos dados do estudo de dissolução (*in vitro*). Nesta etapa do trabalho foram empregados os dados do estudo de solubilidade e de dissolução *in vitro* apresentados no Capítulo 2. Para o desenvolvimento da modelagem com emprego do programa STELLA[®], foram utilizados os dados de estudo de dissolução com o aparato IV. Já para o desenvolvimento da modelagem com o emprego do programa Simcyp[®], foram realizados dois tipos de simulação diferentes, a partir dos dados de dissolução obtidos com o emprego dos aparatos II e IV. Os resultados previstos a partir dos dois programas foram comparados aos dados obtidos no estudo de biodisponibilidade (BD) *in vivo*, descritos no Capítulo 3. Foram calculados os erros de predição (EP%) para os parâmetros $C_{\max}$ e ASC_{0-t} obtidos por meio do emprego dos dois programas. Nas condições do estudo, os resultados obtidos com o STELLA[®] mostraram que o modelo desenvolvido simulou o comportamento *in vivo* das formulações utilizadas neste trabalho (Capítulo 2). Os EP% foram inferiores a 20%. Para o programa Simcyp[®], os resultados apresentaram maior divergência quando comparados com os dados do estudo *in vivo*. No estudo com este programa, os EP% calculados foram superiores aos obtidos com o programa STELLA[®], independente do método de dissolução escolhido.

4.1. Introdução

4.1.1. Modelagem farmacocinética *in silico*

Conforme apresentado no Capítulo 1, a absorção de fármacos no lúmen intestinal depende de uma série de fatores fisiológicos, das propriedades físico-químicas do fármaco e dos aspectos relacionados à forma farmacêutica (FF). Considerando essa complexa relação entre a liberação do fármaco a partir da FF, dissolução, permeabilidade através do epitélio intestinal e metabolismo pré-sistêmico, uma simulação confiável e robusta para prever a absorção oral exige um modelo computacional com uma representação mecanística de todos os processos envolvidos (Thelen *et al.*, 2011).

Existe grande interesse no desenvolvimento de modelos *in silico* de farmacocinética que possam auxiliar na seleção de candidatos promissores a novos fármacos. A indústria farmacêutica busca incessantemente a integração efetiva de modelos farmacocinéticos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* (Moda, 2011).

Várias abordagens experimentais e computacionais são utilizadas na descoberta de novos fármacos e no desenvolvimento de medicamentos, com objetivo de simular os efeitos de solubilidade e da dissolução na absorção do fármaco. A simulação detalhada destes efeitos pode ser muito valiosa para a identificação de um potencial problema farmacocinético, para o desenvolvimento pré-clínico e clínico, e para a seleção apropriada de moléculas de sais do fármaco nas formulações (Bhattachar *et al.*, 2011; Shono *et al.*, 2009).

Apesar de estudos clínicos serem indispensáveis no fornecimento de conhecimento apropriado, estas informações podem ser estimadas de maneira indireta, como no caso do emprego de certos biomarcadores de patologias e determinantes fisiológicos e farmacológicos conhecidos, com o intuito de obter dados que sejam de acesso complicado pelos modelos experimentais hoje conhecidos (Pelkonen; Turpeinen; Raunio, 2011; Heatherington; Vicini; Golde, 1998). Os programas de modelagem *in silico* são considerados poderosas ferramentas que podem auxiliar na descrição dos modelos farmacocinéticos - farmacodinâmicos (Heatherington; Vicini; Golde, 1998). Assim, para obter

informações mecanísticas de dados farmacocinéticos, estudos e abordagens *in vitro* e *in silico* estão sendo amplamente empregados para a descoberta e desenvolvimento de fármacos (Moda, 2011; Pelkonen; Turpeinen; Raunio, 2011). No desenvolvimento destes modelos, deve-se incorporar volumes adequados de meios de dissolução biorrelevantes, considerando a transferência de fluido dinâmico e a mudança de pH (Bhattachar *et al.*, 2011; Shono *et al.*, 2009).

Estas técnicas utilizam parâmetros fisiológicos *in silico* baseados em estados prandiais e os dados de avaliação *in vitro* do fármaco (como solubilidade, permeabilidade, dissolução e dados metabólicos) são empregados para simular os perfis de decaimento plasmático (Shono *et al.*, 2009).

O desenvolvimento destes modelos visa à obtenção de resultados sem que a realização de experimentos *in vivo*. Esta abordagem tem a vantagem de possibilitar simulações em condições adversas, que poderiam colocar em risco a saúde dos indivíduos ou provocar situações extremas desnecessárias (Gallo-Neto, 2012).

Os modelos de farmacocinética baseado na fisiologia (*Physiologically based pharmacokinetic* - PBPK) são estudos *in silico* fundamentados na fisiologia humana para prever a farmacocinética de compostos estudados. A aplicação destes modelos baseados em parâmetros fisiológicos conhecidos e propriedades *in vitro* é adequada para o suporte no desenvolvimento de formulações e mostra-se útil na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (Thelen *et al.*, 2011).

Os modelos PBPK dividem o corpo em compartimentos anatômicos e fisiológicos que integram sistemas com propriedades específicas (como por exemplo, fluxo sanguíneo) e propriedades do fármaco (exemplo, afinidades de ligação e permeabilidade) com um modelo estrutural refletindo o arranjo anatômico de tecidos conectados pela perfusão sanguínea. Esses modelos usam parâmetros fisiológicos relevantes descrevendo absorção, distribuição, biotransformação e excreção para prever o perfil farmacocinético de um composto (Chen *et al.*, 2012), permitindo assim prever a extensão e possivelmente a velocidade de absorção (Otsuka; Shono; Dressman, 2013).

Atualmente existem vários programas sendo utilizados para modelagem farmacocinética *in silico*, dentre eles estão: 5Plus[™], PK Sim[®], STELLA[®], Simcyp[®], GI-Sim[®], iDEA[™] e Intellipharm[®] PK (Wagner *et al.*, 2012; Thelen *et al.*, 2011).

4.1.2. STELLA[®]

O programa STELLA[®] foi introduzido pela primeira vez na década de 1980 por Grass e Morehead (1989) que publicaram um estudo de PBPK utilizando este programa. O objetivo deste trabalho foi examinar a influência das formulações de liberação modificada de moexipril sobre a concentração plasmática prevista a partir dos dados de dissolução *in vitro* (Grass; Morehead, 1989). Desde então, o modelo foi melhorado e tem se mostrado preciso em prever os perfis de decaimento plasmático em humano quando combinado com dados do estudo de dissolução *in vitro*, em meio biorrelevante e cinética de precipitação. A cinética de precipitação, obtido experimentalmente, avalia o comportamento do fármaco através da velocidade de precipitação quando ocorrem mudanças bruscas de pH (Wagner *et al.*, 2012; Juenemann *et al.*, 2011; Shono; Jantratid; Dressman, 2011; Nicolaidis *et al.*, 2001).

Kambayashi e Dressman (2013) desenvolveram um estudo cujo objetivo foi a caracterização da dissolução e da cinética de precipitação de um fármaco pouco solúvel, dantroleno, a partir de seus dados de dissolução, e o desenvolvimento um modelo preditivo para sua farmacocinética após administração por via oral. A dissolução foi obtida com o aparato II em meios biorrelevantes. O modelo de Noyes-Whitney foi usado para descrever a cinética de dissolução, e uma equação de primeira ordem foi utilizada para estimar a cinética de precipitação destes perfis de dissolução. O modelo PBPK foi criado usando o STELLA[®]. Os perfis plasmáticos previstos, considerando a cinética de precipitação, estavam próximos aos perfis observados. Em contraste, quando apenas a dissolução foi considerada, a taxa de absorção foi superestimada. Estes resultados indicam que a modelagem PBPK, com emprego dos dados de dissolução e de cinética de precipitação, é útil para a previsão dos perfis farmacocinéticos, após administração oral de dantroleno a

partir do sal sódico. Este trabalho sugere um caminho para predizer perfis de outros sais de ácidos fracos que são pouco solúveis.

Em outro estudo, Wagner e colaboradores (2012), os autores empregaram o programa STELLA[®] para investigar a absorção de um molécula denominada Composto A que pertence à classe IV do SCB em jejum e no estado alimentado. O ensaio de dissolução empregou o aparato II com 500 mL de meio, sendo utilizadas soluções tampão compendiadas pela farmacopeia americana em comparação aos meios biorrelevantes. Os dados obtidos dos estudos de dissolução foram adicionados no modelo criado no STELLA[®]. As curvas reais e previstas foram comparadas por fator de diferença (f1). Os resultados demonstraram que o meio biorrelevante foi capaz de simular o perfil de decaimento plasmático *in vivo* tanto em jejum quanto no estado alimentado, sendo que os resultados de f1 foram 11 e 19 %, respectivamente.

4.1.3. Simcyp[®]

Simcyp é outra ferramenta de modelagem PBPK que oferece uma plataforma, disponível comercialmente, na qual estão inseridos os dados fisiológicos relevantes já estabelecidos cientificamente e que são relevantes aos estudos farmacocinéticos. Este programa apresenta dois modelos de farmacocinética e farmacodinâmica e módulo pediátrico separado. Este programa têm diversas funcionalidades, dentre estas é possível realizar a mudança da população para se adaptar aos diferentes tipos de estudo (Jamei; Dickison; Rostami-Hodjefan, 2009; Jamei *et al.*, 2009).

O grupo de Greupink e colaboradores (2013) estudou a farmacocinética clínica e interações medicamentosas (IMs) do derivado da glibenclamida através da modelagem farmacocinética baseada na fisiologia (PBPK). Para este fim, um modelo PBPK de glibenclamida foi construído no Simcyp[®], no qual foram inseridos dados físico-químicos *in vitro* e de biotransformação do fármaco, e subsequentemente otimizado utilizando dados de decaimento plasmático observados após administração intravenosa. O modelo foi validado em relação aos dados observados após a administração oral de glibenclamida, incluindo as IMs. Após uma dose oral de 875 µg, os parâmetros C_{max} e ASC_{0-t}

simulados foram de 39,7 ng/mL e 108 ng/mL.h, respectivamente, estando em consonância com os valores observados de 43,6 ng/mL e 133 ng/mL.h. Para uma dose oral de 1750 µg, os valores previstos e observados foram de 82,5 ng/mL e 91,1 ng/mL para $C_{\max}$ e 224 ng/mL.h e 324 ng/mL.h para ASC_{0-t} , respectivamente. O modelo previu corretamente uma diminuição na exposição da rifampicina após pré-tratamento com o fármaco. Os efeitos da glibenclamida e fluconazol, após coadministração, também foram simulados. Os estudos *in silico* indicaram que a coadministração deste inibidor potente da CYP450 aumenta profundamente a exposição à glibenclamida, o que está de acordo com as observações clínicas que ligam a administração concomitante de glibenclamida e fluconazol a um aumento do risco de hipoglicemia. Em conclusão, a farmacocinética da glibenclamida e suas IMs mediadas pelo CYP puderam ser corretamente simuladas por meio de modelagem PBPK.

4.2. Objetivos

O objetivo do presente trabalho foi utilizar programas de modelagem farmacocinética (STELLA[®] e Simcyp[®]), combinado aos dados de solubilidade e de dissolução *in vitro* a partir das formulações desenvolvidas e selecionadas descritos no Capítulo 2, para prever as curvas de decaimento plasmático *versus* tempo *in silico*. Para avaliar os resultados foram calculados os erros de predição (EP%) comparando as curvas simuladas e as curvas obtidas no estudo de BD *in vivo* descrito no Capítulo 3.

4.3. Materiais e métodos

Neste trabalho foram utilizados os programas STELLA[®] versão 9.1.1 e Simcyp[®] versão 12 – lançamento 1 conforme descrito a seguir.

Para inserir informações nos programas, foram empregados os dados apresentados no Capítulo 2 referentes ao estudo de solubilidade e aos estudos de dissolução *in vitro* a partir das formulações de comprimidos matriciais, A1,

A2a e A3, com os aparatos II e IV. Além disso, o presente trabalho comparou os resultados previstos com os dados obtidos no estudo de BD *in vivo* apresentado no Capítulo 3.

4.3.1. STELLA[®]

Para a obtenção dos perfis farmacocinéticos simulados pelo programa STELLA[®] versão 9.1.1, foram utilizados os perfis de dissolução obtidos a partir das formulações A1, A2a e A3, com emprego do aparato IV.

A Figura 4.1 apresenta a representação esquemática do modelo empregado para simular o perfil de decaimento plasmático a partir de comprimidos matriciais de furosemida complexada à hidroxipropil-β-ciclodextrina (HP-β-CD).

