



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO E
ANALÍTICO DE COMPRIMIDOS
REVESTIDOS DE MONTELUCASTE:
EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA E
BIOEQUIVALÊNCIA**

Carina Pimentel Itapema Alves
Orientadora: Eliana Martins Lima

Goiânia-2011



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO E ANALÍTICO DE COMPRIMIDOS REVESTIDOS DE MONTELUCASTE: EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA E BIOEQUIVALÊNCIA

Carina Pimentel Itapema Alves

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade Federal de
Goiás para obtenção do título de
Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora:
Profª Drª Eliana Martins Lima

Goiânia-2011

CARINA PIMENTEL ITAPEMA ALVES

**DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO E ANALÍTICO
DE COMPRIMIDOS REVESTIDOS DE MONTELUCASTE:
EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA E BIOEQUIVALÊNCIA**

Banca examinadora da tese de doutorado:

Prof^ª. Dra. Eliana Martins Lima - UFG
Presidente

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho - UFC
Membro

Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti - UFMG
Membro

Prof^ª. Dra. Clévia Ferreira Duarte Garrote - UFG
Membro

Prof. Dr. Ricardo Neves Marreto - UFG
Membro

Dr. Leonardo de Souza Teixeira - ICF
Suplente

Prof. Dr. Luís Carlos da Cunha - UFG
Suplente

Goiânia, 18 de Março de 2011

A **Deus**, por estar sempre iluminando meus caminhos!

A meus pais, **José Luiz e Tereza**, pelo amor incondicional!

Agradecimentos

A meus pais José Luiz e Tereza pelo apoio, incentivo e carinho em todos os momentos da minha vida.

A meus irmãos Fabiano, Viviane e Letícia e cunhados, Kiara, Bruno e Daniel pela amizade e carinho;

Aos sobrinhos Pedro Paulo, Luís Otávio e Mariana pelos momentos de descontração.

À querida Dudu pelo incentivo e alegria contagiante.

À Prof^a. Dr^a. Eliana Martins Lima, pela amizade, incentivo e confiança em meu trabalho.

A meus amigos e colegas do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica pelo companheirismo.

À amiga Fernanda Bellato pela atenção e carinho.

A meus amigos e colegas de trabalho do ICF em especial à equipe de Equivalência Farmacêutica pelo incentivo e apoio ao longo da elaboração deste trabalho.

À equipe de bioequivalência do ICF, em especial à Iram Moreira, Sandro Gomes, Robson Melo, Karini e Fernanda pela contribuição dada a este trabalho.

À Indústria Farmacêutica Laboratório Teuto Brasileiro S/A, em especial à Fernanda Pedatella e Adryana Duarte que muito contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal de Goiás, pela oportunidade de minha formação profissional e suporte às atividades da pós-graduação.

Ao Instituto de Ciências Farmacêuticas pelo apoio, incentivo e compreensão em especial ao Leonardo e Fabiana.

À banca examinadora pela atenção dedicada a este trabalho.

Enfim, a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	I
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE QUADROS	III
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	IV
RESUMO.....	VI
ABSTRACT	VII
1 INTRODUÇÃO.....	8
2 REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	10
2.2 ASMA.....	11
2.3 LEUCOTRIENOS.....	12
2.4 MONTELUCASTE.....	13
2.4.1 Mecanismo de ação.....	14
2.4.2 Farmacocinética do montelukaste.....	14
2.4.3 Dosagem e administração.....	15
2.4.4 Estabilidade.....	15
2.5 TÉCNICAS EMPREGADAS NA CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA TESTE.....	16
2.5.1 <i>Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial</i>	16
2.5.2 <i>Análise Térmica por TG</i>	17
2.5.3 <i>Análise Quantitativa por Cromatografia Líquida de alta Eficiência</i>	17
2.5.4 <i>Análise Quantitativa por Cromatografia Líquida de alta Eficiência acoplada a espectrômetro de massas</i>	20
2.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	22
2.6.1 <i>Especificidade e Seletividade</i>	22
2.6.2 <i>Linearidade (Curva de Calibração)</i>	22
2.6.3 <i>Precisão</i>	23
2.6.4 <i>Exatidão</i>	24
2.6.5 <i>Limite de Detecção</i>	24
2.6.6 <i>Limite de Quantificação</i>	25
2.6.7 <i>Robustez</i>	25
2.6.8 <i>Estabilidade da amostra</i>	25
2.7 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA BIOANALÍTICA.....	26
2.7.1 <i>Especificidade</i>	26
2.7.2 <i>Linearidade (Curva de Calibração)</i>	27
2.7.3 <i>Precisão</i>	27
2.7.4 <i>Exatidão</i>	28
2.7.5 <i>Limite de Detecção (LD)</i>	28
2.7.6 <i>Limite Inferior de Quantificação (LIQ)</i>	29
2.7.7 <i>Limite Superior de Quantificação (LSQ)</i>	29
2.7.8 <i>Recuperação</i>	29
2.7.9 <i>Estabilidade</i>	29
2.8 FARMACOTÉCNICA DE COMPRIMIDOS.....	32
2.8.1 <i>Produção de comprimidos</i>	32
2.8.2 <i>Adjuvantes Farmacêuticos</i>	34
2.8.3 <i>Comprimidos Revestidos</i>	36
2.9 ESTABILIDADE DE COMPRIMIDOS.....	37
2.9.1 <i>Estudo de Estabilidade Acelerado</i>	38

2.9.2	<i>Estudo de Estabilidade de Acompanhamento ou Intermediária</i>	38
2.9.3	<i>Estudo de Estabilidade de Longa Duração</i>	38
2.10	EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA	39
2.11	BIOEQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA	41
3	OBJETIVOS	43
3.1	OBJETIVOS GERAIS	43
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4	MATERIAIS	44
5	MÉTODOS	44
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
7	CONCLUSÕES	45
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cromatógrafo Líquido.....	17
Figura 2 - Componentes do Cromatógrafo Líquido.....	18
Figura 3 - Espectrômetro de massas	20
Figura 4 - Princípio da análise por espectrometria de massas.	21
Figura 5 - Equipamentos utilizados na compressão direta: (a) misturador em "V", (b) e (c) compressora.	34

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos.	23
Quadro 2 – Parâmetros de estabilidade	38
Quadro 3 – Ensaios realizados na Equivalência Farmacêutica de acordo com a forma farmacêutica	40

LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

ACN – Acetonitrila
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC – Área sobre a curva
BPL - Boas práticas de laboratório
CEP - Comitê de Ética em Pesquisa
CG – Cromatografia gasosa
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
 $C_{máx}$ - Concentração plasmática máxima
CMC – Carboximetilcelulose
CMD - Concentração média determinada
CONEP - Comitê Nacional de Ética em Pesquisa
CQ – Controle de qualidade
CQB - Controle de qualidade de baixa concentração
CQM - Controle de qualidade de média concentração
CQA - Controle de qualidade de alta concentração
CV% - Coeficiente de variação
CysLT – Cisteinil leucotrienos
DPOC - Doença pulmonar obstrutiva crônica
DPR - Desvio padrão relativo
DP - Desvio padrão
DSC - Differential scanning calorimetry
ECD - Estabilidade de curta duração
ECCD -Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento;
ELD - Estabilidade de longa duração;
EQF – Equivalência farmacêutica
EPP - Estabilidade pós-processamento;
ESP - Estabilidade em solução padrão;
FARMATEC - Laboratório de tecnologia farmacêutica – UFG
FCM – Faculdade de Ciências Médicas
FDA - Food and Drug Administration
FM – Fase móvel
HPLC – High performance Liquid Chromatography

HPLC- MS/MS – *High performance Liquid Chromatography-mass spectrometry*
(Cromatografia líquida de alta eficiência-espectrometria de massas)

HRB - Hiper-reatividade brônquica

IC – Intervalo de confiança

ICF – Instituto de Ciências Farmacêuticas

IS – *Internal Standard* (Padrão interno)

LD – Limite de detecção

LIQ – Limite inferior de quantificação

LQ – Limite de quantificação;

LSQ – Limite superior de quantificação;

MRM - Monitoramento Múltiplo de Reação

MS – *mass spectrometry* (Espectrometria de massas)

PEG – Polietilenoglicol

pH – Potencial hidrogeniônico

PI – Padrão interno

PVP – Polivinilpirrolidona

PVDF - Polyvinylidene Fluoride

RBC – Rede Brasileira de Calibração

RE – Resolução

Reblas - Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde

SQM – Soma dos quadrados mínimos

TG – Termogravimetria

Tp - Tampão

T_{máx} – Tempo para atingir concentração plasmática máxima

UFG – Universidade Federal de Goiás

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

UV – Ultravioleta

RESUMO

Alves, C.P.I. **Desenvolvimento farmacotécnico e analítico de comprimidos revestidos de montelucaste: equivalência farmacêutica e bioequivalência.** Goiânia, 2010. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina – Universidade Federal de Goiás. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

O Montelucaste é um potente inibidor seletivo reversível do receptor cisteinil-leucotrieno-1, evitando que os mediadores provoquem a resposta asmática. Sua comercialização no Brasil, na forma de produto acabado, é protegida por patente até 2010. Uma vez que o fármaco Montelucaste é recente no mercado farmacêutico e não há descrição de metodologia em compêndios oficiais capaz de assegurar a qualidade das novas formulações, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento farmacotécnico de comprimidos revestidos de montelucaste, desenvolvimento e validação de métodos analítico e bioanalítico visando obtenção de equivalência farmacêutica e bioequivalência com o medicamento referência de mercado. Com esta finalidade, foram caracterizados alguns parâmetros físico-químicos, desenvolvidos e validados métodos de doseamento e dissolução por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (HPLC-UV) para quantificação de montelucaste presente em comprimidos revestidos de 10,0 mg. A determinação de montelucaste sódico em plasma humano foi realizada utilizando-se loratadina como padrão interno e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de massas (HPLC – MS/MS). O fármaco foi extraído do plasma humano utilizando extração por precipitação. Os resultados encontrados dos parâmetros de especificidade, linearidade, exatidão, precisão, limites de quantificação e detecção e estabilidade nas validações dos métodos confirmam que os mesmos foram adequados para a finalidade proposta. Os métodos analíticos desenvolvidos e validados foram aplicados no desenvolvimento farmacotécnico dos comprimidos para determinação de uma formulação próxima ao medicamento referência de mercado Singulair®. Esta formulação foi submetida a ensaios de estabilidade para assegurar sua qualidade e permitir a realização de equivalência e bioequivalência farmacêutica com o intuito de registro como medicamento genérico.

Palavras Chaves: Montelucaste; HPLC-UV; HPLC-MS/MS; desenvolvimento analítico; desenvolvimento farmacotécnico, validação, equivalência farmacêutica, bioequivalência.

