

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Débora Priscila de Campos**

**CANDESARTANA CILEXETILA: UM CANDIDATO A BIOISENÇÃO E AO  
PROGRAMA FARMÁCIA POPULAR DO BRASIL?**

**OURO PRETO**

**2017**

**Débora Priscila de Campos**

**Candesartana cilexetila: um candidato a bioisemção e ao Programa Farmácia Popular do Brasil?**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestra.

Área de concentração: Fármacos e medicamentos.

**Orientadora: Profa. Dra. Jacqueline de Souza**

**Coorientadora: Profa. Dra. Neila Márcia Silva Barcellos**

**Ouro Preto**

**2017**

C198c Campos, Débora Priscila de.  
Candesartana cilexetila [manuscrito]: um candidato a bioisemção e ao Programa Farmácia Popular do Brasil / Débora Priscila de Campos. - 2017. 122f.: il.: color; graf; tabs; quadros.

Orientador: Profa. Dra. Jacqueline de Souza.

Coorientador: Profa. Dra. Neila Márcia Silva Barcellos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

1. Medicamentos genéricos - Candesartana cilexetila. 2. Programa Farmácia Popular do Brasil. 3. Biofarmacêutica - Sistema de Classificação. 4. Solubilidade. 5. Permeabilidade. I. Souza, Jacqueline de. II. Barcellos, Neila Márcia Silva. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 615.1/2

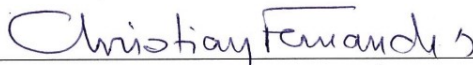
Catálogo: [www.sisbin.ufop.br](http://www.sisbin.ufop.br)



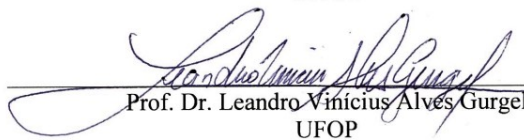
## LISTA DE PRESENÇA

Sessão de defesa da 125ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas a **Débora Priscila de Campos**, com a defesa da dissertação intitulada: “Candesartana cilexetila: Um candidato a bioisemção e ao programa farmácia popular do Brasil?”, avaliada pela banca examinadora abaixo:

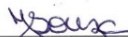
Ouro Preto, 09 de março de 2017.



Prof. Dr. Christian Fernandes  
UFMG



Prof. Dr. Leandro Vinicius Alves Gurgel  
UFOP



Profa. Dra. Jacqueline de Souza  
UFOP

*“It is by logic that we prove, but by intuition that we discover”.*

Henri Poincaré

## AGRADECIMENTOS

Como sempre em primeiro lugar à Deus, pela vida, pelas oportunidades e pela força nos momentos difíceis.

À minha família, especialmente aos meus pais, Amilton e Stela pelo apoio incondicional.

Ao meu querido Paulinho pelo incentivo, compreensão e paciência durante este período.

À minha orientadora Jacqueline, a quem respeito e admiro. Obrigada pela oportunidade, paciência e pela exigência na medida certa, que contribuiu para o meu crescimento e aprendizagem.

À minha coorientadora Neila, parte importante deste time, que colaborou com suas ideias, sabedoria e o “pé no chão” que nos direcionou em momentos necessários.

Aos doutores Melissa Siqueira e Ranylson Marcello Leal por suas contribuições de Química Quântica.

Aos doutores Maria Irene Yoshida e Wagner da Nova Mussel por seu auxílio nas análises de identificação da candesartana cilexetila pelas técnicas térmicas e de difração de raio-X e, ao professor Sidney Augusto Vieira Filho (Bibo) por possibilitar nosso contato.

Aos Doutores Christian Fernandes e Leandro Vinícius Alves Gurgel por suas considerações no Exame de Qualificação.

À Patricia Capelari, pelos seus valiosos ensinamentos de manuseio do cromatógrafo, que permitiram a realização de boa parte experimental deste trabalho.

À todas as companheiras do Laboratório de Controle de Qualidade (LCQ) tanto da pós-graduação quanto as alunas de iniciação científica, pois assim como diz o ditado: “Uma andorinha só não faz verão”. Em especial quero agradecer à Lorena Barbosa Arrunátegui, pela amizade, pela ajuda e por tornar os momentos difíceis mais leves. Agradeço também às alunas, Amanda Fernanda Machado e Renata Rodrigues Lima, companheiras de experimentos. Obrigada pela colaboração e paciência.

Ao CNPQ, pela bolsa de mestrado.

Aos demais funcionários da UFOP especialmente os da Escola de Farmácia.

À FAPEMIG, ANVISA e CAPES pelo auxílio financeiro.

E a todos que tenham colaborado na realização deste trabalho, mas que por ventura eu tenha esquecido de mencionar.

## RESUMO

O Programa Farmácia Popular do Brasil foi desenvolvido pelo Ministério da Saúde com o intuito de ampliar o acesso da população a medicamentos considerados básicos e essenciais e atualmente distribui gratuitamente medicamentos, preferencialmente genéricos, para o tratamento da hipertensão arterial. Dentre eles encontra-se a losartana, membro da classe dos antagonistas dos receptores de angiotensina II. Porém, diversos estudos publicados demonstraram a superioridade de outros representantes desta classe sobre a losartana, especialmente a candesartana cilexetila, um pró-fármaco. Para propor a inserção da candesartana cilexetila no Programa, contribuir para o registro de novos medicamentos genéricos do pró-fármaco e avaliar a sua solubilidade em condições fisiológicas, visto que dados da literatura a este respeito são controversos, o presente trabalho visa avaliar a solubilidade e permeabilidade da candesartana cilexetila, bem como, sua dissolução a partir de produtos sob a forma farmacêutica comprimidos, comparando os resultados experimentais com as informações obtidas da literatura e da Química Quântica para subsidiar sua classificação de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica. Para tal foi desenvolvido e validado um método por cromatografia à líquido de alta eficiência empregando coluna C18 (50 x 4,6 mm d.i., 5,0 µm), fase móvel composta por acetonitrila e água acidificada com ácido acético 0,1 % (60:40 v/v), vazão de 1,2 mL/min e detector de fluorescência. O método demonstrou ser seletivo, linear nas faixas de 0,4-1,4 µg/mL (pH 1,2), 0,5-1,8 µg/mL (pH 6,8) e 1,0-25,0 µg/mL (pH 6,8 com polissorbatato 20), preciso, exato e robusto quando mantidas as condições cromatográficas demonstrando assim ser adequado para a quantificação do pró-fármaco nos testes de solubilidade e dissolução. A solubilidade em equilíbrio da candesartana cilexetila foi avaliada em meios tamponados no intervalo de pH entre 1,2 e 6,8 sendo de 0,42 µg/mL no meio pH 1,2 e 0,66 µg/mL no meio pH 6,8. A razão entre a maior dose terapêutica e a solubilidade proporcionaram os valores 76.190,48 mL e 48.484,85 mL, que apontaram a candesartana cilexetila como de baixa solubilidade. Os resultados da Química Quântica demonstraram que dois grupos principais estão envolvidos na solvatação da candesartana cilexetila, o benzimidazol e o tetrazol-bifenil. A biodisponibilidade absoluta de 14 % relatada na literatura para o fármaco permite classificar a candesartana cilexetila como de baixa permeabilidade. Desta forma podendo inferir que o pró-fármaco pertence à classe IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, o que inviabiliza a possibilidade de bioinserção de novos produtos. No mercado nacional são encontrados 15 medicamentos contendo candesartana cilexetila na dose de 16 mg, a maioria dos produtos possui o excipiente polietilenoglicol que

conhecidamente apresenta efeito inibidor sobre a glicoproteína-P, podendo deste modo interferir na sua absorção, por competir com o sítio de ligação desta proteína de membrana. Destes 15 medicamentos, dois (referência e genérico) foram selecionados e comparados quanto aos perfis de dissolução, que demonstraram ser estatisticamente diferentes,  $p < 0,05$ . Quanto ao Programa Farmácia Popular do Brasil, foi realizado um levantamento bibliográfico a respeito do seu histórico e critérios utilizados para a inclusão de produtos no elenco de medicamentos distribuídos e espera-se com estes dados contribuir para a sua ampliação ou avaliação da possibilidade ou não de inserir a candesartana cilexetila neste elenco.

**Palavras-chave:** candesartana cilexetila, Programa Farmácia Popular do Brasil, Sistema de Classificação Biofarmacêutica, solubilidade em equilíbrio, permeabilidade.



## ABSTRACT

The Popular Pharmacy Program in Brazil was developed by the Brazilian Ministry of Health with the aim of increasing the population's access to basic and essential medicines. Currently it distributes drugs free of charge, preferably generics, for the treatment of arterial hypertension. Among them is losartan, a member of the class of angiotensin II receptor antagonists. However, several studies demonstrated the superiority of other representatives of this class over losartan, especially candesartan cilexetil, a prodrug. In order to propose the insertion of candesartan cilexetil in the Program, to contribute to the registration of new generic drugs of the prodrug and to evaluate its solubility under physiological conditions, since literature data on this topic is controversial, the present work aims to evaluate the solubility and permeability of candesartan cilexetil, as well as its dissolution from tablets, comparing the experimental results with the information obtained from literature and Quantum Chemistry to subsidize its classification according to the Biopharmaceutical Classification System. For this a high performance liquid chromatography method was developed and validated using a C18 column (50 x 4.6 mm i.d., 5.0  $\mu\text{m}$ ), mobile phase composed of acetonitrile and water acidified with 0.1 % acetic acid (60:40 v/v), flow rate of 1.2 mL/min and fluorescence detector. The method has demonstrated to be selective, linear at the range of 0.4-1.4  $\mu\text{g/mL}$  (pH 1.2), 0.5-1.8  $\mu\text{g/mL}$  (pH 6.8) and 1.0-25.0  $\mu\text{g/mL}$  (pH 6.8 with polysorbate 20), precise, accurate and robust when maintained under the chromatographic conditions thus demonstrating to be suitable for the quantification of the prodrug in the solubility and dissolution tests. The equilibrium solubility of candesartan cilexetil was evaluated in buffered media in the pH range between 1.2 and 6.8, being 0.42  $\mu\text{g/mL}$  in pH 1.2 and 0.66  $\mu\text{g/mL}$  in pH 6.8. The ratio between the highest therapeutic dose and the solubility provided the values of 76,190.48 mL and 48,484.85 mL, which indicated the candesartan cilexetil has low solubility. The results of Quantum Chemistry demonstrated that two are the main groups involved in the solvation of candesartan cilexetil, benzimidazole and tetrazol-biphenyl. The absolute bioavailability of 14 % reported in the literature for the drug allows to classify candesartan cilexetil as low permeability. Thus, it can be inferred that the prodrug belongs to class IV of the Biopharmaceutical Classification System, which makes the possibility of biowaiver of new products unfeasible. In the national market 15 drugs containing candesartan cilexetil in the dose of 16 mg are found, most of the products have the excipient polyethyleneglycol, which is known to have an inhibitory effect on the P-glycoprotein, thus being able to interfere with the prodrug absorption by competition for the site of ligation of this membrane protein. Of these 15 drugs, two (reference and generic) were selected and compared

for the dissolution profiles, which show to be statistically different,  $p < 0.05$ . As for the Popular Pharmacy Program in Brazil, a bibliographic survey was carried out regarding its history and criteria used for the inclusion of products in the list of distributed drugs and it is expected that these data contribute to its expansion or evaluation of the possibility or not of inserting the candesartan cilexetil in this list.

**Keywords:** candesartan cilexetil, Popular Pharmacy Program in Brazil, Biopharmaceutical Classification System, equilibrium solubility, permeability.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Requisitos das agências reguladoras para a bioisenção baseada no SCB .....	27
Tabela 2- Valores de solubilidade em equilíbrio da candesartana cilexetila em meios tamponados a 37,0 °C.....	36
Tabela 3-Eluições gradiente indicadas pelas Farmacopeias Japonesa, Americana e Britânica	44
Tabela 4- Composição dos meios biorrelevantes: pH 1,2, 4,5 e 6,8 .....	45
Tabela 5- Preparo das curvas analíticas dos meios tamponados pH 1,2, 6,8 e 6,8 com 0,35 % de polissorbatato 20.....	48
Tabela 6- Concentrações da candesartana cilexetila nos meios tamponados pH 1,2, 6,8 e 6,8 com 0,35 % de polissorbatato 20 para a avaliação da precisão.....	49
Tabela 7- Parâmetros avaliados na robustez do método cromatográfico desenvolvido para a separação e quantificação da candesartana cilexetila nos meios pH 1,2 e 6,8 .....	50
Tabela 8- Condições experimentais dos testes piloto de solubilidade em equilíbrio da candesartana cilexetila realizado em duplicatas .....	51
Tabela 9- Condições experimentais do teste de solubilidade em equilíbrio da candesartana cilexetila no realizado em triplicatas nos meios tamponados pH 1,2 e 6,8.....	51
Tabela 10- Condições experimentais do teste final de solubilidade em equilíbrio da candesartana cilexetila nos meios tamponados pH 1,2 e 6,8.....	52
Tabela 11- Condições experimentais utilizadas nos ensaios da dissolução intrínseca de candesartana cilexetila.....	52
Tabela 12- Condições experimentais utilizadas na realização do teste perfil de dissolução de produtos possuindo com insumo farmacologicamente ativo a candesartana cilexetila na dose de 16 mg.....	56
Tabela 13- Dados sobre a permeabilidade da candesartana cilexetila e candesartana .....	60
Tabela 14- Condições cromatográficas estabelecidas para a quantificação da candesartana cilexetila.....	73
Tabela 15- Análises de pureza do sinal analítico da candesartana cilexetila nos meios biorrelevantes.....	77
Tabela 16- Parâmetros avaliados na linearidade do método cromatográfico desenvolvido para a separação e quantificação da candesartana cilexetila nos meios tamponados pH 1,2, 6,8 e 6,8 com 0,35 % de polissorbatato 20.....	80

Tabela 17- Resultados da repetibilidade e precisão intermediária do método cromatográfico desenvolvido para separação e quantificação da candesartana cilexetila nos meios tamponados pH 1,2, 6,8 e 6,8 com 0,35 % de polissorbato 20 .....	81
Tabela 18- Resultados do teste t de student para a avaliação da precisão intermediária do método cromatográfico desenvolvido para separação e quantificação da candesartana cilexetila nos meios tamponados pH 1,2, 6,8 e 6,8 com 0,35 % de polissorbato 20 .....	81
Tabela 19- Resultados da exatidão do método cromatográfico desenvolvido para separação e quantificação da candesartana cilexetila nos meios tamponados pH 1,2, 6,8 e 6,8 com 0,35 % de polissorbato 20 .....	82
Tabela 20- Resultados da robustez para os meios tamponados pH 1,2, 6,8 e 6,8 com 0,35 % de polissorbato 20 .....	83
Tabela 21- Solubilidade em equilíbrio média (n=3) da candesartana cilexetila nos meios tamponados pH 1,2 e 6,8 .....	87
Tabela 22- Porcentagem das macro espécies de candesartana cilexetila determinada in silico para os meios tamponados: pH 1,2, 4,5 e 6,8 .....	91
Tabela 23- Quantidade dissolvida nos testes de dissolução intrínseca da candesartana cilexetila nos meios tamponados .....	92
Tabela 24- Excipientes presentes em formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata de candesartana cilexetila comercializados no Brasil e a quantidade usualmente empregada.	99
Tabela 25- Determinação do peso dos medicamentos referência e genérico da candesartana cilexetila na dose de 16 mg com os respectivos desvios em relação ao peso médio determinado .....	100
Tabela 26- Resultados da determinação da dureza, diâmetro e espessura dos medicamentos referência e genérico da candesartana cilexetila na dose de 16 mg avaliados .....	101
Tabela 27- Teor encontrado para os medicamentos referência e genérico da candesartana cilexetila na dose de 16 mg .....	102
Tabela 28- Resultados de friabilidade dos produtos, referência e genérico da candesartana cilexetila na dose de 16 mg testados .....	102
Tabela 29- Resultado médio (n=12) da quantidade de fármaco dissolvida a partir dos medicamentos, referência e genérico, da candesartana cilexetila na dose de 16 mg, em função do tempo .....	103

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquemas das aparelhagens disco rotativo (A) e disco fixo (B).....	30
Figura 2- Fórmulas estruturais da candesartana (A) e candesartana cilexetila (B) .....	34
Figura 3- Espectros na região do infravermelho da substância química de referência e das matérias-primas A e B da candesartana cilexetila .....	63
Figura 4- Curvas de TG, DTG e DTA da SQR da candesartana cilexetila .....	64
Figura 5- Curvas de TG, DTG e DTA da M.P.A da candesartana cilexetila .....	64
Figura 6- Curvas de TG, DTG e DTA da M.P.B da candesartana cilexetila .....	64
Figura 7- Sobreposição das curvas de DSC da SQR e matérias-primas A e B da candesartana cilexetila.....	65
Figura 8- Difrátogramas da substância química de referência e matérias-primas A e B .....	66
Figura 9- Cromatograma da candesartana cilexetila em acetonitrila na concentração de 500 µg/mL com a fase móvel acetonitrila e água acidificada com ácido acético a 1 % (89:11 v/v) no fluxo de 0,8 mL/min .....	67
Figura 10- Cromatograma da candesartana cilexetila em acetonitrila na concentração de 500 µg/mL com a fase móvel acetonitrila e água acidificada com ácido acético a 1 % (57:44 v/v) no fluxo de 1,2 mL/min .....	68
Figura 11- Cromatogramas da candesartana cilexetila na concentração de 100 µg/mL obtidos em etanol (A), pH 6,8 (B), pH 4,5 (C) e pH 1,2 (D) .....	70
Figura 12- Cromatogramas da candesartana cilexetila na concentração de 50 µg/mL nos meios pH 1,2 (A), 4,5 (B) e 6,8 (C) .....	71
Figura 13- Cromatograma da candesartana cilexetila na concentração de 50 µg/mL no FGSSE (pH 1,2).....	72
Figura 14- Cromatogramas obtidos da valsartana na concentração de 200 µg/mL (A) e do metanol e fase móvel (B).....	74
Figura 15- Cromatogramas da candesartana cilexetila (C.C) obtidos no meio pH 1,2, sendo: meio pH 1,2 puro (A), SQR (B), degradação por calor seco (C), degradação ácida (D), mistura da SQR com todos os produtos de degradação (P.D) e a valsartana (E).....	74
Figura 16- Cromatogramas da candesartana cilexetila (C.C) obtidos no meio pH 6,8, sendo: meio pH 6,8 puro (A), SQR (B), degradação por calor seco (C), degradação ácida (D), mistura da SQR com todos os produtos de degradação (P.D) e a valsartana (E).....	75
Figura 17- Cromatogramas da candesartana cilexetila (C.C) obtidos no meio pH 6,8 com 0,35 % de polissorbato 20, sendo: meio pH 6,8 puro (A), SQR (B), degradação por calor seco (C),	

degradação ácida (D), mistura da SQR com todos os produtos de degradação (P.D) e a valsartana (E).....	76
Figura 18- Cromatograma dos excipientes empregados nas formulações de candesartana cilexetila.....	76
Figura 19- Curva analítica média (n=3) obtida a partir método cromatográfico desenvolvido para separação e quantificação da candesartana cilexetila no FGSSE (pH 1,2) na faixa de 0,4 a 1,4 µg/mL .....	78
Figura 20- Curva analítica média (n=3) obtida a partir do método cromatográfico desenvolvido para separação e quantificação da candesartana cilexetila no meio tamponado pH 6,8 na faixa de 0,5 a 1,8 µg/mL.....	78
Figura 21- Curva analítica média (n=3) obtida a partir do método cromatográfico desenvolvido para separação e quantificação da candesartana cilexetila no meio tamponado pH 6,8 com 0,35 % de polissorbato 20 na faixa de 1,0 a 25 µg/mL .....	78
Figura 22- Gráfico de resíduos obtidos a partir da regressão linear do método cromatográfico desenvolvido para separação e quantificação da candesartana cilexetila no FGSSE (pH 1,2)	79
Figura 23- Gráfico de resíduos obtidos a partir da regressão linear do método cromatográfico desenvolvido para separação e quantificação da candesartana cilexetila no meio tamponado pH 6,8 .....	79
Figura 24- Gráfico de resíduos obtidos a partir da regressão linear do método cromatográfico desenvolvido para separação e quantificação da candesartana cilexetila no meio tamponado pH 6,8 com 0,35 % de polissorbato 20.....	79
Figura 25- Piloto 1: concentração de candesartana cilexetila versus tempo para cada replicata (a) e (b) nos meios pH 1,2 (A), 4,5 (B) e 6,8 (C) .....	84
Figura 26- Piloto 2: Concentração de candesartana cilexetila versus tempo para cada replicata (a) e (b) nos meios pH 1,2 (A), 4,5 (B) e 6,8 (C) .....	85
Figura 27- Solubilidade em equilíbrio obtida em triplicata para a candesartana cilexetila nos meios pH 1,2 (A) e 6,8 (B).....	86
Figura 28- Solubilidades da candesartana cilexetila em função do pH: dados in silico (A) e experimentais (B) .....	90
Figura 29- Macro espécies da candesartana cilexetila e respectivas cargas determinadas <i>in silico</i> .....	91
Figura 30- Fórmulas estruturais da candesartana e candesartana cilexetila .....	93
Figura 31- Orbital molecular HOMO da molécula de candesartana cilexetila calculado usando o funcional híbrido B3LYP e o conjunto de bases gaussianas 6-31G (2d,2p).....	93

Figura 32- Orbital molecular LUMO da molécula de candesartana cilexetila calculado usando o funcional híbrido B3LYP e o conjunto de bases gaussianas 6-31G (2d,2p) .....	94
Figura 33- Orbital molecular HOMO da molécula de candesartana calculado usando o funcional híbrido B3LYP e o conjunto de bases gaussianas 6-31G (2d,2p) .....	94
Figura 34- Orbital molecular LUMO para molécula de candesartana usando o funcional híbrido B3LYP e o conjunto de bases gaussianas 6-31G (2d,2p).....	94
Figura 35- Suscetibilidade eletrofílica do orbital molecular estimada para a candesartana cilexetila e candesartana .....	95
Figura 36- Suscetibilidade nucleofílica do orbital molecular estimada para a candesartana cilexetila e candesartana .....	95
Figura 37- Avaliação da estabilidade por meio da variação na concentração (%) média (n=3) da candesartana cilexetila nos meios pH 1,2 e pH 6,8 .....	96
Figura 38- Cromatogramas do estudo de estabilidade da candesartana cilexetila no FGSSE (pH 1,2) nos tempos de 3 (A) e 34 horas (B).....	97
Figura 39- Mecanismos de hidrólise e esterificação de ésteres catalisadas por ácido .....	97
Figura 40- Perfis de dissolução médio de 12 unidades dos medicamentos referência e genérico da candesartana cilexetila no meio tamponado pH 6,8 com 0,35 % de polissorbató 20.....	103
Figura 41- Eficiência de dissolução média calculada (n=12) para os medicamentos referência e genérico da candesartana cilexetila na dose de 16 mg .....	104

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Histórico do Programa Farmácia Popular do Brasil .....	58
--	----

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1- Desvio padrão relativo.....	49
Equação 2- Exatidão .....	49
Equação 3- Limite de quantificação .....	50
Equação 4- Limite de detecção.....	50
Equação 5- Eficiência de dissolução .....	56
Equação 6- Fator de cauda.....	73

## ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrômetro
A.P	Ângulo de pureza
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARA II	Antagonistas dos receptores de angiotensina II
CLAE	Cromatografia a líquido de alta eficiência
CLAE-FR	Cromatografia a líquido de alta eficiência de fase reversa
$\text{cm}^2$	Centímetro quadrado
CMED	Câmara de Regulação do Mercado de Medicamentos
CV	Coefficiente de variação
d.i.	Diâmetro interno
DAD	Detector de arranjo de fotodiodos
DPR	Desvio padrão relativo
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FFSOLI	Formas Farmacêuticas Sólidas Oraís de Liberação Imediata
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
h	Hora
HOMO	Orbital Molecular Ocupado de Maior Energia
L.P	Limite de pureza
Log P	Logaritmo do coeficiente de partição octanol/água
Log S	Logaritmo da concentração em mol/L
LUMO	Orbital Molecular de Menor Energia Desocupado
M.P.A	Matéria-prima A
M.P.B	Matéria-prima B
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
MPA	Megapascal
N	Newtons
PAMPA	<i>Parallel Artificial Membrane Permeability Assay</i>



Papp	<i>Apparent permeability coefficient</i>
PEG	Polietilenoglicol
PFPB	Programa Farmácia Popular do Brasil
pK <sub>a</sub>	Logaritmo negativo da constante de ionização K <sub>a</sub>
q.s.p	Quantidade suficiente para
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução
Rename	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
s	Segundo
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
SE	Solução estoque
SQR	Substância química de referência
SUS	Sistema Único de Saúde
t <sub>1/2</sub>	Tempo de meia vida
tnf	Tonelada-força
UA	Unidade de absorvância
UE	Unidade de emissão
UV	Ultravioleta
VDI	Velocidade da dissolução intrínseca
WHO	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo geral .....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	24
3.1 Programa Farmácia Popular do Brasil.....	24
3.2 Medicamentos genéricos .....	25
3.3 Bioisenção .....	26
3.4 Sistema de Classificação Biofarmacêutica .....	26
3.5 Dissolução .....	28
3.6 Solubilidade.....	29
3.7 Permeabilidade .....	31
3.8 Química Quântica.....	32
3.9 Candesartana cilexetila.....	33
3.9.1 Características físico-químicas.....	33
3.9.2 Mecanismo de ação .....	34
3.9.3 Farmacocinética.....	35
3.9.4 Estudos de solubilidade em equilíbrio.....	36
3.9.5 Classificação Biofarmacêutica .....	36
3.10 Análise térmica: termogravimetria, termogravimetria derivada, calorimetria exploratória diferencial e análise térmica diferencial.....	37
3.11 Difração de raios-X .....	38
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1 Material.....	39

4.1.1 Substância química de referência (SQR).....	39
4.1.2 Matérias-primas .....	39
4.1.3 Medicamentos.....	39
4.1.4 Solventes e reagentes.....	39
4.1.5 Equipamentos .....	40
4.1.6 Material.....	41
4.2 Métodos .....	41
4.2.1 Histórico e critérios para a seleção de medicamentos do Programa Farmácia Popular do Brasil.....	41
4.2.2 Dados sobre a permeabilidade da candesartana cilexetila e da candesartana.....	42
4.2.3. Caracterização da substância química de referência e das matérias-primas de candesartana cilexetila e avaliação da estrutura polimórfica.....	42
4.2.3.1 Infravermelho com Transformada de Fourier: análises da substância química de referência e das matérias-primas de candesartana cilexetila .....	42
4.2.3.2 Análise térmica da substância química de referência e das matérias-primas de candesartana cilexetila.....	42
4.2.3.3 Difração de raios-X da substância química de referência e das matérias-primas de candesartana cilexetila.....	43
4.2.4 Desenvolvimento de método cromatográfico para a quantificação da candesartana cilexetila nos meios biorrelevantes.....	43
4.2.5 Validação do método cromatográfico desenvolvido .....	45
4.2.5.1 Seletividade .....	46
4.2.5.2 Linearidade .....	47
4.2.5.3 Precisão.....	48

4.2.5.4 Exatidão .....	49
4.2.5.5 Robustez .....	49
4.2.5.6 Limites de detecção e quantificação .....	50
4.2.6 Estudos de solubilidade da candesartana cilexetila matéria-prima .....	50
4.2.6.1 Agitação orbital em frasco.....	50
4.2.6.2 Dissolução Intrínseca.....	52
4.2.7 Análises eletrônicas da candesartana cilexetila e candesartana.....	53
4.2.8 Estabilidade da candesartana cilexetila nos meios biorrelevantes pH 1,2 e 6,8.....	53
4.2.9 Avaliação dos medicamentos contendo candesartana cilexetila .....	53
4.2.9.1 Medicamentos disponíveis e seus excipientes.....	53
4.2.9.2 Caracterização geral dos medicamentos.....	54
4.2.9.3 Perfis de dissolução .....	56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	58
5.1 Histórico e critérios para a seleção de medicamentos do Programa Farmácia Popular do Brasil.....	58
5.2 Estudos de permeabilidade .....	60
5.3 Caracterização da substância química de referência e das matérias-primas de candesartana cilexetila e avaliação da estrutura polimórfica.....	63
5.3.1 Infravermelho com Transformada de Fourier: análises da substância química de referência e das matérias-primas de candesartana cilexetila .....	63
5.3.2 Análise térmica da substância química de referência e das matérias-primas de candesartana cilexetila.....	63
5.3.3 Difração de raios-X da substância química de referência e das matérias-primas de candesartana cilexetila.....	66

5.4 Desenvolvimento de método cromatográfico para a quantificação da candesartana cilexetila nos meios biorrelevantes.....	67
5.5 Validação do método cromatográfico.....	74
5.5.1 Seletividade .....	74
5.5.2 Linearidade .....	77
5.5.3 Precisão.....	80
5.5.4 Exatidão .....	82
5.5.5 Robustez .....	82
5.5.6 Limites de detecção e quantificação .....	83
5.6 Estudos de solubilidade da candesartana cilexetila matéria-prima .....	84
5.6.1 Agitação orbital em frasco.....	84
5.6.2 Dissolução intrínseca.....	92
5.7 Análises eletrônicas da candesartana cilexetila e candesartana.....	93
5.8 Estabilidade da candesartana cilexetila nos meios biorrelevantes pH 1,2 e 6,8.....	96
5.9 Avaliação dos medicamentos contendo candesartana cilexetila .....	98
5.9.1 Medicamentos disponíveis comercialmente e seus excipientes .....	98
5.9.2 Caracterização geral dos medicamentos.....	100
5.9.3 Perfis de dissolução .....	103
CONCLUSÕES .....	107
REFERÊNCIAS .....	109
ANEXOS.....	121
ANEXO A- Certificado de apresentação do pôster no <i>10<sup>th</sup> International Congress of Pharmaceutical Sciences</i> realizado em Ribeirão Preto, São Paulo no período de 05 a 09/09/2015.....	121

ANEXO B- Certificado de apresentação de pôster no II Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/CiPharma da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, realizado em Ouro Preto, Minas Gerais no período de 28 a 29/10/2015.....	122
---	-----

## 1 INTRODUÇÃO

O Programa Farmácia Popular do Brasil (PFPP) foi implantado em 2004 e possui como objetivo ampliar o acesso da população a medicamentos considerados básicos e essenciais. Os medicamentos são adquiridos mediante o ressarcimento de seus custos de produção ou aquisição, distribuição e dispensação, o que torna o produto mais acessível para o cidadão (BRASIL, 2004).

Em 2011, observando a gravidade da hipertensão arterial, devido a suas complicações, alta frequência de internação e o elevado custo gerado para o Sistema Único de Saúde (SUS), o PFPP começou a distribuir gratuitamente medicamentos para a terapêutica anti-hipertensiva (BRASIL, 2011a; REVISTA HIPERTENSÃO 2010; WHO, 2013).

Dentre os anti-hipertensivos distribuídos pelo PFPP está a losartana potássica, o primeiro fármaco desenvolvido da classe dos antagonistas dos receptores de angiotensina II (ARA II). Hoje esta classe conta com outros representantes como valsartana, irbersartana, eprosartana, telmisartana, olmesartana medoxomila e candesartana cilexetila. Dentre eles a candesartana cilexetila, um pró-fármaco, se destaca por conferir longa duração à atividade biológica *in vivo*, devido à lenta dissociação do complexo formado por ela junto ao receptor AT1 da Angiotensina II, sendo também eficaz na prevenção de doenças renais e do acidente vascular cerebral, duas complicações comuns geradas pela hipertensão arterial (BRASIL, 2016a; BRUNTON et al., 2008; GRADMAN, 2002; NISHIKAWA et al., 1997). Porém, um fator que pode limitar sua inclusão no PFPP é seu alto custo, que varia de R\$ 89,22 (genérico) a R\$ 150,99 (referência) para uma caixa contendo 30 comprimidos de 16 mg de candesartana cilexetila (CMED, 2016).

Neste contexto, a avaliação da possibilidade de bioisenção, ou seja, a isenção dos estudos de bioequivalência para o registro de novos medicamentos genéricos, sem o custo relativo aos estudos *in vivo*, neste trabalho, possui um papel importante. Adicionalmente, as informações geradas poderão contribuir para uma discussão segura junto as agências regulatórias, quanto à possibilidade ou não de bioisenção. Para subsidiar esta decisão normalmente são compiladas informações sobre: uma possível influência dos excipientes empregados nas formulações de formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata (FFSOLI); as características químicas que interferem na biodisponibilidade e absorção do fármaco *in vivo*, principalmente a solubilidade e permeabilidade; bem como, a estabilidade do fármaco nos líquidos biológicos e, ainda, o seu comportamento farmacocinético, principalmente se existe

uma relação linear entre a dose e as concentrações sanguíneas (ARAÚJO et al, 2010; BRASIL, 2011b, 2014b; EMA, 2010; FDA, 2015; FIP, 2012; HEALTH CANADA, 2014; WHO, 2015).

Um dos critérios para a bioisenção, que vem sendo incluso nos guias das principais agências regulatórias é o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB). O SCB foi proposto por Amidon e colaboradores (1995) e classifica os fármacos de acordo com suas características de solubilidade e permeabilidade. Estas propriedades associadas à velocidade de dissolução a partir de formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata influenciam a velocidade e a extensão da absorção do fármaco e, conseqüentemente sua biodisponibilidade e eficácia clínica (BONAMICI, 2009; BRASIL, 2011b; EMA, 2010; FDA, 2015; HEALTH CANADA, 2014; PURANIK et al., 2011; WHO, 2015).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho consistiu em avaliar a solubilidade, dissolução e permeabilidade da candesartana cilexetila, de acordo com as recomendações das agências regulatórias, para a elucidação de sua classificação segundo o SCB; além de trazer informações sobre o Programa Farmácia Popular do Brasil incluindo os critérios empregados pelo Ministério da Saúde na seleção de medicamentos neste programa. Os dados experimentais foram avaliados juntamente às informações obtidas da literatura e da Química Quântica, uma ciência que utiliza modelos computacionais para auxiliar o entendimento dos fenômenos químicos (LEAL et al., 2010), com o intuito de subsidiar uma discussão sobre a possibilidade ou não de bioisenção para novos produtos contendo este pró-fármaco.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a solubilidade, dissolução e permeabilidade da candesartana cilexetila comparando métodos indicados pelas agências regulatórias, Química Quântica e dados da literatura visando contribuir com a elucidação de sua classificação segundo o SCB, além de subsidiar a discussão sobre a possibilidade ou não de sua bioisenção e inclusão no Programa Farmácia Popular do Brasil.