Para a elaboração do modelo com o emprego deste programa, assumiram-se as seguintes considerações: absorção gástrica negligenciável e esvaziamento gástrico simultâneo para líquidos e sólidos (Wagner *et al.*, 2012; Juenemann *et al.*, 2011; Shono; Jantratid; Dressman, 2011; Nicolaidis *et al.*, 2001). Para representar este processo (Figura 4.1), a passagem do estômago (**Comp. Estomago**) para o intestino (**liq intestino**) foi dividida em quatro compartimentos. A fração do comprimido não solubilizada no estômago passa para o compartimento **sólido intestino** e a fração solubilizada passa para o compartimento **liq intestino**. Os processos de solubilização do comprimido são descritos no estômago (**diss estomago**) e no intestino (**liq intestino**). Os dados inseridos de solubilidade do fármaco no estômago (pH 1,2) e no intestino (pH 6,8) foram obtidos por meio de estudos que estão apresentados no item 2.4.1.3 (Capítulo 2), nos respectivos compartimentos. Assumiu-se também que o volume inicial de fluidos no estômago em jejum é de 250 mL (volume de fluido – **vfluid**). Para o esvaziamento gástrico em jejum, foram utilizados valores médios populacionais (taxa = 2,8 h⁻¹) (Wagner *et al.*, 2012; Juenemann *et al.*, 2011; Shono; Jantratid; Dressman, 2011; Nicolaidis *et al.*, 2001). A concentração plasmática de furosemida ao longo do tempo (**plasmacon**) depende do volume de distribuição (**Vd**) e da quantidade de fármaco que é

absorvida (**absorção**) e eliminada, representada por K_{10} (constante de eliminação no fármaco).

Os parâmetros V_d e K_{10} , detalhados na Tabela 4.1, foram calculados a partir da curva média de decaimento plasmático após a administração intravenosa do medicamento referência, a Furosemida IV Teuto[®] (10 mg/mL) conforme dados obtidos e apresentados no Capítulo 3 – item 3.4.1.

Tabela 4.1. Parâmetros farmacocinéticos calculados a partir da curva média de decaimento plasmático após a administração intravenosa do medicamento referência, a Furosemida IV Teuto[®] (10 mg/mL) conforme dados apresentados no item 3.4.1 do Capítulo 3

Parâmetro	Valor
V_d	5,13 L
K_{10}	0,80 h ⁻¹

V_d = Volume de distribuição; K_{10} = constante da velocidade de eliminação no fármaco.

Figura 4.1. Modelo esquemático usado no programa STELLA® para a obtenção dos perfis plasmáticos simulados.

Para comparar as curvas previstas e observadas foi calculado o erro de predição (EP%) para os parâmetros de $C_{\max}$ e ASC_{0-t} , conforme a equação 1.5 (Eq. 1.5) a seguir:

$$EP\% = \frac{(\text{Parâmetro observado} - \text{Parâmetro previsto}) \times 100}{\text{Parâmetro previsto}} \quad (\text{Eq. 1.5})$$

4.3.2. Simcyp[®]

O simulador ADME Simcyp[®] (versão 12 – lançamento 1) foi empregado para a modelagem PBPK e obtenção dos perfis farmacocinéticos *in silico* a partir de perfis de dissolução.

O uso deste programa envolve algumas tomadas de decisões, conforme apresentado na Figura 4.2 e descritas na sequência. Estas decisões impactam diretamente nos perfis de decaimento plasmáticos simulado e, a escolha utilizada para este trabalho foi feita baseada em testes prévios logo após o preenchimento dos dados requisitados pelo programa.

A primeira etapa envolveu a avaliação dos parâmetros de entrada e a utilização de algumas ferramentas para prever parâmetros *in vivo* a partir de dados *in silico* e *in vitro*. Nesta etapa foram incluídos dados obtidos a partir dos estudos apresentados no Capítulo 2, tais como: solubilidade, dissolução e características físico-químicas do fármaco. Também foram empregados os parâmetros farmacocinéticos descritos na Tabela 4.1 e aqueles obtidos a partir da administração intravenosa do medicamento referência Furosemida IV Teuto[®] (10 mg/mL), conforme estudos descritos no Capítulo 3. Para a execução da simulação foi selecionado população saudável, sendo utilizado um número de indivíduos igual a 12, com as mesmas características da população que participou do estudo *in vivo* e descrito no item 3.3.3.1 (Capítulo 3).

A segunda etapa incluiu a comparação e seleção da estrutura do modelo apropriada para prever a absorção, distribuição e eliminação. Foram realizados testes prévios para verificar quais opções melhor se adequavam ao perfil de decaimento plasmático do fármaco. As opções escolhidas foram:

- ✓ Absorção: Modelo avançado de dissolução, absorção e metabolismo (ADAM);
- ✓ Distribuição: Modelo PBPK mínimo.

Por fim, a última etapa compreendeu as simulações para a obtenção dos perfis de decaimento plasmático previsto a partir da dissolução empregando os Aparatos II ou IV dos comprimidos matriciais contendo 50 mg de furosemida complexada à HP- β -CD (formulações A1, A2a e A3).

Figura 4.2. Esquema para a simulação utilizando o Simcyp® (adaptado de Chen *et al.*, 2012).

Para comparar as curvas previstas e observadas foi calculado o erro de predição (EP%) para os parâmetros de C_{max} e ASC_{0-t} , conforme a equação 1.5 (Eq. 1.5) já apresentada.

4.4. Resultados e discussão

4.4.1. STELLA®

Para realizar as simulações com o programa STELLA® conforme descrito no item 4.3.1, foram utilizados os dados de dissolução obtidos para as formulações A1, A2a e A3, com emprego do aparato IV e apresentado no item 2.4.4.2. Nas Figuras 4.3 a 4.5 estão apresentados as curvas de decaimento plasmático previstas pelo modelo utilizando o programa STELLA® e aquelas obtidas experimentalmente, por meio do estudo de BD, após a ingestão de comprimidos matriciais (A1, A2a e A3).

Figura 4.3. Perfil de decaimento plasmático previsto pelo modelo utilizando o programa STELLA® comparado ao perfil de decaimento plasmático observado experimentalmente, por meio do estudo de BD, após a ingestão de comprimidos matriciais da formulação A1 contendo 50 mg de fármaco em complexo de furosemida e HP-β-CD.

Figura 4.4. Perfil de decaimento plasmático previsto pelo modelo utilizando o programa STELLA® comparado ao perfil de decaimento plasmático observado experimentalmente, por meio do estudo de BD, após a ingestão de comprimidos matriciais da formulação A2a contendo 50 mg de fármaco em complexo de furosemida e HP-β-CD.

Figura 4.5. Perfil de decaimento plasmático previsto pelo modelo utilizando o programa STELLA® comparado ao perfil de decaimento plasmático observado experimentalmente, por meio do estudo de BD, após a ingestão de comprimidos matriciais da formulação A3 contendo 50 mg de fármaco em complexo de furosemida e HP-β-CD.

As curvas observadas e previstas foram comparadas a partir dos valores de erro de predição (EP%) para os parâmetros C_{max} e ASC_{0-t} conforme a equação 1.5 (Eq. 1.5). A Tabela 4.2 apresenta estes resultados.

Tabela 4.2. Estimativa de erro de predição (EP%) para os parâmetros farmacocinéticos $C_{\max}$ e ASC_{0-t} , para as formulações A1, A2a e A3 a partir do modelo utilizando o programa STELLA[®] comparado ao valores observados experimentalmente

Formulação	$C_{\max}$			ASC_{0-t}		
	Observado ($\mu\text{g/mL}$)	Previsto ($\mu\text{g/mL}$)	EP%	Observado ($\mu\text{g.h/mL}$)	Previsto ($\mu\text{g.h/mL}$)	EP%
A1	0,41	0,42	-2,92	1,49	1,37	8,73
A2a	0,77	0,74	4,64	2,21	2,33	-5,28
A3	1,24	1,18	4,98	3,00	3,63	-17,32

A1 = 30% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 4,5% C.M.; A2a = 17,5% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 17% C.M.; A3 = 10% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 24,5% C.M.; $C_{\max}$ = Concentração plasmática máxima; ASC_{0-t} = área sob a curva de decaimento plasmática *versus* tempo de zero ao tempo t; EP% = erro de predição em porcentagem.

Baseado nas Figuras 4.3 a 4.5, que demonstraram que o perfil do decaimento plasmático foram semelhantes, e nos cálculo de EP% (Tabela 4.2), pode-se concluir que o modelo foi capaz de simular as curvas de decaimento plasmático observadas a partir dos dados obtidos do estudo de dissolução com o aparato IV dos comprimidos matriciais de furosemida complexada a HP- β -CD. Entretanto, os desvios de EP% foram relativamente elevados, especialmente para a formulação com menor quantidade de HPMC (formulação A3).

Existem poucos trabalhos publicados que permitam fundamentar a abordagem *in silico* (Chen *et al.*, 2012). Os estudos publicados na literatura sugerem que os resultados poderiam ser aprimorados com a realização de estudos de dissolução utilizando meios biorrelevantes. Nestes trabalhos, os autores apresentam estudos comparativos de dissolução entre os meios compendiados e os meios biorrelevantes mantendo as demais condições. Os resultados previstos a partir destes estudos com meios biorrelevantes foram mais preditivos quando comparados com os obtidos a partir de estudos em meios farmacopéicos (Wagner *et al.*, 2012; Nicolaidis *et al.*, 2001).

Os pesquisadores Shono, Jantravid e Dressman (2011) publicaram um trabalho com o objetivo de avaliar o emprego dos ensaios de dissolução com meios biorrelevantes na simulação *in silico*. Assim puderam verificar o

desempenho *in vivo* de bases pouco solúveis em água, utilizando o mesilato de nelfinavir como um fármaco modelo. Neste estudo, um modelo *in silico* com o emprego do programa STELLA[®] foi usado para gerar perfis de decaimento plasmático do fármaco mesilato de nelfinavir combinando com os dados de dissolução e das estimativas dos parâmetros de cinética de precipitação e dados farmacocinéticos do nelfinavir no trato gastrointestinal (TGI). O ensaio de dissolução *in vitro* de mesilato de nelfinavir a partir de comprimidos revestidos, foi conduzido em meios biorrelevantes e compendiais. Parâmetros do TGI (taxa de esvaziamento gástrico e volume de líquido) apropriadas para as condições de dosagem (jejum e alimentado) foram usados no modelo. O desempenho *in vivo* em cada estado prandial, foi simulado com o modelo desenvolvido. E os valores previstos para a ASC_{0-t} e C_{max} foram comparados com valores observados. Os resultados a partir dos estudos de dissolução em fluido intestinal simulado no jejum (FaSSIF-V2) e em fluido intestinal simulado no estado alimentado (FeSSIF-V2), previram corretamente que haveria um efeito alimentar positivo para este fármaco, ou seja, a alimentação aumenta a absorção do fármaco, porém em voluntários saudáveis este efeito foi superestimado. Além disso, o meio compendiado não conseguiu prever corretamente o comportamento do fármaco. Os resultados obtidos com o modelo, indicaram que a cinética de precipitação do fármaco no intestino delgado é necessária para descrever o desempenho *in vivo* do mesilato de nelfinavir em jejum, ao passo que uma boa previsão no estado alimentado é obtida sem a inclusão da cinética de precipitação.

Outro estudo realizado pelo mesmo grupo utilizou os dados obtidos a partir do ensaio de dissolução *in vitro*, em aparato II a 50 rpm e em meios compendiados e biorrelevantes. Os dados foram inseridos no modelo *in silico* considerando os efeitos dos alimentos sobre a absorção de um fármaco pouco solúvel, o celecoxibe, a partir de cápsulas contendo 200 mg do fármaco. Neste trabalho, os pesquisadores utilizaram o programa STELLA[®] para desenvolver o modelo com o emprego dos seguintes parâmetros: cinética de dissolução, solubilidade e os parâmetros do TGI (esvaziamento gástrico e volume de fluido) e de pós-absorção (V_d/F – volume de distribuição considerado o fator de BD; K_{10} ; K_{12} ; K_{21}). As médias dos perfis de decaimento plasmático, considerando os

efeitos dos alimentos, foram avaliadas usando o ASC_{0-t} , C_{max} e o fator de diferença (f_1). Foi observada uma diferença de cerca de sete vezes na porcentagem máxima dissolvida considerando os estudos de dissolução *in vitro* destinados a representar os estados alimentado e jejum. Em contrapartida, o efeito dos alimentos, estimado através da simulação dos perfis plasmático com o modelo previu apenas um ligeiro atraso no T_{max} (1 h), aumentos modestos de 1,9 vezes no C_{max} e de 1,3 vezes na ASC_{0-t} no estado alimentado. A abordagem *in silico*, combinando os resultados dos ensaios de dissolução com meio biorrelevante, responde melhor ao efeito dos alimentos sobre a BD do celecoxibe. Adicionalmente, as estimativas pontuais de C_{max} e ASC_{0-t} , bem como cálculos de f_1 demonstraram melhores resultados na utilização de meios biorrelevantes em relação aos meios compendiais no modelo *in silico* (Shono *et al.*, 2009).

