

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS E MEDICAMENTOS

LARA MARIA LOPES DE CASTRO

VALSARTANA UM CANDIDATO A BIOISENÇÃO?

Ouro Preto, 2017

LARA MARIA LOPES DE CASTRO

VALSARTANA UM CANDIDATO A BIOISENÇÃO?

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

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Neila Márcia Silva Barcellos

Coorientadora: Prof^ª Dr^ª Jacqueline de Souza

Ouro Preto, 2017

C346v Castro, Lara Maria Lopes de.
Valsartana um candidato a bioisemção? [manuscrito] / Lara Maria Lopes de Castro. - 2017.
139f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Neila Márcia Silva Barcellos.
Coorientador: Prof. Dr. Jacqueline de Souza.

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. Sistema de Classificação Biofarmacêutica. 2. Bioisemção. 3. Solubilidade. 4. Permeabilidade. 5. Valsartana. I. Márcia Silva Barcellos, Neila. II. de Souza, Jacqueline. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.12-008.331.



UFOP
Universidade Federal
de Ouro Preto



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia



LISTA DE PRESENÇA

Sessão de defesa da 133ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas a **Lara Maria Lopes de Castro**, com a defesa da dissertação intitulada: “Valsartana um candidato a bioisemção?”, avaliada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 14 de setembro de 2017.

Prof. Dr. Christian Fernandes
UFMG

Prof. Dr. Sidney Augusto Vieira Filho
UFOP

Prof. Dra. Neila Márcia Silva Barcellos
UFOP

AGRADECIMENTOS

A Deus por me abençoar todos os dias.

A minha família: aos meus pais Zilda e Maurílio pelo amor, por sempre estarem presentes e pelo apoio em mais esta etapa. Às minhas irmãs Rogéria e Giséli por todos os momentos, pelo companheirismo e cuidado. A minha amada sobrinha Maria Eduarda, por fazer os dias ficarem mais lindos e felizes.

A minha orientadora professora Neila Márcia Silva Barcellos pela oportunidade, por todos os ensinamentos e aprendizados. Pelo compromisso, incentivo e apoio sempre. Por sempre acreditar em mim.

A minha coorientadora professora Jacqueline de Souza pelos ensinamentos, tranquilidade e paciência. Pelo compromisso e por todo auxílio.

Ao meu namorado Guilherme por estar sempre presente, por todo amor, por cada palavra e apoio.

Às amigas do Laboratório de Controle de Qualidade – LCQ: Débora Campos, Laryssa, Lorena Ulhôa, Lorena Arrunátegui, Bruna Pegorelli, Anna Flávia, Carolina, Thayná e demais alunas de iniciação científica, por todos os momentos, ensinamentos e risos. Em especial às queridas Tamires, Lorena Rosa, Débora Silva e Bruna Mapa por toda ajuda, paciência e pela grande amizade.

À Mirela, Délio, Amanda Quaresma e Hygor por toda disponibilidade e ajuda.

À Patrícia Capellari pelo apoio em todos os momentos, pela amizade e ensinamentos.

Às amigas Larissa Cotrin e Lívia Mendes, companheiras em mais esta caminhada, pelas palavras de apoio e todos os momentos de risos.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos que contribuíram de alguma forma para o aprendizado e realização deste trabalho.

RESUMO

Para comprovação da possibilidade de intercambialidade entre medicamentos genéricos e similares com o referênciã, estes devem passar por estudos *in vivo* de bioequivalência. O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) é utilizado como ferramenta regulatória, visando a possibilidade de substituição destes estudos *in vivo* por estudos *in vitro* (bioisenção). A valsartana, fármaco anti-hipertensivo da classe dos antagonistas de angiotensina II (ARA II), apresenta ampla divergência quanto a sua classificação segundo o SCB. Assim, este trabalho visa a obtenção de informações para a definição de sua classificação e, conseqüentemente, segura discussão sobre a possibilidade ou não de sua bioisenção. Um método por CLAE empregando coluna C18, fase móvel composta por acetonitrila: ácido acético 0,1% (v/v) em água (52: 48), fluxo de 1,0 mL/min foi desenvolvido para a quantificação da valsartana nos meios: fluido gástrico simulado sem enzimas FGSSE (pH=1,2), tampão acetato TA (pH=4,5) e suco entérico simulado sem enzimas SESSE (pH=6,8). Foram validados dois intervalos de concentração devido a diferentes estudos, que demonstraram seletividade, linearidade entre 2 a 12 µg/mL (pH=1,2), 10 a 60 µg/mL (pH=4,5) e 10 a 400 µg/mL (pH=6,8) (Intervalo 1) e 0,5 a 6 µg/mL (pH=1,2) e 2 a 40 µg/mL (pH=4,5) (Intervalo 2), precisão (DPR < 5%) e exatidão de 95 a 105%. A solubilidade foi determinada pelo método da agitação orbital em frascos (em equilíbrio) e por dissolução intrínseca (cinética). De acordo com os resultados obtidos com o primeiro método a valsartana apresentou alta solubilidade (9,21 mg/mL) no meio SESSE (pH=6,8), sendo a razão entre a maior dose (320 mg) e a solubilidade D/S < 250 (34,75) e baixa solubilidade nos meios FGSSE pH=1,2 (0,08 mg/ mL) e TA pH=4,5 (1,23 mg/mL), com razão D/S ≥ 250 (3991,60 e 259,48, respectivamente). Os resultados obtidos por ambos os métodos foram equivalentes. A velocidade de dissolução intrínseca (VDI) foi de 0,6073 mg/min/cm² no meio SESSE (pH=6,8), 0,0074 mg/min/cm² no FGSSE (pH=1,2) e 0,0726 mg/min/cm² no TA (pH=4,5). Foram avaliados os perfis de dissolução de três produtos contendo valsartana disponíveis no mercado brasileiro. Somente os produtos A (referência) e C (similar) no meio SESSE (pH=6,8) apresentaram dissolução muito rápida (85% em 15 minutos) e não houve diferença significativa entre eles. Dados de permeabilidade *in vivo* e *in vitro* foram identificados por revisão da literatura; a permeabilidade *in silico* foi determinada pelos programas computacionais Molinspiration e MarvinSketch. De acordo com estes dados, considerando principalmente os estudos *in vivo*, em que a fração absorvida foi < 85%, a

valsartana foi definida como de baixa permeabilidade. Assim, os resultados obtidos levam à conclusão de que a valsartana é classificada como fármaco classe IV do SCB (baixa solubilidade e permeabilidade), não sendo um fármaco candidato a bioisenção.

Palavras-chave: Sistema de Classificação Biofarmacêutica, Bioisenção, Solubilidade, Permeabilidade e Valsartana.

ABSTRACT

To prove the possibility of interchangeability of generic and similar drugs with the reference these must undergo *in vivo* bioequivalence studies. The Biopharmaceutical Classification System (BCS) it is used as a regulatory tool, aiming the possibility of replacing *in vivo* studies with *in vitro* studies (biowaiver). Valsartan, an antihypertensive drug of the class of angiotensin II receptor antagonists (ARA II), presents wide divergence concerning its classification according to the BCS. Thus, this work aims at obtaining additional information in order to contribute to the definition of its classification according to the BCS and to subsidize an appropriate discussion of biowaiver's possibility. An HPLC method employing C18 column, mobile phase composed of acetonitrile: 0.1% (v/v) acetic acid in water (52:48) and flow rate of 1.0 mL/min was developed for the quantification of valsartan in the media: simulated gastric fluid without enzymes (pH=1.2), acetate buffer (pH=4.5) and simulated intestinal fluid without enzymes (pH=6.8). The method was validated in two ranges due different studies, and showed selectivity, linearity between 2 to 12 µg/mL (pH =1.2), 10 to 60 µg/mL (pH=4.5) and 10 to 400 µg/mL (pH=6.8) (Interval 1) and 0.5 to 6 µg/mL (pH=1.2) and 2 to 40 µg/mL (pH = 4.5) (Interval 2), precision with RSD of 5 % and accuracy from 95 to 105%. Solubility was determined by shake-flask method (in equilibrium) and by intrinsic dissolution (kinetics). According to the results obtained with the first method, valsartan presented high solubility of 9.21 mg/mL in the buffer (pH=6.8), the ratio between the highest dose (320 mg) and the solubility $D/S < 250$ (34.75) and low solubility in the buffers pH=1.2 (0.08 mg/mL) and pH=4.5 (1.23 mg/mL), with D/S ratio ≥ 250 (3991.60 and 259.48, respectively). The results obtained with both methods were equivalent. The intrinsic dissolution rate was 0.6073 mg/min/cm² in the pH=6.8, 0.0074 mg/min/cm² in pH=1.2 and 0.0726 mg/min/cm² in pH=4.5. The dissolution profiles of three valsartan-containing products available in the Brazilian market were evaluated. Only products A (reference) and C (similar) in pH=6.8 showed very rapid dissolution (85% in 15 minutes) and there was no significant difference between them. *In vivo* and *in vitro* permeability data were identified by literature review. The *in silico* permeability was determined by the computational programs Molinspiration and MarvinSketch. According to these data, considering mainly the *in vivo* studies, in which the absorbed fraction was $< 85\%$, valsartan was classified as low permeability drug. Therefore, the results obtained lead to the conclusion that valsartan is classified as BCS class IV drug (low solubility and permeability), and so not a candidate for biowaiver.

Key words: Biopharmaceutical Classification System, Biowaiver, Solubility, Permeability and Valsartan.

LISTA DE EQUAÇÕES

| | |
|---|----|
| Equação 1 – Equação utilizada para o cálculo do DPR na determinação do parâmetro precisão..... | 45 |
| Equação 2 – Equação utilizada para o cálculo do parâmetro exatidão..... | 46 |
| Equação 3 – Equação utilizada para o cálculo do parâmetro limite de detecção..... | 46 |
| Equação 4 – Equação utilizada para o cálculo do parâmetro limite de quantificação..... | 46 |
| Equação 5 – Equação utilizada para o cálculo da relação dose/solubilidade visando classificação de um fármaco pelo SCB..... | 73 |
| Equação 6 – Equação utilizada para o cálculo da eficiência de dissolução..... | 87 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Estrutura química da valsartana | 34 |
| Figura 2 – Espectros na região do infravermelho da SQR e IFA | 49 |
| Figura 3 – Cromatograma obtido para a solução de valsartana utilizando metanol: ácido acético 0,1% (v/v) em água (75: 25). Concentração da amostra de 200 µg/mL | 51 |
| Figura 4 – Cromatograma obtido para a solução de valsartana utilizando metanol: ácido acético 0,1% (v/v) em água (70: 30). Concentração da amostra de 200 µg/mL | 51 |
| Figura 5 – Cromatograma obtido para a solução de valsartana utilizando metanol: ácido acético 0,1% (v/v) em água (72: 28). Concentração da amostra de 200 µg/mL | 51 |
| Figura 6 – Cromatograma obtido para a solução de valsartana utilizando acetonitrila: ácido acético 0,1% (v/v) em água (50: 50). Concentração da amostra de 200 µg/mL | 52 |
| Figura 7 – Cromatograma obtido para a solução de valsartana utilizando acetonitrila: ácido acético 0,1% (v/v) em água (55: 45). Concentração da amostra de 200 µg/mL | 52 |
| Figura 8 – Cromatograma obtido para a solução de valsartana utilizando acetonitrila: ácido acético 0,1% (v/v) em água (60: 40). Concentração da amostra de 200 µg/mL | 53 |
| Figura 9 – Cromatograma obtido para a solução de valsartana utilizando Metanol: acetonitrila: ácido acético 0,1% (v/v) em água em diferentes proporções e fluxos. (1) 65: 10: 25 - 1,0 mL/min; (2) 55: 15: 30 - 1,2 mL/min; (3) 60: 10: 30 - 1,2 mL/ min; (4) 60: 10: 30 - 1,0 mL/min; (5) 50: 20: 30 - 1,0 mL/min. Concentração da amostra de 200 µg/mL..... | 53 |
| Figura 10 – Cromatograma obtido para a solução de valsartana utilizando diferentes proporções de fase móvel e fluxo: (1) acetonitrila: ácido acético 0,1% (v/v) em água (60: 40) - 0,1 mL/min; (2) metanol: acetonitrila: ácido acético 0,1% (v/v) em água (55:15:30) - 1,2 mL/min e (3) metanol: ácido acético 0,1% (v/v) em água (72:28) - 1,0 mL/min | 54 |
| Figura 11 – Cromatograma obtido para a solução de valsartana utilizando acetonitrila: ácido acético 0,1% (v/v) em água (52: 48). Concentração da amostra de 200 µg/mL | 55 |
| Figura 12 – Cromatogramas obtidos para quantificação da valsartana nos meios tamponados (A) FGSSE (pH=1,2), (B) TA (pH=4,5) e (C) SESSE (pH=6,8). Concentração da amostra de 200 µg/mL | 56 |
| Figura 13 – Cromatograma obtido com a solução diluída de valsartana no meio FGSSE (pH=1,2). Concentração da amostra 15 µg/mL..... | 57 |
| Figura 14 – Cromatograma obtido com a solução diluída de valsartana no meio TA (pH=4,5). Concentração da amostra 30 µg/mL..... | 58 |

| | |
|---|----|
| Figura 15 – Cromatograma obtido com a solução diluída de valsartana no meio SESSE (pH=6,8). Concentração da amostra 150 µg/mL..... | 58 |
| Figura 16 – Curva analítica para o método de quantificação da valsartana no meio FGSSE (pH=1,2)..... | 59 |
| Figura 17 – Gráfico de resíduos da regressão para a valsartana no meio FGSSE (pH=1,2).... | 59 |
| Figura 18 – Curva analítica para o método de quantificação da valsartana no meio TA (pH=4,5)..... | 60 |
| Figura 19 – Gráfico de resíduos da regressão para a valsartana no meio TA (pH=4,5)..... | 60 |
| Figura 20 – Curva analítica para o método de quantificação da valsartana no meio SESSE (pH=6,8)..... | 60 |
| Figura 21 – Gráfico de resíduos da regressão para a valsartana no meio SESSE (pH=6,8) | 61 |
| Figura 22 – Curva analítica para o método de quantificação da valsartana no meio FGSSE (pH=1,2)..... | 67 |
| Figura 23 – Gráfico de resíduos da regressão para a valsartana no meio FGSSE (pH=1,2).... | 67 |
| Figura 24 – Curva analítica para o método de quantificação da valsartana no meio TA (pH=4,5)..... | 68 |
| Figura 25 – Gráfico de resíduos da regressão para a valsartana no meio TA (pH=4,5) | 68 |
| Figura 26 – Tipos de transportes envolvidos na absorção intestinal de fármacos. (1) Transporte paracelular; (2) Transporte transcelular: (2a) mediado por carreador, (2b) difusão passiva, (2c) endocitose mediada pelo receptor; (3) Transporte mediado por carreador de efluxo. Adaptado de: (BALIMANE et al., 2000)..... | 77 |
| Figura 27 – Solubilidade da valsartana no meio FGSSE (pH=1,2)..... | 89 |
| Figura 28 – Solubilidade da valsartana no meio TA (pH=4,5) | 89 |
| Figura 29 – Solubilidade da valsartana no meio SESSE (pH=6,8)..... | 90 |
| Figura 30 – Avaliação da estabilidade da matéria prima de valsartana no meio FGSSE (pH=1,2)..... | 91 |
| Figura 31 – Avaliação da estabilidade da matéria prima de valsartana no meio TA (pH=4,5)..... | 91 |
| Figura 32 – Avaliação da estabilidade da matéria prima de valsartana no meio SESSE (pH=6,8)..... | 91 |
| Figura 33 – Perfil de dissolução intrínseca da valsartana no meio FGSSE (pH=1,2)..... | 92 |
| Figura 34 – Perfil de dissolução intrínseca da valsartana no meio TA (pH=4,5)..... | 92 |
| Figura 35 – Perfil de dissolução intrínseca da valsartana no meio SESSE (pH=6,8) | 93 |

| | |
|---|-----|
| Figura 36 – Perfis de dissolução médios (n=6) de comprimidos contendo 320 mg de valsartana no meio FGSSE (pH=1,2) para os produtos: A (Referência), B (Genérico) e C (Similar)..... | 100 |
| Figura 37 – Perfis de dissolução médios (n=6) de comprimidos contendo 320 mg de valsartana no meio FGSSE (pH=4,5) para os produtos: A (Referência), B (Genérico) e C (Similar)..... | 100 |
| Figura 38 – Perfis de dissolução médios (n=6) de comprimidos contendo 320 mg de valsartana no meio FGSSE (pH=6,8) para os produtos: A (Referência), B (Genérico) e C (Similar)..... | 100 |
| Figura 39 – Eficiência de dissolução valsartana (320 mg) no meio SESSE (pH= 6,8). Produto A (Referência) e Produto C (Similar)..... | 102 |
| Figura 40 – Gráfico do log D versus pH da valsartana obtido do programa computacional MarvinSketch..... | 104 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1 – Condições cromatográficas consideradas para o desenvolvimento do método por CLAE para quantificação de valsartana..... | 41 |
| Quadro 2 – Preparo das soluções estoque de valsartana..... | 42 |
| Quadro 3 – Preparo dos meios tamponados FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8)..... | 42 |
| Quadro 4 – Preparo de soluções diluídas a serem utilizadas na avaliação do parâmetro seletividade..... | 44 |
| Quadro 5 – Parâmetros de variação avaliados para determinação do parâmetro robustez para quantificação da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8)..... | 47 |
| Quadro 6 – Métodos para a determinação da permeabilidade de fármacos. Adaptado de: FDA, 2015; LINDEMBERG, 2004..... | 78 |
| Quadro 7 – Diluições das alíquotas realizadas nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8) para avaliação da solubilidade da valsartana | 82 |
| Quadro 8 – Critério de aceitação referentes à determinação de peso para comprimidos revestidos de 250,0 mg ou mais (BRASIL, 2010b)..... | 97 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Preparo das soluções diluídas de valsartana a partir da SE1 contendo 1000 µg/mL para avaliação da linearidade no meio FGSSE (pH=1,2)..... | 44 |
| Tabela 2 – Preparo das soluções diluídas de valsartana a partir da SE contendo 1000 µg/mL para avaliação da linearidade no meio TA (pH=4,5)..... | 44 |
| Tabela 3 – Preparo das soluções diluídas de valsartana a partir da SE contendo 4000 µg/mL para avaliação da linearidade no meio SESSE (pH=6,8)..... | 45 |
| Tabela 4 – Concentração das soluções de valsartana em µg/mL para determinação da precisão nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8)..... | 46 |
| Tabela 5 – Preparo das soluções diluídas de valsartana a partir da SE4 contendo 400 µg/mL para avaliação da linearidade no meio FGSSE (pH=1,2)..... | 47 |
| Tabela 6 – Preparo das soluções diluídas de valsartana a partir da SE4 contendo 400 µg/mL para avaliação da linearidade no meio TA (pH=4,5)..... | 48 |
| Tabela 7 – Concentração das soluções de valsartana em µg/mL para determinação da precisão nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8)..... | 48 |
| Tabela 8 – Frequências de absorção das principais bandas no espectro de infravermelho da valsartana SQR e IFA..... | 49 |
| Tabela 9 – Diferentes proporções da fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético 0,1% (v/v) em água, testadas em diferentes fluxos..... | 53 |
| Tabela 10 – Parâmetros calculados para cada cromatograma obtido para a solução de valsartana utilizando Metanol: acetonitrila: ácido acético 0,1% (v/v) em água em diferentes proporções e fluxos. (1) 65: 10: 25 - 1,0 mL/min; (2) 55: 15: 30 - 1,2 mL/min; (3) 60: 10: 30 - 1,2 mL/ min; (4) 60: 10: 30 - 1,0 mL/min; (5) 50: 20: 30 - 1,0 mL/min. Concentração da amostra de 200 µg/mL..... | 54 |
| Tabela 11 – Parâmetros calculados para cada cromatograma obtido para a solução de valsartana utilizando diferentes proporções de fase móvel e fluxo: (1) acetonitrila: ácido acético 0,1% (v/v) em água (60: 40) - 0,1 mL/min; (2) metanol: acetonitrila: ácido acético 0,1% (v/v) em água (55:15:30) - 1,2 mL/min e (3) metanol: ácido acético 0,1% (v/v) em água (72:28) - 1,0 mL/min..... | 55 |
| Tabela 12 – Parâmetros cromatográficos para o método de quantificação da valsa..... | 56 |
| Tabela 13 – Condições analíticas definidas para quantificação da valsartana..... | 56 |
| Tabela 14 – Parâmetros cromatográficos para o método de quantificação da valsartana..... | 57 |

| | |
|---|----|
| Tabela 15 – Valores dos ângulos determinados e de referência para determinação da pureza de pico do método cromatográfico para quantificação da valsartana..... | 58 |
| Tabela 16 – Significância das regressões da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8)..... | 61 |
| Tabela 17 – Parâmetros da regressão linear obtidos para a quantificação da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8)..... | 62 |
| Tabela 18 – Análise da precisão intra-corrída (repetibilidade) para o método de quantificação da valsartana no meio FGSSE (pH=1,2)..... | 62 |
| Tabela 19 – Análise da precisão intra-corrída (repetibilidade) para o método de quantificação da valsartana no meio TA (pH=4,5)..... | 62 |
| Tabela 20 – Análise da precisão intra-corrída (repetibilidade) para o método de quantificação da valsartana no meio SESSE (pH=6,8)..... | 63 |
| Tabela 21 – Precisão inter-corrídas (intermediária) para o método de quantificação da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8)..... | 63 |
| Tabela 22– Análise da exatidão para o método de quantificação da valsartana no meio FGSSE (pH=1,2)..... | 64 |
| Tabela 23 – Análise da exatidão para o método de quantificação da valsartana no meio TA (pH=4,5)..... | 64 |
| Tabela 24 – Análise exatidão para o método de quantificação da valsartana no meio SESSE (pH=6,8)..... | 64 |
| Tabela 25 – Valores de LD e LQ para o método de quantificação da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8)..... | 65 |
| Tabela 26 – Resultados das médias das concentrações e DPR para avaliação da robustez do método de quantificação da valsartana no meio FGSSE (pH=1,2)..... | 65 |
| Tabela 27 – Resultados das médias das concentrações e DPR para avaliação da robustez do método de quantificação da valsartana no meio TA (pH=4,5)..... | 66 |
| Tabela 28 – Resultados das médias das concentrações e DPR para avaliação da robustez do método de quantificação da valsartana no meio SESSE (pH=6,8)..... | 66 |
| Tabela 29 – Significância das regressões da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2) e TA (pH=4,5)..... | 69 |
| Tabela 30 – Parâmetros da regressão linear obtidos para a quantificação da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2) e TA (pH=4,5)..... | 69 |
| Tabela 31 – Análise da precisão intra-corrída (repetibilidade) para o método de quantificação da valsartana no meio FGSSE (pH=1,2)..... | 69 |

| | |
|--|----|
| Tabela 32 – Análise da precisão intra-corrída (repetibilidade) para o método de quantificação da valsartana no meio TA (pH=4,5)..... | 70 |
| Tabela 33 – Precisão inter-corrídas (intermediária) para o método de quantificação da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2) e TA (pH=4,5)..... | 70 |
| Tabela 34 – Análise da exatidão para o método de quantificação da valsartana no meio FGSSE (pH=1,2)..... | 71 |
| Tabela 35 – Análise da exatidão para o método de quantificação da valsartana no meio TA (pH=4,5)..... | 71 |
| Tabela 36 – Valores de LD e LQ para o método de quantificação da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8)..... | 71 |
| Tabela 37 – Condições do 1º e 2º estudo piloto utilizadas para determinação da solubilidade de VAL nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8)..... | 82 |
| Tabela 38 – Condições determinadas para realização do estudo final de solubilidade da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8)..... | 82 |
| Tabela 39 – Condições utilizadas para o estudo de dissolução intrínseca da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH= 6,8)..... | 84 |
| Tabela 40 – Condições determinadas para realização dos perfis de dissolução dos comprimidos contendo valsartana..... | 87 |
| Tabela 41 – Razão D/S da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2) TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8)..... | 90 |
| Tabela 42 – Parâmetros das regressões lineares referentes a dissolução intrínseca da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8)..... | 93 |
| Tabela 43 – Velocidade de dissolução intrínseca (VDI) da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8)..... | 93 |
| Tabela 44 – Excipientes presentes nos medicamentos contendo valsartana comercializados no Brasil. Adaptado de: SOUZA, 2015..... | 95 |
| Tabela 45 – Resultados da determinação de peso realizada com 20 comprimidos de cada produto e desvios percentuais em relação à média..... | 97 |
| Tabela 46 – Resultados do teste de dureza (N) realizado com dez unidades de cada produto..... | 98 |
| Tabela 47 – Resultados do teste de friabilidade realizado com vinte unidades dos produtos A (referência) e C (similar) e com dez unidades do produto B (genérico)..... | 99 |
| Tabela 48 – Resultados das médias das concentrações e do teor dos produtos analisados no meio SESSE (pH=6,8)..... | 99 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 49 – Resultados médios dos perfis de dissolução de 6 comprimidos de cada um dos produtos analisados no meio FGSSE (pH=1,2)..... | 101 |
| Tabela 50 – Resultados médios dos perfis de dissolução de 6 comprimidos de cada um dos produtos analisados no meio TA (pH=4,5)..... | 101 |
| Tabela 51 – Resultados médios dos perfis de dissolução de 12 comprimidos de cada um dos produtos analisados no meio SESSE (pH=6,8)..... | 102 |
| Tabela 52 – Eficiência de dissolução do Produto A (Referência) e Produto C (Similar) no meio SESSE (pH=6,8)..... | 102 |
| Tabela 53 – Resultados da permeabilidade da valsartana de acordo com diferentes métodos..... | 103 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------|--|
| a | Coeficiente angular |
| ACN | Acetonitrila |
| ANOVA | Análise de variância |
| Anvisa | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| As | Assimetria |
| ASC | Área sobre a curva |
| ATR | Dispositivo de Refletância Total Atenuada |
| b | Coeficiente linear |
| BA | Biodisponibilidade absoluta |
| BE | Bioequivalência |
| BR | Biodisponibilidade relativa |
| CMD | Concentração média determinada |
| CLAE | Cromatografia à líquido de alta eficiência |
| DAD | Detector de arranjo de diodos |
| DP | Desvio padrão |
| Do | Número de dose |
| DPR | Desvio padrão relativo |
| D/S | Razão dose/solubilidade |
| ECA | Enzima conversora de angiotensina |
| ED | Eficiência de dissolução |
| EF | Equivalência farmacêutica |
| EMA | <i>European Medicines Agency</i> |
| F2 | Fator de semelhança |
| Fa | Fração absorvida |
| Fc | Fator de cauda |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FFSOLI | Forma farmacêutica sólida oral de liberação imediata |
| FGSSE | Fluido gástrico simulado sem enzimas |
| FIP | Federação Internacional Farmacêutica |
| FM | Fase móvel |
| HAS | Hipertensão arterial sistêmica |

| | |
|--------------|--|
| IC | Inclinação da curva analítica |
| ICC | Insuficiência cardíaca congestiva |
| IFA | Insumo farmacêutico ativo |
| L | Litro |
| LD | Limite de detecção |
| Log D | Logaritmo do coeficiente de partição em diferentes pH |
| Log P | Logaritmo do coeficiente de partição octanol/água |
| LQ | Limite de quantificação |
| mg | Miligramas |
| min | Minutos |
| mL | Mililitros |
| Mpa | Mega Pascal |
| MRP | Proteína de multirresistência a fármacos |
| OATP | Transportador polipeptídico de ânions orgânicos |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PA | Pressão arterial |
| PAMPA | Ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela |
| P_{appA-B} | Permeabilidade aparente apical-basolateral |
| P_{appB-A} | Permeabilidade aparente basolateral-apical |
| P_{eff} | Permeabilidade efetiva |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| P-gp | Glicoproteína P |
| PNM | Política Nacional de Medicamento |
| Psi | <i>Pound force per square inch</i> |
| R | Correlação linear |
| R^2 | Coefficientes de determinação |
| RE | Resolução |
| RENAME | Relação Nacional de Medicamentos |
| rpm | Rotação por minuto |
| SCB | Sistema de Classificação Biofarmacêutica |
| SBC | Sociedade Brasileira de Cardiologia |
| SE | Solução estoque |
| SESSE | Suco entérico simulado sem enzimas |

| | |
|-----------|-------------------------------------|
| SQR | Substância química de referência |
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| TGI | Trato gastrointestinal |
| TA | Tampão acetato |
| Tr | Tempo de retenção |
| UV | Ultravioleta |
| VD | Velocidade de dissolução |
| VDI | Velocidade de dissolução intrínseca |
| λ | Comprimento de onda |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 25 |
| 2. OBJETIVOS | 27 |
| 2.1 Objetivo geral | 27 |
| 2.2 Objetivos específicos | 27 |
| 3. REFERENCIAL TEÓRICO | 28 |
| 3.1 Breve histórico da política de medicamentos no Brasil..... | 28 |
| 3.2 Sistema de classificação biofarmacêutica (SCB) e bioisenção..... | 29 |
| 3.3 Valsartana: um antagonista dos receptores AT1 de angiotensina II (ARA II)..... | 31 |
| 3.3.1 Características farmacocinéticas..... | 33 |
| 3.3.2 Características biofarmacêuticas | 34 |
| 3.3.2.1 Solubilidade da valsartana | 34 |
| 3.3.2.2 Permeabilidade da valsartana | 36 |
| PARTE 1: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA VALSARTANA NOS MEIOS FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) E SESSE (pH=6,8) | 37 |
| 4. REFERENCIAL TEÓRICO | 38 |
| 4.1 Desenvolvimento e validação de métodos analíticos por CLAE | 38 |
| 5. MATERIAL E MÉTODOS | 39 |
| 5.1 Material..... | 39 |
| 5.1.1 Substância química de referência (SQR) e insumo farmacêutico ativo (IFA) | 39 |
| 4.1.2 Equipamentos e Materiais | 39 |
| 4.1.3 Reagentes e Solventes | 39 |
| 5.2 Métodos | 40 |
| 5.2.1 Análise do Insumo Farmacêutico Ativo (IFA)..... | 40 |
| 5.2.1.1 Análise por espectrofotometria na região do infravermelho | 40 |
| 5.2.1.2 Ponto de fusão | 40 |
| 5.2.2 Desenvolvimento do método cromatográfico para quantificação da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH= 4,5) e SESSE (pH=6,8) | 40 |
| 5.2.2.1 Determinação das condições cromatográficas..... | 41 |
| 5.2.2.2 Preparo da solução estoque (SE) de valsartana | 42 |
| 5.2.2.3 Preparo das soluções diluídas | 42 |
| 5.2.3 Validação do método analítico para quantificação da valsartana..... | 43 |

| | |
|--|-----------|
| 5.2.3.1 Intervalo 1 | 43 |
| 5.2.3.1.1 Seletividade | 43 |
| 5.2.3.1.2 Linearidade | 44 |
| 5.2.3.1.3 Precisão..... | 45 |
| 5.2.3.1.4 Exatidão | 46 |
| 5.2.3.1.5 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) | 46 |
| 5.2.3.1.6 Robustez | 47 |
| 5.2.3.2 Intervalo 2..... | 47 |
| 5.2.3.2.1 Linearidade | 47 |
| 5.2.3.2.2 Precisão..... | 48 |
| 5.2.3.2.3 Exatidão | 48 |
| 5.2.3.2.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) | 48 |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 49 |
| 6.1 Análise do Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) | 49 |
| 6.1.1 Análise por espectrofotometria na região do infravermelho | 49 |
| 6.1.2 Ponto de fusão | 50 |
| 6.2 Desenvolvimento de método cromatográfico para quantificação da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH= 4,5) e SESSE (pH=6,8) | 50 |
| 6.3 Validação do método analítico para quantificação da valsartana..... | 57 |
| 6.3.1 Intervalo 1 | 57 |
| 6.3.1.1 Seletividade | 57 |
| 6.3.1.2 Linearidade | 59 |
| 6.3.1.3 Precisão..... | 62 |
| 6.3.1.4 Exatidão | 63 |
| 6.3.1.5 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) | 65 |
| 6.3.1.6 Robustez | 65 |
| 6.3.2 Intervalo 2..... | 67 |
| 6.3.2.1 Linearidade | 67 |
| 6.3.2.2 Precisão..... | 69 |
| 6.3.2.3 Exatidão | 70 |
| 6.3.2.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) | 71 |
| PARTE 2: AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE E PERMEABILIDADE DA VALSARTANA E DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE FFSOLI CONTENDO VALSARTANA NOS MEIOS FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) E SESSE (pH=6,8)..... | 72 |

| | |
|---|-----------|
| 7. REFERENCIAL TEÓRICO | 73 |
| 7.1 Solubilidade | 73 |
| 7.1.1 Método da agitação orbital em frascos (<i>shake-flask</i>) | 74 |
| 7.1.2 Dissolução intrínseca | 74 |
| 7.2 Dissolução | 75 |
| 7.3 Permeabilidade | 76 |
| 8. MATERIAL E MÉTODOS | 80 |
| 8.1 Material | 80 |
| 8.1.1 Substância química de referência, insumo farmacêutico ativo e medicamentos | 80 |
| 8.1.2 Equipamentos e materiais | 80 |
| 8.1.3 Reagentes e solventes | 81 |
| 8.2 Métodos | 81 |
| 8.2.1 Métodos utilizados para estudo de solubilidade da valsartana | 81 |
| 8.2.1.1 Estudo de solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frascos | 81 |
| 8.2.1.1.1 Avaliação da estabilidade da valsartana durante o estudo de solubilidade | 83 |
| 8.2.1.1.2 Estudo de dissolução intrínseca | 83 |
| 8.2.2 Avaliação de medicamentos contendo valsartana | 84 |
| 8.2.2.1 Análise dos excipientes utilizados nos medicamentos contendo valsartana | 84 |
| 8.2.2.2 Caracterização dos medicamentos | 85 |
| 8.2.2.2.1 Determinação de peso | 85 |
| 8.2.2.2.2 Desintegração | 85 |
| 8.2.2.2.3 Dureza | 85 |
| 8.2.2.2.4 Friabilidade | 85 |
| 8.2.2.2.5 Teor | 86 |
| 8.2.2.3 Perfil de dissolução dos medicamentos | 86 |
| 8.2.3 Avaliação da permeabilidade da valsartana | 88 |
| 9. RESULTADOS | 89 |
| 9.1 Solubilidade da valsartana | 89 |
| 9.1.1 Estudo de solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frascos | 89 |
| 9.1.1.1 Avaliação da estabilidade da valsartana durante o estudo de solubilidade | 90 |
| 9.1.2 Estudo de dissolução intrínseca | 92 |
| 9.2 Avaliação de medicamentos contendo valsartana | 94 |
| 9.2.1 Análise dos excipientes utilizados nos medicamentos contendo valsartana | 94 |
| 9.2.2 Caracterização dos medicamentos | 97 |

| | |
|--|------------|
| 9.2.2.1 Determinação de peso..... | 97 |
| 9.2.2.2 Desintegração | 98 |
| 9.2.2.3 Dureza..... | 98 |
| 9.2.2.4 Friabilidade..... | 98 |
| 9.2.2.5 Teor..... | 99 |
| 9.2.3 Perfis de dissolução da valsartana a partir dos medicamentos avaliados | 99 |
| 9.3 Avaliação da permeabilidade da valsartana..... | 103 |
| 10. DISCUSSÃO | 106 |
| 11. CONCLUSÃO..... | 121 |
| 12. REFERÊNCIAS..... | 122 |

1 INTRODUÇÃO

Em 1999 foi instituída no Brasil a política de medicamentos genéricos, a qual permitiu o acesso da população a medicamentos seguros e eficazes com menor custo. Para serem registrados, os medicamentos genéricos sob a forma farmacêutica sólida de liberação imediata (FFSOLI), devem passar por estudos de bioequivalência (BE). A BE consiste na comparação das biodisponibilidades do fármaco entre os medicamentos genérico e referência, e os resultados possibilitam avaliar se estes medicamentos são intercambiáveis (BRASIL, 1999). Anteriores aos genéricos, os medicamentos denominados similares, presentes no mercado brasileiro desde a década de setenta, passaram, em 2003, a ter seu registro condicionado à obrigatoriedade da realização dos estudos de equivalência farmacêutica e biodisponibilidade relativa (BR), este último tecnicamente semelhante ao estudo de BE (BRASIL, 2003a; 2003b). Neste cenário, as indústrias tiveram um período de dez anos para adequar seus produtos a estas exigências estabelecidas pela Anvisa e em outubro de 2014 estes medicamentos passaram, assim como os genéricos, a serem considerados intercambiáveis com o medicamento referência (BRASIL, 2014b). Diante disto, também se tornam uma opção terapêutica considerada segura e de menor custo.

As características de solubilidade e permeabilidade são determinantes para a biodisponibilidade e absorção de um fármaco, bem como, a dissolução a partir da forma farmacêutica, uma vez que para ser absorvido, o fármaco precisa primeiramente ser liberado da forma farmacêutica, para então se solubilizar nos fluidos gastrointestinais e então permear as membranas biológicas e chegar até a corrente sanguínea (FDA, 2015b).

Em 1995, Amidon e colaboradores propuseram o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), que aloca os fármacos de acordo com suas características de solubilidade e permeabilidade em quatro classes: I (alta solubilidade e alta permeabilidade), II (baixa solubilidade e alta permeabilidade), III (alta solubilidade e baixa permeabilidade) e IV (baixa solubilidade e baixa permeabilidade). O SCB tornou-se nos últimos anos uma ferramenta empregada pelas agências regulatórias, para avaliação da possibilidade de bioisenção de fármacos veiculados em FFSOLI, que é a possibilidade de substituição de estudos *in vivo* de BE/BR por estudos *in vitro* (AMIDON, 1995).

Com exceção da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), que considera a bioisenção apenas para fármacos da classe I (BRASIL, 2011a), as agências reguladoras *Food and Drug Administration* (FDA), *European Medicines Agency* (EMA) e a Organização

Mundial da Saúde (OMS), em um recente consenso, preconizam a bioisenção para fármacos das classes I e III (FDA, 2015; EMA, 2010; WHO, 2015).