ABSTRACT

Alves, C.P.I. **Pharmaceutical and analytical development film coated tablets of montelukast: pharmaceutical equivalence and bioequivalence.** Goiânia, 2010. Doctoral Thesis. Faculdade de Medicina – Universidade Federal de Goiás. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Montelukast is a potent reversible selective inhibitor of cysteinil-leukotrien-1 receptor, avoiding that these mediators promote the asthmatic response. Its commercialization in Brazil, as a terminated product, is protected by patent up to 2010. Once the active ingredient Montelukast is recent in the pharmaceutical market and there is no methodology description in official compendiums capable to assure the quality of new formulations, the objective of this paper was the pharmaceuticals of montelukast film coated tablets, the development and the validation of analytical and bioanalytical methodologies foreseeing the pharmaceutical equivalence and bioequivalence with the reference medication of the market. With this purpose, some physical-chemical parameters were characterized, assay and dissolution methodologies were developed and validated per high performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV) for the quantification of montelukast present in 10.0mg film coated tablets. The quantification of montelukast sodium in human plasma was performed using Loratadine as internal standard and high performance liquid chromatography attached to mass detector (HPLC - MS / MS). The active ingredient was extracted from the human plasma using precipitation extraction. The results found for the parameters of specificity, linearity, accuracy, precision, quantification and detection limits and stability in the methodologies validation confirm they were adequate for the objective proposed. The analytical methodologies developed and validated were applied in the pharmaceuticals of the tablets for the determination of the formulation similar to the market reference medication Singulair®. This formulation was submitted to stability assays to assure its quality and to allow the performance of pharmaceutical equivalence and bioequivalence with the purpose of registering as a generic medication.

Key words: Montelukast; HPLC-UV; HPLC-MS/MS; analytical development; pharmaceuticals; validation; pharmaceutical equivalence; bioequivalence.

1 INTRODUÇÃO

O ano de 1999 apresentou-se como um marco para a indústria farmacêutica nacional com a instituição do medicamento genérico no país. A implementação da Lei de Medicamentos Genéricos nº 9.787 de 10 de fevereiro determinou o registro de medicamentos com base na equivalência farmacêutica, bioequivalência e boas práticas de fabricação e controle (Brasil, 1999).

Para chegar até o registro como medicamento genérico, faz-se necessário um longo processo de desenvolvimento farmacotécnico, analítico e bioanalítico para garantir a qualidade de medicamentos que possam ser intercambiáveis com o medicamento referência no mercado. Este processo envolve o desenvolvimento e utilização de um método analítico adequado para o estudo do fármaco e o emprego de uma série de métodos de caracterização físico-química (Swartz e Krull, 1997; Mondoveanue e David, 2002).

Uma vez que a produção de medicamentos genéricos se faz a partir da expiração ou renúncia da proteção patentária do medicamento referência, este trabalho foi direcionado para o fármaco Montelukaste, cujo medicamento referência Singulair® tem sua patente expirada em outubro do ano de 2010¹. Este fármaco apresenta importância para a saúde da população no tratamento da asma, uma enfermidade cada vez mais relevante no cenário nacional.

As doenças alérgicas têm aumentado sua prevalência nas últimas décadas em todo o mundo, especialmente em países ocidentais. A asma é uma das doenças crônicas mais comuns na infância, sendo que sua prevalência e gravidade aumentaram em vários países nas últimas décadas. As causas para as oscilações da prevalência têm sido atribuídas à poluição, mudanças dietéticas e maior exposição alergênica (Raffa *et al.*, 2006; Virchow e Bachert, 2006).

A asma é a doença crônica mais comum das vias aéreas e é caracterizada por obstrução ao fluxo aéreo, reversível espontaneamente ou com tratamento. Os principais predisponentes de asma e de rinite alérgica são viroses

¹ Número do processo de patente: PI1100383-9. Prioridade dos Estados Unidos, número 596887 em 12/10/1990. Vigência da proteção patentária até 12/10/2010. Disponível em: <http://pesquisa.inpi.gov.br/MarcaPatente/jsp/servimg/validamagic.jsp?BasePesquisa=Patentes>

respiratórias, hipersensibilidade aos ácaros da poeira doméstica, mofo e pêlos de animais, fatores irritantes (fumaça de cigarro, mudanças climáticas e poluição) e aspectos emocionais, como o estresse (Raffa *et al.*, 2006).

Os fármacos usados para o tratamento das doenças respiratórias atuam por vários mecanismos, como relaxamento de músculos lisos bronquiais ou modulação da resposta inflamatória. O objetivo do tratamento é aliviar os sintomas e, se possível, prevenir a recorrência de crises asmáticas (Howland e Mycek, 2006).

Os moduladores de leucotrienos, como o montelucaste sódico, apresentam-se como alternativas úteis no tratamento de asma alérgica moderada a grave, em pacientes mal controlados com o tratamento convencional ou que apresentam efeitos adversos devido a doses elevadas ou prolongadas de corticosteróides. Os moduladores de leucotrienos atuam na redução da síntese desses mediadores inflamatórios ou antagonizando os receptores dos mesmos, evitando que estes provoquem a resposta asmática (Brody *et al.*, 2006).

Por se tratar de um fármaco recente no mercado farmacêutico, o montelucaste sódico necessita de maiores estudos quanto ao desenvolvimento de formulações e de metodologia analítica de forma a assegurar a qualidade dos medicamentos desenvolvidos a partir deste ativo. Uma vez que não há descrição de metodologia analítica descrita em farmacopéia, a realização deste trabalho é importante, pois fornece ferramentas necessárias para garantir a qualidade de todo o processo produtivo, controle de qualidade do produto final e estudos de equivalência farmacêutica e bioequivalência, com o intuito de registro como medicamento genérico no Brasil.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Para a obtenção da equivalência terapêutica (equivalência farmacêutica, bioequivalência e boas práticas de fabricação) com o medicamento referência e conseqüente registro como medicamento genérico é necessário um amplo conhecimento sobre a substância química que se estuda (Mitra e Brukh, 2003).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) ressalta a importância da qualidade analítica dos resultados como um dos instrumentos fundamentais para a proteção e promoção da saúde da população (Brasil, 2005a). Para que isto ocorra uma importante fase de desenvolvimento analítico deve ser contemplada.

Para o desenvolvimento de um método é necessário considerar as propriedades do fármaco de interesse realizando levantamento bibliográfico sobre o assunto (Mitra *et al.*, 2003). Nessa etapa, são pesquisadas informações em compêndios oficiais (Farmacopéias) nacionais e internacionais e em periódicos técnicos e científicos sobre a existência de algum método analítico do fármaco de interesse descrito em literatura, do conhecimento das substâncias relacionadas, da estabilidade, das propriedades físico-químicas, dos possíveis produtos de degradação etc. Após a reunião dessas informações, as etapas seguintes são a seleção, desenvolvimento e otimização do método quando é determinada a aplicação, matriz, solventes, concentração do fármaco, a instrumentação a ser utilizada, as condições analíticas, entre outros. Também deve ser considerada a facilidade do uso do método, bem como o custo e a rapidez da análise que o mesmo proporciona (Swartz e Krull, 1997; Mondoveanue e David, 2002).

O método selecionado é submetido ao processo de validação, de acordo com os parâmetros de especificidade e seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação e robustez, o que garantirá que o método seja realmente apropriado para o uso pretendido (Brasil, 2003; Brasil-INMETRO, 2010). Um método bem desenvolvido deve ser fácil de ser validado (Breux *et al.*, 2003).

O desenvolvimento farmacotécnico também exige um amplo conhecimento do fármaco estudado, bem como de sua interação com excipientes utilizados na formulação e embalagem utilizada necessitando de uma série de caracterizações físico-químicas para determinar as melhores técnicas de fabricação, armazenamento e segurança da formulação desenvolvida (Ansel *et al.*, 2007).

A etapa de desenvolvimento farmacotécnico é de extrema importância, uma vez que a eficácia clínica de um fármaco não é atribuída apenas a sua atividade farmacológica intrínseca, mas também à fatores ligados as propriedades físico-químicas, bem como aos relacionados aos excipientes empregados na formulação, além do processo de manufatura, que têm sido considerados responsáveis por alterações nos efeitos dos medicamentos, uma vez que podem afetar sua biodisponibilidade (Gibaldi, 1991; Shargel *et al.*, 2005; Bonamici, 2009).

2.2 ASMA

A asma é uma grave alteração inflamatória crônica das vias aéreas, em que vários elementos celulares estão envolvidos. Uma característica da asma é a obstrução das vias aéreas que é reversível com o tempo ou em resposta ao tratamento. Mesmo quando os pacientes têm respiração normal (asmáticos moderados) seus pulmões são hiper-reativos para uma variedade de estímulos que ocorrem normalmente (ex: ar frio, exercícios, cigarros). A hiper-reatividade brônquica (HRB) está relacionada com a inflamação dos brônquios, incluindo danos ao epitélio e infiltração de eosinófilos. Outras características da asma incluem edema da mucosa das vias aéreas, hipersecreção de muco e remodelamento das vias aéreas. Sintomaticamente, os pacientes ficam com tensão torácica, ofegantes, respiração curta ou tosse (Brody *et al.*, 2006; Howland e Mycek, 2006).

Em comparação com a asma, a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é definida pela Global Initiative on Obstructive Lung Disease como "Um estado de doença caracterizado por limitação das vias aéreas que não é completamente reversível. A limitação das vias aéreas é geralmente progressiva e associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões a partículas nocivas e gases," A DPOC inclui bronquiolite obstrutiva crônica com

fibrose e obstrução das vias aéreas menores, enfisema com amplificação do espaço aéreo e destruição do parênquima pulmonar, perda da elasticidade pulmonar e fechamento das vias aéreas menores (Brody *et al.*, 2006; Raffa *et al.*, 2006).

O tratamento da asma e da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) envolve o uso de fármacos com mecanismos que afetam diferentes aspectos dessas doenças (Brody *et al.*, 2006).

Dentre os agentes antiinflamatórios destacam-se as cromonas para o controle da liberação de mediadores a partir de mastócitos e outras células e para o controle dos efeitos de estabilização da membrana; os glicocorticóides locais ou sistêmicos, para o controle da transcrição de genes mediadores e para o controle de edema, produção de muco e infiltração eosinófila, e os moduladores de leucotrienos para diminuir a síntese de mediadores inflamatórios ou antagonizar os receptores dos mediadores inflamatórios (Brody *et al.*, 2006).

Como agentes broncodilatadores destacam-se as metilxantinas para redução da frequência de broncoespasmos recorrentes; os agonistas dos receptores β 2-adrenérgicos para relaxar o músculo liso brônquico e diminuir a permeabilidade microvascular, e os antagonistas dos receptores muscarínicos para inibir os efeitos broncoconstritores da acetilcolina endógena (Brody *et al.*, 2006).

2.3 LEUCOTRIENOS

Os leucotrienos são produtos do metabolismo do ácido araquidônico envolvidos nos processos inflamatórios, incluindo asma e anafilaxia. A enzima 5-lipoxigenase catalisa a síntese de ácido araquidônico em intermediários instáveis, que são convertidos em leucotrienos. Inúmeras células das vias aéreas (incluindo mastócitos, macrófagos, eosinófilos e basófilos) sintetizam, armazenam e secretam vários subtipos de leucotrienos pró-inflamatórios (Raffa *et al.*, 2006; SINGULAIR, Merck & Co., Inc). O leucotrieno B₄ (LTB₄) atrai leucócitos adicionais, e os LTC₄ e LTD₄ aumentam a reatividade bronquial, a broncoconstrição e a secreção de muco (Raffa *et al.*, 2006).

Estes eicosanóides se ligam aos receptores cisteinil leucotrienos (CysLT). O receptor CysLT tipo 1 (CysLT1) é encontrado na via respiratória humana

(incluindo células musculares lisas e macrófagos da via aérea) e em outras células pró-inflamatórias (incluindo eosinófilos e certas células do sistema mielóide). CysLTs têm sido correlacionados com a patofisiologia da asma e da rinite alérgica. Na asma, os mediadores de leucotrienos apresentam como efeitos, o edema respiratório, contração da musculatura lisa e alteração da atividade celular associado ao processo inflamatório. Na rinite alérgica, os CysLTs são liberados na mucosa nasal após exposição a alérgenos (SINGULAIR, Merck & Co., Inc; Balani *et al.*, 1997).