### 2.2 Objetivos específicos

- Conhecer e divulgar o histórico e os critérios utilizados pelo Ministério da Saúde para inclusão de produtos no Programa Farmácia Popular do Brasil.
- Buscar na literatura dados sobre a permeabilidade da candesartana cilexetila e discutir estes dados.
- Desenvolver e validar método analítico para a quantificação da candesartana cilexetila nos testes de solubilidade e dissolução.
- Realizar estudos de solubilidade em equilíbrio da candesartana cilexetila utilizando o método de agitação orbital em frascos (*shake-flask*) e também o método de dissolução intrínseca em três meios tamponados, pH 1,2, 4,5 e 6,8.
- Discutir os dados experimentais de solubilidade confrontando-os com os dados teóricos de Química Quântica.
- Levantar os dados sobre quais medicamentos com o insumo farmacologicamente ativo candesartana cilexetila estão disponíveis no mercado brasileiro e quais os seus excipientes.
- Realizar o estudo do perfil de dissolução de FFSOLI contendo candesartana cilexetila.
- Classificar o fármaco segundo o SCB e assim subsidiar discussões sobre a decisão segura em relação à bioisenção.
- Contribuir para avaliação da possibilidade de inserção da candesartana cilexetila no Programa Farmácia Popular do Brasil.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Programa Farmácia Popular do Brasil

O PFPB tem como objetivo assegurar o acesso aos medicamentos básicos e essenciais da população assistida pela rede privada, de forma a universalizar o seu acesso e diminuir o impacto que estes gastos ocasionam no orçamento familiar, assim como minimizar as despesas de internação no SUS em decorrência do abandono ao tratamento (BRASIL, 2014a; SILVA FILHO, 2010). Este programa foi instituído por meio da Lei nº 10.858, de 13 de abril de 2004, e regulamentado pelo Decreto nº 5.090, de 20 de maio de 2004. Segundo esta Lei, a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) fica autorizada a disponibilizar os medicamentos, que estão contidos em uma relação estabelecida para o referido programa, mediante somente o ressarcimento correspondente aos custos de produção ou aquisição, distribuição e dispensação (BRASIL, 2004a).

A seleção dos medicamentos e correlatos é realizada pelo Ministério da Saúde e as outras etapas como aquisição, estocagem, comercialização e dispensação são realizadas pela Fiocruz. Durante aquisição dos medicamentos há a preferência por laboratórios farmacêuticos públicos e por medicamentos prioritariamente genéricos, sempre que disponíveis no mercado (BRASIL, 2004b, 2014a).

O Programa se divide em duas modalidades, a “Rede Própria” constituída pelas Farmácias Populares e o “Aqui Tem Farmácia Popular” constituído em parceria com drogarias e farmácias privadas. Em ambas o Ministério da Saúde custeia uma parte do valor do medicamento e o cidadão a outra parte, ou seja, o Programa funciona em esquema de copagamento (BRASIL, 2016a).

Em 2011, o PFPB passou a distribuir anti-hipertensivos de forma gratuita a população, sendo eles: captopril e maleato de enalapril (inibidores da enzima conversora de angiotensina), cloridrato de propranolol e atenolol ( $\beta$ -bloqueadores), hidroclorotiazida (diurético) e a losartana potássica (ARA II) (BRASIL, 2011a, 2016a). A lista completa dos medicamentos disponibilizados no programa pode ser encontrada no site do Ministério da Saúde (BRASIL, 2016b).

### 3.2 Medicamentos genéricos

Os medicamentos genéricos são medicamentos similares aos de referência. São produzidos com comprovada eficácia, segurança e qualidade após a expiração ou renúncia da patente do medicamento de referência ou do inovador (BRASIL, 1999). Possuem como principal vantagem um menor custo ao paciente, já que seu valor deve ser no mínimo 35 % menor que do medicamento de referência correspondente, além de incentivarem a redução do preço deste, pois se tornam seus concorrentes (CMED, 2004).

Para a concessão do registro de medicamentos genéricos os critérios presentes na RDC nº 60 de 2014 devem ser seguidos. Dentre os requisitos específicos estão a comprovação da equivalência farmacêutica e da similaridade entre os perfis de dissolução, bem como os estudos de bioequivalência (BRASIL, 2014).

A equivalência farmacêutica é a constatação de que dois medicamentos possuem resultados equivalentes em testes realizados *in vitro*, especificados na monografia individual descrita na Farmacopeia Brasileira ou na ausência de monografia na Farmacopeia Brasileira em outros compêndios oficiais ou ainda em normas/regulamentos aprovados pela Anvisa (BRASIL, 2010a; 2010b).

Já nos estudos de bioequivalência realizados *in vivo*, ou seja, em seres humanos, são realizadas comparações de parâmetros farmacocinéticos relacionados à velocidade e extensão de absorção dos dois medicamentos, referência e teste, administrados por via extravascular (BRASIL, 2002, 2014b).

A comprovação da equivalência farmacêutica entre dois medicamentos (referência e genérico ou referência e similar) associada a bioequivalência destas formulações, asseguram a equivalência terapêutica entre eles e permitem a intercambialidade destes produtos, pois assume-se que irão apresentar o mesmo comportamento no organismo (BRASIL, 2010b; STORPIRTIS et al., 2004). No entanto, o que assegura a qualidade dos lotes fabricados subsequentes ao biolote (lote que foi submetido aos estudos de equivalência farmacêutica e bioequivalência), são as boas práticas de fabricação, o controle da qualidade e a farmacovigilância (BEDOR, 2014; STORPIRTIS et al., 2004).

### 3.3 Bioisenção

Existe a possibilidade dos estudos de bioequivalência, realizados *in vivo*, necessários ao registro de medicamentos genéricos, serem substituídos por estudos adequados *in vitro*. Esta substituição ou isenção do ensaio *in vivo* é chamada bioisenção (ARAÚJO et al., 2010).

Em 2011, foi publicado o Guia para a isenção e substituição dos testes de bioequivalência, por meio da RDC nº 37 da Anvisa (BRASIL, 2011b). Segundo este, a bioisenção pode ser baseada:

- Em razão da forma farmacêutica, para fármacos veiculados em soluções aquosas (parenterais, orais, otológicas, oftálmicas e inalatórias), soluções oleosas parenterais, gases e medicamentos de ação local (tópica e gastrointestinal);
- Para as demais dosagens, ou seja, para fármacos veiculados em formas farmacêuticas de liberação imediata e retardada ou prolongada com formulações proporcionais produzidos pelo mesmo fabricante;
- No Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), para fármacos da classe I, veiculados em formas farmacêuticas orais de liberação imediata, formuladas com excipientes que não impactem na biodisponibilidade.

### 3.4 Sistema de Classificação Biofarmacêutica

Em 1995, Amidon e colaboradores propuseram o Sistema de Classificação Biofarmacêutica, que classifica os fármacos a partir de seus dados de solubilidade e permeabilidade *in vitro* em quatro classes:

- I: fármacos de altas solubilidade e permeabilidade;
- II: fármacos de baixa solubilidade e alta permeabilidade;
- III: fármacos de alta solubilidade e baixa permeabilidade;
- IV: fármacos de baixas solubilidade e permeabilidade.

Os fármacos pertencentes a todas as classes podem ter sua absorção limitada devido a diferentes fatores. Para a classe I, o fator limitante é a dissolução ou, se esta for muito rápida, o tempo de esvaziamento gástrico. Para a classe II o fator é a dissolução *in vivo*. Já para a classe III devido à baixa permeabilidade, a absorção é limitada por este fator. Os integrantes da classe

IV apresentam problemas significativos para serem administrados por via oral (AMIDON et al., 1995).

Esta aplicação de dados *in vitro* para previsão do comportamento *in vivo* se baseia no conhecimento de que a solubilidade e a permeabilidade, em conjunto com a velocidade de dissolução, influenciam a extensão e a velocidade da absorção, ou seja, a biodisponibilidade do fármaco a partir das FFSOLI. Portanto, para que o fármaco seja absorvido, ele precisa ser solubilizado e permear as membranas celulares do trato gastrointestinal (AMIDON et al., 1995; FDA, 2015).

Diversas agências regulatórias como, *Food and Drug Administration* (FDA), *European Medicines Agency* (EMA), *Health Canada* e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), bem como a *World Health Organization* (WHO), aderiram ao processo de avaliação da possibilidade de bioisentar novos produtos baseando-se inicialmente na classificação do fármaco segundo o SCB. Os critérios avaliados e a forma de realização dos experimentos segundo estes órgãos reguladores estão resumidos na Tabela 1 (BRASIL, 2011b; EMA, 2008; FDA, 2015; HEALTH CANADA, 2014; WHO, 2015).

Tabela 1- Requisitos das agências reguladoras para a bioisenção baseada no SCB

Requisitos	Anvisa	EMA	FDA	Health Canada	WHO
Classe	I	I e III	I e III	I e III	I e III
Dissolução	Rápida*	Rápida ou muito rápida** para classe I	Rápida para classe I	Rápida ou muito rápida para classe I	Rápida ou muito rápida para classe I
		Muito rápida para a classe III	Muito rápida para a classe III	Muito rápida para a classe III	Muito rápida para a classe III
Volume de meio (mL)	900	900 ou menos	500	900 ou menos	900 ou menos
Aparelhagem e agitação (rpm)	Cesta - 100 Pá - 50	Cesta - 100 Pá - 50	Cesta - 100 Pá - 50 ou 75	Cesta - 100 Pá - 50 ou 75	Cesta - 100 Pá - 75

\* Quando 85 % ou mais do fármaco dissolve-se em 30 minutos (BRASIL, 2010a).

\*\* Quando 85 % ou mais do fármaco dissolve-se em 15 minutos (BRASIL, 2010a).

Fonte: Adaptado de BELLAVINHA, 2012.

Além dos requisitos mencionados, para que o fármaco possa ser um candidato a bioisenção baseada no SCB outras propriedades importantes devem ser avaliadas, como a janela

terapêutica, que não deve ser estreita; a linearidade da farmacocinética, para que realizando os estudos com a maior dosagem, as demais possam ser bioisentas; a estabilidade nos meios biorrelevantes utilizados para mimetizar as condições fisiológicas; assim como a forma farmacêutica que não pode ser de liberação modificada ou planejada para liberar o fármaco na cavidade oral (BRASIL, 2011b; FIP, 2012).

### 3.5 Dissolução

A absorção de fármacos administrados por via oral em FFSOLI é dependente de uma sequência de etapas como a desintegração da forma farmacêutica e, conseqüente liberação do fármaco, seguida da sua dissolução nos líquidos biológicos e permeação através das células do trato gastrointestinal. As duas primeiras etapas podem ser críticas no processo de absorção, por isso os testes de dissolução *in vitro* podem ser úteis na previsão do comportamento *in vivo* (FDA, 1997; SHARGEL; YU, 2016).

O teste de dissolução avalia a quantidade de fármaco dissolvido no meio de dissolução a partir da forma farmacêutica. O resultado é expresso em porcentagem da quantidade declarada no rótulo (BRASIL, 2010b).

A avaliação da quantidade cedida ao meio pode ser realizada com um ponto de coleta ou vários pontos (perfil de dissolução). O perfil de dissolução permite a construção de uma curva de porcentagem de fármaco dissolvido em função do tempo. Possui aplicabilidade em situações como no desenvolvimento de formulações, controle de qualidade lote-a-lote, estabelecimento de correlações *in vitro/in vivo* além de, em conjunto com a solubilidade e a permeabilidade, fazer parte dos requisitos a serem avaliados para a bioisenção de formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (BRASIL, 2010b, 2011b; FDA 1997; MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

Para esta última aplicação, são avaliados comparativamente os perfis de dissolução do fármaco de interesse a partir dos medicamentos referência e teste, utilizando doze unidades de cada um deles. As condições experimentais indicadas são: aparato pá a 50 rpm ou cesto a 100 rpm, temperatura de  $37,0 \pm 1,0$  °C, meios de dissolução pH 1,2, 4,5 e 6,8 e volume de meio de 900 mL. São consideradas semelhantes as formulações que apresentam o resultado para o fator de semelhança (F2) entre 50 e 100 e o mesmo tipo de dissolução, sendo requerida para a bioisenção no Brasil a dissolução rápida (BRASIL, 2010a, 2011b).

### 3.6 Solubilidade

A solubilidade é definida como a quantidade máxima de soluto dissolvida em solução saturada a determinada temperatura, sendo expressa em termos de proporção de soluto no solvente (IUPAC, 2014; FELTRE, 2004). Já a solubilidade em equilíbrio (termodinâmica) é definida como a concentração de uma substância em uma solução saturada quando há excesso de sólido e este se encontra em equilíbrio com a solução sendo obtida após um período de tempo normalmente longo (BOX et al., 2006).

A solubilidade é um dos fatores que mais impactam na efetividade terapêutica dos fármacos, pois influencia diretamente na dissolução a partir da forma farmacêutica e conseqüentemente na biodisponibilidade e ação terapêutica (GROSSJOHANN et al., 2012).

A solubilidade referida pelo SCB é a solubilidade em equilíbrio do fármaco determinada em meios aquosos tamponados a  $37,0 \pm 1,0$  °C. O intervalo de pH sugerido varia um pouco de acordo com os órgãos regulatórios sendo 1,2 a 6,8 (BRASIL, 2011; HEALTH CANADA, 2014; WHO, 2006) e 1,0 a 6,8 (EMA, 2010; FDA, 2015). No mínimo três condições de pH devem ser testadas e as normalmente indicadas são pH 1,2, 4,5 e 6,8. O FDA preconiza que além dos meios com pH 1,0 e 6,8 outros devem ser testados, baseados nas características de ionização do fármaco ( $pK_a$ ). O volume de meio a ser empregado deve ser de 250 mL, volume que provém da quantidade padronizada de líquido ingerido em testes de bioequivalência (FDA, 2015).

O fármaco possui alta solubilidade quando a sua maior dose administrada oralmente em uma formulação de liberação imediata é solúvel em 250 mL ou menos nos meios tamponados. Ou seja, se a razão entre a maior dose (mg) e a menor solubilidade encontrada na faixa de pH analisada (mg/mL) for menor ou igual ao volume de 250 mL, o fármaco é considerado de alta solubilidade (FDA, 2015).

Dentre os métodos disponíveis para a avaliação experimental da solubilidade em equilíbrio de fármacos estão a agitação orbital em frasco (*shake-flask*), método indicado pelas agências regulatórias e a dissolução intrínseca (BRASIL, 2011; EMA, 2010; FDA, 2015; HEALTH CANADA, 2014; WHO, 2015).

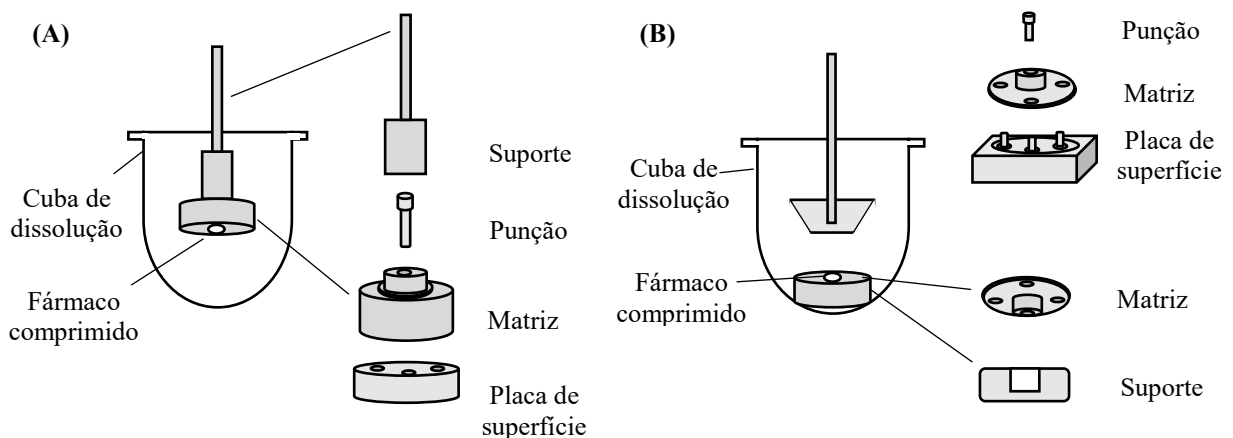
O método da agitação orbital em frasco é realizado com uma quantidade em excesso do fármaco, normalmente 10 %, que é acrescida a soluções aquosas tamponadas com pH entre 1,2 e 6,8, de forma a obter uma solução saturada, que deve ser agitada a velocidade constante (50 ou 150 rpm dependendo do volume de meio) e temperatura de  $37,0 \pm 1,0$  °C. Amostras da solução são coletadas, separadas do sobrenadante, o que pode ser feito por meio de filtração e quantificadas em períodos determinados. O equilíbrio é alcançado quando duas amostras

sucessivas apresentam a mesma concentração (BRASIL, 2016c; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001; MONTEIRO, 2014). Vale ressaltar que não existe uma padronização para a realização dos ensaios de solubilidade em equilíbrio, visto que o método não está presente nas Farmacopeias (BAKA; COMER; TAKÁCS-NOVÁK, 2008; MONTEIRO, 2014). As condições descritas provêm das recomendações publicadas pela Anvisa na nota técnica nº 003 de 2013 (BRASIL, 2013b) e na consulta pública nº 139 que propõe a inclusão do capítulo na Farmacopeia Brasileira: Método geral de determinação da solubilidade aplicada à bioisenção de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BRASIL, 2016c). Sendo esta última baseada no trabalho de padronização do método de agitação orbital em frascos realizado por Monteiro (2014).

A dissolução intrínseca avalia a velocidade de dissolução de uma substância pura compactada, em determinado meio, sob agitação e temperatura constantes, sendo expressa em  $\text{mg}/\text{min}/\text{cm}^2$ . É um ensaio útil no entendimento da relação existente entre a dissolução e a forma cristalina da substância, pois fatores intrínsecos como o polimorfismo, podem influenciar a velocidade da dissolução intrínseca (VDI) de fármacos (UNITED KINGDOM, 2013; UNITED STATES, 2015; YU et al., 2004).

Para a realização do ensaio duas aparelhagens podem ser utilizadas, disco fixo ou o disco rotativo também conhecido como aparato de Wood, Figura 1. A matriz destas aparelhagens possui uma cavidade de 0,1-1,0 cm de diâmetro onde o pó da substância é colocado e comprimido. Após a compressão os discos são inseridos no equipamento de dissolução (UNITED KINGDOM, 2013; UNITED STATES, 2015).

Figura 1- Esquemas das aparelhagens disco rotativo (A) e disco fixo (B)





Nos capítulos gerais da Farmacopeia Americana encontra-se descrito o teste de dissolução intrínseca aparente. Para a preparação do compacto as condições exatas não estão indicadas, somente há as sugestões de que o tempo de compressão de 1 minuto e a pressão de 15 MPA são suficientes para a maioria dos compostos orgânicos, mas que outras condições devem ser testadas (UNITED STATES, 2015).

Yu e colaboradores (2004) propuseram como limite de classificação da solubilidade VDI de 0,1 mg/min/cm<sup>2</sup>, ou seja, fármacos com VDI acima deste valor são considerados de alta solubilidade e, inferior a ele, de baixa solubilidade.

### 3.7 Permeabilidade

Para a avaliação da permeabilidade diversos métodos *in vivo*, *in vitro* e *in silico* estão disponíveis (AULTON; TAYLOR, 2013).

Os métodos *in vivo* avaliam a permeabilidade de fármacos em animais assim como em seres humanos, neste caso empregando dados da biodisponibilidade ou da perfusão em um segmento intestinal isolado por balões (*Loc-I-Gut*) (AULTON; TAYLOR, 2013; BALIMANI; CHONG, 2005).

Os métodos *in vitro* são bem diversificados e podem ser baseados em tecidos de animais, como por exemplo, segmentos intestinais e intestino invertido; em sistemas de lipídeos artificiais, como a membrana artificial paralela (PAMPA) e em modelos celulares, sendo as células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2) as mais amplamente utilizadas na avaliação da permeabilidade de fármacos (BALIMANI; CHONG, 2005; HÄMÄLÄINEN; FROSTELL-KARLSSON, 2004).

Já a avaliação da permeabilidade por métodos *in silico*, é realizada por modelos computacionais levando em consideração as propriedades físico-químicas da molécula (HÄMÄLÄINEN; FROSTELL-KARLSSON, 2004).

As agências reguladoras consideram como de alta permeabilidade, os fármacos que possuem extensão de absorção  $\geq 85$  % da dose administrada e recomendam como métodos para sua determinação a biodisponibilidade absoluta, o balanço de massas e a perfusão intestinal em seres humanos, assim como a perfusão intestinal em animais e a permeabilidade em modelos celulares (BRASIL, 2011b; EMA, 2010; FDA, 2015; HEALTH CANADA, 2014; WHO, 2015).

### 3.8 Química Quântica

A Química Quântica surgiu da necessidade de teorias que explicassem o comportamento de partículas pequenas, como os elétrons e núcleos de átomos e moléculas, visto que as leis da mecânica clássica aplicadas ao movimento de objetos macroscópicos, não explicavam adequadamente o comportamento microscópico. Então a partir do século XX, diversos cientistas desenvolveram teorias que se complementaram e originaram a mecânica quântica, que quando aplicada a fenômenos químicos, é denominada Química Quântica (BATHISTA e SILVA, 2003; LEVINE, 2001).

A Química Quântica permite o entendimento de vários temas relacionados a química como, estabilidade relativa de moléculas, mecanismos de reações químicas, energia dos orbitais, cargas eletrônicas sobre os átomos, comprimento de ligação, energia de dissociação dentre muitos outros que auxiliam na compreensão de resultados experimentais (BERBERAN e SANTOS, 2015; LEAL, NETO, 2010; LEVINE, 2001).

Existem diversos programas computacionais que realizam cálculos químico quânticos moleculares (LEVINE, 2001). Estes cálculos são realizados considerando as interações entre os elétrons e o núcleo da molécula (PATRICK, 2013).

Os métodos químico quânticos podem ser subdivididos em duas categorias: *ab initio* e semi-empírico. Os métodos *ab initio* são restritos a moléculas pequenas, por serem mais precisos são mais caros e requerem maior tempo de análise pelos computadores. Já os métodos semi-empíricos são aplicáveis a moléculas maiores, fornecem resultados mais rapidamente, porém menos exatos (PATRICK, 2013).

A realização dos cálculos químico quânticos normalmente envolve a seleção do método, isto depende do tipo de cálculo desejado e do tamanho molecular; o desenho da estrutura molecular em três dimensões (3D); a minimização da energia para garantir que a estrutura utilizada nos cálculos seja a mais energeticamente estável e o cálculo propriamente dito das propriedades moleculares desejadas (PATRICK, 2013).

Dentre os diversos descritores disponíveis em química quântica, dois utilizados como indicadores da reatividade química das moléculas são os orbitais moleculares de fronteira: HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital* - Orbital Molecular Ocupado de Maior Energia) e LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital* - Orbital Molecular Desocupado de Mais Baixa Energia) e a função de Fukui, que envolve a densidade eletrônica da molécula na sua região de valência (ARROIO, 2010; CISNEROS-GARCÍA; NIETO-DELGADO; RODRÍGUEZ-ZAVALA, 2015; DUARTE, 2001; VESSECCHI et al., 2008).

Os orbitais moleculares de fronteira são importantes pois trazem informações sobre o caráter elétron doador (HOMO) e o caráter elétron aceitador (LUMO) de uma molécula (ARROIO, 2010; HONÓRIO; SILVA, 2003). Já as funções de Fukui ( $f^+$ ) e ( $f^-$ ) descrevem os locais de susceptibilidade à adição nucleofílica e eletrofílica respectivamente (CISNEROS-GARCÍA; NIETO-DELGADO; RODRÍGUEZ-ZAVALA, 2015).

### 3.9 Candesartana cilexetila

A candesartana é um fármaco pertencente à classe dos antagonistas dos receptores tipo 1 (AT1) da angiotensina II. Foi desenvolvida por meio de um programa da *Takeda Chemical Industries Ltda* para ser um antagonista não competitivo de longa duração do receptor AT1. Porém, por possuir baixa biodisponibilidade após a administração por via oral, foi sintetizado o pró-fármaco candesartana cilexetila, na forma de éster (NISHIKAWA et al., 1997).

Ésteres são formados pela reação reversível entre ácido carboxílico e álcool, obtendo também como produto a água. Geralmente os ácidos sulfúrico e clorídrico são utilizados como catalisadores da reação. A ordem inversa desta reação é a hidrólise do éster (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012; SOLOMONS; FRYHLE, 2011). A esterificação é normalmente empregada como estratégia para melhorar a permeabilidade de fármacos (KERNS; DI, 2008).

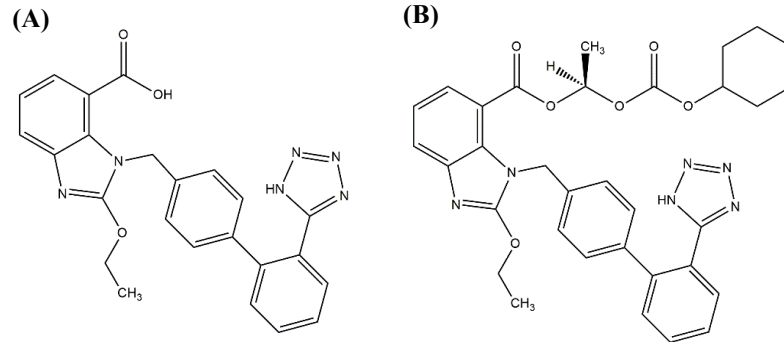
O uso da candesartana cilexetila foi aprovado pelo FDA em 1998, sendo indicada para o tratamento da hipertensão e insuficiência cardíaca (ASTRAZENCA, 2014; FDA, 2002). Encontra-se disponível na forma de comprimidos nas doses de 4, 8, 16 e 32 mg, além da associação com a hidroclorotiazida (12,5 mg) em comprimidos nas relações de 8 mg/12,5 mg e 16 mg/12,5 mg. A dose inicial para o tratamento da hipertensão é de 8 mg e para insuficiência cardíaca de 4 mg, ambas uma vez ao dia, podendo ser aumentadas para 32 mg, uma vez ao dia (ASTRAZENECA, 2014; CMED, 2016).

#### 3.9.1 Características físico-químicas

A candesartana cilexetila, cujo nome químico é (1RS)-1-(ciclohexiloxicarboniloxi) etil-2-etoxi-1- {[2'-(1*H*-tetrazol-5-il) bifenil-4-il]metil} 1*H*-benzo[*d*]imidazol-7-carboxilato, possui um centro quiral no grupamento éster, sendo assim, uma mistura racêmica dos dois enantiômeros. Possui massa molecular de 610,66 g/mol e fórmula química  $C_{33}H_{34}N_6O_6$

(HUSAIN et al., 2011; JAPAN, 2011). As fórmulas estruturais da candesartana e da candesartana cilexetila estão apresentadas na Figura 2.

Figura 2- Fórmulas estruturais da candesartana (A) e candesartana cilexetila (B)



A candesartana cilexetila pode ser encontrada na forma de cristais brancos ou como pó branco cristalino. A sua faixa de fusão é de 160-175 °C (JAPAN, 2011; REDDY; NAVANEETHA, 2015). É considerada um ácido fraco e possui dois valores de  $pK_a$  relatados: 5,3 e 6,0 (CAGIGAL, et al., 2001; HOPPE; SZNITOWSKA, 2014; NISHIWAKA et al., 1997).

Quanto a solubilidade, a candesartana cilexetila é altamente solúvel em dimetilsulfóxido, solúvel em ácido acético, fracamente solúvel em metanol, ligeiramente solúvel em etanol e praticamente insolúvel em água (<0,05 µg/mL) (ASTRAZENECA, 2014; JAPAN, 2011; NISHIKAWA et al., 1997).

A candesartana cilexetila possui polimorfos, ou seja, mais de uma forma cristalina com arranjos moleculares ordenados. Inicialmente acreditava-se existir três estruturas polimórficas: a Forma I, utilizada no medicamento referência no Brasil, Atacand<sup>®</sup>, a Forma II e a forma amorfa. Porém, com o passar do tempo, outros 31 polimorfos foram identificados (ASTRAZENCA, 2015; ARDIANA; LESTARI; INDRAYANTO, 2012; STORPIRTIS et al., 2009; VIPPAGUNTA; BRITAIN; GRANT, 2001).

### 3.9.2 Mecanismo de ação

A ação da candesartana se dá pelo antagonismo da Angiotensina II. A angiotensina II é um octapeptídeo sintetizado via cascata renina, angiotensina e aldosterona, que ocasiona efeitos hipertensores mediados por vasoconstrição, secreção de aldosterona e reabsorção renal de sódio. Possui dois receptores AT1 e AT2, sendo que o último parece não exercer papel na regulação da homeostase cardiovascular (HUSSAIN et al., 2011; LARAGH et al., 1972).

A candesartana se liga de forma seletiva, forte e não competitiva com o receptor AT1, sendo dentre os fármacos da mesma classe, a possuidora da maior potência de ligação. Em comparação com a losartana e seu metabólito ativo (EXP3174) a candesartana possui afinidade superior pelo receptor, sendo 80 vezes maior que a losartana e 10 vezes maior que o EXP3174. Além disso é clinicamente mais efetiva na redução da pressão sanguínea. A dissociação do receptor ocorre de maneira lenta ( $t_{1/2}$  120 min) garantindo efeito prolongado (CERNES; MASHAVI; ZIMLICHMAN, 2011; GLEITER et al., 2004; LACOURCIÈRE; ASMAR, 1999; MEREDITH; MURRAY; MCINNES, 2010; VIDT et al., 2001; ZHOU et al., 2009).

### 3.9.3 Farmacocinética

A farmacocinética da candesartana é linear, ou seja, as concentrações séricas aumentam de forma proporcional ao aumento da dose administrada de candesartana cilexetila (ASTRAZENECA, 2015; HÜBNER, 1997).

A candesartana cilexetila é convertida completamente a sua forma ativa, a candesartana, por meio de hidrólise do éster durante a sua absorção no trato gastrointestinal (KUBO et al., 1993; VAN LIER; VAN HEININGEN; SUNZEL, 1997). A biodisponibilidade da candesartana a partir da forma farmacêutica comprimido é de aproximadamente 14 % (SWEETMAN, 2009). Após sua absorção, a concentração máxima observada ( $C_{max}$ ) é alcançada após um período de 4 horas (TJANDRAWINATA et al., 2013; HÜBNER, 1997).

A candesartana apresenta forte ligação as proteínas plasmáticas (> 99 %) e possui volume de distribuição de 0,13 L/Kg (ASTRAZENECA, 2014; SWEETMAN, 2009).

As moléculas que sofrem metabolização, são transformadas na forma não ativa, CV-15959, pelo citocromo P450 isoenzima CYP2C9 (ASTRAZENECA, 2014; HÜBNER, 1997). A sua eliminação ocorre principalmente por excreção biliar (67 %) e eliminação renal (33 %), sendo o  $t_{1/2}$  de eliminação de aproximadamente 9 horas (BRUNTON et al., 2008).

O tempo necessário para observar o efeito anti-hipertensivo varia de 2 a 4 semanas (CERNES et al., 2011).

### 3.9.4 Estudos de solubilidade em equilíbrio

Foram encontrados três estudos experimentais de solubilidade em equilíbrio da candesartana cilexetila em meios tamponados a 37,0 °C. Os resultados da solubilidade média (n=3) em meios com diferentes valores de pH podem ser vistos na Tabela 2.

Tabela 2- Valores de solubilidade em equilíbrio da candesartana cilexetila em meios tamponados a 37,0 °C

pH	Solubilidade (µg/mL)	Meio	Equipamento	Tempo (h)	Método de quantificação	Fonte
1,2	37,21	HCl	Banho com agitação	24	UV**	Darwhekar, Jain e Chouhan (2012)
1,2	0,23	HCl 0,1 mol/L	N.I*	24	CLAE	Hoppe e Sznitowska (2014)
N.I	2,40	HCl 0,1 N	Agitador mecânico	48	UV	Hassan et al. (2015)
4,0	57,54	Tampão acetato 0,02 M	Banho com agitação	24	UV	Darwhekar, Jain e Chouhan (2012)
4,5	0,51	Tampão fosfato 0,05 mol/L	N.I	24	CLAE	Hoppe e Sznitowska (2014)
4,5	2,61	Tampão acetato	Agitador mecânico	48	UV	Hassan et al. (2015)
6,0	112,57	Tampão fosfato 0,05 M	Banho com agitação	24	UV	Darwhekar, Jain e Chouhan (2012)
6,5	1,30	Tampão fosfato 0,2 mol/L	N.I	24	CLAE	Hoppe e Sznitowska (2014)
6,5	3,93	Tampão fosfato	Agitador mecânico	48	UV	Hassan et al. (2015)

\* N.I: Não informado.

\*\* UV: Espectrofotometria na região do ultravioleta.

Fonte: Elaborada pela autora.

### 3.9.5 Classificação Biofarmacêutica

A Classificação Biofarmacêutica da candesartana cilexetila e da candesartana foi relatada por Darwhekar, Jain e Chouhan (2012). Os resultados de solubilidade encontrados para candesartana cilexetila são apresentados na Tabela 2. Já os valores de solubilidade para a candesartana foram: 5,49 µg/mL no pH 1,2; 18,73 µg/mL no pH 4,4 e 36,15 µg/mL no pH 6,4.

Adicionalmente, a determinação da permeabilidade foi realizada pelo método do intestino invertido de rato e os coeficientes de permeabilidade aparente (Papp) encontrados para a candesartana cilexetila e candesartana, foram respectivamente  $11,986 \times 10^{-6}$  cm/s e  $9,854 \times 10^{-6}$  cm/s (DARWHEKAR; JAIN; CHOUHAN, 2012).

Assim, os autores classificaram a candesartana cilexetila como de baixa solubilidade, já que, a maior dose disponível (32 mg) não é solúvel em toda a faixa de pH de 1,0-7,5 (DARWHEKAR; JAIN; CHOUHAN, 2012).

Por outro lado, em relação a permeabilidade e considerando os limites de Papp entre  $0,9-8,3 \times 10^{-6}$  cm/s como baixa permeabilidade e entre  $11,4-100,3 \times 10^{-6}$  cm/s como de alta permeabilidade, a candesartana cilexetila foi classificada como de alta permeabilidade e a candesartana como baixa permeabilidade, o que sugere que o pró-fármaco pertence à classe II e o fármaco a classe IV (DARWHEKAR; JAIN; CHOUHAN, 2012).

### **3.10 Análise térmica: termogravimetria, termogravimetria derivada, calorimetria exploratória diferencial e análise térmica diferencial**

A análise térmica é definida como “Um grupo de técnicas em que uma propriedade física de uma substância e/ou o seu produto de reação é medida como uma função da temperatura, enquanto a substância é submetida a um programa de temperatura controlada” (IUPAC, 2014).

Dentre as técnicas pertencentes a este grupo estão: a termogravimetria (TG), a termogravimetria derivada (DTG ou DrTGA), a análise térmica diferencial (DTA) e a calorimetria exploratória diferencial (DSC) (ATTIA; SOUAYA; SOLIMAN, 2015; IONASHIRO, 2004).

Na TG, a perda de massa da amostra é registrada em função da temperatura ou do tempo. As curvas geradas apresentam diferenças de níveis que correspondem as variações de massa da amostra. Já na DTG, os desníveis são substituídos por picos que delimitam exatamente as áreas onde houve as variações de massa. Então, na DTG é registrada ao invés da massa da amostra, a derivada da variação da massa em relação ao tempo (IONASHIRO, 2004). Ambas as técnicas podem ser empregadas na avaliação do comportamento térmico, determinações de pureza, teor de umidade e cinzas, temperaturas de ebulição, sublimação e decomposição térmica (BRASIL, 2010b; OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011).

