

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMILA MACHADO BRÊTAS

**AVALIAÇÃO DE POTENCIAL BIOISENÇÃO DE NAPROXENO SÓDICO E
SUCCINATO DE SUMATRIPTANO EM COMPRIMIDOS ISOLADOS E EM DOSE
FIXA COMBINADA**

Belo Horizonte – MG

2018

CAMILA MACHADO BRÊTAS

**AVALIAÇÃO DE POTENCIAL BIOISENÇÃO DE NAPROXENO SÓDICO E
SUCCINATO DE SUMATRIPTANO EM COMPRIMIDOS ISOLADOS E EM DOSE
FIXA COMBINADA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti

Coorientadora: Profa. Dra. Isabela da Costa César

Coorientador: Prof. Dr. José Eduardo Gonçalves

Belo Horizonte – MG

2018

AGRADECIMENTOS

Ao longo do projeto pude contar com muitos colegas, amigos e familiares. O suporte veio de forma direta na execução, fornecimento ou programação de análises. Ou indireta, com boas conversas, alívio nos momentos mais complicados ou apenas companhia. Todos marcaram de alguma forma esse período tão importante em minha vida. Por isso agradeço sinceramente:

A Deus por mais uma vez permitir meu crescimento pessoal e profissional, sempre me guiando nas pequenas e grandes conquistas.

Ao Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti, pela confiança, amizade, ensinamentos e parceria. Mais uma vez me orgulho em ser orientada por um dos maiores nomes brasileiros da nossa profissão, com quem aprendo constantemente o enorme valor de ser uma farmacêutica.

À Profa. Dra. Isabela da Costa César, pela idealização do projeto e imensurável disponibilidade nas dúvidas e programações do projeto. Pela amizade e doçura, ao longo desse período. Sempre com prazer compartilha ensinamentos e divide experiências.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Gonçalves, pelas constantes contribuições na etapa mais complicada do projeto, indicando novo rumo e abrindo portas para melhoria do estudo. Sua co-orientação dedicada e companheira me proporcionou um enorme crescimento pessoal e profissional.

À Profa. Dra. Cristina Duarte Vianna Soares pelo carinho e disponibilidade em ajudar nos meus projetos profissionais, e na dedicação ao cuidado e crescimento do Laboratório de Controle de Qualidade. Ao Prof. Dr. Christian Fernandes, pelo compartilhamento de conhecimentos e convívio diário.

Prof. Dr. Ricardo José Alves por seus carinhosos e enormes ensinamentos. Exemplo de professor, dedicação e amor pela profissão. Obrigada pela imensa disponibilidade e ajuda no processo de síntese.

A amiga e Prof. Dr. Luci Dusse, por todo carinho e disponibilidade em ajudar na aquisição dos medicamentos para o estudo. Me acompanha desde o ensino médio, sempre torcendo pelo meu sucesso e comemorando minhas conquistas.

Ao Prof. Dr. André Faraco pelas as colaborações na execução de testes e fornecimento de matérias-primas.

A Prof. Dr. Gisele Goulart, pela imensa disponibilidade em ajudar nas avaliações estatísticas, por todas explicações e conselhos. A Paula Cheline e Rangel Dutra por também contribuírem nas avaliações estatísticas.

A indústria Libbs e Copermed Comercial Importadora pela doação das matérias-primas de succinato de sumatriptano e naproxeno sódico, respectivamente.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo e ao programa de Pós-Graduação, pela oportunidade.

A todos os amigos do Laboratório de Controle de Qualidade e CEDAFAR. Em especial: Ao Luciano e Léo pela aquisição de materiais e execução de análises, respectivamente. À Naialy por compartilhar muito mais que experiências e ajudas profissionais, compartilhar uma das vivências mais importantes de nossas vidas. À Juliana Veloso, Bárbara, Iara, Ingrid e Talita por dividir as angústias e alegrias a cada resultado e fazer com que os momentos de trabalho se tornassem mais leves e divertidos. A Ana Carolina pela compreensão e ajuda na reta final dos estudos. A Grazi, Matheus, Pedro Reis, Diego, Pedro Franco, Derick, Sara, Vanessa, Edilene, Desiele, Luis e Vinícius pelas trocas de conhecimento e conversas que tanto engrandeceram esse período.

Ao Bernardo que tanto contribuiu para a execução do projeto e com quem pude aprender e crescer como coorientadora.

A Letícia por todo o cuidado nos cultivos celulares, tornando possível a execução dos estudos de permeabilidade em tempo hábil.

À Juliana, minha irmã, companheira e amiga, que ao longo de todo esse período dividiu minhas angústias, me deu conselhos, dividiu seus conhecimentos e me deu força. Sempre será minha “coorientadora” pessoal e profissional.

Aos meus amados pais, Tânia e Otto, por toda dedicação, amor e compreensão, abrindo mão tantas vezes de seus planos para sonhar os meus e me dar base para mais essa conquista. Pelas caronas infinitas, pelas preocupações, por entenderem minha ausência, ansiedade e nervosismo, pelos cuidados e carinhos sem fim. Vocês são a inspiração das minhas vitórias.

Ao Paulinho, meu amigo, companheiro, grande amor e agora esposo, por toda confiança, carinho, cuidado e compreensão na minha ausência. Sempre me apoiando, acalmando minhas ansiedades e preocupações, tornando as coisas mais leves e especiais. Ajudando direta e indiretamente na construção desse projeto.

Ao meu cunhado Daniel, por estar sempre na torcida por meu sucesso, por todas as caronas e alto astral que tanto contribuíram no dia a dia.

A todos os amigos e familiares, pelo carinho, torcida e apoio ao longo da minha carreira.

“Já se desejarmos fortemente o melhor e, principalmente, lutarmos pelo melhor...o melhor vai se instalar em nossa vida...Porque sou do tamanho daquilo que vejo, e não do tamanho da minha altura.”

(Carlos Drummond de Andrade)

RESUMO

A isenção de estudos farmacocinéticos (Bioisenção) vem sendo amplamente discutida pelas agências regulatórias mundiais, possibilitando menor custo no lançamento de medicamentos genéricos e similares. A bioisenção baseada no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) vem se destacando, seguida da correlação *in vitro in vivo* (CIVIV). O SCB é baseado na solubilidade e permeabilidade dos fármacos, sendo divididos em quatro classes. A associação de naproxeno sódico (NAP), um anti-inflamatório não esteroide, e succinato de sumatriptano (SUM), um agonista seletivo do receptor 5-hidroxitriptamina-1, é usada para o tratamento de crises de enxaqueca. NAP é um fármaco ácido de classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade) e SUM, fármaco básico de classe III (alta solubilidade e baixa permeabilidade). Estudos de solubilidade, perfis de dissolução e permeabilidade celular foram realizados (com os fármacos isolados e associados), com o intuito de discutir a bioisenção para esses ativos. SUM apresentou alta solubilidade nos meios tamponados com pH 1,2; 4,5; 6,8 e 7,5, dissolução acima de 85% em 15 minutos (muito rápida) e a permeabilidade foi intermediária. Com essas características, segundo a maioria das legislações mundiais vigentes, SUM pode ser considerado um forte candidato à bioisenção. Os ensaios com NAP resultaram em baixa solubilidade nos meios com pH 1,2 e 4,5, mas alta solubilidade nos meios com pH na faixa intestinal, 6,8 e 7,5, sugerindo boa biodisponibilidade nessa região. A dissolução dos medicamentos contendo NAP foi rápida, ou seja, acima de 85% em 30 minutos e os estudos de permeabilidade confirmaram a alta capacidade de ser absorvido desse fármaco. Segundo algumas referências, NAP poderia ser um candidato à bioisenção, já que na principal região absorptiva do trato gastrointestinal, esse fármaco se encontra completamente dissolvido, podendo ser altamente absorvido, como comprova os estudos farmacocinéticos. NAP pode ainda ser bioisento pela CIVIV, demonstrando bons resultados preliminares. Desse modo, com os estudos pode-se concluir que para as formulações presentes no mercado (contendo excipientes não interferentes) NAP e SUM podem ser fortes candidatos à bioisenção.

Palavras-chave: Bioisenção. Sistema de Classificação Biofarmacêutica. CIVIV. Enxaqueca. Naproxeno sódico. Succinato de sumatriptano.

ABSTRACT

The exemption of pharmacokinetic studies (Biowaiver) has been widely discussed by regulatory agencies worldwide, allowing lower costs in launching generic and similar medications. The biowaiver based on Biopharmaceutics Classification System (BCS) has been highlighting, followed by *in vitro in vivo* correlation (IVIVC). BCS is based on the solubility and permeability of the drugs and it is divided into four classes. The association of naproxen sodium (NAP) – a non-steroidal anti-inflammatory – and sumatriptan succinate (SUM) – a selective 5-hydroxytryptamine-1 receptor agonist – is used for the treatment of migraine attacks. NAP is a class II acidic drug (low solubility and high permeability) and SUM is a class III basic drug (high solubility and low permeability). Studies of solubility, dissolution profiles and cellular permeability were performed (with the isolated and associated drugs) in order to discuss the biowaiver for these drugs. SUM showed high solubility in buffer media with pH 1.2; 4.5; 6.8 and 7.5; dissolution above 85% in 15 minutes (very rapid) and intermediate permeability. Therefore, according to the most current international legislations, SUM may be considered a strong candidate for biowaiver. NAP assays resulted in low solubility in media with pH of 1.2 and 4.5; but high solubility in media with pH at intestinal range (6.8 and 7.5), which suggests good bioavailability in this region. The dissolution of drug products containing NAP was rapid (above 85% in 30 minutes) and the permeability studies confirmed the high absorptive capacity for this drug. NAP could be a biowaiver candidate since it is completely dissolved in the major absorptive region of the gastrointestinal tract, and may be highly absorbed, as evidenced by the pharmacokinetic studies. NAP may also be a candidate for biowaiver by IVIVC, demonstrating good preliminary results. Therefore, with the results of this study, it can be concluded that for the formulations present in the market (with inactive excipients) NAP and SUM may be strong candidates for biowaiver.