Quanto às características biofarmaceuticas de solubilidade e permeabilidade da valsartana, uma ampla divergência é encontrada na literatura. Ela tem sido relatada como um fármaco de baixa solubilidade e alta permeabilidade, classe II (KAZA et al., 2013; GOVINDASWAMY; UMASANKAR, 2014; CHOWDARY et al., 2014) e/ou de alta solubilidade e baixa permeabilidade, classe III (SAYDAM; TAKKA, 2007; KUMAR et al., 2012). Esta divergência justifica a necessidade de estudos adicionais, com o objetivo de contribuir para definição de sua classificação pelo SCB e, conseqüentemente, com uma discussão segura a respeito da possibilidade de bioisenção de novos medicamentos contendo este fármaco. A valsartana é um potente anti-hipertensivo da classe dos antagonistas dos receptores de Ang II (ARA II) comercialmente disponível no Brasil e vem sendo muito utilizada na terapêutica da hipertensão. No entanto, possui um elevado custo e não pertence à Relação Nacional dos Medicamentos Essenciais (RENAME).

Neste contexto, o uso da bioisenção para o registro de novos medicamentos contendo a valsartana (genéricos e similares), pode ser benéfico à população na medida em que, ao facilitar o registro destes medicamentos, poderá reduzir custos ampliando o acesso da população a estes medicamentos com segurança e eficácia garantidas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar as características biofarmacêuticas da valsartana que possam viabilizar a definição de sua classificação pelo SCB e, conseqüentemente, subsidiar de forma segura a discussão sobre a possibilidade de sua bioisenção.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar método por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) para quantificação da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8).
- Realizar estudo da solubilidade em equilíbrio da valsartana pelo método da agitação orbital em frascos (*shake-flask*) nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8).
- Realizar estudo da solubilidade da valsartana avaliando sua dissolução intrínseca nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8).
- Discutir dados de permeabilidade da valsartana obtidos por meio de revisão da literatura e cálculo do log P pelo método computacional (*in silico*).
- Identificar todos os medicamentos na forma farmacêutica comprimidos contendo valsartana disponíveis no mercado brasileiro, listar e discutir os excipientes utilizados nos mesmos.
- Avaliar comparativamente o perfil de dissolução de três medicamentos contendo valsartana (referência, genérico e similar) nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8).
- Analisar e discutir os dados obtidos visando subsidiar uma segura discussão sobre a possibilidade ou não de bioisenção da valsartana.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Breve histórico da política de medicamentos no Brasil

A partir da Constituição Federal de 1988, a saúde passou a ser considerada um direito de todos e um dever do Estado, cabendo a este prover meios de garantir o acesso da população a saúde por meio de políticas sociais e econômicas (BRASIL, 1988; BRASIL 1990). Neste contexto, o Sistema Único de Saúde (SUS), teve sua estrutura e funcionamento regulamentado pela Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, chamada de Lei Orgânica da Saúde (BRASIL, 1990).

Em 1998, foi publicada a Portaria nº 3.916, de 30 de outubro, onde foi criada a Política Nacional de Medicamentos (PNM), visando o uso racional de medicamentos, a garantia da segurança, eficácia e qualidade necessária destes e, além disso, o acesso da população àqueles medicamentos que fossem considerados essenciais. Para isso, dentre as diretrizes dessa política, estão o estabelecimento da relação de medicamentos essenciais, o estímulo à produção de medicamentos e a regulamentação sanitária (BRASIL, 1998).

Um ano depois, foi criada a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, (Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999) com o objetivo de proteção da saúde, agindo por meio do controle sanitário da produção e comercialização de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária (BRASIL, 1999a).

Neste mesmo ano, foi instituída no Brasil a Lei nº 9.787 de 10 de fevereiro, que estabeleceu a política de medicamentos genéricos. Apesar da obrigatoriedade do uso da denominação genérica ter surgido pela primeira vez com o Decreto nº 793 de 5 de abril de 1993, a política dos genéricos somente foi efetivamente implantada em 1999. Até então, no Brasil, além dos medicamentos de referência, somente existiam os similares, que foram criados em 1976 com a Lei nº 6.360 de 23 de setembro e o registro desses não seguiam normas rígidas de qualidade.

Com o surgimento da política de medicamentos genéricos, houve um estímulo à produção de medicamentos, o que ampliou a concorrência entre as indústrias produtoras. Em consequência, a população foi beneficiada, uma vez que passou a ter acesso a medicamentos de qualidade, seguros e eficazes a um menor custo; uma vez que para serem comercializados, os medicamentos genéricos devem passar por estudos de BE, que são estudos que avaliam se o medicamento genérico e o de referência são absorvidos na mesma extensão e velocidade (biodisponibilidade) sendo, portanto, intercambiáveis (BRASIL, 1999b).

Por outro lado, os medicamentos similares, existentes no mercado desde 1976, não possuíam a obrigatoriedade de apresentarem estudos de equivalência farmacêutica (EF) (*in vitro*) e de biodisponibilidade comparativa (*in vivo*). Assim, além de serem comercializados sem a comprovação da equivalência terapêutica com o medicamento de referência, esses eram registrados apenas com a comprovação da semelhança com o medicamento de referência no que diz respeito ao fármaco, concentração, forma farmacêutica, via de administração, posologia e indicação terapêutica (BRASIL, 1976).

Este cenário contraditório quanto às exigências para comercialização de medicamentos genéricos e similares em nosso país começou a ser modificado a partir de 2003, com a publicação das Resoluções RDC 133 e 134 de 29 de maio, que tornou obrigatória a realização de testes de EF e de BR aos similares (BRASIL, 2003a; 2003b). As indústrias farmacêuticas tiveram até o fim de 2013 para adequarem seus produtos a essas novas exigências. Com a Resolução RDC nº 58 de 10 de outubro de 2014 estes medicamentos passaram, assim como os genéricos, a serem considerados intercambiáveis com o medicamento referência (BRASIL, 2014b) e, por isto, também uma opção terapêutica segura e de menor custo à população brasileira.

3.2 Sistema de Classificação Biofarmacêutica e Bioisenção

Em 1995, Amidon e colaboradores propuseram o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) como uma forma de identificar os fármacos de acordo com suas características de solubilidade aquosa e permeabilidade intestinal. Estes dois fatores, aliados à dissolução de fármacos a partir de FFSOLI compreendem os três principais determinantes da velocidade e extensão da absorção (biodisponibilidade) (AMIDON, 1995; FDA, 2015). Assim, com base nesses parâmetros, o SCB classifica os fármacos em quatro classes:

- Classe I: alta solubilidade e alta permeabilidade. Os fármacos dessa classe são bem absorvidos e a etapa limitante para a absorção é a velocidade de dissolução e o esvaziamento gástrico.
- Classe II: baixa solubilidade e alta permeabilidade. Para esses fármacos a dissolução *in vivo* do fármaco é a etapa limitante para a absorção.

- Classe III: alta solubilidade e baixa permeabilidade. A permeabilidade é a etapa limitante para a absorção dessa classe de fármacos.
- Classe IV: baixa solubilidade e baixa permeabilidade. Estes fármacos apresentam problemas significativos para liberação e absorção via oral.

Diferenças observadas na biodisponibilidade de um fármaco a partir de dois produtos equivalentes farmacêuticos podem ser devido a diferenças na dissolução do medicamento *in vivo*. No entanto, quando a dissolução de um fármaco de alta solubilidade a partir de uma FFSOLI é rápida (85% em 30 minutos) ou muito rápida (85% em 15 minutos) em relação ao esvaziamento gástrico é improvável que a biodisponibilidade dependa da dissolução e/ou do tempo de trânsito gastrointestinal. Neste caso, a BE *in vivo* pode não ser necessária para produtos classe I e III, desde que os excipientes utilizados não afetem significativamente a absorção. Desta forma o SCB pode ser usado para justificar a bioisenção (FDA, 2015).

As agências reguladoras, bem como a OMS utilizam o SCB como critério para bioisenção de fármacos, que compreende a possibilidade de substituição de estudos *in vivo* de BE/BR por estudos *in vitro*, no registro de medicamentos. Neste contexto, no Brasil foi elaborada uma lista de fármacos candidatos a bioisenção, publicada por meio de uma instrução normativa pela Anvisa. A primeira delas continha 12 fármacos (BRASIL, 2011b). Com a avaliação contínua dos riscos inerentes à decisão sobre a possibilidade ou não de bioisenção, esta lista se tornou dinâmica e vem sendo ampliada (BRASIL, 2013; BRASIL, 2014a; BRASIL, 2016b). A Anvisa, desde a publicação do guia para isenção e substituição de estudos de BE/BR em 2011, considera a bioisenção somente para fármacos da classe I (BRASIL, 2011a). O FDA, até recentemente também considerava a possibilidade de bioisenção apenas para os fármacos da classe I, porém, em 2015 lançou um novo guia em que foram incluídos os fármacos da classe III (FDA, 2000; FDA, 2015). A EMA considera as classes I e III (EMA, 2010). A Organização Mundial da Saúde (OMS) considerava a bioisenção para fármacos das classes I, II e III, no entanto, assim como o FDA, publicou no ano de 2015 um novo guia onde foram retirados os fármacos da classe II como possíveis de serem bioisentos, uma vez que foi demonstrado que a metodologia de dissolução não é capaz de demonstrar diferenças *in vivo* na velocidade de liberação desses fármacos (WHO, 2006; WHO, 2015; ARIETA, 2015).

Um fármaco é considerado altamente solúvel quando sua maior dose for solúvel em 250 mL ou menos de meio aquoso, em uma faixa de pH fisiológico de 1,0-6,8 a $37 \pm 1^\circ \text{C}$.

Adicionalmente, é considerado de alta permeabilidade quando a extensão da absorção em humanos é maior ou igual a 85%. Para realização de estudos de solubilidade, as agências reguladoras consideram como método de escolha a agitação orbital em frascos (*shake-flask*). Já para os estudos de permeabilidade, são considerados os estudos farmacocinéticos em humanos, como os testes de BA e perfusão *in vivo* utilizando seguimento intestinal (EMA, 2010; BRASIL, 2011a; FDA, 2015; WHO, 2015).

Como relatado acima, até recentemente as agências reguladoras possuíam divergências em relação às classes de fármacos candidatos a bioisenção. No entanto, com as recentes atualizações de seus guias, esses órgãos direcionaram-se para um consenso de que fármacos com elevada solubilidade, classes I e III, são os passíveis de bioisenção (FDA, 2015; EMA, 2010; WHO, 2015). No entanto a Anvisa ainda mantém apenas fármacos classe I como possíveis candidatos (BRASIL, 2011a).

Estudos relacionados à bioisenção de novos medicamentos vêm demonstrando que para vários fármacos, ainda existem informações inconsistentes na literatura sobre suas características biofarmacêuticas. Adicionalmente, tem sido observado que os dados encontrados normalmente não foram obtidos a partir de condições experimentais adequadas às exigências das agências regulatórias no contexto das bioisenções (STORPIRTIS, 2005; BELLAVINHA et al., 2014; SOUZA; MONTEIRO, 2014; FIP, 2016).

O grupo de pesquisa do Laboratório de Controle de Qualidade do PPG-Cipharma vem trabalhando há dez anos no sentido de contribuir para definição da classificação biofarmacêutica de fármacos, principalmente da classe dos anti-hipertensivos. Neste contexto, os fármacos losartana e candesartana, antagonistas dos receptores de Ang II (ARA II), foram recentemente estudados por nosso grupo de pesquisa. Os resultados obtidos nestes trabalhos levantaram a necessidade de também avaliar um terceiro fármaco deste grupo, a valsartana.

3.3 Valsartana: um antagonista dos receptores AT1 de angiotensina II (ARA II)

Em 1970 ocorreram as primeiras tentativas de desenvolvimento de antagonistas dos receptores de Angiotensina II terapeuticamente úteis. Dentre outras, a saralasin demonstrou ser um potente ARA II, porém, por não ser absorvida por via oral, necessitando de administração parenteral, o seu uso clínico não foi levado adiante. Em 1995 foi aprovado para uso clínico, um antagonista não peptídico seletivo dos receptores AT1, potente e ativo oralmente, a losartana. A partir daí surgiram outros antagonistas dos receptores AT1 (HILAL-DANDAN, 2012).

De acordo com a 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial “a hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA)”. Para controle desta doença são considerados dois tipos de tratamentos: o não medicamentoso e o medicamentoso. O primeiro inclui várias medidas, dentre elas o controle do peso; a modificação do estilo alimentar, em que existem vários tipos de padrões de dietas; a prática de atividades físicas e o consumo moderado de álcool. Já no tratamento medicamentoso são utilizados os medicamentos das seguintes classes: diuréticos, betabloqueadores, inibidores da enzima conversora da angiotensina, antagonistas do receptor AT1 da angiotensina e antagonistas dos canais de cálcio (SBC, 2016).

Dentre os anti-hipertensivos da classe dos ARA II comercialmente disponíveis no Brasil estão a candesartana, irbesartana, losartana, olmesartana, telmisartana e valsartana (SBC, 2010). A valsartana é caracterizada como um potente antagonista dos receptores de Ang II e é altamente seletivo para os receptores do tipo AT1 (FLESCHE et al., 1997). É utilizado no tratamento da hipertensão e possui um vasto mercado nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (SIDDIQUI et al., 2011). Vale também ressaltar a alta especificidade de ligação da valsartana a receptores AT1, assim como um excelente perfil de efeitos secundários, os quais oferecem boas condições para a adesão do paciente ao tratamento, apresentando elevada eficácia e longa duração (SAYDAM; TAKKA, 2007). No entanto, o único ARA II presente na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais é a losartana (RENAME, 2017).

A valsartana é eficaz no tratamento de crianças, adolescentes e pacientes idosos com hipertensão leve a moderada e possui segurança a longo prazo. A monoterapia com valsartana, 80 mg como dose inicial, demonstrou eficácia considerável em doentes com insuficiência cardíaca congestiva (ICC) e insuficiência renal juntamente com hipertensão. Já a terapia complementar ajudou a controlar a PA em grande população de pacientes com hipertensão grave que não respondem suficientemente aos β -bloqueadores, inibidores da ECA ou diuréticos (CHALLA et al., 2013).

A valsartana está disponível comercialmente no Brasil nas doses de 40, 80, 160 e 320 mg, além de associações com outros anti-hipertensivos como o besilato de anlodipino e hidroclorotiazida (ANVISA, 2009). Ainda, foi aprovada recentemente uma nova associação de sacubitril e valsartana, indicado para insuficiência cardíaca crônica sintomática (ANVISA, 2017).

3.3.1. Características farmacocinéticas

A valsartana é rapidamente absorvida após administração oral, atingindo os níveis plasmáticos máximos 2-4 horas após a sua administração. Apresenta meia vida de eliminação na faixa de 6-9 horas e sua biodisponibilidade oral relatada na literatura apresenta grande variação (10% a 35%) com média de 25%. Alguns autores determinaram a biodisponibilidade da valsartana por estudos em humanos e encontraram valores de 23% (FLESH et al., 1997; WELLINGTON; FAULDS, 2002); já Pérez e colaboradores em 2006, apresentaram valores de biodisponibilidade, também por estudos realizados em humanos, de 44,9%. Rajesh Kaza e colaboradores relatam que a valsartana possui baixa e variável biodisponibilidade oral (25%).

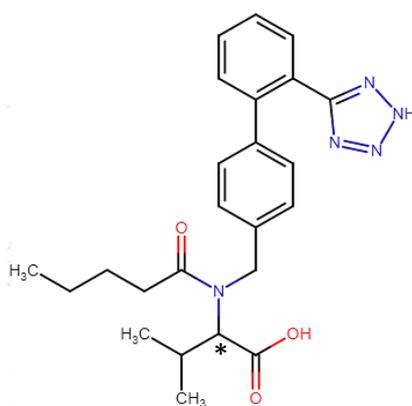
A valsartana possui alta taxa de ligação às proteínas plasmáticas (85-99%) e volume de distribuição de 17,0 litros (L). A depuração plasmática total deste fármaco é de 2,2 L/h, sendo que a depuração renal corresponde a cerca de 30% desta (0,62 L/h). A principal forma de eliminação da valsartana e de seu metabólito inativo é pelo processo biliar, onde 70% do fármaco é eliminado. Quando administrada como solução oral, é recuperada principalmente nas fezes (cerca de 83% da dose), na urina aparece cerca de 13% da dose. Sua recuperação é principalmente como fármaco inalterado, sendo apenas 20% da dose recuperada na forma de metabólitos. O principal metabólito, o valeril valsartan 4-hidroxi (M1) é formado por biotransformação oxidativa, sendo este inativo no tratamento da hipertensão, uma vez que possui menor afinidade (cerca de 200 vezes) pelos receptores AT1 em comparação com a valsartana (SAYDAM; TAKKA, 2007).

A valsartana é substrato tanto para transportadores de influxo (OATP1B1 e OATP1B3), quanto para de efluxo (MRP2); ambos envolvidos no transporte hepatobiliar da valsartana, uma vez que sua excreção ocorre principalmente por esta via e possui grupo carboxílico aniônico o qual favorece sua ligação aos transportadores aniônicos. Estes transportadores de influxo também estão presentes nos enterócitos, onde atuam na absorção intestinal, captando o fármaco para a corrente sanguínea (YAMASHIRO et al., 2006; KALLIOKOSKI; NIEMI, 2009; SKOLNIK et al., 2010). Além disso, a valsartana é substrato também para glicoproteína-P (P-gp), que promove o efluxo deste fármaco no sentido basolateral- apical (HEDAYA; HELMY, 2013; CHALLA et al., 2013; LOZOYA-AGULLO et al., 2015b).

3.3.2 Características Biofarmacêuticas

A valsartana, ácido (2S)-3-metil-2-[pentanoil-[[4-[2-[2H-tetrazol-5-il]fenil]fenil]metil]amino]butanoico (PubChem, 2016), é um pó de coloração branca e com faixa de fusão de 105 - 110°C (CRISCIONE et al., 1995; SAYDAM; TAKKA, 2007). Sua massa molar é 435,519 g/mol e sua fórmula química é C₂₄H₂₉N₅O₃ (SIDDIQUI et al., 2011). Sua estrutura química está apresentada na Figura 1.

Figura 1– Estrutura química da valsartana.



A valsartana possui dois grupos fracamente ácidos, o tetrazol e a hidroxila, representados por valores de pKa de 4,73 e 3,9, respectivamente. Em soluções com pH duas unidades abaixo de 3,9 o fármaco apresenta-se não ionizado e duas unidades acima se encontra ionizado, o que faz com que o composto seja solúvel em água na faixa de pH neutro. Além disso, possui um centro assimétrico e coexiste em solução nos valores de pH fisiológico como ácido não dissociado, o mono- ânion e o di- ânion (FLESCHE et al., 1997).

3.3.2.1 Solubilidade da Valsartana

Estudos biofarmacêuticos da valsartana encontrados na literatura apresentam diferentes dados de solubilidade, além de não terem sido realizados como o preconizado para uma definição de sua classificação pelo SCB. Assim, alguns autores classificam a valsartana como um fármaco de baixa solubilidade (classe II) e outros estudos a classificam como de alta solubilidade (classe III), demonstrando haver uma clara divergência nos dados obtidos.

Rajesh Kaza e colaboradores (2013) realizaram estudo da solubilidade da valsartana pelo método de equilíbrio, utilizando água e os meios 1,2, 6,8 e 7,4. Porém, a temperatura utilizada foi de 25 °C; vale ressaltar que a temperatura preconizada pelas agências reguladoras

para estudos de solubilidade é de 37 ± 1 °C, de forma a mimetizar as condições do TGI (EMA, 2010; BRASIL, 2011a; FDA, 2015; WHO, 2015). Os valores de solubilidade encontrados neste trabalho foram de 0,567 mg/mL em água e nos meios 1,2, 6,8 e 7,4 foram de 0,116 mg/mL, 0,304 mg/mL e 0,598 mg/mL respectivamente. Este autor ainda relata uma baixa e variável biodisponibilidade oral deste fármaco (KAZA et al., 2013). Além deste, outros autores a classificam como classe II, porém não apresentaram valores de solubilidade e afirmam, assim como Rajesh Kaza e colaboradores, que a valsartana possui baixa e variável biodisponibilidade oral (25%) (GOVINDASWAMY; UMASANKAR, 2014; CHOWDARY et al., 2014).

Contraditoriamente, Saydam e Takka (2007), classificaram a valsartana como classe III do SCB (alta solubilidade e baixa permeabilidade). Neste estudo, foi relatada a solubilidade do fármaco em água como sendo de 0,18 mg/mL e em tampão fosfato pH 8,0, de 16,8 mg/mL, porém também a temperatura de 25 °C. Estes autores relatam que a valsartana possui solubilidade dependente do pH. Outro estudo também classificou o fármaco como classe III, porém não foram apresentados dados de solubilidade e a biodisponibilidade descrita foi de aproximadamente 20 a 25 % (KUMAR et al., 2012a).

De acordo com Kassim e colaboradores (2003), a classificação da solubilidade de um fármaco é baseada no número de dose adimensional (Do), que é a razão da concentração do fármaco em um volume administrado de 250 mL para a solubilidade de saturação do fármaco em água. Fármacos que apresentam $Do \leq 1$ são classificados como de alta solubilidade. Ao contrário, os que apresentam $Do > 1$ são de baixa solubilidade. Neste estudo, a valsartana apresentou $Do = 1,28$, o que a classificaria como um fármaco de baixa solubilidade (KASSIM et al., 2003). Porém, este dado é utilizado somente como uma estimativa, uma vez que este não é o método de escolha para determinação da solubilidade.

Nalluri e colaboradores (2012) demonstraram que a solubilidade da valsartana em água foi de $0,249 \pm 0,020$ mg/mL e em tampão fosfato pH 6,8, a solubilidade do fármaco aumentou para $43,53 \pm 3,18$ mg/mL. Porém este estudo não apresentou a classificação da valsartana pelo SCB. No entanto, assim como Saydam e Takka (2007), relata uma solubilidade como dependente do pH.

3.3.2.2 Permeabilidade da Valsartana

A classificação da permeabilidade do fármaco pode basear-se no coeficiente de partição n-octanol/água estimado ($\log P$). Neste caso, o metoprolol é considerado como referência para permeabilidade uma vez que ele é 95% absorvido pelo trato gastrointestinal (TGI). Assim, fármacos que apresentam $\log P$ maior ou igual ao do metoprolol são considerados de alta permeabilidade (KASSIM et al., 2003; TAKAGI et al., 2006). De acordo com o banco de dados *Drug Bank*, o $\log P$ da valsartana é 5,8. Uma vez que este valor é maior do que o $\log P$ do metoprolol, que é de 1,72, a valsartana pode ser considerada como um fármaco de alta permeabilidade. Porém, mais uma vez de forma controversa, trabalhos relatam o valor do $\log P$ da valsartana como igual a 1,499 ($< 1,72$), o que a classificaria como fármaco de baixa permeabilidade (SAYDAM; TAKKA, 2007; SIDDIQUI et al., 2011). Apesar deste método para avaliação da permeabilidade não ser o método de escolha, ele serve como uma estimativa para a determinação da permeabilidade dos fármacos.

Para determinação da permeabilidade de acordo com o SCB são considerados os estudos farmacocinéticos em humanos (EMA, 2010; BRASIL, 2011a; FDA, 2015; WHO, 2015). Como um dos objetivos específicos deste trabalho é identificar e discutir as informações relativas à permeabilidade da valsartana encontradas na literatura, as mesmas serão apresentadas e discutidas no item resultados.

Ao serem avaliadas as informações biofarmacêuticas de solubilidade e permeabilidade da valsartana, pode ser observado que os estudos são inconclusivos e divergentes, além de obtidos em condições inadequadas para uma correta classificação pelo SCB. Assim, estudos adicionais são necessários para definição de sua classificação, o que justifica o desenvolvimento deste trabalho. Os resultados obtidos poderão contribuir para uma discussão segura sobre a possibilidade ou não de sua bioisecção.

**PARTE 1: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR
CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA VALSARTANA NOS MEIOS FGSSE (pH=1,2),
TA (pH=4,5) E SESSE (pH=6,8).**

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Desenvolvimento e validação de métodos analíticos por CLAE

O desenvolvimento de um método analítico envolve inicialmente, uma busca bibliográfica de condições experimentais já descritas para quantificação do analito de interesse, que são compiladas e então avaliadas experimentalmente, com adaptações ou não, visando obter os melhores resultados com menor tempo e custo. Adicionalmente, a implementação de um método, envolve um processo de avaliação que estime a sua eficiência (BRITO et al., 2003). Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve passar por uma avaliação denominada validação. A validação de um método analítico deve garantir por meio de estudos experimentais, que este atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (RIBANI et al., 2004).

A cromatografia à líquido de alta eficiência (CLAE), é um dos tipos de cromatografia por eluição mais utilizados (SKOOG, 2005). Esta técnica de separação vem se destacando devido à capacidade de realizar análises qualitativas e quantitativas em amostras ambientais, farmacêuticas, biológicas e em alimentos (RIBANI et al., 2004). Além disso, é uma técnica considerada bastante sensível e seletiva, em relação a outras técnicas, por exemplo, quando comparada à espectrofotometria (SKOOG, 2005).

Os parâmetros de validação variam de acordo com diferentes guias e resoluções, no entanto, é essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados (RIBANI et al., 2004). Os principais parâmetros de validação para um método analítico de quantificação são seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação e robustez (BRASIL, 2003c).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material

5.1.1 Substância química de referência (SQR) e insumo farmacêutico ativo (IFA)

Valsartana SQR: *United States Pharmacopeia* – USP, lote R009P0, válido por todo período do estudo.

Valsartana IFA Gemini®, lote 64614030402, válida por todo período do estudo.

5.1.2 Equipamentos e materiais

Aparelho de ultrassom Unique, modelo USC-1400;

Balança analítica Shimadzu, modelo AUX 220, com precisão de 0,01g;

Balança analítica Shimadzu, modelo AUX 220D, com precisão de 0,001g;

Bomba de vácuo Marconi, modelo MA057/2;

Coluna C18 Agilent (150 x 4,6 mm; 5 µm);

Cromatógrafo Waters Alliance e2695, com forno de injetor automático, detector de arranjo de diodos (DAD) e software Empower versão 2;

Equipamento de determinação de ponto de fusão Büchi M-560;

Espectrofotômetro de absorção no Infravermelho (FTIR) Varian 640-IR;

Estufa de secagem e esterilização Fanem, modelo 315 SE;

Membrana de celulose, 0,45 µm de poro, Millipore;

Potenciômetro HANNA;

Pipetas Gilson, volume ajustável de 10-100 µL, 20-200 µL 100-1000 µL; 1000-5000 µL;

Pipeta Kasvi, volume ajustável de 1000-5000 µL;

Ponteiras plásticas AXYGEN de 200 µL, 1000 µL e 5000 µL;

Sistema de purificação de água Millipore, modelo Direct – Q3 e Q8;

Unidade filtrante para seringa Millex – 0,45 µm de poro, 13 mm de diâmetro – Millipore

Vials de vidro âmbar Waters de 2 mL com tampa e septos de teflon.

5.1.3 Reagentes e Solventes

Acetato de sódio triidratado grau analítico Vetec;

Acetonitrila grau HPLC J. T. Baker;
Ácido acético glacial Vetec;
Ácido clorídrico Proquimios;
Água ultrapurificada em sistema Milli-Q;
Cloreto de sódio Neon;
Fosfato de potássio monobásico Neon;
Hidróxido de sódio Vetec;
Metanol grau HPLC J. T. Baker.

5.2 Métodos

5.2.1 Análise do Insumo Farmacêutico Ativo (IFA)

5.2.1.1 Análise por espectrofotometria na região do infravermelho

Foram realizadas análises por espectrofotometria na região do infravermelho do IFA de valsartana e SQR utilizando o dispositivo de reflectância total atenuada (ATR). Os espectros foram obtidos no modo de transmissão, no intervalo de 4000-600 cm^{-1} . Posteriormente foi realizada a comparação entre os espectros do IFA e da SQR, para caracterização da primeira.

5.2.1.2 Ponto de fusão

Para determinação do ponto de fusão do IFA, este foi introduzido em capilar de vidro e levado ao equipamento para a determinação da faixa de fusão. Esta faixa foi comparada aos valores encontrados na literatura.

5.2.2 Desenvolvimento do método cromatográfico para quantificação da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8)

Para o desenvolvimento do método para a quantificação da valsartana por CLAE nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8) foram consideradas as condições relatadas por Baek e colaboradores (2014); Júlio e colaboradores (2013); Vinzuda e

colaboradores (2010), assim como as condições descritas na Farmacopeia Americana (UNITED STATES, 2016) (Quadro 1).

Quadro 1 – Condições cromatográficas consideradas para o desenvolvimento do método por CLAE para quantificação de valsartana.

| Referência | Coluna | Fase móvel | Vol. Injeção | Fluxo | Detector/ λ | Temp. Coluna |
|----------------------|--------------------------------|--|--------------|------------|------------------------|--------------|
| UNITED STATES, 2016 | C18 4,6 mm x 25 cm; 10 μ m | ACN: água: ácido acético glacial (50:50:0.1) | 20 μ L | 1,0 ml/min | UV/ 230 nm | 30°C |
| BAEK et al., 2014 | C18 4.6 mm x 150 mm; 5 μ m | ACN: água (60:40), pH 3,0 ajustado com ácido fosfórico | 20 μ L | 1,0 ml/min | UV/ 247 nm | --- |
| JÚLIO et al., 2013 | C18 3.0 mm x 125 mm; 5 μ m | ACN: água: ácido acético glacial (50:50:0.1) | 10 μ L | 0,4 ml/min | DAD/ 273 nm | 25°C |
| VINZUDA et al., 2010 | C18 4,6 mm x 150 mm; 5 μ m | ACN: água: ácido acético glacial (50:50:0.1) | 20 μ L | 1,0 ml/min | UV/ 273 nm | 25°C |

5.2.2.1 Determinação das condições cromatográficas

O método por CLAE para a quantificação da valsartana foi desenvolvido em cromatógrafo Waters Alliance e2695, com detector de arranjo de diodos e coluna cromatográfica da marca Agilent ECLIPSE® XDB-C18 (4,6 x 150 mm; 5 μ m). O volume de injeção foi de 20 μ L, o comprimento de onda de 230 nm e a temperatura da coluna foi de 30°C.

As proporções de fase móvel foram variadas durante o desenvolvimento do método, sendo testadas as seguintes composições: (1) água: acetona; (2) água: metanol; (3) ácido acético 0,1% (v/v) em água: acetona; (4) ácido acético 0,1% (v/v) em água: metanol e (5) ácido acético 0,1% (v/v) em água: acetona: metanol. As diferentes condições da fase móvel foram testadas em fluxo de 1,0 e 1,2 mL/min.

5.2.2.2 Preparo da solução estoque (SE) de valsartana

Foram preparadas diferentes SE de valsartana de acordo com cada meio em que esta seria diluída posteriormente e com o estudo a ser utilizada. O modo de preparo está apresentado no Quadro 2.

Quadro 2 – Preparo das soluções estoque de valsartana.

| Solução estoque | Modo de preparo |
|------------------------|---|
| SE1 | Pesou-se quantidade exata de 5,0 mg de SQR e transferiu para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com metanol. A concentração da SE obtida foi de 1000 µg/mL |
| SE2 | Pesou-se quantidade exata de 20,0 mg de SQR e transferiu para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com metanol. A concentração da SE obtida foi de 4000 µg/mL |
| SE3 | Pesou-se quantidade exata de 9,0 mg de SQR e transferiu para balão volumétrico de 10,0 mL. O volume foi completado com metanol. A concentração da SE obtida foi de 900 µg/mL |
| SE4 | Pesou-se quantidade exata de 2,0 mg de SQR e transferiu para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com metanol. A concentração da SE obtida foi de 400 µg/mL |

5.2.2.3 Preparo das soluções diluídas

As soluções diluídas foram preparadas retirando-se alíquotas da SE e completando o volume com os meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8). Estes meios foram preparados conforme apresentado no Quadro 3 (UNITED STATES, 2015).

Quadro 3 – Preparo dos meios tamponados FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8).

| Meios tamponados | Modo de preparo |
|-------------------------|---|
| FGSSE (pH=1,2) | Foram dissolvidos 2,0 g de cloreto de sódio em 7,0 mL de ácido clorídrico e transferidos para um balão volumétrico de 1,0 L. O volume foi completado com água ultrapurificada |
| TA (pH=4,5) | Foram adicionados 2,99 g de acetato de sódio triidratado e 14,0 mL de ácido acético 2 mol/L em um balão volumétrico de 1,0 L. O volume foi completado com água ultrapurificada |
| SESSE (pH=6,8) | Foram adicionados 250 mL de uma solução de fosfato de potássio monobásico 0,2 mol/L e 112,0 mL de uma solução de hidróxido de sódio 0,2 mol/L em um balão volumétricos de 1,0 L. O volume foi completado com água ultrapurificada |

5.2.3 Validação do método analítico para quantificação da valsartana

O método analítico desenvolvido para quantificação da valsartana foi validado de acordo com a Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003c).

Apesar deste trabalho se enquadrar na finalidade I, da classificação de testes da RE 899 e não necessitar a realização dos parâmetros limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) (BRASIL, 2003c), estes foram determinados por meio das médias das inclinações e do desvio padrão do intercepto das curvas analíticas preparadas em cada um dos meios avaliados (BRASIL, 2003c). Não foram avaliadas de forma experimental, a precisão e exatidão para as concentrações estabelecidas como LQ, pois estas concentrações não foram utilizadas no presente trabalho. Foram validados dois intervalos devido aos diferentes estudos realizados. Estes estão apresentados nos itens seguintes como Intervalo 1 e Intervalo 2. Para a realização dos cálculos e análise estatística foi utilizado o Software Microsoft Excel® 2010.

5.2.3.1 Intervalo 1

A validação do Intervalo 1 foi realizada no intervalo de concentração de 2 a 12 µg/mL (pH=1,2), 10 a 60 µg/mL (pH=4,5) e 10 a 400 µg/mL (pH=6,8) e utilizado para quantificação da valsartana em estudos de solubilidade pelo método da agitação orbital em frascos e perfil de dissolução nos três meios tamponados, além da determinação da dissolução intrínseca no meio SESSE (pH=6,8).

5.2.3.1.1 Seletividade

A SE3 foi submetida à degradação por hidrólise ácida, alcalina e térmica nos três meios tamponados, porém somente a partir da hidrólise ácida houve formação de produto de degradação. Assim, uma alíquota de 1,0 mL da SE3 foi transferida para tubo de ensaio com 1,0 mL de HCl 3 mol/L. A solução foi exposta ao calor seco, em estufa a temperatura de $95 \pm 1^\circ\text{C}$ por 40 minutos. Após esse tempo, adicionou-se 1,0 mL de NaOH 3 mol/L para neutralização da solução. As diluições foram realizadas conforme descritas no Quadro 4.

Quadro 4 – Preparo de soluções diluídas a serem utilizadas na avaliação do parâmetro seletividade

| Meio tamponado | Diluição |
|----------------|---|
| FGSSE (pH=1,2) | Retirou-se uma alíquota de 500,0 µL da SE3, transferiu para balão de 10,0 mL e completou o volume com meio |
| TA (pH=4,5) | Retirou-se uma alíquota de 1000,0 µL da SE3, transferiu para balão de 10,0 mL e completou o volume com meio |
| SESSE (pH=6,8) | Retirou-se uma alíquota de 1000,0 µL da SE3, transferiu para balão de 2,0 mL e completou o volume com meio |

Para a comprovação da seletividade foi avaliada a capacidade do método de separar o pico da valsartana, analito de interesse, dos picos dos produtos de degradação por meio da análise dos cromatogramas e pela pureza cromatográfica do pico.

5.2.3.1.2 Linearidade

A linearidade foi determinada por meio de 6 concentrações. A partir das SE1 e SE2, foram preparadas soluções diluídas nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8), em triplicata. Os dados das curvas analíticas encontram-se nas Tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1 – Preparo das soluções diluídas de valsartana a partir da SE1 contendo 1000 µg/mL para avaliação da linearidade no meio FGSSE (pH=1,2).

| Concentração final (µg/mL) | Alíquota da SE (µL) | Solução diluente q.s.p (mL) |
|----------------------------|---------------------|-----------------------------|
| 2,0 | 100,0 | 50,0 |
| 4,0 | 100,0 | 25,0 |
| 6,0 | 60,0 | 10,0 |
| 8,0 | 80,0 | 10,0 |
| 10,0 | 100,0 | 10,0 |
| 12,0 | 120,0 | 10,0 |

Solução diluente = tampão utilizado para diluição.

Tabela 2 – Preparo das soluções diluídas de valsartana a partir da SE1 contendo 1000 µg/mL para avaliação da linearidade no meio TA (pH=4,5).

| Concentração (µg/mL) | Alíquota da SE (µL) | Solução diluente q.s.p (mL) |
|----------------------|---------------------|-----------------------------|
| 10,0 | 100,0 | 10,0 |
| 20,0 | 200,0 | 10,0 |
| 30,0 | 60,0 | 2,0 |
| 40,0 | 80,0 | 2,0 |
| 50,0 | 100,0 | 2,0 |
| 60,0 | 120,0 | 2,0 |

Solução diluente = tampão utilizado para diluição.

Tabela 3 – Preparo das soluções diluídas de valsartana a partir da SE2 contendo 4000 µg/mL para avaliação da linearidade no meio SESSE (pH=6,8).

| Concentração (µg/mL) | Alíquota da SE (µL) | Solução diluente q.s.p (mL) |
|----------------------|---------------------|-----------------------------|
| 10,0 | 125,0 | 50,0 |
| 50,0 | 125,0 | 10,0 |
| 100,0 | 50,0 | 2,0 |
| 200,0 | 100,0 | 2,0 |
| 300,0 | 150,0 | 2,0 |
| 400,0 | 200,0 | 2,0 |

Solução diluente = tampão utilizado para diluição.

A linearidade do método analítico foi avaliada pelos parâmetros: coeficientes de determinação e correlação linear (R^2 e R), coeficiente angular (a), coeficiente linear (b) e resíduos da regressão.