O esforço para desenvolver fármacos que bloqueiam as ações pró-inflamatórias dos leucotrienos produziu dois tipos de fármacos: os inibidores da 5-lipoxigenase e os antagonistas de leucotrienos (Raffa *et al.*, 2006).

Esses fármacos são eficazes e seguros quando administrados por via oral, vantagem significativa quando comparados com a inalação de corticosteróides. A ampla margem de segurança e a excelente atividade por via oral justificam a popularidade dos antagonistas de leucotrienos para crianças (Raffa *et al.*, 2006).

2.4 MONTELUCASTE

O Montelukaste, é um potente inibidor seletivo reversível do receptor cisteinil-leucotrieno-1 (CysLT1), evitando que esses mediadores provoquem a resposta asmática (SINGULAIR, Merck & Co., Inc). Pode ser administrado oralmente uma vez por dia, o que aumenta a adesão ao tratamento quando comparado a outras terapias, o que justifica sua utilização no tratamento de adultos e crianças. É o antagonista de leucotrienos aprovado pela US Food and Drug Administration (FDA) para tratamento de asma em crianças de 2 a 12 anos (Al-rawithi, *et al.*, 2001; Alsarra *et al.*, 2005).

O Montelukaste Sódico, fármaco recente no mercado mundial, encontra-se disponível no mercado farmacêutico no medicamento Singulair da empresa Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltda nas formas farmacêuticas de comprimidos, comprimidos mastigáveis e grânulos mastigáveis, sob proteção patentária até outubro do ano de 2010.

2.4.1 Mecanismo de ação

Montelucaste é um componente que se liga com alta afinidade e seletividade aos receptores CysLT₁ (em detrimento a outros importantes receptores das vias respiratórias). O Montelucaste inibe a ação fisiológica de LTC₄, LTD₄ e LTE₄ no receptor CysLT₁ sem qualquer atividade agonista (SINGULAIR, Merck & Co).

2.4.2 Farmacocinética do montelucaste

2.4.2.1 Absorção

O montelucaste é rápida e quase completamente absorvido após a administração oral. A concentração plasmática máxima média (C_{máx}) dos comprimidos revestidos de 10mg é atingida 3 horas (T_{máx}) após a administração a adultos em jejum. A biodisponibilidade oral média é de 64%. A biodisponibilidade oral e a C_{máx} não são influenciadas por uma refeição-padrão. Estudos clínicos demonstram o perfil de segurança e a eficácia dos comprimidos revestidos de 10mg, independentemente do horário de ingestão de alimentos (SINGULAIR, Merck & Co).

2.4.2.2 Distribuição e metabolismo

A ligação do montelucaste às proteínas plasmáticas é superior a 99%. O volume de distribuição em estado de equilíbrio do montelucaste é de aproximadamente 8 a 11 litros. Estudos em ratos, que utilizaram montelucaste marcado radioativamente, demonstraram mínima distribuição pela barreira hematoencefálica. Além disso, as concentrações do material radiomarcado, 24 horas após a dose, foram mínimas em todos os outros tecidos. O montelucaste é amplamente metabolizado (SINGULAIR, Merck & Co).

2.4.2.3 Eliminação

A depuração plasmática do montelucaste é de aproximadamente 45mL/min em adultos saudáveis. Após uma dose oral de montelucaste marcado radioativamente, 86% da radioatividade foi recuperada em coletas fecais durante 5 dias e < 0,2% foi recuperada na urina. Considerando-se as estimativas da biodisponibilidade oral do montelucaste, isso indica que o

montelucaste e seus metabólitos são excretados quase que exclusivamente pela bile. Em diversos estudos, a meia vida plasmática média do montelucaste foi de 2,7 a 5,5 horas em jovens saudáveis. A farmacocinética do montelucaste é quase linear para doses de até 50mg administradas por via oral (SINGULAIR, Merck & Co).

2.4.3 Dosagem e administração

O montelucaste sódico na forma de comprimidos revestidos de 10mg dose única apresenta-se como menor dose capaz de fazer efeito contra a obstrução pulmonar na asma crônica e na broncoconstrição induzida por exercícios. A administração deve ser realizada à noite, uma vez que neste período se obtém nível plasmático máximo e mais rápido (4 a 7 horas), coincidindo com o período do dia em que a manifestação asmática é mais freqüente (Knorr *et al.*, 1999; Roman, 2008).

2.4.4 Estabilidade

2.4.4.1 Estabilidade à luz

Para que uma reação fotoquímica ocorra é necessário que a molécula em estudo apresente máximos de absorção na região de amplitude da fonte de radiação. Compostos contendo grupamentos como o nitrogênio e ligações duplas conjugadas são mais sensíveis à fotólise quanto maior for o número destes cromóforos na molécula, especialmente se estão conjugados ou ocorrer a possibilidade de interação entre os elétrons móveis de cada grupo (Nudelman, 1975). O montelucaste sódico apresenta em sua estrutura química grupamentos de nitrogênio e ligações duplas conjugadas tornando-o suscetível à fotólise (Roman, 2008).

Os principais subprodutos da fotodegradação do montelucaste são isômero cis, óxido S e dehidro, sendo o isômero cis obtido pela conversão do grupo funcional trans-etinil para a forma cis sob irradiação de luz ultravioleta (Ochiai *et al.*, 1998; Omari *et al.*, 2007).

A estabilidade química do montelucaste em solução e em estado sólido tem sido alvo de estudos, uma vez que o Montelucaste é um componente sensível à luz (Omari *et al.*, 2007). O montelucaste em solução demonstra instabilidade quando exposto à luz, principalmente ultravioleta (UV) a 254nm,

permitindo a formação do seu maior subproduto de fotodegradação, o isômero cis. Em pó, ou em comprimidos intactos, fora da embalagem de alumínio original, o montelucaste sódico também apresenta instabilidade na presença de luz UV (Omari *et al.*, 2007).

Em seus estudos, Omari *et al.* (2007) demonstraram ainda, a influência do tipo de solvente na fotodegradação, caracterizando maior estabilidade do montelucaste sódico quando no diluente metanol 70% em água e meio básico.

Devido à elevada fotosensibilidade, faz-se necessário maior cuidado na manipulação deste fármaco empregando vidraria âmbar e ambiente protegido da luz, ou utilização de luz neon ou luz de sódio.

2.4.4.2 Estabilidade térmica

A temperatura não é um fator preponderante que influencia na estabilidade do montelucaste, como demonstrado por Omari *et al.* (2007) e Roman (2008).

Omari *et al.* (2007) demonstraram que em estado sólido e em solução, o montelucaste apresenta excelente estabilidade quando incubado à 65°C por até 70 dias, uma vez que a porcentagem de montelucaste encontrada foi maior que 99%, sendo encontrado apenas 0,2% do produto de degradação óxido S, que pode ser evitado empregando agentes antioxidantes. Roman (2008) também demonstrou a estabilidade do montelucaste em solução, comprimidos triturados e intactos por até 35 dias à temperatura de 60°C.

2.5 TÉCNICAS EMPREGADAS NA CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA TESTE

2.5.1 Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial

Calorimetria exploratória diferencial (DSC, Differential scanning calorimetry) pode ser definida como uma técnica que mede as temperaturas e o fluxo de calor associado com as transições dos materiais em função da temperatura e do tempo. Tais medidas fornecem informações qualitativas e quantitativas sobre mudanças físicas e químicas que envolvem processos endotérmicos e exotérmicos ou mudanças na capacidade calorífica (Mothé e Azevedo, 2002).

O DSC é uma das técnicas mais empregadas para medir a temperatura de transição vítrea dos diversos materiais, além de fornecer informações sobre a compatibilidade da mistura entre duas ou mais substâncias, o que permite levantar informações importantes para o desenvolvimento farmacotécnico quanto à compatibilidade dos excipientes em relação ao ativo principal de uma formulação (Mothé e Azevedo, 2002).

2.5.2 Análise Térmica por TG

A termogravimetria baseia-se no estudo da variação de massa de uma amostra, resultante de uma transformação física (sublimação, evaporação, condensação) ou química (degradação) em função da temperatura ou do tempo. Esta análise pode agregar informações importantes sobre a estabilidade térmica e a composição da amostra original (Mothé e Azevedo, 2002).

2.5.3 Análise Quantitativa por Cromatografia Líquida de alta Eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência é o tipo de cromatografia mais versátil e amplamente utilizada. Esta técnica é empregada para separação e determinação de uma variedade de compostos orgânicos, inorgânicos e biológicos (Skoog *et al.*, 2004; McMaster, 2007).

A cromatografia líquida de alta eficiência emprega uma fase móvel líquida e uma fase estacionária finamente dividida e que, para ter um fluxo razoável, opera a pressões elevadas (Skoog *et al.*, 2004).

Os equipamentos empregados para efetuar a cromatografia a líquido – CLAE são os denominados cromatógrafos a líquido (Figura 1).



Figura 1 - Cromatógrafo Líquido

Fonte: Disponível em: <http://www.lvc.edu/chemistry/instrumentation.aspx>

Os componentes que constituem estes equipamentos estão descritos a seguir (Ciola, 1998) e visualizados na figura 2:

- Reservatório e sistema de bombeamento da fase móvel
- Sistema de introdução de amostras
- Sistema analítico – coluna cromatográfica
- Sistema de detecção
- Sistema de registro e tratamento de amostra

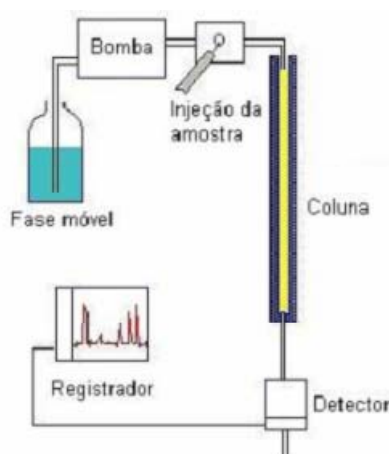


Figura 2 - Componentes do Cromatógrafo Líquido

Fonte: Disponível em:

<http://www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/Exclusivo/Inserir/Anexos/LinkAnexos/Resumo%20G6.pdf>

A fase móvel, formada por solventes encontrados nos reservatórios, é bombeada com o auxílio da bomba através do sistema de introdução das amostras até uma coluna cromatográfica, situada ou não dentro de um termostato. Nesta fase estacionária (coluna) efetua-se a separação dos componentes da mistura de acordo com a natureza da fase móvel, da fase estacionária e dos componentes analisados. A fase móvel sai da coluna e passa por um sistema de detecção, onde são detectadas alterações de alguma propriedade física específica. Esta variação é transformada num sinal elétrico, que é registrado e tratado matematicamente por um processador conveniente. Um gráfico conhecido por cromatograma é obtido (Farmacopéia Brasileira, 1988; Ciola, 1998).

Os equipamentos mais comuns, geralmente apresentam bombas quaternárias, ou seja, a capacidade de bombear quatro solventes simultaneamente, em quantidades previamente determinadas e antes de

chegar ao sistema de introdução de amostras os mesmos solventes são degaseificados pelo próprio equipamento. Todos reagentes e solventes da fase móvel são especiais com pureza e qualidade altas e antes de serem utilizados, principalmente os tampões preparados em laboratório, são filtrados á vácuo em membranas de 0,45 μm . O sistema de introdução das amostras deve ser de preferência automatizado, de forma que as amostras preparadas sejam colocadas em frasco de borossilicato (*vials*) e o próprio aparelho mede uma quantidade conhecida da amostra e encaminha para o sistema analítico. (Ciola, 1998).