Key words: Biowaiver. Biopharmaceutical Classification System. CIVIV. Migraine. Naproxen sodium. Sumatriptan succinate

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Classes do Sistema de Classificação Biofarmacêutica.....	32
Figura 2 - Esquema do cultivo de células Caco-2 em suportes para estudos de permeabilidade.....	38
Figura 3 - Método de dissolução usando cestas.....	42
Figura 4 - Método de dissolução usando pás.....	42
Figura 5 - Estrutura química de naproxeno.....	53
Figura 6 - Estrutura química de sumatriptano.....	56
Figura 7 - Demonstração da superfície apical e basolateral em poços de placas Transwell®.....	94
Figura 8 - Cromatograma obtido em corrida cromatográfica contendo NAP e SUM em associação usando coluna C18.....	98
Figura 9 - Prevalência de forma molecular de naproxeno em diferentes valores de pH...	99
Figura 10 - Prevalência de forma molecular de sumatriptano em diferentes valores de pH.....	89
Figura 11 - Prevalência de forma molecular de succinato em diferentes valores de pH...	99
Figura 12 - Cromatograma obtido em corrida cromatográfica realizada com gradiente exploratório.....	100
Figura 13 - Varredura espectral de SUM.....	101
Figura 14 - Varredura espectral de NAP.....	101
Figura 15 - Cromatograma obtido com o método analítico desenvolvido para quantificação de NAP e SUM.....	102
Figura 16 - Espectro cromatográfico 3D obtido com o método analítico desenvolvido para quantificação de NAP e SUM.....	103
Figura 17 - Cromatograma obtido com o método bioanalítico desenvolvido para quantificação de NAP e SUM.....	103
Figura 18 - Espectro cromatográfico 3D obtido com o método bioanalítico desenvolvido para quantificação de NAP e SUM.....	104
Figura 19 - Cromatogramas sobrepostos referente às corridas do branco (linha azul claro) da solução contendo peróxido de hidrogênio e amostra (linha azul escuro) degradada após ser submetida a essa solução.....	106

/continua.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES (continuação)

Figura 20 - Cromatogramas sobrepostos referente às corridas dos diluentes: fase móvel e HBSS.....	107
Figura 21 - Cromatogramas sobrepostos referente às corridas do branco das soluções usadas como meios de dissolução.....	107
Figura 22 - Cromatogramas sobrepostos referente às corridas das soluções placebo....	108
Figura 23 - Cromatogramas sobrepostos referente às corridas da solução amostra e padrão.....	108
Figura 24 - Curva resposta versus concentração e gráfico de resíduos para método analítico de quantificação de NAP em estudos de estudos de permeabilidade celular.....	110
Figura 25 - Gráficos de linearidade e resíduos para método analítico de quantificação de SUM em estudos de permeabilidade celular.....	111
Figura 26 - Curva de concentração versus resposta e gráfico de resíduos para método analítico de quantificação de NAP em estudos de estudos de solubilidade, doseamento e dissolução.....	113
Figura 27 - Curva de concentração versus resposta e gráfico de resíduos para método analítico de quantificação de SUM em estudos de estudos de solubilidade, doseamento e dissolução.....	114
Figura 28 - Curva de concentração versus resposta e gráfico de resíduos para método analítico de quantificação de NAP em estudos de doseamento e solubilidade na faixa de 7,5 a 14,5 µg/mL.....	115
Figura 29 - Espectros de NAP IFA (linha preta) e SQR (linha azul)	125
Figura 30 - Espectros de SUM IFA (linha preta) e SQR (linha azul)	126
Figura 31 - Perfis de dissoluções obtidos para SUM em comprimidos de SUMAXPRO® 85-500 mg.....	134
Figura 32 - Perfis de dissoluções obtidos para NAP em comprimidos de SUMAXPRO® 85-500 mg.....	135
Figura 33 - Perfis de dissoluções obtidos para NAP em comprimidos de FLANAX® 275 mg.....	135
Figura 34 - Perfis de dissoluções obtidos para NAP em comprimidos de SUMAXPRO® (S), FLANAX® (F) e NAP (NAP) em meio pH 6,8 e 7,5.....	138

/continua.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES (conclusão)

Figura 35 - Perfis de dissoluções obtidos para NAP em comprimidos de SUMAXPRO® (S), FLANAX® (F) e NAP (NAP) em meio pH 6,8 e pá a 50 rpm.....	138
Figura 36 - Perfis de dissoluções obtidos para NAP em comprimidos de SUMAXPRO® (S) e FLANAX® (F) em os meios 4,5 e 1,2.....	139
Figura 37 - Perfis de dissoluções obtidos para SUM em comprimidos de SUMAXPRO® (S) e IMIGRAN® (I) em meio pH 6,8 e 7,5.....	140
Figura 38 - Perfis de dissoluções obtidos para SUM em comprimidos de SUMAXPRO® (S) e IMIGRAN® (I) em meio pH 6,8 e pá a 50 rpm.....	140
Figura 39 - Perfis de dissoluções obtidos para NAP em comprimidos de SUMAXPRO® (S) e IMIGRAN® (I) em meio pH 1,2 e 4,5.....	140
Figura 40 - Perfis de dissoluções obtidos para NAP em comprimidos de SUMAXPRO® 50-500 mg com e sem desaeração do meio 6,8.....	143
Figura 41 - Perfis de dissoluções obtidos para SUM em comprimidos de SUMAXPRO® 50-500 mg com e sem desaeração do meio 6,8.....	143
Figura 42 - Curva de concentração plasmática de SUM ao longo do tempo obtida em estudo farmacocinético BRÊTAS, 2016.....	144
Figura 43 - Curva de concentração plasmática de NAP ao longo do tempo obtida em estudo farmacocinético de BRÊTAS, 2016.....	145
Figura 44 - Fração absorvida de NAP ao longo do tempo obtida a partir de dados do estudo farmacocinético de BRÊTAS, 2016.....	146
Figura 45 - Curva de fração absorvida por fração dissolvida obtida por estudos de dissolução e farmacocinético com FLANAX® 275mg.....	147
Figura 46 - Concentração de SUM permeada ao longo do tempo durante estudo de permeabilidade de SUM isolado e associado.....	148
Figura 47 - Concentração de NAP permeada ao longo do tempo durante estudo de permeabilidade de NAP isolado e associado.....	148

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classes do Sistema de Classificação Biofarmacêutica e características.....	33
Tabela 2 - Aspectos gerais exigidos para bioisenção baseada no SCB por diferentes agências regulatórias no mundo (S=Sim / N=Não)	47
Tabela 3 - Requisitos exigidos por diferentes agências regulatórias no mundo para bioisenção baseada no SCB.....	48
Tabela 4 - Dados farmacocinéticos obtidos após administração simultânea de SUM e NAP.....	59
Tabela 5 - Condições cromatográficas de métodos descritos na literatura para quantificação de NAP e/ou SUM por CLAE.....	61
Tabela 6 - Condições testadas durante o desenvolvimento do método analítico.....	67
Tabela 7 - Preparo e composição das soluções injetadas na avaliação da seletividade do método.....	70
Tabela 8 - Composição provável de formulação para comprimidos de IMIGRAN® 50 mg.....	71
Tabela 9 - Composição provável de formulação para comprimidos de FLANAX® 275 mg.....	71
Tabela 10 - Composição provável de formulação para comprimidos de SUMAXPRO® 50-500 mg.....	72
Tabela 11 - Preparo das soluções de contendo NAP e SUM para avaliação da linearidade do método analítico empregado em estudos de solubilidade, doseamento e dissolução.....	73
Tabela 12 - Preparo das soluções de contendo NAP e SUM para avaliação da linearidade do método analítico empregado em estudo de permeabilidade celular.....	75
Tabela 13 - Preparo das soluções de contendo NAP e SUM para avaliação da precisão do método analítico empregado em estudo de permeabilidade celular.....	76
Tabela 14 - Preparo das soluções de contendo NAP e SUM para avaliação da exatidão do método analítico empregado em estudo de permeabilidade celular.....	77
Tabela 15 - Preparo das soluções de contendo NAP e SUM para avaliação da exatidão do método analítico empregado em estudos de doseamento, dissolução e solubilidade.....	78

/continua.

LISTA DE TABELAS (continuação)

Tabela 16 - Parâmetros e variações para avaliação da robustez de método cromatográfico para quantificação de NAP e SUM.....	81
Tabela 17 - Matriz de combinação fatorial os parâmetros analíticos para avaliação da robustez pelo teste de Youden.....	81
Tabela 18 - Preparo de soluções para doseamento dos medicamentos.....	84
Tabela 19 - Preparo dos meios utilizados no estudo de solubilidade em equilíbrio dos IFAs NAP e SUM.....	85
Tabela 20 - Dados gerais do estudo de solubilidade.....	87
Tabela 21 - Preparo de soluções padrão para o estudo de solubilidade.....	87
Tabela 22 - Preparo de soluções padrão para estudos de perfil de dissolução.....	90
Tabela 23 - Condições de preparo do teste de recuperação.....	91
Tabela 24 - Resultados dos parâmetros cromatográficos obtidos com o método analítico e bioanalítico desenvolvido para quantificação de NAP e SUM.....	104
Tabela 25 - Resultados da avaliação da linearidade de método analítico para quantificação de NAP e SUM em estudo de permeabilidade celular.....	109
Tabela 26 - Resultados da avaliação da linearidade de método analítico para quantificação de NAP e SUM em estudos de doseamento, dissolução e solubilidade.....	113
Tabela 27 - Resultados da avaliação da linearidade de método analítico para quantificação de NAP em estudos de doseamento e solubilidade na faixa de 7,5 a 14,5 µg/mL.....	115
Tabela 28 - Resultados para avaliação da precisão do método para quantificação de NAP e SUM empregado em estudos de permeabilidade celular.....	116
Tabela 29 - Resultados para avaliação da precisão do método para quantificação de NAP e SUM empregado em estudos de solubilidade, doseamento e dissolução.....	117
Tabela 30 - Resultados para avaliação da precisão do método para quantificação de NAP usando a equação da reta obtida com análise estatística por MMQO.....	117
Tabela 31 - Resultados para avaliação da exatidão do método para quantificação de NAP e SUM empregado em estudos de permeabilidade celular.....	118
Tabela 32 - Resultados para avaliação da exatidão do método para quantificação de NAP e SUM empregado em estudos de solubilidade, doseamento e dissolução.....	119

/continua.

LISTA DE TABELAS (continuação)

Tabela 33 - Resultados para avaliação da exatidão do método para quantificação de NAP usando a equação da reta obtida com análise estatística por MMQO.....	119
Tabela 34 - Resultados para avaliação da estabilidade do métodos analítico e bioanalítico para quantificação simultânea de NAP e SUM.....	120
Tabela 35 - Resultados para avaliação dos limites de detecção e quantificação para método analítico e bioanalítico.....	121
Tabela 36 - Resultados obtidos nos testes de variação combinada de parâmetros para avaliação da robustez de método cromatográfico para quantificação de NAP.....	121
Tabela 37 - Resultados obtidos nos testes de variação combinada de parâmetros para avaliação da robustez de método cromatográfico para quantificação de SUM.....	122
Tabela 38 - Resultados das amostras de avaliação do efeito da variação superior e inferior em cada parâmetro testado na robustez de método cromatográfico para quantificação de NAP.....	123
Tabela 39 - Resultados das amostras de avaliação do efeito da variação superior e inferior em cada parâmetro testado na robustez de método cromatográfico para quantificação de SUM.....	123
Tabela 40 - Resultados para a determinação de peso médio dos comprimidos.....	127
Tabela 41 - Resultados para o teste de doseamento dos medicamentos.....	127
Tabela 42 - Resultados de solubilidade quantitativa após 6, 24 e 30 horas em cada um dos meios utilizados no estudo de solubilidade em equilíbrio dos IFAs NAP e SUM.....	129
Tabela 43 - Resultados do teor de fármaco obtido nas soluções após 6, 24 e 30 horas em cada um dos meios utilizados no estudo de solubilidade em equilíbrio dos IFAs NAP e SUM.....	130
Tabela 44 - Resultados da média das razões dose máxima comercial/solubilidade obtidos após 30 horas de estudo em cada um dos meios utilizados no estudo de solubilidade dos IFAs NAP e SUM.....	131
Tabela 45 - Valores médios de pH medidos nas amostras no início e no fim do estudo de solubilidade em equilíbrio para NAP e SUM.....	132
Tabela 46 - Média das porcentagens dissolvidas de NAP em cada tempo de coleta nos diferentes estudos de perfis de dissolução realizados.....	137
Tabela 47 - Média das porcentagens dissolvidas de SUM em cada tempo de coleta nos diferentes estudos de perfis de dissolução realizados.....	139

/continua.