5.2.3.1.3 Precisão

A precisão intra-corrída (repetibilidade) do método, foi avaliada em três níveis de concentração: baixa, média e alta, em triplicata. Assim como esta, a precisão inter-corrídas (intermediária) também foi avaliada em três níveis de concentração (baixa, média e alta, em triplicata), porém em três dias consecutivos, dando um total de 27 determinações.

A determinação da precisão foi feita em cada um dos meios tamponados FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8) e para cada nível de concentração foi calculado o desvio padrão relativo (DPR), sendo que o critério de aceitação de acordo com a RE nº 899 é de DPR menor do que 5%. O cálculo do DPR foi realizado de acordo com a Equação 1 (BRASIL, 2003c).

Equação 1 – Equação utilizada para o cálculo do DPR na determinação do parâmetro precisão.

$$DPR = \left(\frac{DP}{CMD} \right) * 100$$

Onde: DP é o desvio padrão das replicatas de cada uma das três determinações (baixa, média e alta) e CMD a concentração média determinada.

As concentrações utilizadas para determinação da precisão nos meios tamponados encontram-se apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Concentração das soluções de valsartana em µg/mL para determinação da precisão nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH= 4,5) e SESSE (pH=6,8).

| Nível de concentração | FGSSE (pH=1,2) | TA (pH=4,5) | SESSE (pH=6,8) |
|-----------------------|----------------|-------------|----------------|
| Baixo | 4,0 | 20,0 | 50,0 |
| Médio | 8,0 | 40,0 | 200,0 |
| Alto | 12,0 | 60,0 | 400,0 |

5.2.3.1.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada em três níveis de concentração: baixo, médio e alto, em triplicata para cada um dos meios tamponados FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8). O cálculo da exatidão foi realizado de acordo com a Equação 2.

Equação 2 – Equação utilizada para o cálculo do parâmetro exatidão.

$$Exatidão = \left(\frac{Concentração\ média\ experimental}{Concentração\ teórica} \right) * 100$$

O método é considerado exato quando a concentração determinada está compreendida em um intervalo de 95 a 105% (KUMAR, 2012b). Os dados utilizados para determinação da exatidão encontram-se apresentados na Tabela 4, contida no item 5.2.3.1.3.

5.2.3.1.5 Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os parâmetros LD e LQ foram calculados por meio das médias das inclinações e do desvio padrão do intercepto de três curvas analíticas obtidas de cada um dos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8). O cálculo dos parâmetros LD e LQ foram realizados de acordo com as Equações 3 e 4.

Equação 3 – Equação utilizada para o cálculo do parâmetro limite de detecção.

$$LD = \left(\frac{DPa}{IC} \right) * 3$$

Equação 4 – Equação utilizada para o cálculo do parâmetro limite de quantificação.

$$LQ = \left(\frac{DPa}{IC} \right) * 10$$

Onde: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo y de no mínimo três curvas analíticas e IC é a inclinação da curva analítica.

5.2.3.1.6 Robustez

Para a determinação da robustez foram avaliados os seguintes parâmetros de variação: % de ácido acético na fase móvel, composição da fase móvel, temperatura e fluxo. Para cada um destes parâmetros foram preparadas soluções com concentrações de 8,0; 40,0 e 200,0 µg/mL para os meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8), respectivamente. Estes foram injetados em triplicata para cada nível de variação que se encontra no Quadro 5.

Quadro 5 – Parâmetros avaliados para determinação da robustez do método para a quantificação da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8).

| Parâmetro | Nível -1 | Nominal | Nível +1 |
|--------------------|----------------------|--------------------|---------------------|
| % de ácido acético | 0,099% (v/v) em água | 0,1% (v/v) em água | 0,11% (v/v) em água |
| Composição da FM | 50:50 | 52:48 | 54:46 |
| Temperatura (°C) | 25 | 30 | 35 |
| Fluxo (mL/min) | 0,9 | 1,0 | 1,1 |

5.2.3.2 Intervalo 2

A validação do Intervalo 2 foi parcial (linearidade, precisão, exatidão e limites de detecção e quantificação) e realizada nos intervalos de concentrações de 0,5 a 6,0 µg/mL (pH=1,2) e 2,0 a 40,0 µg/mL (pH=4,5). A validação desta faixa de concentração foi necessária para determinação da dissolução intrínseca nos meios FGSSE (pH=1,2) e TA (pH=4,5).

5.2.3.2.1 Linearidade

A linearidade foi determinada como descrito em Intervalo 1, item 5.2.3.1.2. Os dados referentes à preparação das curvas analíticas estão apresentados nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 – Preparo das soluções diluídas de valsartana a partir da SE4 contendo 400 µg/mL para avaliação da linearidade no meio FGSSE (pH=1,2).

| Concentração final (µg/mL) | Alíquota da SE (µL) | Solução diluente q.s.p (mL) |
|----------------------------|---------------------|-----------------------------|
| 0,5 | 125,0 | 100,0 |
| 1,0 | 250,0 | 10,0 |
| 2,0 | 50,0 | 10,0 |
| 3,0 | 75,0 | 10,0 |
| 4,0 | 100,0 | 10,0 |
| 6,0 | 150,0 | 10,0 |

Solução diluente = tampão utilizado para diluição.

Tabela 6 – Preparo das soluções diluídas de valsartana a partir da SE4 contendo 400 µg/mL para avaliação da linearidade no meio TA (pH=4,5).

| Concentração (µg/mL) | Alíquota da SE (µL) | Solução diluente q.s.p (mL) |
|----------------------|---------------------|-----------------------------|
| 2,0 | 50,0 | 10,0 |
| 6,0 | 150,0 | 10,0 |
| 10,0 | 50,0 | 2,0 |
| 20,0 | 100,0 | 2,0 |
| 30,0 | 150,0 | 2,0 |
| 40,0 | 200,0 | 2,0 |

Solução diluente = tampão utilizado para diluição.

A linearidade do método analítico foi avaliada pelos parâmetros: coeficientes de determinação e correlação linear (R^2 e R), coeficiente angular (a), coeficiente linear (b) e resíduos da regressão.

5.2.3.2.2 Precisão

Os resultados de precisão intra-corrída, bem como a inter-corrída foram determinados como descrito em Intervalo 1, item 5.2.3.1.3. Os dados utilizados para o preparo das soluções empregadas na determinação da precisão nos meios tamponados encontram-se apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Concentração das soluções de valsartana em µg/mL para determinação da precisão nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8).

| Nível de concentração | FGSSE (pH=1,2) | TA (pH=4,5) |
|-----------------------|----------------|-------------|
| Baixo | 1,0 | 6,0 |
| Médio | 3,0 | 20,0 |
| Alto | 6,0 | 40,0 |

5.2.3.2.3 Exatidão

A exatidão foi determinada como descrito em Intervalo 1, item 5.2.3.1.4. Os dados utilizados para o preparo das soluções encontram-se apresentados na Tabela 7 (item 5.2.3.2.2)

5.2.3.2.4 Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O LD e LQ foram calculados conforme as fórmulas apresentadas em Intervalo 1 (Figuras 5 e 6), item 5.2.3.1.5 (BRASIL, 2003c).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Análise do Insumo Farmacêutico Ativo (IFA)

6.1.1 Análise por espectrofotometria na região do infravermelho

Para o desenvolvimento deste trabalho, primeiramente foi feita uma análise para identificação do IFA Gemini® adquirido. Um método que já é bem utilizado e de grande importância para identificação de substâncias é a espectroscopia no infravermelho (VALDERRAMA, 2005). Esta análise foi realizada e pode-se observar que o espectro obtido na região do infravermelho para o IFA se mostrou semelhante ao da SQR (Figura 2), contendo as principais bandas características com frequências próximas ao relatado na literatura (Tabela 8) (CAPPELLO et al., 2006; COATES, 2006; ISLAS et al., 2012; RAJESWARI et al., 2012; GURRAPU et al., 2012; NAVEEN et al., 2012; XU et al., 2014). Após a comparação com o espectro da SQR, pode-se afirmar que o IFA corresponde a valsartana.

Figura 2 – Espectros na região do infravermelho da SQR e IFA.

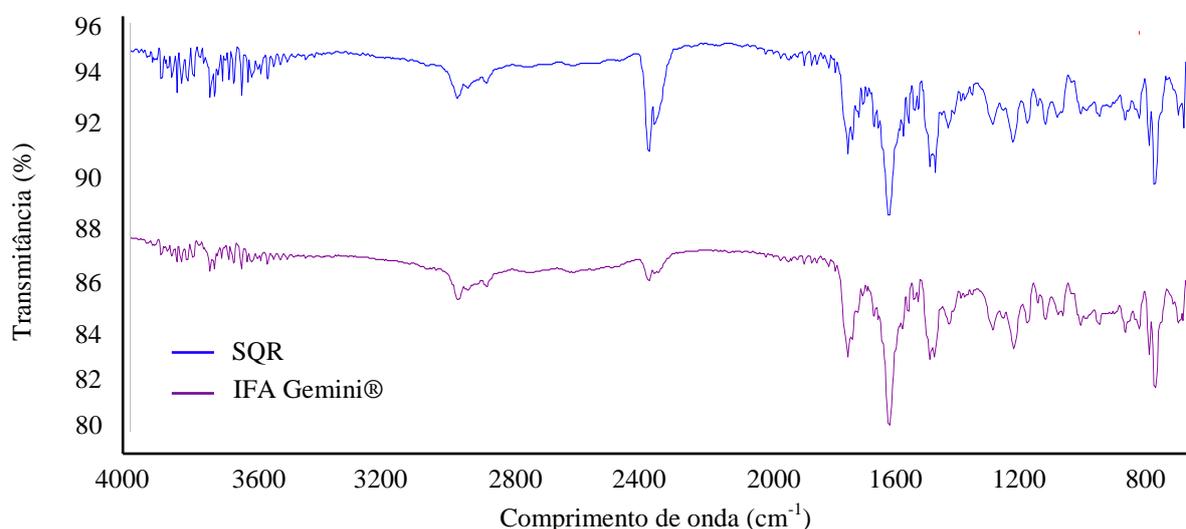


Tabela 8 – Frequências de absorção das principais bandas no espectro de infravermelho da valsartana SQR e IFA.

| Frequência do grupo (número de onda cm^{-1}) | Atribuição |
|---|-------------------------|
| 2964,43 | C-H |
| 1732,00 | C=O (ácido carboxílico) |
| 1601,61 | C=O (amida) / C=N |
| 1463,76 | C=C (aromático) |

6.1.2 Ponto de fusão

O ponto de fusão de uma substância pura é a temperatura em que a fase sólida e a fase líquida coexistem, ou seja, entram em equilíbrio (LENZI et al, 2004). Esta propriedade física se destaca como critério básico na determinação do grau de pureza de substâncias, sendo intrínseca de cada uma podendo, portanto, ser caracterizada por um ponto ou por uma faixa de fusão (DIAS et al., 2014).

A faixa de fusão do IFA Gemini® avaliada foi de 104,4 a 109,8 °C. De acordo com a literatura, a faixa de fusão para este fármaco está entre 105 a 110°C (CRISCIONE et al., 1995; SAYDAM; TAKKA, 2007), desta forma, este foi considerado puro.

6.2 Desenvolvimento de método cromatográfico para quantificação da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8)

Para a determinação das condições foram avaliadas as variáveis relatadas na literatura, bem como as do método farmacopeico (Quadro 1). Durante o desenvolvimento do método, a temperatura e o volume de injeção foram mantidos conforme o método farmacopeico (UNITED STATES, 2016). O comprimento de onda também foi mantido, porém foi usado o detector DAD. A coluna utilizada foi uma C18 (4,6 x 150 mm; 5 µm).

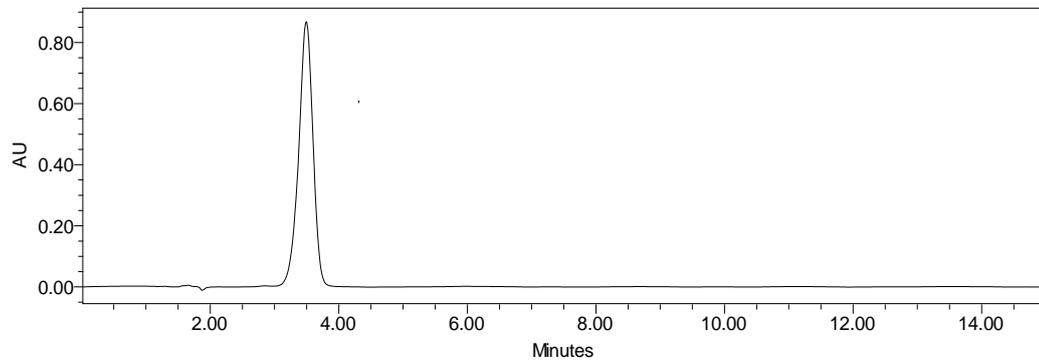
Primeiramente foi avaliada uma fase móvel diferente da proposta no método farmacopeico. O objetivo foi tentar minimizar danos na coluna cromatográfica e no equipamento, evitando adição de ácido na composição da fase móvel. Além disso, trocou-se o componente orgânico para o metanol por questões ambientais e devido aos gastos. Assim, foram testadas as seguintes proporções de fase móvel: metanol: água (50: 50) e acetonitrila: água (50: 50).

A utilização tanto de metanol, quanto de acetonitrila com água, não foram capazes de promover a eluição do pico. Então, foi testada a fase móvel contendo ácido acético conforme descrito no método farmacopeico.

Primeiramente foi utilizado o metanol como solvente orgânico, na seguinte proporção: metanol: ácido acético 0,1% (v/v) em água (50: 50). Com esta condição não foi observado o sinal cromatográfico durante o tempo de corrida (15 minutos), então se optou por aumentar a proporção do solvente, uma vez que, em cromatografia de fase reversa, quando se aumenta o solvente apolar (orgânico), há um aumento da força de eluição, diminuindo, portanto o tempo de retenção do analito (SKOOG et al., 2005). Dessa forma, foi testada uma nova proporção de

fase móvel: metanol: ácido acético 0,1% (v/v) em água (75: 25). O cromatograma obtido nessas condições está apresentado na Figura 3.

Figura 3 – Cromatograma obtido para a solução de valsartana utilizando metanol: ácido acético 0,1% (v/v) em água (75: 25). Concentração da amostra de 200 µg/mL.



Apesar do sinal cromatográfico possuir intensidade satisfatória, seu fator de cauda foi de 0,87, foi assimétrico ($As = 0,75$), saiu com baixo tempo de retenção e largura de 0,7 mm, próximo ao volume morto. Assim, mais uma vez foi alterada a proporção da fase móvel, foram testadas: metanol: ácido acético 0,1% (v/v) em água (70: 30) e (72:28), cujos cromatogramas estão representados nas Figuras 4 e 5.

Figura 4 – Cromatograma obtido para a solução de valsartana utilizando metanol: ácido acético 0,1% (v/v) em água (70: 30). Concentração da amostra de 200 µg/mL.

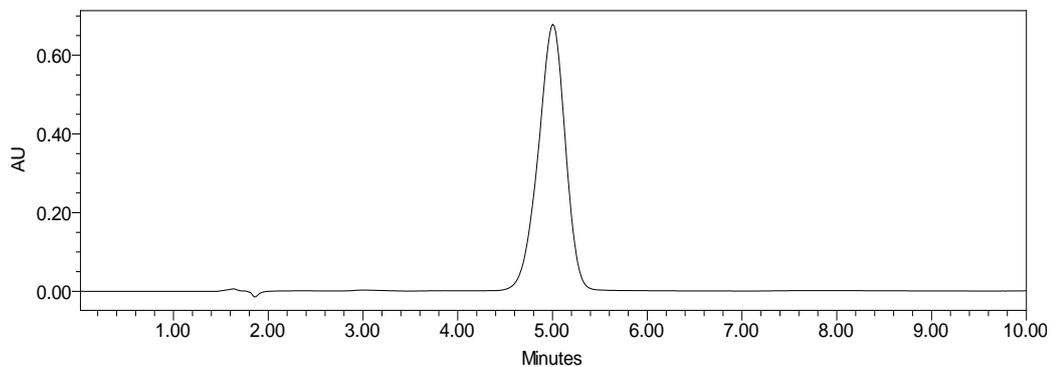
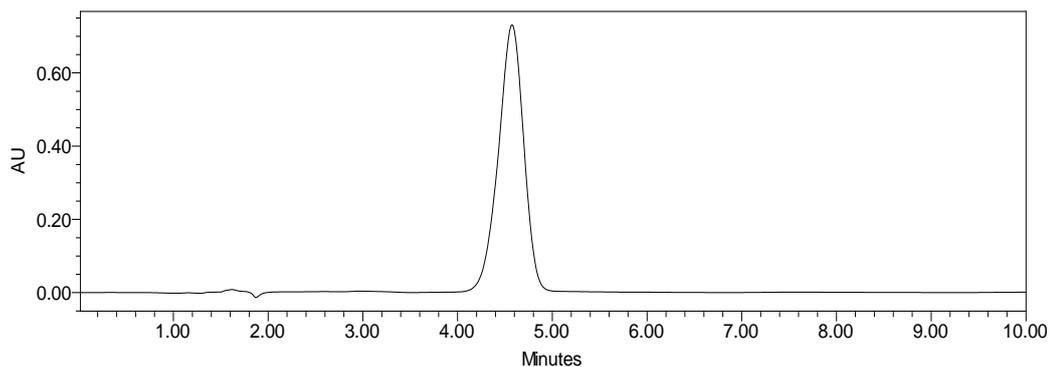


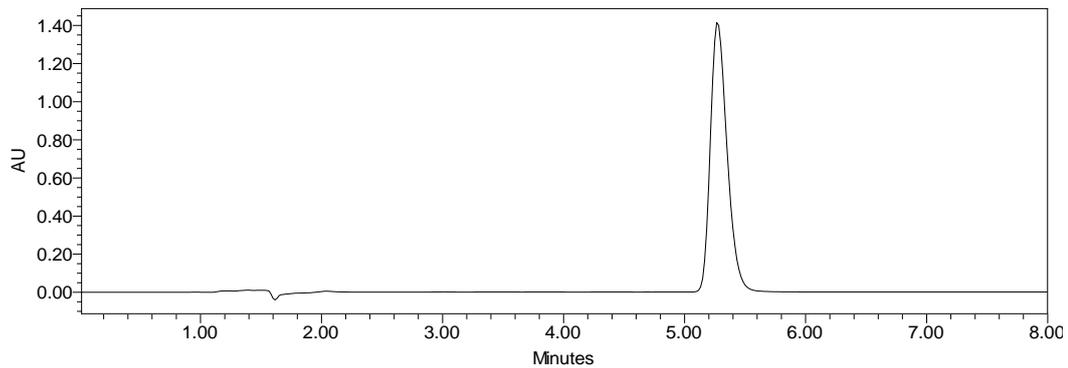
Figura 5 – Cromatograma obtido para a solução de valsartana utilizando metanol: ácido acético 0,1% (v/v) em água (72: 28). Concentração da amostra de 200 µg/mL.



Ao diminuir a proporção de solvente orgânico (Figuras 4 e 5) o tempo de retenção aumentou (5,004 e 4,575 minutos) como esperado, porém houve um alargamento do sinal cromatográfico (1,4 e 1,1 cm) e este continuou assimétrico ($A_s = 0,83$) para ambas as proporções apresentadas, com fator de cauda de 0,87 e 0,91.

Foi testada a fase móvel de acordo com o método farmacopeico: acetonitrila: ácido acético 0,1% (v/v) em água (50: 50). O cromatograma está apresentado na Figura 6.

Figura 6 – Cromatograma obtido para a solução de valsartana utilizando acetonitrila: ácido acético 0,1% (v/v) em água (50: 50). Concentração da amostra de 200 $\mu\text{g/mL}$.



Com a utilização da acetonitrila como solvente orgânico a intensidade do sinal cromatográfico aumentou e a largura diminuiu (0,8 mm), porém, o pico se manteve assimétrico ($A_s = 1,3$), com fator de cauda de 1,3 e apresentou tempo de retenção de 5,273 minutos. Então foram avaliadas outras proporções, aumentando-se a quantidade do solvente orgânico, de forma a diminuir o tempo de retenção.

Foram testadas duas proporções da fase móvel contendo acetonitrila: ácido acético 0,1% (v/v) em água, sendo elas: (55: 45) e (60: 40). Os cromatogramas são mostrados nas Figuras 7 e 8.

Figura 7 – Cromatograma obtido para a solução de valsartana utilizando acetonitrila: ácido acético 0,1% (v/v) em água (55: 45). Concentração da amostra de 200 $\mu\text{g/mL}$.

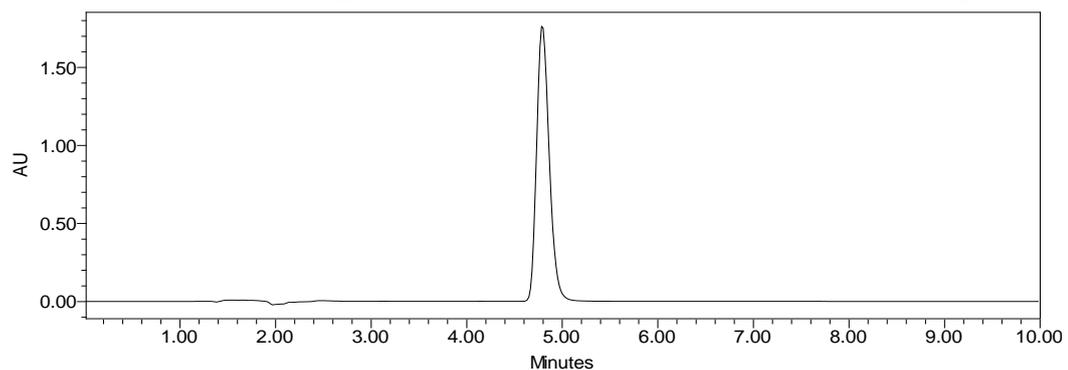
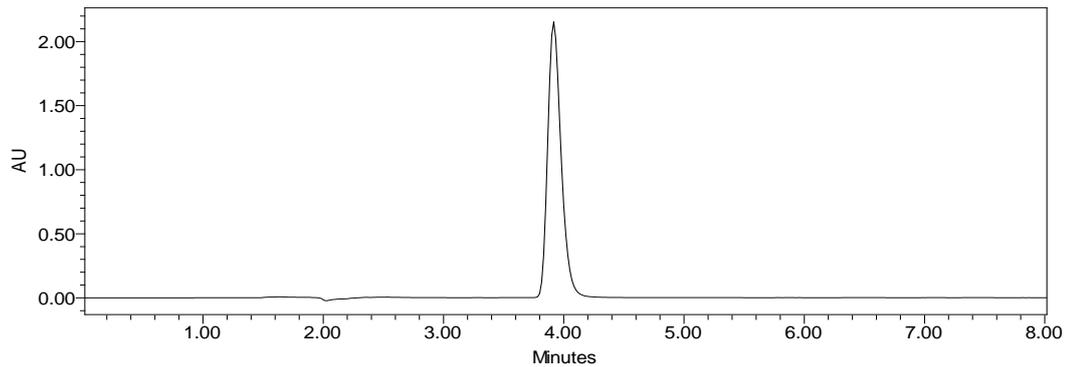


Figura 8 – Cromatograma obtido para a solução de valsartana utilizando acetonitrila: ácido acético 0,1% (v/v) em água (60: 40). Concentração da amostra de 200 µg/mL.



O sinal cromatográfico de ambas as proporções apresentadas (Figuras 7 e 8) melhorou consideravelmente, uma vez que se apresentou simétrico ($A_s = 1,0$), com fator de cauda de 1,0 e mais estreito (0,6 mm) do que os anteriormente avaliados. Os tempos de retenção foram de 4,791 e 3,917 minutos, respectivamente.

Na tentativa do gasto mínimo de acetonitrila, por economia e questões ambientais, foi avaliada a fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético 0,1% (v/v) em água com diferentes proporções e fluxos (Tabela 9). O cromatograma referente a estas condições está apresentado na Figura 9 e os parâmetros cromatográficos calculados encontram-se na Tabela 10.

Tabela 9 – Diferentes proporções da fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético 0,1% (v/v) em água, testadas em diferentes fluxos.

| Proporção | Fluxo (mL/min) |
|---------------|----------------|
| 1) 65: 10: 25 | 1,0 |
| 2) 55: 15: 30 | 1,2 |
| 3) 60: 10: 30 | 1,2 |
| 4) 60: 10: 30 | 1,0 |
| 5) 50: 20: 30 | 1,0 |

Figura 9 – Cromatograma obtido para a solução de valsartana utilizando Metanol: acetonitrila: ácido acético 0,1% (v/v) em água em diferentes proporções e fluxos. (1) 65: 10: 25 - 1,0 mL/min; (2) 55: 15: 30 - 1,2 mL/min; (3) 60: 10: 30 - 1,2 mL/min; (4) 60: 10: 30 - 1,0 mL/min; (5) 50: 20: 30 - 1,0 mL/min. Concentração da amostra de 200 µg/mL.

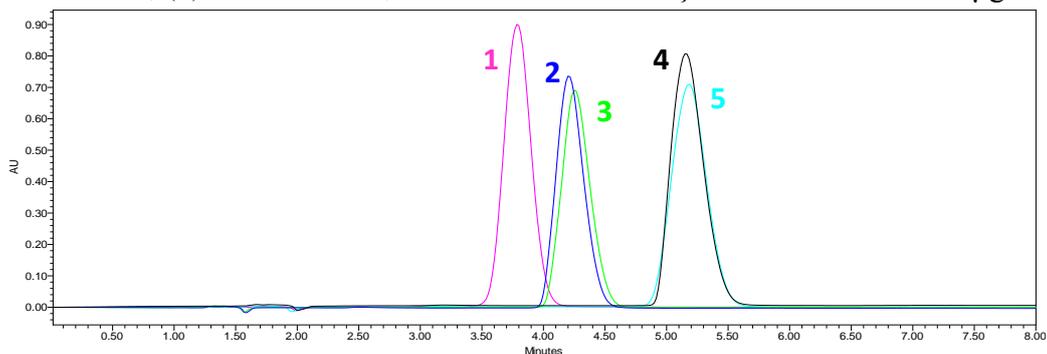


Tabela 10 – Parâmetros calculados para cada cromatograma obtido para a solução de valsartana utilizando Metanol: acetonitrila: ácido acético 0,1% (v/v) em água em diferentes proporções e fluxos. (1) 65: 10: 25 - 1,0 mL/min; (2) 55: 15: 30 - 1,2 mL/min; (3) 60: 10: 30 - 1,2 mL/min; (4) 60: 10: 30 - 1,0 mL/min; (5) 50: 20: 30 - 1,0 mL/min. Concentração da amostra de 200 µg/mL.

| Cromatograma | Largura do pico (cm) | Fc | As |
|--------------|----------------------|------|------|
| 1 | 1,4 | 0,87 | 0,85 |
| 2 | 1,4 | 1,16 | 1,16 |
| 3 | 1,5 | 1,07 | 1,16 |
| 4 | 1,6 | 1,14 | 1,30 |
| 5 | 1,8 | 1,12 | 1,14 |

Fc= fator de cauda do pico cromatográfico; As= assimetria.

Dentre as condições testadas (Tabela 9), a 1 e 2 foram as que apresentaram melhores resultados em relação aos parâmetros cromatográficos avaliados (Tabela 10). Porém, o sinal cromatográfico com a utilização da acetonitrila como solvente orgânico se mostrou mais intenso e simétrico. O tempo de retenção foi compatível com o tempo e o número de análises previstas, bem como, distante do tempo morto (1,6 min). Além disso, não foi tão longo o que favorece menor gasto de solvente e agilidade na obtenção dos resultados, tendo em vista o grande número de análises a serem realizadas no desenvolvimento do trabalho.

Por fim, foi feita a comparação das condições cromatográficas que proporcionaram melhores resultados utilizando as três combinações de solvente que foram testadas, visando definir as que iriam compor o método para posterior validação. Esta comparação está apresentada na Figura 10 e os parâmetros cromatográficos calculados para cada uma destas condições encontram-se na Tabela 11.

Figura 10 – Cromatograma obtido para a solução de valsartana utilizando diferentes proporções de fase móvel e fluxo: (1) acetonitrila: ácido acético 0,1% (v/v) em água (60: 40) - 1,0 mL/min; (2) metanol: acetonitrila: ácido acético 0,1% (v/v) em água (55:15:30) - 1,2 mL/min e (3) metanol: ácido acético 0,1% (v/v) em água (72:28) - 1,0 mL/min.

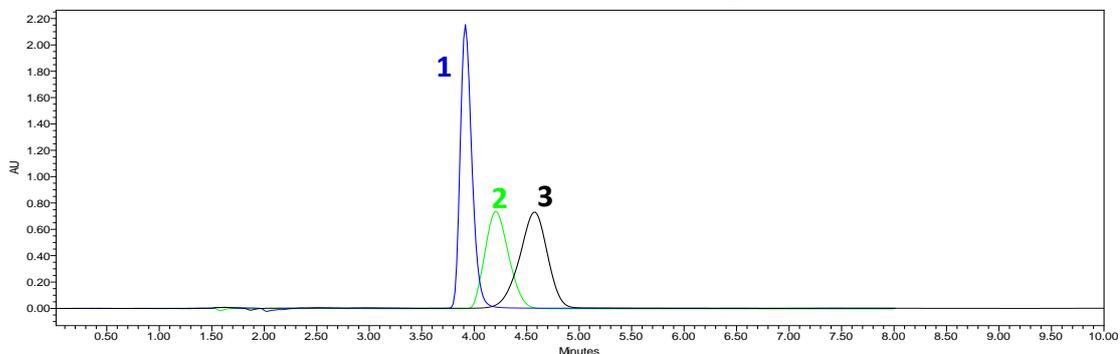


Tabela 11 – Parâmetros calculados para cada cromatograma obtido para a solução de valsartana utilizando diferentes proporções de fase móvel e fluxo: (1) acetonitrila: ácido acético 0,1% (v/v) em água (60: 40) - 0,1 mL/min; (2) metanol: acetonitrila: ácido acético 0,1% (v/v) em água (55:15:30) - 1,2 mL/min e (3) metanol: ácido acético 0,1% (v/v) em água (72:28) - 1,0 mL/min.

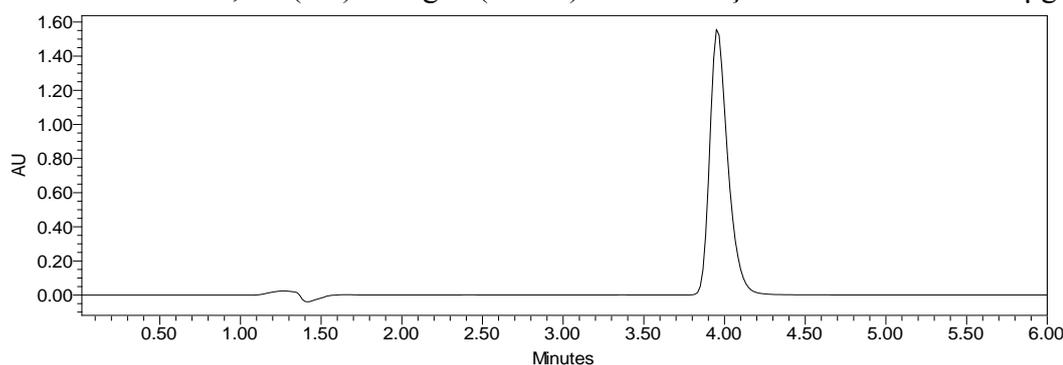
| Cromatograma | Largura do pico (cm) | Fc | As |
|--------------|----------------------|------|------|
| 1 | 0,6 | 1,00 | 1,00 |
| 2 | 1,1 | 1,10 | 1,00 |
| 3 | 1,4 | 0,87 | 0,87 |

Fc= fator de cauda do pico cromatográfico; As= assimetria.

Ao analisar os parâmetros referentes a estas condições (Tabela 11), podemos observar nitidamente que a acetonitrila (1) foi o solvente orgânico que mostrou melhor resultado. O sinal cromatográfico apresentou ótima simetria, sem presença de cauda e tempo de retenção adequado (3,917 minutos). Assim, as condições para o método de quantificação da valsartana haviam sido determinadas: coluna C18 (4,6 x 150 mm; 5 µm), fase móvel acetonitrila: ácido acético 0,1% (v/v) em água (60: 40), fluxo de 1,0 mL/min, temperatura da coluna de 30 °C, detecção por DAD a 230 nm, volume de injeção de 20 µL e tempo de corrida de 6,0 minutos.

Porém, em injeções posteriores não foi observada reprodução no tempo de retenção, este fato ocorreu logo após o equipamento ter passado por manutenção, o que provavelmente interferiu nas condições. Desta forma, foi necessário o ajuste da proporção da fase móvel para: acetonitrila: ácido acético 0,1% (v/v) em água (52: 48) (Figura 11).

Figura 11 – Cromatograma obtido para a solução de valsartana utilizando acetonitrila: ácido acético 0,1% (v/v) em água (52: 48). Concentração da amostra de 200 µg/mL.



Os parâmetros cromatográficos tempo de retenção, fator de cauda e assimetria obtidos, foram adequados para o método de quantificação da valsartana (Tabela 12). Desta forma, foram definidas as condições do método analítico, que estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 12 – Parâmetros cromatográficos para o método de quantificação da valsartana.

| Tr (min) | Fc | As |
|----------|-----|-----|
| 3,956 | 1,0 | 1,0 |

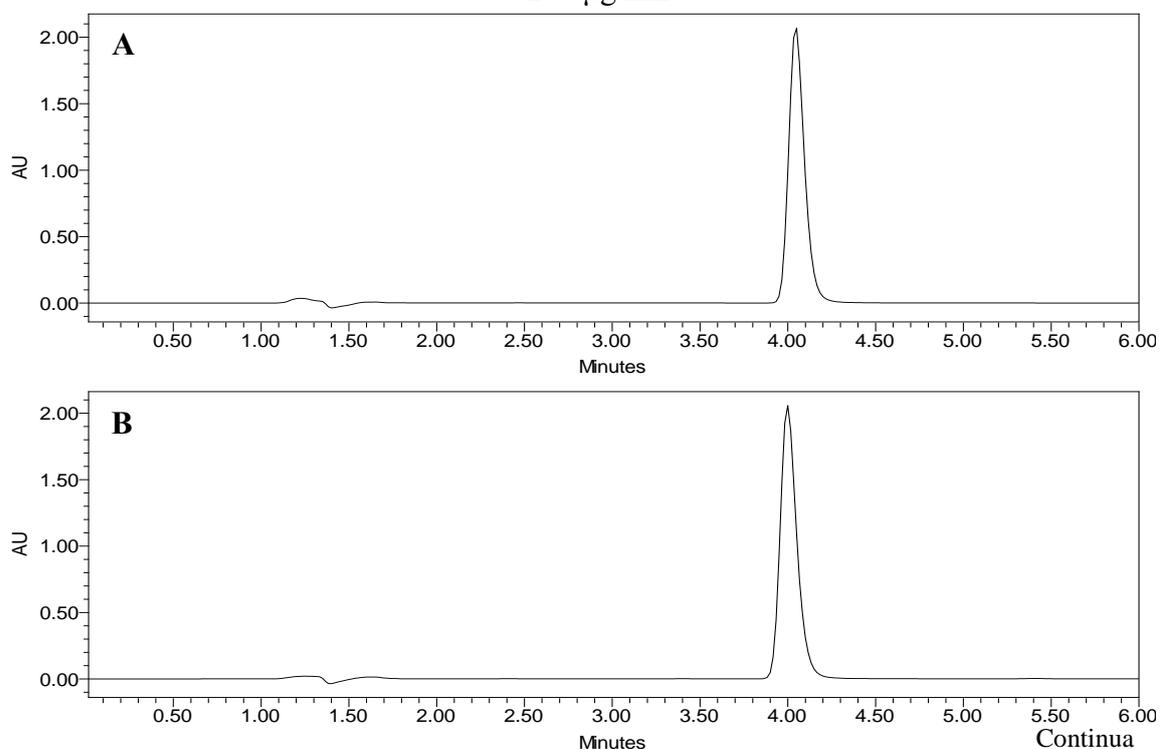
Tr= tempo de retenção do analito; Fc= fator de cauda do pico cromatográfico; As= assimetria.

Tabela 13 – Condições analíticas definidas para quantificação da valsartana.

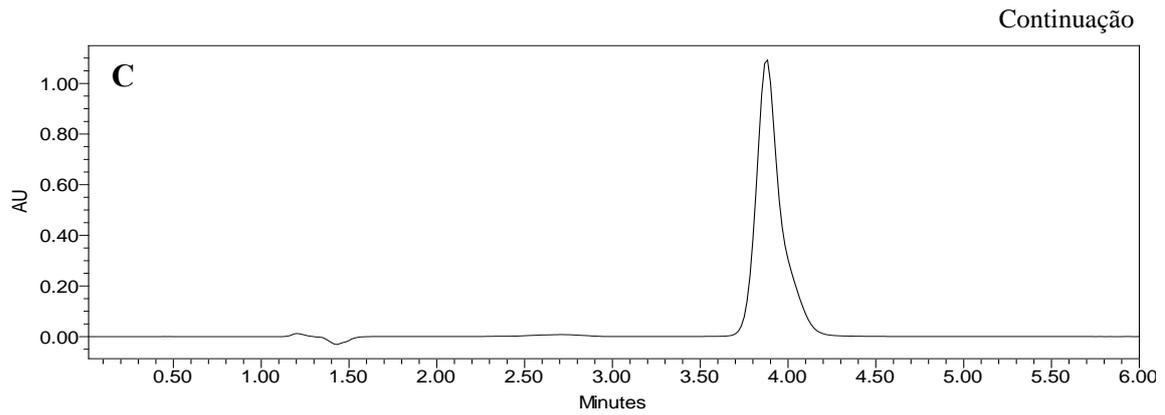
| Parâmetro | Especificação |
|----------------------------|---|
| Coluna | C18 (4,6 x 150 mm; 5 µm) |
| Fase móvel | acetonitrila: ácido acético 0,1% (v/v) em água (52: 48) |
| Fluxo (mL/min) | 1,0 |
| Temperatura da coluna (°C) | 30 |
| Deteção | DAD |
| Comprimento de onda (λ) | 230 |
| Volume de injeção (µL) | 20 |
| Tempo de corrida (min) | 6,0 |

Após a definição das condições cromatográficas, foram preparadas soluções de valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8), que seriam utilizados nos estudos de solubilidade e dissolução. Os cromatogramas estão apresentados na Figura 12.