No entanto, considerando que a furosemida é um fármaco de alta variabilidade intra e interindividual (Najib *et al.*, 2003; Ponto; Schoenwald, 1990; Hammarlund; Paalzow; Odlind, 1984) e que no estudo de BD *in vivo* apresentados neste trabalho incluem variações superiores a 30%, conforme visto no item 3.4.1 (Capítulo 3), conclui-se que os resultados obtidos por este método foram satisfatórios, uma vez que o método conseguiu prever o comportamento das formulações testadas. De acordo com a literatura, uma alternativa que poderia ter um impacto positivo sobre os resultados seria o emprego de estudos de dissolução em meios biorrelevantes.

4.4.2. Simcyp®

Os estudos *in silico* a partir do programa Simcyp® foram realizados para as formulações A1, A2a e A3 utilizando os aparatos II e IV.

Utilizando os dados de dissolução obtidos com o aparato II e apresentados no item 2.4.4.1, foram realizadas as simulações para as formulações A1, A2a e A3, conforme descrito no item 4.3.2. Nas Figuras 4.6 a 4.8, a partir dos dados de dissolução com o aparato II, e aqueles obtidos experimentalmente, por meio do estudo de BD, após a ingestão de

comprimidos matriciais (A1, A2a e A3), apresentados no item 3.4.1 do Capítulo 3.

Figura 4.6. Perfil de decaimento plasmático previsto a partir dos dados de dissolução (aparato II) obtido pelo programa Simcyp[®] comparado ao perfil de decaimento plasmático observado experimentalmente, por meio do estudo de BD, após a ingestão de comprimidos matriciais da formulação A1 contendo 50 mg de fármaco em complexo de furosemida e HP-β-CD.

Figura 4.7. Perfil de decaimento plasmático previsto a partir dos dados de dissolução (aparato II) obtido pelo programa Simcyp[®] comparado ao perfil de decaimento plasmático observado experimentalmente, por meio do estudo de BD, após a ingestão de comprimidos matriciais da formulação A2a contendo 50 mg de fármaco em complexo de furosemida e HP- β -CD.

Figura 4.8. Perfil de decaimento plasmático previsto a partir dos dados de dissolução (aparato II) obtido pelo programa Simcyp[®] comparado ao perfil de decaimento plasmático observado experimentalmente, por meio do estudo de BD, após a ingestão de comprimidos matriciais da formulação A3 contendo 50 mg de fármaco em complexo de furosemida e HP- β -CD.

As curvas observadas e previstas foram comparadas a partir dos valores de erro de predição (EP%) para os parâmetros $C_{\max}$ e ASC_{0-t} conforme a equação 1.5 (Eq. 1.5). A Tabela 4.3 apresenta estes resultados.

Tabela 4.3. Estimativa de erro de predição (EP%) para os parâmetros farmacocinéticos $C_{\max}$ e ASC_{0-t} , para as formulações A1, A2a e A3 a partir dos dados de dissolução (aparato II) obtido pelo programa Simcyp® comparado aos valores observados experimentalmente

Formulação	$C_{\max}$			ASC_{0-t}		
	Observado ($\mu\text{g/mL}$)	Previsto ($\mu\text{g/mL}$)	EP%	Observado ($\mu\text{g.h/mL}$)	Previsto ($\mu\text{g.h/mL}$)	EP%
A1	0,41	0,40	2,91	1,49	1,65	-10,05
A2a	0,77	0,75	3,08	2,21	3,06	-27,79
A3	1,24	1,15	7,47	3,00	4,96	-24,26

A1 = 30% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 4,5% C.M.; A2a = 17,5% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 17% C.M.; A3 = 10% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 24,5% C.M.; $C_{\max}$ = Concentração plasmática máxima; ASC_{0-t} = área sob a curva de decaimento plasmática *versus* tempo de zero ao tempo t; EP% = erro de predição em porcentagem.

Para este programa também foram utilizados os dados de dissolução obtidos com o aparato IV e apresentados no item 2.4.4.2 do Capítulo 2. Nas Figuras 4.9 a 4.11 estão apresentados os perfis de decaimento plasmático previstos a partir desta simulação e observados experimentalmente por meio dos no estudo de BD *in vivo* apresentados no item 3.4.1. do Capítulo 3.

Figura 4.9. Perfil de decaimento plasmático previsto a partir dos dados de dissolução (aparato IV) obtido pelo programas Simcyp[®] comparado ao perfil de decaimento plasmático observado experimentalmente, por meio do estudo de BD, após a ingestão de comprimidos matriciais da formulação A1 contendo 50 mg de fármaco em complexo de furosemida e HP-β-CD.

Figura 4.10. Perfil de decaimento plasmático previsto a partir dos dados de dissolução (aparato IV) obtido pelo programas Simcyp[®] comparado ao perfil de decaimento plasmático observado experimentalmente, por meio do estudo de BD, após a ingestão de comprimidos matriciais da formulação A2a contendo 50 mg de fármaco em complexo de furosemida e HP-β-CD.

Figura 4.11. Perfil de decaimento plasmático previsto a partir dos dados de dissolução (aparato IV) obtido pelo programas Simcyp[®] comparado ao perfil de decaimento plasmático observado experimentalmente, por meio do estudo de BD, após a ingestão de comprimidos matriciais da formulação A3 contendo 50 mg de fármaco em complexo de furosemida e HP- β -CD.

As curvas observadas e previstas foram comparadas a partir dos valores de erro de predição (EP%) para os parâmetros $C_{\max}$ e ASC_{0-t} conforme a equação 1.5 (Eq. 1.5). A Tabela 4.4 apresenta estes resultados.

Tabela 4.4. Estimativa de erro de predição (EP%) para os parâmetros farmacocinéticos $C_{\max}$ e ASC_{0-t} , para as formulações A1, A2a e A3 a partir dos dados de dissolução (aparato IV) obtido pelo programa Simcyp[®] comparado aos valores observados experimentalmente

Formulação	$C_{\max}$			ASC_{0-t}		
	Observado ($\mu\text{g/mL}$)	Previsto ($\mu\text{g/mL}$)	EP%	Observado ($\mu\text{g.h/mL}$)	Previsto ($\mu\text{g.h/mL}$)	EP%
A1	0,41	0,41	0,56	1,49	1,61	-7,52
A2a	0,77	0,70	10,63	2,21	2,47	-10,38
A3	1,24	1,13	9,84	3,00	3,87	-22,47

A1 = 30% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 4,5% C.M.; A2a = 17,5% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 17% C.M.; A3 = 10% HPMC; 10% Furosemida; 55% HP- β -CD; 0,5% Est. Mg.; 24,5% C.M.; $C_{\max}$ = Concentração plasmática máxima; ASC_{0-t} = área sob a curva de decaimento plasmática *versus* tempo de zero ao tempo t; EP% = erro de predição em porcentagem.

Os resultados demonstraram EP% altos nas simulações que utilizaram dados de dissolução obtidos por meio dos aparatos II e IV. Este fato foi mais evidente especialmente para a formulação A3, que apresenta a menor concentração de HPMC (10%). Isto provavelmente foi observado, porque o método desenvolvido pelo Simcyp® está subestimando a eliminação do fármaco, independente do estudo de dissolução empregado no programa. Portanto, nesta formulação a curva de decaimento plasmático *versus* tempo apresentou erros mais pronunciados para a eliminação do fármaco, e a diferença ficou mais evidente porque esta formulação tem maior quantidade absorvida.

Polak e colaboradores (2012) relataram um modelo mecanístico de absorção dérmica de fármacos utilizando dados da formulação, estrato córneo, epiderme, derme e compartimentos sanguíneos. O modelo desenvolvido foi incorporado no simulador Simcyp®, e validado usando os dados de farmacocinética clínica a partir de cinco diferentes formulações tópicas de diclofenaco. O efeito dos melhoradores de penetração, o local de aplicação, variações de gênero e etnia foram incorporadas para simular os ensaios clínicos. O modelo de absorção dérmica mecanística aplicada quando combinado com os dados fisiológicos da pele foi capaz de simular a farmacocinética de acordo com os dados clínicos observados e a variabilidade da população, considerando as cinco formulações em estudo utilizadas na validação do método.

Estas ferramentas podem ser utilizadas para o estabelecimento de uma correlação *in vitro* – *in vivo* – *in silico*. Entretanto, para a obtenção de uma correlação preditiva, faz-se necessário aprimorar estes métodos, pois os resultados obtidos, pelos programas utilizados, apresentaram altos valores de EP%. Comparando o programa Simcyp® ao STELLA®, observa-se que os resultados dos valores de EP% foram superiores nas condições de trabalho durante o presente estudo. Adicionalmente, as curvas de decaimento plasmático *versus* tempo simuladas com o programa Simcyp® tiveram o formato diferente das curvas observadas no estudo de BD *in vivo*. Os dados publicados na literatura sugerem que simulações *in silico* utilizando modelos PBPK devam

ser combinadas com ensaios de dissolução em meios biorrelevantes, pois estes meios apresentam resultados mais preditivos do comportamento do fármaco *in vivo* do que meios compendiais (Chen *et al.*, 2012; Wagner *et al.*, 2012). Portanto, esta abordagem poderia exibir resultados mais preditivos.

4.4.3. Avaliação dos programas utilizados

Neste trabalho, foi possível avaliar os dados em dois programas diferentes. Isto possibilita comparar tanto o desempenho em relação aos resultados obtidos, quanto as facilidades de operação dos sistemas. O Quadro 4.1 sumariza essas informações trazendo parâmetros como, preço e outros aspectos em relação ao uso dos programas.

Quadro 4.1. Comparativo dos programas utilizados no presente trabalho.

	STELLA[®]	Simcyp[®]
Preços	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Licença faculdade/laboratório (U\$99/ano) – com <i>upgrade</i>/atualização e suporte ✓ Licença estudante (U\$59/6 meses – sem <i>upgrade</i> ou suporte) ou (U\$129/licença perpétua – sem <i>upgrade</i>/atualização ou suporte) 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Licença Acadêmica – Necessário participar de curso com uma semana de duração ✓ Licença Ensino – duas vagas gratuitas no curso com uma semana de duração ✓ Curso nos EUA – valores variando de U\$ 2380 a 3432, os valores dependem da data de registro. Registros realizados com antecedência apresentam custo menor. Também é necessário considerar valores de voos e hotéis
Vantagens	<ul style="list-style-type: none"> ✓ O modelo pode ser construído de maneira que atenda as necessidades de um projeto específico 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ O conhecimento fisiológico já está incluído no programa ✓ O <i>layout</i> do programa oferece facilidade operacional ✓ Não é necessário ter conhecimentos de linguagem computacional
Desvantagens	<ul style="list-style-type: none"> ✓ É necessário conhecimento de linguagem computacional 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Algumas vezes é difícil realizar ajustes ao modelo para que se adapte aos

	prévio ✓ Algumas vezes existe dificuldade em construir algum modelo por deficiência de informações, especialmente no caso de novos fármacos	resultados obtidos a partir do estudo <i>in vivo</i>
--	--	--

Nas condições experimentais adotadas neste estudo, encontraram-se resultados significativamente melhores com o STELLA[®]. No entanto, para a seleção de um dos programas devem ser consideradas as variáveis como preço e facilidade de adaptação, tanto em relação aos usuários quanto aos projetos. Neste sentido, o Simcyp[®] apresenta uma interface mais amigável, porém com maior dificuldade de realizar mudanças para adequação aos projetos. Já o STELLA[®] apresenta uma abordagem mais simplificada, mas a falta de uma estrutura robusta e de conhecimento da molécula, como por exemplo nos estudos envolvendo novos fármacos, poderá ser um limitante importante para o emprego deste programa.

4.5. Conclusões

- ✓ As simulações *in silico* obtidas pelo emprego do programa STELLA[®] permitiram uma predição do perfil de decaimento plasmático mais próxima ao observado experimentalmente por meio dos ensaios *in vivo*. Entretanto, os resultados obtidos com o programa Simcyp[®] foram menos representativos do comportamento do fármaco *in vivo*. Corroborando, os valores de EP% obtidos com o STELLA[®] apresentaram desvios menores quando comparados aos resultados com o Simcyp[®]. Diante do exposto, nas condições empregadas neste estudo, o programa STELLA[®] mostrou-se mais adequado para simular os perfis de decaimento plasmático a partir dos dados de dissolução *in vitro*, obtidos com o

aparato IV, para os comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD.