LISTA DE TABELAS (conclusão)

Tabela 48 - Desvio padrão relativo (DPR) obtido entre as seis cubas analisadas nos tempos de coleta de 30 e 60.....	141
Tabela 49 - Erro padrão relativo (EPR%) obtido no teste de exatidão do método de dissolução.....	142
Tabela 50 - Média das porcentagens dissolvidas de NAP e SUM em cada tempo de coleta nos perfis de dissolução realizados com e sem desaeração do meio.....	143
Tabela 51 - Parâmetros farmacocinéticos relacionados a NAP.....	145
Tabela 52 - Concentração plasmática e fração absorvida de NAP ao longo do tempo.....	146
Tabela 53 - Concentrações de NAP e SUM nas soluções obtidas nos compartimentos receptores após diferentes tempos de estudo e os respectivos valores de permeabilidade.....	149

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a	Coeficiente linear
μg	Micrograma
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
3D	Três dimensões
5-HT	5-hidroxitriptamina
AINE	Anti-inflamatório não esteroide
An	Número de absorção
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
$ASC_{0-\infty}$	Área sob a curva do tempo zero ao infinito (extrapolada)
ASC_{0-t}	Área sob a curva do tempo zero ao último tempo de coleta quantificado
ATCC	<i>American type culture collection</i>
b	Coeficiente angular
BD	Biodisponibilidade
BE	Bioequivalência
C_{18}	Sílica ligada a grupos octadecilsilano
cel/cm^2	Células / centímetro quadrado
CIVIV	Correlação <i>in vitro in vivo</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos
CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência
cm	Centímetro
cm^2	Centímetro quadrado
cm^3	Centímetro cubico
C_{max}	Concentração plasmática máxima
COX	Ciclo-oxigenases
CR	Celulose regenerada
CV	Coeficiente de variação
D/S	Dose / solubilidade
DAD	Detector de arranjo de diodos

/continua.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (continuação)

DMEM	Dulbecco modified eagle médium
D _n	Número de dissolução
D _o	Número da dose
DPR	Desvio padrão relativo
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EPR	Erro padrão relativo
F _a	Fração absorvida
F _d	Fração dissolvida
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FIP	Federação Farmacêutica Internacional
FM	Fase móvel
HBSS	Solução tampão hanks
HCl	Ácido clorídrico
IFA	Insumos farmacêuticos ativos
IMAO	Inibidores da monoaminoxidase
I _{mc}	Índice de massa corpórea
LD	Limites de detecção
log P _{octanol/água}	Coeficiente de partição
LQ	Quantificação
M	Molaridade
m/z	Massa/carga
MAO-A	Monoamina oxidases tipo a
mg	Miligrama
Min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MMQG	Método dos mínimos quadrados generalizados
MMQO	Método dos mínimos quadrados ordinários
MS	Espectrometria de massas
N	Número de pratos teóricos
NAP	Naproxeno sódico

/continua.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (conclusão)

ng	Nanograma
ng/mL	Nanograma por mililitro
nm	Nanômetro
°C	Grau <i>celsius</i>
PAMPA	Parallel artificial membrane permeability
P_{app}	Permeabilidade aparente
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Logaritimo da constante de acidez
r	Coeficiente de correlação
r ²	Coeficiente de determinação
RDC	Resolução da diretoria colegiada
rpm	Rotação por minuto
SCB	Sistema de classificação biofarmacêutica
SIG	Grupo de interesse especial
SQR	Substância química de referência
SUM	Succinato de sumatriptano
T _{abs}	Tempo médio de absorção
T _{diss}	Tempo médio de dissolução
TR	Tempo de retenção
T _{res}	Tempo médio de residência do fármaco no organismo
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visível
v/v	Volume por volume
WHO	<i>World Health Organization</i>
Ω	Ômega

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	24
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1 Bioisenções	27
2.1.1 <u>Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB)</u>	30
2.1.1.1 <i>Estudos de solubilidade</i>	34
2.1.3.2 <i>Estudos de permeabilidade</i>	36
2.1.2 <u>Dissolução</u>	40
2.1.3 <u>Guias e legislações sobre bioisenções baseadas no SCB no Brasil e no mundo</u>	45
2.2 Enxaqueca: causa, sintomas, profilaxia e tratamentos.....	51
2.2.1 <u>Naproxeno sódico</u>	53
2.2.2 <u>Succinato de sumatriptano</u>	55
2.2.3 <u>Associação de succinato de sumatriptano e naproxeno sódico</u>	58
2.2.4 <u>Métodos analíticos e bioanalíticos para quantificação simultânea de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano</u>	59
3 OBJETIVOS.....	62
3.1 Objetivo geral.....	62
3.2 Objetivos específicos.....	62
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	63
4.1 Materiais.....	63
4.1.1 <u>Substâncias químicas de referência (SQR)</u>	63
4.1.2 <u>Medicamentos</u>	63
4.1.3 <u>Insumos Farmacêuticos ativos</u>	63
4.1.4 <u>Solventes, reagentes e excipientes</u>	64

/continua.

SUMÁRIO (continuação)

<u>4.1.5 Reagentes, materiais e equipamentos usados exclusivamente no cultivo celular e no estudo de permeabilidade</u>	64
<u>4.1.6 Acessórios e vidrarias</u>	65
<u>4.1.7 Equipamentos</u>	66
4.2 Métodos	67
<u>4.2.1 Desenvolvimento de método analítico para quantificação simultânea de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano por CLAE-DAD</u>	67
<u>4.2.2 Validações de métodos analítico e bioanalítico para quantificação simultânea de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano por CLAE-DAD</u>	68
<u>4.2.2.1 Seletividade</u>	69
<u>4.2.2.2 Linearidade</u>	72
4.2.2.2.1 Linearidade do método para estudos de solubilidade, doseamento e dissolução.....	73
4.2.2.2.2 Linearidade do método para estudos de permeabilidade in vitro.....	74
<u>4.2.2.3 Precisão</u>	75
<u>4.2.2.4 Exatidão</u>	77
<u>4.2.2.5 Faixa de trabalho</u>	78
<u>4.2.2.6 Estabilidade</u>	79
<u>4.2.2.7 Limites de detecção e quantificação</u>	79
<u>4.2.2.8 Robustez</u>	80
<u>4.2.3 Doseamento e identificação por IV dos insumos farmacêuticos ativos naproxeno sódico e succinato de sumatriptano</u>	82
<u>4.2.4 Avaliação do peso médio, teor, dureza e desintegração de comprimidos revestidos de naproxeno sódico e succinato isolados e em dose fixa combinada</u>	83

/continua.

SUMÁRIO (continuação)

<u>4.2.4.1 Determinação do peso médio dos comprimidos</u>	83
<u>4.2.4.2 Avaliação do teor dos comprimidos</u>	83
<u>4.2.4.3 Avaliação da dureza dos comprimidos</u>	84
<u>4.2.4.4 Avaliação da desintegração dos comprimidos</u>	85
<u>4.2.5 Estudo de solubilidade dos insumos farmacêuticos ativos naproxeno sódico e succinato de sumatriptano isolados e em associação</u>	85
<u>4.2.6 Estudos de dissolução em comprimidos revestidos de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano isolados e em dose fixa combinada</u>	88
<u>4.2.6.1 Estudos de perfil de dissolução com comprimidos contendo NAP e SUM</u>	88
<u>4.2.6.2 Validação do estudo de dissolução desenvolvido para NAP e SUM</u>	90
<u>4.2.6.3 Proposta de estudo de Correlação In Vitro In Vivo</u>	92
<u>4.2.7 Estudo de permeabilidade celular de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano, isolados e em associação, usando células da linhagem CaCo-2</u>	93
<u>4.2.7.1 Cultivo e avaliação da integridade de membranas de células da linhagem Caco-2</u>	93
<u>4.2.7.2 Execução do estudo de permeabilidade Caco-2</u>	95
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
5.1 Desenvolvimento de método analítico para quantificação simultânea de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano por CLAE-DAD	97

/continua.

SUMÁRIO (continuação)

5.2 Validações de métodos analítico e bioanalítico para quantificação simultânea de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano em estudos de solubilidade, dissolução, doseamento e permeabilidade celular por CLAE-DAD.....	105
5.2.1 <u>Seletividade</u>.....	105
5.2.2 <u>Linearidade</u>.....	109
5.2.2.1 <u>Linearidade do método para estudos de permeabilidade celular.....</u>	109
5.2.2.2 <u>Linearidade do método para estudos de solubilidade, doseamento e dissolução</u>.....	111
5.2.3 <u>Precisão</u>.....	116
5.2.4 <u>Exatidão</u>.....	118
5.2.5 <u>Faixa de trabalho</u>.....	119
5.2.6 <u>Estabilidade</u>.....	120
5.2.7 <u>Limite de detecção e quantificação</u>.....	120
5.2.8 <u>Robustez</u>.....	121
5.3 Doseamento e identificação por IV dos insumos farmacêuticos ativos naproxeno sódico e succinato de sumatriptano.....	125
5.4 Avaliação do peso médio, teor, dureza e desintegração de comprimidos revestidos de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano isolados e em dose fixa combinada.....	126
5.4.1 <u>Determinação do peso médio dos comprimidos</u>.....	127
5.4.2 <u>Avaliação do teor dos comprimidos</u>.....	127
5.4.3 <u>Avaliação da dureza dos comprimidos</u>.....	128
5.4.4 <u>Avaliação da desintegração dos comprimidos</u>.....	128
5.5 Estudo de solubilidade dos insumos farmacêuticos ativos naproxeno sódico e succinato de sumatriptano isolados e em associação.....	128

/continua.