Figura 12 – Cromatogramas obtidos para quantificação da valsartana nos meios tamponados (A) FGSSE (pH=1,2), (B) TA (pH=4,5) e (C) SESSE (pH=6,8). Concentração da amostra de 200 µg/mL.



Continua



Os parâmetros referentes aos cromatogramas da Figura 12 estão apresentados na Tabela 14. A variação dos tempos de retenção se deve aos diferentes valores de pH dos meios.

Tabela 14 – Parâmetros cromatográficos para o método de quantificação da valsartana.

| Meios | Tr (min) | Fc | As |
|----------------|----------|-----|-----|
| FGSSE (pH=1,2) | 4,047 | 1,1 | 1,1 |
| TA (pH=4,5) | 4,000 | 1,1 | 1,1 |
| SESSE (pH=6,8) | 3,878 | 1,2 | 1,4 |

Tr= tempo de retenção do analito; Fc= fator de cauda do pico cromatográfico; As= assimetria.

6.3 Validação do método analítico para quantificação da valsartana

6.3.1 Intervalo 1

6.3.1.1 Seletividade

Os resultados obtidos para comprovação do parâmetro seletividade, originados da degradação por hidrólise ácida, com HCl 3 mol/L, a $95 \pm 1^\circ\text{C}$, por 40 minutos, em cada um dos meios tamponados, estão apresentados nas Figuras 13, 14 e 15.

Figura 13 – Cromatograma obtido com a solução diluída de valsartana no meio FGSSE (pH=1,2). Concentração da amostra 15 $\mu\text{g/mL}$.

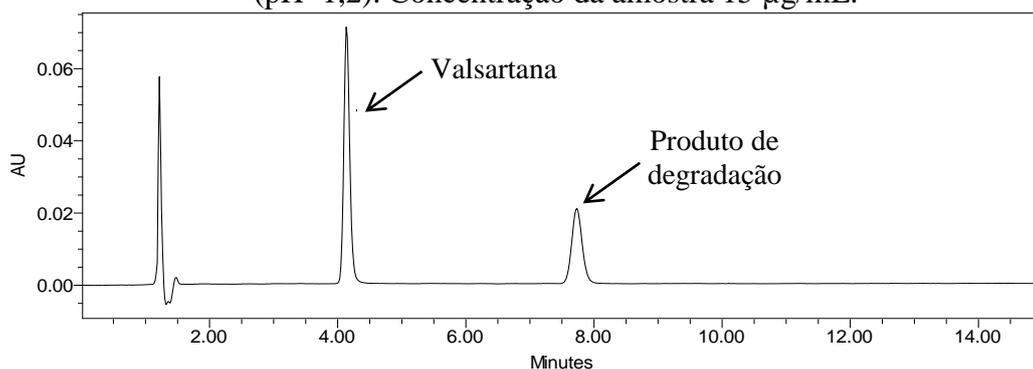


Figura 14 – Cromatograma obtido com a solução diluída de valsartana no meio TA (pH=4,5).
Concentração da amostra 30 µg/mL.

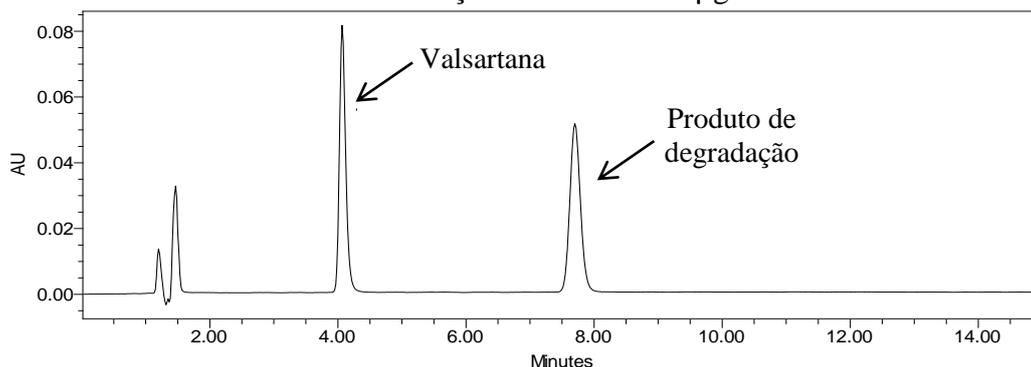
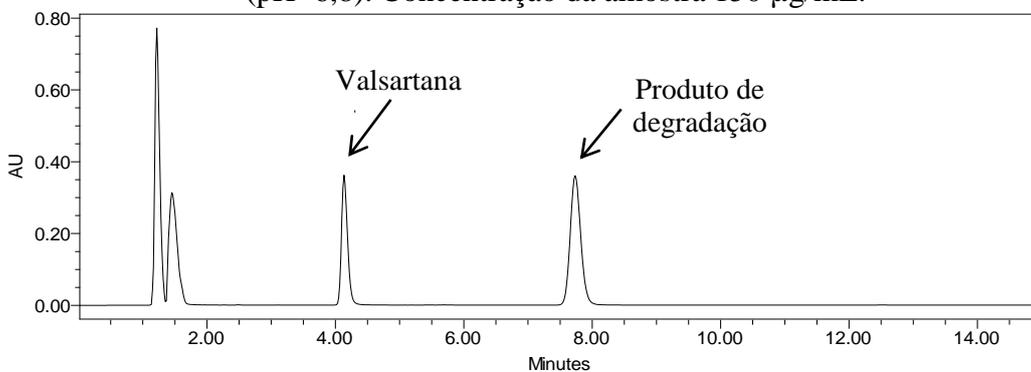


Figura 15 – Cromatograma obtido com a solução diluída de valsartana no meio SESSE (pH=6,8). Concentração da amostra 150 µg/mL.



Para cada um dos cromatogramas foi feita a pureza cromatográfica do pico. Os valores dos ângulos determinados e de referência estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 – Valores dos ângulos determinados e de referência para avaliação da pureza de pico do método cromatográfico para quantificação da valsartana.

| Meios tamponados | Ângulo determinado | Ângulo de referência |
|------------------|--------------------|----------------------|
| FGSSE (pH=1,2) | 0,188 | 0,404 |
| TA (pH=4,5) | 0,170 | 0,380 |
| SESSE (pH=6,8) | 0,059 | 0,277 |

De acordo com os resultados obtidos para a determinação da seletividade (Figuras 13 a 15), pode-se observar que o método foi capaz de separar o pico da valsartana do produto de degradação gerado nos três meios tamponados.

Além disso, ao analisar os dados obtidos por meio do *software* Empower 2 da Waters® (Tabela 15), relativos aos valores dos ângulos determinados e de referência para avaliação da pureza de pico do método cromatográfico, observamos que os valores dos

ângulos determinados foram menores do que os de referência, o que confirma que não houve coeluição de picos de produto de degradação com cromóforo semelhante com o pico da valsartana (BRASIL, 2003c).

6.3.1.2 Linearidade

A seguir estão apresentadas as curvas analíticas médias seguidas dos gráficos referentes aos resíduos das regressões lineares obtidas para os métodos desenvolvidos empregando cada um dos meios tamponados FGSSE (pH=1,2) (Figuras 16 e 17), TA (pH=4,5) (Figuras 18 e 19) e SESSE (pH=6,8) (Figuras 20 e 21).

Figura 16 – Curva analítica para o método de quantificação da valsartana no meio FGSSE (pH=1,2).

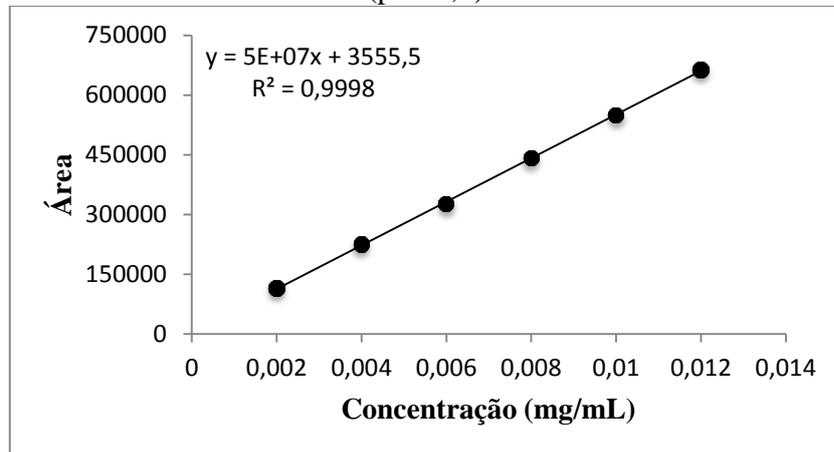


Figura 17 – Gráfico de resíduos da regressão para a valsartana no meio FGSSE (pH=1,2).

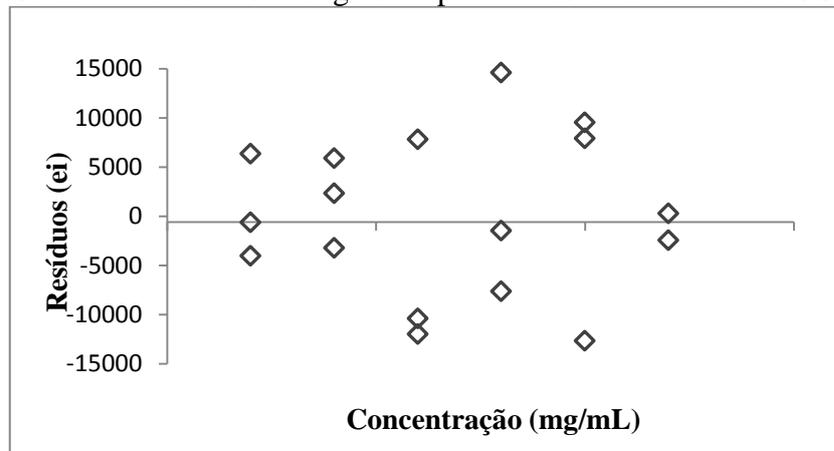


Figura 18 – Curva analítica para o método de quantificação da valsartana no meio TA (pH=4,5).

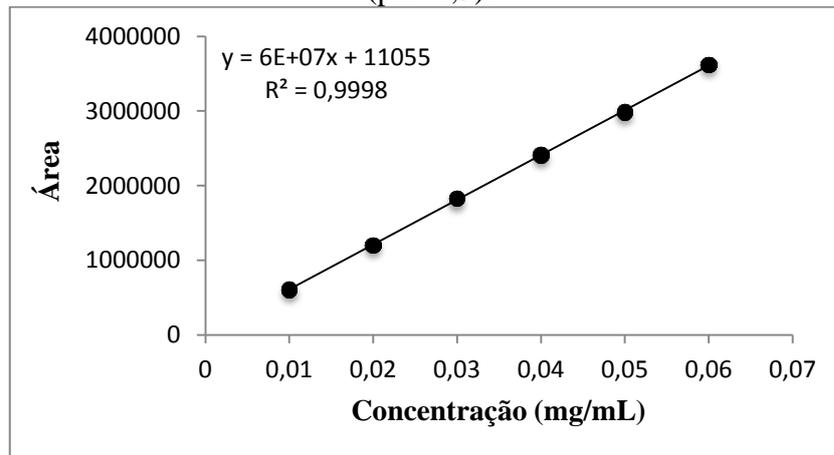


Figura 19 – Gráfico de resíduos da regressão para a valsartana no meio TA (pH=4,5).

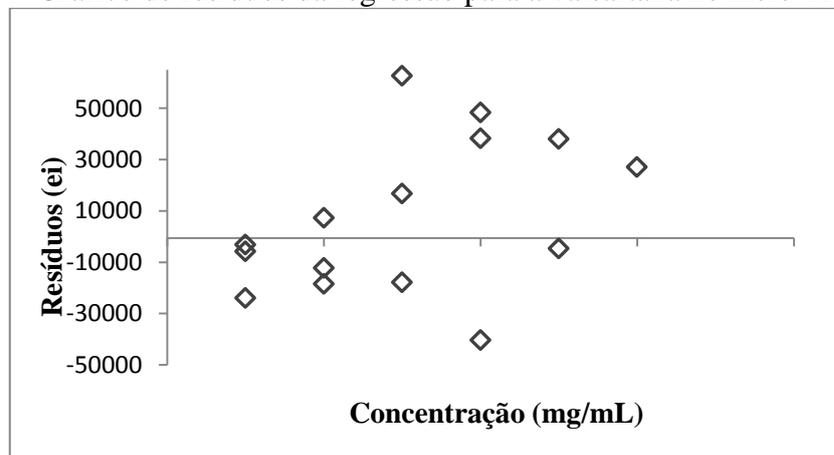


Figura 20 – Curva analítica para o método de quantificação da valsartana no meio SESSE (pH=6,8).

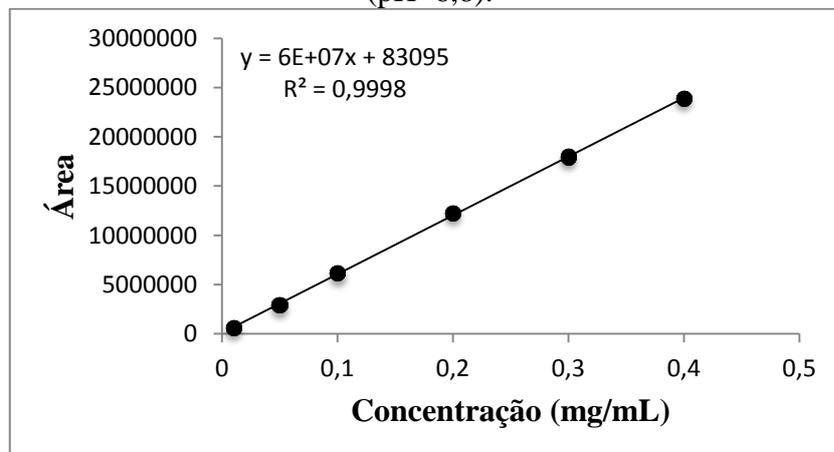
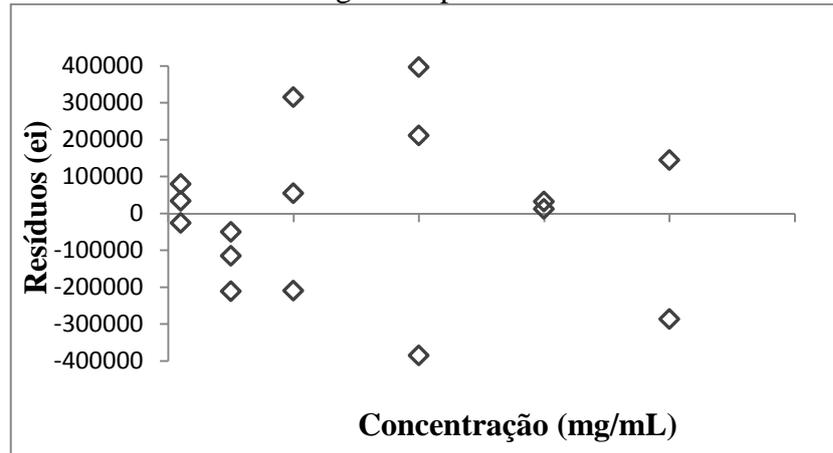


Figura 21 – Gráfico de resíduos da regressão para a valsartana no meio SESSE (pH=6,8).



Em relação à linearidade dos métodos, ao analisar os parâmetros da regressão que foram obtidos, em cada um dos meios tamponados FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8) (Tabela 17), observa-se que os valores dos coeficientes de correlação linear foram maiores do que o mínimo preconizado pela RE 899, que é de 0,99, confirmando, portanto a linearidade da regressão (BRASIL, 2003c).

Em relação aos resíduos obtidos em cada um dos meios tamponados (Figuras 17, 19 e 21), estes apresentaram uma distribuição aleatória ao longo do eixo 0, o que significa que não é evidenciada tendência. Assim, a significância das regressões foi calculada por ANOVA e os valores estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Significância das regressões da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8).

| Significância da regressão | | |
|-----------------------------------|--------------------|------------------|
| Meio tamponado | F calculado | F crítico |
| FGSSE (pH=1,2) | 7983,11 | 4,54 |
| TA (pH=4,5) | 12347,85 | 4,54 |
| SESSE (pH=6,8) | 21232,68 | 4,60 |

F= valor do coeficiente calculado de acordo com a ANOVA.

Para que haja significância das regressões, os valores calculados no teste F devem ser maiores do que os de F crítico. Isto foi observado nos resultados (Tabela 16), confirmando que as regressões são significativas e o método adequado para a quantificação da valsartana na faixa de concentração selecionada para cada um dos meios.

Na Tabela 17, estão descritos os parâmetros da regressão que foram obtidos para o método de quantificação da valsartana em cada um dos meios tamponados.

Tabela 17 – Parâmetros da regressão linear obtidos para a quantificação da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8).

| Parâmetros da regressão | FGSSE (pH=1,2) | TA (pH=4,5) | SESSE (pH=6,8) |
|-------------------------|----------------|-------------|----------------|
| a | 54745729 | 59964114 | 59718421 |
| b | 3555,511 | 11054,67 | 83094,67 |
| R ² | 0,9998 | 0,9998 | 0,9998 |
| R | 0,9998 | 0,9998 | 0,9998 |

a= coeficiente angular; b= coeficiente linear; R²= coeficiente de determinação; R= coeficiente de correlação linear.

6.3.1.3 Precisão

Os resultados da precisão intra-corrída e inter-corrídas, para cada um dos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8), estão apresentados nas Tabelas 18 a 21.

Tabela 18– Análise da precisão intra-corrída (repetibilidade) para o método de quantificação da valsartana no meio FGSSE (pH=1,2).

| Dia | Nível | Concentração teórica (µg/mL) | Concentração média real (µg/mL) (n=3) | DPR (%) |
|-----|-------|------------------------------|---------------------------------------|---------|
| 1° | CB | 4,00 | 4,07 | 3,09 |
| | CM | 8,00 | 8,21 | 3,56 |
| | CA | 12,00 | 12,12 | 1,65 |
| 2° | CB | 4,00 | 4,17 | 2,01 |
| | CM | 8,00 | 8,13 | 2,58 |
| | CA | 12,00 | 12,18 | 2,06 |
| 3° | CB | 4,00 | 4,07 | 3,09 |
| | CM | 8,00 | 8,21 | 3,56 |
| | CA | 12,00 | 12,12 | 1,65 |

CB= concentração baixa; CM= concentração média; CA= concentração alta.
DPR= Desvio Padrão Relativo.

Tabela 19 – Análise da precisão intra-corrída (repetibilidade) para o método de quantificação da valsartana no meio TA (pH=4,5).

| Dia | Nível | Concentração teórica (µg/mL) | Concentração média real (µg/mL) (n=3) | DPR (%) |
|-----|-------|------------------------------|---------------------------------------|---------|
| 1° | CB | 20,00 | 20,32 | 4,10 |
| | CM | 40,00 | 39,77 | 2,72 |
| | CA | 60,00 | 60,51 | 2,08 |
| 2° | CB | 20,00 | 20,28 | 1,10 |
| | CM | 40,00 | 40,44 | 2,00 |
| | CA | 60,00 | 60,56 | 2,69 |
| 3° | CB | 20,00 | 19,38 | 3,19 |
| | CM | 40,00 | 39,46 | 0,78 |
| | CA | 60,00 | 60,45 | 0,68 |

CB= concentração baixa; CM= concentração média; CA= concentração alta.
DPR= Desvio Padrão Relativo.

Tabela 20 – Análise da precisão intra-corrída (repetibilidade) para o método de quantificação da valsartana no meio SESSE (pH=6,8).

| Dia | Nível | Concentração teórica (µg/mL) | Concentração média real (µg/mL) (n=3) | DPR (%) |
|------------|--------------|-------------------------------------|--|----------------|
| 1° | CB | 50,00 | 50,27 | 2,69 |
| | CM | 200,00 | 206,67 | 3,31 |
| | CA | 400,00 | 401,24 | 3,18 |
| 2° | CB | 50,00 | 48,76 | 2,45 |
| | CM | 200,00 | 200,44 | 2,35 |
| | CA | 400,00 | 399,21 | 2,11 |
| 3° | CB | 50,00 | 48,84 | 2,09 |
| | CM | 200,00 | 201,96 | 2,55 |
| | CA | 400,00 | 399,72 | 3,31 |

CB= concentração baixa; CM= concentração média; CA= concentração alta.

DPR= Desvio Padrão Relativo.

Tabela 21 – Precisão inter-corrídas (intermediária) para o método de quantificação da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8).

| Meio tamponado | Nível | Concentração teórica (µg/mL) | Concentração média real (µg/mL) (n=9) | DPR (%) |
|-----------------------|--------------|-------------------------------------|--|----------------|
| FGSSE (pH=1,2) | CB | 4,00 | 4,13 | 2,64 |
| | CM | 8,00 | 8,15 | 2,30 |
| | CA | 12,00 | 12,17 | 1,40 |
| TA (pH=4,5) | CB | 20,00 | 19,99 | 3,80 |
| | CM | 40,00 | 39,89 | 3,04 |
| | CA | 60,00 | 60,51 | 2,47 |
| SESSE (pH=6,8) | CB | 50,00 | 49,29 | 2,58 |
| | CM | 200,00 | 203,02 | 2,78 |
| | CA | 400,00 | 400,06 | 2,54 |

CB= concentração baixa; CM= concentração média; CA= concentração alta.

DPR= Desvio Padrão Relativo.

De acordo com os resultados da precisão intra-corrída e inter-corrídas, para cada um dos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8) (Tabelas 18 a 21), pode-se observar que todos os valores do DPR foram menores do que 5% (BRASIL, 2003c), concluindo que o método para a quantificação da valsartana é preciso na faixa de concentração selecionada.

6.3.1.4 Exatidão

Os resultados da exatidão, para cada um dos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8), estão apresentados nas Tabelas 22 a 24.

Tabela 22 – Análise da exatidão para o método de quantificação da valsartana no meio FGSSE (pH=1,2).

| Dia | Nível | Concentração teórica (µg/mL) | Concentração média real (µg/mL) (n=3) | Exatidão (%) |
|------------|--------------|-------------------------------------|--|---------------------|
| 1º | CB | 4,00 | 4,07 | 101,79 |
| | CM | 8,00 | 8,21 | 102,58 |
| | CA | 12,00 | 12,12 | 100,96 |
| 2º | CB | 4,00 | 4,17 | 104,17 |
| | CM | 8,00 | 8,13 | 101,63 |
| | CA | 12,00 | 12,18 | 101,52 |
| 3º | CB | 4,00 | 4,14 | 103,46 |
| | CM | 8,00 | 8,12 | 101,46 |
| | CA | 12,00 | 12,21 | 101,72 |

CB= concentração baixa; CM= concentração média; CA= concentração alta.

Tabela 23 – Análise da exatidão para o método de quantificação da valsartana no meio TA (pH=4,5).

| Dia | Nível | Concentração teórica (µg/mL) | Concentração média real (µg/mL) (n=3) | Exatidão (%) |
|------------|--------------|-------------------------------------|--|---------------------|
| 1º | CB | 20,00 | 20,32 | 101,60 |
| | CM | 40,00 | 39,77 | 99,42 |
| | CA | 60,00 | 60,51 | 100,85 |
| 2º | CB | 20,00 | 20,28 | 101,38 |
| | CM | 40,00 | 40,44 | 101,10 |
| | CA | 60,00 | 60,56 | 100,94 |
| 3º | CB | 20,00 | 19,38 | 96,92 |
| | CM | 40,00 | 39,46 | 98,65 |
| | CA | 60,00 | 60,45 | 100,75 |

CB= concentração baixa; CM= concentração média; CA= concentração alta.

Tabela 24 – Análise exatidão para o método de quantificação da valsartana no meio SESSE (pH=6,8).

| Dia | Nível | Concentração teórica (µg/mL) | Concentração média real (µg/mL) (n=3) | Exatidão (%) |
|------------|--------------|-------------------------------------|--|---------------------|
| 1º | CB | 50,00 | 50,27 | 100,54 |
| | CM | 200,00 | 206,67 | 103,33 |
| | CA | 400,00 | 401,24 | 100,31 |
| 2º | CB | 50,00 | 48,76 | 97,51 |
| | CM | 200,00 | 200,44 | 100,22 |
| | CA | 400,00 | 399,21 | 99,80 |
| 3º | CB | 50,00 | 48,84 | 97,67 |
| | CM | 200,00 | 201,96 | 100,98 |
| | CA | 400,00 | 399,72 | 99,93 |

CB= concentração baixa; CM= concentração média; CA= concentração alta.

Uma vez que não há determinação de critérios para o parâmetro de exatidão (BRASIL, 2003c), foram avaliadas indicações da literatura e foi considerado o trabalho de Kumar e

colaboradores (2012b), o qual assume que o valor deve estar compreendido entre 95 e 105%. Observou-se que os valores da exatidão para cada um dos meios avaliados (Tabelas 22 a 24), ficaram dentro da faixa estabelecida, o que confirma a exatidão do método.

6.3.1.5 Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

Os valores de LD e LQ calculados estão apresentados na Tabela 25 (BRASIL, 2003c).

Tabela 25 – Valores de LD e LQ para o método de quantificação da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8).

| Meio tamponado | LD ($\mu\text{g/mL}$) | LQ ($\mu\text{g/mL}$) |
|----------------|-------------------------|-------------------------|
| FGSSE (pH=1,2) | 0,15 | 0,51 |
| TA (pH=4,5) | 1,40 | 4,67 |
| SESSE (pH=6,8) | 1,02 | 3,41 |

De acordo com os valores apresentados para cada um dos meios (Tabela 25), a menor concentração da faixa de trabalho se encontra acima dos valores de LD e LQ calculados.

6.3.1.6 Robustez

Os resultados das médias das concentrações obtidas com as variações das condições determinadas para cada um dos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8), estão apresentados nas Tabelas 26 a 28.

Tabela 26 – Resultados das médias das concentrações e DPR para avaliação da robustez do método de quantificação da valsartana no meio FGSSE (pH=1,2).

| Condição | Concentração média (n=3) ($\mu\text{g/mL}$) | DPR (%) |
|---------------------------|---|---------|
| Fluxo (-) | 7,32 | 10,12 |
| Fluxo (nominal) | 8,12 | |
| Fluxo (+) | 8,97 | |
| Temperatura (-) | 8,01 | 2,35 |
| Temperatura nominal | 8,37 | |
| Temperatura (+) | 8,07 | |
| Composição (-) | 8,30 | 1,94 |
| Composição (nominal) | 8,37 | |
| Composição (+) | 8,06 | |
| % ácido acético (-) | 8,40 | 0,48 |
| % ácido acético (nominal) | 8,37 | |
| % ácido acético (+) | 8,32 | |

DPR= Desvio Padrão Relativo.

Tabela 27 – Resultados das médias das concentrações e DPR para avaliação da robustez do método de quantificação da valsartana no meio TA (pH=4,5).

| Condição | Concentração média (n=3) (µg/mL) | DPR (%) |
|---------------------------|---|----------------|
| Fluxo (-) | 4,54 | 10,10 |
| Fluxo (nominal) | 4,08 | |
| Fluxo (+) | 3,71 | |
| Temperatura (-) | 4,08 | 0,57 |
| Temperatura nominal | 4,13 | |
| Temperatura (+) | 4,09 | |
| Composição (-) | 4,14 | 0,49 |
| Composição (nominal) | 4,13 | |
| Composição (+) | 4,10 | |
| % ácido acético (-) | 4,14 | 0,19 |
| % ácido acético (nominal) | 4,13 | |
| % ácido acético (+) | 4,14 | |

DPR= Desvio Padrão Relativo.

Tabela 28 – Resultados das médias das concentrações e DPR para avaliação da robustez do método de quantificação da valsartana no meio SESSE (pH=6,8).

| Condição | Concentração média (n=3) (µg/mL) | DPR (%) |
|---------------------------|---|----------------|
| Fluxo (-) | 1,85 | 9,57 |
| Fluxo (nominal) | 2,04 | |
| Fluxo (+) | 2,24 | |
| Temperatura (-) | 2,02 | 0,68 |
| Temperatura nominal | 2,04 | |
| Temperatura (+) | 2,04 | |
| Composição (-) | 2,04 | 1,17 |
| Composição (nominal) | 2,04 | |
| Composição (+) | 2,00 | |
| % ácido acético (-) | 2,04 | 0,17 |
| % ácido acético (nominal) | 2,04 | |
| % ácido acético (+) | 2,04 | |

DPR= Desvio Padrão Relativo.

De acordo com os resultados obtidos (Tabelas 26 a 28), os valores de DPR das determinações referentes à variação da proporção e composição da fase móvel, bem como da temperatura foram inferiores a 5%. Segundo RIBANI et al. (2004) o método pode ser considerado robusto se as mudanças nos parâmetros estiverem dentro dos limites de exatidão, precisão e seletividade aceitáveis.

Com relação ao fluxo, que apresentou um DPR maior do que 5% sugere-se que haja o controle rigoroso deste parâmetro durante a execução do método.

6.3.2 Intervalo 2

6.3.2.1 Linearidade

A seguir estão apresentadas as curvas analíticas médias e os gráficos referentes aos resíduos das regressões lineares obtidas em cada um dos meios tamponados FGSSE (pH=1,2) (Figuras 22 e 23) e TA (pH=4,5) (Figuras 24 e 35).

Figura 22 – Curva analítica para o método de quantificação da valsartana no meio FGSSE (pH=1,2).

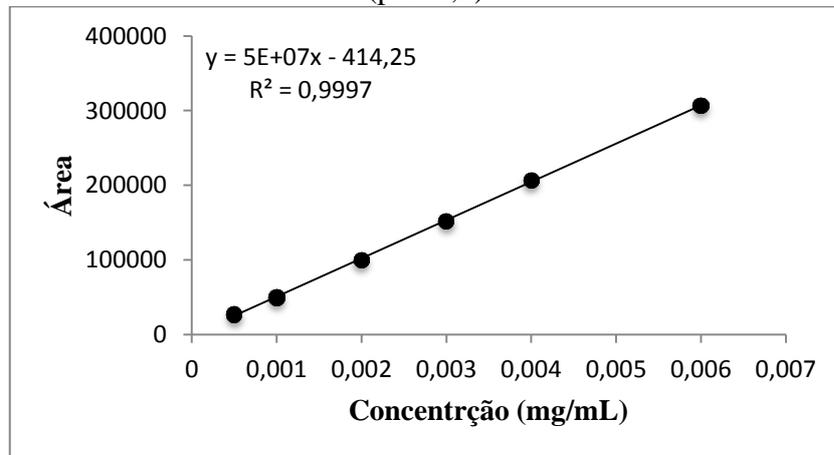


Figura 23 – Gráfico de resíduos da regressão para a valsartana no meio FGSSE (pH=1,2).

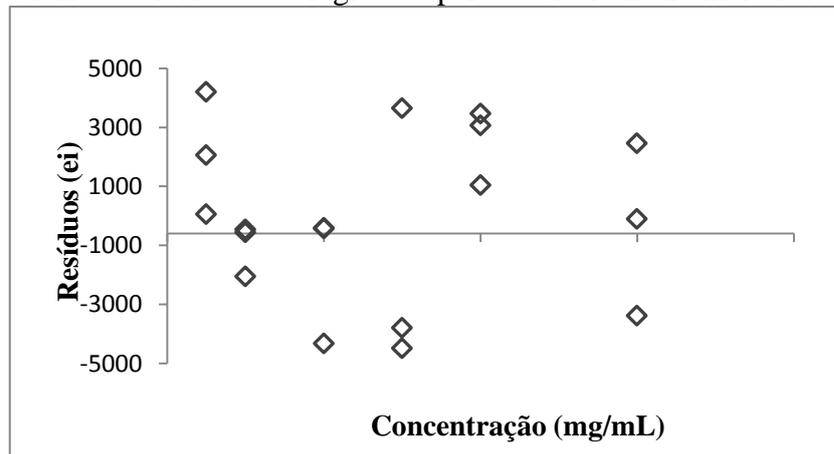


Figura 24 – Curva analítica para o método de quantificação da valsartana no meio TA (pH=4,5).

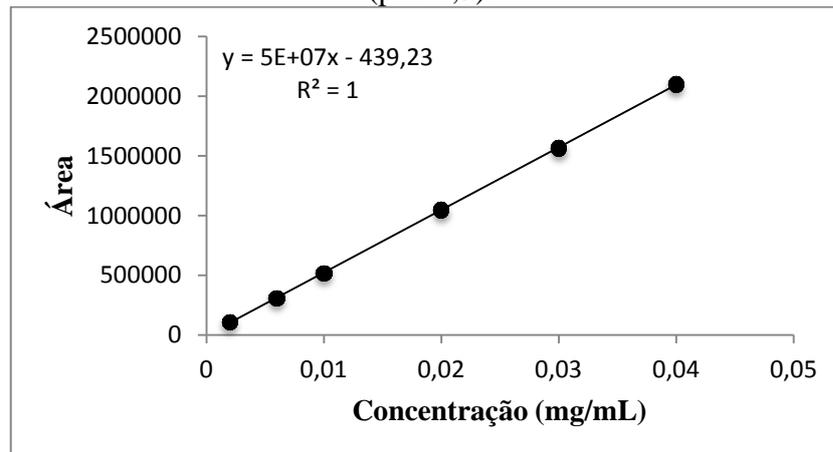
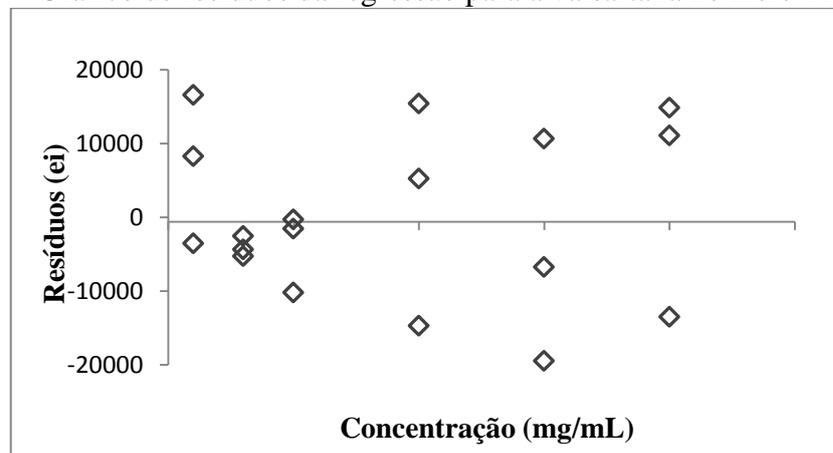


Figura 25 – Gráfico de resíduos da regressão para a valsartana no meio TA (pH=4,5).



Ao analisar os parâmetros da regressão que foram obtidos em cada um dos meios, o método foi considerado linear, uma vez que os valores dos coeficientes de correlação linear foram maiores do que 0,99 (BRASIL, 2003c).

Os resíduos obtidos em cada um dos meios tamponados (Figuras 23 e 25), apresentaram uma distribuição aleatória ao longo do eixo 0, o que significa que não apresentam tendência.

A significância das regressões foi calculada por ANOVA e os valores estão apresentados na Tabela 29. A regressão foi considerada significativa uma vez que os valores de F calculado foram maiores do que os de F crítico. Desta forma o método foi considerado adequado para a quantificação da valsartana na faixa de concentração selecionada para cada um dos meios.

Tabela 29 – Significância das regressões da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2) e TA (pH=4,5).

| Significância da regressão | | |
|-----------------------------------|--------------------|------------------|
| Meio tamponado | F calculado | F crítico |
| FGSSE (pH=1,2) | 19719,88 | 4,49 |
| TA (pH=4,5) | 70067,08 | 4,49 |

F= valor do coeficiente calculado de acordo com a ANOVA.

Na Tabela 30, estão descritos os parâmetros da regressão que foram obtidos para o método de quantificação da valsartana nos meios tamponados FGSSE (pH=1,2) e TA (pH=4,5).

Tabela 30 – Parâmetros da regressão linear obtidos para a quantificação da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2) e TA (pH=4,5).

| Parâmetros da regressão | FGSSE (pH=1,2) | TA (pH=4,5) |
|--------------------------------|-----------------------|--------------------|
| a | 51264475,05 | 52404148,42 |
| b | -414,250832 | -439,227088 |
| R ² | 0,9997 | 1,0000 |
| R | 0,9998 | 1,0000 |

a= coeficiente angular; b= coeficiente linear; R²= coeficiente de determinação; R= coeficiente de correlação linear.

6.3.2.2 Precisão

Os resultados referentes à precisão intra-corrída e inter-corrídas para os meios tamponados FGSSE (pH=1,2) e TA (pH=4,5) estão apresentados nas Tabelas 31 a 33.

Tabela 31 – Análise da precisão intra-corrída (repetibilidade) para o método de quantificação da valsartana no meio FGSSE (pH=1,2).

| Dia | Nível | Concentração teórica (µg/mL) | Concentração média real (µg/mL) (n=3) | DPR (%) |
|------------|--------------|-------------------------------------|--|----------------|
| 1° | CB | 1,00 | 0,96 | 1,80 |
| | CM | 3,00 | 2,95 | 2,98 |
| | CA | 6,00 | 5,98 | 0,96 |
| 2° | CB | 1,00 | 1,04 | 3,51 |
| | CM | 3,00 | 3,05 | 3,18 |
| | CA | 6,00 | 6,08 | 3,77 |
| 3° | CB | 1,00 | 1,05 | 0,51 |
| | CM | 3,00 | 3,07 | 3,75 |
| | CA | 6,00 | 6,11 | 1,86 |

CB= concentração baixa; CM= concentração média; CA= concentração alta.
DPR= Desvio Padrão Relativo.