Na DTA e DSC é empregada além da substância de interesse um material termicamente inerte, utilizado como referência, por não apresentar nenhuma mudança de fase ao longo das temperaturas do experimento. A diferença entre as técnicas está no parâmetro medido. No caso da DTA é medida a diferença entre a temperatura do material de referência e da amostra em função da temperatura ou do tempo. Já na DSC é registrada a diferença entre a energia fornecida à substância e ao material de referência em função da temperatura (HATAKEYAMA; QUINN, 1999; IONASHIRO, 2004).

Por meio destas técnicas pode-se acompanhar as alterações físicas na amostra como as mudanças de fase e as alterações químicas como desidratação, decomposição, oxidação e redução. A DSC especificamente permite a determinação da pureza, do ponto e da faixa de fusão assim como a identificação de polimorfos e suas entalpias (BRASIL, 2010; IONASHIRO, 2004; OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011).

### **3.11 Difração de raios-X**

A difração de raios-X é amplamente empregada na caracterização de substâncias e identificação de polimorfos (ALBERS et al., 2002; SILVA; IHA, 2010).

Nesta técnica, ao se incidir um feixe de raios-X em um cristal, os raios interagem com os elétrons presentes na molécula e se espalham, ou seja, sofrem difração, em um padrão que é característico para cada estrutura cristalina de um sólido. O difratograma obtido é composto por várias reflexões, identificadas pelo ângulo ( $2\theta$ ), cada uma com sua intensidade (ALBERS et al., 2002; STORPIRTIS et al., 2009).



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Substância química de referência (SQR)

Candesartana cilexetila (SQR): USP; Lote: FOK 123; teor: 99,7 %.

#### 4.1.2 Matérias-primas

Matéria-prima A (M.P.A): Candesartana cilexetila; Lote de fabricação: 20141101; Validade: 11/2016; Fabricante: Jiangxi Synergy Pharmaceutic/ China - Pharmanostra®.

Matéria-prima B (M.P.B): Candesartana cilexetila; Lote de fabricação: 20131201; Validade: 12/2015; Fabricante: Jiangxi Synergy Pharmaceutic/ China - Pharmanostra®.

#### 4.1.3 Medicamentos

Referência: Atacand®; Apresentação: embalagem com 30 comprimidos de 16 mg; Excipientes: carmelose cálcica, hiprolose, lactose monohidratada, estearato de magnésio, amido de milho, macrogol e óxido férrico marrom-avermelhado; Lote de fabricação: 41036; Validade: 10/2018; Fabricante: AstraZeneca.

Genérico: Candesartana cilexetila; Apresentação: embalagem com 30 comprimidos de 16 mg; Excipientes: lactose monoidratada, óxido de ferro vermelho, dióxido de titânio, amido, povidona, carragenina, croscarmelose sódica, estearato de magnésio; Validade: 01/2018.

#### 4.1.4 Solventes e reagentes

Acetato de sódio triidratado grau analítico, Proquímios;

Acetonitrila grau HPLC, J.T. Baker;

Ácido acético glacial grau analítico, Vetec;

Ácido clorídrico grau analítico, Proquímios;  
Água ultrapurificada;  
Cloreto de sódio grau analítico, Neon;  
Fosfato de potássio monobásico grau analítico, Neon;  
Hidróxido de sódio grau analítico, Vetec;  
Metanol grau HPLC, J.T. Baker;  
Polissorbato 20 grau analítico, Synth.

#### 4.1.5 Equipamentos

Balança analítica Shimadzu - AUX 220;  
Balança analítica Shimadzu - AUX 220D;  
Bomba de vácuo Marconi, modelo MA057/2;  
Desintegrador Nova Ética modelo 301;  
Detector de arranjos de fotodiodos 2996 da Waters;  
Detector de fluorescência multi  $\lambda$  2475 da Waters;  
Difratômetro XRD -7000 (Shimadzu, Japan);  
Dissolutor Vision<sup>®</sup> G2 Elite 8<sup>TM</sup> acoplado ao coletador automático Vision<sup>®</sup> AutoPlus<sup>TM</sup> & AutoFill<sup>TM</sup>, munido com filtros de cânula de 10  $\mu$ m de polietileno;  
Durômetro Nova Ética, 298 DGP;  
Espectrômetro no infravermelho com transformada de Fourier - Varian 640 IR;  
Estufa FANEM- Modelo 315 SE;  
Friabilômetro Ética;  
HPLC Waters Alliance 2695 Separations Module e Software Empower Pro;  
HPLC Waters Alliance e2695 Separations Module e Software Empower Pro;  
Incubadora Shaker - IKA<sup>®</sup> KS 4000i control;  
Lavadora ultra-sônica Unique;  
Paquímetro, Digimess;  
pHmetro Hanna;  
Sistema de purificação de água Millipore, Direct-Q3.

#### 4.1.6 Material

Balões volumétricos;

Béqueres;

Coluna Luna<sup>®</sup> C18 (50 x 4,6 mm d.i.; 5,0 µm) da Phenomenex;

Coluna Sunfire<sup>®</sup> C18 (150 x 4,6 mm d.i.; 3,5 µm) da Waters;

Coluna XBridge<sup>®</sup> C18 (150 x 4,6 mm d.i.; 3,5 µm) da Waters;

Erlenmeyers;

Filtro de seringa Millex<sup>®</sup> HV (PVDF), 0,22 µm de poro, 25 mm de diâmetro;

Filtro de seringa Millex<sup>®</sup> HV (PVDF), 0,45 µm de poro, 33 mm de diâmetro;

Membrana filtrante em nylon - 0,45 µm de poro, 47 mm de diâmetro;

Papel de filtro quantitativo, 8 µm de poro, 12,5 cm de diâmetro;

Pipetas automáticas;

Ponteiras plásticas;

Pré-coluna C18 Waters (20 x 4,6 mm d.i.; 3,5 µm);

Seringas estéreis descartáveis;

Tubos de ensaio;

Vials âmbar.

#### 4.2 Métodos

##### 4.2.1 Histórico e critérios para a seleção de medicamentos do Programa Farmácia Popular do Brasil

O histórico e os critérios do Ministério da Saúde para a seleção de medicamentos disponibilizados pela Farmácia Popular do Brasil foram buscados na legislação brasileira, em manuais do programa e na página do PFPB no site do Ministério da Saúde, empregando como palavras-chave: Farmácia Popular, histórico, critérios e elenco de medicamentos (BRASIL, 2016b).

#### **4.2.2 Dados sobre a permeabilidade da candesartana cilexetila e da candesartana**

Os dados sobre a permeabilidade do pró-fármaco e sua forma ativa foram pesquisados em livros e artigos científicos disponíveis nas bases de dados: Periódicos Capes, SciFinder e PubMed no período de março de 2015 a julho de 2016. Os descritores utilizados foram: permeabilidade, candesartana, candesartana cilexetila, células Caco-2, biodisponibilidade, biodisponibilidade absoluta, farmacocinética e Sistema de Classificação Biofarmacêutica.

#### **4.2.3. Caracterização da substância química de referência e das matérias-primas de candesartana cilexetila e avaliação da estrutura polimórfica**

##### **4.2.3.1 Infravermelho com Transformada de Fourier: análises da substância química de referência e das matérias-primas de candesartana cilexetila**

Os espectros de absorção no infravermelho foram obtidos na faixa de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$  em espectrômetro no infravermelho com transformada de Fourier (modelo 630- IR, Varian) com dispositivo de reflectância total atenuada (modelo MIRacle, Pike Technologies) e posteriormente analisados.

##### **4.2.3.2 Análise térmica da substância química de referência e das matérias-primas de candesartana cilexetila**

As técnicas de TG, DTG, DTA e DSC foram empregadas assim como a difração de raios-X, para averiguar se todas as amostras de candesartana cilexetila possuíam a mesma estrutura polimórfica. Visto que os polimorfos possuem propriedades físicas e químicas distintas, como por exemplo a solubilidade, propriedade alvo dos estudos deste trabalho (FLORENCE; ATTWOOD, 2011). Para tal, as amostras de candesartana cilexetila foram enviadas para o Laboratório de Análise Térmica do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais.

As análises de DSC foram realizadas no calorímetro de varredura diferencial DSC-60 da Shimadzu. As amostras foram acondicionadas em cadinhos de alumínio e aquecidas a uma

razão de 10 °C min<sup>-1</sup> a partir da temperatura ambiente até 300 °C, em atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de gás de 50 mL/min. As curvas de DTG foram geradas a partir da diferenciação eletrônica dos dados obtidos nas análises de TG.

As análises de TG e DTA foram realizadas simultaneamente no analisador térmico DTG-60 da Shimadzu. As amostras também foram acondicionadas em cadinhos de alumina e aquecidas a uma razão de 10 °C min<sup>-1</sup> a partir da temperatura ambiente até 600 °C, em atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de gás de 20 mL/min.

#### **4.2.3.3 Difração de raios-X da substância química de referência e das matérias-primas de candesartana cilexetila**

As amostras de candesartana cilexetila foram enviadas para o Laboratório de Fluorescência e Difração de Raios-X do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais. Os dados de difração de raios-X foram coletados em um difratômetro XRD-7000 (Shimadzu) usando 40 kV e 30 mA, com um tubo de Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$ ) equipado com ótica policapilar em geometria paralela munido de um monocromador de grafite, com varredura em faixa angular de 5–50° (2 $\theta$ ) com incrementos de 0,01° (2 $\theta$ ) e constante de tempo de 5s step<sup>-1</sup>. O porta amostra foi submetido a giro "spinning" de 30 rpm para minimizar efeitos de rugosidade e reduzir qualquer eventual orientação preferencial.

#### **4.2.4 Desenvolvimento de método cromatográfico para a quantificação da candesartana cilexetila nos meios biorrelevantes**

Foram pesquisados em compêndios oficiais métodos cromatográficos existentes para a separação e quantificação da candesartana cilexetila.

A candesartana cilexetila não está presente na Farmacopeia Brasileira, então outros compêndios aceitos no Brasil foram pesquisados. A monografia do fármaco foi encontrada nas Farmacopeias Japonesa, Britânica e Americana.

Nas Farmacopeias citadas foram encontradas condições cromatográficas similares, variando somente nos tempos de mudança das fases móveis empregadas na eluição gradiente apresentadas na Tabela 3 (JAPAN, 2011; UNITED KINGDON, 2013; UNITED STATES, 2015). As condições são:

- **Fase móvel:**  
Fase móvel A: acetonitrila, água, ácido acético (57:43:1, v/v/v);  
Fase móvel B: acetonitrila, água, ácido acético (90:10:1 v/v/v);
- **Coluna:** fase estacionária: octadecilsilano ligado a sílica (C18); tamanho: 150 x 3,9 mm; 4 µm;
- **Volume de injeção:** 10 µL;
- **Fluxo:** 0,8 mL/min;
- **Deteção:** Ultravioleta em 254 nm;
- **Temperatura:** 25 °C. Somente informada pela Farmacopeia Japonesa.

Tabela 3- Eluições gradiente indicadas pelas Farmacopeias Japonesa, Americana e Britânica

Farmacopeia	Tempo (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
Japonesa e Americana	0	100	0
	30	0	100
Britânica	0-3	100	0
	3-33	100 → 0	0 → 100
	33-40	0	100

Fonte: adaptado de JAPAN, 2011; UNITED KINGDON, 2013; UNITED STATES, 2015.

Os testes iniciais foram realizados com a coluna Waters, Sunfire® C18 (150 x 4,6 mm; 3,5 µm); pré-coluna Sunfire C18 (20 x 4,6 mm; 3,5 µm); detector DAD; volume de injeção 10 µL; 25 °C. A amostra da candesartana cilexetila foi preparada em acetonitrila na concentração de 500 µg/mL.

As fases móveis sugeridas pelas farmacopeias foram testadas isoladamente em corridas isocráticas. Adaptações quanto a proporção dos solventes e fluxo foram realizadas, sendo estas:

- Acetonitrila, água acidificada com ácido acético à 1 % (89:11 v/v), fluxo: 0,8 mL/min.
- Acetonitrila, água acidificada com ácido acético à 1 % (57:44 v/v), fluxo: 1,2 mL/min.

Posteriormente, as melhores condições analíticas testadas foram avaliadas com a candesartana cilexetila nos meios biorrelevantes, cuja composição está descrita na Tabela 4.

Tabela 4- Composição dos meios biorrelevantes: pH 1,2, 4,5 e 6,8

<b>Meios biorrelevantes</b>	<b>Composição</b>
Fluido gástrico simulado sem enzimas (FGSSE) - pH 1,2	2,0 g de cloreto de sódio; 7,0 mL de ácido clorídrico; Água q.s.p 1000 mL.
Tampão acetato - pH 4,5	2,99 g de acetato de sódio trihidratado; 14 mL de ácido acético 2 M; Água q.s.p 1000 mL.
Tampão fosfato - pH 6,8	250 mL de solução de fosfato de potássio monobásico 0,2 M; 112 mL de solução de hidróxido de sódio 0,2 M; Água q.s.p 1000 mL.

Fonte: Adaptado de UNITED STATES (2015).

#### 4.2.5 Validação do método cromatográfico desenvolvido

A validação do método cromatográfico desenvolvido para a separação e quantificação da candesartana cilexetila foi realizada de acordo com as recomendações da Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Os parâmetros avaliados foram: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e limites de detecção e quantificação.

Para cada dia da validação três soluções estoques foram preparadas e cada solução estoque (SE) originou uma curva analítica. As soluções estoque para os meios pH 1,2 e 6,8 foram preparadas na concentração de 40 µg/mL a partir da solubilização de 2 mg de SQR em balão de 50 mL com metanol. O meio tamponado pH 4,5 não foi validado pelo fato da candesartana cilexetila apresentar neste meio os menores valores de solubilidade, fato que será discutido posteriormente.

Por outro lado, e adicionalmente, o método também foi validado utilizando-se o meio tamponado pH 6,8 com 0,35 % de polissorbato 20, empregado na realização do perfil de dissolução. Para esta condição, duas soluções estoque foram preparadas: a primeira na concentração de 500 µg/mL a partir da solubilização de 2,5 mg de SQR em balão de 5 mL com metanol e, a segunda, na concentração de 20 µg/mL a partir da diluição da primeira.

Os meios tamponados foram preparados de acordo com a Tabela 4. Para o meio pH 6,8 com adição de tensoativo, o polissorbato 20 foi pesado ao invés de medido devido a sua viscosidade.

Os cálculos e análises estatísticas foram realizados com o software Microsoft Excel® 2013.

#### 4.2.5.1 Seletividade

Para demonstrar a seletividade do método cromatográfico desenvolvido foi avaliada a capacidade de discriminação do sinal da candesartana cilexetila em presença de produtos de degradação e compostos estruturalmente semelhantes. Também foram avaliados os sinais correspondentes a fase móvel, o diluente da SE (metanol), os meios biorrelevantes e os excipientes empregados nas formulações de candesartana cilexetila.

Foram utilizados dois cromatógrafos da Waters acoplados a diferentes detectores. O primeiro deles acoplado ao detector de fluorescência, foi utilizado para comprovar a não interferência na fluorescência dos excipientes presentes nas formulações de candesartana cilexetila. O segundo cromatógrafo acoplado ao detector DAD foi utilizado em todas as outras avaliações para demonstrar a pureza dos picos cromatográficos.

Para as análises foi preparada uma solução estoque de candesartana cilexetila na concentração de 8000 µg/mL em metanol a partir da diluição de 16 mg de SQR em balão de 2 mL. As amostras analisadas foram preparadas na concentração de 100 µg/mL pois, concentrações menores não foram detectadas no teste piloto realizado previamente.

Para obter os produtos de degradação e poder atestar que o método é capaz de quantificar o analito de interesse sem a interferência dos referidos produtos, foi realizada a degradação ácida, alcalina e por calor seco da candesartana cilexetila nos meios tamponados, pH 1,2, 6,8 e 6,8 com 0,35 % de polissorbato 20 de acordo com as metodologias adaptadas de Golubović et al. (2015) e Bhagwate, Gaikwad e Tarte (2013).

Na degradação por calor seco, 50 µL da SE foram transferidos para um balão de 2 mL e completado com os meios: pH 1,2, 6,8 e 6,8 com tensoativo. As amostras permaneceram na estufa por 3 horas na temperatura de  $70,0 \pm 2,0$  °C para o meio pH 1,2 e 5 horas na temperatura de  $85,0 \pm 2,0$  °C para os meios pH 6,8 e 6,8 com tensoativo. Estas condições foram estabelecidas em uma avaliação inicial.

Na degradação ácida uma alíquota de 100 µL da solução estoque foi acrescida de 900 µL dos meios biorrelevantes em tubo de ensaio, completando assim 1 mL. Logo em seguida, 1 mL da solução de HCl 1 mol/L foi adicionada. As amostras foram deixadas na estufa por 3 horas na temperatura de  $70,0 \pm 2,0$  °C para o pH 1,2 e 5 horas na temperatura de  $85,0 \pm 2,0$  °C para os meios pH 6,8 e 6,8 com tensoativo. Depois foram resfriadas e acrescidas de 1 mL de NaOH 1 mol/L.



A degradação alcalina foi realizada da mesma forma, porém com NaOH 1 mol/L e a neutralização foi feita com HCl 1 mol/L. Ao final do processo foi coletado 1 mL de cada amostra, diluído com 1 mL de fase móvel, filtrado e analisado por CLAE.

Para a comparação dos cromatogramas, a amostra com SQR foi preparada na concentração de 100 µg/mL.

Como composto estruturalmente semelhante a candesartana cilexetila foi escolhida a valsartana, fármaco também pertencente à classe dos ARA II (BRUNTON et al., 2008), devido a sua disponibilidade em nosso laboratório. A solução de valsartana foi preparada na concentração de 200 µg/mL a partir da diluição de 2 mg de matéria-prima em balão de 10 mL com metanol.

Após a corrida analítica individual de cada amostra, 200 µL de cada vial foram coletados e misturados com o objetivo de avaliar a pureza da candesartana cilexetila juntamente com todos os produtos de degradação e o fármaco estruturalmente semelhante.

Na avaliação dos excipientes, quantidades médias de todos os excipientes encontrados nas formulações de candesartana cilexetila comercializadas no Brasil, (item 5.9.1, Tabela 24) exceção a carragenina, foram pesados e posteriormente homogeneizados e pulverizados. Desta mistura de pós, 2,5 mg foram retirados e transferidos para um balão volumétrico de 5 mL com metanol. O balão permaneceu por 30 minutos em aparelho de ultrassom, depois o menisco foi aferido e esta solução foi utilizada como SE para a preparação das amostras. Para tal, 100 µL da SE foram transferidos para balão volumétrico de 2 mL e completados com o meio pH 6,8 com 0,35% de polissorbato 20. Posteriormente uma alíquota de 1 mL foi retirada e diluída com 1 mL de fase móvel, a amostra foi filtrada e analisada por CLAE.

#### **4.2.5.2 Linearidade**

A linearidade do método cromatográfico foi avaliada a partir da construção de curvas analíticas com 5 concentrações do pró-fármaco nos meios pH 1,2 e 6,8 e com 6 concentrações para a candesartana cilexetila no meio pH 6,8 com tensoativo.

Como no final, 1 mL do meio foi diluído com 1 mL de fase móvel, as concentrações foram preparadas considerando esta diluição. Os dados referentes a construção das curvas são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5- Preparo das curvas analíticas dos meios tamponados pH 1,2, 6,8 e 6,8 com 0,35 % de polissorbato 20

Meio tamponado	Aliquota da SE (µL)	Meio adicionado q.s.p (mL)	Concentração (µg/mL)	Concentração final após diluição com fase móvel (µg/mL)
pH 1,2	40	2	0,8	0,4
	50	2	1,0	0,5
	70	2	1,4	0,7
	100	2	2,0	1,0
	140	2	2,8	1,4
pH 6,8	50	2	1,0	0,5
	70	2	1,4	0,7
	100	2	2,0	1,0
	140	2	2,4	1,4
	180	2	3,6	1,8
pH 6,8 com 0,35 de polissorbato 20	200*	2	2,0	1,0
	40	2	10,0	5,0
	80	2	20,0	10,0
	120	2	30,0	15,0
	160	2	40,0	20,0
	200	2	50,0	25,0

\* Aliquota retirada da solução estoque de concentração 20 µg/mL.

#### 4.2.5.3 Precisão

A precisão foi avaliada nos meios pH 1,2, 6,8 e 6,8 com 0,35 % de polissorbato 20 em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária.

A repetibilidade foi avaliada em três níveis de concentração, baixa, média e alta com três réplicas de cada, totalizando 9 determinações.

A precisão intermediária foi avaliada da mesma forma que a repetibilidade, porém com dois dias diferentes, totalizando 18 determinações.

Para cada concentração foi calculado o coeficiente de variação, também denominado desvio padrão relativo (DPR), de acordo com a Equação 1.

$$\text{Desvio padrão relativo} = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Concentração média determinada}} \times 100 \quad (1)$$

As concentrações selecionadas para a avaliação da precisão estão na Tabela 6.

Tabela 6- Concentrações da candesartana cilexetila nos meios tamponados pH 1,2, 6,8 e 6,8 com 0,35 % de polissorbato 20 para a avaliação da precisão

Meio tamponado	Concentração baixa (µg/mL)	Concentração média (µg/mL)	Concentração alta (µg/mL)
pH 1,2	0,4	0,7	1,4
pH 6,8	0,5	1,0	1,8
pH 6,8 com 0,35 % de polissorbato 20	1,0	10,0	25,0

#### 4.2.5.4 Exatidão

A exatidão calculada de acordo com a Equação 2, foi avaliada nos meios pH 1,2, 6,8 e 6,8 com 0,35 % de polissorbato 20 em três níveis de concentração: baixa, média e alta. Para cada concentração três réplicas foram utilizadas, totalizando 9 determinações. As concentrações selecionadas foram as mesmas utilizadas para avaliar a precisão, Tabela 6.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (2)$$

A RE 899 de 2003 não apresenta os critérios de aceitabilidade para a exatidão por isso foi adotado o intervalo entre 95,0-105,0 % onde os resultados devem estar compreendidos (ERMER; MILLER, 2006; KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007; KUMAR et al., 2012).

#### 4.2.5.5 Robustez

Para a avaliação da robustez, três amostras foram preparadas de forma independente e avaliadas de acordo com os cinco parâmetros descritos na Tabela 7. Para o meio pH 1,2, as amostras foram preparadas na concentração de 1,0 µg/mL, para o meio pH 6,8 estas foram

preparadas na concentração de 1,4 µg/mL e para o meio pH 6,8 com 0,35 % de polissorbato 20, as amostras foram preparadas na concentração de 15,0 µg/mL.

O impacto que cada variação dos parâmetros analíticos ocasionou nos resultados foi avaliado por meio da exatidão.

Tabela 7- Parâmetros avaliados na robustez do método cromatográfico desenvolvido para a separação e quantificação da candesartana cilexetila nos meios pH 1,2 e 6,8

<b>Parâmetro</b>	<b>Nominal -1</b>	<b>Nominal</b>	<b>Nominal + 1</b>
Volume de injeção (µL)	24	25	26
Temperatura (°C)	24	25	26
Fluxo (mL/min)	1,1	1,2	1,3
Proporção de acetonitrila na fase móvel (%)	59	60	61
Porcentagem de ácido acético na fase móvel (%)	0,09	0,10	0,11

#### 4.2.5.6 Limites de detecção e quantificação

Os limites de quantificação e detecção foram estimados por meio das equações 3 e 4. O desvio padrão do intercepto e a inclinação da curva analítica foram calculados a partir de dados de 3 curvas.

$$\text{Limite de quantificação} = \frac{\text{Desvio padrão com intercepto com eixo Y} \times 10}{\text{Inclinação da curva analítica}} \quad (3)$$

$$\text{Limite de detecção} = \frac{\text{Desvio padrão do intercepto com o eixo Y} \times 3}{\text{Inclinação da curva de calibração}} \quad (4)$$

#### 4.2.6 Estudos de solubilidade da candesartana cilexetila matéria-prima

##### 4.2.6.1 Agitação orbital em frasco

Foram realizados dois estudos piloto, em duplicatas, a fim de determinar as melhores condições experimentais para a realização do estudo de solubilidade em equilíbrio da candesartana cilexetila nos meios tamponados pH 1,2, 4,5 e 6,8. As condições utilizadas nos testes estão na Tabela 8.

Tabela 8- Condições experimentais dos testes piloto de solubilidade em equilíbrio da candesartana cilexetila realizado em duplicatas

Condições	Primeiro Piloto	Segundo Piloto
Massa	0,5 mg	0,5 mg
Meios biorrelevantes	pH 1,2, 4,5 e 6,8	pH 1,2, 4,5 e 6,8
Volume	250 mL	250 mL
Temperatura	37 °C	37 °C
Agitação	100 rpm	150 rpm
Volume coletado e repostado	1 mL	1,5 mL
Tempos de coleta	0, 3, 6, 9, 12, 24, 30, 36, 48, 54, 60 h	0, 3, 6, 9, 12, 24, 30, 36, 48, 54, 60 h

No primeiro piloto as amostras foram coletadas nos tempos descritos e diluídas com 1 mL da fase móvel, acetonitrila e água acidificada com ácido acético 0,1 % (60:40 v/v), exceto as amostras no pH 1,2 que foram diluídas com acetonitrila e água acidificada com ácido acético 0,01 % (60:40 v/v). Depois foram filtradas com filtro de seringa de 0,45 µm de poro e em seguida quantificadas por CLAE.

No segundo piloto as amostras foram coletadas e filtradas, em seguida, 800 µL das amostras foram diluídas com 800 µL da fase móvel, refiltradas e quantificadas por CLAE.

Posteriormente a solubilidade em equilíbrio da candesartana cilexetila foi avaliada em triplicatas, nos meios pH 1,2 e 6,8. Optou-se por não prosseguir com os estudos no meio tamponado pH 4,5, pois neste meio foram encontrados a maior discrepância entre as replicatas e os menores valores de solubilidade, fato que será discutido posteriormente. As condições utilizadas estão na Tabela 9 e o procedimento de coleta e filtração foi feito da mesma forma relatada para o segundo piloto.

Tabela 9- Condições experimentais do teste de solubilidade em equilíbrio da candesartana cilexetila no realizado em triplicatas nos meios tamponados pH 1,2 e 6,8

Condições	
Massa	1,0 mg
Meios biorrelevantes	pH 1,2 e 6,8
Volume	250 mL
Temperatura	37 °C
Agitação	150 rpm
Volume coletado	1,5 mL
Tempos de coleta	0, 1, 2, 3, 7, 10, 22, 28 e 34 h (pH 1,2) 0, 1, 2, 3, 7, 10, 22, 28, 34, 46, 52 e 58 h (pH 6,8)

Em razão da grande variação observada entre as replicatas, o ensaio para determinar a solubilidade em equilíbrio do pró-fármaco foi realizado novamente, porém com um único ponto de coleta, selecionado de acordo com a estabilidade determinada experimentalmente em cada meio, item 5.8. As condições utilizadas estão na Tabela 10 e o procedimento de coleta e filtração foi feito da mesma forma relatada para o segundo piloto.

Tabela 10- Condições experimentais do teste final de solubilidade em equilíbrio da candesartana cilexetila nos meios tamponados pH 1,2 e 6,8

<b>Condições</b>	
Massa	1,0 mg
Meios biorrelevantes	pH 1,2 e 6,8
Volume	250 mL
Temperatura	37 °C
Agitação	150 rpm
Volume coletado	1,5 mL
Tempos de coleta	3 horas (pH 1,2) e 32 horas (pH 6,8)*

\* Tempos selecionados de acordo com estabilidade avaliada experimentalmente, item 5.8.

#### 4.2.6.2 Dissolução Intrínseca

Três ensaios de dissolução intrínseca da candesartana cilexetila foram realizados em busca das melhores condições experimentais. Para a formação do compacto, a matéria-prima do fármaco foi colocada no disco rotativo e comprimida com auxílio de prensa hidráulica. As condições empregadas em cada teste encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11- Condições experimentais utilizadas nos ensaios de dissolução intrínseca da candesartana cilexetila

<b>Condições</b>	<b>Ensaio 1</b>	<b>Ensaio 2</b>	<b>Ensaio 3</b>
Meio tamponado	pH 1,2, 4,5 e 6,8	pH 1,2, 6,8	pH 1,2
Massa (mg)	300	300	100
Força (tnf)	2	1	1
Tempo de compressão	2 min	15 s	1 min
Volume de meio (mL)	900	500	500
Agitação (rpm)	50	100	100
Temperatura (°C)	37	37	37
Volume coletado e repostado (mL)	5	5	5
Duração (h)	22	4 (pH 1,2) 3,5 (pH 6,8)	3
Aparelhagem	Disco rotativo	Disco rotativo	Disco rotativo

#### **4.2.7 Análises eletrônicas da candesartana cilexetila e candesartana**

As estruturas eletrônicas da candesartana cilexetila e da candesartana foram analisadas a partir de modelos estruturais tridimensionais, utilizando o método de Mecânica Quântica baseado na Teoria do Funcional da Densidade. Para isso foi empregado o funcional B3LYP com o conjunto de bases gaussianas 6 - 31G (2d, 2p) implementado no pacote computacional de Química Quântica ORCA (NEESE, 2012). As superfícies dos orbitais de fronteira e de Fukui foram geradas com o Gabedit (ALLOUCHE, 2010).

Como etapa inicial, todas as estruturas foram submetidas a um processo de minimização de energia com método de mecânica molecular, que é fundamentado na Mecânica Clássica. Os resultados desta metodologia, foram utilizados como estados de partida para se estimar as estruturas com energias completamente minimizadas com os métodos de Mecânica Quântica. A partir destes resultados, as propriedades químicas foram analisadas avaliando-se a estrutura eletrônica das moléculas.

#### **4.2.8 Estabilidade da candesartana cilexetila nos meios biorrelevantes pH 1,2 e 6,8**

A estabilidade da candesartana cilexetila foi avaliada em triplicata nos meios pH 1,2 durante 34 horas e no pH 6,8 durante 58 horas a  $37,0 \pm 1,0$  °C. O pró-fármaco foi considerado estável durante o tempo de exposição no qual a porcentagem de perda não foi superior a 5 %.

#### **4.2.9 Avaliação dos medicamentos contendo candesartana cilexetila**

##### **4.2.9.1 Medicamentos disponíveis e seus excipientes**

A busca dos medicamentos que contêm a candesartana cilexetila disponíveis no mercado brasileiro foi realizada no site da Anvisa, mais especificamente na lista de preços de medicamentos que a Câmara de Regulação do Mercado de Medicamentos (CMED) atualiza mensalmente (CMED, 2016).

Para a pesquisa dos excipientes, foram consultadas as bulas constantes no Bulário Eletrônico desenvolvido pela Anvisa (BRASIL, 2015).

A maior dose disponível na forma farmacêutica comprimidos é de 32 mg, porém somente um produto está presente na lista da CMED (2016), por isso a avaliação dos excipientes foi realizada para a dose de 16 mg que possui 15 medicamentos.

A quantidade usual de cada excipiente para a forma farmacêutica comprimido de liberação imediata foi consultada no banco de dados *Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products* que contém informações sobre as quantidades de excipientes presentes nos medicamentos aprovados pelo FDA (2016a) assim como no livro *Handbook of Pharmaceutical Excipients* onde a função de cada excipiente foi também pesquisada (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

#### **4.2.9.2 Caracterização geral dos medicamentos**

Para a caracterização geral dos medicamentos, dois produtos foram selecionados, referência e genérico da candesartana cilexetila na dose de 16 mg. Estes produtos foram avaliados quanto ao peso, dureza, diâmetro, espessura, teor, friabilidade e desintegração de acordo com os métodos gerais aplicados a medicamentos sugeridos na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010b). Para o teor, adotou-se o intervalo especificado na Farmacopeia Japonesa (JAPAN, 2011).

#### **I. Determinação do peso**

Foram pesadas individualmente 20 unidades de cada medicamento, depois o peso médio foi calculado.

Segundo a Farmacopeia Brasileira o limite de variação aceitável para comprimidos não revestidos com o peso médio entre 80 e 250 mg é de  $\pm 7,5\%$ , não sendo tolerável mais que duas unidades fora deste limite assim como nenhuma unidade acima ou abaixo do dobro da porcentagem relatada.

#### **II. Dureza, diâmetro e espessura**

De cada produto selecionado, 10 unidades aleatórias foram mensuradas quanto a espessura e ao diâmetro com auxílio de paquímetro, posteriormente estas unidades foram submetidas ao teste de dureza. Para tal, cada unidade foi colocada individualmente no aparelho



durômetro e a pressão radial necessária para a ruptura do comprimido foi medida em Newtons (N).

### **III. Teor**

Foram pesadas 4 unidades de cada produto e o peso médio determinado. Em seguida, estas unidades foram pulverizadas e a quantidade do pulverizado equivalente a 2,5 mg do pró-fármaco foi transferida para balão volumétrico de 5 mL e metanol foi acrescentado. O balão permaneceu em aparelho de ultrassom por 30 minutos. Depois o volume foi completado e a solução filtrada em papel de filtro de 8  $\mu\text{m}$  e posteriormente em filtro de seringa de 0,22  $\mu\text{m}$ . Desta solução, na concentração teórica de 500  $\mu\text{g/mL}$ , foi retirada uma alíquota de 160  $\mu\text{L}$ , transferida para balão volumétrico de 2 mL, que foi completado com o meio pH 6,8 com 0,35 % de polissorbato 20, devido a maior solubilidade da candesartana cilexetila neste meio. Em seguida, uma alíquota de 1 mL foi retirada, diluída com 1 mL de fase móvel, chegando na concentração teórica de 20  $\mu\text{g/mL}$ . A amostra foi filtrada em filtro de seringa de 0,45  $\mu\text{m}$  e quantificada utilizando o método cromatográfico desenvolvido e validado. As análises foram realizadas em triplicata.

Segundo a Farmacopeia Japonesa, a única que possui monografia para a forma farmacêutica comprimidos da candesartana cilexetila, os comprimidos devem conter entre 95,0 e 105,0 % da porcentagem declarada no rótulo (JAPAN, 2011).

### **IV. Friabilidade**

Na avaliação da friabilidade dos comprimidos, ou seja, sua resistência à abrasão, 20 unidades de cada produto foram pesadas e submetidas a 100 rotações em aparelho friabilômetro. Em seguida, a integridade dos comprimidos foi avaliada visualmente, os resíduos de pó foram removidos e as unidades novamente pesadas. Os produtos cumprem o teste quando nenhuma unidade apresenta no final do ensaio quebras, lascas ou rachaduras e a porcentagem de perda não é superior a 1,5 % do peso inicial (BRASIL, 2010b).

### **V. Desintegração**

O ensaio foi realizado em aparelho desintegrador empregando como meio de imersão água a 37,0 °C. Foram testadas 6 unidades do medicamento referência e 12 unidades do

medicamento genérico devido à necessidade de repetir o teste. Como critério geral de aceitação têm-se que todas as unidades devem estar completamente desintegradas dentro de 30 minutos (BRASIL, 2010b).

#### 4.2.9.3 Perfis de dissolução

Foram avaliadas a cedência em função do tempo de 12 unidades de cada medicamento, referência e genérico, sob a forma farmacêutica comprimido, na dose de 16 mg de candesartana cilexetila.