Conclusões

1. O complexo de furosemida e HP- β -CD foi adequadamente obtido por liofilização e a caracterização pelos ensaios termoanalíticos sugerem que houve a formação de complexo de inclusão;
2. Observou-se um aumento da solubilidade do complexo de furosemida e HP- β -CD em relação ao fármaco puro. No entanto, de acordo com os critérios do guia do FDA (United States, 2000) e de acordo com SCB (Amidon *et al.*, 1995), pode-se afirmar que ambos foram considerados de baixa solubilidade e podem ser classificados Classe II ou IV do SCB;
3. Com relação à permeabilidade avaliada por meio da técnica de PAMPA, tanto a furosemida, quanto o complexo de furosemida e HP- β -CD apresentaram baixa permeabilidade, nas condições adotadas para o ensaio;
4. Os comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD, formulações A1, A2, A2a, A2b e A3, foram adequadamente obtidos por compressão direta e a caracterização por testes físicos demonstraram que estas formulações estão de acordo com as especificações da Farmacopeia Brasileira (2010);
5. As formulações produzidas (A1, A2, A2a, A2b e A3) apresentaram perfis de dissolução distintos utilizando o aparato II e IV. Baseado nestes resultados, foram selecionadas as formulações A1, A2a e A3 para o estudo de CIVIV;
6. Nos estudos de biodisponibilidade (BD) *in vivo*, foram observadas diferenças nos perfis de decaimento plasmáticos entre as formulações A1, A2a e A3. A partir destes dados, obteve-se adequadamente a fração absorvida pela técnica de deconvolução numérica;
7. O coeficiente de determinação (r^2) da CIVIV foi de 0,7662 utilizando os dados de dissolução com o aparato II e de 0,96017 para o aparato IV;
8. A validação interna, para avaliar a CIVIV, apresentou valores de EP% inferiores a 12%, considerando a alta variabilidade do

fármaco, pode-se, portanto considerar que a CIVIV foi adequadamente obtida;

9. Nas condições empregadas no estudo *in silico*, o programa STELLA[®] mostrou-se mais adequado para simular os perfis de decaimento plasmático a partir dos dados de dissolução *in vitro*, obtidos com o aparato IV do que de o programa Simcyp[®], para os comprimidos matriciais contendo complexo de furosemida e HP- β -CD.

Referências Bibliográficas

1. ABDEL-HAMID, M.E. High-performance liquid chromatography–mass spectrometric analysis of furosemide in plasma and its use in pharmacokinetic studies. **Farmaco**, v.55, n.6/7, p.448-454, 2000.
2. ABDOL, H.M. **Dissolution, bioavailability & bioequivalence**. Easton: Meck Publishing, 1989. 554p.
3. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Manual de boas práticas em biodisponibilidade e bioequivalência**. Brasília: ANVISA, 2002. 2v. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/bioequivalencia/publicacoes/index.asp>. Acesso em: 10 nov. 2012.
4. AL-MOHIZEA, A.M. Influence of intestinal efflux pumps on the absorption and the transport of furosemide. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v.18, n.2, p.97-101, 2010.
5. AMEUR, H.; BOUZIT, M. 3D hydrodynamics and shear rates' variability in the United States Pharmacopeia Paddle Dissolution Apparatus. **International Journal of Pharmaceutics**, v.452, n.1/2, p.42-51, 2013.
6. AMIDON, G.L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v.12, n.3, p.413-420, 1995.
7. ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, L.V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. São Paulo: Editorial Premier, 2000. 568p.
8. ARMANDO, Y.P. **Avaliação da bioequivalência entre comprimido convencional e comprimido de desintegração oral contendo 8 mg de ondansetrona**. São Paulo, 2008. 117p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
9. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16.ed. Arlington: AOAC, 1995. v.1, pt.1, p.18.
10. AVDEEF, A. **Absorption and drug development: solubility, permeability and charge state**. Hoboken, Chichester: Wiley Interscience, 2003. 309p.
11. AVDEEF, A.; TESTA, B. Physicochemical profiling in drug research: a brief survey of the state-of-the-art of experimental techniques. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.59, n.10, p.1681–1689, 2002.

12. AZARMI, S.; ROA, W.; LÖBENBERG, R. Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v.328, n.1, p.12-27, 2007.
13. BALAN, G.; TIMMINS, P.; GREENE, D.S.; MARATHE, P.H. *In-vitro in-vivo* correlation models for glibenclamide after administration of metformin/glibenclamide tablets to healthy human volunteers. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.52, n.7, p.831-838, 2000.
14. BALAN, G.; TIMMIS, P.; GREENE, D.S.; MARATHE, P.H. *In vitro – in vivo* correlation (IVIVC) models for metformin after administration of modified release (MR) oral dosage forms to healthy human volunteers. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.90, n.8, p.1176-1185, 2001.
15. BANAKAR, U.V. **Pharmaceutical dissolution testing**. New York: Marcel Dekkes, 1992. p.307-395. (Drugs and the pharmaceutical sciences; v.49).
16. BAPTISTA, E.B.; VOLPATO, N.M. Efeito do pH e da presença de tensoativos no meio de dissolução na correlação *in vitro/in vivo* de comprimidos de glibenclamida não bioequivalentes. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.88, n.3, p.107-112, 2007.
17. BENET, L.Z. Understanding bioequivalence testing. **Transplantation Proceedings**, v.1, suppl.3A, p.7S-9S, 1999.
18. BENET, L.Z. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of furosemide in man: a review. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, v.7, n.1, p.1-27, 1979.
19. BHATTACHAR, S.N.; PERKINS, E.J.; TAN, J.S.; BURNS, L.J. Effect of gastric pH on the pharmacokinetics of a BCS class II compound in dogs: utilization of an artificial stomach and duodenum and Gastroplus dissolution model, simulations to predict absorption. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.100, n.11, p.4756-4765, 2011.
20. BONAMICI, D. **Sistema de classificação biofarmacêutico**. São Paulo, 2009. 171p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
21. BORGES, R.M.H. **Introdução à validação de métodos**. Brasília: Coordenação Geral de Credenciamento – CGCRE / Inmetro – Divisão de Credenciamento de Laboratórios – Dicla, 2006. 50p. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/metcientifica/palestras/Renata%20Borges.pdf>. Acesso em: 10 set. 2013.

22. BRAGATTO, M.S.; SANTOS, M.B.; PUGENS PINTO, A.M.P.; GOMES, E.; ANGONESE, N.T.; GIRELLI VIEZZER, W.F.; DONADUZZI, C.M.; MANFIO, J.L. Comparison between pharmacokinetic and pharmacodynamic of single doses of furosemide 40 mg tablets. **Journal of Bioequivalence & Bioavailability**, v.3, n.8, p.191-197, 2011.
23. BRASIL. Resolução RDC n.27, de 17 de maio de 2003. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Guia para validação de métodos bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.1, 22 mai. 2012. Seção 1, pag.93.
24. BRASIL. Resolução RDC n.37, de 03 de agosto de 2011. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.1, 5 ago. 2011. Seção 1, pag.117.
25. BRASIL. Resolução RE n.1.170, de 19 de abril de 2006. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.1, 24 abr. 2006. Seção 1, pag.101.
26. BRASIL. Resolução RE n.310, de 01 de setembro de 2004. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.2, 3 set. 2004. Seção 1, pag.93.
27. BRASIL. Resolução RE n.899, de 29 de maio de 2003. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.2, 2 jun. 2003a. Seção 1, pag.56.
28. BRASIL. Resolução RE n.894, de 29 de maio de 2003. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Guia para protocolo e relatório técnico de estudo de bioequivalência. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.1, 2 jun. 2003b. Seção 1, pag.51.
29. BRASIL. Resolução RE n.482, de 19 de março de 2002. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Guia de correlação para estudos in vitro – in vivo (CIVIV). **Diário Oficial da União**, Brasília, n.1, 20 mar. 2002. Seção 1, pag.116.
30. BRASIL. Resolução n.196, de 10 de outubro de 1996. Estabelece os requisitos para realização de pesquisa clínica de produtos para saúde utilizando seres humanos. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.2, 16 out. 1996. Seção 1, pag.21082.

31. BRASITUS, T.A.; DUDEJA, P.K. Alterations in the physical state and composition of brush border membrane lipids of rat enterocytes during differentiation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.240, n.1, p.483-488, 1985.
32. BRISCOE, C.J.; STILES, M.R.; HAGE, D.S. System suitability in bioanalytical LC/MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.44, n.2, p.484-491, 2007.
33. BUCH, P.; HOLM, P.; THOMASSEN, J.Q.; SCHERER, D.; BRANSCHIED, R.; KOLB, U.; LANGGUTH, P. IVIVC for fenofibrate immediate release tablets using solubility and permeability as *in vitro* predictors for pharmacokinetics. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.99, n.10, p.4427-4436, 2010.
34. BURTON, P.S.; GOODWIN, J.T.; VIDMAR, T.J.; AMORE, B.M. Predicting drug absorption: how nature made it a difficult problem. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.303, n.3, p.889-895, 2002.
35. CAMPOS, D.R.; STORPIRTIS, S.; GAI, M.N.; GONÇALVES, J.E. Aplicação da farmacocinética aos estudos de correlação de dados *in vitro* – *in vivo*. In: STORPIRTIS, S.; GAI, M.N.; CAMPOS, D.R.; GONÇALVES, J.E. **Farmacocinética: básica e aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. cap.20, p.155-161.
36. CARDOT, J.-M.; BEYSSAC, E.; ALRIC, M. *In vitro* – *in vivo* correlation: importance of dissolution in IVIVC. **Dissolutions Technologies**, v.14, n.1, p.15-19, 2007.
37. CARDOT, J.-M.; DAVIT, B.M. *In vitro*–*in vivo* correlations: trick and traps. **AAPS Journal**, v.14, n.3, p.491-499, 2012.
38. CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v.689, n.1, p.175-180, 1997.
39. CHEN, Y.; JIN, J.Y.; MUKADAM, S.; MALHI, V.; KENNY, J.R. Application of IVIVE and PBPK modeling in prospective prediction of clinical pharmacokinetics: strategy and approach during discovery phase with four case studies. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v.33, n.2, p.85-98, 2012.
40. CHEN, X.X.; MURAWSKI, A.; PATEL, K.; CRESPI, C.L.; BALIMANE, P.V. A novel design of artificial membrane for improving the PAMPA model. **Pharmaceutical Research**, v.25, n.7, p.1511-1520, 2007.

41. COLLETT, J.; MORETON, C. Formas farmacêuticas perorais de liberação modificada. In: AULTON, M.E.; GONZALEZ ORTEGA, G.; **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap.20, p.298-313.
42. COLORCON. Pharmaceutical. Modified Release. Select Product: Methocel. Methocel Literature. Applications Data. **Using methocel cellulose ethers for controlled release of drugs in hydrophilic matrix systems**. 2000. Disponível em: http://www.colorcon.com/literature/marketing/mr/Extended%20Release/METHOCEL/English/hydroph_matrix_broch.pdf. http://www.colorcon.com/pharma/mod_rel/methocel/literature/hydroph_matrix_broch.pdf. Acesso em: 1 dez. 2012.
43. CONSIGLIERI, V.O. **Avaliação da qualidade biofarmacêutica da ampicilina sob as formas de suspensão e cápsulas: ensaios *in vitro* e *in vivo* (bioequivalência)**. São Paulo, 1996. 135p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
44. CONSIGLIERI, V.O.; STORPIRTIS, S. Bioequivalência de medicamentos: objetivos, parâmetros farmacocinéticos, decaimentos experimental e critérios de avaliação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.36, n.1, p.13-21, 2000.
45. COOK, J.A. Development strategies for IVIVC in a industrial environment. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v.33, n.7, p.349-353, 2012.
46. COSTA, P.; LOBO, J.M.S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.13, n.2, p.123-133, 2001.
47. CUNHA-FILHO, M.S.S.; SÁ-BARRETO, L.C.L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.28, n.1, p.1-9, 2007.
48. CUSTODIO, J.M.; WU, C.-Y.; BENET, L.Z. Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and role of food on drug absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.60, n.6, p.717-733, 2008.
49. CUTLER, D. Assessment of rate and extent of drug absorption. **Pharmacology & Therapeutics**, v.14, p.123-160, 1981.
50. DE LA PENÃ, M.H.Y.; ALVARADO, Y.V.; DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, A.M.; ARROYO, A.R.C. Comparison of dissolution profiles for