As colunas utilizadas podem ter diversos comprimentos, diâmetros, micragem de partículas e tipo de empacotamento. A mais utilizada é coluna com empacotamento C18 para realização da cromatografia em fase reversa. Termostatos para o compartimento de colunas podem ser utilizados para controlar a temperatura de trabalho das mesmas (Ciola, 1998; Skoog *et al.*, 2004).

Para a detecção do fármaco, os equipamentos utilizam com maior frequência a técnica de espectrofotometria em ultravioleta (UV), uma vez que a maioria dos grupos orgânicos funcionais absorve nesta região (Skoog *et al.*, 2004). Estes detectores geram sinais elétricos que são convertidos em cromatogramas por softwares especiais, instalados em computadores. Assim os equipamentos são controlados via computadores e todos os cálculos das análises são realizados pelos mesmos (Skoog *et al.*, 2004).

Para a análise quantitativa, preparam-se soluções amostras e padrões conforme a monografia individual de cada fármaco e calcula-se a concentração, através da área obtida no cromatograma referente à substância. Este tipo de calibração é denominado de calibração externa, mas pode-se utilizar, conforme a monografia, a calibração interna onde uma substância de concentração conhecida é adicionada em quantidade constante às soluções amostras e padrão, desta forma o cálculo para determinação da concentração leva em conta a razão entre a área da substância em questão e a área do padrão interno (Ciola, 1998).

2.5.4 Análise Quantitativa por Cromatografia Líquida de alta Eficiência acoplada a espectrômetro de massas

O espectrômetro de massas (Figura 3) é um instrumento que permite determinar a massa molar de compostos eletricamente carregados, ou íons previamente formados. Estes íons são selecionados no espectrômetro de massas de acordo com a razão massa-carga (m/z) (Skoog *et al.*, 2002; Dass, 2007).

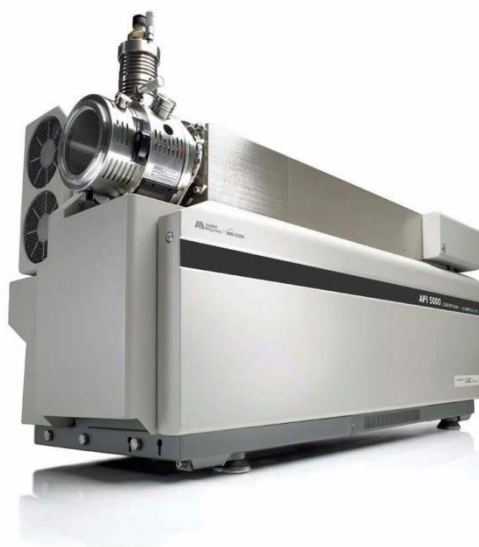


Figura 3 - Espectrômetro de massas

Fonte: Disponível em:

<http://www.kitmondo.com/category.aspx?CatID=126&catName=Mass-Spectrometer&mfr=Applied-Biosystems>

A espectrometria de massas é uma técnica analítica utilizada para identificação de compostos, elucidação estrutural de propriedades químicas da molécula e quantificação de compostos conhecidos (Skoog *et al.*, 2002).

O acoplamento do detector de MS/MS à técnica de Cromatografia Líquida permite que os compostos pré-separados por esta última sejam identificados e quantificados com alto grau de seletividade, sensibilidade e confiabilidade. Com isso, os compostos presentes em amostras complexas (ex: fluidos biológicos) podem ser analisados livres de interferentes, proporcionando análises rápidas (Ardrey, 2003). Além disso, a técnica de

espectrometria de massas apresenta elevada sensibilidade, podendo quantificar os analitos na ordem de picogramas (Ardrey, 2003).

A espectrometria de massas pode ser apresentada em cinco etapas principais. São elas: introdução das amostras, ionização, separação dos íons, detecção dos íons e tratamento dos dados (Ardrey, 2003). A figura 4 apresenta de maneira simplificada as etapas da análise de espectrometria de massas.

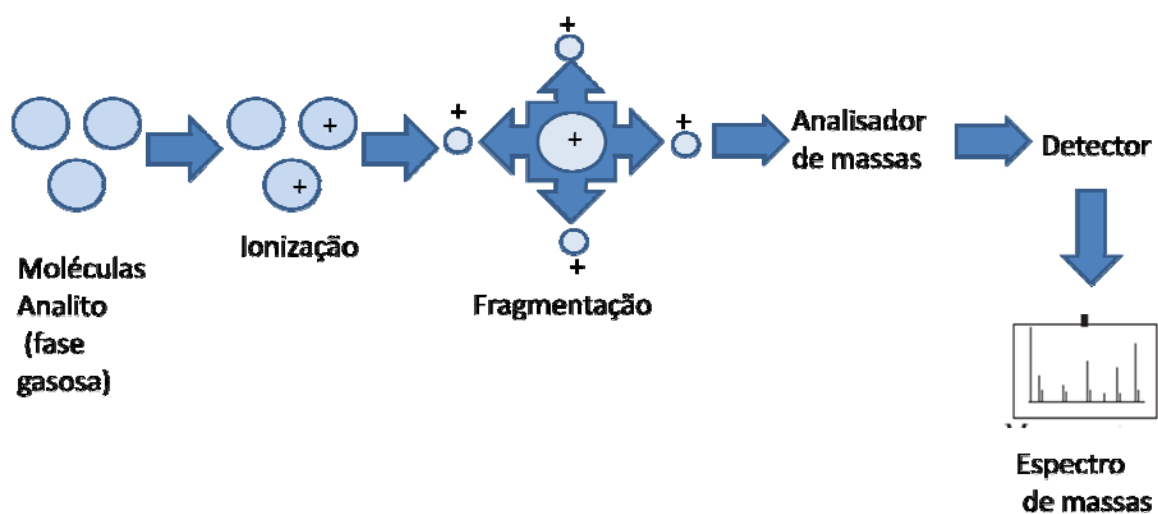


Figura 4 - Princípio da análise por espectrometria de massas.

A ionização do analito é uma das etapas cruciais para análise por espectrometria de massas. Através da aplicação de forças elétricas e magnéticas, a energia e velocidade de espécies iônicas podem ser controladas, auxiliando na separação e detecção (Dass, 2007). A espectrometria de massas com ionização *ElectroSpray* foi introduzida por Yamashita e Fenn, em 1984. A ionização por *ElectroSpray* não é, na realidade um processo de ionização, mas um processo de transferência de íons em solução para a fase gasosa. A ionização por *ElectroSpray* gera íons através de um aerosol da solução (100% aquosa ou 100% orgânica), aplicando uma carga voltaica através de uma sonda. Uma vez formado o spray do solvente contendo os compostos iônicos, estas gotas são rapidamente desolvatadas pela adição de um aquecimento ou banho de gás. À medida que o solvente evapora os íons presentes nesta "gota carregada" são ejetados. Os íons são guiados por força eletrostática para o

orifício de entrada do analisador de massas, possibilitando as etapas seguintes de fragmentação, detecção e análise dos dados (Cole, 1997; Dass, 2007).

2.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

De acordo com o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, da ANVISA, a validação analítica deve garantir, por meio de estudos experimentais em laboratório, que o método a ser utilizado atenda as exigências das aplicações analíticas na qual será submetido, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação, robustez e estabilidade adequados à análise.

2.6.1 Especificidade e Seletividade

a) Conceito/ Objetivo

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (Brasil, 2003).

Para análise quantitativa, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras contendo apenas os excipientes do medicamento (placebo), com os resultados obtidos da solução do analito (padrão). Caso o método seja destinado à quantificação de mais de um fármaco, devem ser analisados separadamente para determinar e assegurar que impurezas de um fármaco não interfiram na análise do outro (Brasil, 2003; ICH, 2005; Leite, 2002).

b) Critério de Aceitação

A amostra de placebo não deve apresentar valor superior a 2%, calculado em relação ao padrão.

2.6.2 Linearidade (Curva de Calibração)

a) Conceito/ Objetivo

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na

amostra, dentro do intervalo especificado conforme quadro 1 (Brasil, 2003; ICH, 2005).

Quadro 1 - Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos.

Ensaio	Alcance
Determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas	De 80% a 120% da concentração teórica do teste
Determinação de impurezas	Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando apresentarem importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados, os limites de quantificação e detecção devem ser adequados às quantidades de impurezas a serem controladas
Uniformidade de conteúdo	De 70% a 130% da concentração teórica do teste
Ensaio de Dissolução	De $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para o intervalo. Caso a especificação para a dissolução envolva mais que um tempo, o alcance do método deve incluir -20% sobre o menor valor e $+20\%$ sobre o maior valor.

Fonte: Brasil, 2003

b) Critério de Aceitação

Valor mínimo aceitável para coeficiente de correlação de 0,99 (Brasil, 2003).

2.6.3 Precisão

a) Conceito/ Objetivo

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A repetibilidade do método é determinada com o mesmo analista e mesma instrumentação (precisão intra-corrida). Determina-se também a precisão intermediária através de análises em dias diferentes com analistas diferentes (precisão intermediária, inter-corridas).

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

em que, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada (Brasil, 2003; ICH, 2005).

b) Critério de Aceitação

DPR não superior a 5% (Brasil, 2003).

2.6.4 Exatidão

a) Conceito/ Objetivo

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo. É expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (Brasil, 2003; ICH, 2005).

$$Exatidão = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

b) Critério de Aceitação

A Exatidão deve estar entre 95,0% a 105,0% para teor, uniformidade e dissolução.

2.6.5 Limite de Detecção

a) Conceito/ Objetivo

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (Brasil, 2003; ICH, 2005).

b) Critério de Aceitação

No caso de métodos instrumentais (CLAE, CG, absorção atômica), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base (Brasil, 2003; ICH, 2005).

2.6.6 Limite de Quantificação**a) Conceito/ Objetivo**

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (Brasil, 2003; ICH, 2005).

b) Critério de Aceitação

A variação permitida para aprovação do limite de quantificação deve ter exatidão de 95 a 105% e DPR não superior a 5,0%.

2.6.7 Robustez**a) Conceito/ Objetivo**

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal.

Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método as variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (Brasil, 2003; ICH, 2005).

b) Critério de Aceitação

Não há parâmetro legal estabelecido para avaliação dos resultados, neste trabalho será estabelecido para aprovação exatidão de 95 a 105% e precisão não superior a 5,0%.

2.6.8 Estabilidade da amostra**a) Conceito/Objetivo**

O ensaio de estabilidade verifica as características dos analitos nas amostras solubilizadas até a realização da análise, detectando a formação de degradantes e subprodutos que possam interferir nos resultados da análise.

b) Critério de aceitação

São consideradas estáveis as amostras que apresentam uma variação de no máximo 5,0% em relação às amostras padrão recentes.

2.7 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA BIOANALÍTICA

A validação de métodos bioanalíticos deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, especificidade, reprodutibilidade, estabilidade e recuperação adequadas à análise (Brasil, 2003).

Para os estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência deve-se utilizar padrão interno, sempre que métodos cromatográficos forem utilizados (Brasil, 2003).