SUMÁRIO (conclusão)

5.6 Estudos de dissolução em comprimidos revestidos de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano isolados e em dose fixa combinada.....	133
5.6.1 <u>Estudos de perfil de dissolução com comprimidos contendo NAP e SUM</u>	133
5.6.2 <u>Validação do estudo de dissolução desenvolvido para NAP e SUM</u>	141
5.6.3 <u>Proposta de estudo de Correlação In Vitro In Vivo</u>	144
5.7 Estudo de permeabilidade celular com células CaCo-2.....	148
5.8 Discussão geral.....	150
6 CONCLUSÕES.....	154
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	155
ANEXO A – Certificado de Análise do Insumo Farmacêutico Ativo Succinato de Sumatriptano.....	165
ANEXO B – Certificado de Análise do Insumo Farmacêutico Ativo Naproxeno Sódico.....	166
ANEXO C – Certificado de apresentação de trabalho no II Simpósio em Ciências Farmacêuticas – SIMCIFAR 2016.....	167
APÊNDICE A – Resumo enviado ao II Simpósio em Ciências Farmacêuticas – SIMCIFAR 2016.....	168
APÊNDICE B – Síntese de naproxeno sódico.....	169

1 INTRODUÇÃO

Os medicamentos genéricos ou similares são fundamentais para manutenção da competitividade entre indústrias proporcionando ao paciente maior diversidade de produtos a preços variáveis. Os novos medicamentos, genéricos e similares, devem ser considerados equivalentes farmacêuticos e bioequivalentes ao medicamento designado como referência. Esses estudos permitem a comprovação da eficácia e segurança desses medicamentos que poderão ser intercambiáveis com o referência (MIDHA; MCKAY, 2009; PIANETTI; CÉSAR, 2016).

O estudo de equivalência farmacêutica é realizado com o medicamento teste e o referência simultaneamente, envolvendo diversos testes *in vitro* que atestem a similaridade quanto aos aspectos de identidade, dosagem e forma farmacêutica. Para tanto, são realizados ensaios farmacopeicos físico-químicos, destacando-se entre esses, perfis de dissolução comparativos desses medicamentos (BRASIL, 2010). Já os estudos de biodisponibilidade relativa para comprovação da bioequivalência são realizados por meio da avaliação da quantidade e velocidade com que um fármaco e/ou seu metabólito se disponibilizam a partir da forma farmacêutica para um indivíduo. A determinação do fármaco em fluidos biológicos (sangue, soro, plasma ou urina) obtido de voluntários sadios, é realizada após administração do medicamento em estudo (BRASIL, 2002a).

A comprovação da bioequivalência por meio dos estudos de biodisponibilidade relativa tem sido alvo de grande discussão por parte das autoridades regulatórias e meio acadêmico no sentido de se buscar alternativas válidas para sua substituição. Os estudos de biodisponibilidade relativa podem ser considerados complexos, de alto custo de execução e envolvem a exposição de indivíduos saudáveis às condições do estudo, que, em algumas situações, requerem grande número de voluntários para avaliação, devido às altas variabilidades intra e interindividual (BRASIL, 2002a; MIDHA; MCKAY, 2009).

Desse modo, a chamada bioisenção, que corresponde à isenção ou substituição de estudos *in vivo* por testes *in vitro* adequados, surge como uma boa estratégia para

facilitar e reduzir os custos em lançamento de medicamentos genéricos e similares. A bioisenção pode ser obtida por meio de estudos de correlação *in vitro in vivo* (CIVIV), e por estudos baseados no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), desde que comprovada a possibilidade de substituição por testes de dissolução (*in vitro*) (EMAMI, 2006).

O SCB permite a classificação dos fármacos em quatro classes, de acordo com dados de permeabilidade e solubilidade em meios aquosos que mimetizam líquidos fisiológicos do trato gastrintestinal. Isso se deve à consideração de serem esses os dois fatores principais para a biodisponibilidade oral de uma substância (YU *et al.*, 2002). A alta solubilidade corresponde a maior dose administrada oralmente, como uma formulação de liberação imediata, solubilizada completamente em até 250 mL em soluções tampão com pH 1,2, 4,5 e 6,8 mantidas a 37 ± 1 °C (DAHAN *et al.*, 2010; YAZDANIAN *et al.*, 2004). Já para um fármaco ser considerado de alta permeabilidade, deve possuir uma extensão de absorção igual ou superior a 85% (BRASIL, 2011; EMA, 2010; FDA, 2017; WHO, 2017). A classe I abrange fármacos de alta permeabilidade e solubilidade, a II alta permeabilidade e baixa solubilidade, a III baixa permeabilidade e alta solubilidade, e por fim a classe IV baixa permeabilidade e solubilidade (AMIDON *et al.*, 1995; EMAMI, 2006).

As principais agências regulatórias do mundo recomendam que fármacos de classe I e de classe III podem ser candidatos a bioisenção, devendo para tal serem de dissolução rápida (para classe I) e dissolução muito rápida (para classe III) o que significa que 85% do fármaco estão dissolvidos no tempo de 30 e 15 minutos, respectivamente (BRASIL, 2011; EMA, 2010; FDA, 2017; WHO, 2017). A bioisenção de fármacos pertencentes a classe II, já foi recomendada pela Organização Mundial de Saúde e vem sendo discutida no meio científico (WHO, 2006; YAZDANIAN *et al.*, 2004). No Brasil, embora sejam aceitas isenções apenas para fármacos de classe I, já vem sendo discutida a possibilidade de inclusão da classe III (BRASIL, 2011; BRASIL, 2015).

Nesse contexto, a possibilidade de registro de novos medicamentos para tratamento das mais variadas patologias por meios alternativos de comprovação da sua eficácia

e segurança é de grande valia sob aspecto da farmacoeconomia (MIDHA; MCKAY, 2009). Em termos de saúde pública, destaca-se nesse estudo os medicamentos empregados no tratamento da enxaqueca. A enxaqueca é uma síndrome incapacitante que afeta de 10% a 20% da população mundial sendo a frequência de ocorrência cerca de três vezes maior em mulheres que em homens. O tratamento dos sintomas dessa doença é fundamental para o restabelecimento das atividades normais e bem estar do paciente (INTERNATIONAL HEADACHE SOCIETY, 2004; SANTOS, 2005).

O naproxeno sódico (NAP), um sal originado de um fármaco ácido (pKa 4,80), é o anti-inflamatório não esteroide com maior eficácia no controle da dor relacionada a crises de enxaqueca leves a moderadas. Já o succinato de sumatriptano (SUM) é derivado de uma base nitrogenada (pka 9,63 e 11,24), que age como agonista seletivo do receptor 5-hidroxitriptamina-1. Esse último fármaco pertence a classe dos triptanos que são específicos para o tratamento de crises de enxaqueca, incluindo as de intensidade moderada a severa. O uso combinado desses ativos resulta em um efeito sinérgico, já que atuam por diferentes mecanismos, sendo eficaz tanto no início dos sintomas quanto após a exacerbação da dor. Isso porque, embora SUM seja eliminado mais rapidamente, NAP permanece no organismo agindo no combate a dor (BERGES *et al.*, 2010; HABERER *et al.*, 2010; PATEL *et al.*, 2012; SRINIVASU *et al.*, 2000).

Em 2008 essa associação, passou a ser comercializada em dose fixa combinada no medicamento TREXIMET[®], contendo 119 mg de SUM (equivalente a 85 mg de base livre) e 500 mg de NAP. No Brasil apenas em 2014 o medicamento SUMAXPRO[®] foi registrado nas concentrações de 119 mg de SUM e 500 de NAP, e 70 mg de SUM e 500 de NAP. A disponibilidade de medicamentos no mercado contendo essa associação ainda é reduzida e o custo elevado (cerca de 15 reais por comprimido).

Diante do exposto, torna-se relevante avaliar a possibilidade de bioisenção de NAP e SUM, por meio da realização de estudos de solubilidade, perfis de dissolução e permeabilidade, com base nas recomendações mundiais e discutir os benefícios e riscos dessas bioisenções.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bioisencões

O uso de medicamentos genéricos ou similares é bastante considerável no mundo. Desse modo o lançamento desses produtos no mercado é fundamental para manutenção da competitividade entre indústrias, proporcionando para o paciente maior diversidade de produtos a preços variáveis. Esses medicamentos podem ser produzidos assim que finalizado o período de proteção patentária de um medicamento inovador ou referência. Os medicamentos genéricos devem ser comercializados a custos consideravelmente inferiores (valor 30% menor em relação ao inovador no momento do lançamento. A diferença de valor entre os medicamentos referência e genéricos se deve ao alto investimento tanto na fase inicial de síntese e estudos farmacotécnicos, quanto na comprovação da eficácia, segurança e qualidade por meio dos estudos clínicos (fases I, II e III) e farmacocinéticos, e custos com divulgação realizados com o medicamento referência (MIDHA; MCKAY, 2009; STORPIRTIS *et al.*, 2009).

Os novos medicamentos, genéricos e similares, devem ser equivalentes farmacêuticos e bioequivalentes ao referência. Desse modo, tem-se a comprovação da eficácia e segurança também dos medicamentos propostos, já que serão comparados ao inovador que tem essas características bem estabelecidas. Após registro, os medicamentos genéricos e similares são considerados cópias do medicamento referência, ou seja são equivalentes terapêuticos, e poderão ser intercambiáveis por meio de prescrição médica ou orientações farmacêuticas (PIANETTI; CÉSAR, 2016; STORPIRTIS *et al.*, 2009).

Para serem considerados equivalentes farmacêuticos, os medicamentos devem possuir a mesma forma farmacêutica, via de administração e quantidade de ativo (ou seja sal, base, derivado químico ou éster). Também deve-se comprovar a adequação em relação aos parâmetros farmacopeicos (pureza, concentração, identidade, potência). Os excipientes das formulações não precisam ser iguais, no entanto devem apresentar funções semelhantes (BRASIL, 2010).

O estudo de equivalência farmacêutica é realizado com os medicamentos teste e referência simultaneamente. Os dois produtos devem cumprir com todas as especificações relatadas em monografias descritas em compêndios oficiais, quando existirem, ou na ausência devem ser usados métodos validados por centro de estudo devidamente credenciado por agência regulatória. Testes informativos como aspecto, viscosidade, densidade, valor do peso médio e volume médio, devem ser realizados também. Por fim, devem ser realizados perfis de dissolução comparativos desses medicamentos (BRASIL, 2010). Com estes estudos objetiva-se avaliar a qualidade do medicamento teste por meio da verificação de algumas características, como o teor e a liberação do fármaco desses medicamentos, em relação ao medicamento referência (PIANETTI; CÉSAR, 2016; STORPIRTIS *et al.*, 2009).

Os estudos de biodisponibilidade/bioequivalência (BD/BE) são realizados por meio da avaliação da quantidade e velocidade com que um fármaco e/ou seu metabólito se encontra em fluido biológico (sangue, soro, plasma ou urina) obtido de voluntários saudáveis, após administração do medicamento em estudo. Para ser considerado bioequivalente o medicamento testado deve possuir parâmetros farmacocinéticos ou farmacodinâmicos semelhantes estatisticamente aos obtidos para o produto referência. Tais dados são originados quando administrados a mesma dose molar do princípio ativo, sob as mesmas condições experimentais (BRASIL, 2002).