- albendazole tablets using USP apparatus 2 and 4. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.29, n.7, p.777-784, 2003.
51. DEMIRTÜRK, E.; ÖNER, L. *In vitro – in vivo* correlations. **FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.28, n.4, p.215-224, 2003.
 52. DEZANI, A.B. **Avaliação *in vitro* da solubilidade e da permeabilidade da lamivudina e da zidovudina**: aplicações na classificação biofarmacêutica. São Paulo, 2010. 140p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
 53. DRESSMAN, J.B.; AMIDON, G.L.; REPPAS, C.; SHAH, V. Dissolution testing as a prognostic tool for oral absorption: immediate release dosage forms. **Pharmaceutical Research**, v.15, n.1, p.11-22, 1998.
 54. DUNNE, A.; O'HARA, T.; DEVANE, J. A new approach to modeling the relationship between *in vitro* and *in vivo* drug dissolution/absorption. **Statistics in Medicine**, v.18, n.14, p.1865-1877, 1999.
 55. DUTTA, S.; QIU, Y.; SAMARA, E.; CAO, G.; GRANNEMAN, G.R. Once-a-day extended-release dosage form of divalproex sodium III: Development and validation of a level A *in vitro – in vivo* correlation (IVIVC). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.94, n.9, p.1949-1956, 2005.
 56. EBIHARA, A.; TAWARA, K.; OKA, T. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of a slow release formulation of furosemida in man. **Arzneimittel-Forschung**, v.33, n.1, p.163-166, 1983.
 57. EDDINGTON, N.D.; MARROUM, P.; UPPOOR, R.; HUSSAIN, A.; AUSBURGER, L. Development and internal validation of a *in vitro-in vivo* correlation for a hydrophilic metoprolol tartrate extended release tablet formulation. **Pharmaceutical Research**, v.13, n.3, p.466-473, 1998.
 58. EGAN, W.J.; LAURI, G. Prediction of intestinal permeability. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.54, n.3, p.273-289, 2002.
 59. EMAMI, J. *In vitro – in vivo* correlation: from theory to application. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v.9, n.2, p.169-189, 2006.
 60. EMARA, L.H.; EL-MENSHAWI, B.S.; ESTEFAN, M.Y. *In vitro – in vivo* correlation and comparative bioavailability of vincamine in prolonged-release preparation. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.26, n.3, p.243-251, 2000.

61. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Committee for Proprietary Medicinal Products. **Guilne on the investigation of bioequivalence**. 2010. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf. Acesso em: 21 mar. 2013.
62. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Committee for Proprietary Medicinal Products. **Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence**. 2001. Disponível em: http://apps.who.int/prequal/info_applicants/BE/emea_bioequiv.pdf. Acesso em: 21 jan. 2013.
63. FARMACOPEIA Brasileira. 5.ed. São Paulo: ANVISA, 2010.
64. FONSECA, L.B. **Desenvolvimento e validação de método de dissolução aplicado a suspensões orais de nimesulida**. Rio de Janeiro, 2006. 151p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio de Janeiro.
65. FOTAKI, N.; AIVALIOTIS, A.; BUTLER, J.; DRESSMAN, J.; FISCHBACH, M.; HEMPENSTALL, J.; KLEIN, S.; REPPAS, C. A comparative study of different release apparatus in generating *in vitro* – *in vivo* correlations for extended release formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.73, n.1, p.115-120, 2009.
66. FRIJLINK, H.W.; EISSENS, A.C.; SCHOONEN, A.J.M.; LERK, C.F. The effects of cyclodextrins on drug absorption. II. *In vivo* observations. **International Journal of Pharmaceutics**, v.64, p.195-205, 1990.
67. GALLO-NETO, M. **Modelagem farmacocinética e análise de sistemas lineares para a predição da concentração de medicamentos no corpo humano**. São Paulo, 2012. 108p. Dissertação de Mestrado – Escola Politécnica – Universidade de São Paulo.
68. GAMSIZ, E.D.; MILLER, L.; THOMBRE, A.G.; AHMED, I.; CARRIER, R.L. Modeling the influence of cyclodextrins on oral absorption of low-solubility drugs. I. Model development. **Biotechnology and Bioengineering**, v.105, n.2, p.409-420, 2009.
69. GHIMIRE, M.; HODGES, L.A.; BAND, J.; O'MAHONY, B.; MCINNES, F.J.; MULLEN, A.B. STEVENS, H.N.E. *In-vitro* and *in-vivo* erosion profiles of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) matrix tablets. **Journal of Controlled Release**, v.147, n.1, p.70-75, 2010.
70. GHOSH, A.; BHAUMIK, U.K.; BOSE, A.; MANDAL, U.; GOWDA, V.; CHATTERJEE, B.; CHARKRABARTY, U.S.; PAL, T.K. Extended release

- dosage form of glipizide: development and validation of a level A *in vitro* – *in vivo* correlation. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.31, n.10, p.1946-1951, 2008.
71. GIBALDI, M.; PERRIER, D. Pharmacokinetic. 2.ed. New York: Dekker, 1982, p.149-163.
 72. GIOLITO, I.; IONASHIRO, M. A nomenclatura em análise térmica – parte II. **Cerâmica**, v.34, n.225, p.163-164, 1988.
 73. GIORDANO, F.; NOVAK, C.; MOYANO, J.R. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. **Thermochimica Acta**, v.380, p.123-151, 2001.
 74. GRANERO, G.E.; LONGHI, M.R.; MORA, M.J.; JUNGINGER, H.E.; MIDHA, K.K.; SHAH, V.P.; STAVCHANSKY, S.; DRESSMAN, J.B.; BARENDT, D.M. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: furosemide. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.99, n.6, p.2544-2556, 2010.
 75. GRASS, G.M.; MOREHEAD, W.T. Evidence for site-specific absorption of a novel ACE inhibitor. **Pharmaceutical Research**, v.6, n.9, p.759-765, 1989.
 76. GRAY, V.; KELLY, G.; XIA, M.; BUTLER, C.; THOMAS, S.; MAYOCK, S. The science of USP 1 and 2 dissolution: present challenges and future relevance. **Pharmaceutical Research**, v.26, n.6, p.1289-1301, 2009.
 77. GREUPINK, R.; SCHREURS, M.; BENNE, M.S.; HUISMAN, M.T.; RUSSEL, F.G.M. Semi-mechanistic physiologically-based pharmacokinetic modeling of clinical glibenclamide pharmacokinetics and drug-drug-interactions. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.49, n.5, p.819-828, 2013.
 78. GUEDES, F.L.; ALVES, G.M.C.; SANTOS, F.L.A.; LIMA, L.F.; ROLIM, L.A.; ROLIM-NETO, P.J. Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.89, n.3, p.220-225, 2008.
 79. HAMMARLUND, M.M.; PAALZOW, L.K.; ODLIND, B. Pharmacokinetics of furosemide in man after intravenous and oral administration: application of moment analysis. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v.26, n.2, p.197-207, 1984.
 80. HAMMARLUND-UDENAES, M.; BENET, L.Z. Furosemide pharmacokinetics and pharmacodynamics in healthy and disease – an

- update. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, v.17, n.1, p.1-46, 1989.
81. HEATHERINGTON, B.C.; VICINI, P.; GOLDE, H. The pharmacokinetic/pharmacodynamic comparison of SAAM II and PC/WinNonlin modeling software. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.87, n.10, p.1255-1263, 1998.
 82. HELLRIEGEL, E.T.; BJORNSSON, T.D.; HAUCK, W.W. Interpatient variability in bioavailability is related to the extent of absorption: implications for bioavailability and bioequivalence studies. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v.60, n.6, p.601-607, 1996.
 83. HITE, M.; TURNER, S.; FEDERICI, C. **Part 1: Oral delivery of poorly soluble drugs**. 3.ed. [S.l.]: Samedan Ltd, 2003. p.38-40. [Pharmaceutical Manufacturing and Packing Sourcer, Summer].
 84. HYLANDER, B.; DANIELSON, M.; ELIASSON, K. Comparison of hydrochlorothiazide and slow-release furosemide as adjuvant therapy to beta-blockers in the treatment of moderate hypertension. **Acta Medica Scandinavica**, v.22, n.2, p.137-142, 1987.
 85. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Guideline for Good Clinical Practice. ICH Topic E6 (R1)**. 1996. 59p. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/ich/013595en.pdf>. Acesso em: 1 jun. 2010.
 86. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**. 2005. 17p. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf. Acesso em: 1 ago. 2013.
 87. INTERNATIONAL PHARMACEUTICAL FEDERATION. FIP guideline for dissolution testing of solid oral products. **Drug Inf. J.**, v.30, p.1071-1084, 1996. Disponível em: http://www.fip.org/www/uploads/database_file.php?id=260&table_id=. Acesso em: 21 nov. 2012.
 88. JACKSON, E.K. Diuréticos. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.G., eds. **Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. 10.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. cap.29, p.569-592.
 89. JACKSON, A.J. ed. **Generics and bioequivalence**. Boca Raton: CRC Press, 1994. 203p.

90. JAMEI, M.; DICKINSON, G.L.; ROSTAMI-HODJEGAN, A. A framework for assessing inter-individual variability in pharmacokinetics using virtual human populations and integrating general knowledge of physical chemistry, biology, anatomy, physiology and genetics: a tale of 'bottom-up' vs 'top-down' recognition of covariates. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v.24, n.1, p.53-75, 2009.
91. JAMEI, M.; TURNET, D.; YANG, J.; NEUHOFF, S.; POLAK, S.; ROSTAMI-HODJEGAN, A.; TUCKER, G. Population-based mechanistic prediction of oral drug absorption. **AAPS Journal**, v.11, n.2, p.225-237, 2009.
92. JAMZAD, S.; FASSIHI, R. Role of surfactant and pH on dissolution properties of fenofibrate and glipizide: a technical note. **AAPS PharmSciTech**, v.7, n.2, art.33, p.E1-E6, 2006.
93. JUENEMANN, D.; JANTRATID, E.; WAGNER, C.; REPPAS, C.; VERTZONI, M.; DRESSMAN, J.B. Biorelevant *in vitro* dissolution testing of products containing micronized or nanosized fenofibrate with a view to predicting plasma profiles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.77, n.2, p.257-264, 2011.
94. KAMBAYASHI, A.; DRESSMAN, J.B. An *in vitro* – *in silico* – *in vivo* approach to predicting the oral pharmacokinetic profile salts of weak acids: case example dantrolene. **Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.84, n.1, p.200-207, 2013.
95. KANO, E.K. **Avaliação biofarmacêutica de formulações contendo cefadroxil: estudos *in vitro* e *in vivo* (bioequivalência)**. São Paulo, 2002. 233p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
96. KANO, E.K.; SERRA, C.H.R.; KOONO, E.E.M.; ANDRADE, S.S.; PORTA, V. Determination of lamivudine in human plasma by HPLC and its use in bioequivalence studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v.297, n.1/2, p.73-79, 2005.
97. KASIM, A.N.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO, M. LENNERNÄS, H.; HUSSAIN, A.S.; JUNGIGNER, H.E.; STAVCHANSKY, S.A.; MIDHA, K.K.; SHAH, V.P.; AMIDON, G.L. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. **Molecular Pharmacology**, v.1, n.1, p.85-96, 2004.
98. KAUKONEN, A.M.; LAITINEN, L.; SALONEN, J.; TUURA, J.; HEIKKILÄ, T.; LIMNELL, T.; HIRVONEN, J.; LEHTO, V.-P. Enhanced *in vitro* permeation of furosemide loaded into thermally carbonized mesoporous

- silicon (TCPSi) microparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.66, n.3, p.348-356, 2007.
99. KHAN, K.A. The concept of dissolution efficiency. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.27, n.1, p.48-49, 1975.
 100. KIM, E.J.; HAN, K.S.; LEE, M.G. Gastrintestinal first-pass effect of furosemide in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.52, n.11, p.1337-1343, 2000.
 101. KLAČAR, U.; MARKUN, B.; BAUMGARTNER, S.; LEGEN, I. Anovel beads-based dissolution method for the *in vitro* evaluation of extended release HPMC matrix tablets and the correlation with the *in vitro* data. **AAPS Journal**, v.15, n.1, p.267-277, 2012.
 102. KLEIN, S.; RUDOLPH, M.W.; SKALSKY, B.; PETEREIT, H.U.; DRESSMAN, J.B. Use of BioDis to generate a physiologically relevant IVIVC. **Journal of Controlled Release**, v.130, p.216-219, 2008.
 103. KOONO, E.E.M. **Avaliação de bioequivalência de comprimidos contendo 500 mg de tinidazol**. São Paulo, 2005. 178p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
 104. KOROLKOVAS, A. **Dicionário terapêutico Guanabara**: 2007/2008. 14.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.
 105. KORTEJÄRVI, H.; MALKKI, J.; MARVOLA, M.; URTTI, A.; YLIPERTTULA, M.; PAJUNEN, P. Level A *in vitro* – *in vivo* correlation (IVIVC) model with Bayesian approach to formulations series. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.95, n.7, p.1595-1605, 2006.
 106. KORTEJÄRVI, H.; MIKKOLA, J.; BÄCKMAN, M.; ANTILA, S.; MARVOLA, M. Development of level A, B and C *in vitro*–*in vivo* correlations for modified-release levosimendan capsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v.241, n.1, p.87-95, 2002.
 107. LENNERNÄS, H.; ABRAHAMSSON, B. The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension. **Journal Pharmacy and Pharmacology**, v.57, n.3, p.273-285, 2005.
 108. LI, C.L.; MARTINI, L.G.; FORD, J.L.; ROBERTS, M. The use of hypromellose in oral drug delivery. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.57, n.5, p.533-546, 2005.