2.7.1 Especificidade**a) Conceito/Objetivo**

O teste de especificidade verifica a habilidade do método bioanalítico de medir e diferenciar o analito de componentes que possam estar presentes na amostra, tais como metabólitos, impurezas, compostos de degradação ou componentes da matriz.

Caso o método seja destinado à quantificação de mais de um fármaco, cada um deve ser injetado separadamente para determinar os tempos de eluição individuais e assegurar que impurezas de um fármaco não interfiram na análise do outro (Brasil, 2003; ICH, 2005).

b) Critério de aceitação

A resposta de picos interferentes no tempo de eluição do fármaco deve ser inferior a 20% da resposta do limite inferior de quantificação (LIQ). A resposta de picos interferentes no tempo de eluição do padrão interno deve ser inferior a 5% da resposta na concentração utilizada (Brasil, 2003).

2.7.2 Linearidade (Curva de Calibração)

a) Conceito/ Objetivo

A curva de calibração representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito. Deve-se gerar uma curva de calibração para cada fármaco e corrida analítica, a qual será usada para calcular a concentração do fármaco nas amostras, utilizando-se a mesma matriz biológica proposta para o estudo (Brasil, 2003; ICH, 2005).

b) Critério de Aceitação (Brasil, 2003)

O desvio deve ser menor ou igual a 20% (vinte por cento) em relação à concentração nominal para o LIQ;

O desvio deve ser menor ou igual a 15 % (quinze por cento) em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração;

No mínimo quatro de seis concentrações da curva de calibração devem cumprir com os critérios anteriores, incluindo o LIQ e a maior concentração da curva de calibração;

O coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98.

2.7.3 Precisão

a) Conceito/ Objetivo

A precisão representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio. A concordância entre os resultados é determinada dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação (precisão intra-corrida). Determina-se também a precisão intermediária através da concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes (inter-corridas).

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

em que, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada (Brasil, 2003).

b) Critério de Aceitação

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 15%, exceto para o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20% (Brasil, 2003).

2.7.4 Exatidão

a) Conceito/ Objetivo

A exatidão de um método bioanalítico representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência.

A exatidão deve ser determinada em uma mesma corrida analítica (exatidão intra-corrida) e em corridas diferentes (exatidão inter-corridas).

A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (Brasil, 2003):

$$Exatidão = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

b) Critério de Aceitação

O desvio não deve exceder 15%, exceto para o limite de quantificação, para o qual se admite desvios menores ou iguais a 20%.

2.7.5 Limite de Detecção (LD)

a) Conceito/ Objetivo

É a menor concentração de um analito que o procedimento bioanalítico consegue diferenciar confiavelmente do ruído de fundo. (Brasil, 2003).

b) Critério de Aceitação

Recomenda-se que o LD seja de 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base.

2.7.6 Limite Inferior de Quantificação (LIQ)

a) Conceito/ Objetivo

Limite inferior de quantificação é a menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser determinado quantitativamente, com precisão e exatidão aceitáveis (Brasil, 2003).

b) Critério de Aceitação

O LIQ deve ser no mínimo, cinco vezes superior a qualquer interferência da amostra branco no tempo de eluição do fármaco.

2.7.7 Limite Superior de Quantificação (LSQ)

a) Conceito/ Objetivo

Maior quantidade de um analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão (Brasil, 2003).

b) Critério de Aceitação

O LSQ deve ser no mínimo 120% do valor esperado para concentração máxima ($C_{m\acute{a}x}$). Sendo o $C_{m\acute{a}x}$ baseado na literatura.

2.7.8 Recuperação

a) Conceito/ Objetivo

É a eficiência do procedimento de extração de um método analítico. Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximos a 100% são desejáveis, porém, admitem-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata.

Este teste deve ser realizado comparando-se os resultados analíticos de amostras extraídas a partir de três concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de linearidade do método, com os resultados obtidos com soluções padrão não extraídas, que representam 100% de recuperação (Brasil, 2003).

2.7.9 Estabilidade

Para a realização do estudo de estabilidade devem ser observados os parâmetros de exatidão, precisão, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, especificidade e limite de variação, previamente validados. A

estabilidade do fármaco em líquidos biológicos depende de suas propriedades químicas, da matriz biológica e do material de acondicionamento utilizado. A estabilidade determinada para um tipo de matriz e de material de acondicionamento específico não pode ser extrapolada para outros (Brasil, 2003).

As condições de realização dos ensaios de estabilidade devem reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras. Deve ser avaliada a estabilidade do analito durante a coleta e manuseio da amostra, após armazenagem de longa duração (congelamento) e curta duração (à temperatura ambiente), após ciclos de congelamento e descongelamento e nas condições de análise. Deve-se incluir também avaliação da estabilidade do analito nas soluções-padrão, preparadas com solvente apropriado em concentrações conhecidas. As determinações de estabilidade devem utilizar um conjunto de amostras, preparadas a partir de uma solução estoque recente do fármaco em análise, adicionado à matriz biológica isenta de interferência (Brasil, 2003).

2.7.9.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento (ECCD)

Deve-se testar a estabilidade do fármaco após três ciclos de congelamento e descongelamento, utilizando-se, no mínimo, três amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico, nas seguintes condições: as amostras devem ser congeladas à temperatura indicada para o armazenamento e mantidas por 24 horas, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, as amostras devem ser novamente congeladas à temperatura indicada para o armazenamento, por 12 a 24 horas e, assim sucessivamente, até contemplar os três ciclos, quantificando-se o fármaco nas amostras após o terceiro ciclo. Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas (Brasil, 2003).

2.7.9.2 Estabilidade de curta duração (ECD)

Para verificação dessa estabilidade utilizam-se, no mínimo, três amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do

método analítico. Cada uma delas deverá permanecer à temperatura ambiente de 4 (quatro) a 24 (vinte e quatro) horas (baseado no tempo em que as amostras do estudo serão mantidas à temperatura ambiente) e analisadas. Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas (Brasil, 2003).

2.7.9.3 Estabilidade de longa duração (ELD)

O tempo de armazenamento para o estudo de estabilidade de longa duração deve exceder o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra e a análise da última, de acordo com o cronograma apresentado no protocolo de estudo de biodisponibilidade relativa/bioequivalência.

Para verificação dessa estabilidade utilizam-se, no mínimo, três amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico. As concentrações de todas as amostras de estabilidade devem ser comparadas com a média dos valores anteriormente calculados para as amostras do primeiro dia do teste (Brasil, 2003).

2.7.9.4 Estabilidade pós-processamento (EPP)

Em caso de utilização de equipamentos que empregam sistemas automáticos de amostragem/injeção, deve-se realizar estudo de estabilidade do fármaco, na amostra processada para análise, incluindo o padrão interno, na temperatura sob a qual o teste será realizado e por período de tempo superior à duração da corrida analítica. Utiliza-se, no mínimo, três amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico. Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas (Brasil, 2003).

2.7.9.5 Estabilidade das soluções padrão

Deve ser avaliada a estabilidade das soluções-padrão do fármaco e do padrão interno, mantidas à temperatura ambiente por, no mínimo, 6 (seis) horas após preparação.

Em caso de tais soluções serem armazenadas sob refrigeração ou congelamento, a estabilidade também deve ser avaliada, contemplando a temperatura e o período de armazenamento das mesmas.

Os resultados desse teste devem ser comparados com aqueles obtidos utilizando-se soluções recentemente preparadas do fármaco e do padrão interno (Brasil, 2003).

2.7.9.6 Critério de aceitação

As amostras serão consideradas estáveis quando não se observar desvio superior a 15% do valor obtido das amostras recém-preparadas, com exceção do LIQ, para o qual se aceita desvio de até 20%.

2.8 FARMACOTÉCNICA DE COMPRIMIDOS

Comprimidos são formas farmacêuticas sólidas, geralmente preparados com o auxílio de adjuvantes farmacêuticos. Eles podem variar em tamanho, forma, peso, dureza, espessura, em características de desintegração e dissolução e em outros aspectos dependendo de sua finalidade de uso e método de fabricação (Ansel *et al.*, 2007).

Os comprimidos representam mais de 80% das formas farmacêuticas administradas ao homem. A facilidade de produção, a conveniência de administração oral e sua estabilidade quando comparada à de um líquido ou semi-sólido são algumas das razões da grande utilização de comprimidos (Jivraj *et al.*, 2000).

2.8.1 Produção de comprimidos

Os comprimidos são obtidos por meio de três técnicas básicas: granulação por via úmida, granulação por via seca e compressão direta (Prista *et al.*, 1995; Lachman *et al.*, 2001; Ansel *et al.*, 2007).

A granulação por via úmida consiste em quatro etapas: o umedecimento dos pós, a granulação da massa úmida, a secagem do granulado obtido e a calibração do granulado seco em grãos de tamanho uniforme. Na etapa de umedecimento um agente aglutinante na forma de solução é adicionado à mistura de pós promovendo a formação de uma pasta. Esta pasta é passada por um tamis ou placa perfurada obtendo-se vários grânulos que são submetidos ao processo de secagem. Após a secagem, os grânulos são calibrados pela passagem através de tamises, o lubrificante é adicionado, uma nova mistura é executada e, finalmente realiza-se a compressão. Dentre as

limitações da técnica de granulação por via úmida estão a impossibilidade de fabricação de comprimidos contendo substâncias termolábeis ou facilmente hidrolisáveis, a suscetibilidade a contaminações devido ao grande número de etapas, o elevado custo de produção pela necessidade de possuir vários equipamentos diferentes e de utilizar grande quantidade de energia elétrica para secagem (Prista *et al.*, 1995; Lachman *et al.*, 2001; Ansel *et al.*, 2007).

A granulação por via seca é um método de obtenção de comprimidos em que não se utiliza solução aglutinante. Os pós são misturados e submetidos a um processo de compactação em compressoras ou rolos compactadores. O material compactado é fragmentado em moinhos e tamisado, obtendo-se grânulos de tamanho definido. O lubrificante é adicionado e a mistura é comprimida. O processo de granulação a seco permite a preparação rápida de comprimidos, uma vez que não é necessária a etapa de secagem como na granulação úmida. Sua principal utilização é na fabricação de comprimidos contendo substâncias higroscópicas, termolábeis ou de substâncias que sofrem alteração na presença de umidade (Prista *et al.*, 1995; Lachman *et al.*, 2001; Ansel *et al.*, 2007).

A compressão direta é uma técnica muito utilizada na produção de comprimidos e consiste no processo ideal para produção em escala industrial de medicamentos. É composta por três etapas: a pesagem dos pós que compõem a formulação, a mistura destes e a compressão (Prista *et al.*, 1995; Lachman *et al.*, 2001; Ansel *et al.*, 2007).

Entre suas vantagens estão a redução no tempo de fabricação o que acarreta em elevada produtividade, a eliminação de várias etapas de processo reduzindo a probabilidade de contaminação cruzada, a redução do consumo de energia e a redução do custo final do produto, uma vez que requer área física menor e menor número de equipamentos e mão-de-obra, já que envolve somente três etapas (Prista *et al.*, 1995; Lachman *et al.*, 2001; Ansel *et al.*, 2007).

Além das vantagens já mencionadas, a compressão direta permite melhor estabilidade dos componentes da formulação quando comparados aos procedimentos que incluem granulação via úmida, uma vez que não há adição de solução aglutinante e aquecimento (secagem) durante a produção, sendo

desta forma considerada adequada para substâncias termolábeis e higroscópicas (Martinello, 2005).