Tabela 32 – Análise da precisão intra-corrída (repetibilidade) para o método de quantificação da valsartana no meio TA (pH=4,5).

| Dia | Nível | Concentração teórica (µg/mL) | Concentração média real (µg/mL) (n=3) | DPR (%) |
|------------|--------------|-------------------------------------|--|----------------|
| 1° | CB | 6,00 | 5,88 | 1,66 |
| | CM | 20,00 | 20,02 | 0,76 |
| | CA | 40,00 | 40,07 | 1,95 |
| 2° | CB | 6,00 | 5,90 | 0,45 |
| | CM | 20,00 | 20,02 | 1,46 |
| | CA | 40,00 | 40,06 | 0,73 |
| 3° | CB | 6,00 | 5,94 | 0,58 |
| | CM | 20,00 | 19,91 | 0,52 |
| | CA | 40,00 | 40,12 | 0,38 |

CB= concentração baixa; CM= concentração média; CA= concentração alta.

DPR= Desvio Padrão Relativo.

Tabela 33 – Precisão inter-corrídas (intermediária) para o método de quantificação da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2) e TA (pH=4,5).

| Meio tamponado | Nível | Concentração teórica (µg/mL) | Concentração média real (µg/mL) (n=9) | DPR (%) |
|-----------------------|--------------|-------------------------------------|--|----------------|
| FGSSE (pH=1,2) | CB | 1,00 | 1,02 | 4,43 |
| | CM | 3,00 | 3,02 | 3,40 |
| | CA | 6,00 | 6,05 | 2,38 |
| TA (pH= 4,5) | CB | 6,00 | 5,92 | 1,13 |
| | CM | 20,00 | 19,99 | 0,97 |
| | CA | 40,00 | 40,11 | 1,08 |

CB= concentração baixa; CM= concentração média; CA= concentração alta.

DPR= Desvio Padrão Relativo.

Para cada um dos meios, pode-se observar que os valores do DPR foram menores do que 5% (Tabelas 31 a 33) (BRASIL, 2003c), sendo o método para a quantificação da valsartana é preciso na faixa de concentração selecionada.

6.3.2.3 Exatidão

Os valores de exatidão para os meios tamponados FGSSE (pH=1,2) e TA (pH=4,5) estão apresentados nas Tabelas 34 e 35.

Assim como em Validação 1 (item 5.3.4) foram adotados os critérios de Kumar e colaboradores (2012). De acordo com os dados apresentados (Tabelas 34 e 35), o método foi considerado exato, uma vez que os valores permaneceram entre 95 e 105% (KUMAR et al., 2012b).

Tabela 34 – Análise da exatidão para o método de quantificação da valsartana no meio FGSSE (pH=1,2).

| Dia | Nível | Concentração teórica (µg/mL) | Concentração média real (µg/mL) (n=3) | Exatidão (%) |
|-----|-------|------------------------------|---------------------------------------|--------------|
| 1º | CB | 1,00 | 0,96 | 96,39 |
| | CM | 3,00 | 2,95 | 98,46 |
| | CA | 6,00 | 5,98 | 99,62 |
| 2º | CB | 1,00 | 1,04 | 104,13 |
| | CM | 3,00 | 3,05 | 101,81 |
| | CA | 6,00 | 6,08 | 101,37 |
| 3º | CB | 1,00 | 1,05 | 104,69 |
| | CM | 3,00 | 3,07 | 102,28 |
| | CA | 6,00 | 6,11 | 101,77 |

CB= concentração baixa; CM= concentração média; CA= concentração alta.

Tabela 35 – Análise da exatidão para o método de quantificação da valsartana no meio TA (pH=4,5).

| Dia | Nível | Concentração teórica (µg/mL) | Concentração média real (µg/mL) (n=3) | Exatidão (%) |
|-----|-------|------------------------------|---------------------------------------|--------------|
| 1º | CB | 6,00 | 5,88 | 97,98 |
| | CM | 20,00 | 20,02 | 100,10 |
| | CA | 40,00 | 40,07 | 100,19 |
| 2º | CB | 6,00 | 5,90 | 98,43 |
| | CM | 20,00 | 20,02 | 100,10 |
| | CA | 40,00 | 40,06 | 100,16 |
| 3º | CB | 6,00 | 5,94 | 99,07 |
| | CM | 20,00 | 19,91 | 99,56 |
| | CA | 40,00 | 40,12 | 100,31 |

CB= concentração baixa; CM= concentração média; CA= concentração alta.

6.3.2.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os valores de LD e LQ calculados (BRASIL, 2003c) estão apresentados na Tabela 36.

Tabela 36 – Valores de LD e LQ para o método de quantificação da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2) e TA (pH=4,5).

| Meio tamponado | LD (µg/mL) | LQ (µg/mL) |
|----------------|------------|------------|
| FGSSE (pH=1,2) | 0,02 | 0,08 |
| TA (pH=4,5) | 0,01 | 0,05 |

De acordo com os valores apresentados para cada um dos meios tamponados (Tabela 36), pode-se observar que a menor concentração da faixa de trabalho se encontra acima dos valores de LD e LQ calculados para cada um dos meios avaliados.

PARTE 2: AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE E PERMEABILIDADE DA VALSARTANA E DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE FFSOLI CONTENDO VALSARTANA NOS MEIOS FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) E SESSE (pH=6,8).

7 REFERENCIAL TEÓRICO

7.1 Solubilidade

Solubilidade é a concentração de um determinado soluto numa solução saturada em uma determinada temperatura. Solução saturada é aquela em que o soluto se encontra em equilíbrio com o solvente. Ela desempenha papel importante na liberação do fármaco da forma farmacêutica, bem como na sua absorção, sendo parâmetro fundamental na biodisponibilidade (BABU et al., 2010).

A solubilidade é uma característica intrínseca de cada composto, sendo influenciada por propriedades físicas e químicas tanto do soluto como do solvente, além de outros fatores como temperatura, pH, tamanho de partícula e polimorfismo (OLIVEIRA; MANZO, 2009; BABU et al., 2010; FLORENCE ; ATTWOOD , 2011).

Para fins de classificação biofarmacêutica pelo SCB, um fármaco é considerado altamente solúvel quando sua maior dose for solúvel em 250 mL ou menos de meio aquoso, em uma faixa de pH fisiológico de 1,2-6,8 a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ (BRASIL, 2011a). Considera-se o volume de 250 ml uma vez que é preconizada a administração do medicamento com um copo de água com este volume; e também por este volume estar relacionado ao volume mínimo de líquido que deve estar presente no estômago após a administração de um medicamento (FDA, 2015, GONÇALVES; STORPIRTIS, 2011). O valor da solubilidade é calculado pela razão da maior dose administrada e sua solubilidade obtida experimentalmente (Equação 5).

Equação 5 – Equação utilizada para o cálculo da relação dose/solubilidade visando classificação de um fármaco pelo SCB.

$$D/S = \frac{\text{Dose (mg)}}{\text{Solubilidade (mg/mL)}}$$

As agências reguladoras determinam como procedimento de escolha para a determinação da solubilidade o método da agitação orbital em frascos, no entanto, existem outros métodos capazes de prever a solubilidade de um fármaco contido ou não em uma forma farmacêutica (BRASIL, 2011a; FDA 2015; EMA, 2010; WHO, 2015).

7.1.1. Método da agitação orbital em frascos (*shake-flask*)

O método da agitação orbital em frascos é considerado o método de escolha para determinação da solubilidade em equilíbrio de fármacos visando bioisenção (BRASIL, 2011a; FDA 2015; EMA, 2010). No entanto, este não foi descrito em farmacopeias, por isto é encontrado na literatura em diferentes protocolos e com diferentes condições experimentais (HEIKKILA et al., 2011).

O estudo de solubilidade em equilíbrio é realizado em pelo menos três condições de pH (1,2; 4,5 e 6,8) e em triplicata para cada condição. O fármaco é adicionado em excesso em recipiente fechado, com agitação e temperatura controlada a 37 ± 1 °C durante um tempo definido. A solução saturada é caracterizada pelo fármaco não dissolvido, ou seja, pelo excesso de pó que deve permanecer durante o tempo do estudo. As coletas são realizadas em tempos determinados previamente e a amostra filtrada para quantificação da concentração por meio de método analítico previamente desenvolvido e validado (GLOMME; MÄRZ; DRESSMAN, 2004; BRASIL, 2011a; MONTEIRO, 2014).

No período de 2012-2014 nosso grupo de pesquisa desenvolveu um trabalho no sentido de padronizar as condições para utilização do método da agitação orbital em frascos em estudos de solubilidade de fármacos visando a possibilidade de bioisenção (MONTEIRO, 2014). Os resultados obtidos permitiram a composição de um capítulo submetido à avaliação por meio da consulta pública nº 139 de 2016 (BRASIL, 2016a) e já está aprovado para ser publicado no segundo suplemento da Farmacopeia Brasileira.

7.1.2 Dissolução intrínseca

A dissolução intrínseca é definida como a velocidade de dissolução de uma substância pura em condições constantes de área de superfície, velocidade de agitação, pH e força iônica do meio de dissolução, sendo também descrita como a velocidade de transferência de massa da superfície sólida para a fase líquida (ZAKERI-MILANI et al., 2009).

A dissolução intrínseca tem sido utilizada para a caracterização de fármacos sólidos, bem como para auxiliar na prevenção de problemas de biodisponibilidade. As principais utilizações estão relacionadas à determinação de parâmetros termodinâmicos associados com a transição de fases cristalinas; investigação do fenômeno de transferência de massa durante processo de dissolução; estudo do efeito de tensoativos e da alteração do pH na solubilização de fármacos pouco solúveis em água; bem como o entendimento da relação entre velocidade

de dissolução e forma cristalina de uma substância (YU et al, 2004; ROSA; VILHENA, 2012).

O método da dissolução intrínseca não está contido nas monografias individuais dos fármacos, sendo considerado um estudo de caracterização. Nos capítulos gerais da Farmacopeia Americana (USP) está descrito o método, podendo este ser padronizado para uma substância específica (ROSA; VILHENA, 2012; UNITED STATES, 2017a).

Para a determinação da velocidade de dissolução intrínseca (VDI) utiliza-se uma quantidade de fármaco compactado em um disco com superfície constante e de área definida. O compacto é analisado utilizando-se um aparelho (disco rotatório ou estático), procedendo-se a dissolução com temperatura, velocidade de agitação e pH constantes (ROSA; VILHENA, 2012; UNITED STATES, 2017a).

O cálculo da dissolução intrínseca é feito por meio da relação entre a velocidade (massa de amostra no meio de dissolução por unidade de tempo) e o fluxo de dissolução (velocidade por unidade de área), e é expressa como a velocidade de dissolução por unidade de área ($\text{mg}/\text{min}/\text{cm}^2$) (UNITED STATES, 2017a).

Este estudo é utilizado como uma alternativa ao método da agitação orbital em frascos para determinação da classe de fármacos de acordo com o SCB (YU et al, 2004).

7.2 Dissolução

A dissolução é o processo no qual uma substância sólida entra em solução. A velocidade de dissolução pode interferir na absorção de fármacos que são administrados em formas farmacêuticas sólidas, influenciando, conseqüentemente, na biodisponibilidade (MARQUES, 2009).

De acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010), “o teste de dissolução determina a quantidade de substância ativa dissolvida no meio de dissolução quando o produto é submetido à ação de aparelhagem específica, sob condições experimentais descritas” (BRASIL, 2010b).

A determinação da dissolução de fármacos a partir das formas farmacêuticas em condições padronizadas é um importante parâmetro para garantir a qualidade do produto, bem como a biodisponibilidade do fármaco. Adicionalmente, auxilia na escolha dos excipientes, no processo de desenvolvimento do produto e modificações pós-registro, além do estabelecimento de correlações *in vitro-in vivo* (DRESSMAN et al., 1998; MARQUES, 2009).

A absorção de um fármaco contido em uma forma farmacêutica sólida, após administração oral, depende da sua liberação, solubilização e dissolução sob condições fisiológicas, para posteriormente permear através das membranas biológicas do TGI. As duas primeiras etapas apresentam natureza crítica e, portanto, a dissolução *in vitro* pode ser importante para prever o desempenho *in vivo* (FDA, 2015).

Uma forma de avaliar a dissolução é por meio do perfil de dissolução, que consiste no gráfico que representa a porcentagem de fármaco dissolvido em função do tempo. Esta é uma maneira rápida e barata de avaliar formas farmacêuticas sólidas e permite obter parâmetros cinéticos, que são importantes para determinar a velocidade e eficiência do processo, além do tempo necessário para a liberação do fármaco, o que contribui para conclusões sobre as características biofarmacêuticas *in vitro* da formulação (STORPIRTIS et al., 1999; ARRUNÁTEGUI et al., 2015).

As agências reguladoras recomendam a isenção de estudos de BE/BR para fármacos classe I (Anvisa) e classes I e III (FDA, EMA e OMS) em formas farmacêuticas sólidas orais que proporcionam dissolução rápida, ou seja, maior ou igual a 85% em 30 minutos, o que ressalta, desta forma a importância do perfil de dissolução no contexto da bioisenção (EMA, 2010; BRASIL, 2011a; FDA 2015; WHO, 2015; ARRUNÁTEGUI et al., 2015).

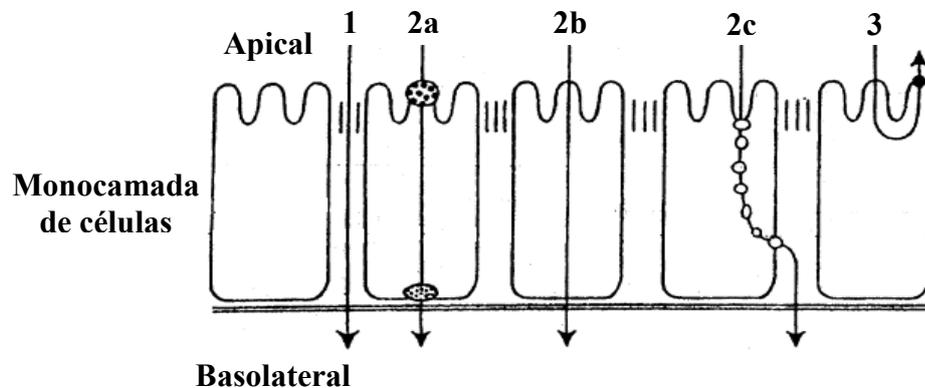
7.3 Permeabilidade

A permeabilidade baseia-se indiretamente na extensão da absorção (fração absorvida da dose e não fração sistêmica) de um fármaco em humanos e, diretamente por meio da medida da velocidade de transferência de massa através da membrana intestinal humana (FDA, 2015).

A permeabilidade é fator determinante para a absorção, que pode ser descrita como a permeação de compostos através de membranas biológicas sob influência das características físico-químicas de ambos (BALIMANE et al., 2000; SOUZA et al., 2007).

Em relação aos fármacos administrados por via oral, seu transporte para o interior da membrana intestinal é considerado um processo complexo e dinâmico, o qual inclui o transporte passivo, que pode ser através dos enterócitos (transcelular) ou das junções entre os enterócitos (paracelular), e os mecanismos ativos, via transportadores (BALIMANE et al., 2000; SOUZA et al, 2007). Alguns tipos de transportes estão apresentados na Figura 26.

Figura 26 – Tipos de transportes envolvidos na absorção intestinal de fármacos. (1) Transporte paracelular; (2) Transporte transcelular: (2a) mediado por carreador, (2b) difusão passiva, (2c) endocitose mediada pelo receptor; (3) Transporte mediado por carreador de efluxo. Adaptado de: BALIMANE et al., 2000.



Apesar da existência de outras vias de administração, a via oral ainda continua sendo a preferencial devido à sua conveniência, baixo custo e maior aderência ao tratamento pelo paciente (ÇELIK, 1996; MANADAS et al., 2002; SOUZA et al, 2007).

A resposta terapêutica do fármaco está relacionada diretamente a quantidade e velocidade com que este atinge a corrente sanguínea. Para fármacos contidos em FFSOLI é necessário que ocorra sua liberação da forma farmacêutica, em seguida sua dissolução nos fluidos gastrointestinais, para posterior permeação através das membranas biológicas (GRASS, 1997; DUNE et al., 1999; BALIMANE et. al., 2000; SOUZA et al, 2007).

Devido à complexidade dos vários fenômenos envolvidos na absorção de fármacos por via oral ainda é difícil utilizar apenas um modelo *in vitro* para prever com precisão as características de permeabilidade *in vivo*.

Um fármaco é considerado altamente permeável quando a extensão da absorção em humanos é 85% ou mais de uma dose administrada com base na determinação do balanço de massa (juntamente com evidências que mostram a estabilidade do fármaco no TGI) ou em comparação com uma dose de referência intravenosa (IV).

Diferentes métodos capazes de prever a extensão da absorção são utilizados para a determinação da permeabilidade de fármacos, dentre eles estudos *in vivo*, *in vitro*, *in silico* e físico-químicos (BALIMANE et. al., 2000). Os mais aceitos pela agência americana para a determinação da permeabilidade de fármacos estão apresentados no Quadro 6 (FDA, 2015).

Quadro 6 – Métodos para a determinação da permeabilidade de fármacos. Adaptado de: LINDEMBERG, 2004; FDA, 2015.

| Modelo | Métodos | Restrições |
|---|--|--|
| Estudos farmacocinéticos em humanos | Balanço de massas Biodisponibilidade absoluta (BA) – BA oral ou BA IV | Grande número de voluntários Alta variabilidade Necessidade de comprovação da estabilidade do fármaco no TGI Necessidade de comprovação da estabilidade do fármaco no TGI quando BA < 85% |
| Determinação da permeabilidade intestinal | Estudos <i>in vitro</i> de perfusão intestinal Estudos <i>in vitro</i> ou <i>in situ</i> de perfusão intestinal utilizando modelo animal Estudos <i>in vitro</i> de permeação usando tecido humano ou animal Estudos <i>in vitro</i> de permeação através de monocamada de cultura de células epiteliais – Caco-2 | Indicado somente para fármacos carregados por transporte passivo Necessidade de comprovação da estabilidade do fármaco no TGI Dificuldade em comprovar a reprodutibilidade |

Os modelos realizados em humanos são os métodos de escolha devido à predição real da permeabilidade, apresentando todos os fatores e variáveis presentes, como a presença de nervos, sangue e transportadores de membrana (EMA, 2010; BRASIL, 2011a; FDA, 2015; WHO, 2015). Os modelos animais geralmente apresentam uma constituição semelhante do epitélio intestinal humano, porém pode haver variações de acordo com a espécie utilizada (ATISOOK et al., 1990; KARASOV et al., 1991; LABOISSE et al., 1994; ASADA et al., 1995; SOUZA et al, 2007). Além disso, a dificuldade de se obter tecidos viáveis e que se mantenham adequados durante o tempo do experimento é uma restrição, devido à necessidade constante de oxigenação e sangue (PIETZONKA et al., 2002; SOUZA et al, 2007).

Dentre os modelos *in vitro* utilizados para determinação da permeabilidade de fármacos, existem os que utilizam as células Caco-2, que são extraídas de adenocarcinoma de cólon humano. Durante a cultura, estas células se diferenciam espontaneamente em enterócitos e formam uma membrana de células em monocamada aderida por junções (BALIMANE et. al., 2000; SOUZA et al, 2007). Este modelo pode ser utilizado para prever a absorção oral de fármacos por transporte passivo (transcelular e paracelular) (HORIE et al., 2003, SOUZA et al, 2007) e tem sido o modelo mais empregado para obtenção de informações para estudos de novos fármacos (SOUZA et al, 2007). Porém, o tempo de cultura

das células é relativamente longo (21 dias), o que propicia a contaminação por fungos/bactérias (CHONG et al., 1997; SOUZA et al, 2007).

Outro método *in vitro* é o ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA) que avalia a permeabilidade de fármacos pelo transporte passivo transcelular e consiste na formação de um sanduíche através de duas placas. Uma placa funciona como um compartimento doador, que contém a substância que será avaliada solubilizada em tampão. A outra placa, o compartimento receptor, possui em sua base um filtro que recebe uma impregnação lipídica dando origem a uma membrana com a finalidade de mimetizar a mucosa intestinal, por onde a substância migrará por difusão passiva (KANSY et al., 1998; REIS, 2013). Neste modelo não há expressão de transportadores e/ou processo de metabolismo (KANSY et al., 1998), porém é um método considerado para avaliação da absorção durante o período exploratório e de descoberta de novos fármacos (KERNS et al., 2004).

O método *in silico* é baseado em programas computacionais. Por meio deles avaliam-se a permeabilidade de substâncias baseando-se no caráter lipofílico, nas ligações de hidrogênio, no tamanho molecular e em propriedades quânticas. É um método importante na descoberta de fármacos (BALIMANE et al., 2000). Porém, os estudos *in silico* não levam em consideração os transportadores de membrana que interferem na permeabilidade de um fármaco (WATERBEEMD; GIFFORD, 2003).

8 MATERIAL E MÉTODOS

8.1 Material

8.1.1 Substância química de referência, insumo farmacêutico ativo e medicamentos

Valsartana SQR: Farmacopeia Americana – USP, lote R009P0, válido por todo período do estudo.

Valsartana IFA Gemini®, lote 64614030402, válida por todo período do estudo.

Comprimidos de VAL 320 mg:

- Produto A (Referência) lote: 1613280, validade: 10/2018;
- Produto B (Genérico) lote: 1610362, validade: 06/2018;
- Produto C (Similar) lote: 475436, validade: 10/2018.

8.1.2 Equipamentos e materiais

Aparelho de ultrassom Unique, modelo USC-1400;

Balança analítica Shimadzu, modelo AUX 220, com precisão de 0,01g;

Balança analítica Shimadzu, modelo AUX 220D, com precisão de 0,001g;

Bomba de vácuo Marconi, modelo MA057/2;

Coluna C18 Agilent (150 x 4,6 mm; 5 µm);

Cromatógrafo Waters Alliance e2695, com forno de injetor automático, detector de arranjo de diodos (DAD), software Empower versão 2;

Desintegrador Nova Ética modela 301;

Destilador Cristófoli;

Dissolutor Vision Elite 8 G2;

Durômetro Nova Ética, 298 DGP;

Estufa de secagem e esterilização Fanem, modelo 315 SE;

Incubadora Shaker SPLabor modelo SP-222-CF-135;

Membrana de celulose, 0,45 µm de poro, Millipore;

Potenciômetro HANNA;

Pipetas Gilson, volume ajustável de 10-100 µL, 20-200 µL 100-1000 µL; 1000-5000 µL;

Pipeta Kasvi, volume ajustável de 1000-5000 µL;

Ponteiras plásticas AXYGEN de 200 µL, 1000 µL e 5000 µL;

Prensa modelo PH-10;

Sistema de purificação de água Millipore, modelo Direct – Q3 e Q8;

Unidade filtrante para seringa Millex – 0,45 µm de poro, 13 mm de diâmetro – Millipore

Vials de vidro âmbar Waters de 2 mL com tampa e septos de teflon.

8.1.3 Reagentes e Solventes

Acetato de sódio triidratado grau analítico Vetec;

Acetonitrila grau HPLC J. T. Baker;

Ácido acético glacial Vetec;

Ácido clorídrico Proquimios;

Água ultrapurificada em sistema Milli-Q;

Cloreto de sódio Neon;

Fosfato de potássio monobásico Neon;

Hidróxido de sódio Vetec;

Metanol grau HPLC J. T. Baker.

8.2 Métodos

8.2.1 Métodos utilizados para estudo da solubilidade da valsartana

8.2.1.1 Estudo de solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frascos

Primeiramente foi realizado teste para determinação do excesso de fármaco a ser utilizado em cada um dos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8). Foram adicionadas alíquotas de 2,0 mg do IFA de valsartana a 10,0 mL de meio, sucessivamente até o aparecimento de fármaco não dissolvido, o que caracterizou visivelmente uma solução saturada.

Após a determinação do excesso de fármaco para obtenção da solução saturada, foram realizados dois estudos piloto para estabelecer as condições a serem utilizadas no estudo de solubilidade da valsartana pelo método da agitação orbital em frascos. As condições utilizadas nos pilotos estão apresentadas na Tabela 37.

Tabela 37 – Condições do 1º e 2º estudo piloto utilizadas para determinação da solubilidade de valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8).

| Parâmetro | Condição (1º piloto) | Condição (2º piloto) |
|-------------------------------|---|-----------------------------|
| Excesso de matéria prima (mg) | | |
| FGSSE (pH=1,2) | 1 | 1 |
| TA (pH=4,5) | 4 | 10 |
| SESSE (pH=6,8) | 40 | 65 |
| Volume de meio (mL) | 10 | 10 |
| Alíquota retirada (µL) | 160 | 160 |
| Temperatura (°C) | 37 ± 1 | 37 ± 1 |
| Velocidade de agitação (rpm) | 100 | 100 |
| Pontos de coleta (horas) | 0, 1, 3, 5, 7, 12, 20, 26, 29, 32 e 48 | 0, 1, 5, 10, 20, 30 e 36 |

Os estudos pilotos foram realizados com uma replicata de cada meio e, a partir destes, foram determinadas as condições para o estudo de solubilidade final da valsartana que foi realizado em triplicata nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8) (Tabela 38). As alíquotas coletadas foram imediatamente filtradas e posteriormente diluídas de acordo com as proporções adequadas para cada meio e estão apresentadas no Quadro 7.

Tabela 38 – Condições determinadas para realização do estudo final de solubilidade da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8).

| Parâmetro | Condição |
|-------------------------------|-------------------|
| Excesso de matéria prima (mg) | |
| FGSSE (pH=1,2) | 1 |
| TA (pH=4,5) | 10 |
| SESSE (pH=6,8) | 65 |
| Volume de meio (mL) | 10 |
| Alíquota retirada (µL) | 160 |
| Temperatura (°C) | 37 ± 1 |
| Velocidade de agitação (rpm) | 100 |
| Pontos de coleta (horas) | 0, 5, 10, 20 e 30 |

Quadro 7 – Diluições das alíquotas realizadas nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8) para avaliação da solubilidade da valsartana.

| Meio tamponado | Diluição |
|-----------------------|---|
| FGSSE (pH=1,2) | Transferiu 80,0 µL para balão de 2 mL e adicionou 720,0 µL de meio |
| TA (pH=4,5) | Transferiu 50,0 µL para balão de 2 mL e adicionou 1450,0 µL de meio |
| SESSE (pH=6,8) | Transferiu 50,0 µL para balão de 2 mL e adicionou 1450,0 µL de meio |

Para a determinação da solubilidade, foi calculada a razão dose/solubilidade (D/S), considerando a maior dose da valsartana (320 mg) e as solubilidades em cada meio. O fármaco é classificado como de alta solubilidade se a razão D/S for menor do que 250 e de baixa solubilidade quando esta razão é maior do que 250 (BRASIL, 2011a).

8.2.1.1.1 Avaliação da estabilidade da valsartana durante o estudo de solubilidade

A estabilidade da valsartana (IFA) foi avaliada nas concentrações de 7,0; 35,0 e 200,0 µg/mL, nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8), respectivamente.

As análises foram realizadas em triplicata, a 37°C por um período de tempo igual ao utilizado no estudo de solubilidade pelo método da agitação orbital em frasco, 30 horas. O decaimento da concentração das soluções de valsartana foi avaliado em cada meio. As soluções de valsartana foram consideradas estáveis quando o decaimento da concentração referente ao ponto zero foi menor do que 5%.

8.2.1.2 Estudo de dissolução intrínseca

O estudo de dissolução intrínseca foi realizado nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8), em triplicata. Os meios foram desgaseificados em aparelho ultrassom por 30 minutos.

Foi utilizado o sistema de disco rotativo, com matriz de diâmetro 0,8 cm. Para definição da quantidade do IFA de valsartana que seria comprimido em prensa hidráulica, bem como a força e o tempo de compressão, foram realizados experimentos prévios. A temperatura foi mantida a $37 \pm 0,5$ °C, a velocidade de rotação foi de 100 rpm e foi utilizado 900 mL de meio.

Foram utilizados 200 mg de IFA e a força de compressão foi de 1T por 30 segundos. A duração do teste foi de 240 e 480 minutos (4 h e 8h) para os meios FGSSE (pH=1,2) e TA (pH=4,5), respectivamente. Para o meio SESSE (pH=6,8) tempo de duração foi de 1440 minutos (24 h). Alíquotas de 5,0 mL foram coletadas por amostrador automático em tempos pré-determinados com reposição de meio. As alíquotas foram filtradas em filtro de seringa Millex® PVDV (0,45 µm) e analisadas por método cromatográfico previamente desenvolvido e validado.

As condições utilizadas no estudo de dissolução intrínseca estão apresentadas na Tabela 39.

Tabela 39 – Condições utilizadas para o estudo de dissolução intrínseca da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8).

| Parâmetro | Condição estabelecida |
|------------------------------|------------------------------|
| Quantidade de IFA (mg) | 200 |
| Força de compressão (T) | 1 |
| Tempo de compressão (seg) | 30 |
| Volume de meio (mL) | 900 |
| Alíquota retirada (mL) | 5 |
| Temperatura (°C) | 37 ± 0,5 |
| Velocidade de agitação (rpm) | 100 |
| Tempo do experimento (min) | |
| FGSSE (pH= 1,2) | 1440 |
| TA (pH=4,5) | 480 |
| SESSE (pH= 6,8) | 240 |

Para o cálculo da velocidade de dissolução intrínseca, foram construídos gráficos de quantidade de fármaco dissolvido em função do tempo. A seguir foi feita a regressão linear, onde $R^2 > 0,95$ (ZAKERI-MILANI et al., 2009) e as inclinações das curvas de dissolução e, conseqüentemente, a velocidade de dissolução (VD) foram determinadas, em unidade de massa por minuto. A velocidade de dissolução intrínseca (VDI) foi calculada dividindo a VD pela área superficial do compacto, que foi de $0,50 \text{ cm}^2$, sendo portando a unidade de VDI expressa em $\text{mg}/\text{min}/\text{cm}^2$ (UNITED STATES, 2017a).

8.2.2 Avaliação de medicamentos contendo valsartana

8.2.2.1 Análise dos excipientes utilizados nos medicamentos contendo valsartana

Foi realizada uma pesquisa no site da Anvisa para identificação de todos os medicamentos (referência, genéricos e similares) na forma farmacêutica comprimidos contendo valsartana, na maior dosagem (320 mg) registrados e disponíveis no mercado brasileiro (ANVISA, 2016a; 2016b; 2016c).

Foram listados todos os excipientes presentes nestes medicamentos por meio de pesquisa nas bulas, bem como suas funções. A seguir foram escolhidos três medicamentos, A (referência), B (genérico) e C (similar), para caracterização e análise comparativa dos excipientes presentes nas formulações.

8.2.2.2 Caracterização dos medicamentos

8.2.2.2.1 Determinação de peso

Para avaliação da variação de peso, foram pesados 20 comprimidos de cada produto: A (referência), B (genérico) e C (similar), individualmente e feita a média destes. O critério de aceitação para comprimidos revestidos de 250,0 mg ou mais, é não mais do que duas unidades fora do limite de $\pm 5,0\%$, em relação ao peso médio, sendo que, nenhum comprimido poderá estar acima ou abaixo do dobro da porcentagem indicada (BRASIL, 2010b).

8.2.2.2.2 Desintegração

Para realização do teste foram utilizados seis comprimidos de cada produto: A (referência), B (genérico) e C (similar) e água mantida a 37 ± 1 °C, como líquido de imersão. Foi colocado um comprimido em cada um dos seis tubos da cesta, seguidos do disco acrílico em cada tubo e então, o aparelho foi acionado. Ao final do intervalo de tempo especificado, de 30 minutos, o movimento foi cessado e observou-se o material em cada um dos tubos. Ao final do teste, todos os comprimidos deveriam estar completamente desintegrados (BRASIL, 2010b).

8.2.2.2.3 Dureza

Foram utilizados 10 comprimidos de cada produto: A (referência), B (genérico) e C (similar) para o teste. Antes foi eliminado qualquer resíduo superficial presente. Os comprimidos foram testados individualmente e obedecendo sempre à mesma orientação em relação à forma, presença de ranhura e gravação. O resultado foi expresso como a média dos valores obtidos nas determinações e o resultado do teste é somente informativo (BRASIL, 2010b).

8.2.2.2.4 Friabilidade

Para avaliação da friabilidade, foram utilizados 20 comprimidos dos produtos A (referência) e C (similar) (peso $\leq 650,0$ mg) e 10 comprimidos do produto B (genérico) (peso

> 650,0 mg). Estes foram pesados com exatidão e introduzidos no aparelho. A velocidade de rotação e o tempo de teste foram de 25 rotações por minuto e 4 minutos, respectivamente. Ao final, foi removido qualquer resíduo de pó da superfície dos comprimidos e pesado novamente. Nenhum comprimido poderia se apresentar quebrado, lascado, rachado ou partido. São aceitáveis comprimidos com perda igual ou inferior a 1,5% do seu peso (BRASIL, 2010b).

8.2.2.2.5 Teor

Para determinação do teor de valsartana nos comprimidos foi utilizado o método desenvolvido e validado empregando o meio FGSSE (pH= 6,8), no qual o fármaco apresentou maior solubilidade. O teste foi realizado em triplicata.

Pesou-se 5 comprimidos de valsartana. Estes foram pulverizados e transferiu-se quantidade de pó equivalente a 100,0 mg de valsartana para balão volumétrico de 100,0 mL. O volume do balão foi completado com metanol, levado ao ultrassom a 30 °C por 20 minutos e filtrado em papel de filtro. Logo após, foi retirada uma alíquota de 2000,0 µL, esta foi transferida para balão de 10,0 mL e volume completado com meio FGSSE (pH=6,8). A concentração final da solução foi de 200,0 µg/mL. As amostras foram quantificadas por método cromatográfico previamente desenvolvido e validado para o meio FGSSE (pH=6,8).

De acordo com a monografia da valsartana, os comprimidos devem conter no mínimo 95,0 e no máximo 105,0% da quantidade declarada de valsartana (C₂₄H₂₉N₅O₃) (UNITED STATES, 2016).

8.2.2.3 Perfil de dissolução dos medicamentos

O perfil de dissolução foi realizado para os três produtos A (referência), B (genérico) e C (similar). No meio FGSSE (pH=1,2) e TA (pH=4,5), foram utilizados 6 comprimidos e no SESSE (pH=6,8) 12 comprimidos de cada produto.

As condições utilizadas para realização do perfil de dissolução (Tabela 40) foram determinadas de acordo com a legislação e monografia individual do produto (BRASIL, 2010a; BRASIL, 2011a; UNITED STATES, 2016).

Tabela 40 – Condições determinadas para realização dos perfis de dissolução dos comprimidos contendo valsartana.

| Parâmetro | Condição estabelecida |
|------------------------------|--------------------------------|
| Volume de meio (mL) | 900 |
| Alíquota retirada (mL) | 5 |
| Temperatura (°C) | 37 ± 0,5 |
| Velocidade de agitação (rpm) | 50 |
| Aparato | Pá (2) |
| Tempos de coleta (min) | 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 |
| Ponto infinito | 150 rpm por 10 minutos |

Os meios utilizados foram desgaseificados em aparelho de ultrassom por 30 minutos. A temperatura foi estabilizada a 37 ± 0,5 °C e os comprimidos foram adicionados nas cubas. Em tempos pré-determinados, foram retiradas alíquotas de 5 mL por meio de um coletor automático, com reposição de meio. Estas foram filtradas em filtros de seringa Millex® PVDV (0,45 µm) e quantificadas por método cromatográfico previamente desenvolvido e validado. O ponto infinito foi caracterizado por 150 rpm por 10 minutos.

Os gráficos de porcentagem dissolvida em função do tempo foram construídos, considerando as alíquotas retiradas para análise e o cálculo da porcentagem de cedência do fármaco. Para a comparação perfil de liberação da valsartana a partir dos três produtos, foi utilizado o método da eficiência de dissolução (ED). Esta foi calculada a partir da área sob a curva (ASC) do perfil de dissolução no intervalo de tempo (t) definido ou estabelecido experimentalmente, utilizando o método dos trapezoides (KHAN; RHODES, 1975).

Para cada um dos meios a ED foi calculada pela razão entre a área sob a curva do perfil de dissolução no intervalo de tempo ente zero e 60 minutos ($ASC_{0-60 \text{ min}}$) e a área total do retângulo (ASC_{TR}) definido pela ordenada (100% de dissolução) e pela abcissa (tempo igual a 60 minutos), expressa em porcentagem (Equação 6).

Equação 6 – Equação utilizada para o cálculo da eficiência de dissolução.

$$ED = \frac{ASC_{(0-60)}}{ASC_{TR}} * 100$$

Os resultados da ED foram submetidos à análise de variância *One Way* (ANOVA) seguido do pós-teste de T de Student. Os resultados foram considerados significativamente iguais ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

8.2.3 Avaliação da permeabilidade da valsartana

Informações sobre a permeabilidade da valsartana foram obtidas por meio de uma revisão da literatura, onde foram consultadas as bases de dados Capes, PubMed e SciELO, utilizando as seguintes palavras chaves: “*valsartan permeability*” “*valsartan and human permeability study*”, “*valsartan permeability and Caco-2*” e “*valsartan permeability and PAMPA*”. Os dados da permeabilidade foram compilados e discutidos em relação aos critérios preconizados pelas agências reguladoras (EMA, 2010; BRASIL, 2011a; FDA, 2015; WHO, 2015) e artigos científicos (YU et al., 2002; DI; KERNS, 2008).

A permeabilidade do fármaco foi determinada *in silico*, por meio da utilização dos programas computacionais: Molinspiration e MarvinSketch. Os valores de log P e log D calculados foram comparados com os valores do metoprolol, normalmente utilizado como fármaco de referência de alta permeabilidade (KASSIM et al., 2003).

Os dados obtidos foram compilados e analisados com o objetivo de contribuir para definição da classe biofarmacêutica da valsartana segundo o SCB.

9 RESULTADOS

9.1 Solubilidade da valsartana

9.1.1 Estudo de solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frascos

Os resultados do estudo de solubilidade da valsartana por este método nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8) estão apresentados nas Figuras 27 a 29. A razão D/S da valsartana em cada um dos meios está apresentada na Tabela 41.

Figura 27 – Solubilidade da valsartana no meio FGSSE (pH=1,2).