109. LOFTSSON, T. Cyclodextrins and biopharmaceutics system of drugs. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.44, n.1/4, p.63-67, 2002.
110. LOFTSSON, T.; BREWSTER, M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.85, n.10, p.1017-1025, 1996.
111. LOPES, C.M.; LOBO, J.M.S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.2, p.143-154, 2005.
112. LU, Y.; KIM, S.; PARK, K. In vitro – in vivo correlation: perspectives on model development. **International Journal of Pharmaceutics**, v.418, n.1, p.142-148, 2011.
113. MANADAS, R.; PINA, M.E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.4, p.375-399, 2002.
114. MARAGOS, S.; ARCHONTAK, H.; MACHERAS, P.; VALSAMI, G. Effect of cyclodextrin complexation on the aqueous solubility and solubility/dose ratio of praziquantel. **AAPS PharmaSciTech**, v.10, n.4, p.1444-1451, 2009.
115. MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. São Paulo, 2003. 127p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
116. MATOS, J.R.; MERCURI, L.P.; BARROS, G. Análise térmica aplicada a fármacos e medicamentos. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. **Biofarmarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p.32-65. (Ciências farmacêuticas).
117. MCNAMARA, P.J.; FOSTER, T.S.; DIGENIS, G.A.; PATEL, R.B.; CRAIG, W.A.; WELLING, P.G.; RAPAKA, R.S.; PRASAD, V.K.; SHAH, V.P. Influence of tablet dissolution on furosemide bioavailability: a bioequivalence study. **Pharmaceutical Research**, v.4, n.2, p.150-153, 1987.
118. MELO, R.S. **Validação da correlação *in vitro* – *in vivo* para comprimidos de liberação modificada de diclofenaco de sódio**. São Paulo, 2012. 135p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

119. MERCK Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 12.ed. Whitehouse Station: Merck, 1996.
120. MIDHA, K.K.; RAWSON, M.J.; HUBBARD, J.W. Bioequivalence: swicability and scaling. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.6, n.2, p.87-91, 1998.
121. MILLS, C.D.; WHITWORTH, C.; RYBAK, L.P.; HENLEY, C.M. Quantification of furosemide from sérum and tissues using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v.701, n.1, p.65-70, 1997.
122. MIRZA, T.; BYKADI, S.A.; ELLISON, C.D.; YANG, Y.; DAVIT, B.M.; KHAN, M.A. Use of *in vitro* – *in vivo* correlation to predict the pharmacokinetics of several products containing a BCS class 1 drug in extended release matrices. **Pharmaceutical Research**, v.30, n.1, p.179-190, 2013.
123. MODA, T.L. **Modelagem *in silico* de propriedades farmacocinéticas para a avaliação de candidatos a novos fármacos**. São Carlos, 2011. 216p. Tese de Doutorado – Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo.
124. MODI, N.B. *In vitro* – *in vivo* correlation. In: CHILUKURI, D.M.; SUNKARA, G.; YOUNG, D., eds. **Pharmaceutical product development: *in vitro* – *in vivo* correlation**. New York: Informa Heatlthcare, 2007. cap.5, p.107-123. (Drugs and the pharmaceutical sciences, v.165).
125. MOHAMED, F.A.A.; ROBERTS, M.; SETON, L.; FORD, J.L.; LEVINA, M.; RAJABI-SIAHBOOMI, A.R. The influence of HPMC concentration on release of theophylline or hydrocortisone form extended release mini-tablets. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.39, n.8, p.1167-1174, 2013.
126. MOURÃO, S.C. **Correlação *in vitro* – *in vivo* para formas farmacêuticas sólidas de liberação modificada contendo diclofenaco de sódio**. São Paulo, 2009. 182p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
127. MOURÃO, S.C.; SILVA, C.; BRESOLIN, T.M.B.; SERRA, C.H.R.; PORTA, V. Dissolution parameters for sodium diclofenac – containing hypromellose matrix tablete. **International Journal of Pharmaceutics**, v.386, n.1/2, p.201-207, 2010.
128. NAINAR, S.; RAJIAH, K.; ANGAMUTHU, S.; PRABAKARAN, D.; KASIBHATTA, R. Biopharmaceutical classification system in *in vitrolin*

- vivo* correlation: concept and development strategies in drug delivery. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v.11, n.2, p.319-329, 2012.
129. NAJIB, N.; IDKAIDEK, N.; BESHTAWI, M.; BADER, M.; ADMOUR, I.; ALAM, S.M.; ZAMAN, Q.; DHAM, R. Bioequivalence evaluation of two brands of furosemide 40 mg tablets (Salurin and Lasix) in healthy human volunteers. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v.24, n.6, p.245-249, 2003.
 130. NATION, R.L.; SANSOM, L.N. Bioequivalence requirements for generic products. **Pharmacology & Therapeutics**, v.62, n.1/2, p.41-55, 1994.
 131. NIAZI, S.K. **Handbook of bioequivalence testing**. New York: Informa Healthcare, 2007. 622p. (Drugs and the pharmaceutical sciences, v.171).
 132. NICOLAIDES, E.; SYMILLIDES, M.; DRESSMAN, J.B.; REPPAS, C. Biorelevant dissolution testing to predict the plasma profile of lipophilic drugs after oral administration. **Pharmaceutical Research**, v.18, n.3, p.380-388, 2001.
 133. NIELSEN, P.; AVDEEF, A. PAMPA—a drug absorption *in vitro* model 8: apparent filter porosity and the unstirred water layer. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.22, n.1, p.33–41, 2004.
 134. OSTROWSKI, M.; WILKOWSKA, E.; BACZEK, T. The influence of averaging procedure on the accuracy of IVIVC predictions: immediate release dosage form case study. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.99, n.12, p.5040-5045, 2010.
 135. OSTROWSKI, M.; WILKOWSKA, E.; BACZEK, T. *In vivo – in vitro* correlation for amoxicillin trihydrate 1000 mg dispersible tablet. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.35, n.8, p.981-985, 2009.
 136. OTSUKA, K.; SHONO, Y.; DRESSMAN, J. Coupling biorelevant dissolution methods with physiologically based pharmacokinetic modelling to forecast *in-vivo* performance of solid oral dosage forms. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.65, n.7, p.937-952, 2013.
 137. ÖZDEMİR, N.; ORDU, S. Improvement of dissolution properties of furosemide by complexation with β -cyclodextrin. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.24, n.1, p.19-25, 1998.
 138. ÖZDEMİR, N.; ORDU, S.; ÖZKAN, Y. Studies of floating dosage forms of furosemide: *in vitro* and *in vivo* evaluations of bilayer tablet

- formulations. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.16, n.8, p.857-866, 2000.
139. PELKONEN, O.; TURPEINEN, M.; RAUNIO, H. *In vivo – in vitro – in silico* pharmacokinetic modelling in drug development: current status and future directions. **Clinical Pharmacokinetics**, v.50, n.8, p.483-491, 2011.
 140. PEREIRA, T.M. **Avaliação da solubilidade e da permeabilidade intestinal de fármacos antirretrovirais**: aplicações na classificação biofarmacêutica. São Paulo, 2011. 151p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
 141. PEZZINI, B.R.; SILVA, M.A.S.; FERRAZ, H.G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.4, p.491-502, 2007.
 142. POLAK, S.; GHOBADI, C.; MISHRA, H.; AHAMADI, M.; PATEL, N.; JAMEL, M.; ROSTAMI-HODJEGAN, A. Prediction of concentration-time profile and its inter-individual variability following the dermal drug absorption. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.101, n.7, p.2584-2595, 2012.
 143. PONTO, L.L.B.; SHOENWALD, R.D. Furosemide (frusemide): a pharmacokinetic/pharmacodynamics review (part I). **Clinical Therapeutics**, v.18, n.5, p.381-408, 1990.
 144. PORTA, V.; SCHRAMM, S.G.; KANO, E.K.; KOONO, E.E.; ARMANDO, Y.P.; FUKUDA, K.; SERRA, C.H.S. HPLC-UV determination of metformin in human plasma for application in pharmacokinetics and bioequivalence studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.46, n.1, p.143-147, 2008.
 145. PORTA, V.; YAMAMICHI, E.; STORPIRTIS, S. Avaliação biofarmacêutica *in vitro* de cápsulas de fluconazol. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.3, p.333-343, 2002.
 146. POWERS, J.D. Statistical considerations in pharmacokinetics study design. **Clinical Pharmacokinetics**, v.24, n.5, p.380-387, 1993.
 147. PRÓ-GENÉRICOS. Associação Brasileira das Indústrias de Medicamentos Genéricos. Institucional. Quem Somos. História. **História dos medicamentos genéricos no Brasil**. São Paulo: pró-genérico, 2011. Disponível em: <http://www.progenericos.org.br/index.php/historia>. Acesso em: 13 jan. 2013.

148. PROULX, P. Structure-function relationships in intestinal brush border membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1071, n.3, p.255-271, 1991.
149. QIU, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, G.G.Z.; LIU, L.; PORTER, W.R., eds. **Developing solid oral dosage forms**: pharmaceutical theory and practice. Amsterdam: Elsevier; London: Academic Press, 2009. 907p.
150. QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIN, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v.24, n.1, p.68-76, 2001.
151. REIS, J.M. **Ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA)**: investigação das variáveis do ensaio para o estudo da permeabilidade de fármacos. São Paulo, 2013. 157p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
152. REIS, J.M.; DEZANI, A.B.; PEREIRA, T.M.; AVDEEF, A.; SERRA, C.H.R. Lamivudine permeability study: a comparison between PAMPA, *ex vivo* and *in situ* Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.48, n.4/5, p.781-789, 2013.
153. REIS, J.M.; SINKÓ, B.; SERRA, C.H.R. Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) – is it better than Caco-2 for human passive permeability prediction? **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.10, n.11, p.1071-1076, 2010.
154. RITSCHER, W.A. **Handbook of basic pharmacokinetics**. 4.ed. Hamilton: Drug Intelligence, 1992. 588p.
155. ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; OWEN, S.C., eds. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 5.ed. London: Pharmaceutical Press; Chicago: APhA Publications, 2006. 918p.
156. RUELL, J.; TSINMAN, K.L.; AVDEEF, A. PAMPA - a drug absorption *in vitro* model 5. Unstirred water layer in iso-pH mapping assays and pKa flux - optimized design (pOD-PAMPA). **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.20, n.4/5, p.393-402, 2003.
157. SALSA, T.; VEIGA, F.; PINA, M.E. Oral controlled-release dosage forms. I. Cellulose ether polymers in hydrophilic matrices. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.23, n.9, p.929-938, 1997.