Três etapas principais envolvem os estudos de BD/BE:clínica, analítica e estatística. A etapa clínica compreende a seleção, internação (administração do medicamento e coletas de material biológico) e alta de voluntários. Essa etapa envolve equipe multidisciplinar incluindo médicos, enfermeiros e farmacêuticos, e deve ser realizado em centro com instalações regularizadas e que garantam a segurança dos voluntários em caso de emergências. Na etapa analítica, realizada em laboratórios especializados, é feita a quantificação do fármaco, em amostras coletadas na etapa clínica, por métodos bioanalíticos validados. Por fim, os dados obtidos na etapa analítica são avaliados estatisticamente por meio da comparação dos parâmetros farmacocinéticos obtidos com o medicamento teste e com o medicamento referência (BRASIL, 2002).

A complexidade dos estudos de BD/BE faz com que apresentem alto custo de execução. Além disso, nesses estudos tem-se a exposição de indivíduos saudáveis. Em virtude das características do próprio fármaco, os parâmetros farmacocinéticos podem apresentar alta variabilidade intrínseca intra e interindividual, sendo necessário um grande número de voluntários para avaliações confiáveis. Um elevado número de amostras deve ser analisado, gerando muitas vezes um grande volume de resíduo de solventes orgânicos envolvidos nos métodos cromatográficos normalmente empregados (BRASIL, 2002; MIDHA; MCKAY, 2009). Nesse contexto, propõe-se, quando possível, a isenção ou substituição de estudos *in vivo* de BD/BE por testes *in vitro* adequados, determinada como bioisenção.

A bioisenção pode ser concedida para aprovação de um produto por agências regulatórias para: formas farmacêuticas, como parenterais, aplicações tópicas, soluções, gases e pós para reconstituição que resultem em solução; formas farmacêuticas de menor ou maior dosagem, quando as formulações forem proporcionais e a outra dosagem foi submetida a BD/BE; estudos de correlação *in vitro in vivo* (CIVIV), desde que comprovada a possibilidade de substituição por testes de dissolução (*in vitro*); e estudos baseados no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (BRASIL, 2011; EMA, 2010; FDA, 2017; WHO,2017).

A bioisenção baseada no SCB tem sido reconhecida por algumas agências regulatórias como FDA, EMA e ANVISA para medicamentos orais de liberação imediata. De modo geral, para ser considerado bioisento deve-se levar em conta: a solubilidade e permeabilidade intestinal do fármaco estudado; a similaridade entre os perfis de dissolução do medicamento teste e o referência nos meios de dissolução com valores de pH 1,2, 4,5 e 6,8, sendo ambos de rápida dissolução; os excipientes usados na formulação (não podem apresentar impacto sobre a biodisponibilidade); e o risco de assegurar a bioisenção, considerando nessa avaliação o índice terapêutico (não pode ser estreito) e as indicações clínicas para o fármaco (BRASIL, 2011; EMA, 2010; FDA, 2017; WHO,2017).

A aplicação do SCB em isentar estudos de BD/BE, é baseada na ideia de que, quando duas formulações de liberação imediata se comportam como soluções orais dentro do

trato gastrointestinal (elevada solubilidade e dissolução), caso não ocorra precipitação por outros fatores (como excipientes), o princípio ativo estará dissolvido, e portanto, devem apresentar a mesma velocidade e extensão da absorção, e, por conseguinte, serem bioequivalentes (DAVIT *et al.*, 2016).

No Brasil em 2016 a ANVISA publicou uma lista contendo 21 fármacos candidatos a bioisenção (BRASIL, 2016). A Federação Farmacêutica Internacional (FIP) possui um Grupo de Interesse Especial (SIG) que visa realizar estudos científicos que possibilitem a redação de monografias de candidatos a bioisenção, especialmente de fármacos contidos na relação de medicamentos especiais da *World Health Organization* (WHO). Pesquisadores de diferentes lugares do mundo colaboram na compilação de dados e redação das monografias. Atualmente mais de 50 monografias estão disponíveis no site da FIP.

A bioisenção facilita o lançamento de medicamentos genéricos e similares no mercado, por conseguir reduzir consideravelmente o tempo e o custo no desenvolvimento de produtos farmacêuticos. Desse modo, o objetivo central dos estudos de bioisenções é o aumento das opções terapêuticas disponíveis, que apresentem menor custo com eficácia e segurança comprovadas. Entretanto, deve-se avaliar criteriosamente todas as informações relacionadas ao produto para evitar-se decisões errôneas a respeito de bioisenções (COOK *et al.*, 2010).

2.1.1 Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB)

A via oral é a mais usada para administração de medicamentos. Essa via é considerada mais conveniente, de menor custo e mais segura para os pacientes. No entanto, para que sua eficácia terapêutica seja garantida, medicamentos administrados por essa via devem ser capazes de passar pelos processos de liberação, absorção e distribuição, alcançando assim a região alvo do organismo. As características físico-químicas de um fármaco e a capacidade absorptiva do intestino para esse composto são determinantes para a ocorrência desses processos (SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007; LENNERNÄS, ABRAHAMSON, 2005).

Em 1995, Amidon e colaboradores, avaliaram modelos experimentais e propuseram o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB). Para tal, levaram em consideração o número de absorção (A_n), número de dissolução (D_n) e número da dose (D_0), para relacionar a dissolução e a absorção de um fármaco (AMIDON *et al.*, 1995). O número de absorção (A_n) pode ser obtido pela razão entre o tempo médio de residência do fármaco no organismo (T_{res}) e o tempo médio de absorção (T_{abs}), conforme apresentado na equação 1:

$$A_n = \frac{T_{res}}{T_{abs}} \quad (1)$$

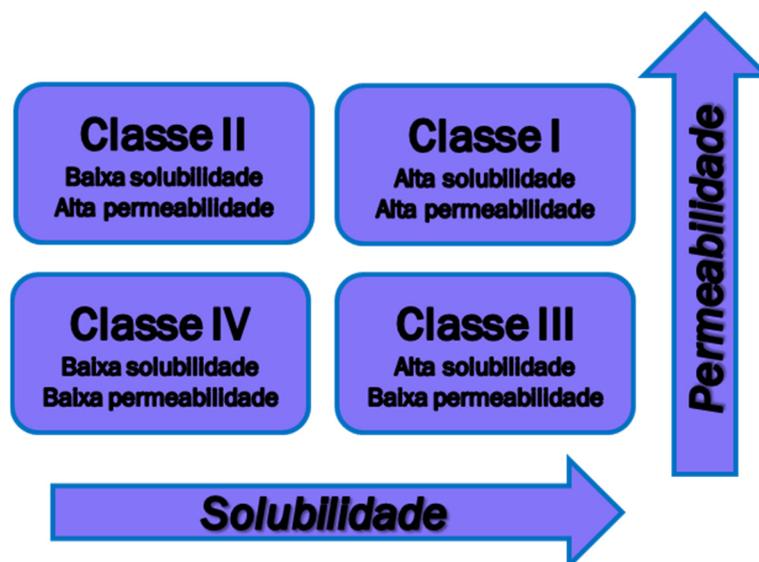
O número de dissolução (D_n) é a razão entre o tempo médio de residência (T_{res}) e o tempo médio de dissolução (T_{diss}), conforme pode ser observado pela equação 2:

$$D_n = \frac{T_{res}}{T_{diss}} \quad (2)$$

Já o número da dose (D_0) é calculado pela razão da dose administrada pela multiplicação do volume gástrico inicial (padronizado como 250 mL) pela a solubilidade mínima na faixa de pH fisiológico (EMAMI, 2006, MARTINEZ; AMIDON, 2002).

Esse sistema permite a classificação dos fármacos em quatro classes, de acordo com dados de permeabilidade e solubilidade em meios aquosos que mimetizam líquidos fisiológicos do trato gastrintestinal. Isso se deve à consideração de serem esses os dois fatores principais para a biodisponibilidade oral de uma substância. (YU *et al.*, 2002). Na Figura 1 estão representadas as quatro classes do SCB.

Figura 1 - Classes do Sistema de Classificação Biofarmacêutica



A determinação da solubilidade e permeabilidade é realizada por meio de estudos específicos. Um fármaco é considerado de alta solubilidade quando a maior dose de medicamento de liberação imediata, administrada oralmente for solubilizada em até 250 mL de meio aquoso (que mimetize meios fisiológicos) mantido a 37 ± 1 °C. Quanto à permeabilidade, são classificados como de alta permeabilidade fármacos que possuam extensão de absorção em humanos igual ou superior a 85% (FARMACOPEIA, 2017; WHO, 2017).

Os fármacos de classe I tem a absorção relacionada às velocidades de dissolução e de esvaziamento gástrico caso a dissolução seja muito rápida. Esses fármacos são fortes candidatos à bioislação por tenderem a ter alta biodisponibilidade. Por esse motivo, estudos de CIVIV são possíveis quando a velocidade de dissolução for menor que a de esvaziamento gástrico (EMAMI, 2006).

Os fármacos de classe II possuem sua absorção dependente da velocidade de dissolução *in vivo*. A absorção ocorrerá por um período mais longo que os fármacos da classe I, e espera-se que seja variável de acordo com fatores associados à formulação. As condições fisiológicas podem afetar a dissolução acarretando alterações na biodisponibilidade. Para fármacos que solubilizam-se bem em meio fisiológico intestinal, a bioislação pode ser sugerida (YAZDANIAN *et al.*, 2004; WHO,

2006). A CIVIV é esperada se a velocidade de dissolução *in vitro* for similar à velocidade de dissolução *in vivo* (EMAMI, 2006).

Para os fármacos de classe III a dissolução é rápida, sendo a biodisponibilidade determinada majoritariamente pela absorção do fármaco. Devido à rápida dissolução o tempo de contato entre o fármaco dissolvido e a mucosa do trato gastrointestinal é aumentado, o que contribui para a absorção do fármaco. Tal característica leva a possibilidade de bioisentar medicamentos contendo fármacos dessa classe (EMA, 2010; FDA, 2017; WHO, 2017; YU *et al.*, 2002). Podem ocorrer variações tanto na velocidade quanto na extensão de absorção, o que pode ser atribuído, ao trânsito gastrointestinal, ao conteúdo luminal e à velocidade de permeação dos fármacos através da membrana, limitando portanto o estabelecimento de CIVIV (EMAMI, 2006).

Os medicamentos contendo fármacos de classe IV tendem a apresentar significativos problemas de biodisponibilidade devido à baixa permeabilidade e solubilidade do fármaco. Desse modo, a CIVIV é dificilmente estabelecida, assim como a bioisenção (EMAMI, 2006). Na Tabela 1, estão sumarizadas as principais características relacionadas às quatro classes do SCB.

Tabela 1 - Classes do Sistema de Classificação Biofarmacêutica e características

Classe	Solubilidade	Permeabilidade	A _n e D _n	Fator limitante para absorção	Expectativa de CIVIV
I	Alta	Alta	Alto A _n Alto D _n	Velocidade de dissolução/ Esvaziamento gástrico	Esperada, se a velocidade de dissolução for menor que a velocidade de esvaziamento gástrico.
II	Baixa	Alta	Alto A _n Baixo D _n	Dissolução <i>in vivo</i> (exceto para D ₀ elevado)	Esperada, se a velocidade de dissolução <i>in vitro</i> for similar à velocidade de dissolução <i>in vivo</i> .
III	Alta	Baixa	Baixo A _n Alto D _n	Permeabilidade/ Velocidade de absorção	Limitada, conforme a velocidade de dissolução
IV	Baixa	Baixa	Baixo A _n Baixo D _n	Solubilidade/ Permeabilidade	Limitada

Fonte: AMIDON *et al.*, 1995; EMAMI, 2006.