Outra vantagem da compressão direta consiste na otimização da desintegração do comprimido, onde cada partícula do fármaco é liberada da massa do comprimido e fica disponível para a dissolução (Shangraw, 1989).

Todavia, existem exigências que limitam sua ampla aplicação. Número reduzido de fármacos pode ser transformado em comprimidos sem sofrer quaisquer processamentos. A principal limitação consiste em utilizar somente 30% ou menos do princípio ativo, não sendo indicado para fármacos de baixo escoamento e segregação (Jivraj *et al.*, 2000). A figura 5 apresenta equipamentos utilizados na compressão direta.

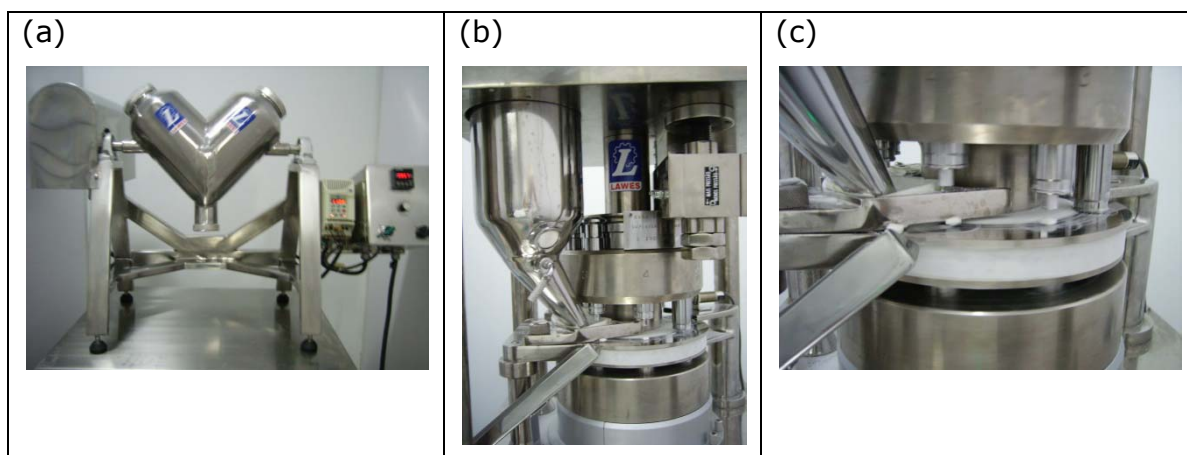


Figura 5 - Equipamentos utilizados na compressão direta: (a) misturador em "V", (b) e (c) compressora.

2.8.2 Adjuvantes Farmacêuticos

A maioria das substâncias ativas pulverizadas necessita da adição de adjuvantes farmacêuticos, a fim de que as características necessárias para a produção e uso de comprimidos sejam obtidas (Ansel *et al.*, 2007). O sucesso do desenvolvimento e planejamento de um comprimido obtido por compressão direta se dá principalmente pela correta escolha dos excipientes ou adjuvantes. Estes adjuvantes podem ser classificados de acordo com sua função na formulação como por exemplo diluentes, aglutinantes, desintegrantes, lubrificantes e agentes molhantes.

2.8.2.1 Diluentes ou materiais de enchimento

Aumentam o volume da formulação para a preparação de comprimidos de tamanho adequado, ou seja, são produtos quimicamente inertes e estáveis adicionados à formulação para originarem comprimidos de peso conveniente nos casos de substâncias ativas em pequenas dosagens. Por exemplo: lactose, misturas de amido de milho e açúcar invertido, celulose microcristalina, maltose cristalina e fosfato de sódio (Sheth, 1980; Prista *et al.*, 1995; Lachman *et al.*, 2001; Ansel *et al.*, 2007).

2.8.2.2 Aglutinantes

Promovem a adesão das partículas dos pós, permitindo a preparação de grânulos e a manutenção da integridade do produto final (Ansel *et al.*, 2007). Os excipientes aglutinantes devem apresentar certas características como boa compactação, para que os comprimidos estejam de acordo com os requerimentos de dureza e friabilidade, bom fluxo para atender às especificações de uniformidade de conteúdo, serem quimicamente inertes para não interagir com outras substâncias e estáveis para atender ao prazo de validade estabelecido (Eissens *et al.*, 2002). Deve-se empregar pequenas quantidades de aglutinante, visto que estas substâncias se opõem a desagregação dos comprimidos. Por exemplo: açúcares (sacarose em pó ou xarope, glucose, lactose), amidos, goma arábica, goma adraganta, gelatina (solução aquosa de 2 a 4%), PVP (solução alcoólica de 10 a 30%), pectina (solução aquosa 5%), derivados de celulose (CMC 1%, MC 400 2 a 5%, etilcelulose solução alcóolica de 2 a 4%), parafina, ácido esteárico, manteiga de cacau e PEG 4000 e 6000.

2.8.2.3 Desintegrantes

Promovem a desagregação dos comprimidos, após a administração em partículas menores para tornar o fármaco mais disponível, ou seja, são adicionados a formulação para proporcionar a quebra da forma farmacêutica quando na presença de água. Compreendem um grupo de materiais, que em contato com água, intumescem, hidratam, mudam de volume, posição ou reagem quimicamente. Por exemplo: Croscarmellose, amido para compressão

direta, carboximetilamido, carboximetilcelulose e polivinilpirrolidona (Sheth, 1980; Prista *et al.*, 1995; Lachman *et al.*, 2001; Ansel *et al.*, 2007).

2.8.2.4 Lubrificantes: antiaderentes e deslizantes

Melhoram o fluxo dos pós e grânulos para a matriz, minimizam o desgaste das matrizes e punções, previnem a aderência dos materiais particulados nas matrizes e punções e conferem brilho aos comprimidos. Podem ser divididos em duas categorias: lubrificantes hidrófobos (antiaderentes) e lubrificantes hidrofílicos ou solúveis (deslizantes) (Sheth, 1980; Prista *et al.*, 1995; Lachman *et al.*, 2001; Ansel *et al.*, 2007).

Os lubrificantes são adicionados às formulações com a finalidade de reduzir a fricção do granulado ou da mistura de pós com as paredes da matriz e com a superfície dos punções, permitindo uma fácil ejeção dos comprimidos, por exemplo: estearato de magnésio (Sheth, 1980; Prista *et al.*, 1995).

Os deslizantes são adicionados à formulação para melhorar as propriedades de fluxo, pela redução da fricção interparticular facilitando o enchimento da matriz da máquina de compressão, por exemplo: dióxido de silício (Sheth, 1980; Prista *et al.*, 1995).

O tamanho das partículas, bem como o tipo e tempo da mistura dos lubrificantes e deslizantes nas formulações são fatores importantes na utilização destes adjuvantes.

2.8.2.5 Molhantes

Substâncias capazes de reduzir a tensão superficial na interface sólido/líquido. Age diminuindo o ângulo de contato entre a água e as partículas sólidas, aumentando a molhabilidade das partículas. Apresentam propriedades tensoativas. Por exemplo: lauril sulfato de sódio, sais de trietanolamina e polissorbato 80 (Sheth, 1980; Prista *et al.*, 1995; Ferreira, 2006).

2.8.3 Comprimidos Revestidos

Os comprimidos são revestidos por várias razões: para proteger a substância ativa contra a exposição destrutiva do ar e/ou umidade e/ou luz, mascarar o sabor do fármaco, obter perfis de liberação modificados (por exemplo revestimento entérico), e proporcionar qualidades estéticas e diferenciadas ao produto, entre outras funções (Prista *et al.*, 1995).

O mercado oferece uma vasta gama de produtos de revestimento, muitos dos quais podem ser formulados especialmente para a função pretendida, quer liberação imediata ou liberação controlada.

Uma vasta seleção de formulações com misturas de polímeros permite características benéficas para formulações sólidas de dose oral, entre elas: tempo reduzido do processo de revestimento, adesão superior da cor em superfícies difíceis, menor estresse em condições que envolvem calor (Prista *et al.*, 1995; Sheth, 1980).

2.9 ESTABILIDADE DE COMPRIMIDOS

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais da embalagem (ICH, 2003; Brasil, 2005b).

A realização dos ensaios de estabilidade de produtos farmacêuticos permitem prever, determinar ou acompanhar o seu prazo de validade (ICH, 2003; Brasil, 2005b).

O prazo de validade de um produto a ser comercializado no Brasil é determinado por um estudo de estabilidade de longa duração. Por ocasião do registro poderá ser concedido um prazo de validade provisório de 24 meses se aprovado o relatório de estudo de estabilidade de longa duração de 12 meses ou relatório de estudo de estabilidade acelerado de 6 meses acompanhado dos resultados preliminares do estudo de longa duração (Brasil, 2005b).

Com a globalização, evidenciou-se a necessidade de padronização das condições experimentais da condução dos ensaios de estabilidade. Os parâmetros definidos pela legislação brasileira conforme resolução nº1 de 29 de julho de 2005 para formas farmacêuticas sólidas estão apresentados no quadro 2.

Quadro 2 – Parâmetros de estabilidade

Forma Farmacêutica	Condição de armazenamento *	Embalagem	Temperatura e umidade Acelerado **	Temperatura e umidade Longa Duração **
Sólido	15°C -30°C	Semi-permeável	40°C ± 2°C / 75% UR ± 5% UR	30°C ± 2°C / 75% UR ± 5% UR
Sólido	15°C -30°C	Impermeável	40°C ± 2°C	30°C ± 2°C

Fonte: Brasil, 2005b

* Qualquer recomendação de armazenamento em temperatura dentro destas faixas deve constar de bulas e rótulos. A temperatura recomendada não exige de que os testes de estabilidade sejam realizados com as temperaturas definidas nas duas últimas colunas da tabela.

** Os valores de temperatura e umidade são fixos e as variações são inerentes às oscilações esperadas pela câmara climática e por eventuais aberturas para retirada ou colocação de material.

2.9.1 Estudo de Estabilidade Acelerado

Estudo projetado para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento. Os dados assim obtidos, juntamente com aqueles derivados dos estudos de longa duração, podem ser usados para avaliar efeitos químicos e físicos prolongados em condições não aceleradas e para avaliar o impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas no rótulo do produto, que podem ocorrer durante o transporte (Brasil, 2005b).

2.9.2 Estudo de Estabilidade de Acompanhamento ou Intermediária

Estudo realizado para verificar que o produto farmacêutico mantém suas características físicas, químicas, biológicas, e microbiológicas conforme os resultados obtidos nos estudos de estabilidade de longa duração (Brasil, 2005b).

2.9.3 Estudo de Estabilidade de Longa Duração

Estudo projetado para verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado. Os resultados são

usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento (Brasil, 2005b).

2.10 EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA

Segundo a resolução RE nº 310, de 01 de setembro de 2004, o estudo de equivalência farmacêutica deve ser realizado entre o medicamento teste e o medicamento referência comercializado no país por laboratórios devidamente autorizados pela Anvisa para essas finalidades, pertencente à Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (Reblas).

O medicamento de referência deve cumprir com todos os requisitos farmacopéicos. O medicamento teste deve cumprir em sua totalidade com os requisitos farmacopéicos da monografia individual, inscrita na Farmacopéia Brasileira. No caso de utilização de algum outro código autorizado pela legislação vigente, os requisitos farmacopéicos da monografia devem ser complementados com os ensaios descritos em métodos gerais da Farmacopéia Brasileira vigente, para a forma farmacêutica em estudo. Na falta de monografia farmacopéica oficial, o estudo deve ser realizado utilizando-se método fornecido pela empresa solicitante, validado parcialmente pelo laboratório executor do estudo, complementando-se com os ensaios descritos em métodos gerais da Farmacopéia Brasileira vigente (Brasil, 2004).