158. SANTUS, G.; LAZZARINI, C.; BOTTONI, G.; SANDEFER, E.P.; PAGE, R.C.; DOLL, W.J.; RYOU, U.Y.; DIGENIS, G.A. An *in vitro* – *in vivo* investigation of oral bioadhesive controlled release furosemide formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.44, n.1, p.39-52, 1997.
159. SERRA, C.H.R. **Avaliação biofarmacotécnica de comprimidos contendo cefalexina**: cinética de dissolução e bioequivalência. São Paulo, 1998. 205p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
160. SERRA, C.H.R.; KOONO, E.E.M.; KANO, E.K.; SCHRAMM, S.G.; ARMANDO, Y.P.; PORTA, V. Bioequivalence and pharmacokinetics of two zidovudine formulations in healthy Brazilian volunteers: an open-label, randomized, single-dose, two-way crossover study. **Clinical Therapeutics**, v.30, n.5, p.902-908, 2008.
161. SERRA, C.H.R.; STORPIRTIS, S. Comparação de perfis de dissolução da cefalexina através de estudos de cinética e eficiência de dissolução (ED%). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.1, p.79-88, 2007.
162. SINKO, P.J.; LEESMAN, G.D.; AMIDON, G.L. Predicting fraction dose absorbed in human using mass balance approach. **Pharmaceutical Research**, v.8, n.8, p.979-988, 1991.
163. SHAH, H.J.; SUBBAIAH, G.; PATEL, D.M.; PATEL, C.N. *In vitro* – *in vivo* correlation of modified release dosage form of lamotrigine. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v.30, n.9, p.524-531, 2009.
164. SHARGEL, L.; YU-PONG, S.; YU, A.B.C. **Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics**. 6.ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2012. 811p.
165. SHIN, S.; CHOI, D.H.; TRUONG, N.K.V.; KIM, N.A.; CHU, K.R.; JEONG, S.H. Time-oriented experimental design method to optimize hydrophilic matrix formulations with gelatin kinetics and drug release profiles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.407, p.53-62, 2011.
166. SHONO, Y.; JANTRATID, E.; DRESSMAN, J.B. Precipitation in the small intestine may play a more important role in the *in vivo* performance of poorly soluble weak bases in the fasted state: case example nelfinavir. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.79, n.2, p.349-356, 2011.
167. SHONO, Y.; JANTRATID, E.; JANSSEN, N.; KESISOGLOU, F.; MAO, Y.; VERTZONI, M.; REPPAS, G.; DRESSMAN, J.B. Prediction

- effects of food on the absorption of celecoxib based on biorelevant dissolution testing coupled with physiologically based pharmacokinetic modeling. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.73, n.1, p.107-114, 2009.
168. SIEPMANN, J.; PEPPAS, N.A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.48, n.2/3, p.163-174, 2012.
 169. SIEWERT, M.; DRESSMAN, J.; BROWN, C.; SHAH, V. FIP/ AAPS guidelines for dissolution/ *in vitro* release testing of novel/special dosage forms. **Dissolution Technologies**, v.10, p.6-15, 2003.
 170. SIRISUTH, N.; EDDINGTON, N. *In vitro-in vivo* correlation, definitions and regulatory guidance. **International Journal of Generic Drugs**, pt.2, p.1-11, 2002. Disponível em: <http://www.iagim.org/pdf/ivivc-01.pdf>. Acesso em: 01 set. 2013.
 171. SORA, D.I.; UDRESCU, S.; ALBU, F.; DAVID, V.; MEDVEDOVICI, A. Analytical issues in HPLC/MS/MS simultaneous assay of furosemide, spironolactone and canrenone in human plasma samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.52, n.5, p.734-740, 2010.
 172. SOTO, E.; HAERTTER, S.; KOENEN-BERGMANN, M.; STAAB, A.; TROCÓNIZ, I.F. Population *in vitro* – *in vivo* correlation model for pramipexole slow – release oral formulations. **Pharmaceutical Research**, v.27, n.2, p.340-349, 2010.
 173. SPAMER, E.; MÜLLER, D.G.; WESSELS, P.L.; VENTER, J.P. Characterization of the complexes of furosemide with 2-hydropropyl- β -cyclodextrin and sulfobutyl ether-7- β -cyclodextrin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.16, n.4/5, p.247-253, 2002.
 174. SPRICIGO, R. **Desenvolvimento de comprimidos de liberação prolongada de furosemida**: influência das ciclodextrinas. São Paulo, 2006. 159p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
 175. SPRICIGO, R.; BOTELHO, K.C.A.; CONSIGLIERI, V.O.; SERRA, C.H.R. Obtenção e avaliação de complexos de inclusão de furosemida com β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina: efeitos sobre as propriedades de dissolução do fármaco. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, n.5, p.645-53, 2008.
 176. STAVCHANSKY, S.; PADE, V. Link between drug absorption solubility and permeability measurements in Caco-2 cells. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.87, n.12, p.1604-1607, 1998.

177. ŠTEFANIČ, M.; LOCATELLI, I.; VREČER, F.; SEVER, T.; MRHAR, A.; BOGATAJ, M. The influence of gastric emptying kinetics on the drug release from enteric coated pellets in fasted state: an *in vitro/in vivo* correlation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.82, n.2, p.376-382, 2012.

178. STORPIRTIS, S.; BAALDUÍNO, J.; BUENO, M.M.; FREITAS, S.T.; GATTO, R.C.; LIMA FILHO, P.; MARCOLONGO, R.; VALENTE, V.R. **Aspectos técnicos relativos ao registro de medicamentos genéricos no Brasil**. [S.l.]: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2008. 14p. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/profissionais/artigos/registro_med.pdf. Acesso em: 28 jan. 2013.

179. STORPIRTIS, S.; CONSIGLIERI, V.O. Biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos: aspectos fundamentais para o planejamento e execução de estudos. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.31, n.2, p.63-70, 1995.

180. STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. **Biofarmarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 321p. (Ciências farmacêuticas).

181. TAKAHASHI, A.I. **Obtenção e caracterização de complexos binários e ternários de sinvastatina e ciclodextrina**. São Paulo, 2009. 99p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

182. TAKANO, R.; KATAOKA, M.; YAMASHITA, S. Integrating drug permeability with dissolution profile to develop IVIVC. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v.33, n.7, p.354-365, 2012.

183. THELEN, K.; COBOEKEN, K.; WILLMANN, S.; DRESSMAN, J.B.; LIPPERT, J. Evolution of a detailed physiological model to simulate the gastrointestinal transit and absorption process in humans. Part II: Extension to describe performance of solid dosage forms. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.101, n.3, p.1267-1280, 2012.

184. THELEN, K.; COBOEKEN, K.; WILLMANN, S.; BURGHHAUS, R.; DRESSMAN, J.B.; LIPPERT, J. Evolution of a detailed physiological model to simulate the gastrointestinal transit and absorption process in humans. Part I: Oral solutions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.100, n.12, p.5324-5345, 2011.

185. TROTTA, F.; ZANETTI, M.; CAMINO, G. Thermal degradation of cyclodextrins. **Polymer Degradation and Stability**, v.69, n.3, p.373-379, 2000.

186. UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Office of Federal Register. Code of Federal regulations Title 21: Food and drug Administration. Subchapter D: Drugs for human use. Part 320. **Bioavailability and bioequivalence requirements.** 2004. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=320&showFR=1>. Acesso em: 02 out. 2013.

187. UNITED STATES. Food and Drug Administration. **Guidance for Industry:** bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products – general considerations. 2003. 26p. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070124.pdf>. Acesso em: 29 jan. 2013.

188. UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. **Guidance for industry:** bioanalytical method validation. 2001. 25p. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>. Acesso em: 1 ago. 2013.

189. UNITED STATES. Food and Drug Administration. **Guidance for industry:** waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. 2000. 16p. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070246.pdf>. Acesso em: 24 ago. 2013.

190. UNITED STATES. Food and Drug Administration. **Guidance for industry:** extended release oral dosage forms: development, evaluation, and applications of *in vitro/in vivo* Correlation. 1997a. 27p. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070239.pdf>. Acesso em: 25 ago. 2013.

191. UNITED STATES. Food and Drug Administration. **Guidance for industry:** dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms. 1997b. 17p. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070237.pdf>. Acesso em: 19 jan. 2013.

192. UNITED States Pharmacopeia: USP34; National Formulary: NF29. Rockville: United States Pharmacopeial, 2012.

193. UPPOOR, V.R.S. Regulatory perspectives on *in vitro* (dissolution)/*in vivo* (bioavailability) correlations. **Journal of Controlled Release**, v.72, n.1/3, p.127-132, 2001.

194. VERHOEVEN, J.; PESCHIER, L.J.C.; DANHOF, M.; JUNGINGER, H.E.A. Controlled-release matrix tablet of furosemide: design, *in vitro* evaluation, pharmacological and pharmacodynamic evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.45, n.1/2, p.65-77, 1988.
195. VOLPE, D.A. Application of method suitability for drug permeability classification. **APPS Journal**, v.12, n.4, p.670-678, 2010.
196. WAGNER, C.; JANTRATID, E.; KESISOGLOU, F.; VERTZONI, M.; REPPAS, C.; DRESSMAN, J.B. Predicting the oral absorption of a poorly soluble, poorly permeable weak base using biorelevant dissolution and transfer model tests coupled with physiologically based pharmacokinetic model. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.82, n.1, p.127-138, 2012.
197. WALSHE, M.; KELLY, M.T.; SMYTH, M.R. Comparison of two extraction methods for determination of propranolol and furosemide in human plasma by mixed-mode chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.14, n.4, p.475-481, 1996.
198. WATSON, D.G. **Pharmaceutical analysis**: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1999.
199. WEI, H.; LÖBENBERG, R. Biorrelevant dissolution media as predictive tool for glyburide a class II drug. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.29, n.1, p.45-52, 2006.
200. WELLING, P.G.; TSE, F.L.S.; DIGHE, S.V. **Pharmaceutical bioequivalence**. New York: Marcel Dekker, 1991. 467p. (Drugs and the Pharmaceutical Sciences, v.48).
201. WENDLANDT, W.W. **Thermal analysis**. 3.ed. New York: Wiley, 1986. 814p. (Chemical analysis, v.19).
202. WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO **Expert Committee on Specification for Pharmaceutical Preparation**: 40 Report. Geneva: WHO, 2006. 478p. (WHO Technical report series, 937).
203. WORLD MEDICAL ASSOCIATION. **Declaration of Helsinki**: ethical principles for medical research involving human subjects. 5p. 2008. Disponível em: <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/17c.pdf>. Acesso em: 1 jun. 2013.

204. YADAV, K.; YADAV, D.; SRIVASTAVA, A.K. Evaluation of hydrophilic, hydrophobic and waxy matrix excipients for sustained release tablets of venlafaxine hydrochloride. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.39, n.8, p.1197-1206, 2013.
205. YASIR, M.; ASIF, M.; AMMEDUZAFAR, CHAUHAN, I.; SINGH, A.P. *In vitro-in vivo* correlation: a review. **Drug Invention Today**, v.2, n.6, p.282-286, 2010.
206. YUKSEL, N.; KANIK, A.E.; BAYKARA, T. Comparison of *in vitro* dissolution profiles by ANOVA-based, model dependent and independent methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v.209, p.57-67, 2000.
207. ZUGASTI, M.E.; ZORNOZA, A.; GOÑI, M.D.M.; ISASI, J.R.; VÉLAZ, I.; MARTÍN, C.; SANCHEZ, M.; MARTÍNEZ-OHÁRRIZ, M.C. Influence of soluble and insoluble cyclodextrin polymers on drug release from hydroxypropyl methylcellulose tablets. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.35, n.10, p.1264-1270, 2009.

Anexos

ANEXO A

Documento de informações para os membros de bancas julgadoras de mestrado/doutorado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de 30 minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de 30 minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de 30 minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até 60 minutos por examinador.

2.2 Tempo máximo total de arguição: 3 horas para o mestrado e 5 horas para o doutorado.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

4.2 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 26 de maio de 2011.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO B

Aprovação dos Comitês de Ética HU e FCF - USP

São Paulo, 11 de dezembro de 2009.

Ilmo(a) Sr(a),

Dra. Cristina Helena dos Reis Serra

Departamento de Farmácia

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** "Biodisponibilidade da furosemida complexada à beta ciclodextrina correlação in vitro – in vivo em voluntários humanos" -
Pesquisador(a) Responsável: Dra. Cristina Helena dos Reis Serra - **Co-Investigador(es):** Marina de Freitas Silva, Alexandre Volney Villa - **Registro CEP-HU/USP:** 942/09 – **SISNEP CAAE:** 0029.0.018.198-09

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 06 de novembro de 2009, analisou o Projeto de Pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO** bem como o seu **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final, em função da duração da pesquisa), de acordo com a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, inciso IX.2, letra "c".

O primeiro relatório está previsto para 06 de novembro de 2010.

Atenciosamente,

Dr. Maurício Seckler
 Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
 Hospital Universitário da USP

São Paulo, 18 de janeiro de 2010.

Il^{mo}(s). S^{re}(a).

Dra. Cristina Helena dos Reis Serra

Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** "*Biodisponibilidade de furosemida complexada à beta ciclodextrina: correlação in vitro – in vivo em voluntários humanos*" - **Registro CEP-HU/USP:** 942/09 - **Registro SISNEP CAAE:** 0029.0.018.198-09.