As condições experimentais empregadas estão apresentadas na Tabela 12. O meio de dissolução escolhido para a realização do teste é uma adaptação do meio tampão fosfato pH 6,5 com 0,35 % de polissorbato 20, recomendado pelo FDA (FDA, 2016b). Este foi previamente desgaseificado por 30 minutos em aparelho de ultrassom. As amostras foram filtradas duas vezes, a primeira durante a coleta pelo equipamento, empregando filtros de cânulas de 10 µm e a segunda utilizando filtro de seringa de 0,45 µm após a diluição com a fase móvel. A quantificação foi realizada utilizando o método cromatográfico desenvolvido e validado.

Tabela 12- Condições experimentais utilizadas na realização do teste perfil de dissolução de produtos possuindo com insumo farmacologicamente ativo a candesartana cilexetila na dose de 16 mg

Condições	
Meio de dissolução	pH 6,8 com 0,35 % de polissorbato 20
Volume de meio	900 mL
Volume coletado e repostado	5 mL
Temperatura	37 °C
Aparato	Pá
Tempos de coleta	2, 6, 10, 15, 20, 25, 45 e 60 min
Velocidade de agitação	50 rpm até 45 min 150 rpm de 45 a 60 min (tempo infinito)

Para cada unidade testada foi calculada a eficiência dissolução (E.D.), por meio do método dos trapézios (soma da área dos trapézios) empregando a Equação 5.

$$E. D. = \frac{ASC_{(0-x \text{ minutos})}}{ASC_{TR}} \times 100 \quad (5)$$

Sendo,  $ASC_{(0-x \text{ minutos})}$  a área sob a curva de dissolução do fármaco no intervalo entre o tempo inicial e final do teste (onde ocorreu 100 % da dissolução, ou seja, o platô na curva) e  $ASC_{TR}$ , a área total do retângulo definida também pelo tempo onde ocorreu 100 % de dissolução (RIGOBELLO et al., 2013).

Para ambas as formulações foi empregado nos cálculos o mesmo tempo de dissolução, 45 minutos, seguindo as sugestões de Khan (1975), que afirma que somente tempos iguais da E.D. podem ser comparados.

Os perfis de dissolução foram comparados estatisticamente empregando os valores da E.D. encontrados, por meio da análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey realizados nos programas Microsoft Office Excel 2013 e ASSISTAT versão 7.7.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Histórico e critérios para a seleção de medicamentos do Programa Farmácia Popular do Brasil

Desde 2004, o PFPB não sofreu grandes modificações. O seu histórico é apresentado no Quadro 1, juntamente com a legislação que regulamentou os eventos ocorridos, quando existente.

Quadro 1- Histórico do Programa Farmácia Popular do Brasil

Ano	Evento	Legislação e assunto
2004	O Programa Farmácia Popular do Brasil foi implantado.	Lei nº 10.858, de 13 de abril de 2004. Autoriza a Fiocruz disponibilizar medicamentos, mediante ressarcimento. Decreto nº 5.090, de 20 de maio de 2004. Regulamenta a Lei no 10.858, de 13 de abril de 2004, e institui o programa "Farmácia Popular do Brasil".
2006	Expansão do Programa, denominada “Aqui tem Farmácia Popular”, mediante parceria entre o Governo Federal e a rede privada de farmácias e drogarias comerciais.	Portaria nº 491, de 9 de março de 2006. Dispõe sobre a expansão do Programa “Farmácia Popular do Brasil”.
2007	Ampliação dos medicamentos do “Aqui tem Farmácia Popular” pela inclusão de contraceptivos.	-
2010	Inclusão dos medicamentos: fosfato de oseltamivir, insulina regular, sinvastatina e outros para o tratamento da osteoporose, rinite, asma, parkinson e glaucoma. Para a incontinência urinária fraldas geriátricas também começaram a ser distribuídas.	-
2011	Os medicamentos para os tratamentos da hipertensão e diabetes passaram a ser distribuídos gratuitamente.	Portaria nº 184, de 3 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre o Programa Farmácia Popular do Brasil.
2012	Os medicamentos para o tratamento da asma passaram a ser distribuídos gratuitamente.	Portaria nº 1.146, de 1º de junho de 2012. Altera e acresce dispositivos à Portaria nº 971/GM/MS, de 17 de maio de 2012, para ampliar a cobertura da gratuidade no âmbito do Programa Farmácia Popular do Brasil.
2016	Alteração da Portaria que rege o Programa com atualização dos valores de referência dos medicamentos.	Portaria nº 111, de 28 de janeiro de 2016. Dispõe sobre o Programa Farmácia Popular do Brasil (PFPB).

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2016b.

A lista de medicamentos que compõem o PFPB é baseada na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (Rename). Primariamente, os medicamentos foram selecionados de acordo com critérios epidemiológicos e com as principais doenças que acometem a população brasileira e geram grande impacto financeiro (BRASIL, 2016f; BRASIL, 2009).

Adicionalmente, outros critérios também foram considerados, tais como:

- Segurança, eficácia terapêutica, qualidade e disponibilidade;
- Medicamentos que compõem os Programas Assistenciais do Ministério da Saúde;
- Produção por laboratórios farmacêuticos oficiais;
- Disponibilidade de registro como medicamentos genéricos.

Os medicamentos que compõem o programa possuem também como característica em comum o baixo custo, tanto os genéricos quanto os medicamentos de marca (ALMEIDA, 2015).

Segundo o Ministério da Saúde (2016f) o elenco de medicamentos é revisto rotineiramente e caso haja alteração do perfil epidemiológico, o programa pode incluir ou excluir medicamentos. Porém, a análise dos medicamentos distribuídos, realizada por Yamauti, Barberato-Filho e Lopes (2015), mostrou a inexistência desta revisão periódica pois foi notada a presença de medicamentos já excluídos de edições anteriores da Rename. Como exemplos têm-se a nistatina 25.000 UI em creme vaginal (anti-infeccioso tópico), o cetoconazol comprimido de 200 mg (antimicótico de uso sistêmico) ambos excluídos da Rename em 2006 e o mebendazol comprimido mastigável de 100 mg (antiparasitário), excluído em 2010.

Já em conformidade com a preferência por medicamentos genéricos, dados de 2016 apontam que os genéricos são a maioria dos medicamentos que compõem o PFPB, totalizando aproximadamente 80 % dos medicamentos disponibilizados (ABCFARMA, 2016). Assim, o PFPB tem se firmado como incentivador da produção, prescrição e uso de medicamentos genéricos em acordo com a Política Nacional de Medicamentos; além de promover o uso racional dos medicamentos, priorizado pela Política Nacional de Assistência Farmacêutica, já que a dispensação dos medicamentos só ocorre mediante apresentação do receituário médico ou odontológico, mesmo para aqueles medicamentos que não necessitam prescrição médica (PEREIRA, 2013; BRASIL, 2001; 2004c).

Além dos medicamentos, o Programa distribui fraldas geriátricas com até 90 % de desconto (somente no “Aqui tem Farmácia Popular”) e preservativos masculinos a preço de custo (somente na “Rede Própria”) (BRASIL, 2016a).

Desde a sua criação, a modalidade “Aqui tem Farmácia Popular” já beneficiou 38 milhões de pessoas, o que representa aproximadamente 20 % da população brasileira (BRASIL, 2016d).

Mensalmente esse número é de aproximadamente 9 milhões de pessoas, a maior parte dos medicamentos dispensados são aqueles gratuitos para o tratamento da hipertensão arterial (6,4 milhões) e diabetes (2,7 milhões) (BRASIL, 2016d). Estes dados demonstram a importância desta iniciativa do Governo Federal para o acesso a estes medicamentos e, também, aos antiasmáticos ampliando as possibilidades da população para obtenção destes medicamentos de uso crônico. Cabe ressaltar que em 2013, um ano após o início da distribuição de medicamentos gratuitos para a asma pelo PFPB, houve redução de 16 % das internações no SUS por crises asmáticas (BRASIL, 2013a). Estes dados demonstram a relevância deste Programa no atual cenário da saúde brasileira, sendo reconhecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como bom exemplo de como melhorar o uso responsável de medicamentos pela população por meio da facilitação do seu acesso (WHO, 2012).

## 5.2 Estudos de permeabilidade

Os dados de permeabilidade da candesartana cilexetila e da candesartana, encontrados na literatura estão listados na Tabela 13.

Tabela 13- Dados sobre a permeabilidade da candesartana cilexetila e candesartana

Método	Valores de referência	Resultados		Fonte
		Candesartana cilexetila	Candesartana	
Coefficiente de partição octanol/água	Alta: 1,80	7,10	4,68	Campos et al. (2015)
PAMPA (Papp:10 <sup>-6</sup> cm/s)	Baixa: < 1,0 Alta: > 1,5	12,7 ± 3,7	0,5 ± 0,4	Tervahauta (2014)
Células Caco-2 (Papp:10 <sup>-6</sup> cm/s)	Moderada: 2-20	-	A-B*: 2,11 ± 0,44 B-A**: 8,08 ± 1,34	Zhou et al. (2009)

*Continua*

Tabela 13- (Continuação)

Método	Valores de referência	Resultados		Fonte
		Candesartana cilexetila	Candesartana	
Intestino invertido (Papp: $10^{-6}$ cm/s)	Baixa: 0,9-8,3 Alta: 11,4-100,3	11,97	9,85	Darwhekar, Jain e Chouhan (2012)
Biodisponibilidade absoluta em seres humanos (%)	Alta: $\geq 85$	-	42,3- a partir de forma farmacêutica solução	Van Lier, Van Heiningen e Sunzel (1997)
			$\approx 40$ - a partir de forma farmacêutica solução	Sweetman (2009)
			$\approx 14$ - a partir de forma farmacêutica comprimido	

\*Papp A-B: coeficiente de permeabilidade aparente no sentido apical-basolateral.

\*\*Papp B-A: coeficiente de permeabilidade aparente no sentido basolateral-apical.

Fonte: Elaborado pela autora.

Os coeficientes de partição octanol/água (Log P) da candesartana cilexetila e da forma ativa candesartana, obtidos por modelos computacionais (*in silico*) demonstram que ambas as formas possuem alta permeabilidade em comparação com o fármaco padrão de alta permeabilidade, o metoprolol (Log P: 1,80) (CAMPOS et al., 2015). Sendo o pró-fármaco mais hidrofóbico que o fármaco. No entanto, a permeabilidade intestinal depende de uma série de propriedades da molécula além da sua lipofilia, como tamanho molecular, área superficial polar, flexibilidade dentre outras (MARTINEZ; AMIDON, 2002; UNGELL et al., 1997).

Os resultados relatados no ensaio PAMPA por Tervahauta (2014), assim como os obtidos por Darwhekar, Jain e Chouhan (2012) utilizando o método do intestino invertido para o pró-fármaco e o fármaco, coincidiram com o caráter lipofílico determinado pelo LogP, sendo o Papp da candesartana cilexetila superior ao da candesartana.

Porém, durante a realização do ensaio pelo método do intestino invertido, não foi relatada a avaliação da integridade do tecido e nem sequer o emprego dos controles de alta ou baixa permeabilidade, essenciais para a caracterização do método e verificação dos resultados (GIACOMINI et al., 2010). A candesartana cilexetila foi classificada como de alta

permeabilidade e a candesartana como de baixa permeabilidade, para tal, foram utilizados os seguintes limites: baixa permeabilidade Papp entre  $0,9-8,3 \times 10^{-6}$  cm/s e alta permeabilidade Papp entre  $11,4-100,3 \times 10^{-6}$  cm/s, estabelecidos por Ungell e colaboradores (1987) para o modelo em questão. No entanto, o valor de Papp encontrado para a candesartana,  $9,85 \times 10^{-6}$  cm/s está fora de ambos os intervalos. Além disso, Ungell e colaboradores (1987) afirmaram que esperavam que o fármaco cujo Papp foi de  $11,4 \times 10^{-6}$  cm/s fosse metabolizado pelo tecido intestinal durante o experimento e pudesse influenciar os resultados, subestimando-os mas, este ponto fundamental, visto que este fármaco foi utilizado como limite de classes, não foi avaliado profundamente por eles.

Os resultados obtidos no modelo de células Caco-2 indicam que o fármaco possui moderada permeabilidade (Papp entre  $2-20 \times 10^{-6}$  cm/s) (JIN et al., 2014), sendo principalmente absorvido por difusão passiva. Foi observado também que ele é susceptível ao efluxo por transportadores de membrana, pois a razão da permeabilidade encontrada (Papp B-A/Papp A-B) foi superior a 2, valor utilizado como indicador de efluxo (ZHOU et al., 2009; GIACOMINI et al., 2010). O efluxo da candesartana demonstrou ser principalmente realizado pela P-gP visto que na presença da ciclosporina A e verapamil, ambos inibidores da P-gP, a absorção da candesartana foi aumentada e a secreção diminuída (ZHOU et al., 2009).

Segundo o FDA (2015) a avaliação da permeabilidade de pró-fármacos depende do local onde a conversão à forma ativa acontece. Se esta ocorrer antes da permeação intestinal, a permeabilidade do fármaco deve ser determinada. Caso ocorra após a permeação da membrana intestinal a permeabilidade do pró-fármaco deve ser determinada.

Os artigos científicos relatam que a conversão da candesartana cilexetila ocorre durante sua absorção intestinal, ou seja, durante a sua passagem do trato gastrointestinal para a circulação sanguínea, mais especificamente na parede intestinal (KUBO et al., 1993; LEMKE et al., 2013; VAN LIER; VAN HEININGEN; SUNZEL, 1997; RANG et al., 2003). Deste modo, a molécula que permeia a membrana intestinal é a candesartana cilexetila, sendo ela a responsável pela biodisponibilidade absoluta de 14 % da candesartana. Assim considerando que quando há conflito quanto aos dados de permeabilidade provenientes de tipos diferentes de estudos, os obtidos em seres humanos são os mais relevantes (FDA, 2015) a biodisponibilidade absoluta relatada permite a classificação da candesartana cilexetila e da candesartana como de baixa permeabilidade, visto ser inferior a 85 %, valor utilizado como referência pelas agências regulatórias (BRASIL, 2011b; EMA, 2010; FDA, 2015; HEALTH CANADA, 2014; WHO, 2015).

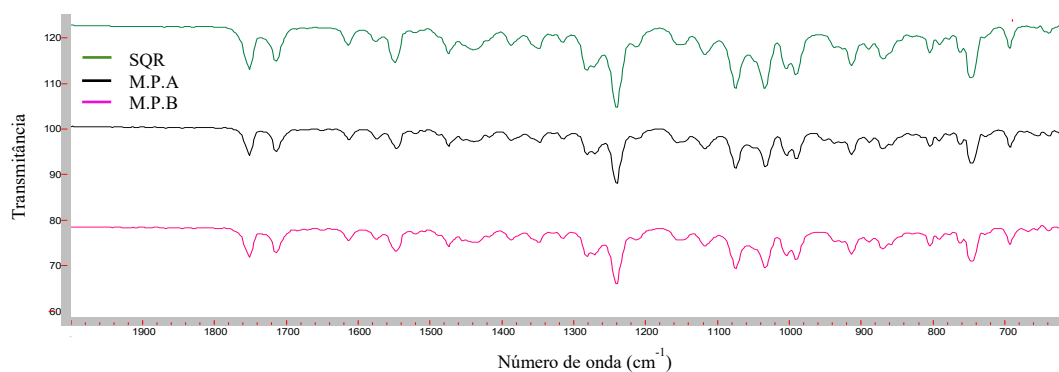


### 5.3 Caracterização da substância química de referência e das matérias-primas de candesartana cilexetila e avaliação da estrutura polimórfica

#### 5.3.1 Infravermelho com Transformada de Fourier: análises da substância química de referência e das matérias-primas de candesartana cilexetila

Os espectros na região do infravermelho obtidos para as matérias-primas A e B da candesartana cilexetila foram semelhantes ao espectro da SQR, Figura 3. Para facilitar a visualização dos picos os espectros foram extraídos na faixa de 2000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ .

Figura 3- Espectros na região do infravermelho da substância química de referência e das matérias-primas A e B da candesartana cilexetila



Os picos com as intensidades mais fortes foram observados em: 1751  $\text{cm}^{-1}$ ; 1240  $\text{cm}^{-1}$ , 1034  $\text{cm}^{-1}$  e 1074  $\text{cm}^{-1}$ . Estão relacionados respectivamente a frequência de estiramento da ligação C=O do grupo carbonila de ésteres (1750-1735  $\text{cm}^{-1}$ ); ao estiramento da ligação C-N de grupos aril-amina (1280-1180  $\text{cm}^{-1}$ ); a vibração do esqueleto do anel ciclohexano (1055-1000  $\text{cm}^{-1}$ ) e ao estiramento da ligação C-O também de ésteres (1300-1000  $\text{cm}^{-1}$ ) (COATES, 2000; LOPES; FASCIO, 2004; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005; SOLOMONS; FRYLE, 2011).

#### 5.3.2 Análise térmica da substância química de referência e das matérias-primas de candesartana cilexetila

As curvas de TG, DTG e DTA obtidas para as amostras de candesartana cilexetila são apresentadas nas Figuras 4 (SQR), 5 (M.P.A), 6 (M.P.B) e as curvas de DSC na Figura 7.

Figura 4- Curvas de TG, DTG e DTA da SQR da candesartana cilexetila

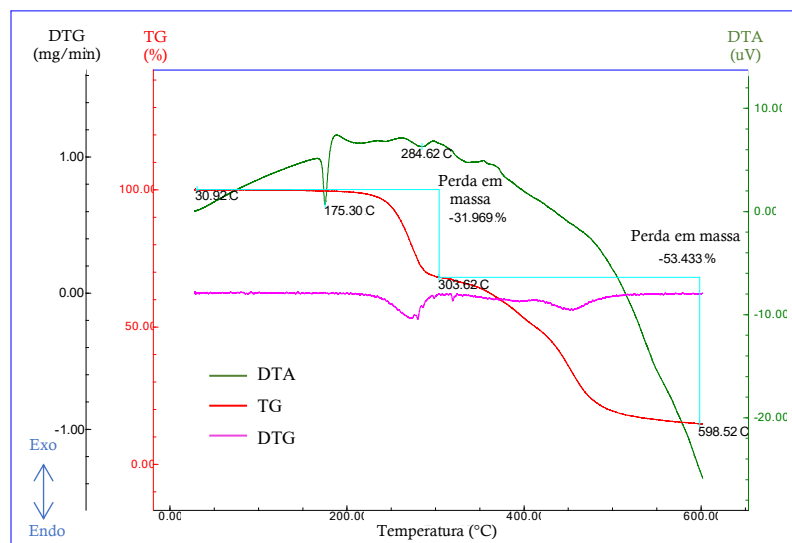


Figura 5- Curvas de TG, DTG e DTA da M.P.A da candesartana cilexetila

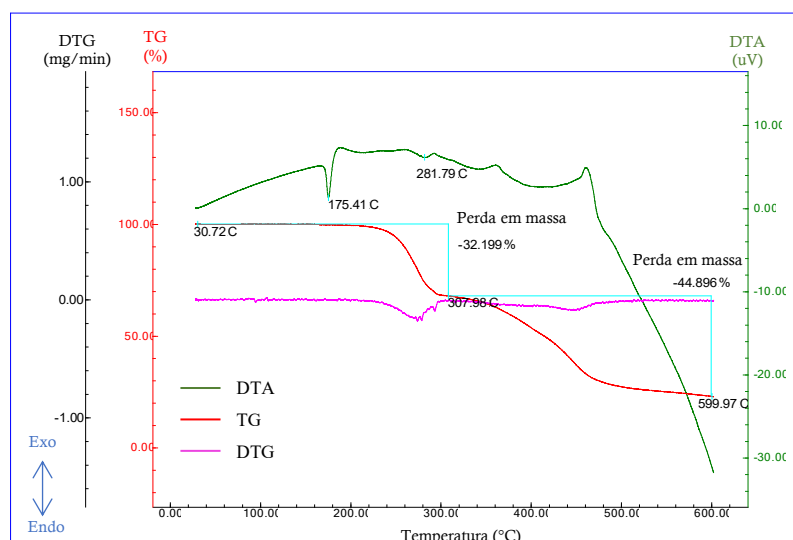


Figura 6- Curvas de TG, DTG e DTA da M.P.B da candesartana cilexetila

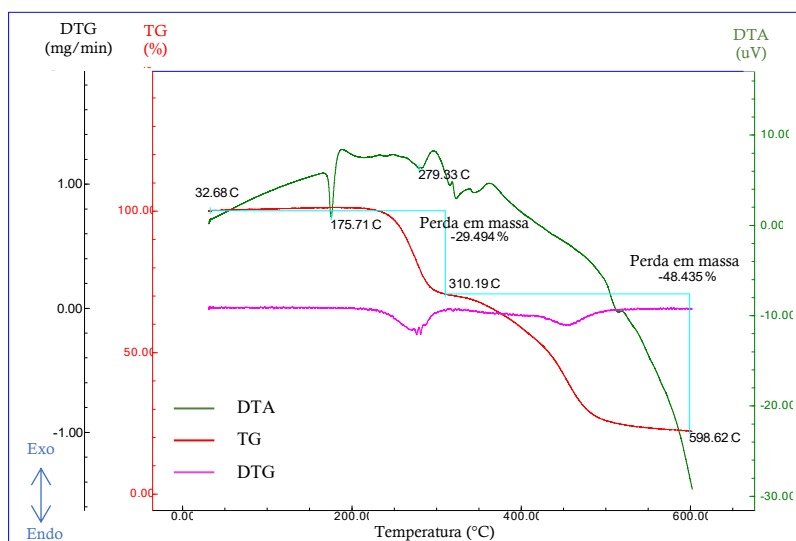
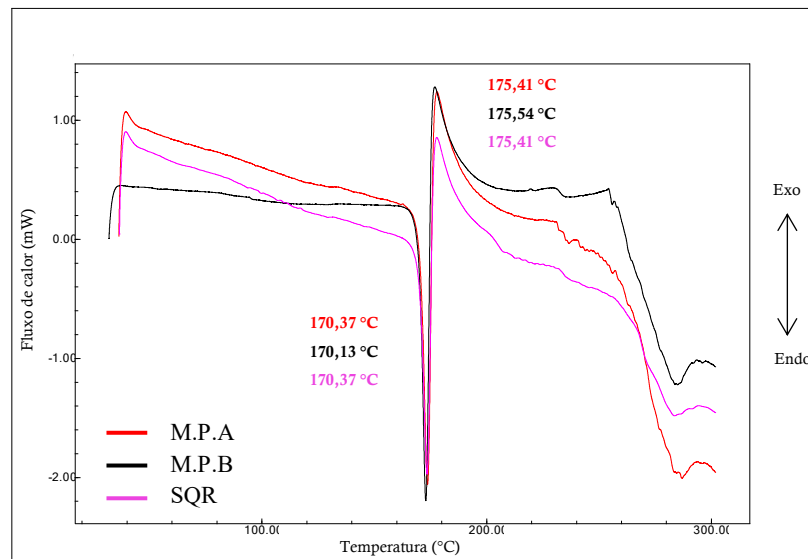


Figura 7- Sobreposição das curvas de DSC da SQR e matérias-primas A e B da candesartana cilexetila



De forma geral, observa-se que todas as curvas térmicas obtidas apresentam perfis termoanalíticos semelhantes. As curvas de TG demonstraram processos de decomposição em mais de uma etapa a partir de 200 °C, aproximadamente.

As curvas de DTA das três amostras apresentaram um pico endotérmico estreito na temperatura de 175 °C que não apareceu nas curvas de TG e DTG. Este evento endotérmico corresponde a fusão da candesartana cilexetila. A fusão é um fenômeno físico evidenciado por picos endotérmicos, que por não envolver perda de massa, não são apresentados na TG e DTG (IONASHIRO, 2004; STORPIRTIS, 2009).

A fusão da candesartana cilexetila também pode ser observada nas curvas obtidas por DSC. Os valores apresentados na Figura 7, correspondem as temperaturas onde o processo de fusão da candesartana cilexetila se iniciou, sendo a mesma para as três amostras, 170 °C. Este valor encontra-se dentro da faixa de fusão relatada na literatura para a candesartana cilexetila (160-175 °C) (REDDY, NAVANEETHA, 2015).

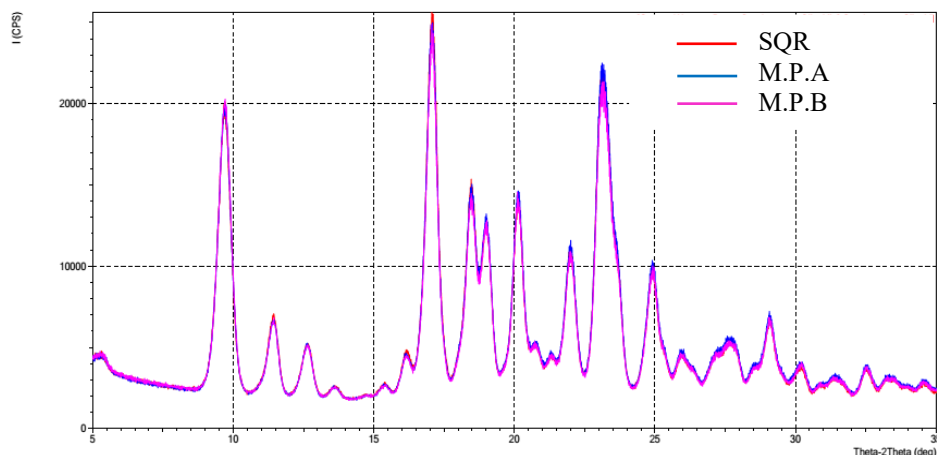
Ainda com relação às curvas de DSC, observou-se logo imediatamente após o pico correspondente a fusão da candesartana cilexetila um pico exotérmico. Segundo dados da literatura, este segundo pico é causado pelo processo de decomposição do pró-fármaco que ocorre junto com a fusão (MATSUNAGA et al., 1999). Porém, o início dos declínios nas curvas de TG e DTG, que demonstram a perda de massa, só foi observado após o pico exotérmico, demonstrando que ele marca o início do processo de decomposição.

Diante do exposto pode-se inferir que as três amostras são do mesmo polimorfo, visto que, polimorfos diferentes possuem propriedades físicas e químicas diferentes, como ponto de fusão o que não foi observado na análise térmica realizada (ARAÚJO et al., 2012; FLORENCE, ATTWOOD, 2011).

### 5.3.3 Difração de raios-X da substância química de referência e das matérias-primas de candesartana cilexetila

Os resultados da análise por difração de raios-X estão apresentados na Figura 8. Observa-se que os picos da M.P.A, M.P.B e SQR possuem os mesmos picos de difração estando desta forma sobrepostos.

Figura 8- Difratomogramas da substância química de referência e matérias-primas A e B



Os picos de difração são característicos para cada fase cristalina, ou seja, para cada forma polimórfica (ALBERS et al., 2002). Desta forma, pode-se inferir que as três amostras são do mesmo polimorfo.

Comparando os picos cristalinos obtidos com os relatados por Matsunaga et al. (1999) (9,82; 17,18; 18,58; 19,12; 20,26 e 23,22  $2\theta^\circ$ ) é possível identificar a forma I da candesartana cilexetila. Esta forma polimórfica é considerada a mais estável e possui o maior ponto de fusão em comparação com a forma II (120  $^\circ\text{C}$ ) (CUI et al., 2013; MATSUNAGA et al., 1999).

Independentemente do número de polimorfos que um fármaco possua, somente um deles é termodinamicamente estável a determinada temperatura e pressão. Os outros polimorfos instáveis, tendem a se converter na forma estável, com o passar do tempo. A forma amorfa do

fármaco, ou seja, a que possui arranjos moleculares aleatoriamente distribuídos, também tende a ser menos estável que a forma cristalina e a se converter nela (ARAÚJO et al., 2012; ZHANG, 2004; SINGHAL, 2004).

Apesar dos polimorfos de um mesmo fármaco possuírem a mesma composição química, as estruturas internas dos cristais se diferem e por isso distintas propriedades físico-químicas são esperadas, por exemplo, o polimorfo mais estável normalmente possui máxima estabilidade química, maior ponto de fusão, porém menor solubilidade (ARAÚJO et al., 2012; ZHANG, 2004; VIPPAGUNTA; BRITTAIN; GRANT, 2001).

De maneira geral, prefere-se desenvolver um medicamento com a forma mais termodinamicamente estável do fármaco para assegurar que não ocorra a conversão de uma forma em outra durante o processo de produção, garantindo assim biodisponibilidade reprodutível (SINGHAL, 2004). Fato este que pode explicar o porquê da forma I, mais estável, da candesartana cilexetila ser utilizada na fabricação do medicamento referência, Atacand<sup>®</sup> (ASTRAZENCA, 2015).

#### 5.4 Desenvolvimento de método cromatográfico para a quantificação da candesartana cilexetila nos meios biorrelevantes

Os cromatogramas obtidos a partir das adaptações das condições analíticas das Farmacopeias estão representados nas Figuras 9 e 10.

Figura 9- Cromatograma da candesartana cilexetila em acetonitrila na concentração de 500 µg/mL com a fase móvel acetonitrila e água acidificada com ácido acético a 1 % (89:11 v/v) no fluxo de 0,8 mL/min

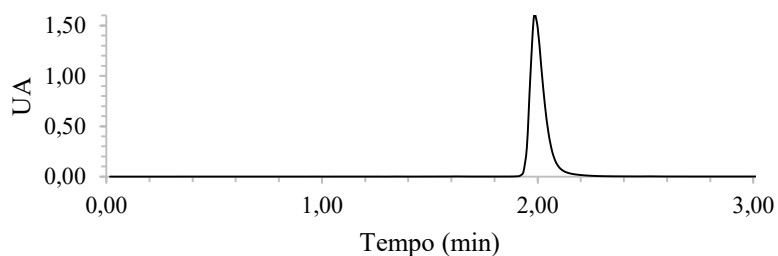
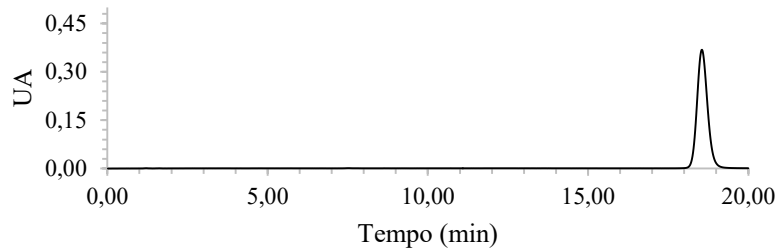


Figura 10- Cromatograma da candesartana cilexetila em acetonitrila na concentração de 500 µg/mL com a fase móvel acetonitrila e água acidificada com ácido acético a 1 % (57:44 v/v) no fluxo de 1,2 mL/min



Na Figura 9 observa-se que o tempo de retenção da candesartana cilexetila foi próximo ao tempo morto (estimado em 1,9 minutos por meio da fórmula:  $t_0 \approx 0,5 \times L \times d_c^2$ . Sendo L: comprimento da coluna e  $d_c$  o seu diâmetro interno, ambos em cm), que é o tempo que a fase móvel leva para percorrer o sistema, a coluna e chegar ao detector. O que não é indicado, já que pode haver sobreposição do sinal da amostra com o sinal da fase móvel (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

No cromatograma da Figura 10, o fluxo foi elevado à 1,2 mL/min, pois com os fluxos de 0,8 e 1,0 mL/min o pico não foi detectado em 20 minutos de corrida, que já é considerado um tempo alto para a aplicação analítica em questão por acarretar maior tempo de análise e maior geração de resíduo.

Ambas as proporções de fase móvel testadas não foram adequadas visto os tempos de retenção obtidos.

A retenção da amostra pode ser controlada por meio do ajuste da força (proporção de solventes) da fase móvel. Na cromatografia a líquido de fase reversa quanto maior a proporção do solvente orgânico, no caso a acetonitrila, menor o tempo de retenção (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Em busca de condições analíticas que possibilitem tempo de retenção adequado a aplicação do método, adaptações na proporção dos constituintes da fase móvel foram realizadas. A condição cromatográfica mais adequada que proporcionou o tempo de retenção de 6,93 min foi: fase móvel composta acetonitrila, água acidificada com ácido acético à 1 % (69:31 v/v) e fluxo 1,0 mL/min.

Esta condição foi utilizada para avaliar o comportamento do pró-fármaco nos meios biorrelevantes, com valores de pH: 1,2, 4,5 e 6,8. Para tal, as amostras foram preparadas na concentração de 0,25 µg/mL, valor próximo aos dados de solubilidade relatados na literatura

para a candesartana cilexetila, sendo estes pH 1,2: 0,23  $\mu\text{g/mL}$ ; 4,5: 0,51  $\mu\text{g/mL}$  e 6,8: 1,3  $\mu\text{g/mL}$  (HOPPE; SZNITOWSKA, 2014).

Porém o sinal analítico correspondente à candesartana cilexetila não foi observado em nenhum dos cromatogramas obtidos sob a mesma condição que resultou um tempo de retenção de 6,93 minutos para o pró-fármaco em acetonitrila. Então suspeitou-se que por causa da baixa concentração da amostra, o detector DAD não era sensível o bastante para detectar o analito.

O detector de fluorescência foi então selecionado por ser cerca de 3 vezes mais sensível que o UV (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

A fluorescência é um processo onde a energia absorvida por átomos e moléculas é convertida em luz emitida. Consiste em três passos: excitação, por meio da absorção de energia; relaxamento, onde as espécies voltam ao estado fundamental e a consequente emissão do excesso de energia (SADEK, 2004; SKOOG et al., 2005).

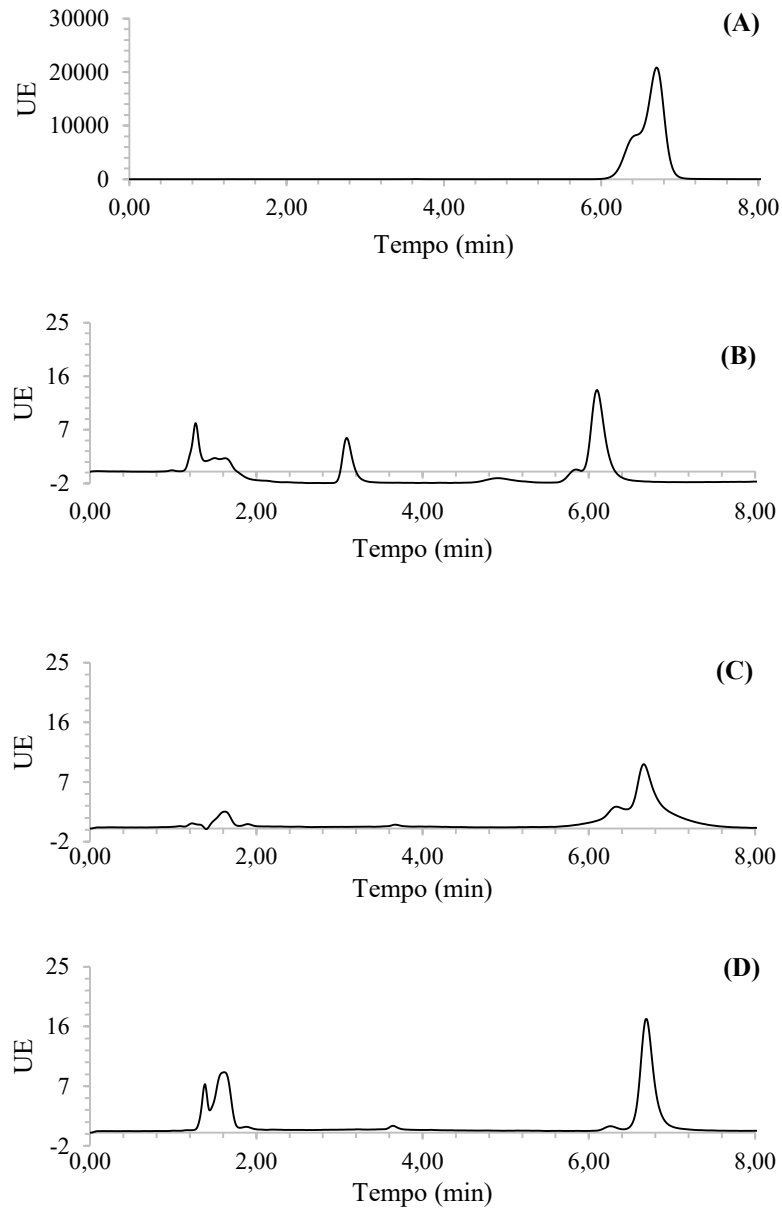
Foram avaliados inicialmente os comprimentos de onda de excitação 265 nm e de emissão 392 nm empregados por Belal et al. (2014) para a quantificação do pró-fármaco em etanol. Estes valores foram testados na coluna XBridge<sup>®</sup> C18, 150 mm x 4,6; 3,5  $\mu\text{m}$  da Waters pois a coluna Sunfire apresentou problemas com a pressão devido ao desgaste.