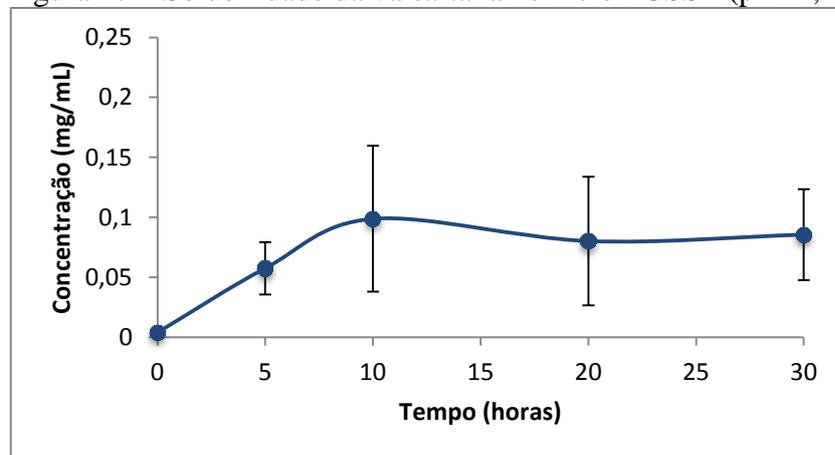


Figura 28 – Solubilidade da valsartana no meio TA (pH=4,5).

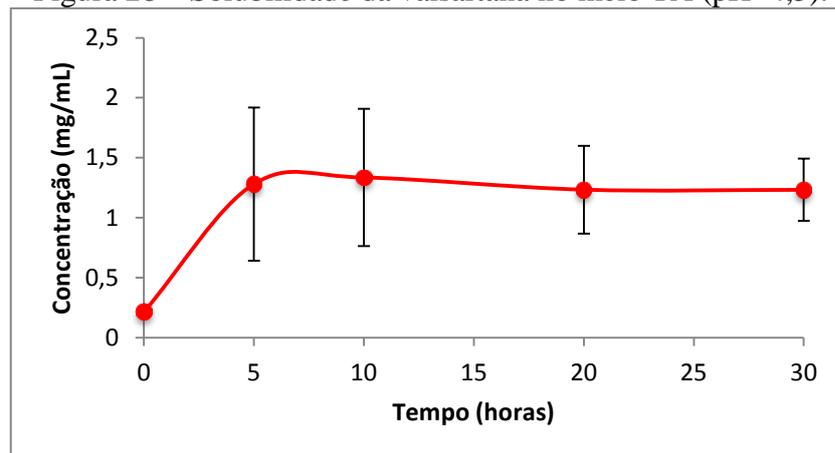


Figura 29 – Solubilidade da valsartana no meio SESSE (pH=6,8).

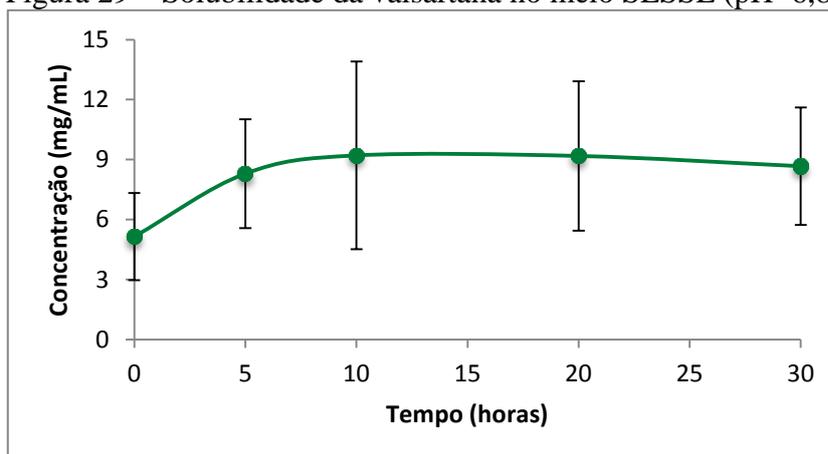


Tabela 41 – Razão D/S da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8).

| Meios | Dose (mg) | Tempo de equilíbrio (horas) | Solubilidade (mg/mL) | Razão Dose/Solubilidade (D/S) |
|----------------|-----------|-----------------------------|----------------------|-------------------------------|
| FGSSE (pH=1,2) | 320 | 20 | 0,08 | 3991,60 |
| TA (pH= 4,5) | | 20 | 1,23 | 259,48 |
| SESSE (pH=6,8) | | 10 | 9,21 | 34,75 |

A partir dos resultados de solubilidade obtidos (Figuras 27 a 29), foi possível calcular a razão D/S utilizando a maior dose administrada da valsartana e a solubilidade determinada no tempo de equilíbrio em cada um dos meios. A valsartana apresentou baixa solubilidade nos meios FGSSE (pH=1,2) e TA (pH=4,5), uma vez que a razão D/S foi maior do que 250 mL. Já no meio SESSE (pH=6,8), a razão D/S foi menor do que 250 mL, indicando alta solubilidade do fármaco neste pH (BRASIL, 2011a). Os desvios foram menores do que 5% em todos os meios avaliados.

9.1.1.1 Avaliação da estabilidade da valsartana durante o estudo de solubilidade

Os resultados da avaliação da estabilidade do IFA valsartana nas concentrações de 7,0; 35,0 e 200,0 µg/mL, nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8) respectivamente, estão apresentados nas Figuras 30 a 32.

Figura 30 – Avaliação da estabilidade da matéria prima de valsartana no meio FGSSE (pH=1,2).

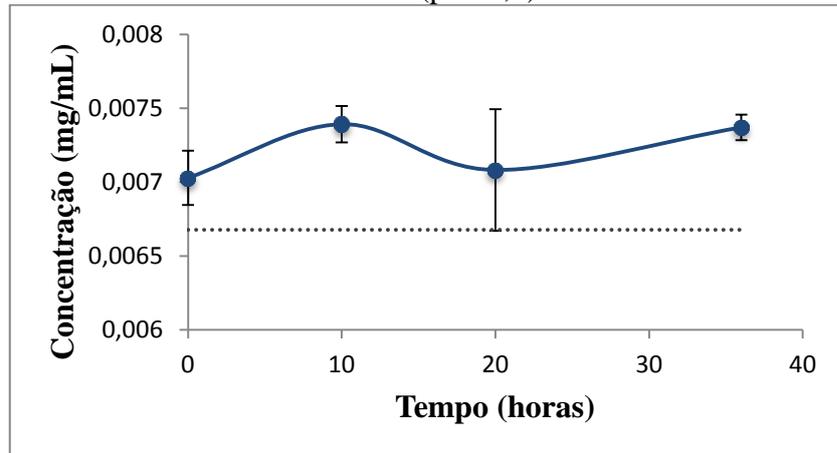


Figura 31 – Avaliação da estabilidade da matéria prima de valsartana no meio TA (pH=4,5).

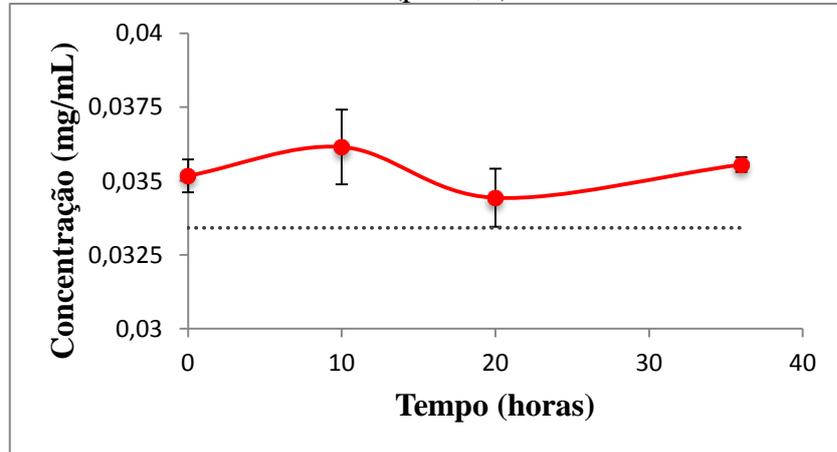
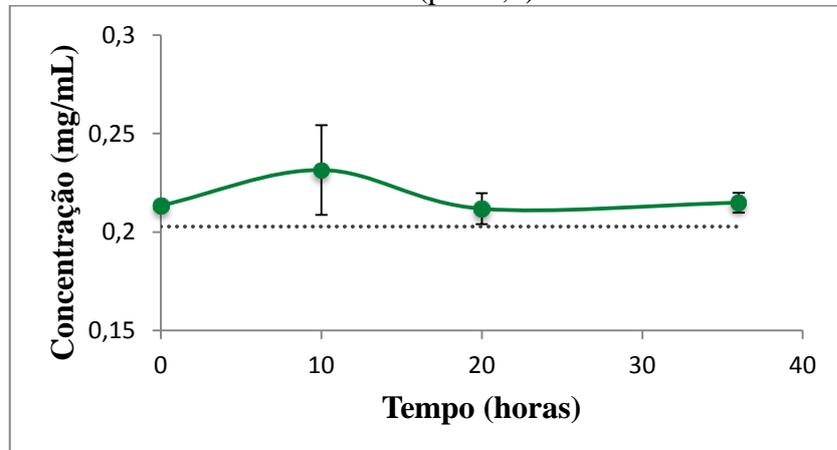


Figura 32 – Avaliação da estabilidade da matéria prima de valsartana no meio SESSE (pH=6,8).



Ao observar os resultados do estudo de estabilidade do IFA (Figuras 30 a 32), a solução foi considerada estável nos três meios avaliados, uma vez que a concentração se manteve acima dos limites de 0,0067 (pH=1,2), 0,0334 (pH=4,5) e 0,2028 (pH=6,8), não havendo o decaimento maior do que 5% da concentração referente ao ponto zero, representada pelas linhas tracejadas.

9.1.2 Estudo de dissolução intrínseca

Os gráficos referentes ao estudo de dissolução intrínseca, da quantidade dissolvida pelo tempo nos três meios tamponados, estão apresentados nas Figuras 33 a 35.

Figura 33 – Perfil de dissolução intrínseca da valsartana no meio FGSSE (pH=1,2).

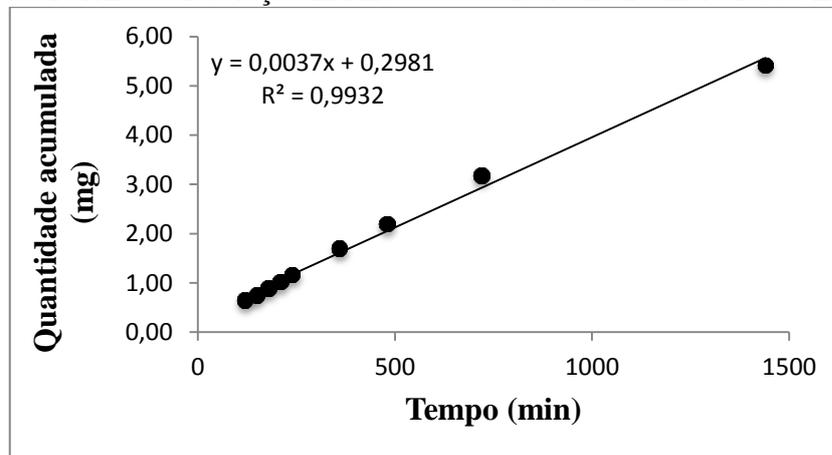


Figura 34 – Perfil de dissolução intrínseca da valsartana no meio TA (pH=4,5).

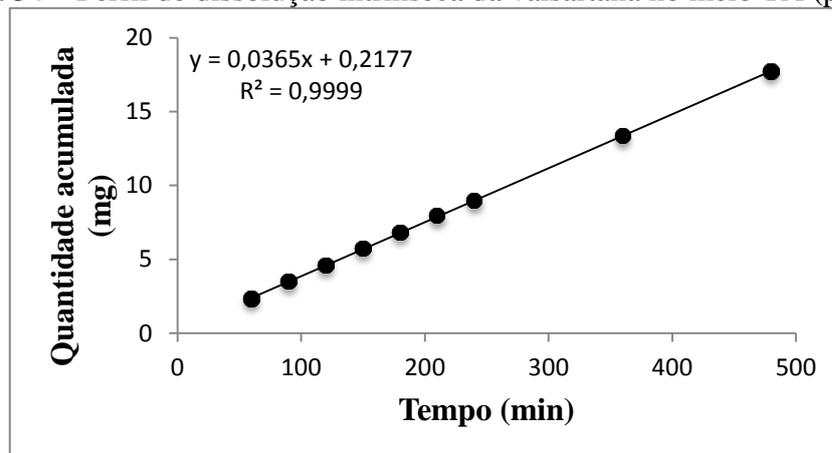
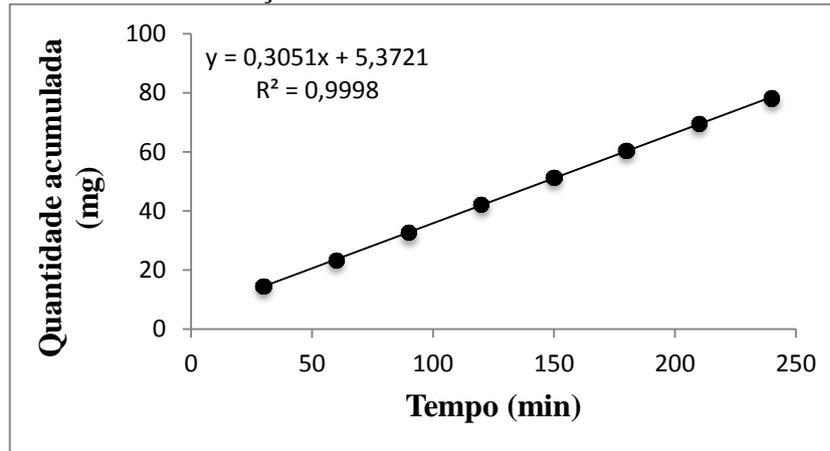


Figura 35 – Perfil de dissolução intrínseca da valsartana no meio SESSE (pH=6,8).



Em relação aos tempos de duração do experimento, estes foram diferentes para cada um dos meios. No FGSSE (pH=1,2) o tempo total do experimento foi de 1440 minutos, no TA (pH=4,5) o experimento durou 480 minutos e no SESSE (pH=6,8) foi de 240 minutos.

Os parâmetros de regressão linear referentes à dissolução intrínseca da valsartana nos meios estão apresentados na Tabela 42.

Tabela 42 – Parâmetros das regressões lineares referentes a dissolução intrínseca da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8).

| Parâmetros da regressão | FGSSE (pH=1,2) | TA (pH=4,5) | SESSE (pH=6,8) |
|-------------------------|----------------|-------------|----------------|
| a | 0,0037 | 0,0365 | 0,3051 |
| b | 0,2981 | 0,2177 | 5,3721 |
| R ² | 0,9932 | 0,9999 | 0,9998 |
| R | 0,9966 | 0,9998 | 0,9999 |

a= coeficiente angular; b= coeficiente linear; R²= coeficiente de determinação; R= coeficiente de correlação linear.

Para a determinação da velocidade de dissolução intrínseca nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8) (Tabela 43), partiu-se das velocidades de dissolução, representadas pelas inclinações (coeficiente angular) das retas de regressão.

Tabela 43 – Velocidade de dissolução intrínseca (VDI) da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8).

| Meio | Velocidade de dissolução intrínseca (VDI) (mg/min/cm ²) |
|----------------|---|
| FGSSE (pH=1,2) | 0,0074 |
| TA (pH=4,5) | 0,0726 |
| SESSE (pH=6,8) | 0,6073 |

A solubilidade da valsartana foi determinada adotando-se como critério o valor estabelecido por Yu e colaboradores (2004), que determina que um fármaco é de alta solubilidade quando a VDI é maior do que $0,1 \text{ mg/min/cm}^2$. De acordo com os resultados de VDI (Tabela 43), a valsartana foi considerada um fármaco de baixa solubilidade nos meios FGSSE (pH=1,2) e TA (pH=4,5) e de alta solubilidade no meio SESSE (pH=6,8).

9.2 Avaliação dos medicamentos contendo valsartana

9.2.1 Análise dos excipientes utilizados nos medicamentos contendo valsartana

Na Tabela 44 estão listados os excipientes presentes em todos os medicamentos na forma farmacêutica comprimidos contendo valsartana (320 mg) encontrados no mercado brasileiro, bem como suas funções. Dentre eles, estão marcados os presentes nos três produtos avaliados neste trabalho (referência, genérico e similar).

Tabela 44 – Excipientes presentes nos medicamentos contendo valsartana comercializados no Brasil. Adaptado de: SOUZA, 2015.

| Excipiente | Função farmacotécnica | Produtos | | |
|--------------------------|---|-------------------|-----------------|----------------|
| | | A (Referência) | B (Genérico) | C (Similar) |
| Celulose microcristalina | Diluyente | X | X | X |
| Crospovidona | Desagregante | X | X | X |
| Dióxido de silício | Deslizante | X | X | X |
| Estearato de magnésio | Lubrificante | X | X | X |
| Hipromelose | Agente de revestimento/ polímero controlador da taxa de liberação | X | | |
| Dióxido de titânio | Opacificante/ pigmento | X | X | X |
| Macrogol | Lubrificante/ aglutinante | X | X | X |
| Lauril sulfato de sódio | Surfactante | | | X |
| Povidona | Desagregante | --- | --- | --- |
| Álcool polivinílico | Lubrificante | | X | X |
| Talco | Lubrificante | | X | |
| Lactose monoidratada | Diluyente/ aglutinante | | X | |
| Croscarmelose sódica | Desagregante | | | X |
| Óxido férrico vermelho | Corante | X | | |
| Óxido férrico amarelo | Corante | X | | |
| Óxido férrico preto | Corante | X | X | |
| Óxido férrico marrom | Corante | | X | |
| Corante sicovit marrom | Corante | --- | --- | --- |
| Corante laca amarelo | Corante | --- | --- | --- |
| Oxido férrico | Corante | | | X |
| Caulim | Lubrificante | | | X |

X= excipientes presentes nos três produtos escolhidos para análise.

X= excipientes em comum entre os produtos escolhidos para análise.

--- = excipientes não encontrados nos produtos escolhidos para análise.

De acordo com a Tabela 44, pode-se observar que os produtos B e C, genérico e similar respectivamente, são os que apresentam maior número de excipientes, possuindo 11 cada um. Já o medicamento referência possui 10 excipientes em sua composição.

Existem seis excipientes comuns entre os três produtos (A, B e C), que são: celulose microcristalina, crospovidona, dióxido de silício, estearato de magnésio, dióxido de titânio e macrogol.

A celulose microcristalina é um diluente, adicionado a formulação para proporcionar um volume adequado para a produção da forma farmacêutica sólida. Os diluentes devem ser inertes uma vez que não devem alterar a estabilidade e a biodisponibilidade do fármaco (PRISTA et al., 1995). Além da celulose microcristalina, outro diluente listado nas formulações contendo valsartana foi a lactose monoidratada, presente apenas no medicamento genérico.

A crospovidona, a povidona e a croscarmelose sódica são desagregantes adicionados para acelerar a dissolução ou desagregação dos comprimidos; estas substâncias se intumescem na presença de água por serem muito solúveis e, permite a formação de canalículos facilitando a entrada de água nos comprimidos (PRISTA et al., 1995; AMIDON; BERMEJO, 2003).

Os deslizantes, como o dióxido de silício melhoram a fluidez dos pós e granulados, reduzindo o atrito entre as partículas (PRISTA et al., 1995).

O estearato de magnésio e o talco, lubrificantes bem utilizados nas formulações, que facilitam o deslizamento do grânulo, evitando a aderência do pó às punções, devendo ser deslizante e antiaderente. Estes podem levar ao comprometimento da velocidade de dissolução (STORPIRTIS et al., 1999; PRISTA et al., 1995). Além destes, outros deslizantes presentes nas formulações são o álcool polivinílico e o macrogol (AMIDON; BERMEJO, 2003).

O macrogol e a lactose monoidratada, também podem ser utilizados como aglutinantes, para facilitar a união entre as partículas (AMIDON; BERMEJO, 2003; ROWE et al., 2006).

O caulim é um mineral formado por silicatos hidratados de alumínio que pode ser utilizado na indústria farmacêutica substituindo, por exemplo, o talco (DA LUZ; DAMASCENO, 1993).

A hipromelose é um polímero controlador da taxa de liberação que atua como um agente de revestimento (ROWE et al., 2006).

Somente o medicamento C (similar) apresenta em sua composição o lauril sulfato de sódio. Este é um tensoativo, utilizado para melhorar a aparência de um medicamento ou facilitar a dissolução (PRISTA et al., 1995). É considerado um componente crítico na formulação, uma vez que pode afetar a biodisponibilidade de fármacos (BRASIL, 2011a).

9.2.2 Caracterização dos medicamentos

9.2.2.1 Determinação de peso

Os resultados referentes à determinação de peso para os três produtos estão apresentados na Tabela 45.

Tabela 45 – Resultados da determinação de peso realizada com 20 comprimidos de cada produto.

| Unidades | Peso (mg) | | |
|----------|----------------|--------------|-------------|
| | A (Referência) | B (Genérico) | C (Similar) |
| 1 | 636,7 | 678,7 | 642,5 |
| 2 | 622,4 | 699,1 | 636,1 |
| 3 | 627,8 | 708,1 | 643,7 |
| 4 | 632,4 | 682,2 | 644,7 |
| 5 | 636,6 | 690,4 | 649,0 |
| 6 | 639,5 | 685,7 | 625,0 |
| 7 | 646,7 | 683,0 | 635,0 |
| 8 | 641,0 | 676,9 | 645,6 |
| 9 | 617,7 | 691,8 | 631,0 |
| 10 | 639,5 | 679,8 | 641,7 |
| 11 | 647,3 | 693,3 | 627,5 |
| 12 | 631,2 | 672,4 | 644,7 |
| 13 | 634,0 | 682,0 | 644,3 |
| 14 | 642,7 | 729,6 | 649,6 |
| 15 | 634,0 | 673,3 | 642,7 |
| 16 | 631,0 | 668,9 | 651,3 |
| 17 | 642,0 | 664,8 | 643,9 |
| 18 | 633,1 | 688,5 | 638,1 |
| 19 | 629,9 | 692,6 | 644,4 |
| 20 | 644,0 | 697,0 | 654,4 |
| Média | 635,5 | 687,0 | 641,8 |

De acordo com a farmacopeia brasileira 5ª edição, o critério de aceitação para comprimidos revestidos de 250,0 mg ou mais está apresentado no Quadro 8.

Quadro 8 – Critério de aceitação referentes à determinação de peso para comprimidos revestidos de 250,0 mg ou mais (BRASIL, 2010b).

| Unidades | Limites | | |
|----------|----------------|--------------|-------------|
| | A (Referência) | B (Genérico) | C (Similar) |
| Até 2 | De 667,25 | De 721,25 | De 673,85 |
| | Até 603,70 | Até 652,56 | Até 609,67 |
| Nenhuma | De 699,02 | De 755,59 | De 705,94 |
| | Até 571,93 | Até 618,21 | Até 577,58 |

Ao analisar os resultados da determinação de peso dos três produtos, pode-se observar que somente uma unidade do produto B (genérico) ficou acima de 5% do peso médio; e nenhuma ficou acima ou abaixo do dobro dessa porcentagem. Desta forma, todos os produtos cumpriram o teste, estando dentro dos limites especificados (BRASIL, 2010b).

9.2.2.2 Desintegração

Em relação ao teste de desintegração, os três produtos se desintegraram antes do tempo especificado de 30 minutos (BRASIL, 2010b).

9.2.2.3 Dureza

Os resultados do teste de dureza para os três produtos estão apresentados na Tabela 46.

Tabela 46 – Resultados do teste de dureza (N) realizado com dez unidades de cada produto.

| Unidade | A (Referência) | B (Genérico) | C (Similar) |
|----------------|-----------------------|---------------------|--------------------|
| 1 | 265,0 | 200,5 | 182,0 |
| 2 | 54,5 | 188,0 | 195,0 |
| 3 | 208,5 | 162,5 | 202,0 |
| 4 | 72,0 | 157,0 | 183,0 |
| 5 | 235,5 | 180,5 | 207,5 |
| 6 | 222,0 | 169,5 | 203,5 |
| 7 | 63,0 | 194,0 | 190,5 |
| 8 | 53,5 | 192,0 | 178,0 |
| 9 | 191,5 | 103,0 | 203,0 |
| 10 | 69,5 | 146,0 | 190,5 |
| Média | 143,5 | 169,3 | 193,5 |
| Desvio | 87,6 | 29,3 | 10,3 |

Pode-se observar nos resultados que o desvio se mostrou bem elevado principalmente para o produto A (referência). Porém, o teste de dureza se aplica, principalmente, a comprimidos não revestidos, sendo considerado apenas de caráter informativo (BRASIL, 2010b).

9.2.2.4 Friabilidade

Os resultados referentes ao teste de friabilidade estão apresentados na Tabela 47.

Tabela 47 – Resultados do teste de friabilidade realizado com vinte unidades dos produtos A (referência) e C (similar) e com dez unidades do produto B (genérico).

| Produto | Peso antes (mg) | Peso depois (mg) | Porcentagem de perda (%) |
|----------------|-----------------|------------------|--------------------------|
| A (Referência) | 12721,5 | 12713,6 | 0,0621 |
| B (Genérico) | 6909,1 | 6909,0 | 0,0014 |
| C (Similar) | 12832,7 | 12822,5 | 0,0795 |

De acordo com os resultados, nenhuma unidade se mostrou ao final do teste, quebrado, lascado, rachado ou partido. Além disso, nenhum produto apresentou perda maior que 1,5 % do seu peso (BRASIL, 2010b).

9.2.2.5 Teor

Os resultados do teste de determinação do teor de valsartana em cada um dos três produtos analisados estão apresentados na Tabela 48.

Tabela 48 – Resultados das médias das concentrações e do teor dos produtos analisados no meio SESSE (pH= 6,8).

| Produtos | Concentração teórica (µg/mL) | Concentração experimental (n=3) (µg/mL) | Teor (%) | DPR (%) |
|----------------|------------------------------|---|----------|---------|
| A (Referência) | 200,0 | 206,20 | 103,12 | 1,84 |
| B (Genérico) | | 203,20 | 101,61 | 2,95 |
| C (Similar) | | 212,60 | 106,32 | 1,64 |

De acordo com a monografia do produto, os comprimidos devem conter no mínimo 95,0 e no máximo 105,0% da quantidade declarada ($C_{24}H_{29}N_5O_3$) (UNITED STATES, 2016).

Pode-se observar que os produtos A (referência) e B (genérico) apresentaram um teor dentro dos limites especificados na Farmacopeia Americana. Entretanto, o produto C (similar) apresentou teor um pouco acima do limite especificado.

9.2.3 Perfis de dissolução da valsartana a partir dos medicamentos avaliados

Os gráficos dos perfis de dissolução dos três produtos analisados A (referência), B (genérico) e C (similar), nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8) estão apresentados nas Figuras 36 a 38.

Figura 36 – Perfis de dissolução médios (n=6) de comprimidos contendo 320 mg de valsartana no meio FGSSE (pH=1,2) para os produtos: A (Referência), B (Genérico) e C (Similar).

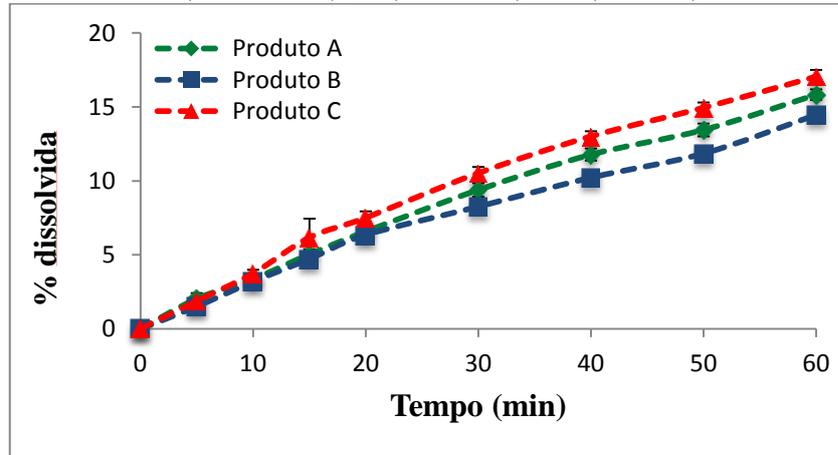


Figura 37 – Perfis de dissolução médios (n=6) de comprimidos contendo 320 mg de valsartana no meio FGSSE (pH=4,5) para os produtos: A (Referência), B (Genérico) e C (Similar).

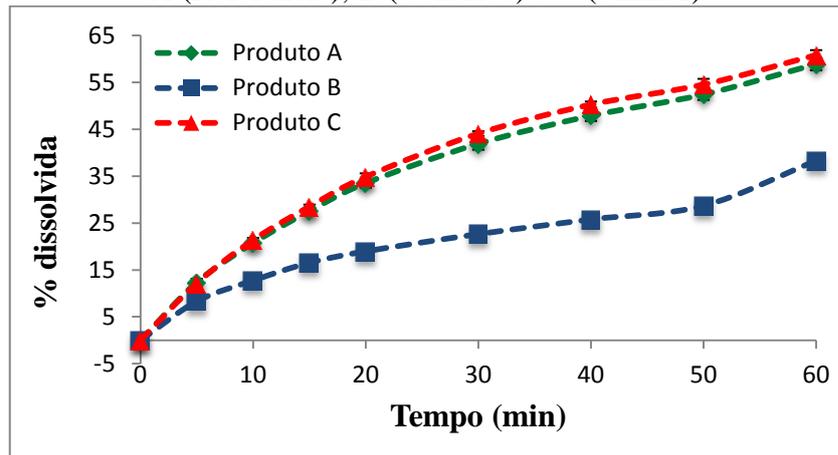
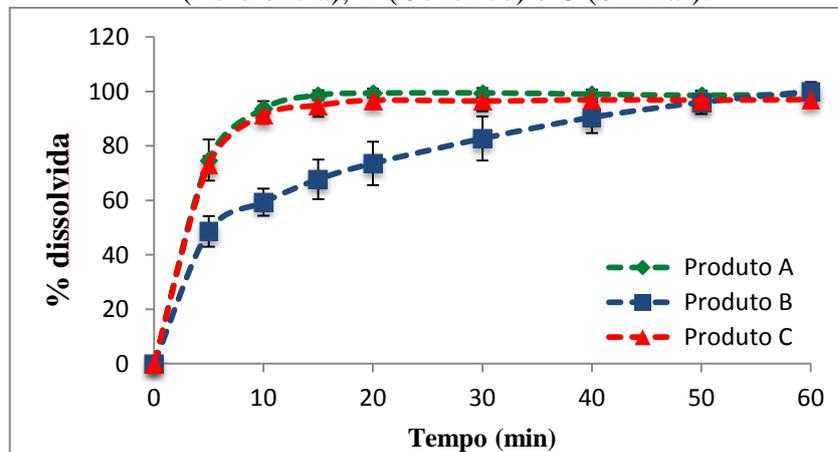


Figura 38 – Perfis de dissolução médios (n=12) de comprimidos contendo 320 mg de valsartana no meio FGSSE (pH=6,8) para os produtos: A (Referência), B (Genérico) e C (Similar).



De acordo com os resultados obtidos para os perfis de dissolução, somente no meio SESSE (pH=6,8) a cedência do fármaco atingiu 85%. Neste meio os produtos A (referência) e C (similar) apresentaram liberação semelhante, podendo ser denominada muito rápida, ou seja, $\geq 85\%$ em 15 minutos. Nos meios FGSSE (pH=1,2) e TA (pH=4,5), nenhum dos três produtos chegaram a liberar 80% do fármaco (EMA, 2010; BRASIL, 2011a; FDA, 2015; WHO, 2015). Nestes dois meios os gráficos apresentaram linhas crescentes, não sendo observado o platô que caracteriza o fim do processo de liberação.

As médias das porcentagens dissolvidas da valsartana em cada um dos meios, bem como o desvio padrão estão apresentadas nas Tabelas 49 a 51.

Tabela 49 – Resultados médios dos perfis de dissolução de 6 comprimidos de cada um dos produtos analisados no meio FGSSE (pH=1,2).

| Tempo | Produto A (Referência) | | Produto B (Genérico) | | Produto C (Similar) | |
|-------|------------------------|------|----------------------|------|---------------------|------|
| | % dissolvida | DP | % dissolvida | DP | % dissolvida | DP |
| 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 5 | 2,03 | 0,37 | 1,51 | 0,09 | 1,88 | 0,20 |
| 10 | 3,37 | 0,18 | 3,19 | 0,16 | 3,75 | 0,25 |
| 15 | 5,03 | 0,33 | 4,72 | 0,17 | 6,17 | 1,28 |
| 20 | 6,57 | 0,36 | 6,34 | 0,48 | 7,51 | 0,43 |
| 30 | 9,39 | 0,45 | 8,26 | 0,32 | 10,53 | 0,41 |
| 40 | 11,78 | 0,41 | 10,22 | 0,37 | 13,01 | 0,34 |
| 50 | 13,45 | 0,43 | 11,85 | 0,31 | 14,95 | 0,36 |
| 60 | 15,83 | 0,36 | 14,46 | 0,48 | 17,05 | 0,45 |

Tabela 50 – Resultados médios dos perfis de dissolução de 6 comprimidos de cada um dos produtos analisados no meio TA (pH=4,5).

| Tempo | Produto A (Referência) | | Produto B (Genérico) | | Produto C (Similar) | |
|-------|------------------------|------|----------------------|------|---------------------|------|
| | % dissolvida | DP | % dissolvida | DP | % dissolvida | DP |
| 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 5 | 12,36 | 0,70 | 8,31 | 0,36 | 12,16 | 0,96 |
| 10 | 20,72 | 0,60 | 12,75 | 0,49 | 21,38 | 0,49 |
| 15 | 27,55 | 0,55 | 16,54 | 0,94 | 28,51 | 0,42 |
| 20 | 33,52 | 0,97 | 18,97 | 0,92 | 34,88 | 0,72 |
| 30 | 41,91 | 1,26 | 22,65 | 1,11 | 44,08 | 0,50 |
| 40 | 47,88 | 1,11 | 25,78 | 0,81 | 50,27 | 0,65 |
| 50 | 52,44 | 1,16 | 28,71 | 1,06 | 54,56 | 1,19 |
| 60 | 58,90 | 1,29 | 38,30 | 1,16 | 60,83 | 1,04 |

Tabela 51 – Resultados médios dos perfis de dissolução de 12 comprimidos de cada um dos produtos analisados no meio SESSE (pH=6,8).

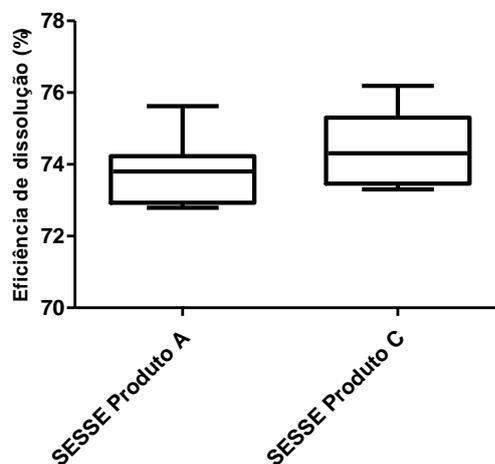
| Tempo | Produto A (Referência) | | Produto B (Genérico) | | Produto C (Similar) | |
|-------|------------------------|------|----------------------|------|---------------------|------|
| | % dissolvida | DP | % dissolvida | DP | % dissolvida | DP |
| 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 5 | 74,81 | 7,53 | 48,63 | 0,09 | 73,19 | 3,12 |
| 10 | 93,72 | 2,70 | 59,32 | 0,16 | 91,36 | 3,18 |
| 15 | 98,69 | 1,73 | 67,74 | 0,17 | 94,89 | 4,15 |
| 20 | 99,41 | 1,63 | 73,61 | 0,48 | 96,80 | 1,41 |
| 30 | 99,50 | 1,77 | 82,72 | 0,32 | 96,48 | 3,74 |
| 40 | 99,01 | 1,73 | 90,50 | 0,37 | 96,96 | 1,64 |
| 50 | 98,61 | 1,66 | 96,03 | 0,31 | 96,81 | 1,10 |
| 60 | 98,99 | 1,92 | 100,08 | 0,48 | 97,04 | 1,21 |

A ED foi calculada somente para os produtos A (referência) e C (similar) no meio SESSE (pH=6,8), uma vez ter sido a única condição em que o processo de liberação atingiu o platô indicando final da dissolução. Em decorrência dos perfis de dissolução terem apresentado liberação muito rápida ($\geq 85\%$ em 15 minutos), outros modelos que comparam perfis de dissolução, como o fator de similaridade (F2), perdem o poder de discriminação e, por isto, foi empregada a ED. Os resultados e o gráfico referente à ED destes produtos estão apresentados na Tabela 52 e Figura 39, respectivamente.

Tabela 52 – Eficiência de dissolução do Produto A (Referência) e Produto C (Similar) no meio SESSE (pH= 6,8).

| Produto | Eficiência de Dissolução (%) |
|----------------|------------------------------|
| A (Referência) | 73,59 |
| C (Similar) | 73,30 |

Figura 39 – Eficiência de dissolução valsartana (320 mg) no meio SESSE (pH=6,8). Produto A (Referência) e Produto C (Similar).



O gráfico apresentado na Figura 46 se refere à análise estatística da ED dos produtos A (referência) e C (similar) por ANOVA e pós-teste T de Student. De acordo com este, não foi observada diferença significativa entre os produtos ($p < 0,05$).

9.3 Avaliação da permeabilidade da valsartana

Os dados de permeabilidade da valsartana compilados da literatura estão apresentados na Tabela 53.