A dissolução e absorção dos fármacos estão relacionadas ainda a características intrínsecas do medicamento/fármaco (como forma farmacêutica, estabilidade, tamanho de partícula, polimorfismo, local de absorção) e diversidades fisiológicas (como volume e pH de líquidos intestinais, integridade do trato gastrintestinal, metabolização, degradações enzimáticas, composição da flora bacteriana). Além de fatores extrínsecos como o efeito da alimentação realizada concomitantemente ao uso do medicamento. Todos esses fatores devem ser considerados e avaliados minuciosamente (LÖBENBERG; AMIDON, 2000; MARTINEZ; AMIDON, 2002).

2.1.1.1 Estudos de solubilidade

A solubilidade em equilíbrio pode ser definida como a medida do grau de mistura molecular entre duas substâncias que estejam em um sistema de equilíbrio termodinâmico. Para essa medida deve-se quantificar a concentração da substância em uma solução saturada da mesma, ou seja, quando um excesso de sólido é adicionado ao meio em um estudo com tempo, temperatura e condições controladas (FARMACOPEIA, 2017; USP, 2017).

A determinação da solubilidade de um fármaco tem forte relação com a biodisponibilidade e resposta clínica esperada para um determinado medicamento, devido à necessidade do fármaco estar em solução para que seja corretamente absorvido. Considerando que os fluidos biológicos são aquosos, substâncias polares e/ou ionizáveis possuem melhor solubilização nos líquidos do organismo. Tal fato, pode ser prejudicial à permeabilidade através das membranas celulares, devido à redução da lipofilicidade (MARTINEZ; AMIDON, 2002).

Para que um fármaco seja considerado de alta solubilidade, a maior dose administrada oralmente, como uma formulação de liberação imediata, deve ser solubilizada completamente em até 250 mL em soluções tampão preconizadas que se encontram na faixa de pH fisiológico, mantidas a 37 ± 1 °C. De acordo com o segundo suplemento da Farmacopeia Brasileira 5ª edição, as soluções usadas nos testes de solubilidade são: HCl 0,1 M ou fluido gástrico simulado sem enzimas pH 1,2; solução tampão acetato 0,05 M pH 4,5; e, solução tampão fosfato de pH 6,8 ou fluido

intestinal simulado sem enzimas pH 6,8 (FARMACOPEIA, 2017). Alguns trabalhos consideram a solubilidade também em valores de pH superiores, até 7,5, considerando a porção íleo distal intestinal (DAHAN *et al.*, 2010; EMAMI, 2006; YAZDANIAN, 2004; YU *et al.*, 2002).

Diversas unidades de concentração podem ser indicadas para representar a solubilidade como a molalidade, fração molar, razão molar, peso / volume ou peso / peso. A capacidade de medir com precisão a solubilidade de uma substância pode ser afetada pelas propriedades físico-químicas do fármaco (como tamanho de partícula e forma cristalina), por propriedades dos meios de solubilidade (como pH, polaridade, tensão superficial, uso de tensoativos, co-solventes, sais diversos e agentes complexantes) ou ainda por variações nas condições controladas (como temperatura, tempo e agitação). Desse modo, deve-se realizar o teste de solubilidade com máximo controle desses fatores para gerar um resultado confiável e correto (USP, 2016).

O método mais indicado para a avaliação da solubilidade em equilíbrio é a agitação orbital em frasco. O também conhecido como “*shake flask*” é preconizado segundo o SCB no contexto da bioensação. Nesse método, é adicionado ao meio selecionado um excesso de fármaco para obter uma solução saturada, em soluções aquosas tamponadas que apresentem pH fisiológico. Os frascos contendo a mistura de fármaco e meio são agitados em temperatura que mimetize a corporal (37 ± 1 °C) e velocidade constante. A velocidade deve estar entre 50 e 150 rpm, variando de acordo com o volume de meio e deve favorecer o equilíbrio das fases sem levar à formação de vórtice (FARMACOPEIA, 2017; USP, 2017).

Ao longo do estudo, coletas em tempos específicos devem ser realizadas e as alíquotas imediatamente filtradas por sistema não absorvivo, para garantir que o processo de solubilização seja interrompido. A solubilidade constante entre determinações consecutivas indicam o equilíbrio entre o excesso da substância não dissolvida e a solução saturada. Atingido esse estado a solubilidade em equilíbrio pode então ser determinada. Após cada coleta, deve-se realizar reposição do meio, entretanto, para manter a hidrodinâmica do sistema e a quantidade de insumo

farmacêutico ativo acima do ponto de saturação, não se deve retirar alíquotas que somadas sejam maiores que 10% do volume total (FARMACOPEIA, 2017).

Estudos conduzidos com insumos farmacêuticos ativos que possuem conhecidamente alta solubilidade, podem ser realizados considerando-se a dose máxima usada por administração oral. Nesse caso, a massa de fármaco usada no teste será dada com o produto da maior dose (comercialmente disponível) pelo volume de meio usado no teste, dividido por 250 mL. Tal indicação é justificada pelo excesso de massa de fármaco que seria necessária para obter-se uma saturação do meio (FARMACOPEIA, 2017, BRASIL 2013).

As amostras coletadas dos frascos de agitação são quantificadas por meio de métodos analíticos validados. A concentração das alíquotas retiradas corresponde à solubilidade da amostra em mg/mL. Para que o fármaco seja classificado segundo o SCB como alta ou baixa solubilidade, deve-se calcular a razão entre a dose máxima administrada do fármaco (mg) e a sua solubilidade (em mg/mL). Resultados inferiores a 250 mL classificam o fármaco como de alta solubilidade e os superiores a 250 mL indicam que o mesmo é de baixa solubilidade (FARMACOPEIA, 2017). O estabelecimento do volume de 250 mL está relacionado à quantidade de líquido usual ingerido em testes de bioequivalência. (FDA, 2017).

2.1.1.2 Estudos de permeabilidade

A permeabilidade de um composto fornece um indicativo do grau de absorção no organismo. Desse modo, a partir de resultados de estudos de permeabilidade pode-se prever e estabelecer a extensão da absorção. A aplicabilidade desses testes é ampla e envolve estudos preliminares com potenciais novos fármacos e conhecimento de alterações e influências já conhecidas (BREEMEN; LI, 2005).

A determinação da permeabilidade intestinal é um processo biológico complexo e bastante difícil de avaliar. Isso ocorre devido a absorção intestinal ser dinâmica ocorrendo por três vias principais: passiva, por carreadores ou vesículas. O transporte passivo pode ser dividido em transcelular (através da membrana celular) ou

paracelular (pelos espaços intercelulares), ambos sem gasto energético. Muitos fármacos são carregados através da membrana por transportadores, sendo esse um mecanismo também impactante na absorção de fármacos, até mesmo como barreira desse processo por efluxo dos fármacos. Por fim, o transporte vesicular envolve especialmente macromoléculas, sendo fundamental para atividades dessas (BREEMEN; LI, 2005; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; STORPIRTIS *et al.*, 2009). A velocidade de permeação de um fármaco depende ainda de fatores intrínsecos do mesmo como pKa, massa molar, tamanho de partícula, lipofilicidade, capacidade de ionização e solubilidade em meios fisiológicos.

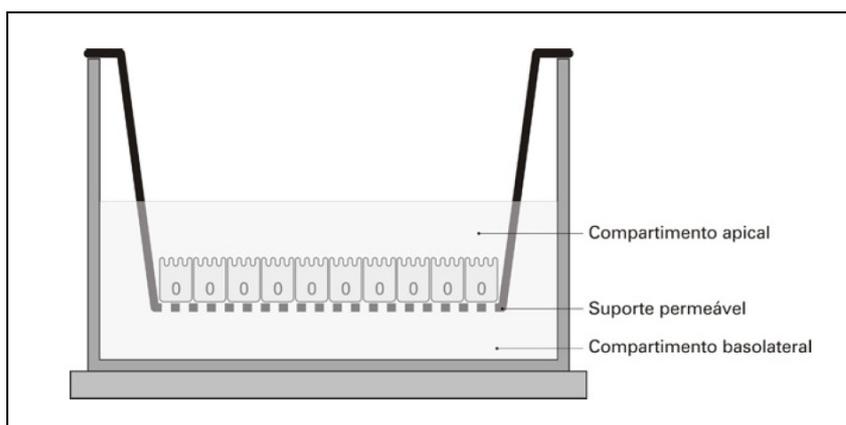
A avaliação da permeabilidade pode ser realizada por métodos *in vivo*, *in situ*, *in silico* e *in vitro*. Os métodos *in silico* envolvem modelos computacionais que levam em consideração as propriedades físico-químicas da molécula estudada. Entretanto, esse método é limitado por não avaliar o transporte paracelular, por vesículas, carreadores, ou fenômenos de efluxo. O método *in vivo* envolve estudos farmacocinéticos avaliando as mudanças nos fluidos fisiológicos. Esses estudos são de alto custo e necessitam de grande número de voluntários. Os estudos *in situ* envolvem ensaios de perfusão intestinal em humanos e animais. Na técnica *Loc-I-Gut®* é possível avaliar a absorção em uma porção intestinal isolada por meio de balões infláveis. Embora seja uma técnica eficiente para avaliar mecanismos de absorção, efluxo e metabolismo, eticamente não são os mais indicados (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; LENNERNÄS, 1998; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007)

Os testes *in vitro* podem ser usados como uma boa alternativa aos testes *in vivo*, que apresentam alto custo e exposição de voluntários. Métodos *in vitro* de uso mais aceito para substituição de testes *in vivo* são estudos de permeação usando tecidos intestinais, humanos ou animais (como a técnica do intestino invertido) e os estudos de permeação por monocamada formada por cultura de células epiteliais, como Caco-2 e MDCK (FDA, 2017; LENNERNÄS, 1998; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007). Existem ainda modelos usando membrana sintética como a PAMPA (Parallel artificial membrane permeability), entretanto, nesses modelos apenas a difusão passiva é avaliada (BREEMEN; LI, 2005).

As células Caco-2 são uma linha celular de adenocarcinoma de cólon humano e vem sendo usada extensivamente como modelo de absorção intestinal humana de fármacos e outros compostos. Essa linhagem celular quando cultivadas em condições adequadas tem a capacidade de se diferenciar espontaneamente e formar uma membrana semelhante ao intestino delgado humano. A monocamada de células cilíndricas apresenta junções estreitas entre as células (servindo como um modelo paracelular), e ainda microvilosidades na borda apical. Além disso, as células Caco-2 expressam proteínas transportadoras, proteínas de efluxo e atividade enzimática (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; BREEMEN; LI, 2005, CHONG *et al.*, 1996).