A fase móvel foi modificada para a proporção de 60 % de acetonitrila e 40 % de água acidificada e a quantidade de ácido acético foi diminuída para elevar o valor de pH para 4,0 pois ambientes muito ácidos contribuem para a hidrólise dos grupos silanóis e a consequente perda da fase estacionária (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

A amostra do pró-fármaco também foi preparada em etanol, para a comparação com os meios biorrelevantes, pois neste solvente, a candesartana cilexetila apresenta maior intensidade de fluorescência em comparação a água (base dos meios biorrelevantes) (BELAL et al., 2014). A concentração final das amostras foi de 100  $\mu\text{g/mL}$ .

Como pode ser observado na Figura 11 (A-D), o detector de fluorescência foi capaz de identificar o pico da candesartana cilexetila, mesmo sem adequada simetria.

Figura 11- Cromatogramas da candesartana cilexetila na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  obtidos em etanol (A), pH 6,8 (B), pH 4,5 (C) e pH 1,2 (D)



Posteriormente realizou-se a varredura nos comprimentos de excitação e emissão para identificar quais seriam os valores mais adequados para garantir o maior sinal possível em cada um dos meios biorrelevantes. A varredura consiste em manter um dos parâmetros, excitação ou emissão fixo e para o outro escolhe-se uma faixa de comprimentos de onda onde o detector realiza a varredura.

Com o comprimento de onda de emissão mantido a 392 nm, realizou-se a varredura dos comprimentos de excitação na faixa de 240 a 300 nm, em intervalos de 1,0 nm, onde os máximos encontrados para os meios foram: pH 1,2: 267 nm; pH 4,5: 264 nm e pH 6,8: 264 nm.



Logo, esses valores foram selecionados e mantidos fixos para a avaliação do melhor comprimento de onda de excitação. O máximo valor encontrado para todos os meios foi 383 nm, porém no decorrer dos testes foram observadas variações no valor máximo da emissão para o mesmo meio. Por isso, optou-se por manter os valores de excitação fixos e utilizar para a emissão varreduras na faixa de comprimentos de onda de 370 a 390 nm.

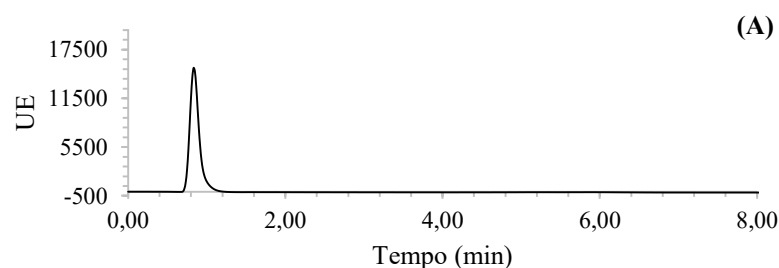
As amostras nos meios biorrelevantes passaram a serem preparadas a partir de SE de candesartana cilexetila na concentração de 500 µg/mL em metanol, solvente no qual o pró-fármaco apresenta adequada estabilidade (perda de menos de 3 % na temperatura de 37,0 °C por 14 dias) (HOPPE; SZNITOWSKA, 2014; FERREIRÓS et al., 2007). Foram diluídas com a fase móvel na proporção de 1:1. A concentração final foi de 50 µg/mL. O ácido acético da fase móvel foi empregado na quantidade de 0,01 % e o pH de 3,8.

Estas adaptações permitiram que as amostras dos meios pH 1,2 e 6,8, adquirissem formato simétrico. Porém, a amostra no meio pH 4,5 permaneceu com o mesmo aspecto.

Por suspeitar que o problema dos picos fosse devido à baixa solubilidade do fármaco nos meios e pelo fato das Farmacopeias Britânica, Japonesa e Americana sugerirem 1 % de ácido acético na fase móvel (JAPAN, 2011; UNITED KINGDON, 2013; UNITED STATES, 2015), solvente onde a candesartana cilexetila é solúvel, a proporção de ácido acético foi aumentada para 0,1 %, o que ocasionou redução do pH da fase móvel para 3,2.

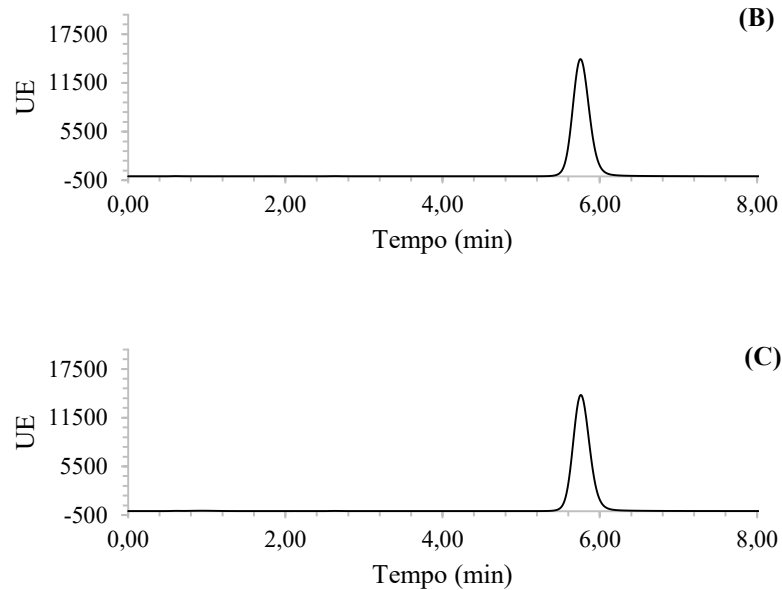
A coluna Luna<sup>®</sup>, C18, 50 x 4,6 mm d.i.; 5 µm da Phenomenex passou a ser utilizada e a pré-coluna Sunfire C18 (20 x 4,6 mm d.i.; 3,5 µm) foi mantida. Os cromatogramas obtidos podem ser visualizados na Figura 12 (A-C).

Figura 12- Cromatogramas da candesartana cilexetila na concentração de 50 µg/mL nos meios pH 1,2 (A), 4,5 (B) e 6,8 (C)



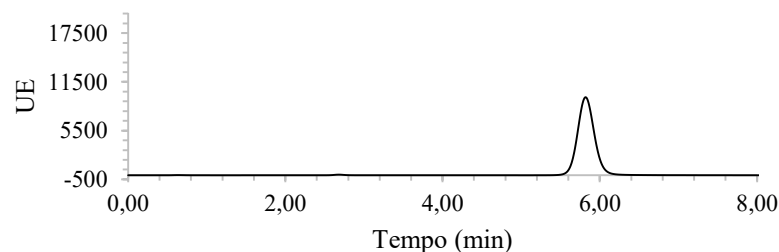
*Continua*

Figura 12- (Continuação)



O pró-fármaco no tampão pH 1,2 eluiu muito rapidamente, próximo ao tempo morto, demonstrando uma maior afinidade pela fase móvel do que pela fase estacionária C18 da coluna. Para solucionar o problema a proporção de ácido acético na fase móvel que é utilizada para diluir amostra foi diminuída para 0,01 %. Ou seja, outra fase móvel foi preparada somente para diluir a amostra no FGSSE (pH 1,2). A fase móvel que é empregada no cromatógrafo se manteve a mesma.

Com essa modificação o pró-fármaco apresentou tempo de retenção similar aos demais como pode ser visto na Figura 13.

Figura 13- Cromatograma da candesartana cilexetila na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  no FGSSE (pH 1,2)

Além de melhorar o aspecto do pico, a maior proporção de ácido acético na fase móvel que é utilizada no cromatógrafo e na diluição das amostras, ocasionou maior sinal de emissão pela candesartana cilexetila, tornando mais fácil a quantificação de pequenas concentrações.

Esta ampliação do sinal pode estar relacionada ao caráter mais ácido da fase móvel, pois os ARA II apresentam maior fluorescência intrínseca em ambientes ácidos (GONZÁLEZ et al., 2002).

A fluorescência intrínseca ou endógena é uma propriedade de moléculas que possuem fluoróforos, representados por grupos aromáticos. Estas moléculas possuem a capacidade de absorver a luz e a transformar em fluorescência (CAGIGAL et al., 2001).

As condições finais do método estão descritas na Tabela 14.

O fator de cauda para cada pico encontrado nas condições finais foi calculado de acordo com a Equação 6.

$$T = \frac{W_{0,05}}{2f} \quad (6)$$

Sendo,  $W_{0,05}$  = largura do pico a 5 % da altura;  $f$  = valor da porção anterior do pico, em relação à largura a 5 % da altura.

Os valores encontrados foram: para o pH 1,2: 1,08; pH 4,5: 1,20 e pH 6,8: 1,14.

Tabela 14- Condições cromatográficas estabelecidas para a quantificação da candesartana cilexetila

<b>Parâmetro</b>	<b>Especificação</b>	
Coluna	C18 - 50 x 4,6 mm d.i.; 5 µm	
Pré-coluna	C18 - 20 x 4,6 mm d.i.; 3,5 µm	
Fase móvel	Acetonitrila: água acidificada com ácido acético 0,1 % (60:40 v/v)	
Fluxo	1,2 mL/min	
Volume de injeção	25 µL	
Temperatura	25 °C	
Detector	Fluorescência	
	pH 4,5 e 6,8	pH 1,2
	Excitação: 264 nm	Excitação: 267 nm
	Varredura da emissão: 370-390 nm	Varredura da emissão: 370-390 nm
Tempo de corrida	8 minutos	

## 5.5 Validação do método cromatográfico

### 5.5.1 Seletividade

A condição de degradação alcalina utilizada para avaliação da seletividade ocasionou a completa degradação da candesartana cilexetila, por isso estes resultados não foram aqui apresentados. Os cromatogramas referentes à corrida cromatográfica de metanol, fase móvel e valsartana, estão apresentados juntos na Figura 14. Os demais correspondentes a candesartana cilexetila nos meios biorrelevantes podem ser observados nas Figuras 15, 16 e 17 e suas respectivas análises de pureza são apresentadas na Tabela 15. Já o cromatograma com os excipientes empregados nas formulações é apresentado na Figura 18.

Figura 14- Cromatogramas obtidos da valsartana na concentração de 200 µg/mL (A) e do metanol e fase móvel (B)

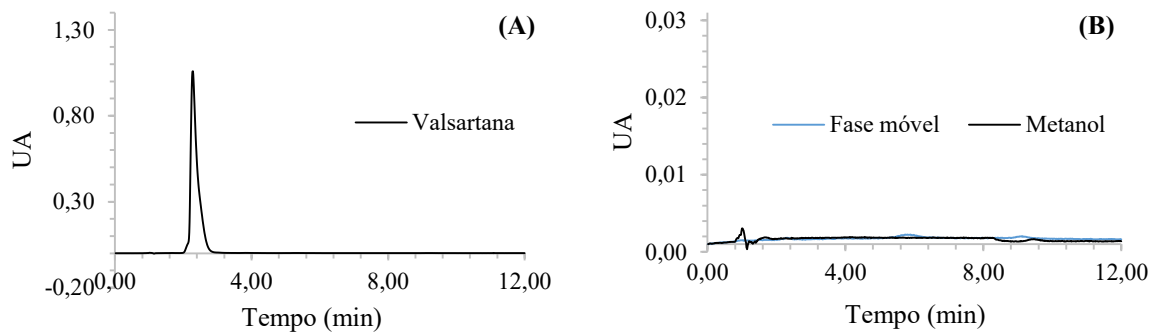
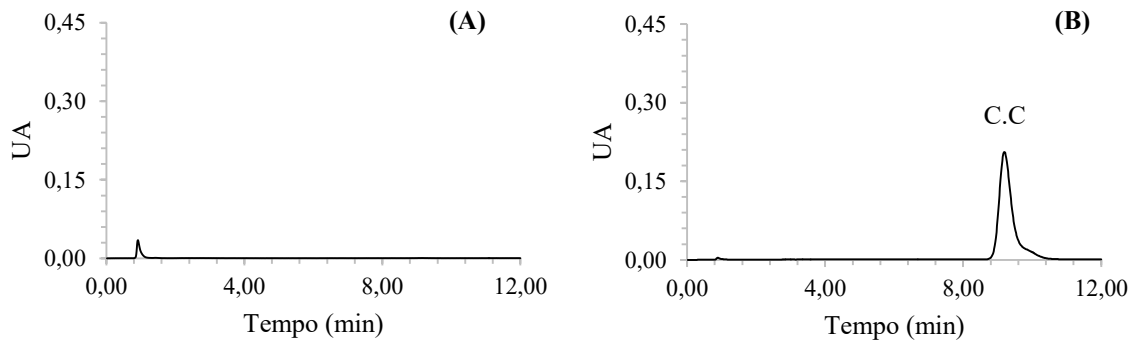


Figura 15- Cromatogramas da candesartana cilexetila (C.C) obtidos no meio pH 1,2, sendo: meio pH 1,2 puro (A), SQR (B), degradação por calor seco (C), degradação ácida (D), mistura da SQR com todos os produtos de degradação (P.D) e a valsartana (E)



*Continua*

Figura 15- (Continuação)

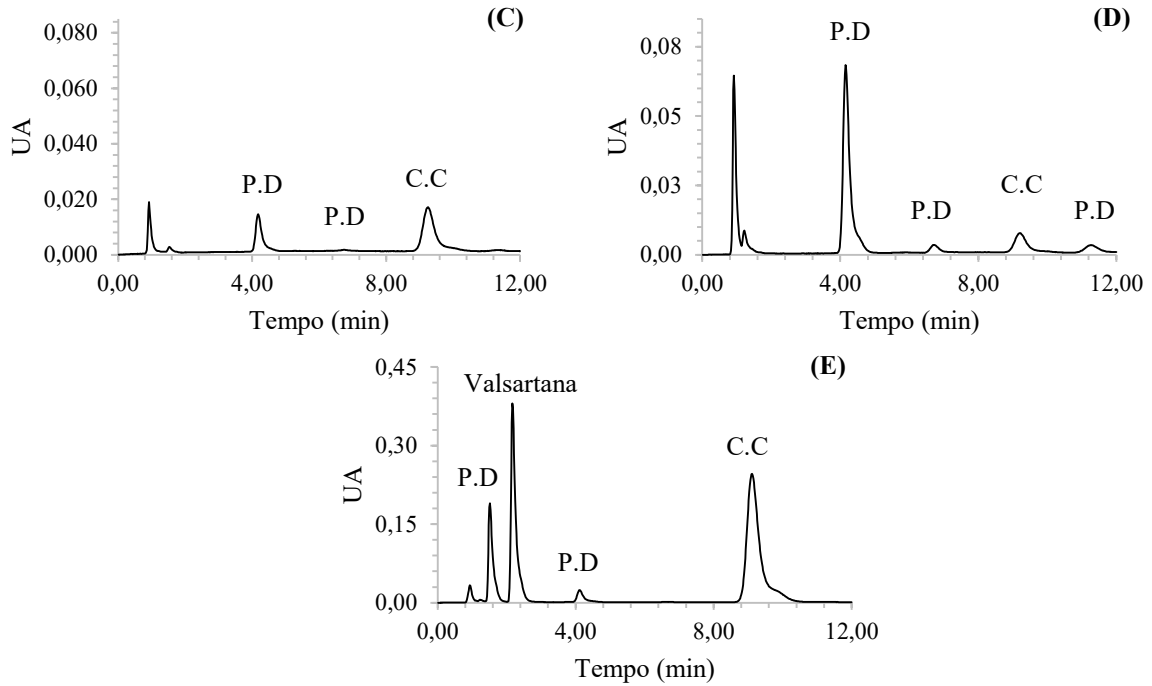


Figura 16- Cromatogramas da candesartana cilexetila (C.C) obtidos no meio pH 6,8, sendo: meio pH 6,8 puro (A), SQR (B), degradação por calor seco (C), degradação ácida (D), mistura da SQR com todos os produtos de degradação (P.D) e a valsartana (E)

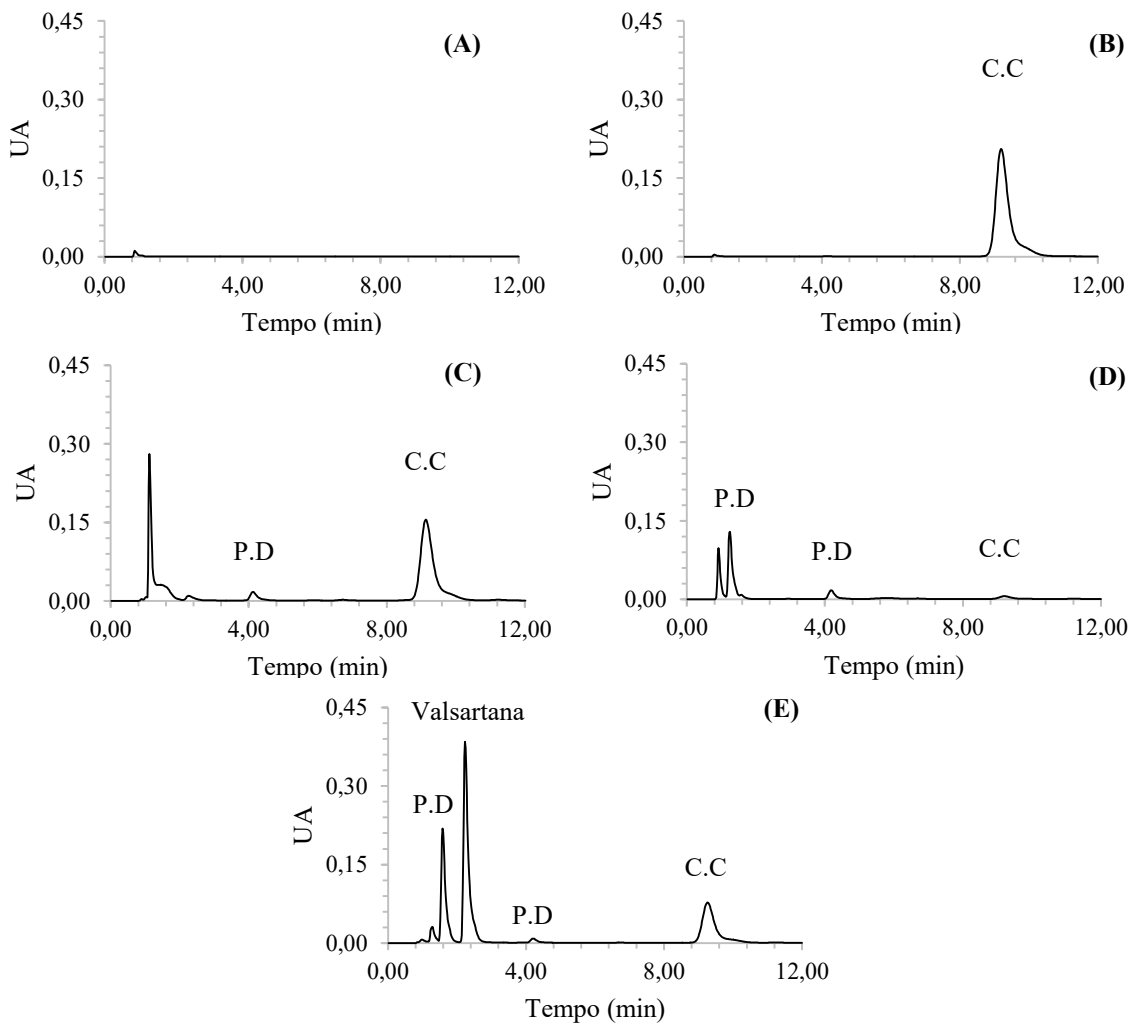


Figura 17- Cromatogramas da candesartana cilexetila (C.C) obtidos no meio pH 6,8 com 0,35% de polissorbato 20, sendo: meio pH 6,8 puro (A), SQR (B), degradação por calor seco (C), degradação ácida (D), mistura da SQR com todos os produtos de degradação (P.D) e a valsartana (E)

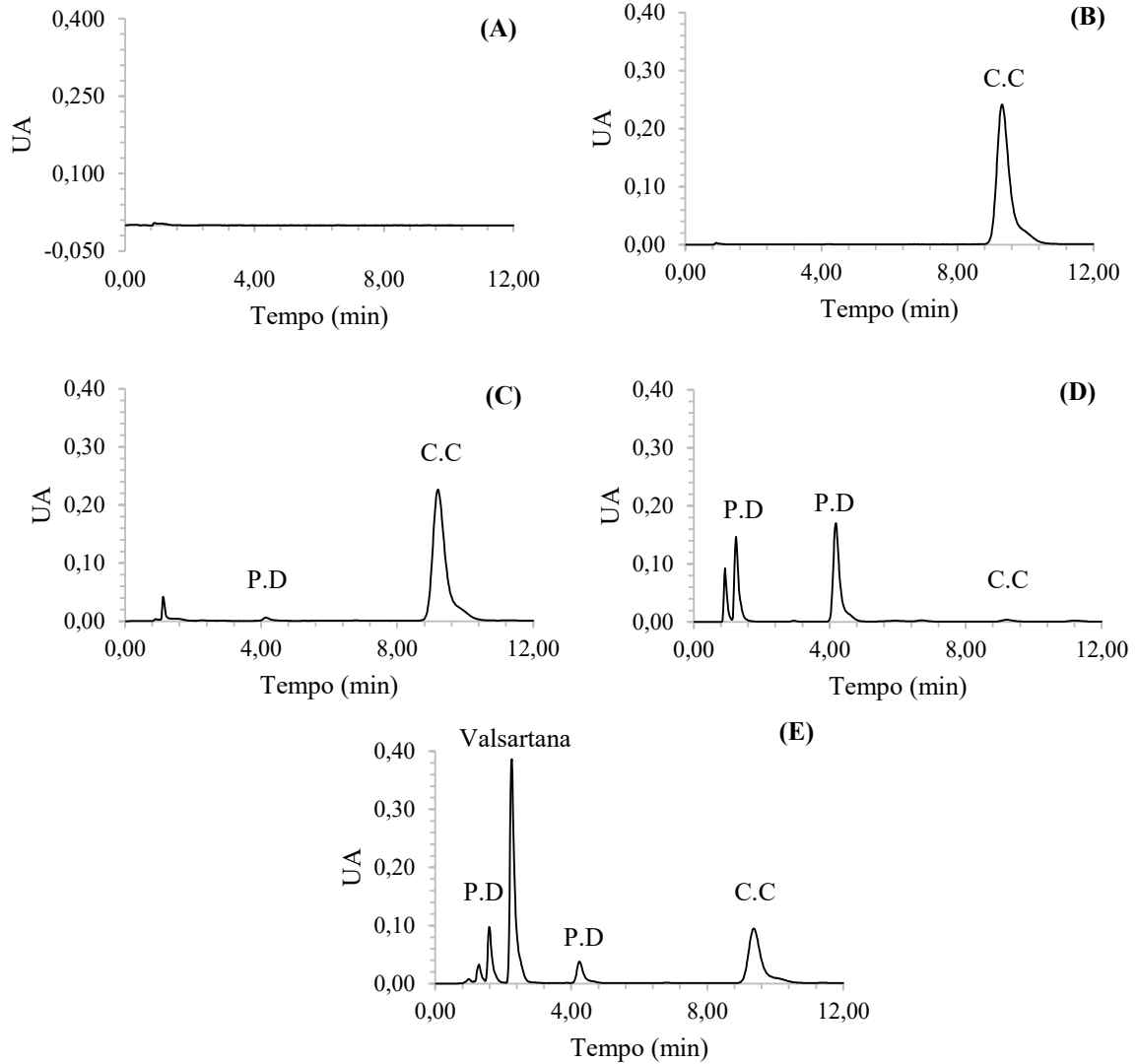


Figura 18- Cromatograma dos excipientes empregados nas formulações de candesartana cilexetila

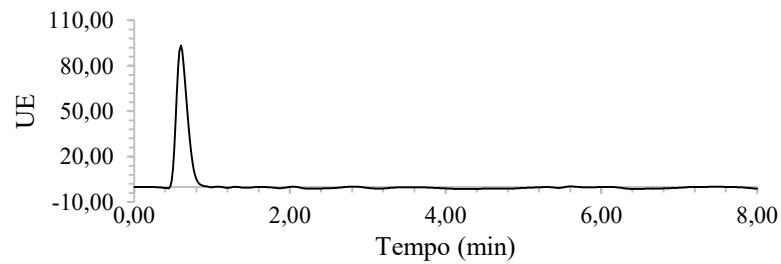


Tabela 15- Análises de pureza do sinal analítico da candesartana cilexetila nos meios biorrelevantes

Meios	Calor seco	Degradação ácida	Mistura de todos os produtos de degradação e a valsartana
pH 1,2	A.P*: 0,438	A.P: 0,775	A.P: 0,050
	L.P**: 0,666	L.P: 0,992	L.P: 0,284
pH 6,8	A.P: 0,078	A.P: 0,907	A.P: 0,109
	L.P: 0,261	L.P: 1,173	L.P: 0,312
pH 6,8 com 0,35 % de polissorbato 20	AP: 0,050	A.P: 1,991	A.P: 0,089
	L.P: 0,287	L.P: 2,363	L.P: 0,292

\*A.P: ângulo de pureza.

\*\* L.P: limite de pureza.

Como pode ser observado o método cromatográfico desenvolvido demonstrou ser seletivo, visto que além de permitir a separação dos produtos de degradação e da valsartana, o pico da candesartana cilexetila mostrou-se puro em todas as condições (Tabela 15). A pureza é comprovada quando o ângulo de pureza (A.P) é inferior ao limite de pureza (L.P).

Os sinais do diluente da SE (metanol), da fase móvel e dos meios biorrelevantes foram consideravelmente baixos e não demonstraram interferir com o pico da candesartana cilexetila. Apesar da intensidade do sinal obtido com os excipientes ser mais alta que nas condições anteriores, estes também não demonstraram comprovada interferência com o sinal analítico do pró-fármaco.

### 5.5.2 Linearidade

As curvas analíticas da candesartana cilexetila nos meios tamponados pH 1,2, 6,8 e 6,8 com 0,35 % de polissorbato 20 estão apresentadas nas Figuras 19, 20 e 21 respectivamente. Os gráficos de resíduos obtidos a partir das regressões lineares nestes mesmos meios estão apresentados nas Figuras 22, 23 e 24.

Figura 19- Curva analítica média (n=3) obtida a partir método cromatográfico desenvolvido para separação e quantificação da candesartana cilexetila no FGSSE (pH 1,2) na faixa de 0,4 a 1,4  $\mu\text{g/mL}$

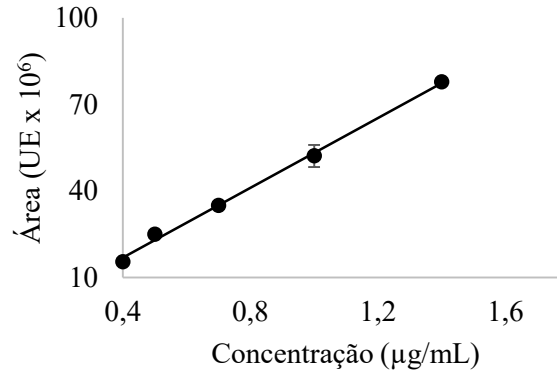


Figura 20- Curva analítica média (n=3) obtida a partir do método cromatográfico desenvolvido para separação e quantificação da candesartana cilexetila no meio tamponado pH 6,8 na faixa de 0,5 a 1,8  $\mu\text{g/mL}$

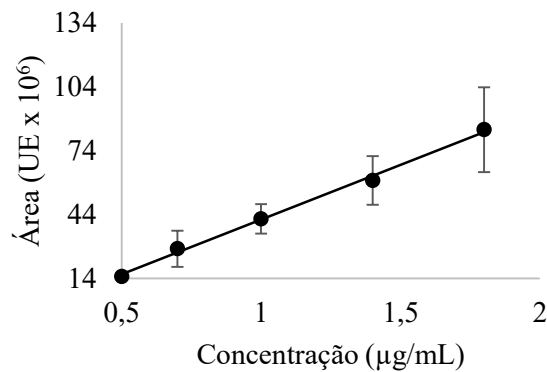


Figura 21- Curva analítica média (n=3) obtida a partir do método cromatográfico desenvolvido para separação e quantificação da candesartana cilexetila no meio tamponado pH 6,8 com 0,35 % de polissorbitato 20 na faixa de 1,0 a 25  $\mu\text{g/mL}$

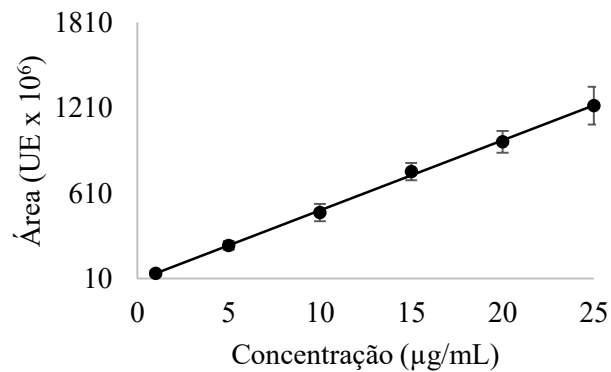




Figura 22- Gráfico de resíduos obtidos a partir da regressão linear do método cromatográfico desenvolvido para separação e quantificação da candesartana cilexetila no FGSSE (pH 1,2)

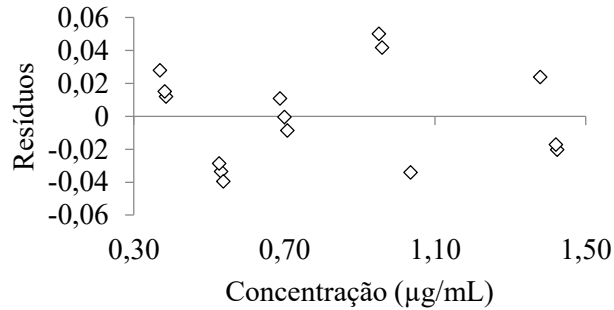


Figura 23- Gráfico de resíduos obtidos a partir da regressão linear do método cromatográfico desenvolvido para separação e quantificação da candesartana cilexetila no meio tamponado pH 6,8

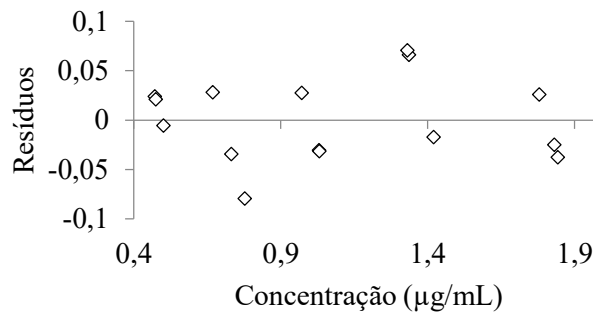
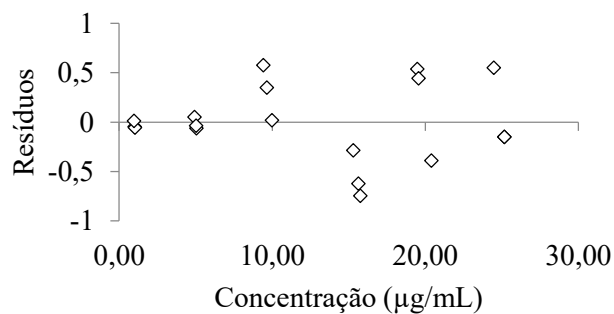


Figura 24- Gráfico de resíduos obtidos a partir da regressão linear do método cromatográfico desenvolvido para separação e quantificação da candesartana cilexetila no meio tamponado pH 6,8 com 0,35 % de polissorbato 20



Por meio da análise visual dos gráficos de resíduos nas Figuras 22, 23 e 24 percebe-se que os pontos estão aleatoriamente distribuídos ao longo do eixo 0, não apresentando tendências. Os demais parâmetros avaliados na linearidade estão na Tabela 16.

Tabela 16- Parâmetros avaliados na linearidade do método cromatográfico desenvolvido para a separação e quantificação da candesartana cilexetila nos meios tamponados pH 1,2, 6,8 e 6,8 com 0,35 % de polissorbatato 20

Parâmetros	Meios tamponados		
	pH 1,2	pH 6,8	pH 6,8 com polissorbatato 20
Equação da reta	$y = 60565679,65x - 7388644,45$	$y = 51470025,47x - 9867632,91$	$y = 49247350,4x - 3929229,55$
Coefficiente de correlação linear (r)	0,9984	0,9983	0,9995
Teste de Cochran-igualdade de variâncias	Calculado:0,3712 Crítico: 0,6840	Calculado:0,3693 Crítico: 0,6840	Calculado: 0,4606 Crítico: 0,6160
Teste F – significância do coeficiente angular	Calculado: 2216,89 Crítico: 6,52E-16	Calculado:1761,16 Crítico: 2,89 E-15	Calculado: 7990,90 Crítico: 5,00 E-23
Coefficiente de determinação (R <sup>2</sup> )	0,9942	0,9927	0,9980

Os coeficientes de correlação linear para todos os meios foram superiores a 0,99, que é o valor mínimo aceitável para este parâmetro (BRASIL, 2003, 2016e).

No teste de Cochran, os valores calculados foram menores que os tabelados (críticos) indicando homogeneidade das variâncias, ou seja, a homocedasticidade (BRASIL, 2016e).

Os resultados calculados no teste F foram superiores aos limites (F crítico), demonstrando que as regressões são significativas e adequadas para quantificar a candesartana cilexetila nos intervalos de concentração adotados (BRASIL, 2016e).

Os valores do coeficiente de determinação foram superiores ao valor de referência, 0,98. Este parâmetro é utilizado para avaliar a eficiência da regressão, valores abaixo de 0,95 indicam que a regressão não é eficiente (CASSIANO et al., 2009).