Os ensaios para a comprovação da equivalência farmacêutica devem ser realizados, simultaneamente, nos medicamentos teste e referência.

Os estudos de perfis de dissolução devem utilizar o mesmo método de dissolução empregado no estudo de equivalência farmacêutica. No caso da inexistência de método de dissolução farmacopéico, os perfis de dissolução devem ser realizados em, pelo menos, três meios de dissolução diferentes, dentro da faixa de pH fisiológico. A apresentação dos perfis de dissolução em três meios poderá ser dispensada quando comprovado que o método proposto para análise é o mais adequado para o produto. Esse procedimento também pode ser adotado nos casos em que o método de dissolução presente na(s) farmacopéia(s) não é adequado para o produto, desde que devidamente justificado (Brasil, 2004).

Na Equivalência farmacêutica são realizados ensaios conforme a forma farmacêutica, como descrito de uma maneira geral no quadro 3:

Quadro 3 – Ensaio realizados na Equivalência Farmacêutica de acordo com a forma farmacêutica

Ensaio	Comprimido, comprimido revestido e cápsula	Creme, pomada e gel	Xarope, suspensão e solução oral	Gotas	Injetáveis
Teor	X	X	X	X	X
Teor por gota	--	--	--	X	--
Contagem de gotas	--	--	--	X	--
Dissolução	X	--	*	--	--
Descrição	X	X	X	X	X
Identificação	X	X	X	X	X
Volume médio	--	--	X	X	X
Peso médio	X	X	--	--	--
Perfil de dissolução	X	--	*	--	--
Uniformidade	X	--	**	--	--
Substâncias Relacionadas	X	X	X	X	X
Contagem total de Microrganismos Bolores e Leveduras	***	X	X	X	--
	--	X	X	X	X
Patógenos	--	X	X	X	X
Esterilidade	--	--	--	--	X
LAL (Pirogênio in vitro)	--	--	--	--	X

Fonte: Brasil, 2004; Brasil, 2010.

*Produtos em suspensão necessitam do ensaio de dissolução e perfil de dissolução.

**Produtos em dose única necessitam do ensaio de uniformidade.

***Algumas monografias solicitam a realização do ensaio de contagem de microrganismos para comprimidos e cápsulas.

2.11 BIOEQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA

Conforme a Resolução RE 1.170 de 19 de abril de 2006, os estudos de Biodisponibilidade Relativa/Bioequivalência compreendem as etapas clínica, analítica e estatística.

Na etapa clínica algumas considerações devem ser levantadas: os medicamentos teste e referência a serem submetidos ao estudo de bioequivalência deverão ser previamente aprovados como equivalentes farmacêuticos, apresentando diferença no doseamento não superior a 5% (Brasil, 2006).

O estudo é realizado por quantificação do fármaco em fluidos biológicos (sangue total, plasma ou urina). O cronograma de coleta das amostras deverá garantir a adequada caracterização do perfil plasmático do fármaco ou metabólito (concentração versus tempo), contemplando um tempo igual ou superior a 3 a 5 vezes a meia vida de eliminação dos mesmos (Brasil, 2006).

O desenho do estudo é delineado e os voluntários sadios recebem os medicamentos teste e referência em ocasiões separadas, em esquema de dose única. Anteriormente ao estudo os voluntários são submetidos à consulta médica e completa avaliação bioquímica e hematológica pré e pós estudo (Brasil, 2006).

O projeto de pesquisa, o protocolo experimental e o termo de consentimento livre e esclarecido são submetidos e aprovados por um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) credenciado no Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde/MS (Brasil, 2006).

A etapa analítica é realizada segundo as normas internacionais de Boas Práticas de Laboratório (BPL) e conforme o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos (Brasil, 2006).

Na etapa estatística os parâmetros farmacocinéticos são estimados das curvas de concentração plasmática do fármaco no decorrer do tempo. Para fins de bioequivalência, considera-se área sobre a curva (ASC_{0-t}) e concentração máxima (C_{max}) (Brasil, 2006).

Dois medicamentos (teste e referência) são considerados bioequivalentes se os valores extremos dos intervalos com 90% de confiança (IC) obtidos para a razão das médias geométricas de ambos os parâmetros estiverem compreendidos entre 80% e 125%. Outros limites para IC com 90% de

confiança para C_{max} , previamente estabelecidos no protocolo, poderão ser aceitos mediante justificativas científicas. Quando clinicamente relevante T_{max} deverá também ser considerado (Brasil, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolvimento farmacotécnico e analítico de comprimidos revestidos de montelucaste sódico visando à obtenção de equivalência e bioequivalência com o medicamento referência de mercado.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar caracterização físico-química do fármaco Montelucaste Sódico;
- Desenvolver metodologia analítica para ensaios quantitativos da matéria-prima e controle de qualidade dos medicamentos desenvolvidos;
- Validar a metodologia analítica;
- Desenvolver metodologia bioanalítica para ensaio quantitativo do montelucaste em amostras biológicas;
- Validar a metodologia bioanalítica;
- Realizar desenvolvimento farmacotécnico dos comprimidos por compressão direta;
- Realizar estudo de estabilidade das formulações;
- Realizar estudo de equivalência farmacêutica;
- Realizar estudo de bioequivalência.

4 MATERIAIS

Retirado do exemplar devido à confidencialidade dos dados.

5 MÉTODOS

Retirado do exemplar devido à confidencialidade dos dados.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Retirado do exemplar devido à confidencialidade dos dados.

7 CONCLUSÕES

- ❖ A caracterização físico-química do fármaco montelucaste e do medicamento referência Singulair® comprimidos revestidos 10mg foram determinantes para a seleção dos parâmetros a serem avaliados nas formulações desenvolvidas.
- ❖ A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência foi satisfatória para determinação quantitativa de teor e dissolução de comprimidos de montelucaste e atendem aos requisitos de Boas Práticas de Laboratório.
- ❖ A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas e a utilização da loratadina como padrão interno foram satisfatórias para a determinação quantitativa de montelucaste em plasma.
- ❖ Os métodos analítico e bioanalítico desenvolvidos foram validados apresentando especificidade, seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e estabilidade.
- ❖ O desenvolvimento farmacotécnico associado ao controle de qualidade permitiu direcionamento para produção de um medicamento com características próximas ao medicamento de referência;
- ❖ Os ensaios de estabilidade foram determinantes para assegurar a qualidade das formulações desenvolvidas mesmo em condições de estresse.
- ❖ A formulação desenvolvida (comprimidos revestidos de 10mg de Montelucaste) foi equivalente ao medicamento referência de mercado Singulair® 10 mg comprimidos revestidos da empresa Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltda.

- ❖ A formulação desenvolvida (comprimidos revestidos de 10mg de Montelukaste) foi bioequivalente ao medicamento referência de mercado Singulair® 10 mg comprimidos revestidos da empresa Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltda em condição de jejum.
- ❖ A razão de aproximadamente 100% obtida na comparação de parâmetros farmacocinéticos entre os medicamentos teste e referência demonstrou a acertividade da formulação desenvolvida.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLABOUN, H; ALKHAMIS, K.A; AL JBOUR, N.D. Effect of surfactant on dissolution of spherical particles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v. 65, p.188-197, 2007.

ANSEL, H. C; POPOVICH, N. G; ALLEN JR L. V. Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos. 8^o edição, Editora Artmed, p.776, 2007.

AL-RAWITHI, S; AL-GAZLAN, S; AL-AHMADI, W; ALSHOWAIER, I.A; YUSUF, A; RAINES, D.A. Expedient liquid chromatographic method with fluorescence detection for montelukast sodium in micro-samples of plasma. *Journal of Chromatography B*, Amsterdam. v.754, p. 527-531, 2001.

ALSARRA, I; AL-OMAR, M; GADKARIEM, E.A; BELAL, F. Voltammetric determination of montelukast sodium in dosage forms and human plasma. *II Farmaco*.v.60, p. 563-567, 2005.

ARDREY, R.E. Liquid chromatography–Mass spectrometry: an introduction. *John Wiley & Sons*. 288p, 2003.

BALANI, S.K; PRATHA, X.XU.V; KOSS, M.A; AMIN, R.D; DUFRESNE, C; MILLER, R.R; ARISON, B.H; DOSS, G.A; CHIBA, M; FREEMAN, A; HOLLAND, S.D; SCHWARTZ, J.I; LASSETER, K.C; GERTZ, B.J; ISENBERG, J.I; ROGERS, J.D; LIN, J.H; BAILLIE, T.A. Metabolic profiles of Montelukast Sodium (Singulair), a potent Cysteinyl Leukotriene₁, receptor antagonist, in human plasma and Bile. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*. v. 25, n^o 11, p. 1282-1287, 1997.

BARACAT, M.M; NERY, M.M.F; GOUVEIA, E.F; MENEGUELLI, L; HIZUKA, S.M; MAMPRIM, C.M. Estudo comparativo de excipientes em diferentes técnicas de preparação de comprimidos de cloridrato de propranolol. *Semina: Ci. Biol. Saúde*. Londrina, v. 22, p. 19-24, 2001.

BONAMICI, D. Sistema de classificação biofarmacêutica e bioisenções. São Paulo, 2009. Dissertação (Mestrado área de produção e controle farmacêuticos). Programa de pós-graduação em fármaco e medicamentos. Universidade de São Paulo.

BRASIL- Congresso Nacional. Lei nº 9.787, 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, DF, 10 de fevereiro, 1999.

BRASIL- Agência nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos através da revogação da RE nº 475 publicada no D.O.U. 19 de março de 2002. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 de junho, 2003.

BRASIL- Agência nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 310, de 01 de setembro de 2004. Determina a publicação do guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 03 de setembro, 2004.

BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Guia para Qualidade em Química Analítica – Uma Assistência a Habilitação, Séries Temáticas, Brasília, 2005 (a).

BRASIL- Agência nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 01 de agosto, 2005 (b).

BRASIL- Agência nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 1170, de 19 de abril de 2006. Determina a publicação do guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 24 de abril, 2006.

BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Informe técnico nº 1 de 15 de julho de 2008 . Esclarecimento sobre o item 2.9 do anexo da resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005, que trata do guia para a realização de estudos de estabilidade. Brasília, 2008.

BRASIL - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); DOQ-CGCRE-008, revisão 03. Orientações sobre Validações de Métodos de Ensaio Químicos. RJ, Brasil, 2010.

BRASIL- Agência nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 31, 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, 2010.

BREAUX, J; JONES, K; BOULAS, P. Understanding and Implementing Efficient Analytical Methods Development and Validation. *Pharmaceutical Technology analytical Chemistry & Testing*, 2003.

BRODY, T.; MENNEMAN, K.; WECKER, L. Farmacologia Humana. Tradução da 4ª edição. Rio de Janeiro, p. 395-405, 2006.

CHAUD, M.V; LIMA, A.C; MICHELIN, D.C; CRUZ, M.R; PAGANELLI, M.O; IGNÁCIO, R.F. Efeito da força de compressão e da umidade no perfil de dissolução de fármacos. *Saúde em revista*. Piracicaba, v.7, p. 39-43, 2005.

CIOLA, Remolo. Fundamentos da cromatografia líquida de alto desempenho HPLC. 1º ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher LTDA, 1998.