Tabela 53 – Resultados da permeabilidade da valsartana de acordo com diferentes métodos.

| Modelo | Permeabilidade | | Referência |
|------------------|---|---|--|
| <i>In silico</i> | log P | | |
| Molinspiration | 3,08 | | --- |
| MarvinSketch | 5,00 | | |
| <i>In vitro</i> | P _{eff} (x 10 ⁻⁶ cm/s) | | |
| PAMPA | 2,10 ± 1,12 0,10 | | SUGANO et al., 2012 POIRIER et al., 2009 |
| Caco-2 | P _{app A-B} (x 10 ⁻⁶ cm/s) | P _{app B-A} (x 10 ⁻⁶ cm/s) | |
| | 0,71 | 1,48 | SKOLNIK et al., 2009; LOZOYA-AGULLO et al., 2015b |
| | 1,86 ± 0,14 | --- | NEKKANTI et al., 2015 |
| <i>In vivo</i> | Fa (%) | P _{eff} (x 10 ⁻⁵ cm/s) | |
| Ratos | 60,4 | 0,6 | LOZOYA-AGULLO et al., 2015 ^a |
| | 72,2 | 2,6 | |
| Humanos | Dose (mg) | Fa (%) | |
| | 80 | 23,0 | FLESH et al., 1997; |
| | 320 | 44,9 | PÉREZ et al., 2006 |
| | 160 | 41,2 | HEDAYA, M.A; HELMY, 2013 |
| | 320 | 82,0 | |

P_{eff} = permeabilidade efetiva; P_{app A-B} = permeabilidade aparente apical-basolateral; P_{app B-A} = permeabilidade aparente basolateral-apical.

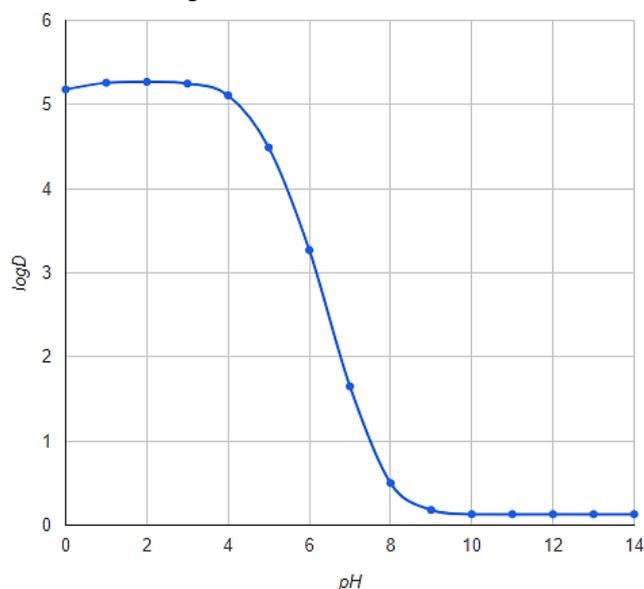
Fa= fração absorvida.

Primeiramente a permeabilidade da valsartana foi determinada pelo método *in silico*. Para análise destes resultados, o metoprolol foi considerado o fármaco de referência de alta permeabilidade. De acordo com Kassim e colaboradores (2003), este possui uma fração de absorção de 95%, determinada experimentalmente em humanos e apresenta log P=1,72.

Ao compararmos os resultados de log P da valsartana obtidos pelos métodos computacionais, pode-se sugerir que a valsartana seja um fármaco de alta permeabilidade, pois os valores de log P encontrados foram maiores do que 1,72 que é o valor de referência do metoprolol (KASSIM et al., 2003).

Além disso, a permeabilidade da valsartana foi avaliada por meio do gráfico do log D obtido, que correlaciona o log P de um fármaco com o pH (Figura 40).

Figura 40 – Gráfico do log D versus pH da valsartana obtido do programa computacional MarvinSketch.



De acordo com a Figura 49, o log D da valsartana diminui com o aumento do pH. Este valor foi comparado ao do metoprolol em pH=6,5, conforme estudo realizado por Kassim e colaboradores (2003). O log D da valsartana neste pH foi de 3, maior do que o do metoprolol (-1,48). Assim de acordo com estes resultados ela apresenta alta permeabilidade.

Em relação à permeabilidade por PAMPA, foram encontrados somente dois estudos, porém não apresentavam dados suficientes para discussão a respeito da permeabilidade do fármaco (POIRIER et al., 2009; SUGANO et al., 2012).

Para determinação da permeabilidade da valsartana em estudos realizados por Caco-2, foram adotados dois parâmetros para a análise dos resultados. De acordo com Di e Kerns (2008), se: $P_{app} < 2 \times 10^{-6}$ cm/s= baixa permeabilidade; $2 \times 10^{-6} < P_{app} < 20 \times 10^{-6}$ cm/s= moderada permeabilidade e $P_{app} > 20 \times 10^{-6}$ cm/s= alta permeabilidade. Além deste, pode-se utilizar como comparação a P_{app} do metoprolol ($18,21 \pm 0,79 \times 10^{-6}$ cm/s), referência de alta permeabilidade (REFSGAARD et al., 2005).

Desta forma, de acordo com os resultados da permeabilidade por Caco-2, podemos observar que os valores de P_{app} foram menores do que 2×10^{-6} cm/s, indicando que a valsartana apresenta baixa permeabilidade, quando comparados os dois parâmetros citados acima. Além disso, de acordo com os resultados de Skolnik e colaboradores (2009), podemos observar que a valsartana é substrato para transportadores de efluxo, caracterizado pela $P_{app\ B-A}$ maior do que $P_{app\ A-B}$.

Para a análise dos resultados da permeabilidade da valsartana em estudos *in vitro* realizados em ratos, foi adotado o critério estabelecido por Zakeri-Milani e colaboradores (2009), os quais definem que fármacos que apresentam $P_{eff} < 5 \times 10^{-5}$ cm/s, apresentam baixa permeabilidade. Assim, a valsartana é classificada como fármaco de baixa permeabilidade.

De acordo com os guias de bioislação a permeabilidade de um fármaco deve ser determinada por estudos farmacocinéticos em humanos. Assim, um fármaco é considerado de alta permeabilidade se a fração da sua absorção for menor ou igual a 85% (EMA, 2010; BRASIL, 2011a; FDA, 2015; WHO, 2015).

Pelos dados da fração absorvida da valsartana em humanos, podemos observar que os três estudos concluem por uma fração absorvida menor que 85%, independente da dose utilizada, demonstrando desta forma que este fármaco é classificado como de baixa permeabilidade.

10 DISCUSSÃO

Estudos relacionados ao processo de liberação, dissolução e biodisponibilidade de fármacos são fundamentais para a comprovação de aspectos relacionados à equivalência farmacêutica, biodisponibilidade relativa, bioequivalência, intercambialidade e equivalência terapêutica de medicamentos (STORPIRTIS et al., 1999).

O SCB classifica os fármacos baseando em sua solubilidade aquosa e permeabilidade intestinal. Através de uma combinação desses fatores e parâmetros fisiológicos, é possível entender o comportamento da absorção de um fármaco no TGI. Estas informações podem contribuir para redução de custos e tempo no desenvolvimento de fármacos, além de reduzir a exposição de indivíduos humanos durante ensaios clínicos (ISSA; FERRAZ, 2011; FDA, 2015).

Para a determinação da solubilidade de um fármaco visando a classificação pelo SCB e a decisão segura sobre a possibilidade de bioisenção, as agências reguladoras preconizam como método de escolha a agitação orbital em frascos (EMA, 2010; BRASIL, 2011a; FDA, 2015; WHO, 2015). Além disso, o método da dissolução intrínseca tem sido utilizado como uma alternativa, sendo muitas vezes justificado por não necessitar da dose para determinação da solubilidade. Diante disto a comparação entre estes métodos e os resultados obtidos por ambos vem crescendo nos últimos anos (YU et al., 2004; DEZANI et al., 2013). Assim, neste trabalho a solubilidade da valsartana foi determinada por ambos os métodos.

A solubilidade da valsartana foi determinada pelo método da agitação orbital em frascos utilizando as condições preconizadas pelos guias de bioisenção, nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8). Para que um fármaco seja dito de alta solubilidade, este deve apresentar este comportamento na faixa de pH fisiológico para mimetizar o TGI como um todo (FDA, 2015; BRASIL; 2016a).

Primeiramente foi determinado o excesso de IFA a ser adicionado (1,0 mg - FGSSE (pH=1,2)/ 10,0 mg - TA (pH=4,5)/ 65,0 mg - SESSE (pH=6,8). A quantidade adicionada de acordo com cada meio tamponado foi diferente devido a solubilidade do fármaco ser distinta em cada um deles. A valsartana é um ácido fraco pH dependente e sua solubilidade aumenta a medida que aumenta o pH do meio. Por possuir dois valores de pKa (4,73 e 3,9), ela se encontra ionizada em pH duas unidades acima de 4,73 e não ionizada em pH abaixo de 3,9. Para determinação do excesso em cada meio foi realizado um teste inicial para determinação desta quantidade, uma vez que recomenda-se a utilização de pequenos excessos de IFA para avaliação da solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frascos;

principalmente para fármacos de baixa solubilidade, pois este excesso foi considerado um fator crítico (MONTEIRO, 2014).

O tempo de duração do experimento foi determinado por estudo piloto realizado previamente e o tempo final foi de 30 horas. Apesar do estudo de solubilidade ser um procedimento considerado simples, ocupa tempo considerável e requer muito trabalho manual (BOX et al., 2006). Neste projeto, o tempo para atingir o equilíbrio da solubilidade da valsartana foi de 20 horas nos meios FGSSE (pH=1,2) e TA (pH=4,5) e 10 horas no meio SESSE (pH=6,8); sendo considerado reduzido, o que possibilita a realização das análises de solubilidade em tempo razoável.

A velocidade de agitação utilizada neste trabalho foi de 100 rpm. As velocidades mais utilizadas em trabalhos de avaliação da solubilidade utilizando o método da agitação orbital em frascos são 50, 100 e 150 rpm (GLOMME et al., 2005; BAKA et al., 2008; HEIKKILA et al., 2011; TAKÁCS-NOVÁK et al., 2013). Porém, apesar de não haver um consenso sobre a velocidade a ser utilizada, não foi demonstrada diferença entre os resultados médios da solubilidade em equilíbrio com essas distintas velocidades (MONTEIRO, 2014).

O volume da alíquota retirada foi de 160 μ L. Este volume deve ser escolhido conforme a necessidade do estudo devendo, porém ser menor ou igual a 10 % do volume total do meio, pois ao realizar a reposição do volume retirado pode ocorrer diluição. Esse procedimento é necessário para manter a hidrodinâmica do sistema e a quantidade de insumo farmacêutico ativo acima do ponto de saturação. Além disso, a reposição deve ser feita com o meio mantido à temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, assim como a temperatura nos frascos para simular a temperatura corporal do TGI (MONTEIRO, 2014; BRASIL; 2016a).

Na literatura são encontrados estudos de solubilidade da valsartana havendo, porém uma divergência da classificação do fármaco como de alta ou baixa solubilidade e, conseqüentemente da sua classificação segundo o SCB. A valsartana é classificada por alguns autores como classe II e por outros como classe III. Porém, muitos destes estudos são inconclusivos e os experimentos não foram realizados de acordo com critérios estabelecidos pelos guias visando bioequivalência. Um estudo da solubilidade da valsartana realizado por Rajesh Kaza e colaboradores (2013) utilizou como meio a água e os tampões pH=1,2, pH= 6,8 e pH=7,4. Dentre estes, a água não é considerada um meio biorrelevante e o tampão pH=7,4 não está compreendido na faixa de pH fisiológico determinado. Além disso, a temperatura utilizada nos experimentos foi de 25°C , que não é a preconizada pelas agências reguladoras (EMA, 2010; BRASIL, 2011a; FDA, 2015; WHO, 2015). Os valores de solubilidade encontrados neste estudo foram de 0,567 mg/mL em água e nos meios pH=1,2, pH=6,8 e

pH=7,4 foram de 0,116 mg/mL, 0,304 mg/mL e 0,598 mg/mL respectivamente. Considerando estes valores de solubilidade e a maior dose de valsartana (320 mg) para cálculo da razão D/S, os resultados são: 2.759, 1.053 e 535 mg/mL, respectivamente (> 250 mL) nos meios avaliados, sendo o fármaco classificado como de baixa solubilidade, como neste trabalho. No entanto, pode-se observar que as condições analíticas comprometeram os resultados, uma vez que esta é significativamente influenciada pela temperatura (LIU et al., 2010); destaque para o pH 6,8 comparativamente aos nossos resultados, o qual apresentou alta solubilidade. Assim, estes resultados não condizem com os obtidos em nosso trabalho, em que a valsartana apresentou baixa solubilidade nos meios FGSSE (pH=1,2) e TA (pH=4,5), sendo elas de 0,08 e 1,23 mg/mL (D/S > 250 mL), respectivamente. E no meio SESSE (pH=6,8) ela foi considerada de alta solubilidade (9,21 mg/mL - D/S < 250 mL). Desta forma, podemos ressaltar a necessidade da utilização das condições preconizadas pelos guias para o estudo da solubilidade de fármacos visando a bioisecção.

Apesar do método da agitação orbital em frascos ser o indicado pelas agências reguladoras, este apresenta algumas desvantagens em relação à dissolução intrínseca (ISSA; FERRAZ, 2011; DEZANI et al., 2013). A solubilidade é determinada pela razão dose/solubilidade, relacionando a maior dose e a solubilidade do fármaco (MARTINEZ; AMIDON, 2002). No entanto, a escolha da dose tem um grande impacto no cálculo desta relação e, para alguns medicamentos, a classificação pode mudar de altamente solúvel para baixa solubilidade, quando se utiliza uma dose diferente no cálculo (LINDENBERG et al., 2004; YU et al., 2004). Por exemplo, a maior dose considerada pode ser diferente em relação ao indicado nos distintos guias de bioisecção (CARDOT et al., 2016). As agências brasileira e europeia definem a maior dose como sendo a administrada (SEDIQ et al., 2013; EMA, 2010; BRASIL, 2011a), já o FDA considera a maior dose disponível (FDA, 2015). Além disso, em cada país os medicamentos podem estar disponíveis em diferentes doses, o que pode levar a uma divergência na solubilidade (LINDENBERG et al., 2004).

A solubilidade em equilíbrio também pode ser afetada por outros fatores como a temperatura, tempo de sedimentação, quantidade do excesso de matéria prima, processo de filtração; além do tempo de duração do experimento, o qual pode ser muito longo (BAKA et al., 2008; ISSA; FERRAZ, 2011; DEZANI et al., 2013).

Neste contexto, o método de dissolução intrínseca vem sendo utilizado por alguns estudos para determinação da solubilidade visando definição da classificação segundo o SCB. Sugere-se que este método seja utilizado para classificar fármacos, uma vez que a VDI é um fenômeno de velocidade, o qual se espera que correlacione melhor com a dinâmica de

dissolução *in vivo* (YU et al., 2004). Adicionalmente, o método de dissolução intrínseca possui como vantagem variabilidade de resultados geralmente menos significativa permitindo assim, melhor descrição do fenômeno (Yu et al., 2004; ISSA; FERRAZ, 2011).

Neste trabalho a solubilidade pela avaliação da dissolução intrínseca também foi determinada nos três meios tamponados. A escolha do volume de meio a ser utilizado nos experimentos, normalmente é um fator importante a ser considerado. Sempre que possível o teste deve ser realizado atendendo a condição *sink*; ou seja, de não saturação onde o volume do meio de dissolução deve ser capaz de dissolver a quantidade esperada do fármaco liberado. Este volume deve ser de 3 a 10 vezes a solubilidade de saturação do fármaco (DRESSMAN; FLEISHER, 1986).

No caso da valsartana, considerando a solubilidade determinada pelo método da agitação orbital em frascos neste trabalho, para que a condição *sink* fosse atendida, seriam necessários volumes de 12.000,00 mL do meio FGSSE (pH=1,2), 780,50 do TA (pH=4,5) e 104,23 mL do SESSE (pH=6,8). Foram utilizados 900,0 mL de meio de dissolução (BRASIL, 2010a), demonstrando, portanto que a valsartana somente não atendeu as condições *sink* no meio FGSSE (pH=1,2).

Os meios de dissolução foram degaseificados antes do ensaio para evitar a formação de bolhas e a temperatura utilizada foi de $37 \pm 0,5$ °C para se aproximar das condições *in vivo*. Foi utilizado o aparato de disco rotativo e para este normalmente é recomendada uma velocidade de agitação 300 rpm, porém, as velocidade típicas podem variar de 60-500 rpm (UNITED STATES, 2017a). Assim foi utilizada a velocidade de 100 rpm.

Em relação ao tempo do experimento, uma das vantagens da dissolução intrínseca é o menor gasto de tempo (Yu et al., 2004; ISSA; FERRAZ, 2011). Versões mais antigas da farmacopeia americana determinavam que para o cálculo da VDI a liberação do fármaco deveria atingir 10% (UNITED STATES, 2007). Porém, versões mais atuais não determinam mais este porcentual mínimo para quantificação da VDI. Neste trabalho a VDI foi calculada em diferentes tempos, havendo ou não liberação referente a 10% do fármaco. Por exemplo, no meio SESSE (pH=1,2) a VDI foi calculada em intervalos de 120 a 210 e também de 240 a 1440 minutos, além do intervalo total de 120 a 1440 minutos. Neste meio a liberação não atingiu 10%. Os valores de VDI destes três intervalos foram de 0,0074, 0,0084 e 0,0070 mg/min/cm², respectivamente. No meio TA (pH=4,5) a VDI foi calculada em intervalos de 60 a 180 e também de 210 a 480 minutos. No primeiro intervalo a liberação não havia atingido 10% de liberação e no segundo sim. Os valores de VDI destes intervalos foram de 0,0746 e 0,0723 mg/min/cm², respectivamente. No intervalo total do estudo a VDI foi de 0,0726

mg/min/cm². No último meio avaliado, o FGSSE (pH=6,8) a VDI foi calculada em intervalos de 30 a 120; 150 a 240 e no intervalo total de 30 a 240 minutos. Neste meio, no primeiro ponto de coleta a liberação já havia atingido 10%. Os valores de VDI destes intervalos foram de 0,6131; 0,5965 e 0,6073 mg/min/cm², respectivamente. Os resultados obtidos mostraram que, independente do tempo e da quantidade liberada, a VDI não sofre alterações significativas. Esta informação corrobora com o fato de a farmacopeia americana não mais preconizar o valor de 10% de liberação para cálculo da VDI.

Para a determinação do tempo dos experimentos de dissolução intrínseca neste trabalho foi levado em consideração dados encontrados na literatura, bem como, o tempo de ocorrência dos 10% de liberação do fármaco em cada meio. A maioria dos estudos utilizam 8 horas para fármacos de baixa solubilidade e menos tempo para os de alta solubilidade (ZAKERI-MILANI et al., 2009; ZHANG et al., 2012; UNITED STATES, 2015; UNITED STATES, 2017a). No FGSSE (pH=1,2) houve uma pequena liberação, sendo que esta não chegou a 10%, desta forma o tempo total determinado foi um pouco mais longo, de 1440 minutos (24 h). No TA (pH=4,5) o experimento durou 480 minutos e no SESSE (pH=6,8) foi de 240 minutos, onde já havia ocorrido a liberação referente a 10% nos dois últimos meios.

Outras condições a serem determinadas para o estudo de dissolução intrínseca é a quantidade de IFA a ser utilizado, bem como a força e o tempo de compressão para formação do compacto. Porém, a literatura, não apresenta um consenso em relação a estes parâmetros, havendo uma ampla variação entre os estudos avaliados; onde, por exemplo, a quantidade de IFA utilizado variou de 100 a 500 mg. Com relação à força e o tempo de compressão, também são encontrados valores variados e em diferentes unidades: tonelada (T), Mega Pascal (Mpa) e *Pound force per square inch* (Psi) (ZAKERI-MILANI et al., 2009; ZHANG et al., 2012; ZHOU et al., 2014; TSENG et al., 2014; SOUZA, 2015).

Neste trabalho primeiramente foi testada a quantidade de 100 mg de IFA utilizando uma força de compressão de 1 T por 30 segundos. No entanto, no meio SESSE (pH= 6,8) houve a formação de uma curvatura ascendente no gráfico de concentração versus tempo devido a desintegração do compacto (UNITED STATES, 2017a). Assim, a quantidade foi aumentada e determinada como 200 mg.

Existem dois diferentes critérios na literatura para determinação da solubilidade por dissolução intrínseca. De acordo com Yu e colaboradores (2004), fármacos que apresentam VDI maior do que 0,1 mg/min/cm² são de alta solubilidade. Além deste, Zakeri-Milani e colaboradores (2009), adotam um valor maior, ou seja, consideram que um fármaco é de alta solubilidade quando a VDI é maior do que 1,0 mg/min/cm².

Os resultados obtidos nos meios FGSSE (pH=1,2) e TA (pH=4,5) determinaram uma VDI para a valsartana de 0,0074 e 0,0726 mg/min/cm², respectivamente. Assim, nestes meios ela é classificada como fármaco de baixa solubilidade, considerando ambos os critérios. Porém, no meio SESSE (pH=6,8) sua VDI foi de 0,6073 mg/min/cm², havendo uma divergência na classificação da sua solubilidade ao serem considerados ambos os critérios. Ao considerarmos o trabalho de Yu e colaboradores (2004), a valsartana seria um fármaco de alta solubilidade; contrariamente, de acordo com de Zakeri-Milani e colaboradores (2009), ela seria de baixa solubilidade.

Para a classificação da valsartana como fármaco de alta ou baixa solubilidade, a partir dos dados obtidos pela dissolução intrínseca, adotou-se o critério estabelecido por Yu e colaboradores (2004). Esta escolha foi realizada em função da semelhança na utilização do aparato disco rotativo em ambos os trabalhos. Ao contrário, o trabalho de Zakeri-Milani e colaboradores (2009) utilizou o aparato disco estacionário e, é conhecido que diferentes sistemas de disco podem causar diferentes condições hidrodinâmicas, como a velocidade do fluido e taxa de cisalhamento (D'ARCY et al., 2006; ZHANG et al., 2012). De acordo com os resultados de VDI aqui obtidos, a valsartana foi considerada um fármaco de baixa solubilidade nos meios FGSSE (pH=1,2) e TA (pH=4,5) e de alta solubilidade no meio SESSE (pH=6,8). Interessante notar que neste trabalho, os resultados obtidos a partir dos dois métodos de estudo da solubilidade de fármacos, agitação orbital em frascos e dissolução intrínseca, corroboram entre si, apesar das diferentes características.

Para fins de classificação biofarmacêutica pelo SCB, para um fármaco ser classificado como de alta solubilidade, este deve apresentar esta característica nos três meios avaliados, de forma a representar seu comportamento ao longo de todo o TGI. No caso da valsartana, nos estudos de solubilidade realizados neste trabalho, esta condição não foi seguida, uma vez que nos meios FGSSE (pH=1,2) e TA (pH=4,5) ela foi definida como de baixa solubilidade. Este resultado corrobora com trabalhos anteriores que identificam a solubilidade da valsartana como dependente do pH (SAYDAM; TAKKA, 2007; NALLURI et al., 2012). Desta forma, a valsartana deve ser classificada como fármaco de baixa solubilidade, classes II ou IV de acordo com o SCB. Pode-se dizer ainda, a partir dos resultados obtidos, que para a determinação da solubilidade da valsartana, o método de dissolução intrínseca foi equivalente ao da agitação orbital em frascos, podendo ser utilizado neste caso para classificação biofarmacêutica.

A solubilidade aquosa é um fator predominante para a dissolução de um fármaco nos fluidos do TGI. O fármaco contido na forma farmacêutica deve ser liberado e dissolvido nos líquidos do TGI, para então se solubilizar (OLIVERA; MANZO, 2009).

O processo de dissolução de fármacos *in vivo* é considerado uma etapa limitante para a absorção de fármacos de baixa solubilidade a partir de FFSOLI. Para fármacos de alta solubilidade, quando esta dissolução é identificada como rápida ou muito rápida em relação ao esvaziamento gástrico é improvável que a velocidade e extensão de absorção dependam da dissolução e/ou tempo de transido gastrointestinal. Neste caso a realização de estudos de BE *in vivo* pode não ser necessária, desde que os excipientes utilizados nas formulações sejam semelhantes e não afetem significativamente a absorção (FDA, 2015). Desta forma, a realização de estudos *in vitro* que reflitam o que ocorre *in vivo* (AMIDON et al., 1995; SOUZA et al., 2007) podem ser aplicáveis à garantia indireta da segurança e eficácia dos medicamentos. Dados gráficos de quantidade dissolvida em função do tempo podem então ser utilizados de forma a prever o comportamento *in vivo* dos fármacos (SOUZA et al., 2007).

O perfil de dissolução de três produtos farmacêuticos contendo valsartana disponíveis no mercado brasileiro foi realizado neste trabalho: produto A foi o medicamento de referência, o produto B um genérico e o produto C um similar. Após o levantamento de todos os medicamentos na FFSOLI contendo valsartana do mercado brasileiro e listagem dos excipientes presentes nas formulações, a escolha destes três produtos foi inicialmente baseada na presença de algum excipiente crítico, para análise de uma possível interferência na dissolução e, conseqüentemente, na biodisponibilidade. De acordo com o levantamento realizado, somente um dos medicamentos genéricos comercializados e um similar continham a presença do excipiente crítico lauril sulfato de sódio (BRASIL, 2011a). Entretanto, somente o medicamento similar foi adquirido, uma vez que não foi possível a compra necessária de 4 caixas do mesmo lote do medicamento genérico. Assim, optou-se pela compra do medicamento genérico acessível.

Uma vez adquiridas as amostras de medicamentos, foi necessário estabelecer as condições a serem utilizadas no perfil de dissolução. Estas condições devem partir daquelas estabelecidas na monografia individual do medicamento, posteriormente devem ser definidos os tempos de análise de tal forma que o método seja discriminativo, ou seja, capaz de detectar pequenas mudanças na liberação do fármaco a partir do produto. Caso não exista monografia farmacopeica, ou não seja detalhado o método o estudo de dissolução deve ser desenvolvido empregando ao menos três meios distintos. Um método desenvolvido de forma apropriada reflete mudanças na formulação, processo de fabricação e características físico-químicas do

fármaco, que podem afetar significativamente a solubilidade e/ou desempenho *in vivo* do produto (MARQUES, 2009; BRASIL, 2010a).

Para definição da composição e volume do meio de dissolução a ser utilizado é importante conhecer a solubilidade do fármaco em função do pH, uma vez que, como já mencionado acima, deve-se garantir que a condição *sink* seja atendida. Foi observado que no meio pH=1,2 a valsartana encontra-se não ionizada e possui baixa solubilidade, não atendendo portanto as condições de não saturação. No entanto, desvios nas condições *sink* são aceitáveis desde que seja demonstrado que o método é discriminativo (MARQUES, 2009).

A composição do meio de dissolução deve ser biorrelevante, ou seja, próxima do que ocorre *in vivo* (MARQUES, 2009). Adicionalmente, deve-se ressaltar que nos estudos visando avaliação da possibilidade de bioisenção, o perfil de dissolução deve ser realizado nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8), sem adição de enzimas (BRASIL, 2011a; FDA, 2015).

Neste trabalho, o aparato II (pás) foi escolhido como preconizado pelo guia de bioisenção do FDA (2015) e este mesmo guia define que utilizando este aparato o perfil de dissolução deve ser realizado com volume de meio de 500 mL ou menos. Porém, com este volume, a valsartana não atenderia as condições *sink* no meio FGSSE (pH=1,2) e também no meio TA (pH=4,5). Além disso, a monografia da farmacopeia americana da valsartana determina a utilização de 1000 mL de meio no estudo de dissolução (UNITED STATES, 2016). Entretanto, considerando a RDC 37 (2011), que determina um volume de 900 mL para realização dos estudos de dissolução visando bioisenção, este volume foi então definido neste trabalho; uma vez que utilizando tanto 1000 ou 900 mL, as condições de não saturação são atendidas da mesma forma (BRASIL, 2011a).

A velocidade de agitação escolhida foi de 50 rpm uma vez que esta é determinada de acordo com o aparato a ser utilizado. Como foi escolhido o aparato II, são indicadas velocidade de 50 ou 75 rpm pelo FDA e de 50 rpm tanto pela Anvisa, quanto pela monografia individual da valsartana (BRASIL, 2011a; FDA, 2015; UNITED STATES, 2016).

O perfil de dissolução deve ser realizado com no mínimo 12 unidades do produto e as amostras devem ser coletadas em um número suficiente de intervalos para caracterizar o perfil de dissolução do medicamento (FDA, 2015). Nos meios FGSSE (pH=1,2) e TA (pH=4,5) foram utilizados somente 6 unidades de cada um dos três produtos avaliados, uma vez que na realização do piloto foi observado que nestes dois meios, o perfil de dissolução da valsartana não foi característico. Não apresentou a formação do platô, caracterizando a liberação de 100% do fármaco (BRASIL, 2010a). Assim, não havia a possibilidade de realizar a análise

estatística descartando, portanto a possibilidade de bioequivalência. Os perfis de dissolução das 6 unidades foram feitos somente para demonstração. Os tempos de coleta determinados foram de 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos.

Como apresentado nos gráficos dos perfis de dissolução da valsartana em função do tempo (Figuras 36 a 38), os produtos A (referência) e C (similar) apresentaram um perfil de liberação muito rápido (85% em 15 minutos) no meio SESSE (pH=6,8). No entanto, nos meios FGSSE (pH=1,2) e TA (pH=4,5) a liberação não chegou a 85% em 60 minutos, mesmo com o aumento da velocidade de agitação para 100 rpm que visa a dissolução a ponto infinito, o qual é importante uma vez que fornece informações adicionais sobre a uniformidade da dose (MARQUES, 2009). Não se espera que esta diferença na dissolução tenha ocorrido devido às condições *sink*, uma vez que somente no meio FGSSE (pH=1,2) esta não foi atendida.

Para comparação dos perfis de dissolução, avalia-se a curva como um todo podendo empregar o método modelo independente simples. Este método emprega um fator de diferença (F1) e um fator de semelhança (F2). Os perfis de dissolução comparativos são avaliados utilizando-se o cálculo de F2. Entretanto, quando as FFSOLI apresentam perfil de dissolução muito rápido, o cálculo de F2 perde o poder discriminativo e, portanto, não é necessário calculá-lo, pois o mesmo não terá significado. Nesses casos deve-se comprovar a dissolução muito rápida dos produtos, por meio do gráfico da curva, onde o coeficiente de variação no ponto de 15 minutos não pode exceder 10%. Nos perfis de dissolução da valsartana no meio SESSE (pH=6,8), os coeficientes de variação foram de 1,73; 7,31 e 4,15 para os produtos A (referência), B (genérico) e C (similar), respectivamente.

Devido à impossibilidade do cálculo de F2, foi utilizada a eficiência de dissolução para comparação dos perfis. Este é um parâmetro adicional considerado adequado para a avaliação da dissolução *in vitro* (KHAN; RHODES, 1972). É definida como a área sob a curva de dissolução, em um determinado tempo (t), expressa como a porcentagem da área do retângulo que corresponde a 100% de dissolução, no mesmo período de tempo (KHAN; RHODES, 1975). Nos meios FGSSE (pH=1,2) e TA (pH=4,5) não houve liberação de 100% do fármaco, a linha relativa ao processo de dissolução manteve sua inclinação, não atingindo um platô. Assim, a ED foi calculada somente no meio SESSE (pH=6,8) para os produtos A (referência) e C (similar) (Tabela 52), e como pode ser observado com os resultados obtidos (Figura 39), não houve diferença significativa entre eles; mesmo o último apresentando em sua formulação um tensoativo, que pode aumentar a dissolução e, conseqüentemente, a fração

absorvida, afetando a biodisponibilidade (AMIDON et al., 1995; SILVA; VOLPATO, 2002; MARTINEZ; AMIDON, 2002).

A valsartana apresentou um perfil de liberação rápido apenas no meio SESSE (pH=6,8), o que corrobora com os resultados da solubilidade neste pH, no qual em ambos os métodos a solubilidade foi considerada elevada. O guia de bioensação preconiza que para fármacos classe I ou III, este perfil de liberação rápido ou muito rápido deve ser comprovado nos três meios tamponados, de forma a mimetizar o TGI como um todo, visando alcançar uma probabilidade bem realística na simulação do que ocorre *in vivo* (FDA, 2015).

A determinação de peso, friabilidade, dureza, desintegração e teor foram realizados nos três produtos contendo valsartana. Estes foram conduzidos e avaliados de acordo com os procedimentos e avaliados de acordo com os limites preconizados nos capítulos gerais da Farmacopeia Brasileira 5ª edição e para o teor foi utilizado o método desenvolvido e validado neste projeto utilizando como referência os limites de aceitação contidos na monografia individual do produto (UNITED STATES, 2016).

Vale ressaltar os resultados referentes ao teor (Tabela 48), sendo que de acordo com a monografia individual do produto, os comprimidos devem conter no mínimo 95,0 e no máximo 105,0% da quantidade declarada ($C_{24}H_{29}N_5O_3$) (UNITED STATES, 2016). Os produtos A (referência) e B (genérico) apresentaram um teor dentro dos limites especificados na Farmacopeia Americana. No entanto, para o produto C (similar), foi obtido um teor um pouco acima do máximo, 106,32% da quantidade declarada.

Como o teor foi determinado por meio de método desenvolvido e validado neste trabalho e não conforme método farmacopeico, este não pode ser considerado um resultado conclusivo, já que a seletividade do método desenvolvido não foi testada em relação aos excipientes da formulação. Além disso, a primeira monografia da valsartana identificada foi a USP 35, publicada em 2012, mesmo ano de registro do medicamento referência na Anvisa. Assim, pode-se intuir que, muito provavelmente, o limite de teor a ser considerado para o registro foi conforme o fabricante, ou seja, por método indicado pelo fabricante. Caso parecido ao ocorrido e justificado pela Anvisa com o fármaco da mesma classe, a losartana (ANVISA, 2017b).

Ainda vale discutir que considerando os perfis de dissolução no meio utilizado para determinação do teor, SESSE (pH=6,8), a média das liberações obtidas com o ponto infinito foram de 98,99; 100,08 e 97,04 para os produtos A (referência), B (genérico) e C (similar), respectivamente. Conforme já mencionado acima, o ponto infinito traz informações importantes em relação à uniformidade da dose. Desta forma, considerando o critério de 90,0

a 105,0%, os três produtos estão dentro dos limites especificados, reforçando a questão da seletividade em relação aos excipientes.

Com relação aos excipientes, estes são importantes componentes de uma formulação farmacêutica e relacionam-se com a via de administração, forma farmacêutica, características físico-químicas do fármaco, ação terapêutica desejada, fatores tecnológicos e propriedades funcionais requeridas. Eles não devem ser chamados de inertes, já que podem atuar como promotores de uma característica desejável ou não do fármaco; podendo interferir na solubilidade e, conseqüentemente, biodisponibilidade de fármacos, além de promover efeitos adversos (KALINKOVA, 1999).

O FDA descreve uma lista de excipientes aprovados para uso em medicamentos bem como a quantidade máxima de cada um a ser utilizado para cada via de administração e forma farmacêutica (UNITED STATES, 2017b). Como é conhecido, para a bioisenção de fármacos classes I e III, os excipientes utilizados na formulação não devem afetar a absorção (FDA, 2015). Assim, quando uma quantidade de excipiente utilizado for diferente da definida na relação acima mencionada, deve-se justificar a ausência do efeito deste na biodisponibilidade do fármaco (POLLI et al., 2008).

De acordo com a análise dos excipientes presentes nas FFSOLI contendo valsartana (Tabela 44), existem seis excipientes comuns entre os três produtos (A, B e C), que são: celulose microcristalina, crospovidona, dióxido de silício, estearato de magnésio, dióxido de titânio e macrogol. Considerando as informações do guia de bioisenção da Anvisa, dentre estes, nenhum é considerado um excipiente crítico que possa afetar a biodisponibilidade dos fármacos (BRASIL, 2011a). No entanto, um estudo demonstrou que a celulose microcristalina promove a transformação da forma polimórfica E de mefloquina para a D. Porém outros, como lactose hidratada não demonstram efeitos sobre os cristais (STORPIRTIS, 1999).

O estearato de magnésio geralmente é utilizado em associação com o talco, assim como observado no produto B (genérico). Vale ressaltar aqui que estes formam uma camada hidrofóbica entre as partículas, inibindo a penetração de água na forma farmacêutica, o que pode levar ao comprometimento da velocidade de dissolução (STORPIRTIS et al., 1999; PRISTA et al., 1995).

O lauril sulfato de sódio, presente no produto C (similar) é um componente crítico na formulação. O uso de tensoativos é uma das principais estratégias para aumentar a solubilidade de fármacos, levando ao aumento da quantidade absorvida afetando a biodisponibilidade (AMIDON et al., 1995; SILVA; VOLPATO, 2002; MARTINEZ; AMIDON, 2002). Assim, o lauril sulfato de sódio, além de outros como: sorbitol, manitol,

maltitol, etoxilato de óleo de rícino, polissorbato 80 estão presentes na lista de fármacos da Anvisa, que comprovadamente afetam a biodisponibilidade (BRASIL, 2011a). A presença de lauril sulfato de sódio na formulação do medicamento similar pode ter facilitado a dissolução da valsartana em comparação ao medicamento genérico no meio pH=6,8; levando à maior similaridade no perfil de dissolução em relação ao medicamento referência. No caso de um produto candidato a genérico pelo critério da bioisenção, este deve possuir excipientes qualitativamente idênticos ao referência e quantitativamente muito semelhantes (BRASIL, 2011).

Outro fator que pode ter contribuído para maior diferença do produto B (genérico) em relação aos produtos A (referência) e C (similar), pode ser a forma de produção do medicamento. As características de uma formulação estão diretamente ligadas ao processo produtivo definido na fase de desenvolvimento (BUENO; RECH, 2009). Desta forma, estas alterações podem interferir na liberação do produto da forma farmacêutica. Por exemplo, a micronização pode levar a agregação das partículas, diminuindo a área de contato com o meio reduzindo, portanto a velocidade de dissolução e conseqüentemente a biodisponibilidade do fármaco (ASHFORD, 2007). Assim, vale ressaltar a importância das Boas Práticas de Fabricação para assegurar que os produtos são consistentemente produzidos e controlados com padrões de qualidade apropriados para o uso pretendido e requerido pelo registro (BRASIL, 2010c).

A permeabilidade é um dos fatores determinantes para a absorção de fármacos a partir do TGI, contribuindo para prever a sua biodisponibilidade. No entanto, a absorção é considerada um processo complexo, sendo difícil a utilização de apenas um modelo *in vitro* para prever com precisão as características de permeabilidade *in vivo* (BALIMANE et. al., 2000; SOUZA et al., 2007).