Os resultados dos parâmetros analisados comprovam que o método cromatográfico desenvolvido apresenta linearidade no intervalo de concentrações escolhido para cada um dos meios biorrelevantes.

### 5.5.3 Precisão

Os resultados da repetibilidade e precisão intermediária são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17- Resultados da repetibilidade e precisão intermediária do método cromatográfico desenvolvido para separação e quantificação da candesartana cilexetila nos meios tamponados pH 1,2, 6,8 e 6,8 com 0,35 % de polissorbato 20

Meio	Concentração teórica (µg/mL)	Repetibilidade		Precisão intermediária	
		Concentração média determinada (n=3) (µg/mL)	DPR (%)	Concentração média determinada (n=6) (µg/mL)	DPR (%)
pH 1,2	0,4	0,39	2,79	0,38	2,46
	0,7	0,68	1,74	0,69	1,99
	1,4	1,40	0,59	1,41	1,18
pH 6,8	0,5	0,53	2,40	0,52	2,56
	1,0	0,96	3,31	0,96	2,14
	1,8	1,81	1,38	1,80	1,23
pH 6,8 com 0,35 % de polissorbato 20	1,0	1,04	2,96	1,02	3,49
	10,0	9,78	2,52	9,73	2,50
	25,0	25,04	0,61	24,99	1,96

A precisão intermediária foi também avaliada pelo teste t de student bicaudal, para tal duas hipóteses foram formuladas, a nula ( $H_0$ ) na qual as médias da precisão obtidas em dias distintos são iguais e a alternativa ( $H_A$ ) na qual as médias são diferentes. Os cálculos envolveram as três concentrações, alta, média e baixa com seis replicatas de cada concentração, sendo estas obtidas em dois dias, ou seja, três replicatas por dia. Os resultados são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18- Resultados do teste t de student para a avaliação da precisão intermediária do método cromatográfico desenvolvido para separação e quantificação da candesartana cilexetila nos meios tamponados pH 1,2, 6,8 e 6,8 com 0,35 % de polissorbato 20

Meio	t calculado	t crítico
pH 1,2	0,02	2,12
pH 6,8	0,04	2,12
pH 6,8 com 0,35 % de polissorbato 20	0,02	2,12

Para todos os meios o método cromatográfico desenvolvido apresentou DPR menor que 5 % que é o valor máximo aceitável segundo a RE 899 de 2003. Além disso, como os valores t calculados foram inferiores aos críticos, não se rejeitou a hipótese nula (GUJARATI, 2006), ou

seja, a precisão obtida em dias diferentes foi considerada igual no nível de 5 % de significância. Desta forma, o método cromatográfico desenvolvido pode ser considerado preciso.

#### 5.5.4 Exatidão

Os resultados da exatidão são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19- Resultados da exatidão do método cromatográfico desenvolvido para separação e quantificação da candesartana cilexetila nos meios tamponados pH 1,2, 6,8 e 6,8 com 0,35 % de polissorbatato 20

Meio tamponado	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração média determinada (n=3) (µg/mL)	Exatidão (%)
pH 1,2	0,4	0,39	96,47
	0,7	0,68	97,29
	1,4	1,40	100,33
pH 6,8	0,5	0,53	105,03
	1,0	0,96	96,23
	1,8	1,81	100,83
pH 6,8 com 0,35 % de polissorbatato 20	1,0	1,04	104,05
	10,0	9,78	97,82
	25,0	25,04	100,15

O método cromatográfico desenvolvido para cada meio tamponado, demonstrou ser exato visto que os resultados de exatidão encontrados estavam dentro da faixa de exatidão adotada (95-105 %) (ERMER; MILLER, 2006; KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007; KUMAR et al., 2012).

#### 5.5.5 Robustez

Os resultados da avaliação da robustez apresentados na Tabela 20 demonstram que mediante as variações dos parâmetros analíticos, o método cromatográfico foi robusto para as alterações na temperatura e na proporção de acetonitrila para os meios tamponados pH 1,2, 6,8 e 6,8 com 0,35 % de polissorbatato 20.

Os demais parâmetros avaliados apresentaram resultados fora do intervalo de exatidão adotado (95,0-105,0 %) (ERMER; MILLER, 2006; KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007;

KUMAR et al., 2012). Assim torna-se fundamental o controle destes parâmetros, principalmente a proporção de ácido acético, cujo erro pode ocorrer durante o preparo da fase móvel e demanda atenção especial do analista. A manutenção das variáveis dentro das condições preconizadas possibilita que haja confiabilidade dos resultados.

Tabela 20- Resultados da robustez para os meios tamponados pH 1,2, 6,8 e 6,8 com 0,35 % de polissorbato 20

Parâmetros	Variações	pH 1,2		pH 6,8		pH 6,8 com polissorbato 20	
		CMD* (n=3) (µg/mL)	Exatidão (%)	CMD (n=3) (µg/mL)	Exatidão (%)	CMD (n=3) (µg/mL)	Exatidão (%)
Volume de injeção (µL)	24	0,98	97,97	1,50	107,18	14,42	96,15
	25	1,01	101,42	1,43	102,18	14,73	98,21
	26	1,05	105,18	1,47	104,89	15,59	103,95
Temperatura (°C)	24	1,00	100,42	1,41	101,04	15,13	100,86
	25	1,01	101,42	1,43	102,18	14,73	98,21
	26	1,01	101,21	1,43	101,93	15,25	101,69
Fluxo (mL/min)	1,1	1,09	108,94	1,54	109,68	16,27	108,45
	1,2	1,01	101,42	1,43	102,18	14,73	98,21
	1,3	0,92	91,79	1,32	94,55	14,32	95,45
Proporção de acetonitrila na fase móvel (%)	59	1,00	100,31	1,42	101,53	15,05	100,31
	60	1,01	101,42	1,43	102,18	14,73	98,21
	61	1,01	101,35	1,44	103,11	15,16	101,07
Porcentagem de ácido acético na fase móvel (%)	0,9	1,12	112,04	1,90	135,47	13,48	89,85
	0,10	1,01	101,42	1,43	102,18	14,73	98,21
	0,11	1,12	112,17	1,68	119,85	14,41	96,08

\*CMD: concentração média determinada.

### 5.5.6 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção estimados foram 0,07 µg/mL para o meio com pH 1,2, 0,08 µg/mL para pH 6,8, e 0,07 µg/mL para pH 6,8 com 0,35 % de polissorbato 20.

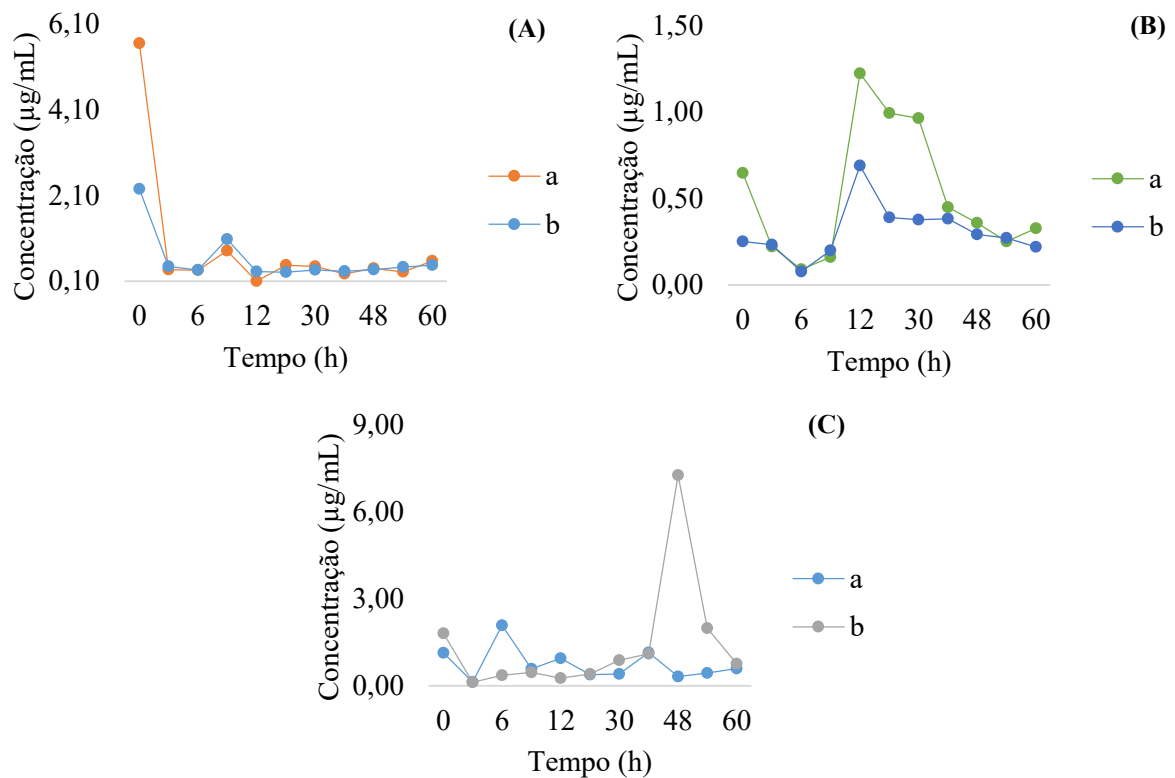
Os limites de quantificação estimados foram 0,24 µg/mL para o meio com pH 1,2, 0,26 µg/mL para pH 6,8, e 0,22 µg/mL para pH 6,8 com 0,35 % de polissorbato 20. Apesar de calculados, estes valores não foram avaliados, por isso considerou-se como limites de quantificação as menores concentrações das curvas analíticas que apresentaram adequadas precisão e exatidão. Sendo elas 0,4 µg/mL para o meio com pH 1,2, 0,5 µg/mL para o meio com pH 6,8 e 1,0 µg/mL para o pH 6,8 com 0,35 % de polissorbato 20.

## 5.6 Estudos de solubilidade da candesartana cilexetila matéria-prima

### 5.6.1 Agitação orbital em frasco

Os resultados encontrados para o primeiro piloto de solubilidade da candesartana cilexetila estão apresentados na Figura 25 (A-C).

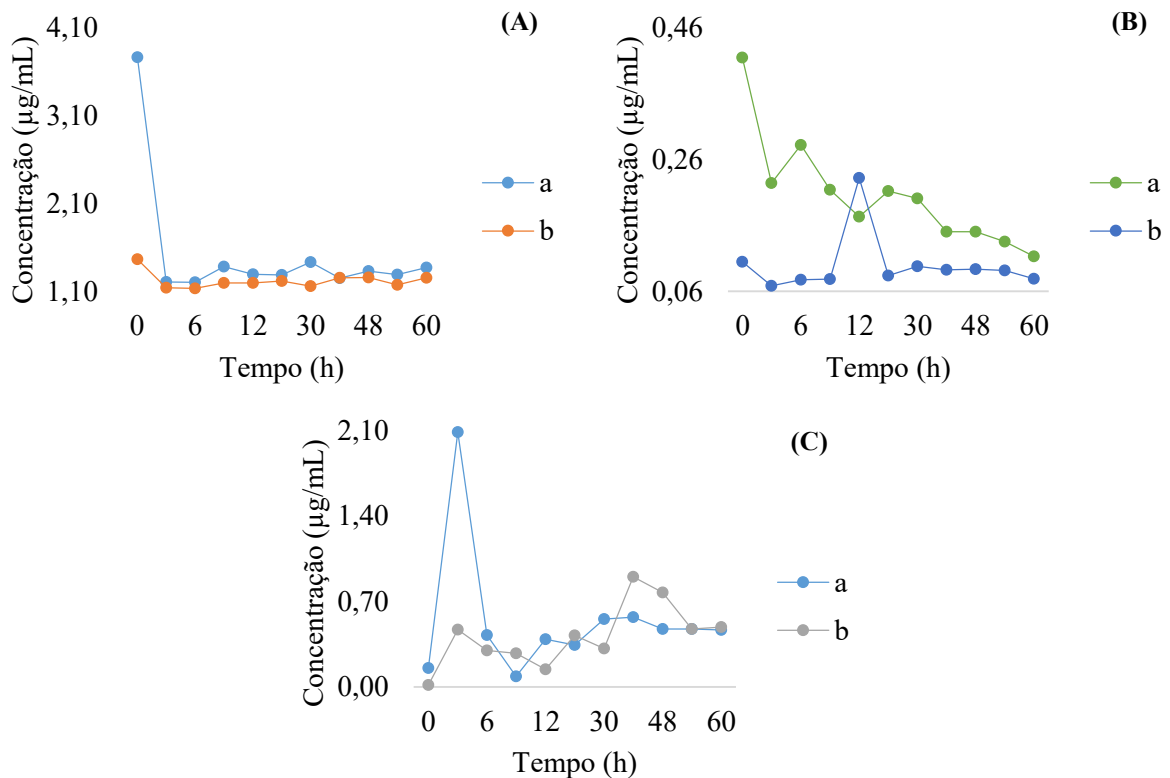
Figura 25- Piloto 1: concentração de candesartana cilexetila versus tempo para cada replicata (a) e (b) nos meios pH 1,2 (A), 4,5 (B) e 6,8 (C)



Como pôde ser observado, houve maior concordância entre os valores de solubilidade em equilíbrio das replicatas (a) e (b) do meio pH 1,2 do que entre as replicatas dos demais meios. Apesar de que o DPR entre as replicatas de todos os meios foi superior aos 5 % preconizado no guia de bioisenção brasileiro (BRASIL, 2011b).

Portanto, por causa dos resultados divergentes entre as replicatas, realizou-se o segundo piloto com uma agitação maior para auxiliar na solubilização do pró-fármaco seguida de duas filtrações para auxiliar a retirada da matéria sólida da amostra. Os resultados encontrados estão dispostos na Figura 26 (A-C).

Figura 26- Piloto 2: Concentração de candesartana cilexetila versus tempo para cada replicata (a) e (b) nos meios pH 1,2 (A), 4,5 (B) e 6,8 (C)



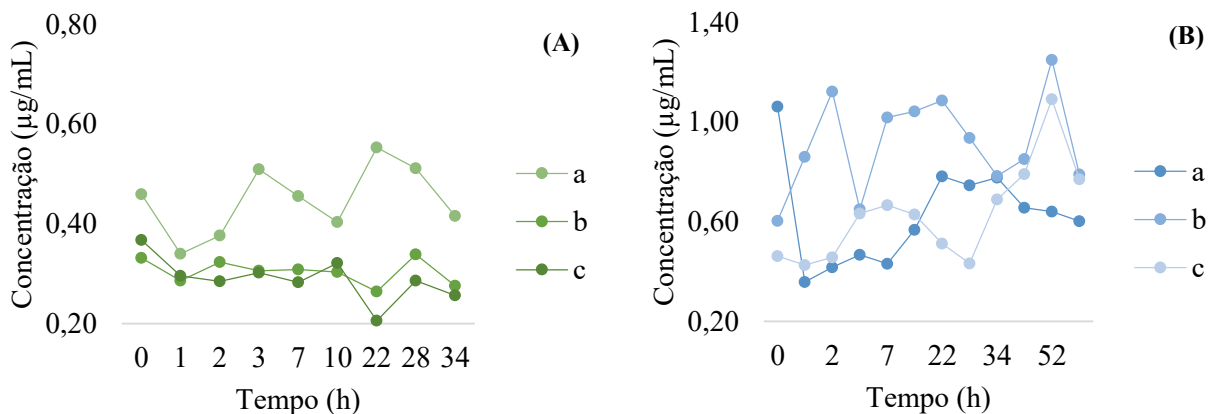
A velocidade de agitação empregada no segundo piloto (150 rpm) e a dupla filtração proporcionaram menor média geral no DPR entre as replicatas dos meios pH 1,2 e 6,8 por isso, estas condições foram mantidas para a realização dos experimentos finais.

A significativa variação no DPR foi também observada por Souza (2015), que avaliou a solubilidade em equilíbrio de outro fármaco da mesma classe terapêutica, a losartana. Foi observada variação acima dos 5 % quando empregando o meio FGSSE (pH 1,2). Para o meio pH 4,5 o valor de solubilidade do fármaco não foi determinado pois, pequenas quantidades de soluto foram suficientes para a formação de uma solução turva. Foi também observada variação nos valores de solubilidade após 6 horas de experimento, o que foi posteriormente demonstrado ter sido causado pela baixa solubilidade do fármaco no meio. Já para o pH 6,8 a losartana apresentou comportamento de alta e baixa solubilidade em função da quantidade de excesso de fármaco adicionada.

Pelo fato da candesartana cilexetila ter apresentado características semelhantes a losartana no pH 4,5, sendo encontrado neste meio os menores valores de solubilidade, em torno de 0,23 µg/mL e a maior discrepância entre as replicatas, optou-se por não prosseguir com os estudos neste tampão.

Para a realização dos testes da solubilidade em equilíbrio utilizando triplicatas, a quantidade de matéria-prima utilizada teve que ser elevada para 1,0 mg, por ser o menor valor que poderia ser pesado com exatidão. Os resultados médios obtidos estão apresentados na Figura 27 (A-B). Como pode ser observado o DPR para todas as amostras continuou alto, superior a 5 %.

Figura 27- Solubilidade em equilíbrio obtida em triplicata para a candesartana cilexetila nos meios pH 1,2 (A) e 6,8 (B)



Segundo Monteiro (2004) um fator que pode influenciar o DPR para fármacos de baixa solubilidade é a quantidade em excesso de pó adicionado ao meio. A autora observou que quando utilizado um grande excesso de fármaco o DPR foi superior a 10 %, já quando o excesso foi reduzido, o DPR obtido foi de 5 %.

O excesso de matéria-prima normalmente empregado é 10 % superior ao valor de solubilidade do fármaco em determinado meio, sendo que, para fármacos de baixa solubilidade é sugerido que o excesso seja reduzido para evitar a ocorrência de erros analíticos (BRASIL, 2016c). Considerando os valores de solubilidade encontrados nos testes piloto, o excesso de candesartana cilexetila empregado foi superior aos 10 %. Porém foi empregada a menor quantidade possível de massa que poderia ser pesada com adequada exatidão.

Além do excesso de pó, outro fator que pode ter exercido influência nos resultados é a baixa molhabilidade da candesartana cilexetila, que se manteve na superfície dos meios tamponados. É possível que durante a coleta das alíquotas pequenas quantidades de pó na superfície tenham sido coletadas, interferindo nos resultados, fato este já relatado por outros pesquisadores (MONTEIRO, 2014; RAGHAD; HIND, 2015).

Por isso, o ensaio foi realizado novamente com um único ponto de coleta, determinado em 3 horas para o pH 1,2 e em 32 horas para o pH 6,8, de acordo com os resultados do teste de



estabilidade da candesartana cilexetila nos meios tamponados. Os resultados estão apresentados na Tabela 21 e como pode ser observado, o DPR encontrado foi inferior ao 5 % preconizado (BRASIL, 2011b), demonstrando que a divergência entre as amostras estava relacionada à baixa molhabilidade da candesartana cilexetila e as sucessivas coletas realizadas em busca da determinação do tempo onde o equilíbrio ocorre.

Tabela 21- Solubilidade em equilíbrio média (n=3) da candesartana cilexetila nos meios tamponados pH 1,2 e 6,8

Meio	Solubilidade média (n=3) (µg/mL)	DPR (%)
pH 1,2	0,42	0,49
pH 6,8	0,66	0,89

Então de acordo com os ensaios realizados a solubilidade em equilíbrio da candesartana cilexetila foi de 0,42 µg/mL no pH 1,2 e de 0,66 µg/mL no pH 6,8. A razão dose/solubilidade calculada para cada um destes meios foi respectivamente 76.190,48 mL, e 48.484,85 mL.

Como neste estudo a razão dose/solubilidade foi maior que 250 mL nos meios avaliados pode-se afirmar que, nas condições experimentais empregadas, a candesartana cilexetila pode ser classificada como de baixa solubilidade pelo SCB (BRASIL, 2011b; EMA, 2010; FDA, 2015; HEALTH CANADA, 2014; WHO, 2015).

Dos estudos de solubilidade em equilíbrio presentes na literatura, Tabela 2, o único voltado para a classificação biofarmacêutica da candesartana cilexetila foi o realizado por Darwhekar, Jain e Chouhan (2012). Estes autores também a classificaram como de baixa solubilidade pelo SCB, apesar dos valores relatados serem significativamente superiores aos encontrados neste trabalho.

Ainda com relação aos dados da literatura, nota-se que os valores de solubilidade em equilíbrio da candesartana cilexetila relatados na Tabela 2 são divergentes entre si e entre os encontrados neste trabalho, fato correlacionável as diferentes condições experimentais empregadas, descritas a seguir.

## I. Meios tamponados

Apesar dos meios tamponados possuírem valores de pH semelhantes, a composição e a molaridade, quando relatada, não foi exatamente a mesma utilizada neste trabalho. Os meios

tamponados considerados adequados para o uso em ensaios de solubilidade são os descritos na Farmacopeia Brasileira ou em outros compêndios oficiais como a Farmacopeia Americana (USP) (BRASIL, 2011b; FDA, 2015). Sendo estes os meios utilizados neste trabalho.

Além disso, é conhecido que a solubilidade de um fármaco em soluções de mesmo pH pode ser bem diferente de acordo com a composição do meio (KERNS; DI, 2008), tornando assim difícil realizar uma comparação precisa entre os resultados.

## **II. Agitação e equipamentos**

Nenhum dos autores citados na Tabela 2 especificou a velocidade de agitação empregada e diferentes equipamentos, quando relatados, foram utilizados (agitador mecânico e banho com agitação) (DARWHEKAR; JAIN; CHOUHAN, 2012; HASSAN et al., 2015).

No entanto, é desaconselhável que o ensaio de solubilidade seja realizado em cubas de dissolução, agitadores magnéticos ou outros equipamentos que não são capazes de proporcionar agitação adequada ao volume de meio empregado assim como a manutenção da temperatura durante todo o tempo de realização do ensaio. Neste trabalho foi utilizado o equipamento recomendado pela Anvisa, a incubadora com plataforma de agitação orbital (BRASIL, 2013b). Este equipamento permite o aquecimento homogêneo dos frascos e manutenção adequada da temperatura ( $37,0 \pm 0,5$  °C) além de controle da velocidade de agitação (DEZANI et al., 2013). Assim as condições experimentais se mantiveram constantes ao longo dos ensaios.

## **III. Métodos de quantificação e duração do ensaio de solubilidade em equilíbrio**

Dois métodos analíticos foram utilizados para a quantificação da candesartana cilexetila nos ensaios de solubilidade em equilíbrio encontrados na literatura, a espectrofotometria UV e a CLAE.

Torna-se claro ao se observar os valores de solubilidade relatados, que estes foram superiores quando obtidos pela espectrofotometria UV (DARWHEKAR; JAIN; CHOUHAN, 2012; HASSAN et al., 2015) em comparação a CLAE (HOPPE; SZNITOWSKA, 2014). O que pode ser relacionável com a seletividade dos métodos. A CLAE possui maior seletividade devido ao fundamento da técnica que é a separação de componentes da amostra em razão de sua afinidade entre a fase móvel e a fase estacionária. Já na espectrofotometria, todas as substâncias presentes na amostra que apresentam absorvidade próxima ou a mesma do

comprimento de onda selecionado para o analito em questão, são lidas (OLIVEIRA et al., 2010).

O tempo de duração dos ensaios também deve ser ressaltado. A solubilidade em equilíbrio de um fármaco deve ser determinada considerando a sua estabilidade no meio tamponado. A maioria dos autores utilizou o tempo de 24 horas para a quantificação da candesartana cilexetila em todos os meios, entretanto como demonstrando neste trabalho, item 5.8, o pró-fármaco é estável no pH 1,2 somente até 3 horas. Assim, neste trabalho foi considerado este dado de estabilidade da candesartana cilexetila para determinar a duração do ensaio de solubilidade em equilíbrio.

#### **IV. Valores de solubilidade encontrados**

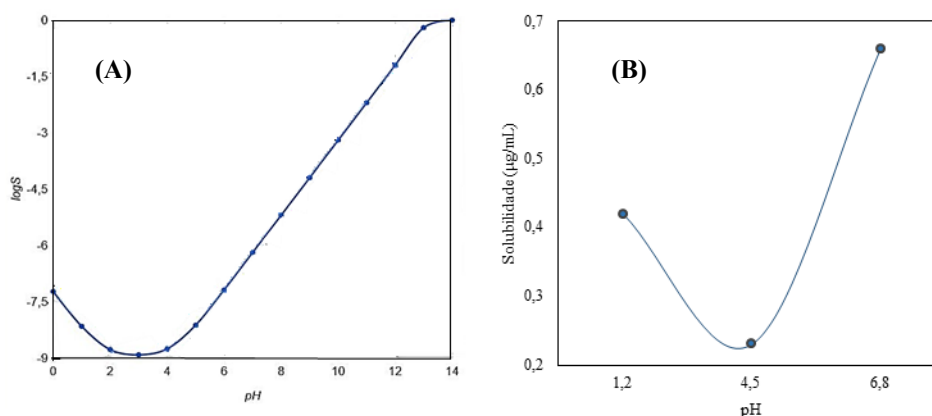
Como já mencionado, os valores de solubilidade em equilíbrio da candesartana cilexetila relatados na literatura e os encontrados neste trabalho são diferentes. Assim, neste aspecto, torna-se importante destacar um fator que pode estar relacionado a esta diferença, que é a forma polimórfica utilizada nos ensaios. Em nenhum dos trabalhos citados na Tabela 2 a forma polimórfica utilizada foi descrita e como polimorfos possuem distintas propriedades físico-químicas, como estabilidade química, ponto de fusão e solubilidade (ARAÚJO et al., 2012; ZHANG, 2004; VIPPAGUNTA; BRITAIN; GRANT, 2001), torna-se relevante a identificação do polimorfo utilizado nos ensaios. Neste trabalho, a forma polimórfica utilizada para determinar a solubilidade em equilíbrio foi identificada como sendo a forma I da candesartana cilexetila, a mesma empregada na fabricação do medicamento referência, Atacand® (ASTRAZENCA, 2015).

Nos trabalhos encontrados na literatura (DARWHEKAR; JAIN; CHOUHAN, 2012; HASSAN et al., 2015; HOPPE; SZNITOWSKA, 2014) a solubilidade da candesartana cilexetila é relatada como dependente do pH, sendo crescente a partir de meios com pH mais baixos,  $\text{pH } 1,2 < \text{pH } 4,5 < \text{pH } 6,8$ . Porém neste trabalho, o menor valor de solubilidade foi observado no meio tamponado de pH 4,5. O que também foi notado por Souza (2015) com o fármaco losartana.

Este comportamento é previsto e comparável com a solubilidade intrínseca ( $\log S$ : logaritmo da concentração em mol/L) da candesartana cilexetila estimada *in silico*. Na Figura 28 são apresentados dois gráficos, o primeiro (A) correlaciona o  $\log S$  da candesartana cilexetila em função do pH calculado por modelo computacional (CHEMAXON, 2015) e ao seu lado, o gráfico com a solubilidade em equilíbrio determinada experimentalmente neste trabalho (B). O

log S foi calculado considerando a contribuição de cada fragmento da molécula na solubilidade aquosa. Este modelo computacional foi desenvolvido a partir do método proposto por Hou e colaboradores (2004).

Figura 28- Solubilidades da candesartana cilexetila em função do pH: dados *in silico* (A) e experimentais (B)

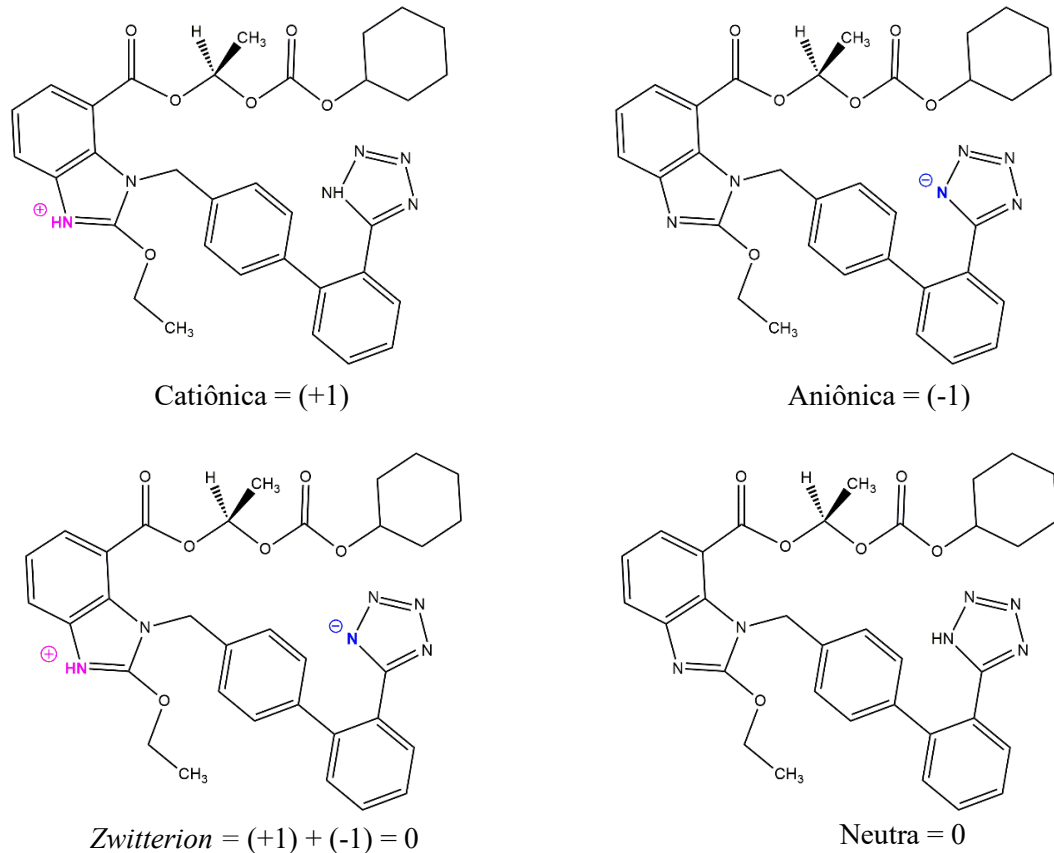


Fonte: Adaptado de ChemAxon, 2015 (A) e autoria própria (B).

Valores acima de -1 indicam moléculas muito polares (JORGENSEN; DUFFY, 2002), ou seja, na Figura 28 (A) quanto mais próximo a zero o log S for, maior a solubilidade da candesartana cilexetila. Nos dois gráficos (A e B), observa-se o mesmo comportamento entre os valores previstos e os experimentais, sendo a solubilidade crescente nos valores de pH:  $4,5 < 1,2 < 6,8$ . Fato explicável pela porcentagem de ionização da candesartana cilexetila em cada pH. Para sua demonstração, foi também calculada a porcentagem de cada macro espécie do pró-fármaco nos valores de pH: 1,2, 4,5 e 6,8. Segundo os modelos computacionais empregados, são 4 as principais macro espécies encontradas e 3 as possíveis cargas, Figura 29 (ACD, 2016; CHEMAXON, 2013).

Estas macro espécies são correlacionáveis com os resultados das análises da estrutura eletrônica da candesartana cilexetila, discutida no item 5.7, visto que segundo estas análises, os dois grupos mais propensos a reagir quimicamente são: o benzimidazol e o tetrazol-bifenil. Estes grupos possuem a tendência de doar elétrons e receber elétrons, ou seja, se comportam como base e ácido de Lewis respectivamente.

Figura 29- Macro espécies da candesartana cilexetila e respectivas cargas determinadas *in silico*



Fonte: Adaptado de ACD, 2016.

A porcentagem de cada macro espécie distribuída em função da carga da molécula está descrita na Tabela 22. Considerando que a forma carregada do fármaco é mais solúvel que sua forma neutra (KERNS; DI, 2008), a solubilidade da candesartana cilexetila nos meios tamponados pode ser explicada pela porcentagem de moléculas ionizadas em função do pH. Sendo esta relação crescente a partir do meio tamponado pH 4,5 com 64,88 %, no pH 1,2 com 76,6 % e no pH 6,8 com 99,73 % (CHEMAXON, 2013).

Tabela 22- Porcentagem das macro espécies de candesartana cilexetila determinada *in silico* para os meios tamponados: pH 1,2, 4,5 e 6,8

pH	Macro espécies (%)		
	(-1)	(0)	(+1)
1,2	0,02	22,98	76,60
4,5	64,88	35,06	0,06
6,8	99,73	0,27	0,00

Fonte: Adaptado de ChemAxon, 2013.

### 5.6.2 Dissolução intrínseca

A velocidade da dissolução intrínseca é calculada com base nos valores de inclinação da reta obtidos a partir da construção da curva analítica da quantidade dissolvida de fármaco em função do tempo. Porém, o seu cálculo não foi possível, pois a quantidade dissolvida em cada meio se manteve constante durante todo o ensaio, Tabela 23. Além disso, observa-se que nos ensaios 1 e 2, considerando a massa utilizada (300 mg) e o volume de meio (900 e 500 mL respectivamente), a quantidade dissolvida foi maior no ensaio 1 do que no ensaio 2.

Tabela 23- Quantidade dissolvida nos testes de dissolução intrínseca da candesartana cilexetila nos meios tamponados

Ensaio	Quantidade dissolvida nos meios tamponados (%)
1	pH 1,2: 0,30
	pH 4,5: 0,09
	pH 6,8: 0,21
2	pH 1,2: 0,07
	pH 6,8: 0,08
3	pH 1,2: 0,21

Ambos os eventos podem estar relacionados a baixa solubilidade da candesartana cilexetila e conseqüentemente a ausência da condição *sink* nos meios tamponados testados, que por estarem saturados, possivelmente, afetaram a dissolução do compacto. A condição *sink* é definida como o mínimo de 3 vezes o volume de meio necessário para se obter uma solução saturada do fármaco (STORPIRTIS et al., 2009). Portanto, não foi possível determinar por este método a solubilidade da candesartana cilexetila nos meios tamponados.

## 5.7 Análises eletrônicas da candesartana cilexetila e candesartana

As Figuras 31 e 32 apresentam os orbitais HOMO e LUMO calculados para a candesartana cilexetila e as Figuras 33 e 34 os orbitais HOMO e LUMO calculados para a candesartana. As setas azuis indicam o vetor do momento dipolo elétrico total das moléculas. Para facilitar o entendimento, as fórmulas estruturais da candesartana e candesartana cilexetila são reapresentadas na Figura 30.