As monocamadas de células Caco-2 são geralmente cultivadas em suportes contendo membrana semipermeável, que é depositada em placas de cultura de múltiplos poços. Desse modo, pode-se adicionar meio de cultivo na porção superior (compartimento apical) e inferior à membrana (compartimento basolateral), permitindo o fornecimento constante de nutrientes para o desenvolvimento celular. Na Figura 2 está demonstrado o cultivo de células Caco-2 em suportes para estudos de permeabilidade (BREEMEN; LI, 2005).

Figura 2 - Esquema do cultivo de células Caco-2 em suportes para estudos de permeabilidade



Fonte: STORPIRTIS *et al.*, 2009.

O estudo de permeabilidade com células Caco-2 se inicia pela adição de solução contendo o fármaco em meio específico que se quer testar na porção apical ou basolateral, de acordo com o sentido que caracteriza a absorção (transporte passivo ou efluxo). Segue-se então com coletas sucessivas de alíquota da solução na porção

contrária a qual adicionou-se a solução inicial. Para realização do experimento a monocamada deve estar íntegra. A verificação da integridade é feita por meio da medida da resistência elétrica transepitelial (TEER). Para determinação da permeabilidade, calcula-se então o chamado coeficiente de permeabilidade aparente (P_{app}), conforme apresentado na equação 3:

$$P_{app} = \frac{VR}{A \times C_0} \times \frac{dC}{dt} \quad (3)$$

em que: P_{app} corresponde a Permeabilidade aparente; VR o volume do compartimento receptor (basolateral) em cm^3 ; A a área do suporte permeável de cultivo celular; C_0 a concentração inicial adicionada no compartimento doador (apical); e dC/dt o diferencial da concentração em relação ao tempo do experimento (BREEMEN; LI, 2005; YEE, 1997).

As principais limitações relacionadas a estudos com células Caco-2 envolvem: o reduzido número de transportadores expressos; a necessidade de uso de co-solventes em compostos muito lipofílicos; a aderência do fármaco à membrana semipermeável; a baixa permeabilidade de compostos hidrofílicos de baixo peso molecular; e o elevado tempo de diferenciação celular (aproximadamente 21 dias) (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; CHONG et al., 1996). Entretanto, tais limitações não são tão impactantes e estudos de permeabilidade celular usando células Caco-2 vem sendo expansivamente realizados tanto como preditivo de absorção de novos fármacos, quanto no âmbito do SCB e para candidatos a bioislação (BREEMEN; LI, 2005; FDA 2017).

Para um fármaco ser considerado de alta permeabilidade, deve possuir uma extensão de absorção igual ou superior a 85% (BRASIL, 2011; EMA, 2010; FDA, 2017; WHO, 2017). Em estudos com monocamadas de células Caco-2 fármacos que apresentam P_{app} menor que 1×10^{-6} são considerados pouco absorvidos (0 a 20%), para P_{app} entre 1 e 10×10^{-6} classifica-se como moderadamente absorvidos (20 a 70%) e quando obtém-se valores superiores a 10×10^{-6} elevada absorção (70 a 100%) (YEE, 1997).

2.1.2 Dissolução

O processo de dissolução de um fármaco presente em uma forma farmacêutica consiste na sua passagem do estado sólido para sua dispersão molecular em um solvente. Testes de dissolução envolvem tanto a desintegração do medicamento quanto a dissolução do fármaco, simulando, portanto, a etapa de liberação do fármaco no organismo. Desse modo, corresponde a uma ferramenta adequada para assegurar a qualidade e o desempenho da formulação (FARMACOPEIA, 2010; MARCOLONGO, 2003). A cinética de dissolução de um fármaco é influenciada por diversos fatores físico-químicos, e pode ser definida como a quantidade de fármaco que passa para solução em uma interface líquido/sólido, por unidade de tempo, sob temperatura e meios padronizados. A equação de Noyes-Whitney modificada permite a identificação de importantes fatores na taxa de absorção:

$$DR = \frac{dX}{dt} = \frac{A \times D}{h} \times \left(C_s - \frac{X_d}{V} \right) \quad (4)$$

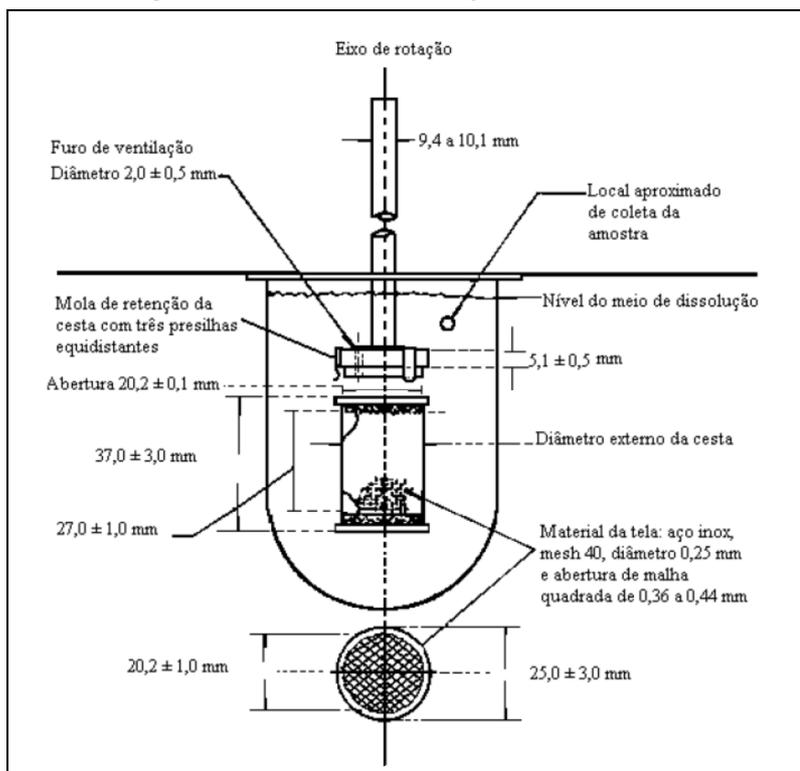
Em que: DR corresponde a taxa de dissolução, A é a área superficial disponível para dissolução, D coeficiente de difusão do fármaco, h é a espessura da camada de difusão, C_s concentração na camada de difusão (concentração de saturação), X_d é a quantidade de fármaco dissolvido e V é o volume de meio de dissolução (HÖRTER, DRESSMAN, 2001)

O teste de dissolução e perfil de dissolução permitem prever a quantidade de substância ativa, advinda de uma forma farmacêutica sólida, disponível para absorção. O teste de dissolução (único ponto de coleta) é realizado como análise de controle de qualidade. O uso de estudos de perfil de dissolução (diversos pontos de coleta) envolvem: avaliações preliminares de novas formulações e guia de desenvolvimento; avaliação da equivalência farmacêutica; garantir a manutenção da qualidade de um produto mesmo após alterações produtivas; estudos de correlação *in vitro in vivo*; e estudos de avaliação de candidatos a bioisencões (EMAMI, 2006; FARMACOPEIA, 2010; WHO, 2017).

Compêndios oficiais, como farmacopeias e outros documentos, descrevem como realizar testes de dissolução. A Farmacopeia Brasileira 5ª edição informa por meio de método geral, diretrizes para execução de testes de dissolução, embora não possua monografias para comprimidos, contendo métodos específicos. Outras farmacopeias como Americana e Britânica, possuem além do método geral, monografias para ensaios com medicamentos em formas sólidas, especificando portanto, as condições em que o teste de dissolução deve ser realizado especificamente para determinado fármaco (FARMACOPEIA, 2010; USP, 2016).

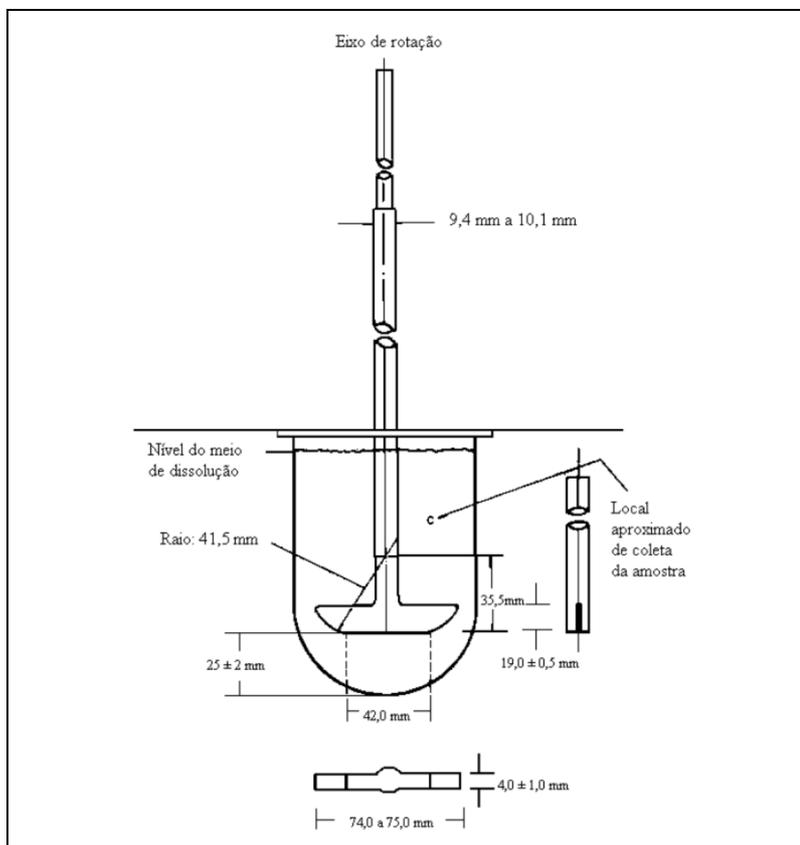
O estudo de dissolução fornece informações importantes para o comportamento do medicamento *in vivo*. Desse modo, as agências regulatórias estabelecem aparelhagem (dissolutor) e condições experimentais específicas para esse tipo de avaliação. Quatro componentes principais compõe o dissolutor: cubas de dissolução; hastes de agitação; motor de rotação das hastes; e banho de água termostatizado. As cubas devem ser transparentes, de material inerte, permitindo visualização do experimento e monitoramento de alterações nas amostras. Devem conter tampa, que permita a inserção da haste de agitação, que por sua vez se apresenta sob duas formas: cesta ou pá. A escolha do sistema de agitação varia para cada estudo, dependendo das características do medicamento. Embora existam outros aparelhos, pás e cestas são os mais usuais e indicados para comprimidos de liberação imediata e modificada, cápsulas dentre outros. Nas Figuras 3 e 4 estão demonstradas as posições e especificações para os métodos de cestas e pás, respectivamente (FARMACOPEIA, 2010; USP, 2016).

Figura 3 - Método de dissolução usando cestas



Fonte: FARMACOPEIA, 2010.

Figura 4 - Método de dissolução usando pás



Fonte: FARMACOPEIA, 2010.