Prezada Doutora,

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 15 de janeiro de 2010, analisou e APROVOU a alteração da formulação referência de comprimidos para solução injetável, descritos no Protocolo do Estudo e no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Atenciosamente,

Dr. Maurício Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
 Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO

 Parecer CEP/FCF/02/2010
 Protocolo CEP/FCF/533
 CAAE: 0029.0.018.198-09

I – Identificação:

Projeto de Pesquisa:	Avaliação da correlação <i>in vitro</i> – <i>in vivo</i> A Partir De Comprimidos Matriciais De Furosemida Complexada à Ciclodextrina
Pesquisador Responsável:	Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra
Instituição:	Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP
Área Temática Especial:	Não se aplica
Patrocinadores:	Não se aplica

II - Sumário Geral do Protocolo:

Será realizada análise comparativa dos dados de biodisponibilidade do complexo furosemida-ciclodextrina, na forma farmacêutica sólida-oral, obtidos por estudo "*in vitro*" e "*in vivo*". Desta forma, pretende-se, para algumas situações, avaliar a possibilidade da substituição do teste em "*in vivo*" pelo "*in vitro*" para a demonstração de bioequivalência de preparações de fármacos que apresentem o processo de dissolução como etapa limitante da absorção.

Os objetivos do presente estudo são:

Objetivo geral:

Estabelecer um estudo de correlação *in vitro* – *in vivo* a partir de comprimidos de liberação prolongada contendo furosemida.

Objetivos específicos:

- obtenção de comprimidos matriciais de furosemida – ciclodextrina com distintos perfis de dissolução;
- caracterização dos comprimidos quanto aos aspectos físicos e físico-químicos;
- desenvolvimento de metodologia para ensaios de dissolução da furosemida e avaliação dos perfis obtidos, sob diferentes condições do ensaio (estudo *in vitro*);
- desenvolvimento da metodologia analítica para determinação e quantificação da furosemida no plasma;
- realização dos estudos de biodisponibilidade utilizando três formulações de furosemida, com distintos perfis de dissolução (estudo *in vivo*).

Tipo de estudo:

O estudo está constituído por uma etapa *in vitro*, ensaio experimental, e por uma etapa *in vivo*, ensaio aleatório cruzado.

Descrição da Casuística:

O ensaio aleatório cruzado será realizado em humanos, entre 12 a 24 voluntários sadios de ambos os sexos, selecionados a partir de exames clínicos e laboratoriais (exames de sangue e urina).

Para a execução dos exames laboratoriais, compostos por hemograma completo; uréia; creatinina; fosfatase alcalina; glicemia; bilirrubina total; proteínas totais e albumina; transaminase oxalacética e pirúvica (TGO e TGP); ácido úrico; colesterol total;

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

triglicérides; urina tipo I; sorologia para HIV, hepatite B e hepatite C; e β -HCG (para mulheres), realizar-se-ão quatro coletas de amostras de sangue e uma de urina.

As coletas de material para exames laboratoriais e o eletrocardiograma serão realizadas no Hospital Universitário da USP. Ao final do estudo, todos os exames serão repetidos.

Este estudo não contempla a aplicação de questionário.

Os critérios de inclusão dos participantes (voluntários) são:

- ✓ não fumantes ou fumantes até 10 cigarros/dia;
- ✓ bom estado de saúde, idade entre 21 e 45 anos, e peso dentro do ideal $\pm 15\%$, calculado pela fórmula $PI = (H - 100)$ para homens e $PI = 0,9 \times (H - 100)$ para mulheres, em que PI é o peso ideal (kg) e H, a altura do voluntário (cm);
- ✓ ausência de patologias cardíacas, renais, gastrintestinais, neurológicas ou metabólicas;
- ✓ sem antecedentes de hipersensibilidade a medicamentos;
- ✓ não devem estar em tratamento com medicamentos;
- ✓ voluntárias do sexo feminino não devem estar em estado de gravidez (comprovado através de exame laboratorial) ou em período de amamentação;
- ✓ considerados aptos após avaliação médica de resultados de exames clínicos, gráfico (eletrocardiograma) e laboratoriais

Serão critérios de exclusão:

- ✓ não satisfaçam os critérios de inclusão supracitados;
- ✓ apresentem resultados fora da normalidade para os exames clínicos e laboratoriais, segundo critério médico;
- ✓ apresentem mal-estar decorrente da retirada de amostras de sangue, tal como tortura, queda de pressão ou desmaio e expressem desejo de serem excluídos do estudo;
- ✓ apresentem reações adversas ao medicamento administrado e expressem desejo de serem excluídos do estudo;
- ✓ independentemente de qualquer intercorrência, expressem desejo de serem excluídos do estudo.

III – Situação do Protocolo: APROVADO em 08/02/2010.

O pesquisador deverá:

- Comunicar ao CEP:
 - A ocorrência de efeitos colaterais e ou de reações não esperadas;
 - Eventuais modificações no projeto aguardando a apreciação e aprovação do CEP;
 - A interrupção do projeto;
- Apresentar relatório parcial em março de 2011 e relatório final em agosto de 2012.

São Paulo, 10 de fevereiro de 2010.

Prof. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/FCF/USP

ANEXO C

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

1934 | 2009
USP 75 ANOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

1. Nome do Paciente:.....
 Documento de Identidade Nº :..... Sexo: () M () F
 Data de Nascimento:...../...../.....
 Endereço:..... Nº:..... Apto:.....
 Bairro:..... Cidade:.....
 CEP:..... Telefone:.....

2. Responsável Legal:.....
 Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):.....
 Documento de Identidade Nº:..... Sexo: () M () F
 Data de Nascimento:...../...../.....
 Endereço:..... Nº:..... Apto:.....
 Bairro:..... Cidade:..... CEP:..... Tel:.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

Título do Protocolo de Pesquisa: Avaliação da correlação *in vitro* – *in vivo* a partir de comprimidos matriciais de furosemida complexada à ciclodextrina

1. Pesquisador responsável: Cristina Helena dos Reis Serra
 Cargo/Função: Professora doutora Departamento da FCF/USP: Departamento de Farmácia
 Pesquisador: Marina de Freitas Silva
 Cargo/Função: Doutoranda Departamento da FCF/USP: Departamento de Farmácia

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

Risco Mínimo (X) Risco Médio ()
 Risco Baixo () Risco Maior ()

(Probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo. Nos projetos com coleta de sangue, incluir detalhadamente, como observação as possíveis reações decorrentes desse procedimento.)

3. Duração da Pesquisa: 2 anos

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa:

Este trabalho se propõe a avaliar o comportamento de comprimidos contendo furosemida no organismo humano, de modo a estabelecer uma correlação com estudos *in vitro* para possibilitar a substituição dos estudos de biodisponibilidade relativa pelos estudos de dissolução. A furosemida é um diurético que também apresenta propriedades anti-hipertensivas.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos; incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais:

Para ser incluído no estudo, o(a) senhor(a) será submetido a exames clínicos e laboratoriais, com quatro coletas de amostras de sangue e uma de urina. Serão realizados os seguintes exames laboratoriais: hemograma completo; uréia; creatinina; fosfatase alcalina; glicemia; bilirrubina total; proteínas totais e albumina; transaminase oxalacética e pirúvica (TGO e TGP); ácido úrico; colesterol total; triglicérides; urina tipo I; sorologia para HIV, hepatite B e hepatite C; e β -HCG (para mulheres). As coletas de sangue e urina para exames laboratoriais serão realizadas pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da USP. Para a coleta de urina o senhor(a) receberá um frasco coletor, e após o período de 2h sem urinar, irá coletar sua urina. Será feito também um eletrocardiograma. A avaliação médica e o eletrocardiograma serão realizados no Hospital Universitário da USP. Ao final do estudo estes mesmos exames laboratoriais e clínicos serão repetidos, juntamente com o eletrocardiograma. As internações para o estudo serão no Hospital Universitário da USP, nos dias do estudo, às 6:00 horas da manhã. O(a) senhor(a) deverá comparecer em jejum de pelo menos 8:00 horas e não poderá levar nenhum tipo de alimento para o hospital, pois a partir do momento da internação receberá dieta padronizada.

O(A) senhor(a) permanecerá no hospital durante todo o dia, até as 19 horas, não sendo necessário passar a noite no hospital. O(A) senhor (a) deverá retornar por mais 3 vezes no dia seguinte às 7:00 e às 19 e no próximo dia às 07:00 horas. O(A) senhor (a) deverá retornar para mais 3 fases ao hospital para repetir o procedimento e finalizar o estudo.

O(A) senhor(a) tomará os comprimidos de furosemida obtidos em farmácia comercial e comprimidos especialmente produzidos para este estudo, com o auxílio de 200 mL de água.

O estudo será realizado em 4 fases. Nas 3 primeiras fases, o(a) senhor(a) receberá as formulações testes e na última o(a) senhor(a) receberá uma solução injetável que será utilizada como referência para a comparação com as formulações testes. O intervalo entre cada uma das fases será de no mínimo 5 dias. Para avaliar o comportamento dos comprimidos e da solução injetável no organismo, serão realizadas coletas de sangue nos seguintes tempos: 0:00, 0:30, 1:00, 1:30, 2:00, 2:30, 3:00, 3:30, 4:00, 6:00, 8:00, 10:00, 12:00, 24:00, 36:00 e 48:00 horas após a administração do produto. Desta forma em cada fase serão retirados 128 mL de sangue, sendo no final do estudo o total de 512 mL. Para evitar que sua veia seja punccionada muitas vezes, será colocado um sistema apropriado para a retirada de sangue. O jejum deverá ser mantido até quatro horas depois de tomar o produto.

3. Desconfortos e riscos esperados:

A furosemida é um remédio amplamente utilizado. A furosemida é utilizada no tratamento hipertensão e edema-pulmonar. Apresenta como reações adversas encefalopatia hepática em pacientes com insuficiência hepatocelular, pancreatite, anorexia, irritação gástrica e oral, diarreia, constipação, náusea, vômito; vasculite sistêmica, nefrite intersticial; dores de cabeça, vertigem, perda de audição; anemia, leucopenia, anemia hemolítica, trombocitopenia, anemia aplástica (raro), agranulocitose (raro); dermatite exfoliativa, eritema multiforme, púrpura, urticária, foto-sensibilidade, prurido; hipotensão ortostática que está sujeita a agravamento com o uso concomitante ao álcool, barbitúricos ou narcóticos; hiperglicemia, glicosúria, hiperuricemia, espasmos musculares, fraqueza, cansaço, espasmo urinário, febre, tromboflebite.

4. Benefícios que poderão ser obtidos:

Embora não existam benefícios diretos aos voluntários envolvidos no estudo descrito, o mesmo poderá trazer benefícios futuros à população, na medida em que irá avaliar o comportamento desse tipo de remédio no organismo e estabelecer uma relação entre estes resultados e estudo *in vitro* podendo no futuro substituir os estudos *in vivo* no registro e alterações pós-registros de medicamentos genéricos e similares.

5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo;

Atualmente, não existem outros métodos que possam ser aplicados em estudos desse tipo.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

1. O(a) senhor(a) terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas.
2. O(a) senhor(a) terá liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga qualquer prejuízo.
3. Na divulgação dos resultados da pesquisa, os voluntários serão identificados apenas por números, garantindo sua privacidade e a confidencialidade dos dados obtidos.
4. Será realizado um seguro para garantir indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

O ensaio será acompanhado por profissional médico capacitado a prestar assistência em caso de necessidade. Os pesquisadores estarão à disposição dos voluntários para quaisquer esclarecimentos nos telefones: 3091-3823 / 3091-2217 (Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra e Doutorado e Farmacologia Marina de Freitas Silva)

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos dessa pesquisa, favor entrar em contato com: Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13A – Butantã – São Paulo – CEP: 05508-900, Telefone: 3091-3877 – e-mail: cepfcf@usp.br e/ou CEP-HU/USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2585 Cidade Universitária CEP: 05508-000, São Paulo – SP. Telefone: 3091-9457. Fax: 3091-9452. E-mail: cep@hu.usp.br.

VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa
ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
Marina de Freitas Silva

Comitê de Ética em Pesquisas do HU / USP: Av. Professor Lineu Prestes, 2585, 3º andar CEP:05508-000

Fone: (11) 3039-9479 Fax: 3091-9452 E-mail: cep@hu.usp.br

Comitê de Ética em Pesquisas da FCF/USP: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13º CEP:05508-900

Fone: (11) 3039-3877 E-mail: cepfcf@usp.br

ANEXO D

Curvas de Decaimento plasmáticos individuais

Figura AC. 1. Curva de decaimento plasmático após a administração por via oral dos produtos desenvolvidos A1, A2a e A3 e por via intravenosa do referência (Furosemida IV Teuto®) aos voluntários 1, 2, 3 e 4.

Figura AC. 2. Curva de decaimento plasmático após a administração por via oral dos produtos desenvolvidos A1, A2a e A3 e por via intravenosa do referência (Furosemida IV Teuto®) aos voluntários 5, 6, 7 e 8.

Figura AC. 3. Curva de decaimento plasmático após a administração por via oral dos produtos desenvolvidos A1, A2a e A3 e por via intravenosa do referência (Furosemida IV Teuto®) aos voluntários 9, 10, 11 e 12.