Com o intuito de identificar a permeabilidade da valsartana neste trabalho, primeiramente esta foi determinada por método *in silico*, normalmente considerado como uma triagem computacional. É um modelo preditivo que minimiza demorados passos de síntese e tem recebido muita atenção nos últimos anos em estudos de desenvolvimento de novos fármacos (BALIMANE et. al., 2000).

Os resultados do log P da valsartana obtidos pelo método *in silico* por meio dos programas computacionais Molinspiration e MarvinSketch, foram de 3,08 e 5,00, respectivamente (Tabela 53), pode-se sugerir que a valsartana se comporta ou possibilita a obtenção de resultados equivalentes a um fármaco de alta permeabilidade, pois os valores de log P encontrados foram maiores do que 1,72 que é o valor de referência do metoprolol,

fármaco de alta permeabilidade (KASSIM et al., 2003). Porém, os estudos *in silico* são modelos completamente empíricos e não levam em consideração os transportadores de membrana que podem interferir na permeabilidade de um fármaco (WATERBEEMD; GIFFORD, 2003). Considerando que a valsartana é substrato para transportadores de influxo e efluxo, os resultados obtidos parecem não condizer com sua permeabilidade real.

Para análise dos resultados do log D da valsartana (Figura 40), também foi feita uma comparação com o metoprolol. Foi considerado o log D do fármaco em pH= 6,5 uma vez que foi o pH avaliado no estudo de Kassim e colaboradores (2003). Neste pH, a valsartana apresentou log D=3, valor maior do que o do metoprolol (- 1,48) e, portanto, considerada um fármaco de alta solubilidade. Neste estudo, 13 dos 15 medicamentos teste (87%) foram corretamente classificadas em relação ao metoprolol quando correlacionados a permeabilidade humana. Dois medicamentos de baixa permeabilidade foram classificados como de alta, sendo neste contexto falsos positivos (KASSIM et al., 2003). Porém, valores de log P e log D são utilizados somente como uma estimativa para determinação da permeabilidade, não sendo o método de escolha.

Além da determinação da permeabilidade da valsartana pelo método *in silico*, foi feita uma revisão da literatura para compilar dados de permeabilidade referentes a este fármaco.

A aplicação bem sucedida de modelos *in vitro* para prever a absorção de fármacos através da mucosa intestinal depende da proximidade com o qual este imita as características do epitélio intestinal *in vivo*. Apesar da dificuldade de desenvolvimento de um único sistema *in vitro* que possa simular todas as condições existentes no intestino humano, vários sistemas são usados rotineiramente como ferramentas de tomada de decisão na descoberta precoce de medicamentos (BALIMANE et. al., 2000).

Um dos métodos avaliados para a determinação da permeabilidade foi o PAMPA, no entanto foram encontrados somente dois estudos (Tabela 53) que apresentavam valores de P_{eff} de 1,20 e $0,10 \times 10^{-6}$ cm/s (POIRIER et al., 2009; SUGANO et al., 2012). Porém estes estudos não apresentavam dados suficientes para discussão a respeito da permeabilidade do fármaco, uma vez que não citam quais foram as referências de alta e baixa permeabilidade para comparação dos resultados. Adicionalmente deve ser lembrado que o método PAMPA é aplicável apenas para estudo da permeabilidade por meio de transporte passivo transcelular (KANSY et al., 1998; BALIMANE et. al., 2000) e este não é o caso da valsartana; ela é um fármaco substrato para transportadores tanto de influxo, quanto de efluxo presentes nos enterócitos, ou seja dependente de transporte ativo.

Foram encontrados também, estudos utilizando células caco-2 para determinação da permeabilidade (Tabela 53). Segundo estes, a valsartana pode ser considerada como um fármaco de baixa permeabilidade, uma vez que os valores de $P_{app\ A-B}$ encontrados na literatura foram de $0,71 \times 10^{-6}$ cm/s (SKOLNIK et al., 2009; LOZOYA-AGULLO et al., 2015b) e $1,86 \times 10^{-6}$ cm/s (NEKKANTI et al., 2015). Estes valores estão abaixo do critério de Di e Kerns (2008), que preconizam que um fármaco é de baixa permeabilidade quando $P_{app} < 2 \times 10^{-6}$ cm/s. A P_{app} também foi menor do que $18,21 \pm 0,79 \times 10^{-6}$ cm/s, que é o valor da P_{app} do metoprolol, que é um fármaco utilizado como referência de alta permeabilidade (REFSGAARD et al., 2005). Além disso, de acordo com os resultados de Skolnik e colaboradores (2009), este fármaco apresenta transporte de efluxo, que pode ser caracterizado pela $P_{app\ B-A}$ ($1,48 \times 10^{-6}$ cm/s) maior do que $P_{app\ A-B}$ ($0,71 \times 10^{-6}$ cm/s). Este tipo de transporte atua em sentido contrário a absorção, funcionando como uma barreira e pode ser um agente causador da baixa permeabilidade da valsartana.

Vale ressaltar que para fins de classificação biofarmacêutica pelo SCB, a permeabilidade deve ser determinada por estudos farmacocinéticos em humanos, como os testes de biodisponibilidade oral e perfusão *in vivo* utilizando seguimento intestinal (FDA, 2015; EMA, 2010; BRASIL, 2011a; WHO, 2015), uma vez que devido à presença de transportadores, inervação e vasos sanguíneos que contribuem para a permeação, estes sistemas se tornam mais completos e contribuem para resultados mais reais e confiáveis (SOUZA et al, 2007).

Considerando os trabalhos *in vivo* descritos na Tabela 53, pode-se dizer que a valsartana é considerada um fármaco de baixa permeabilidade, uma vez que apresentou uma fração de absorção tanto em humanos quanto em ratos, menor do que 85% (EMA, 2010; BRASIL, 2011a; FDA, 2015; WHO, 2015). Com estes resultados de baixa permeabilidade a valsartana poderia ser classificada como classes III ou IV segundo o SCB.

Em relação à definição da classificação biofarmacêutica da valsartana, interessante observar que os resultados de solubilidade obtidos neste trabalho corroboram com uma das possibilidades encontradas na literatura: classe II (KAZA et al., 2013; GOVINDASWAMY; UMASANKAR, 2014; CHOWDARY et al., 2014); uma vez que por ambos os métodos utilizados, agitação orbital em frascos e dissolução intrínseca, o fármaco foi identificado como de baixa solubilidade (classes II ou IV). Por outro lado, em relação à permeabilidade, a partir de dados oriundos de experimentos em humanos (FLESH et al., 1997; PÉREZ et al., 2006; HEDAYA, M.A; HELMY, 2013), a valsartana foi considerada como um fármaco de baixa permeabilidade (classes III ou IV) e, por isto seria classificada de acordo com outros

autores (SAYDAM; TAKKA, 2007; KUMAR et al., 2012a) que a descrevem como classe III. No entanto, torna-se relevante notar que ao avaliar conjuntamente os dados deste trabalho a valsartana apresenta baixas solubilidade e permeabilidade e, portanto é definida como um fármaco da classe IV, em desacordo aos já publicado até o momento. Neste contexto, é importante ressaltar que as condições aqui consideradas são as indicadas e aceitas pelas agencias regulatórias e OMS para definição desta classificação.

11 CONCLUSÃO

Um método analítico por cromatografia a líquido de alta eficiência para quantificação da valsartana nos meios FGSSE (pH=1,2), TA (pH=4,5) e SESSE (pH=6,8) foi desenvolvido e validado. O método se mostrou seletivo, linear, preciso e exato nas faixas de concentração estabelecidas, conseqüentemente aplicável à quantificação da valsartana nos estudos de solubilidade e dissolução.

Os estudos de solubilidade realizados pelo método da agitação orbital em frascos (*shake-flask*) e por dissolução intrínseca, mostraram que a valsartana não cumpre o requisito de alta solubilidade na faixa de pH 1,2 a 6,8 sendo portanto um fármaco de baixa solubilidade, classes II ou IV do SCB

Na avaliação da possibilidade ou não de bioisenção, os estudos de dissolução devem ser considerados para fármacos que apresentam alta solubilidade. Em decorrência da baixa solubilidade da valsartana, os estudos de dissolução foram realizados apenas para a comparação *in vitro* de produtos que estão no comércio. Por meio dos resultados obtidos para os medicamentos sob a FFSOLI contendo este fármaco, somente os produtos A (referência) e C (similar), no meio SESSE (pH=6,8), apresentaram liberação muito rápida (85% em 15 minutos). Para ser candidato a bioisenção, além da alta solubilidade do fármaco, o medicamento deve apresentar dissolução no mínimo rápida nos três meios, o que não ocorreu.

Considerando dados de permeabilidade *in vivo* da valsartana, esta foi considerada um fármaco de baixa permeabilidade, classe III ou IV do SCB.

Associando os dados experimentais de solubilidade realizados e os dados compilados de permeabilidade pode-se concluir que a valsartana é um fármaco da classe IV do SCB (baixa solubilidade e baixa permeabilidade), não sendo desta forma, um candidato à bioisenção.

12 REFERÊNCIAS

AMIDON, G. L.; LENNERNÄS, H., SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A theoretical basis for a Biopharmaceutics Drug Classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.

AMIDON, G. L.; BERMEJO, M. Modern Biopharmaceutics. Ann Arbor: TSRL, 2003. 1 CD-ROM. Version 6.03.

ANVISA. Lista de Medicamentos de Referência. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/referencia/lista.pdf>>. Acesso em: 15 de julho de 2016a.

ANVISA. Lista de Medicamentos Genéricos. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/352400/1.1+Gen%C3%A9ricos+registrados+-+por+nome+do+gen%C3%A9rico+31-03-2017.pdf/9e4ce425-7915-4cc1-b870-05ee305c1a8f>>. Acesso em: 15 de julho de 2016b.

ANVISA. Lista de Medicamentos Similares. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/352782/Lista+de+medicamentos+similares+intercambi%C3%A1veis/27d0f06c-5082-4a92-a667-08b4763a498f>>. Acesso em: 15 de julho de 2016c.

ANVISA. Insuficiência cardíaca tem novo tratamento aprovado. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/insuficiencia-cardiaca-tem-novo-tratamento-aprovado/219201?p_p_auth=Wp876qs2&inheritRedirect=false&redirect=http%3A%2F%2Fportal.anvisa.gov.br%2Fnoticias%3Fp_p_auth%3DWp876qs2%26p_p_id%3D101_INSTANCIE_FXrpx9qY7FbU%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview%26p_p_col_id%3Dcolumn-4%26p_p_col_count%3D2>. Acesso em: 16 de maio de 2017a.

ANVISA. Anvisa contesta Fantástico e garante: genérico é seguro. Nota à imprensa sobre segurança de medicamentos genéricos. Disponível em: < http://portal.anvisa.gov.br/rss/-/asset_publisher/Zk4q6UQCj9Pn/content/id/3210217>. Acesso em: 08 de julho de 2017b.

ARRUNÁTEGUI, L.B.; SILVA-BARCELLOS, N.M.; BELLAVINHA, K.R.; EV, L.S.; SOUZA, J. Biopharmaceutics classification system: importance and inclusion in biowaiver guidance. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 1, p. 143-154, 2015.

ASADA, H.; DOUEN, T.; WAKI, M.; ADACHI, S.; FUJITA, T.; YAMAMOTO, A.; MURANISHI, S. Absorption characteristics of chemical modified-insulin derivatives with various fatty acids in the small and large intestine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.84, p.682-687, 1995.

ASHFORD, M. Biopharmaceutical Principles of Drug Delivery: Bioavailability – Physicochemical and dosage form factors. In: AULTON, M. E. Aulton's pharmaceuticals: the Design and manufacture of medicines. Edinburgh; New York: Churchill Livingstone, 2007.

ATISOOK, K.; CARLSON, S.; MADARA, J.L. Effects of phlorizin and sodium on glucose-elicited alterations of cell junctions in intestinal epithelia, **American Journal of Physiology**, v.258, p.c77-c85, 1990.

BABU, V. R.; AREEFULLA, S. H.; MALLIKARJUN, V. Solubility and dissolution enhancement: an overview. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, n. 1, p. 141-145, 2010.

BAEK, I.; KIM, J.; HA, E.; CHOO, G.; CHO, W.; HWANG, S. D.; KIM, M. Oral absorption of a valsartan-loaded spray-dried emulsion based on hydroxypropylmethyl cellulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 69, p. 222-228, 2014.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S.; MORRISON, R. A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, p. 301-312, 2000.

BELLAVINHA, K.R.; SILVA-BARCELLOS, N. M.; LEITE, J.C.; SOUZA, J. B.; SOUZA, J. Folic acid: a biopharmaceutical evaluation. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 1, p. 1-8, 2014.

BOX, K. J.; VÖLGYI, G.; BAKA, E.; STUART, M.; TAKÁCS-NOVÁK, K.; COMER, J. E. A. 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, 2006.

BRASIL. Lei n.6360 de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a Vigilância Sanitária a que ficam sujeitos os Medicamentos, as Drogas, os Insumos Farmacêuticos e Correlatos, Cosméticos, Saneantes e Outros Produtos, e dá outras Providências. **Diário Oficial da União**, Brasília 24 de setembro de 1976.

BRASIL. Constituição da República Federativa do Brasil: de 05 de outubro de 1988. **Diário Oficial da União**, Brasília 05 de outubro de 1988.

BRASIL. Portaria n.3916 de 30 de fevereiro de 1998. Aprova a Política Nacional de Medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília 10 de novembro de 1998.

BRASIL. Lei n.9782 de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília 27 de janeiro de 1999a.

BRASIL. Lei n.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. **Diário Oficial da União**, Brasília 10 de fevereiro de 1999b.

BRASIL. Resolução RDC n. 133, DE 29 DE MAIO DE 2003. Dispõe sobre o registro de Medicamento Similar e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília 02 de junho de 2003a.

BRASIL. Resolução RDC n. 134, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre a adequação dos medicamentos já registrados. **Diário Oficial da União**, Brasília 02 de junho 2003b.

BRASIL. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília 02 de junho de 2003c.

BRASIL. Resolução-RE nº 1.170, de 19 de abril de 2006. Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 de abril de 2006.

BRASIL. Resolução RDC nº31, de 11 de agosto de 2010. Dispõe sobre a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 12 de agosto de 2010a.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira, volume 1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2010b.

BRASIL. Resolução RDC nº17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 12 de abril de 2010c.

BRASIL. Lei n.37 de 03 de agosto de 2011. Dispõe sobre o Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 03 de agosto de 2011a.

BRASIL. Instrução Normativa IN nº 4, de 03 de agosto de 2011. Dispõe sobre a lista de fármacos candidatos à bioisenção baseada no sistema de classificação biofarmacêutica (SCB) e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 03 de agosto de 2011b.

BRASIL. Instrução Normativa IN nº 2, de 14 de março de 2013. Determina a publicação da “Lista de fármacos candidatos à bioisenção baseada no sistema de classificação biofarmacêutica (SCB)” e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 15 de março de 2013.

BRASIL. Instrução Normativa IN nº 07, de 21 de agosto de 2014. Determina a publicação da “Lista de fármacos candidatos à bioisenção baseada no sistema de classificação biofarmacêutica (SCB)” e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 de agosto de 2014a.

BRASIL. Resolução RDC nº 58, de 10 de outubro de 2014. Dispõe sobre as medidas a serem adotadas junto à Anvisa pelos titulares de registro de medicamentos para a intercambialidade de medicamentos similares com o medicamento de referência. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 13 de outubro de 2014b.

BRASIL. Consulta Pública nº 139, de 2 de março de 2016. Estabelece o envio de comentários e sugestões ao texto da proposta de inclusão de capítulo na Farmacopeia Brasileira: Determinação da Solubilidade Aplicada à Bioisenção de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 04 de março de 2016a.

BRASIL. Instrução Normativa IN nº 10, de 29 de setembro de 2016. Determina a publicação da “Lista de fármacos candidatos à bioisenção baseada no sistema de classificação biofarmacêutica (SCB)” e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 de setembro de 2016b.

BRITO, N.M.; JUNIOR, O.P.A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003

BUENO, M.M.; RECH, N. Insumos Farmacêuticos – Aspectos Técnicos, Científicos e Regulatórios. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. **Ciências Farmacêuticas Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 17-18.

CAPPELLO, B.; MAIO, C.; IERVOLINO, M.; MIRO, A. Improvement of Solubility and Stability of Valsartan by Hydroxypropyl-*b*-Cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 54, p. 289-294, 2006.

CARDOT, J. M.; ARIETA, A. G.; PAIXAO, P.; TASEVSKA, I.; DAVIT, B. Implementing the Biopharmaceutics Classification System in Drug Development: Reconciling Similarities,

Differences, and Shared Challenges in the EMA and US-FDA-Recommended Approaches. **American Association of Pharmaceutical Scientists**. 2016

ÇELİK, M. The past, present, and future of tableting technology. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.22, n.1, p.1-10, 1996.

CHALLA, V. R.; BABU, P. R.; CHALLA, R. S.; JOHNSON, B.; MAHESWARI, C. Pharmacokinetic interaction study between quercetin and valsartan in rats and *in vitro* models. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 6, p. 865–872, 2013.

CHONG, S.; DANDO, S.; MORRISON, R. Evaluation of Biocat intestinal epithelium differentiation environment (3- day cultured Caco-2 cells) as a absorption screening model with improved productivity. **Pharmaceutical Research**, v.14, p.1835-1837, 1997.

CHOWDARY, K. P. R.; RAVI SHANKAR, K.; RAVI SANKAR, P. Optimization of valsartan tablete formulation by 23 factorial design. **Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 1, p.1374-1379, 2014.

COATES, J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, 2006.

CRISCIONE, L.; BRADLEY, W.A.; BUHLMAYER, P.; WHITEBREAD, S.; GLAZER, R.; LLOYD, P.; MUELLER, P.; GASPARO, M. Valsartan: Preclinical and Clinical Profile of a Antihypertensive Angiotensin-II Antagonist. **Cardiovascular Drug Reviews**, v. 13, n. 3, p. 230-250, 1995.

DA LUZ, A. B.; DAMASCENO, E. C. Caulim um Mineral Industrial Importante. CETM/CNPq, **Série Tecnologia Mineral**, n. 65, p. 29, 1993.

D'ARCY, D. M.; CORRIGAN, O. I.; HEALY, A. M. Evaluation of hydrodynamics in the basket dissolution apparatus using computational fluid dynamics - Dissolution rate implications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, p. 259-267, 2006.

DEZANI, A. B.; PEREIRA, T. M.; CAFFARO, A. M.; REIS, J. M.; SERRA, C. H. R. Equilibrium solubility *versus* intrinsic dissolution: characterization of lamivudine, stavudine and zidovudine for BCS classification. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 4, p. 853-863, 2013.

DI, L.; KERNS, E.H. Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimization. Copyright, 2008.

DIAS, F. R. F.; SILVA, W. A.; CAMPOS, V. R.; CUNHA, C.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, N. A. Resgatando um método eficiente para determinação do ponto de ebulição de substâncias orgânicas: percolador *versus* siwoloboff. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 915-918, 2014.

DRESSMAN, J. B.; FLEISHER, D. Mixing-tank model for predicting dissolution rate control of oral absorption. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, n. 2, p. 109-116, 1986.

DRESSMAN, J.B.; AMIDON, G.L.; REPPAS, C.; SHAH, V.P. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 1, p. 11-22, 1998.

DRUG BANK. Disponível em: < <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00177>>. Acesso em: 12 de janeiro de 2016.

DUNE, A.; DEVANE, J.; O'HARA, T. The relationship between *in vitro* drug dissolution and *in vivo* absorption. **Statistician**, v.48, p.125-133, 1999.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on the Investigation of Bioequivalence: EMA, 2010.

FLESCHE, G.; MÜLLER, P.H.; LLOYD, P. Absolute bioavailability and pharmacokinetics of valsartan, an angiotensin II receptor antagonist, in man. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 52, p. 115-120, 1997.

FLORENCE, A.L.; ATWOOD, D. Princípios Físico-Químicos em Farmácia. 2ªed. Pharmabooks, São Paulo, 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Guidance for Industry. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. Rockville: FDA. 2000.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Guidance for Industry. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. Rockville: FDA. 2015.

GLOMME, A.; MARZ, J.; DRESSMAN, J. B. Comparison of a miniaturized shake-flask solubility method with automated potentiometric acid/base titrations and calculated solubilities. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, n. 1, p. 1-16, 2005.

GONÇALVES, J.E.; STORPIRTIS, S. O Sistema de Classificação Biofarmacêutica: conceitos, determinação da solubilidade e permeabilidade e aplicações na Área Farmacêutica. In: Manual de Bioequivalência, 2011.

GOVINDASWAMY, R.; UMASANKAR, K. Formulation and evaluation of immediate release valsartan capsules by using croscarmellose sodium. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Nano Sciences**, v. 3, n. 2, p. 147-152, 2014.

GRASS, G. M. Simulation models to predict oral drug absorption from *in vitro* data. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, p. 199-219, 1997.

GURRAPU, A.; JUKANTI, R.; BOBBALA, S.R.; KANUGANTI, S.; JEEVANA, J.B. Improved oral delivery of valsartan from maltodextrin based proniosome powders, **Advanced Powder Technology**, n. 23, p. 583-590, 2012.

HEDAYA, M.A; HELMY, S.A. Pharmacokinetic Interactions of Valsartan and Hydrochlorothiazide: An Open-Label, Randomized, 4-Period Crossover Study in Healthy Egyptian Male Volunteers. **Clinical Therapeutics**, v. 35, n. 6, p. 846-861, 2013.

HEIKKILA, T.; KARJALAINENA, M.; OJALA, K.; PARTOLA, K.; LAMMERT, F.; AUGUSTIJNS, P.; URTTI, A.; YLIPERTTULA, M.; PELTONEN, L.; HIRVONEN, J. Equilibrium drug solubility measurements in 96-well plates reveal similar drug solubilities in phosphate buffer pH 6.8 and human intestinal fluid. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 405, p. 132-6, 2011.

HILAL-DANDAN, R. Renina e angiotensina. In: GOODMAN & GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica. Porto Alegre: Mac Graw Hill/Artmed, 2012. p 721-743.

HORIE, K.; TANG, F.; BORCHARDT, R.T. Isolation and characterization of Caco-2 subclones expressing high levels of multidrug resistance protein efflux transporter. **Pharmaceutical Research**, v.20, p. 161-167, 2003.

INTERNATIONAL PHARMACEUTICAL FEDERATION (FIP). Disponível em: <<https://www.fip.org>>. Acesso em: 22 de outubro de 2016.

ISLAS, M.S.; FRANCA, C.A.; ETCHEVERRY, S.B.; FERRER, E.G.; WILLIAMS, P.A.M. Computational study and spectroscopic investigations of antihypertensive drugs. **Vibrational Spectroscopy**, v. 62, p. 143-151, 2012.

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. 2, p. 17-23, 2011.

JÚLIO, T. A.; ZÂMARA, I. F.; GARCIA, J.S.; TREVISAN, M. G. Compatibility and stability of valsartan in a solid pharmaceutical formulation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 4, p. 645-651, 2013.

KALINKOVA, G.N. Studies of beneficial interactions between active medicaments and excipients in pharmaceutical formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 187, p. 1-15, 1999.

KALLIOKOSKI, A; NIEMI, M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, p. 693–705, 2009.

KANSY, M.; SENNER, F.; GUBERNATOR, K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 41, n. 7, p.1007-1010, 1998.

KARASOV, W.H.; DARKEN, B.W.; BOTTUM, M.C. Dietary regulation of intestinal ascorbate uptake in guinea pigs. **American Journal of Physiology**, v. 260, p. G108-G118, 1991.

KASSIM, N. A.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO, M.; LENNERNÄS, H.; HUSSAIN, A. S.; JUNGINGER, H. E.; STAVCHANSKY, S. A.; MIDHA, K. K.; SHAH, V. P.; AMIDON, G. L. Molecular Properties of WHO Essential Drugs and Provisional Biopharmaceutical Classification. **Molecular Pharmaceutics**, v. 1, n. 1, p. 85-96, 2003.

KAZA, R.; PRASANNA RAJU, Y.; NAGARAJU, R. Dissolution enhancement of valsartan using natural polymers by solid dispersion technique. **Scholars Research Library**, v. 5, n. 2, p. 126-134, 2013.

KHAN, K . A.; RHODES, C. T. Effect of compaction pressure on the dissolution efficiency of some direct compression systems. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, n. 41, p. 594-607, 1972.

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

KUMAR, A. A.; KUMARI, S. M.; SUREKHA, K.; PRASAD, ChSS.; SURESH, S. Formulation and evaluation of sustained release valsartan matrix tablets by using natural polymers. **International journal of pharmaceutical, chemical and biological sciences**, v. 2, n.2, p. 146-150, 2012a.

KUMAR, N.; SANGEETHA, D.; REDDY, P. S.; REDDY, A. M. Development and validation of a dissolution test for delayed release capsule formulation of duloxetine hydrochloride. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 8, n. 3, p. 236-246, 2012b.

LABOISSE, C.L.; JARRY, A.; BOU-HANNA, C.; MELIN, D.; VALLETTE, G. Intestinal cell culture models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 32-38, 1994.

LENZI, E.; FAVERO, L.O.B.; TANAKA, A.S. Química Geral Experimental. Rio de Janeiro: Freitas Bastos Editora, 2004.

LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J. B. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 265-278, 2004.

LIU, H.; WANG, P.; ZHANG, X.; SHEN, F.; GOGOS, C. G. Effects of extrusion process parameters on the dissolution behavior of indomethacin in Eudragit® E PO solid dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, n. 383, p. 161-169, 2010.

LOZOYA-AGULLO, I.; ZUR, M.; WOLK, O.; BEIG,A.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, I.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, M.; MERINO-SANJUÁN, M.; BERMEJO, M.; DAHAN, A. In-situ intestinal rat perfusions for human Fabs prediction and BCS permeability class determination: Investigation of the single-pass vs. the Doluisio experimental approaches. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 480, p. 1-7, 2015a.

LOZOYA-AGULLO, I.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, I.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, M.; MERINO-SANJUÁN, M.; BERMEJO, M. *In Situ* Perfusion Model in Rat Colon for Drug Absorption Studies: Comparison with Small Intestine and Caco-2 Cell Model. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, p. 3136-3145, 2015b.

MANADAS, R.; PINA, M.E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, p. 375-400, 2002.

MARQUES, M. R. C. Dissolução de Medicamentos. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. Ciências Farmacêuticas Biofarmacotécnica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 96.

MARTINEZ, M. N.; AMIDON, G. L. A Mechanistic Approach to Understanding the Factors Affecting Drug Absorption: A Review of Fundamentals. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 42, p. 620-643, 2002.

MONTEIRO, P. F. Solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frascos: padronização e definição dos fármacos controle. Ouro Preto, 2014. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Ouro Preto.

NAVEEN, C.; SHASTRI, N.; TADIKONDA, R. R. Use of the liquisolid compact technique for improvement of the dissolution rate of valsartan. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 2, n.5, p. 502-508, 2012.

NALLURI, B. N.; RAMYA KRISHNA, M.; RAO, T. P.; CROOKS, P. A. Effect of Recrystallization on the Pharmaceutical Properties of Valsartan for Improved Therapeutic Efficacy. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 10, p. 126-132, 2012.

NEKKANTI, V.; VENKATESAN, N.; WANG, Z.; BETAGERI, G.V. Improved oral bioavailability of valsartan using proliposomes: design, characterization and in vivo pharmacokinetics. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, p. 1-12, 2015.

OLIVEIRA, M.E.; MANZO, R.H. O Sistema de Classificação Biofarmacêutica e as Bioisencões. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. Ciências Farmacêuticas Biofarmacotécnica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 192.

OPEN CHEMISTRY DATABASE (PubChem). Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/valsartan#section=Names-and-Identifiers>>. Acesso em: 21 de março de 2016.

PÉREZ, M.; CÁRDENAS, W.; RAMÍREZ, G.; PÉREZ, M.; RESTREPO, P. A comparative, cross-over, double blind, randomized study for bioequivalence assessment between two formulations of valsartan capsules vs. tablets. **Colombia Médica**, v. 37, n. 2, p. 114-120, 2006.

PIETZONKA, P.; WALTER, E.; DUDA-JOHNER, S.; LANGGUTH, P.; MERKLE, H.P. Compromised integrity of excised porcine intestinal epithelium obtained from the abattoir effects the outcome of in vitro particle uptake studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, p. 39-47, 2002.

POIRIER, A.; CASCAIS, A.; FUNK, C.; LAVÉ, T. Prediction of pharmacokinetic profile of valsartan in human based on in vitro uptake transport data. **Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**, v. 36, p. 585-611, 2009.

POLLI, J. E.; ABRAHAMSSON, B. S. I.; YU, L. X.; AMIDON, G. L.; BALDONI, J. M.; COOK, J. A.; FACKLER, P.; HARTAUER, K.; JOHNSTON, G.; KRILL, S. L.; LIPPER, R. A.; MALICK, W. A.; SHAH, V. P.; SUN, D.; WINKLE, H. N.; WU, Y.; ZHANG, H. Summary Workshop Report: Bioequivalence, Biopharmaceutics Classification System, and Beyond. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 10, n. 2, p. 373-379, 2008.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. Tecnologia Farmacêutica. 5ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 5, 1995.

RAJESWARI, K.R.; ABBULU, K.; SUDHAKAR, M.; KARKI, R.; RAJKUMAR, B. Development and characterization of valsartan loaded hydrogel beads. **Scholars Research Library**, n. 4, v. 4, p. 1044-1053, 2012.

REFSGAARD, H.H.F.; JENSEN, B.F.; BROCKHOFF, P.B.; PADKJAER, S.B.; GULDBRANDT, M.; CHRISTENSEN, M.S. In Silico Prediction of Membrane Permeability from Calculated Molecular Parameters. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 805-811, 2005.

RELAÇÃO NACIONAL DE MEDICAMENTOS ESSENCIAIS (RENAME). Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004

ROSA, M. F.; VILHENA, R. O. Dissolução Intrínseca: Conceito e Aplicações na Indústria Farmacêutica. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 9, n. 1, p. 49-61, 2012.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, I. C. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 5^aed. Pharmaceutical Press e Washington/ DC: American Pharmacists Association, London, 2006.

SAYDAM, M.; TAKKA, S. Bioavailability file: valsartan. **Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 32, p. 185-196, 2007.

SEDIQ, A.; KUBBINGA, M.; LANGGUTH, P.; DRESSMAN, J. The Impact of the EMA Change in Definition of “Dose” on the BCS Dose–Solubility Ratio: A Review of the Biowaiver Monographs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, p. 65-70, 2014.

SIDDIQUI, N.; HUSAIN, A.; CHAUDHRY, L.; ALAM, M. S.; MITRA, M.; BHASIN, P. S. Pharmacological and Pharmaceutical Profile of Valsartan: A Review. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, n. 4, p. 12-19, 2011.

SIVLA, R. L.; VOLPATO, N. M. Meios para dissolução de comprimidos de nimesulida: ação dos tensoativos, **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n.2, p. 163-172, 2002.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; CROUCH. Fundamentos de Química Analítica, 8^a ed. Thomson, São Paulo, 2005.

SKOLNIK, S.; LIN, X.; WANG, J.; CHEN, X.; HE, T.; ZHANG, B. Towards Prediction of In Vivo Intestinal Absorption Using a 96-Well Caco-2 Assay. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 7, p. 3246-3265, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (SBC). Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial VI. **Revista Hipertensão**, v. 13, n.1, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (SBC). 7^a Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. **Revista Hipertensão**, v. 107, n.3, 2016.

SOUZA, J.; STORPIRTIS, S. Avaliação das características físico-químicas, farmacocinéticas e da biodisponibilidade relativa de comprimidos contendo associação de lamivudina 150 mg e zidovudina 300 mg. São Paulo, 2005. Dissertação de mestrado – Universidade de São Paulo.

SOUZA, J.; FREITAS, Z. M. F.; STORPIRTIS, S. Modelos *in vitro* para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 515-527, 2007.

SOUZA, J. B. Avaliação biofarmacêutica da losartana visando subsidiar a discussão de bioequivalência. Ouro Preto, 2015. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Ouro Preto.

STORPIRTIS, S.; OLIVEIRA, P.G.; RODRIGUES, D.; MARANHO, D. Considerações biofarmacotécnicas relevantes na fabricação de medicamentos genéricos: fatores que afetam a dissolução e a absorção de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.35, n.1, p.1-16, 1999.

SUGANO, A.; TAKATA, A.; MACHIDA, A.; SAITOH, A.; TERADA, K. Prediction of passive intestinal absorption using bio-mimetic artificial membrane permeation assay and the paracellular pathway model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 241, p. 241-251, 2002.

TAKÁCS-NOVÁK, K.; SZŐKE, V.; VÖLGYI, G.; HORVÁTH, P.; AMBRUS, R.; SZABÓ-RÉVÉSZ, P. Biorelevant solubility of poorly soluble drugs: Rivaroxaban, furosemide, papaverine and niflumic acid. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 83, n. 0, p. 279-285, 2013.

TAKAGI, T.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO, M.; YAMASHITA, S.; YU, L. X.; AMIDON, G. L. A Provisional Biopharmaceutical Classification of the Top 200 Oral Drug Products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan. **Molecular Pharmaceutics**, v. 3, n. 6, p. 631- 643, 2006.

TSENG, Y. C.; PATEL, M.; ZHAO, Y. Determination of Intrinsic Dissolution Rate Using Miniaturized Rotating and Stationary Disk Systems. **Dissolution Technologies**, 2014.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, 30th ed, United States Pharmacopeia Convention: Rockville, 2007.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, 35th ed, United States Pharmacopeia Convention: Rockville, 2012.

UNITED STATES PHARMACOPEIA), 38th ed, United States Pharmacopeia Convention: Rockville, 2015.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, 39th ed, United States Pharmacopeia Convention: Rockville, 2016.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, 40th ed, United States Pharmacopeia Convention: Rockville, 2017a.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products. Disponível em <<https://www.pharma-excipients.ch/excipientsource/fda-inactive-ingredient-list/>>. Acesso em: 10 de julho de 2017b.

VALDERRAMA, P. Avaliação de Figuras de Mérito em Calibração Multivariada na Determinação de Parâmetros de Controle de Qualidade em Indústria Alcooleira por Espectroscopia no Infravermelho Próximo. Campinas, 2005. Dissertação de mestrado – Universidade de Campinas.

VARMA, M.V.; GARDNER, I.; STEYN, S.J.; NKANSAH, P.; ROTTER, C.J.; WHITNEY-PICKETT, C.; ZHANG, H.; DI, L.; CRAM, M.; FENNER, K.S.; EL-ATTAN, A.F. pH-Dependent Solubility and Permeability Criteria for Provisional Biopharmaceutics Classification (BCS and BDDCS) in Early Drug Discovery. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, p. 1199-1212, 2012.

VINZUDA, D.U.; SAILOR, G.U.; SHETH, N. R. RP-HPLC Method for Determination of Valsartan in Tablet Dosage Form. **International Journal of ChemTech Research**, v.2, n.3, p. 1461-1467, 2010.

XU, W.; LIU, Y.; SHI, L.; CUI, J.; CAO, Q. *In vitro* dissolution and physicochemical characterizations of novel PVP-based solid dispersions containing valsartan prepared by a freeze-drying method. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.27, n.6, p.1799-1804, 2014.

ZAKERI-MILANI, P.; BARZEGAR-JALALI, M.; AZIMI, M.; VALIZADEH, H. Biopharmaceutical classification of drugs using intrinsic dissolution rate (IDR) and rat intestinal permeability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73, p. 102-106, 2009.

ZHANG, J.; LIU, D.; HUANG, Y.; GAO, Y.; QIAN, S. Biopharmaceutics classification and intestinal absorption study of apigenin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, p. 311-317, 2012.

ZHU, C.; JIANG, L.; CHEN, T.; HWANG, K. A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.37, p. 399-407, 2002.

ZHOU, Y.; CHU, W.; LEI, M.; LI, J.; DU, W.; ZHAO, C. Application of a continuous intrinsic dissolution–permeation system for relative bioavailability estimation of polymorphic drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 473, p. 250–258, 2014.

YAMASHIRO, W.; MAEDA, K.; HIROUCHI, M.; ADACHI, Y.; HU, Z.; SUGIYAMA, Y. Involvement of transporters in the hepatic uptake and biliary excretion of valsartan, a selective antagonist of the angiotensin II AT1-receptor, in humans. **Drug metabolism and disposition**, v. 34, n. 7, p. 1247-1254, 2006.

YU, L. X.; CARLIN, A. S.; AMIDON, G. L.; HUSSAIN, A. S. Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 270, p. 221-227, 2004.

YU, L. X.; AMIDON, G.L.; POLLI, J.E.; ZHAO, H.; MEHTA, M.U.; CONNER, D.P.; SHAH, V.P.; LESKO, L.J.; CHEN, M.; LEE, V.H.L.; HUSSAIN, A.S. Biopharmaceutics

Classification System: The Scientific Basis for Biowaiver Extensions¹. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 7, p. 921-925, 2002.

WATERBEEMD, H.V; GIFFORD, E. ADMET *in silico* modelling: towards prediction paradise? **Nature Reviews Drug Discovery**, v.2, n.3, p.192-204, 2003.

WELLINGTON, k.; FAULDS, D. M. Valsartan/Hydrochlorothiazide. A Review of its Pharmacology, Therapeutic Efficacy and Place in the Management of Hypertension. **Adis Drug Evaluation**, v. 62, n. 13, p. 1983-2005, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Fortieth Report report of the WHO Expert Committee on specifications for pharmaceutical preparations. WHO Technical Report Series, No. 937. Geneva: WHO, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Forty-ninth report of the WHO Expert Committee on specifications for pharmaceutical preparations. WHO Technical Report Series, No. 992. Geneva: WHO, 2015.

WU, C.; HU, Y.; LI, Q.; HE, L.; CHEN, J.; CHENG, Z.; LI, Y.; HU, G. Synthesis, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics Studies of Valsartan Peptide Derivatives. **Arch. Pharm. Chem. Life Sci**, v. 345, p. 393-400, 2012.