Figura 30- Fórmulas estruturais da candesartana e candesartana cilexetila

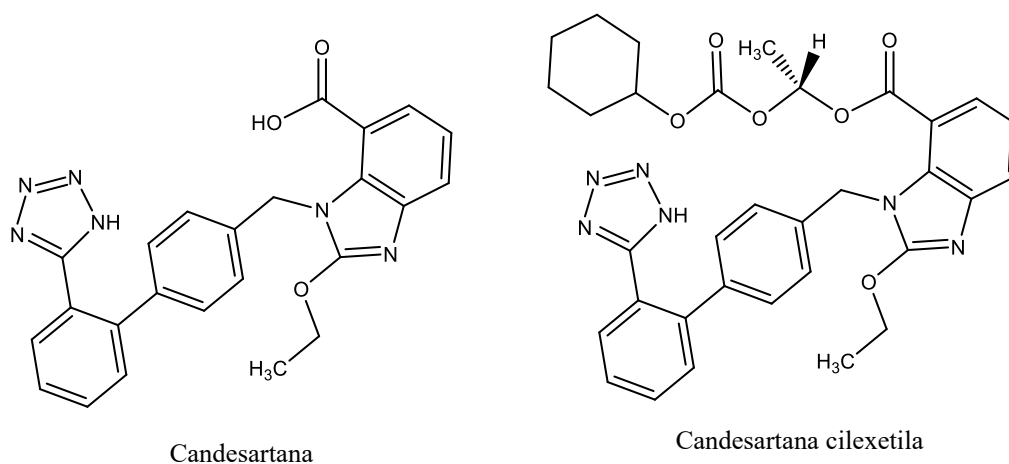


Figura 31- Orbital molecular HOMO da molécula de candesartana cilexetila calculado usando o funcional híbrido B3LYP e o conjunto de bases gaussianas 6-31G (2d,2p)

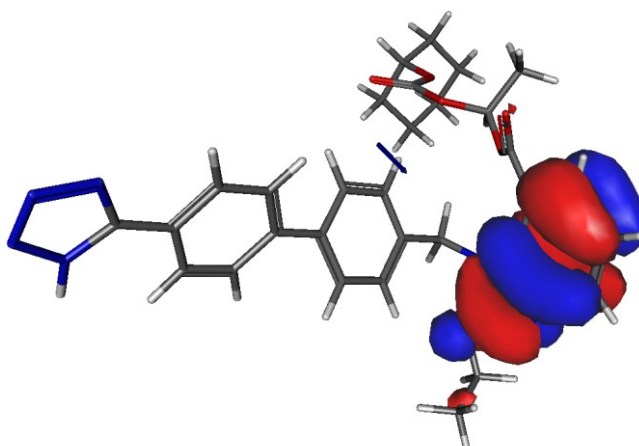


Figura 32- Orbital molecular LUMO da molécula de candesartana cilexetila calculado usando o funcional híbrido B3LYP e o conjunto de bases gaussianas 6-31G (2d,2p)

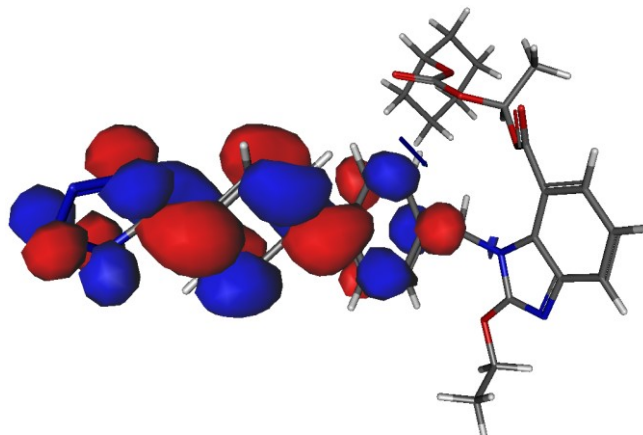


Figura 33- Orbital molecular HOMO da molécula de candesartana calculado usando o funcional híbrido B3LYP e o conjunto de bases gaussianas 6-31G (2d,2p)

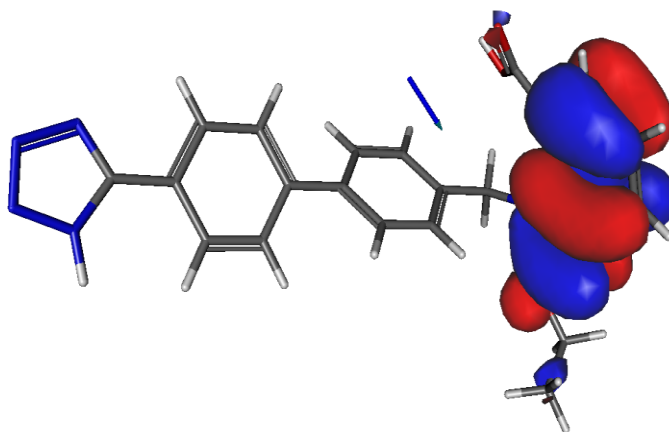
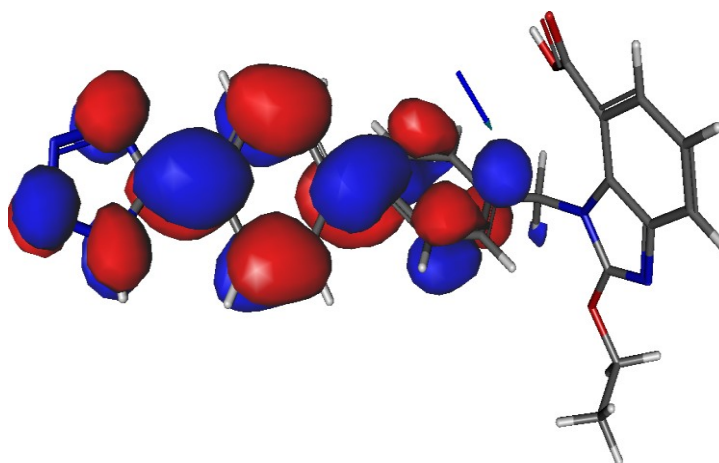


Figura 34- Orbital molecular LUMO para molécula de candesartana usando o funcional híbrido B3LYP e o conjunto de bases gaussianas 6-31G (2d,2p)



Como pôde ser observado, a densidade eletrônica do orbital molecular HOMO da candesartana cilexetila se distribui apenas sobre o grupo benzimidazol (Figura 31). Esta é a região que possui maior probabilidade de reagir com grupos eletrofílicos, isto é, que apresentam



maior deficiência de elétrons. Já a representação do orbital molecular LUMO da candesartana cilexetila (Figura 32) indica que o grupo tetrazol-bifenil possui a tendência de atrair grupos nucleofílicos, ou seja, que possuem maior densidade eletrônica.

As análises dos orbitais moleculares de fronteira para a candesartana (Figuras 33 e 34) demonstram que a distribuição eletrônica é idêntica à estimada para a candesartana cilexetila. Sabendo-se que os grupos insaturados apresentam baixa reatividade, pode-se inferir que ambos os compostos são idênticos sob ponto de vista de sua estrutura eletrônica.

Foram também calculadas as susceptibilidades da candesartana cilexetila e da candesartana à adição eletrofílica (Figura 35) e nucleofílica (Figura 36) empregando as funções de Fukui. Estas funções são aproximações que estimam a reatividade química das moléculas. Uma boa aproximação para a representação das funções de Fukui são os quadrados dos orbitais moleculares de fronteira que são definidas como  $f^- \approx |\phi_{HOMO}|^2$  e  $f^+ \approx |\phi_{LUMO}|^2$ . Dessa forma o descritor dual ( $f^2$ ) pode ser calculado a partir da equação  $f^2 \approx |\phi_{LUMO}|^2 - |\phi_{HOMO}|^2$ .

Figura 35- Suscetibilidade eletrofílica do orbital molecular estimada para a candesartana cilexetila e candesartana

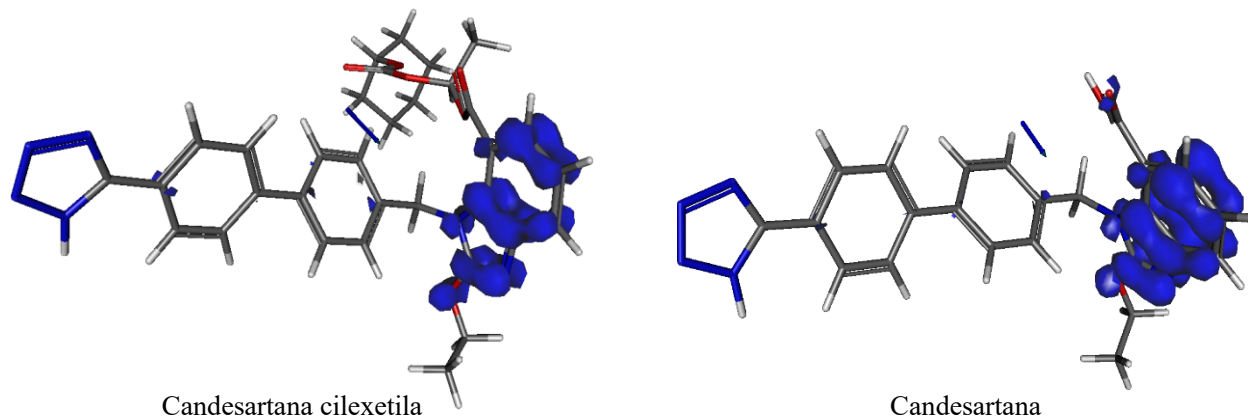
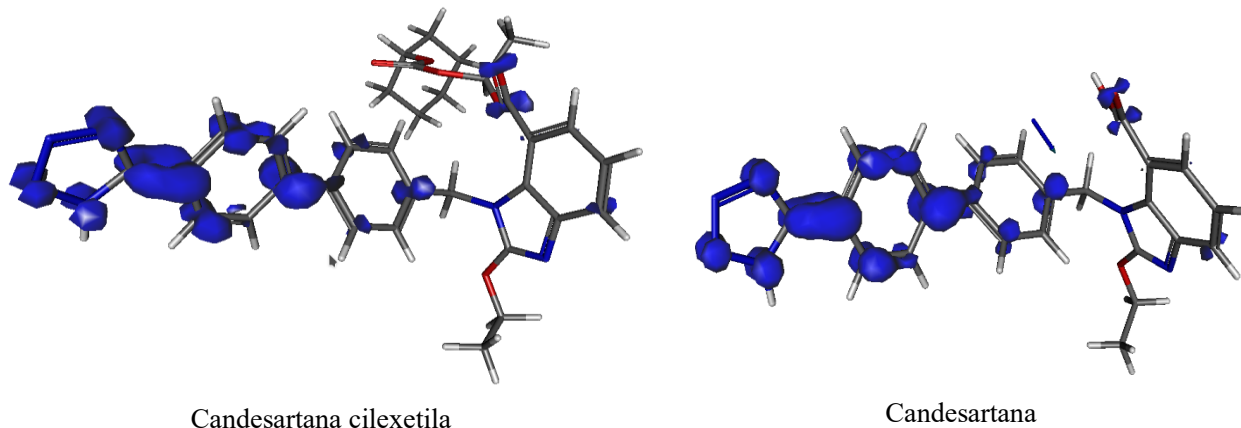


Figura 36- Suscetibilidade nucleofílica do orbital molecular estimada para a candesartana cilexetila e candesartana

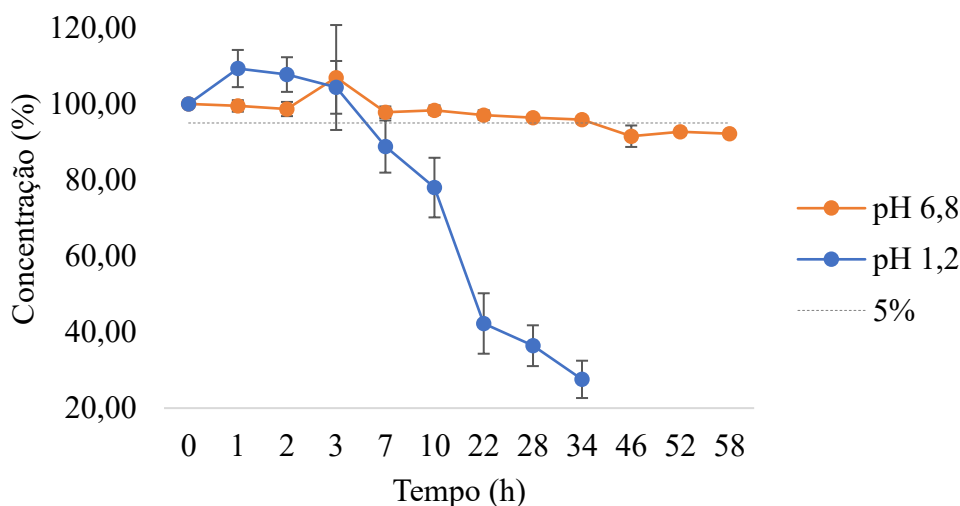


A partir das estimativas do descritor dual sobre as suscetibilidades eletrofílicas ( $f^-$ ) nucleofílicas ( $f^+$ ) para as moléculas em estudo, pode-se inferir que tanto na candesartana cilexetila quanto na candesartana os anéis do benzimidazol são os mais propensos a doar elétrons enquanto que o grupo tetrazol-bifenil é o que possui maior tendência a receber elétrons. Estes dois grupos então se comportam respectivamente como base e ácido de Lewis, e, são os principais responsáveis pela interação da candesartana cilexetila e sua forma ativa nos meios aquosos tamponados e consequente solubilização.

### 5.8 Estabilidade da candesartana cilexetila nos meios biorrelevantes pH 1,2 e 6,8

De acordo com o FDA (2015) considera-se que o fármaco é potencialmente instável quando sua degradação nos meios biorrelevantes a 37,0 °C é superior a 5 %. Assim, a estabilidade da candesartana cilexetila nos meios pH 1,2 e pH 6,8, apresentada na Figura 37, foi calculada empregando a variação das concentrações (teor) em função do tempo, permitindo assim mensurar a porcentagem de perda, ou seja, o quanto do pró-fármaco degradou. Observa-se que o pró-fármaco foi estável no meio pH 1,2 até 3 horas, com 7 horas a porcentagem de degradação foi 11,20 % e no meio pH 6,8 a candesartana cilexetila demonstrou ser estável até 34 horas, com 46 horas o decréscimo na concentração foi 8,48 %.

Figura 37- Avaliação da estabilidade por meio da variação na concentração (%) média (n=3) da candesartana cilexetila nos meios pH 1,2 e pH 6,8



No meio pH 1,2, notou-se a partir de 3 horas um pequeno pico entre 2 e 3 minutos, que, com o passar do tempo, adquiriu uma área maior, enquanto a área correspondente a candesartana cilexetila foi reduzida, Figura 38. O pico que surgiu pode ser um produto de degradação da candesartana cilexetila ou a forma ativa, a candesartana. A segunda hipótese poderia ser explicada pelo fato de que a reação de esterificação é reversível, e que a reação inversa, a hidrólise do éster é favorecida pelo excesso de água e presença de catalisadores como o HCl (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012; SOLOMONS; FRYLE, 2011) presente no tampão do meio pH 1,2. Os mecanismos simplificados destas reações são apresentados na Figura 39. Porém, a confirmação seria somente possível por meio da comparação do tempo de retenção com a SQR da candesartana.

Figura 38- Cromatogramas do estudo de estabilidade da candesartana cilexetila no FGSSE (pH 1,2) nos tempos de 3 (A) e 34 horas (B)

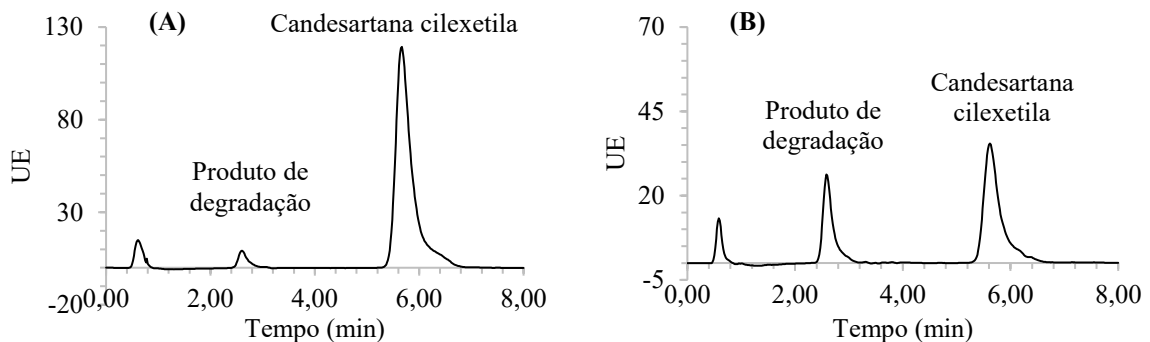
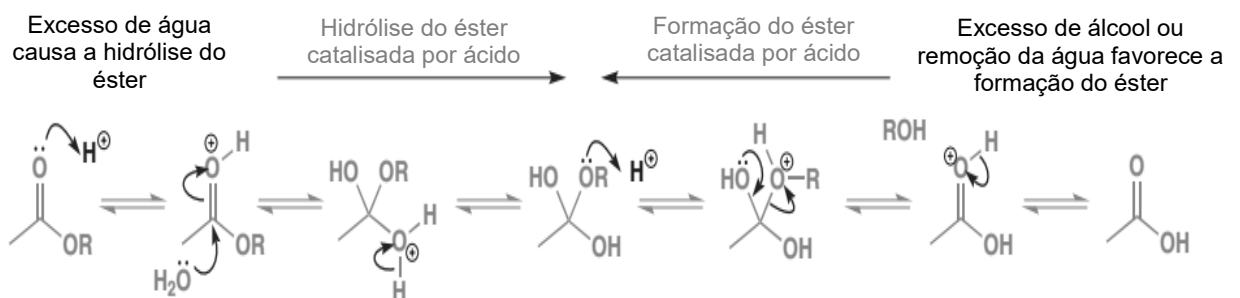


Figura 39- Mecanismos de hidrólise e esterificação de ésteres catalisadas por ácido



Fonte: Adaptado de CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012.

Esta maior instabilidade em meios ácidos foi também observada por Hoop e Sznitowska (2014) que avaliaram a estabilidade da candesartana cilexetila nos meios tamponados: pH 1,2 (0,1 mol/L de HCl), 4,5, 6,5 e 7,4 (tampão fosfato 0,05 mol/L). Os autores

observaram que após 24 horas a 37,0 °C o teor de candesartana cilexetila no pH 1,2 foi reduzido para 37,0 % do valor inicial e para o pH 7,4, sob as mesmas condições, o teor observado foi 83,5 % do valor inicial. Já para a temperatura, um aumento de 4,0 °C para 37,0 °C resultou em elevação na constante de velocidade de degradação de 4,4 vezes para 6,6 vezes dependendo do meio. Demonstrando assim que a velocidade de degradação da candesartana cilexetila aumenta com a diminuição do pH e com o aumento da temperatura.

No entanto, esta instabilidade da candesartana cilexetila a partir de 3 horas não seria preocupante pois, a absorção do fármaco a partir da forma farmacêutica comprimidos administrada por via oral, será dependente do tempo de esvaziamento gástrico que varia de 5 minutos a 2 horas dependendo do estado fisiológico (jejum ou alimentado) (AULTON; TAYLOR, 2013).

## **5.9 Avaliação dos medicamentos contendo candesartana cilexetila**

### **5.9.1 Medicamentos disponíveis comercialmente e seus excipientes**

Comercialmente disponíveis no mercado nacional existem 15 medicamentos, sob a FFSOLI, contendo candesartana cilexetila na dose de 16 mg (CMED, 2016). Na Tabela 24, estes medicamentos são relatados juntamente com seus excipientes. Os similares e genéricos da mesma indústria farmacêutica por possuírem os mesmos excipientes foram citados uma única vez na tabela.

Os medicamentos disponíveis não possuem os excipientes que conhecidamente afetam a biodisponibilidade do fármaco relatados na RDC 37 de 2011. Porém, o polietilenoglicol (PEG) por possuir relatado efeito de inibição da glicoproteína P (P-gp) (GOOLE et al., 2010) poderia interferir na permeabilidade da candesartana cilexetila, que é substrato desta proteína que atua como um transportador de efluxo (secreção) (GURUNATH; NANJWADE; PATILA, 2014), contribuindo assim para aumentar sua absorção por se ligar e inibir a atuação da P-gp sobre o pró fármaco. Segundo a RDC nº 37 de 2011, quando há a presença de excipientes que comprovadamente afetam a biodisponibilidade no medicamento candidato a bioisenção, estes devem ser os mesmos do medicamento referência e estar em quantidades compatíveis com a função pretendida na forma farmacêutica. O PEG está presente no medicamento de referência do Brasil (Atacand<sup>®</sup>) e nos demais, exceto os medicamentos genérico e similar da Sandoz. Em

formas farmacêuticas sólidas, este excipiente normalmente é usado para aumentar a eficácia de aglutinantes, conferir plasticidade aos grânulos, no revestimento de comprimidos e como lubrificante (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

Tabela 24- Excipientes presentes em formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata de candesartana cilexetila comercializados no Brasil e a quantidade usualmente empregada

Excipiente	Função farmacotécnica	Medicamentos que contêm o excipiente	Quantidade usual
Amido de milho	Desintegrante e diluente	1,2,4,5,9	3,96 - 170 mg
Carmelose cálcica	Ligante, diluente e desintegrante	1,4	1 - 15 %
Carragenina	Agente de liberação sustentada	5	15 mg
Celulose microcristalina	Diluente e desintegrante	3,6,7,8	10,4 - 665,36 mg
Croscarmelose sódica	Desintegrante	2,3,5,6,7,8,9	25,5 - 100 mg
Dióxido de silício	Deslizante e antiaglomerante	3,6,7,8	2 - 138 mg
Dióxido de titânio	Pigmento	5	11,91 mg
Estearato de magnésio	Lubrificante	1,2,3,4,5,6,7,8,9	0,2 - 50 mg
Hiproluse	Ligante, agente de revestimento, agente de liberação estendida	1,2,3,4,6,7,8,9	10 - 19,2 mg
Lactose monohidratada	Ligante e diluente	1,2,3,4,5,6,7,8,9	63,3 - 269,8 mg
Macrogol (Polietilenoglicol)	Lubrificante, plastificante e aglutinante	1,2,3,4,6,7,8,9	1,5 - 20 mg
Óxido férrico marrom-avermelhado	Corante	1,2,3,5,6,7,8,9	0,13 - 1,5 mg
Povidona	Ligante, desintegrante e potencializador da dissolução	5	3 - 240 mg

1. Atacand® (Astrazeneca); 2. Cadenza® e candesartana cilexetila (Aché); 3. Candessa® e candesartana cilexetila (EMS Sigma Pharma Ltda); 4. Blopress® (Abbott Laboratórios do Brasil Ltda.); 5. Desarcor® e candesartana cilexetila (Sandoz do Brasil Ind. Farm. Ltda.); 6. Candecor® e candesartana cilexetila (Nova Química Farmacêutica Ltda); 7. Candemed® e candesartana cilexetila (Germed Farmacêutica Ltda); 8. Cansarcor® e candesartana cilexetila (Legrand Pharma Indústria Farmacêutica Ltda); 9. Candesartana cilexetila (Biossintética Farmacêutica Ltda).

Fonte: Elaborado pela autora.

## 5.9.2 Caracterização geral dos medicamentos

### I. Determinação do peso

Os resultados da determinação do peso e os desvios com a relação à média estão na Tabela 25. Ambos os produtos avaliados cumpriram o teste da Farmacopeia Brasileira pois, os valores encontrados para todas as unidades avaliadas estavam dentro do limite de variação de  $\pm 7,5\%$  estabelecido (BRASIL, 2010b).

Tabela 25- Determinação do peso dos medicamentos referência e genérico da candesartana cilexetila na dose de 16 mg com os respectivos desvios em relação ao peso médio determinado

Unidade	Referência		Genérico	
	Peso (mg)	Desvio (%)	Peso (mg)	Desvio (%)
1	132,10	0,88	203,20	1,08
2	130,40	-0,42	202,80	0,88
3	131,20	0,19	201,60	0,28
4	131,90	0,73	199,80	-0,61
5	128,70	-1,72	199,80	-0,61
6	130,60	-0,27	200,30	-0,37
7	131,20	0,19	203,70	1,33
8	129,40	-1,18	199,40	-0,81
9	131,40	0,34	198,80	-1,11
10	131,10	0,11	200,80	-0,12
11	129,30	-1,26	200,40	-0,32
12	128,40	-1,95	203,50	1,23
13	132,50	1,18	201,40	0,18
14	134,30	2,56	200,50	-0,27
15	130,90	-0,04	200,00	-0,51
16	132,30	1,03	202,30	0,63
17	131,70	0,57	200,40	-0,32
18	130,80	-0,11	200,40	-0,32
19	130,60	-0,27	201,50	0,23
20	130,20	-0,57	200,10	-0,47
Média	130,95		201,04	

### II. Dureza, diâmetro e espessura

Os resultados encontrados para cada unidade avaliada estão na Tabela 26. Apesar de serem somente informativos (BRASIL, 2010b) permitem evidenciar diferenças entre os medicamentos relacionadas a composição das formulações e ao processo de fabricação.

Comparando os dois produtos avaliados percebe-se que o medicamento referência é menor e apresenta maior dureza que o genérico. A dureza é uma propriedade importante pois pode afetar a desintegração do comprimido e a dissolução do fármaco e conseqüentemente a quantidade disponível para ser absorvida (ALLEN JUNIOR; POPOVICH; ANSEL, 2013).

Com relação ao diâmetro e a espessura dos produtos avaliados, observou-se que os diâmetros de ambas as formulações foram constantes enquanto que a espessura do medicamento genérico teve pequenas variações. A espessura ou altura de um comprimido é determinada no momento da compressão pelos punções e matrizes empregados, sendo a única dimensão que pode variar (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

Tabela 26- Resultados da determinação da dureza, diâmetro e espessura dos medicamentos referência e genérico da candesartana cilexetila na dose de 16 mg avaliados

Unidade	Referência			Genérico		
	Dureza (N)	Diâmetro (mm)	Espessura (mm)	Dureza (N)	Diâmetro (mm)	Espessura (mm)
1	47,0	7,0	3,0	18,0	8,0	3,90
2	56,0	7,0	3,0	18,5	8,0	3,80
3	52,0	7,0	3,0	29,0	8,0	3,80
4	56,0	7,0	3,0	22,0	8,0	3,85
5	62,0	7,0	3,0	22,0	8,0	3,85
6	55,0	7,0	3,0	24,0	8,0	3,90
7	51,0	7,0	3,0	31,0	8,0	3,85
8	42,5	7,0	3,0	22,0	8,0	3,85
9	56,0	7,0	3,0	23,0	8,0	3,85
10	51,5	7,0	3,0	30,0	8,0	3,85
Média	52,90	7,0	3,0	23,95	8,0	3,85
DP	5,43	0,0	0,0	4,59	0,0	0,03

### III. Teor

O teor calculado para os medicamentos referência e genérico estão na Tabela 27. Ambos cumpriram o critério da Farmacopeia Japonesa, ou seja, o teor encontrado está entre 95,0 e 105,0 % da porcentagem declarada no rótulo (JAPAN, 2011).

Além disso, a diferença entre o teor de ambos os medicamentos não foi superior aos 5% recomendados na RDC nº 31 de 2010 que dispõe sobre a realização dos estudos de equivalência farmacêutica e de perfil de dissolução comparativo (BRASIL, 2010a).

Tabela 27- Teor encontrado para os medicamentos referência e genérico da candesartana cilexetila na dose de 16 mg

Replicata	Referência		Genérico	
	Concentração real (µg/mL)	Teor (%)	Concentração real (µg/mL)	Teor (%)
1	20,38	101,88	20,81	104,06
2	20,47	102,33	20,20	100,98
3	20,02	100,11	20,27	101,33
Média	20,29	101,44	20,43	102,13
DP	0,23	1,17	0,34	1,69
DPR	1,16	1,16	1,65	1,65

#### IV. Friabilidade

Os resultados encontrados estão na Tabela 28. Ambos os produtos avaliados cumpriram o teste, pois todas as unidades permaneceram íntegras e as porcentagens de perda não superaram 1,5 % do peso inicial (BRASIL, 2010b).

Tabela 28- Resultados de friabilidade dos produtos, referência e genérico da candesartana cilexetila na dose de 16 mg testados

Produto	Peso inicial (g) (n=20)	Peso final (g) (n=20)	Perda (g)	Perda (%)
Referência	2,6372	2,6300	0,0072	0,27
Genérico	4,0805	4,0709	0,0096	0,24

#### V. Desintegração

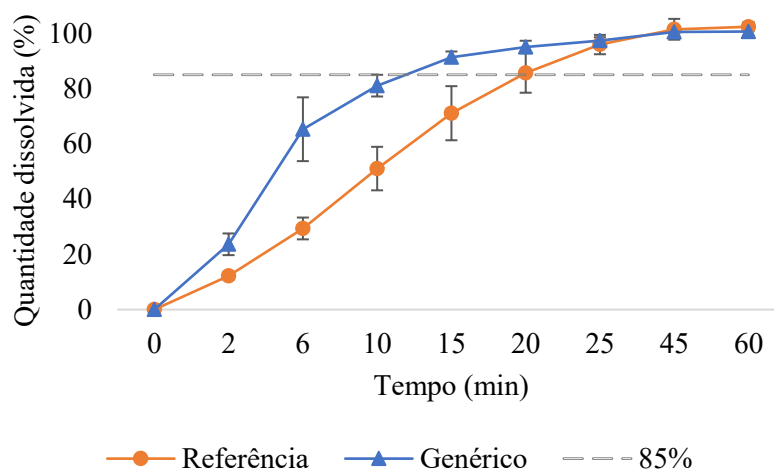
Ambos os produtos avaliados cumpriram o teste. As seis unidades do medicamento referência se desintegraram completamente aos 26 minutos. Já as unidades do medicamento genérico desintegraram completamente com 21 minutos. Porém, para este produto, foi necessário realizar o ensaio duas vezes, pois na primeira avaliação, os comprimidos aderiram aos discos empregados para evitar que os comprimidos escapem dos tubos das cestas de desintegração. Portanto conforme orientações da Farmacopeia Brasileira, o ensaio foi realizado novamente sem os discos (BRASIL, 2010b).



### 5.9.3 Perfis de dissolução

Os perfis de dissolução obtidos para os medicamentos referência e genérico da candesartana cilexetila estão apresentados na Figura 40.

Figura 40- Perfis de dissolução médio de 12 unidades dos medicamentos referência e genérico da candesartana cilexetila no meio tamponado pH 6,8 com 0,35 % de polissorbato 20



Sob as mesmas condições experimentais os dois produtos avaliados apresentaram tipos de dissolução distintos. O medicamento referência apresentou dissolução rápida (dissolução de 85 % da substância ativa em até 30 minutos), enquanto que o medicamento genérico apresentou dissolução muito rápida (dissolução de no mínimo 85 % da substância ativa em até 15 minutos), Tabela 29 (BRASIL, 2010a).

Tabela 29- Resultado médio (n=12) da quantidade de fármaco dissolvida a partir dos medicamentos, referência e genérico, da candesartana cilexetila na dose de 16 mg, em função do tempo

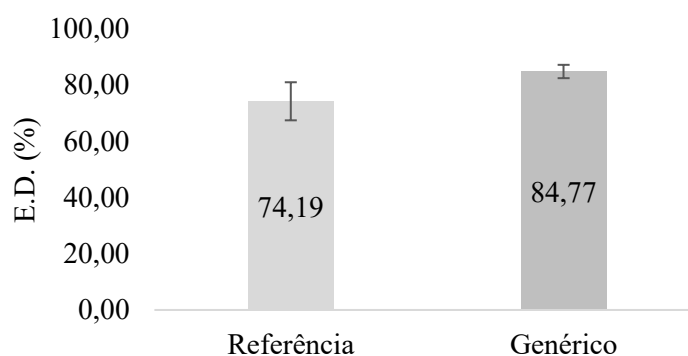
Tempo (min)	Referência		Genérico	
	Quantidade dissolvida (%)	Desvio padrão	Quantidade dissolvida (%)	Desvio padrão
2	12,21	1,32	23,62	3,92
6	29,36	3,95	65,28	11,55
10	51,04	7,87	81,06	3,92
15	71,08	9,79	91,35	2,08
20	85,70	7,20	95,05	2,26
25	95,94	3,50	97,35	1,23
45	101,47	3,77	100,48	1,39
75	102,38	1,68	100,66	1,45

Considerando que os fatores que afetam a dissolução de fármacos administrados em formas farmacêuticas sólidas são: as características físico-químicas do fármaco, a natureza dos excipientes, o processo de fabricação e as condições utilizadas no teste de dissolução (SHARGEL; YU, 2016), pode-se correlacionar a diferença da velocidade de dissolução dos produtos analisados à composição das formulações e ao processo de fabricação.

O medicamento genérico avaliado possui dois excipientes que não estão presentes no medicamento referência, a croscarmelose sódica e a povidona. Estes atuam como facilitadores do processo de desintegração e dissolução (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Além disso, a dureza deste produto determinada experimentalmente foi inferior ao do referência, o que também impacta na desintegração da forma farmacêutica e subsequente dissolução do pró-fármaco (ALLEN JUNIOR; POPOVICH; ANSEL, 2013).

Segundo a RDC nº 31 de 2010, para que os perfis de dissolução sejam considerados semelhantes, os medicamentos referência e teste devem apresentar o mesmo tipo de dissolução (rápida ou muito rápida) e F2 entre 50 e 100. O F2 não foi calculado, pois quando a forma farmacêutica de liberação imediata apresenta dissolução muito rápida, o fator de semelhança perde seu poder discriminativo (BRASIL, 2010a). Em substituição a ele, foi calculada a E.D., Figura 41.

Figura 41- Eficiência de dissolução média calculada (n=12) para os medicamentos referência e genérico da candesartana cilexetila na dose de 16 mg



As análises estatísticas por meio da ANOVA e do teste de Tukey da E.D. calculada, demonstraram haver diferença estatisticamente significativa entre as formulações,  $p = 0,00000082$  (indicativo de diferença estatisticamente significativa:  $p < 0,05$ ).

Apesar das diferenças, ambas as formulações cumpriram a especificação da Farmacopeia Japonesa que preconiza que em 45 minutos não menos de 75 % da quantidade

declarada de candesartana cilexetila deve estar dissolvida (JAPAN, 2011). Vale ressaltar que o meio de dissolução empregado neste estudo foi diferente do indicado por esta Farmacopeia.

Como meio de dissolução foi utilizado o tampão fosfato pH 6,8 com 0,35 % de polissorbato 20 que é uma adaptação do meio tampão fosfato pH 6,5 com 0,35 % de polissorbato 20 recomendando pelo FDA e presente em seu banco de dados (*Dissolution Methods Database*) para fármacos que não possuem métodos de dissolução descritos na Farmacopeia Americana (FDA, 2016b). Este foi selecionado, pois apesar da monografia da candesartana cilexetila comprimidos presente na Farmacopeia Japonesa sugerir o meio de dissolução água com 1 % de polissorbato 20, a água não é considerada um meio representativo das condições fisiológicas, seu pH pode variar de acordo com a fonte e não possui capacidade tamponante, ou seja, não assegura o mesmo valor de pH durante a realização do ensaio (KLEIN, 2010; STORPIRTIS et al., 2009). Além disso, a candesartana cilexetila apresenta maior solubilidade no tampão pH 6,8 (0,66 µg/mL) do que em água (<0,05 µg/mL) o que permitiu o emprego de uma menor concentração de tensoativo (ASTRAZENECA, 2014).

Outros fatores que foram determinantes na seleção e utilização deste meio de dissolução ao invés dos meios tamponados pH 1,2, 4,5 e 6,8 de acordo com as normas de bioensação são: a classificação de baixa solubilidade da candesartana cilexetila segundo o SCB o que a torna inelegível a bioensação segundo as agências regulatórias e a ausência das condições *sink* nestes meios (BRASIL, 2011b; EMA, 2008; FDA, 2015; HEALTH CANADA, 2014; WHO, 2015).