COLE, R.B. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: fundamentals, instrumentation and application. 1º edition, New York: *John Wiley and Sons*, 1997.

COLORCON. Disponível em <<http://www.colorcon.com/>>. Acesso em Janeiro de 2009.

DASS, C. Fundamentals of Contemporary mass spectrometry. *John Wiley & Sons*. 610p, 2007.

EISSENS, A.C.; BOLHUIS, G.K.; HINRICHS, W.L.J.; FRIJLINK, H.W. Inulin as filler-binder for tablets prepared by direct compaction. *European Journal Pharmaceutical Science*. Amsterdam. v. 15, p.31-38, 2002.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ª EDIÇÃO. São Paulo: Editora Atheneu, 1988.

FERREIRA, A.O. Excipientes e adjuvantes farmacotécnicos. São Paulo, 2006. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/excipientes-e-adjuvantes-doc-a31444.html>>. Acesso em Setembro de 2010.

FERRERO, C; MUNOZ, N; VELASCO, M.V; MUNOZ-RUIZ, A; JIMENEZ-CASTELLANOS, R. Disintegrating efficiency of croscarmellose sodium In a direct compression formulation. *International Journal of Pharmaceutics*. Amsterdam, v. 147, p. 11-21, 1997.

GIBALDI, M. Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics. 4^o edition Philadelphia: Lea & Febiger, 406p, 1991.

GRAY, V.A. Current practices in dissolution testing. Promovido por Hanson e flowsciences, São Paulo, 2008.

HOWLAND, R.; MYCEK, M. Farmacologia Ilustrada. 3ª edição. Porto Alegre, p. 315-322, 2006.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). Stability testing of new drug substances and products, Q1A(R2), 2003. Disponível em: <<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>>. Acesso em Janeiro de 2009.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). Validation of Analytical procedures: Test and methodology, Q2(R1), 2005. Disponível em: <<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>>. Acesso em Janeiro de 2008.

JAIN, A; RAN, Y; YALKOWSKY, S. Effect of pH-Sodium Lauryl Sulfate Combination on Solubilization of PG-300995 (an Anti-HIV Agent): A Technical Note. *AAPS Pharmaceutical ScienceTechnology*. v.5, 2004.

JIVRAG, M.; MARTINI, L.G.; THOMSON, C.M. An overview of the different excipients for the direct compression of tablets. *Pharm. Sci. Technol. Today*. Oxford. v.3, p.58-63, 2000.

KIEKENS, F; DEBUNNE, A; VERVAET, C; BAERT, L; VANHOUTTE, F; ASSCHE, I.V; MENARD, F; REMON, J.P. Influence of the punch diameter and curvature on the yield pressure of MCC-compacts during Heckel analysis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v.22, p.117-126, 2004.

KJØNIKSEN, A; NYSTROM, B; LINDMAN, B. Dynamic light scattering on semidilute aqueous systems of ethyl (hydroxyethyl) cellulose. Effects of temperature, surfactant concentration, and salinity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v. 149, p.347-354, 1999.

KNORR, B; LARSON, P; NGUYEN, H.H; HOLLAND, S; REISS, T, F; CHERVINSKY, P; BLAKE, K; NOONAN, G; FREEMAN, A; HAESSEN, R; MICHIELS, N; ROGERS, J.D; AMIN, R.D; ZHAO, J; XU, X; SEIDENBERG, B. C; GERTZ, B.J; SPIELBERG, S. Montelukast dose selection in 6 to 14 years old: comparison of single-dose pharmacokinetics in children and adults. *Journal of Clinical Pharmacology*, v.38, n°8, p. 786-793, 1999.

LACHMAN,L; LIEBRMAN,H.A; KANIG, J.L. Teoria e Prática na indústria farmacêutica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 899p, 2001.

LANÇAS, F.M. Extração em fase sólida. 4^o Edição, v.01. São Carlos. Editora: Rima Editora, 96p, 2004.

LATE, S.G; YU, Y; BANGA, A.K. Effects of disintegration-promoting agent, lubricants and moisture treatment on optimized fast disintegrating tablets. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 365. p.4-11, 2009.

LAUTEN, R. A; NYSTROM, B. Time dependent association phenomena in dilute aqueous mixtures of a hydrophobically modified cellulose derivative and an anionic surfactant. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v. 219, p.45-53, 2003.

LEITE, Flávio. Validação em Análise Química. 4^a edição. São Paulo: Editora Átomo, 2002.

LUNER, P. E; BABU, S. R; MEHTA, S.C. Wettability of a hydrophobic drug by surfactant solutions. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 128, p. 29-44, 1996.

MAMEDE, L.C; CAETANO, B.L; ROCHA, L.A; FERREIRA, E.M; CESTARI, A; KFURI C.R; CIUFFI, K.J; CALEFI, P.S; MELLO, C; CUNHA, W.R; NASSAR, E.J. Comportamento térmico de alguns fármacos e medicamentos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. v. 27, n.2, p.151-155, 2006.

MARCOLONGO, R. Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica. São Paulo, 2003. Dissertação (Mestrado área de produção e controle farmacêuticos). Programa de pós-graduação em fármaco e medicamentos. Universidade de São Paulo.

MARTINELLO, T. Desenvolvimento de comprimidos de paracetamol de 500mg fabricados por compressão direta utilizando o planejamento estatístico de mistura. São Paulo, 2005. Dissertação (Mestrado área de produção e controle farmacêuticos). Programa de pós-graduação em fármaco e medicamentos. Universidade de São Paulo.

McMASTER, M.C. HPLC – A Practical User's Guide. John Wiley & Sons, 2003, 2^o Edition. 239p, 2007.

MITRA, S; BRUKH, R. Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry. *John Wiley & Sons*, 2003.

MONDOVEANUE, S.C.; DAVID, V. Sample preparation in chromatography. *Journal of Chromatography Library*, v.65, 2002.

MOTHÉ, C.G.; AZEVEDO, A.D. Análise Térmica de Materiais. iEditora. São Paulo, 300p, 2002.

MURA, P; MANDERIOLI, A; BRAMANTI, G; FURLANETTO, S; PINZAUTI, S. Utilization of differential scanning calorimetry as a screening technique to determine the compatibility of ketoprofen with excipients. *International Journal of Pharmaceutics*. v.119, p.71-79, 1995.

NUDELMAN, N.S. Estabilidad de Medicamentos. Buenos Aires: El Ateneu, 1975.

OCHIAI, H; UCHIYAMA, N; TAKANO, T; HARA, K; KAMEI, T. Determination of montelukast sodium in human plasma by column-switching high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, Amsterdam, v.713, n^o2, p. 409-414, 1998.

OMARI, M.M., ZOUBI, R.M., HASAN, E.I., KHADER, T.Z., BADWAN, A.A. Effect of light and heat on the stability of montelukast in solution and in its solid state. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v. 45, p. 465-471, 2007.

OKUMU, A.; DIMASO, M.; LOBENBERG, R. Dynamic Dissolution Testing to Establish *In Vitro/In Vivo* Correlations for Montelukast Sodium, a Poorly Soluble Drug. *Pharmaceutical Research*, v. 25, n^o12, p. 2778-2785, 2008.

PARK, S; CHOI, H. The effects of surfactants on the dissolution profiles of poorly water-soluble acidic drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. Amsterdam, v. 321, p. 35-41, 2006.

PIFFERI, G; SANTORO, P; PEDRANI, M. Review: Quality and functionality of excipients. *Il Farmaco*. v.54, p. 1-14, 1999.

PIFFERI, G; RESTANI, P. The safety of pharmaceutical excipients. *Il Farmaco*. v.58, p. 541-550, 2003.

PRISTA, L.N; AIVES, A.C.; MORGADO,R. Tecnologia farmacêutica. 5ª edição. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v.1, p. 199-478, 1995.

QIU, Z.; STOWELL, J.G.; MORRIS, K.R.; BYRN, S.R; PINAL,R. Kinetic study of the Maillard reaction between metoclopramide hydrochloride and lactose. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 303, p. 20-30, 2005.

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Quimica Nova*, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2000.

RADHAKRISHNA, T; NARASARAJU, A; RAMAKRISHNA, M; SATYANARAYANA, A. Simultaneous determination of montelukast and loratadine by HPLC and derivative spectrophotometric methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v. 31, p. 359-368, 2003.

RAFFA, R,; RAWLS, S.; BEYZAROV, E. P. Atlas de Farmacologia de Netter. Porto Alegre, p. 211-228, 2006.

ROMAN, J. Validação de Métodos analíticos e Estudo Preliminar de Estabilidade de Montelucaste Sódico em Comprimidos Revestidos. Porto Alegre, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Programa de pós-graduação em Ciências farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

RUELA, A. L. M; ARAÚJO, M. B; PEREIRA, G. M. Desenvolvimento e validação de um método analítico rápido por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de nimesulida em estudos de liberação *in vitro*. *Química Nova*. v.32, p.165-168, 2009.

SHANGRAW, R.F. In: Pharmaceutical dosage forms: tablets. New York. Marcell Dekker. v 1, p, 195-246, 1989.

SHARGEL, L; YU, A.B.C; PONG, S.W. Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics. 5^o edition. New York. Appleton & Lange Reviews, MacGraw-Hill, 892p, 2005.

SHETH, B. B.; BANDELIN, F.J.; SHANGRAW, R.F. In: Pharmaceutical Dosage Forms: tablets. New York: Marcel Dekker. v 1, p.109 – 185, 1980.

SILVA, R.L; VOLPATO, N.M. Meios para dissolução de comprimidos de nimesulida: ação dos tensoativos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v.38, p.163-172, 2002.

SINGULAIR®, MONTELUKAST SODIUM. Merck & Co., Inc, Whitehouse Station, NJ, 2005.

SKOOG, D.A; HOLLER F. J.; NIEMAN T.A. Princípios de Análise Instrumental. 5ª edição. Porto Alegre. Editora Bookman, 836p, 2002.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER F. J.; CROUCH, S.R., Fundamentals of Analytical Chemistry. Brooks/Cole, Thomson Learning, 8^oedition, 1179p, 2004.

SOARES, L.A.L; PETROVICK, P.R. Física da compressão. *Caderno de Farmácia*, v. 15, n. 2, p. 65-79, 1999.

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 Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo*, v.35, n 1, jan/jun, p 1- 16, 1999.

SWARTZ, M. E., KRULL, I. S. *Analytical Method Development and Validation*. New York, 1997.

THE BRITISH PHARMACOPOEIA – BP 2010. London. The Stationery Office.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION-USP 33. National Publishing, Philadelphia, PA.

THIBERT, R; MACH, H; CLAS, S.D; MEISNER, D.R; VADAS, E.B. Characterization of the self-association properties of a leukotriene D4 receptor antagonist, MK-0476. *International Journal of Pharmaceutics*. Amsterdam, v. 134, p. 59-70, 1996.

U.S.FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Disponível em <<http://www.fda.gov/>>. Acesso em Janeiro de 2009;

VIRCHOW, J.C., BACHERT, C. Efficacy and safety of montelukast in adults with asthma and allergic rhinitis. *Respiratory Medicine*. v. 100, p. 1952-1959, 2006.

WANCZINSKI, B.J; FELIPE, D.F; CARDOSO, M.L.C; CAVALCANTI, O.A. Desenvolvimento de comprimidos de AAS 500mg: influência do amido 1500[®] na compressão direta. *Acta Scientiarum*. v.24, p.649-655, 2002.