A condição *sink* é definida como o mínimo de 3 vezes o volume de meio necessário para se obter uma solução saturada do fármaco (STORPIRTIS et al., 2009). O seu cumprimento permite, em teoria, que a dissolução seja completa (PHILLIPS et al., 2012; KOSTEWICZ et al., 2014). Então, calculando-se o volume de meio de dissolução necessário a realização dos estudos para a candesartana cilexetila disponível em comprimidos de 16 mg, por meio da razão desta dose pelos valores de solubilidade obtidos (pH 1,2 -0,42 µg/mL e pH 6,8-0,66 µg/mL) seriam necessários (16 mg/0,00066 mg/mL x 3), 72.727,67 mL somente para a realização do teste do perfil de dissolução no meio com a maior solubilidade (pH 6,8). Para assegurar as condições *sink* em testes de dissolução de fármacos pouco solúveis, as alternativas mais comumente empregadas são a utilização de tensoativos e o emprego da aparelhagem célula de fluxo (PHILLIPS, et al., 2012). Porém, na indisponibilidade desta última, foi utilizado o meio tamponado adicionado de tensoativo.

É importante ressaltar que assim como mencionado na Farmacopeia Brasileira, os medicamentos produzidos subsequentemente ao referência, genéricos e similares, devem ser

formulados para apresentar as mesmas características relacionadas à liberação do fármaco e à qualidade estabelecidas para o medicamento referência, não devendo ser superior a este (BRASIL, 2010b). Entretanto, nas condições experimentais empregadas, os medicamentos apresentaram diferenças nos tipos e nos perfis de dissolução.

## CONCLUSÕES

O objetivo do PFPB é garantir o acesso aos medicamentos considerados básicos e essenciais, assim a seleção dos medicamentos pertencentes ao programa é baseada principalmente na Rename. Desde 2004 quando o PFPB foi implantado, a mudança mais significativa que ocorreu foi a parceria entre o setor público e as farmácias e drogarias do setor privado em 2006. Isto ocasionou a expansão do programa e o maior acesso da população aos medicamentos distribuídos por ele.

Os dados de permeabilidade demonstram que *in silico* e *in vitro* a candesartana cilexetila apresenta alta permeabilidade, porém, a biodisponibilidade absoluta em seres humanos é de aproximadamente 14 %, o que permite a sua classificação como de baixa permeabilidade segundo o SCB. Esta observação comprova que somente o caráter lipofílico não garante uma alta absorção. Diante disto, são ressaltados fatores como a desintegração da forma farmacêutica e a solubilização que impactam na proporção livre de pró-fármaco para ser absorvido, assim como o efluxo mediado pela P-gp que interfere na quantidade absorvida.

O método cromatográfico desenvolvido para separação e quantificação da candesartana cilexetila demonstrou ser seletivo, linear na faixa de concentração avaliada, exato, preciso e robusto quando controladas as condições cromatográficas, sendo, portanto adequado para a quantificação do pró-fármaco nos testes de solubilidade e dissolução.

A solubilidade em equilíbrio da candesartana cilexetila determinada pelo método da agitação orbital em frascos (*shake-flask*) permitiu a sua classificação de acordo com o SCB, como de baixa solubilidade. Devido à esta baixa solubilidade não foi possível calcular a VDI do pró-fármaco nos meios tamponados, pois a quantidade dissolvida se manteve constante durante todos os ensaios realizados em diferentes condições, demonstrando assim a saturação dos meios.

As análises eletrônicas da candesartana cilexetila e sua forma ativa, a candesartana, por meio da Química Quântica, demonstraram que ambas as moléculas são idênticas sob ponto de vista da estrutura eletrônica e que os dois grupos mais propensos a reagir quimicamente com as moléculas de água e conseqüentemente envolvidos na solubilidade da candesartana cilexetila são: o benzimidazol e o tetrazol-bifenil.

No comércio nacional foram encontrados 15 medicamentos contendo a candesartana cilexetila como insumo farmacologicamente ativo sob a forma farmacêutica comprimidos na dose de 16 mg. Dos excipientes empregados nestas formulações, um que poderia interferir na

biodisponibilidade por inibir a P-gp, é o polietilenoglicol, que está presente em 14 medicamentos, incluindo o referência.

Destes 15 medicamentos, dois produtos (referência e genérico) foram caracterizados empregando testes físico-químicos e comparados quanto ao perfil de dissolução. Ambos produtos cumpriram todos os requisitos dos testes realizados, porém, nas condições experimentais *in vitro* empregadas, o tipo de dissolução e os perfis de dissolução obtidos não foram semelhantes. O medicamento genérico apresentou dissolução muito rápida enquanto que o medicamento referência apresentou dissolução rápida. A comparação dos perfis, realizada pela análise estatística da ED calculada, demonstrou haver diferença estatisticamente significativa entre os perfis,  $p < 0,05$ .

Associando os dados de permeabilidade da literatura aos experimentais de solubilidade obtidos neste trabalho, pode-se inferir que a candesartana cilexetila pertence à classe IV do SCB. Segundo a Anvisa são candidatos a bioisenção fármacos classe I veiculados em formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata com dissolução rápida. Assim o referido fármaco não pode ser incluído na lista de candidatos à bioisenção.

O PFPB tem demonstrado por meio do grande número de pessoas beneficiadas a sua importância na garantia ao acesso dos medicamentos pela população, porém, melhorias são necessárias no que diz respeito ao elenco de medicamentos disponíveis. Assim, como evidenciado, existe a necessidade da atualização periódica da lista de medicamentos para o cumprimento da essencialidade, devendo neste momento a eficácia terapêutica ser considerada. Neste aspecto, apesar da candesartana cilexetila ser reconhecidamente mais eficaz que a losartana, possui alto custo e pertence à classe IV do SCB, o que impossibilita a isenção dos estudos de bioequivalência para o registro de novos produtos com este pró-fármaco e, conseqüentemente, a redução do custo de novos genéricos registrados pelo critério de bioisenção. Diante disto, torna-se inviável, neste momento, a inclusão da candesartana cilexetila no PFPB, que prioriza distribuir medicamentos de baixo custo.

## REFERÊNCIAS

- ADVANCED CHEMISTRY DEVELOPMENT INC. (ACD). ACD/ I-Lab, versão 5.0.0.184. 2016. Disponível em: < <https://ilab.acdlabs.com/iLab2/>>. Acesso em: 29 nov. 2016.
- ALBERS, A. P. F. et al. Um método simples de caracterização de argilominerais por difração de raios x. **Cerâmica**, v. 48, n. 305, p.34-37, 2002.
- ALLEN JUNIOR, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistema de liberação de fármacos**. 9. ed. São Paulo: Artmed, 2013. 716 p.
- ALLEN JUNIOR, L.V. **Introdução à Farmácia de Remington**. Porto Alegre: Artmed, 2016. 688 p.
- ALLOUCHE, A. Gabedit - A graphical user interface for computational chemistry softwares. **Journal of Computational Chemistry**, v. 32, n. 1, p.174-182, 2010.
- ALMEIDA, S. R. Pereira de. **Políticas Públicas para o acesso aos medicamentos no Brasil: O caso da Farmácia Popular**. 2015. 237 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Sociais, Pontifícia Universidade Católica de São Paulo- PUC/SP, São Paulo, 2015.
- AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for 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.
- ARAÚJO, G.L.B. et al. Polimorfismo na produção de medicamentos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 1, p.27-36, 2012.
- ARAÚJO, U. A. et al. Medicamentos genéricos no Brasil: panorama histórico e legislação. **Rev Panam Salud Publica**, v. 28, n.3, p. 480-492, 2010.
- ARDIANA, F.; LESTARI, M. L.A.D.; INDRAYANTO, G. Candesartan cilexetil. In: BRITAIN, Harry G. (Ed.). **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**. Elsevier Inc., 2012. Cap. 3. p. 79-112.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO COMÉRCIO FARMACÊUTICO (ABCFARMA). **Genéricos**. 2016. Disponível em: <<http://abcfarma.org.br/noticias/genericos.html>>. Acesso em: 27 jul. 2016.
- ASTRAZENECA. **Product Information: Atacand®**. Ontario: Astrazeneca Canada Inc., 2015. 17 p.
- ASTRAZENECA. **Product Monograph: Atacand®**. Ontario: Astrazeneca Canada Inc., 2014. 39 p.
- ATTIA, A.K.; SOUAYA, E.R.; SOLIMAN, E.A. Thermal analysis investigation of dapoxetine and vardenafil hydrochlorides using molecular orbital calculations. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 5, n. 4, p.523-529, 2015.

AULTON, M. E.; TAYLOR, M.G. **Aulton's Pharmaceuticals: The Design and Manufacture of Medicines**. 4. ed.: Churchill Livingstone, 2013. 908 p.

AZIM, Md. S. et al. Development of dissolution medium for candesartan cilexetil by RP-HPLC method. **American Journal of Pharmtech Research**, v. 2, n. 3, p.892-903, 2012.

BAKA, E.; COMER, J. E.A.; TAKÁCS-NOVÁK, K. Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, n. 2, p.335-341, 2008.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S. Cell culture-based models for intestinal permeability; a critique. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 5, p.335-343, mar. 2005.

BEDOR, D.C.G. O novo contexto da intercambialidade de medicamentos no Brasil: Medicamentos Similares e suas bases técnico-científicas. **Boletim Informativo Geum**, v. 5, n. 2, p.7-13, abr./jun. 2014.

BELAL, T. S. et al. Validated spectrofluorimetric determination of two pharmaceutical antihypertensive mixtures containing amlodipine besylate together with either candesartan cilexetil or telmisartan. **Luminescence**, v. 29, n. 7, p.893-900, fev. 2014.

BELLAVINHA, K. R. **Avaliação do ácido fólico como potencial candidato à bioisemção**. 2012. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pósgraduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2012.

BHAGWATE, S.; GAIKWAD, N. J.; TARTE, P. Stability indicating hplc method for the determination of candesartan in pharmaceutical dosages form. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 4, n. 3, p.1079-1085, 2013.

BONAMICI, D. **Sistema de Classificação Biofarmacêutica e Bioisemções**. 2009. 159 f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

BOX, K. J. et al. Equilibrium versus Kinetic Measurements of Aqueous Solubility, and the Ability of Compounds to Supersaturate in Solution - A Validation Study. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 6, p.1298-1307, jun. 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nota Técnica nº 003/2013**. Brasília, 2013b, 6p.

BRASIL. **Bulário Eletrônico**. 2015. Desenvolvido pela Anvisa. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/index.asp](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/index.asp)>. Acesso em: 27 jul. 2016.

BRASIL. Consulta Pública nº 129, de 12 de fevereiro de 2016e. **Proposta de RDC que dispõe sobre a validação de métodos analíticos de ensaios biológicos, microbiológicos, imunológicos, de identificação, quantitativos para a determinação de impurezas, ensaios limite para o controle de impurezas, ensaios quantitativos para a determinação de insumos farmacêuticos em amostras de matérias-primas ou de medicamentos em todas as suas fases de produção**. Brasília: D.O.U, 15 fev. 2016. p. 44.



BRASIL. Consulta Pública nº 139, de 02 de março de 2016c. **Proposta de inclusão de capítulo na Farmacopeia Brasileira: método geral de determinação da solubilidade aplicada à bioisenção de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica**. Brasília: D.O.U, 04 mar. 2016. p. 41-42.

BRASIL. Decreto nº 5090, de 20 de maio de 2004b. **Regulamenta a Lei nº 10.858, de 13 de abril de 2004, e institui o programa "Farmácia Popular do Brasil", e dá outras providências**. Brasília: D.O.U, 21 mai. 2004.

BRASIL. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Critérios para a seleção de medicamentos do Programa Farmácia Popular do Brasil**. Sistema Eletrônico do serviço de informação ao cidadão (e-SIC), versão 2.2.5. 2016f.

BRASIL. Lei nº 10858, de 13 de abril de 2004a. **Autoriza a Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz a disponibilizar medicamentos, mediante ressarcimento, e dá outras providências**. Brasília: D.O.U, 14 abr. 2004.

BRASIL. Lei nº 9787, de 10 de fevereiro de 1999. **Altera a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências**. Brasília: D.O.U, 11 fev. 1999.

BRASIL. Ministério Público. **Nota Técnica nº 001/2009**. Belo Horizonte, 2009, 10 p.

BRASIL. Portaria nº 111, de 28 de janeiro de 2016a. **Dispõe sobre o Programa Farmácia Popular do Brasil (PFPPB)**. Brasília: D.O.U, 29 jan. 2016.

BRASIL. Portaria nº 1146, de 01 de junho de 2012. **Altera e acresce dispositivos à Portaria nº 971/GM/MS, de 17 de maio de 2012, para ampliar a cobertura da gratuidade no âmbito do Programa Farmácia Popular do Brasil**. Brasília: D.O.U, 04 jun. 2012.

BRASIL. Portaria nº 184, de 03 de fevereiro de 2011a. **Dispõe sobre o Programa Farmácia Popular do Brasil**. Brasília: D.O.U, 04 fev. 2011.

BRASIL. Portaria nº 491, de 09 de março de 2006. **Dispõe sobre a expansão do Programa "Farmácia Popular do Brasil"**. Brasília: D.O.U. 2006.

BRASIL. RDC nº 31, de 11 de agosto de 2010a. **Dispõe sobre a realização dos estudos de equivalência farmacêutica e de perfil de dissolução comparativo**. Brasília: D.O.U, 12 ago. 2010.

BRASIL. RDC nº 37, de 03 de agosto de 2011b. **Dispõe sobre o Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência e dá outras providências**. Brasília: D.O.U, 05 ago. 2011.

BRASIL. RDC nº 60, de 10 de outubro de 2014b. **Dispõe sobre os critérios para a concessão renovação do registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências**. Brasília: D.O.U, 13 out. 2014.

BRASIL. Resolução nº 338, de 06 de maio de 2004c. **Aprova a Política Nacional de Assistência Farmacêutica**. Brasília: D.O.U, 20 mai. 2004.

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília: D.O.U, 02 jun. 2003.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010b. 1 v.

BRASIL. **Manual Básico do Programa Farmácia Popular do Brasil - Rede Própria**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014a. 76 p.

BRASIL. **Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade bioequivalência**. Brasília: Anvisa, 2002. 1 v.

BRASIL. **Política Nacional de Medicamentos**. 25. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2001. 40 p. (Série C. Projetos, Programas e Relatórios, n. 25).

BRASIL. **Programa Farmácia Popular do Brasil**. 2016b. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/sctie/farmacia-popular>>. Acesso em: 26 jul. 2016.

BRASIL. **Remédio gratuito para asma reduz em 16 % as internações**. 2013a. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/noticias-antiores-agencia-saude/4282-remedio-gratuito-para-asma-br-reduz-em-16-as-internacoes>>. Acesso em: 27 jul. 2016.

BRASIL. **Um em cada cinco brasileiros buscou medicamentos no Aqui Tem Farmácia Popular**. 2016d. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/22609-um-em-cada-cinco-brasileiros-buscou-medicamentos-no-aqui-tem-farmacia-popular>>. Acesso em: 27 jul. 2016.

BRUNTON, L. L. et al. **Goodman e Gilman's: Manual of Pharmacology and Therapeutics**. U.S.A: McGraw-Hill, 2008. 1219 p.

CAGIGAL, E. et al. PKa determination of angiotensin II receptor antagonists (ARA II) by spectrofluorimetry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, p.477-486, 2001.

CÂMARA DE REGULAÇÃO DO MERCADO DE MEDICAMENTOS (CMED). **Preços máximos de medicamentos por princípio ativo**. 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/listas-de-precos>>. Acesso em: 20 dez. 2016.

CÂMARA DE REGULAÇÃO DO MERCADO DE MEDICAMENTOS (CMED). **Resolução nº 2, de 5 de março de 2004**. Brasília: D.O.U, [2004].

CAMPOS, D. P. et al. Computational models and their participation in biopharmaceutical studies of antihypertensives. In: International Congress of Pharmaceutical Sciences, 10., 2015, Ribeirão Preto. **Book of abstracts**. Ribeirão Preto: CIFARP, 2015.

CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Quim. Nova**, v. 32, n. 4, p.1021-1030, 2009.

CHEMAXON. ChemAxon`s Calculator Plugins demo. 2015. Disponível em: < <https://disco.chemaxon.com/apps/demos/>>. Acesso em: 29 nov. 2016.

CHEMAXON. MarvinSketch, versão 5.11.5, demo. 2013. Disponível em: < [https://marvin-demo.chemaxon.com/applet/5\\_11\\_5\\_resigned/marvin/examples/applets/sketch.html](https://marvin-demo.chemaxon.com/applet/5_11_5_resigned/marvin/examples/applets/sketch.html)>. Acesso em: 29 nov. 2016.

CISNEROS-GARCÍA, Z.n.; NIETO-DELGADO, P.G.; RODRÍGUEZ-ZAVALA, J.G.. Conformational analysis on protonation and deprotonation of calmagite in protic solvents and its reactivity through Fukui function. **Dyes And Pigments**, v. 121, p.188-198, 2015.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic Chemistry**. 2. ed. New York: Oxford University Press Inc., 2012. 1234 p.

COATES, J. Interpretation of infrared spectra, a practical approach. In: Meyer, R.A. (Ed.). **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. John Wiley & Sons Ltd, 2000, p. 10815–10837.

CUI, P. et al. Thermodynamic analysis and correlation of solubility of candesartan cilexetil in aqueous solvent mixtures. **Fluid Phase Equilibria**, v. 337, p.354-362, 2013.

DARWHEKAR, G.N.; JAIN, D.K.; CHOUHAN, J. Biopharmaceutical classification of candesartan and candesartan cilexetil. **Asian Journal of Pharmacy and Life Science**, v. 2, n. 2, p.295-302, 2012.

DEZANI, A. B. et al. Equilibrium solubility versus intrinsic dissolution: characterization of lamivudine, stavudine and zidovudine for BCS classification. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Si, v. 49, n. 4, p.853-863, out./dez. 2013.

DUARTE, H.A. Índices de reatividade química a partir da teoria do funcional de densidade: formalismo e perspectivas. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p.501-508, 2001.

ERMER, J.; MILLER, J. H. McB. (Ed.). **Method validation in pharmaceutical analysis: a guide to best practice**. Germany: Wiley- Vch, 2006. 418 p.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). **Guideline on the investigation of bioequivalence**. London: EMA, 2010. 27 p.

FELTRE, R. **Química geral**. 6. ed. São Paulo: Moderna, 2004. 1 v.

FERREIRÓS, N. et al. Hydrolysis and transesterification reactions of candesartan cilexetil observed during the solid phase extraction procedure. **Journal of Chromatography B**, v. 855, n. 2, p.134-138, ago. 2007.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2011. 690 p.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Drug Approval Package: Atacand (Candesartan Cilexetil) Tablets.** 2002. Disponível em: <[http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/98/20838\\_Atacand.cfm](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/98/20838_Atacand.cfm)>. Acesso em: 27 jul. 2016.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **FDA-Recommended Dissolution Methods.** 2016b. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/index.cfm>>. Acesso em: 27 jul. 2016.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for Industry: dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms.** Rockville: FDA, 1997. 14 p.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products.** 2016a. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.Cfm>>. Acesso em: 27 jul. 2016.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a Biopharmaceutics Classification System: Guidance for Industry.** Rockville: FDA, 2015. 14 p.

GIACOMINI, K. M. et al. Membrane transporters in drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 3, p.215-236, mar. 2010.

GLEITER, C. H. et al. Candesartan. **Cardiovascular Drug Reviews**, v. 22, n. 4, p.263-284, 2004.

GOLUBOVIĆ, J. B. et al. Quantitative structure retention relationship modeling in liquid chromatography method for separation of candesartan cilexetil and its degradation products. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 140, p.92-101, 2015.

GONZÁLEZ, L. et al. Fast screening method for the determination of angiotensin II receptor antagonists in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 949, p.49-60, 2002.

GOOLE, J. et al. The effects of excipients on transporter mediated absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 393, p.17-31, 2010.

GRADMAN, A. H. AT 1-receptor blockers: differences that matter. **Journal of Human Hypertension**, v. 16, p.S9-S16, 2002.

GROSSJOHANN, C. et al. Characterisation, solubility and intrinsic dissolution behaviour of benzamide: dibenzyl sulfoxide cocrystal. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 422, p.24-32, 2012.

GUJARATI, D.. **Econometria básica.** 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 812 p. Tradução de Maria José Cyhlar Monteiro.

GURUNATH, S.; NANJWADE, B. K.; PATILA, P. A.. Enhanced solubility and intestinal absorption of candesartan cilexetil solid dispersions using everted rat intestinal sacs. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 22, n. 3, p.246-257, jul. 2014.

HÄMÄLÄINEN, M.D.; FROSTELL-KARLSSON, A.. Predicting the intestinal absorption potential of hits and leads. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 4, p.397-405, 2004.

HASSAN, H. A. et al. establishment of a bioequivalence indicating dissolution specification for candesartan cilexetil tablets using a convolution model. **Dissolution Technologies**, v. 22, n. 1, p.36-43, 2015.

HATAKEYAMA, T.; QUINN, F.X. **Thermal analysis: fundamentals and applications to polymer science**. 2. ed. John Wiley & Sons, 1999. 180 p.

HEALTH CANADA. **Biopharmaceutics Classification System Based Biowaiver**. Ottawa: Health Canada, 2014. 12 p.

HONÓRIO, K. M.; SILVA, A. B. F. da. An AM1 study on the electron-donating and electron-accepting character of biomolecules. **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 95, n. 2, p.126-132, 2003.

HOPPE, K.; SZNITOWSKA, M. The effect of polysorbate 20 on solubility and stability of candesartan cilexetil in dissolution media. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 5, p.1116-1125, 2014.

HOU, T. J. et al. ADME Evaluation in Drug Discovery. 4. Prediction of Aqueous Solubility Based on Atom Contribution Approach. **J. Chem. Inf. Comput. Sci.**, v. 44, n. 1, p.266-275, 2004.

HÜBNER, R et al. Pharmacokinetics of candesartan after single and repeated doses of candesartan cilexetil in young and elderly healthy volunteers. **Journal of Human Hypertension**, v. 11, n. 2, p.S19-S25, 1997.

HUSAIN, A. et al. A Review on candesartan: pharmacological and pharmaceutical profile. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, n. 10, p.12-17, 2011.

INTERNATIONAL PHARMACEUTICAL FEDERATION (FIP). **Biowaiver Monographs 2004-2012**. [the Hague]: FIP, 2012. 110 p.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). **Compendium of Chemical Terminology Gold Book**. 2. ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 2014. 1622 p. Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org/index.html>>. Acesso em: 27 jul. 2016.

IONASHIRO, M. **Giolito: fundamentos da termogravimetria, análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial**. Giz Editorial, 2004. 96 p.

ISSA, M.G.; FERRAZ, H.G. Intrinsic Dissolution as a Tool for Evaluating Drug Solubility in Accordance with the Biopharmaceutics Classification System. **Dissolution Technologies**, v. 18, n. 3, p.6-13, 2011.

JAPAN. **Japanese Pharmacopoeia**. 16. ed. Ministry of Health, Labour and Welfare, 2011.

JIN, X. et al. Comparison of MDCK-MDR1 and Caco-2 cell based permeability assays for anti-malarial drug screening and drug investigations. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 70, n. 2, p.188-194, set. 2014.

JORGENSEN, W.L.; DUFFY, E.M.. Prediction of drug solubility from structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**,v. 54, n. 3, p.355-366, 2002.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. (Ed.). **HPLC for pharmaceutical scientists**. United States of America: John Wiley & Sons, Inc, 2007. 1104 p.

KERNS, E. H.; DI, L. **Drug-like properties: concepts, structure design and methods: from ADME to toxicity optimization**: Elsevier Inc., 2008. 526 p.

KHAN, K. A.. The concept of dissolution efficiency. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 27, p.48-49, 1975.

KLEIN, S. The use of biorelevant dissolution media to forecast the in vivo performance of a drug. **The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**, v. 12, n. 3, p.397-406, 2010.

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

KUBO, K. et al. Nonpeptide angiotensin ii receptor antagonists. synthesis and biological activity of potential prodrugs of benzimidazole-7-carboxylic acids. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, p.2343-2349, 1993.

KUMAR, N. et al. Development and validation of a dissolution test for delayed release capsule formulation of duloxetine hydrochloride. **Current Pharmaceutical Analysis**,v. 8, p.236-246, 2012.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. 1517 p.

LACOURCIÈRE, Y.; ASMAR, R. A comparison of the efficacy and duration of action of candesartan cilexetil and losartan as assessed by clinic and ambulatory blood pressure after a missed dose, in truly hypertensive patients: a placebo-controlled, forced titration study. **American Journal of Hypertension**, v. 12, n. 12, p.1181-1187, dez. 1999.

LARAGH, J. H. et al. Renin, angiotensin and aldosterone system in pathogenesis and management of hypertensive vascular disease. **The American Journal of Medicine**, v. 52, p.633-652, 1972.

LEAL, R. C. et al. A química quântica na compreensão de teorias de química orgânica. **Quim. Nova**, v. 33, n. 5, p.1211-1215, 2010.

LEMKE, T.L. et al (Ed.). **Foye's Principals of Medicinal Chemistry**. 7. ed. China: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. 1479 p.

LEVINE, I. N. Química Cuántica. 5. ed. Madrid: Prentice Hall, 2001. 736 p.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p.670-673, 2004.

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.375-388, out./dez., 2002.

MARTINEZ, M. N.; AMIDON, G. L.. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. **J Clin Pharmacol**, v. 42, p.620-643, 2002.

MATSUNAGA, H. et al. solid-state characterization of candesartan cilexetil (TCV-116): crystal structure and molecular mobility. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 47, n. 2, p.182-186, 1999.

MEREDITH, P.A; MURRAY, L.S; MCINNES, G.T.. Comparison of the efficacy of candesartan and losartan: a meta-analysis of trials in the treatment of hypertension. **Journal of Human Hypertension**, v. 24, p.525-531, 2010.

MONTEIRO, P. F. **Solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frascos: padronização e definição dos fármacos controle**. 2014. 138 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.

NEESE, F. The ORCA program system. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 2, n. 1, p.73-78, 2012.

NISHIKAWA, K. et al. Candesartan cilexetil: a review of its preclinical pharmacology. **Journal of Human Hypertension**, v. 11, n. 2, p. S9-S17, 1997.

OLIVEIRA, D.M et al. Ensaio de dissolução de cápsulas de fluconazol: problemas encontrados na determinação por espectrofotometria na região do UV. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 2, p.211-213, 2010.

OLIVEIRA, M.A.; YOSHIDA, M.I.; GOMES, E.C.L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p.1224-1230, 2011.

PATRICK, G.L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 5. ed. United Kingdom: Oxford University Press, 2013. 789 p.

PEREIRA, M. A. **Programa Farmácia Popular no Brasil: uma análise sobre sua relação com o Complexo Econômico-Industrial da Saúde e os programas estratégicos do Governo**

**Federal.** 2013. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Saúde Pública, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro, 2013.

PHILLIPS, D. J. et al. Overcoming sink limitations in dissolution testing: a review of traditional methods and the potential utility of biphasic systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 11, p.1549-1559, abr. 2012.

PURANIK P. K. et al. Biopharmaceutical Classification System and Biowaiver: an overview. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 2, n. 5, p.66-71, 2011.

RAGHAD, Al-Nuss; HIND, El-Zein. Enhancement of candesartan cilexetil dissolution rate by using different methods. **Asian Journal of Pharmaceutical Clinical Research**, v. 8, n. 1, p.320-326, 2015.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 5. ed. Londres: Elsevier Inc., 2003. 904 p.

REDDY, B. V.; NAVANEETHA, K.. Formulation and evaluation of orodispersible tablets of candesartan. **The Pharma Innovation Journal**, v. 4, n. 1, p.25-32, 2015.

**REVISTA HIPERTENSÃO: Diretrizes Brasileiras de Hipertensão VI.** São Paulo: Bestpoint, v. 13, n. 1, 2010. Trimestral.

RIGOBELLO, C. et al. Avaliação da qualidade e perfil de dissolução de comprimidos de cloridrato de propranolol. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 35, n. 1, p.85-90, 2013.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. (Ed.). **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6. ed. London and Chicago: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2009. 888 p.

SADEK, P. C.. **Illustrated pocket dictionary of chromatography**. United States of America: John Wiley & Sons, Inc, 2004. 227 p.

SHARGEL, L.; YU, A.B.C.. **Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics**. 7. ed. New York: Mcgraw-hill, 2016. 929 p.

SILVA FILHO, H. M. **Direito à saúde: a inconstitucionalidade do Programa Farmácia Popular do Brasil**. 2010. 99 f. TCC (Graduação) - Curso de Direito, Centro Universitário de João Pessoa, João Pessoa, 2010.

SILVA, G.; IHA, K. Polimorfismo: caracterização e estudo das propriedades de uma fase cristalina. **J. Aerosp.technol. Manag.**, v. 2, n. 3, p.331-338, 2010.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J.. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7. ed. United States Of America: John Wiley & Sons, Inc, 2005. 502 p.

SINGHAL, D. Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p.335-347, 2004.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos da química analítica**. Thonsom, 2005. (Tradução da 8. ed. americana).



SMITH, B. C.. **Fundamentals of fourier transform infrared spectroscopy**. 2. ed. United States Of America: CRC Press, 2011. 207 p.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. J.. **Practical HPLC Method Development**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1997. 765 p.

SOLOMONS, T.W. G.; FRYHLE, C. B.. **Organic Chemistry**. 10. ed. United States of America: John Wiley & Sons, Inc, 2011. 1164 p.

SOUZA, J. B.. **Avaliação biofarmacêutica da losartana visando subsidiar a discussão de bioessência**. 2015. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2015.

STORPIRTIS, S. et al. A equivalência farmacêutica no contexto da intercambialidade entre medicamentos genéricos e de referência: bases técnicas e científicas. **Infarma**, v. 16, n. 9-10, p. 51-56, 2004.

STORPIRTIS, S. et al. **Biofarmacotécnica: Ciências Farmacêuticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 321 p.

SWEETMAN, S. C (Ed.). **Martindale: The Complete Drug Reference**. 36. ed. China: Pharmaceutical Press, 2009. 3694 p.

TARASCHEWSKI, M. et al. FTIR Study of CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O/CO<sub>2</sub> nanoparticles and their temporal evolution at 80 K. **J. Phys. Chem. A**, v. 109, p.3337-3343, 2005.

TERVAHAUTA, T. **Non-cell-based in vitro methods in the study of prodrug absorption and metabolism**. 2014. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, University Of Helsinki, Finlândia, 2014.

TJANDRAWINATA, R. et al. Bioequivalence study of two formulations of candesartan cilexetil tablet in healthy subjects under fasting conditions. **Drug Design, Development and Therapy**, p.841-847, 2013.

UNGELL, A.L. et al. Membrane transport of drugs in different regions of the intestinal tract of the rat. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 3, p.360-366, 1998.

UNITED KINGDON. **British Pharmacopoeia**. Health Ministers, 2013.

UNITED STATES. **United States Pharmacopeia (USP)**. 38. ed. The United States Pharmacopoeial Convention, 2015.

VAN LIER, J.J.; VAN HEININGEN, P.N.M.; SUNZEL, M. Absorption, metabolism and excretion of <sup>14</sup>C-candesartan and <sup>14</sup>C-candesartan cilexetil in healthy volunteers. **Journal of Human Hypertension**, v. 11, n. 2, p.S27-S28, 1997.

VESSECCHI, R. et al. Aplicação da química quântica computacional no estudo de processos químicos envolvidos em espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p.840-853, 2008.

VIDT, D.G. et al. A forced titration study of antihypertensive efficacy of candesartan cilexetil in comparison to losartan: CLAIM Study II. **Journal of Human Hypertension**, v. 15, p.475-480, 2001.

VIPPAGUNTA, S.R.; BRITTAIN, H.G.; GRANT, D.J.W.. Crystalline solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p.3-26, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **A global brief on Hypertension: Silent killer, global public health crisis**. Geneva: WHO, 2013. 39 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability**. Geneva: WHO, 2015. 184 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The pursuit of responsible use of medicines: sharing and learning from country experiences**. Geneva: WHO, 2012. 64 p.

YAMAUTI, S. M.; BARBERATO-FILHO, S.; LOPES, L. C. The list of drugs in the Popular Pharmacy Program and the Brazilian National Pharmaceutical Care Policy. **Cad. Saúde Pública**, v. 31, n. 8, p.1648-1662, ago. 2015.

YU, L. X. et al. Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 270, p.221-227, 2004.

ZHANG, G. Phase transformation considerations during process development and manufacture of solid oral dosage forms. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p.371-390, 2004.

ZHOU, L. et al. Transport Characteristics of Candesartan in Human Intestinal Caco-2 Cell Line. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 30, n. 8, p.259-264, 2009.

## ANEXOS

**ANEXO A- Certificado de apresentação do pôster no 10<sup>th</sup> *International Congress of Pharmaceutical Sciences* realizado em Ribeirão Preto, São Paulo no período de 05 a 09/09/2015.**

 <p><b>10<sup>th</sup> International Congress of Pharmaceutical Sciences CIFARP 2015</b> Ribeirão Preto, Brazil, September 5-9 2015 Translating science into health pipeline</p>	<h1>CERTIFICATE</h1>
<p>We certify that</p>	
<p><b>DÉBORA PRISCILA DE CAMPOS</b></p>	
<p>presented the <b>POSTER</b> entitled <b>COMPUTATIONAL MODELS AND THEIR PARTICIPATION IN BIOPHARMACEUTICAL STUDIES OF ANTIHYPERTENSIVES</b></p>	
<p>Authors: <b>DÉBORA PRISCILA DE CAMPOS, LORENA BARBOSA ARRUNÁTEGUI, NEILA MÁRCIA SILVA BARCELLOS, JACQUELINE DE SOUZA</b></p>	
<p>in the <b>POSTER SESSION</b> at the <b>10th International Congress of Pharmaceutical Sciences - CIFARP 2015</b> held on September 5-9, 2015.</p>	
<p>Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, September 9th, 2015.</p>	
 Flávia da Silva Emery <small>Organizing Committee</small>	 Maria Vitória Lopes Badra Bentley <small>DEAN - FCFRP - USP</small>
	

**ANEXO B- Certificado de apresentação de pôster no II Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/CiPharma da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, realizado em Ouro Preto, Minas Gerais no período de 28 a 29/10/2015.**

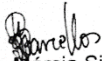


*CIPHARMA*



Certificamos que **Débora Priscila de Campos** apresentou, na forma de pôster, o resumo intitulado "METHOD DEVELOPMENT BY HPLC FOR QUANTIFICATION OF CANDESARTAN CILEXETIL IN BIOPHARMACEUTICAL STUDIES", no *II Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/CiPharma* da Escola de Farmácia da UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO.

Ouro Preto, 29 de outubro de 2015.

  
Profa. Dra. Neila Márcia Silva Barcellos  
Coordenador do CiPharma

  
Profa. Dra. Andrea Grabe Guimarães  
Diretora da Escola de Farmácia

CiPharma/Escola de Farmácia  
Universidade Federal de Ouro Preto