As cubas de dissolução devem permanecer imersas e imóveis (isentas de vibrações) durante todo o experimento em banho de água termostatizado a $37 \pm 0,5$ °C, seguindo a temperatura média corporal. Dentro das cubas serão adicionados volumes precisamente medidos de meio que devem estar, nesse momento, na temperatura de 20 a 25 °C. Para execução do teste está preconizado o uso de condições descritas na monografia ou na ausência dessa, desenvolvidas pelo fabricante. Geralmente, a escolha do meio de dissolução objetiva mimetizar as condições fisiológicas. Desse modo, é mais adequado o uso de meios que abranjam a faixa de pH fisiológica de 1,0 a 7,5 (EMAMI, 2006; FARMACOPEIA, 2010; USP, 2016).

Durante o desenvolvimento do método de dissolução, geralmente emprega-se a realização do perfil de dissolução e deve-se garantir que esse seja discriminativo, de modo a ser capaz de avaliar alterações no produto, como mudanças no processo de fabricação, alterações no IFA ou na formulação. Além disso, a condição de não saturação (*sink conditions*) deve ser priorizada, ou seja, deve-se ter uma condição equivalente a no mínimo três vezes o volume (500 a 1000 mL) do meio de dissolução necessário para obter uma solução saturada do fármaco. Atualmente, aceita-se um volume de cinco a dez vezes para manter essa condição (BRASIL, 2010; MARCOLONGO, 2003).

A avaliação da dissolução pode ser realizada por um único ponto de coleta em tempo estabelecido, por duas coletas quando assim estabelecido ou por múltiplos pontos de coleta ao longo do estudo, criando-se assim uma curva com porcentagens de fármaco dissolvido em função do tempo. Essa curva é chamada de perfil de dissolução, um teste preconizado pelas agências regulatórias como complementar em estudos de equivalência farmacêutica e sugerido na avaliação de bioequivalências de formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata e estudos de *CIVIV* (BRASIL, 2010; HAYES, *et. al.*, 2004; WHO, 2017).

Perfis de dissolução comparativos devem ser realizados, preferencialmente, com as condições experimentais iguais a métodos farmacopeicos ou, na ausência desses, com métodos desenvolvidos utilizando aparelhagem como pás a 50 rpm ou cestas a 100 rpm, 900 mL de meios de dissolução com pH 1,2 (0,1 M HCl ou líquido gástrico

simulado sem enzimas), pH 4,5 e pH 6,8 (ou líquido intestinal simulado sem enzimas), e temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ (BRASIL, 2010; FDA, 2017; WHO 2017). A avaliação dos perfis é feita pelo cálculo do fator de similaridade (f_2), apresentado na equação 5. Para que dois perfis sejam considerados semelhantes, o fator de similaridade deve estar compreendido entre 50 e 100 (BRASIL, 2010).

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right\} \quad (5)$$

O resultado de dissolução é dado por porcentagem da quantidade declarada no rótulo. No âmbito da bioequivalência é importante que a dissolução em formulações de liberação imediata com fármacos classificados pelo SCB como classe I e II seja alta, o que significa que 85% do fármaco devem estar dissolvidos em até 30 minutos com a utilização do aparato e volume de dissolução indicado. Já para fármacos de classe III a dissolução deve ser muito alta, ou seja, 85% do fármaco dissolvido em até 15 minutos (FDA, 2017; WHO 2017).

Um método de dissolução (estudo *in vitro*) com parâmetros e condições minuciosamente estabelecidas pode ser correlacionado matematicamente a um estudo de biodisponibilidade, na chamada correlação *in vitro in vivo* (CIVIV). O estabelecimento da CIVIV permite que o perfil de dissolução, uma técnica mais simples, de menor custo e não invasiva, substitua estudos biológicos na avaliação da biodisponibilidade do medicamento, podendo ser usado no controle de qualidade, em alterações pós-registro do produto e em alguns casos até eliminando a necessidade de estudos de bioequivalência farmacêutica, sendo o medicamento bioequivalente (BRASIL, 2010; EMAMI, 2006; HAYES, 2004).

A correlação entre dados *in vivo* e *in vitro* pode ser dada em quatro níveis: A, B, C e D. A correlação de nível A é o nível mais elevado e representa uma relação ponto a ponto entre a dissolução *in vitro* do fármaco, a partir da forma farmacêutica, e a velocidade de entrada do mesmo no organismo *in vivo*. Pode ser estabelecida quando a fração dissolvida em função do tempo é relacionada matematicamente com a fração

absorvida obtida por deconvolução do perfil plasmático também em função do tempo. Os níveis B e C também são aceitos como substitutos de estudos *in vivo*. No nível B, é comparado o tempo médio de dissolução *in vitro* com o tempo de residência no organismo. Já o nível C correlaciona um ou vários parâmetros farmacocinéticos com os perfis de dissolução. A correlação nível D é útil para avaliação quantitativa para desenvolvimentos farmacotécnicos, não sendo usada para preditividade. Para ser considerado alto o nível de correlação, os coeficientes de determinação e correlação devem estar próximos de 1 (BRASIL, 2002b; EMAMI, 2006; STORPIRTIS *et al.*, 2009).

2.1.3 Guias e legislações sobre bioisenções baseadas no SCB no Brasil e no mundo

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), baseado na solubilidade aquosa e na permeabilidade, vem sendo amplamente utilizado desde sua criação em 1995 para medicamentos administrados por via oral. Esse sistema produziu impacto significativo sobre a política de medicamentos, já que agências regulatórias passaram a discutir a possibilidade de isentar determinados fármacos de testes de BD/BE, baseando na permeabilidade e solubilidade do fármaco e dissolução do medicamento em teste (DAVIT *et al.*, 2016).

O *Food and Drug Administration* (FDA), em 2000, foi a primeira agência regulatória a publicar orientações referentes à possibilidade de bioisenção. As solicitações de isenção de estudos de BD/BE, eram destinadas a medicamentos contendo fármacos classificados como classe I, sendo altamente solúveis, permeáveis (fração absorvida acima de 90%), e devendo apresentar dissolução rápida, ou seja, 85% em menos de 30 minutos em até 900 mL de meios com pH de 1 a 6,8 (FDA, 2000).

Em 2006, a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization-WHO*) publicou diretrizes recomendando a ampliação da possibilidade de bioisenção para registro de medicamentos contendo fármacos de classe I, II e III. Para serem aceitas as bioisenções para as classes II e III, exigiu-se que fármacos de classe III apresentassem dissolução muito rápida (acima de 85% dissolvidos em até 15 minutos) nos meios de pH 1,2, 4,5 e 6,8, e fármacos de classe II rápida dissolução em

pH 6,8 com perfil semelhante ao obtido para o medicamento referência em meios com valores de pH 1,2, 4,5 e 6,8 (WHO, 2006). A recomendação da WHO era estabelecer critérios menos conservadores, especialmente para medicamentos bem conhecidos, que poderiam ser aplicáveis aos medicamentos contendo fármacos que fazem parte da Lista de Medicamentos Essenciais. Em 2010, a *European Medicines Agency* (EMA) também publicou as mesmas diretrizes para fármacos de classe I e III, guia que se mantém até os dias de hoje (EMA, 2010).

A ANVISA publicou no dia 03 de agosto de 2011, a Resolução RDC nº 37 que dispõe um guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. Desde então, no Brasil, são aceitos pedidos de bioisenção para medicamentos contendo fármacos altamente solúveis e altamente permeáveis (Classe I), em formas de dosagem sólidas orais que fornecem dissolução rápida, ou seja, não menos do que 85% de absorção em 30 minutos e que sejam formulados com excipientes que não apresentem impacto sobre a biodisponibilidade. Entretanto, foi restringida apenas para alguns fármacos contidos numa listagem específica (BRASIL, 2011).

Em 2017, o FDA publicou um novo guia fornecendo recomendações para testes de dissolução *in vitro* e critérios específicos para formas de dosagem de sólidos orais de liberação imediata que contém fármacos classe I e agora também para classe III. O FDA passou a recomendar que os ensaios de dissolução utilizem um volume de 500 mL para estabelecimento de uma dissolução rápida ou muito rápida e estabeleceu uma porcentagem de no mínimo 85% para o teste de permeabilidade (FDA, 2017).

Em maior harmonização com o FDA e a EMA, novo guia da WHO foi publicado em 2017, agora com recomendações de bioisenções apenas para os fármacos classe I e classe III. Embora ainda não seja aceito pela ANVISA bioisenções de fármacos classe III, a agência publicou em 2015 um edital de chamamento público (Nº 4) intitulado "Avaliação da capacidade preditiva dos resultados de dissolução *in vitro* conduzidos de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 37, de 03 de agosto de 2011 acerca dos resultados dos estudos de bioequivalência para medicamentos contendo fármacos da classe III do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB)",

que tem por objetivo coletar dados e informações que subsidiem o processo de revisão da RDC nº 37 de 2011 (BRASIL, 2015).

Nas Tabelas 2 e 3 estão apresentados aspectos gerais e requisitos exigidos por algumas agências regulatórias no mundo.

Tabela 2 – Aspectos gerais exigidos para bioequivalência baseada no SCB por diferentes agências regulatórias no mundo (S=Sim / N=Não)

Aspectos Gerais	Asutrália	Brasil	Canadá	Colômbia	União Européia	Nova Zelândia	Singapura	África do Sul	Coreia do Sul	Suíça	Taiwan	Estados Unidos	WHO
SCB – Classe I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SCB – Classe II	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
SCB – Classe III	S	N	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S	S
SCB – Classe IV	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Excluídos fármacos críticos ou de baixo índice terapêutico	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Sólidos orais de liberação imediata	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cápsulas e comprimidos semelhantes	S	N	N	N	N	S	N	S	N	N	N	N	N
Liberação modificada	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Comprimidos orodispersíveis se justificado	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N	S
Suspensões orais	S	S	N	N	S	S	S	S	N	S	N	N	
Doses diferentes do referência	S	N	N	S	S	S	S	S	N	S	S	N	S
Dados para cada dose x dose referência	S	N	S	S	S	S	S	S	S	S	N	S	S
Sais diferentes entre teste e referência	S	N	N	N	S	S	S	S	N	S	N	N	N
Ésteres, éteres, isômeros, misturas de isômeros, complexos ou derivados	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Fonte: Adaptado OUDTSHOORN *et. al.*, 2018

Tabela 3 – Requisitos exigidos por diferentes agências regulatórias no mundo para bioisenção baseada no SCB

Critério	Parâmetro	ANVISA	FDA	EMA	WHO
Classe SCB	-	I	I e III	I e III	I e III
Formulação e comparação	Tipo	Orais de liberação imediata	Orais de liberação imediata	Orais de liberação imediata	Orais de liberação imediata
		Equivalentes farmacêuticos	Equivalentes farmacêuticos ou alternativas com justificativa	Equivalentes farmacêuticos ou alternativas	Equivalentes farmacêuticos ou alternativas
	Excluídos	- Absorção na cavidade oral - Liberação modificada - Baixo índice terapêutico	- Absorção na cavidade oral - Baixo índice terapêutico	- Absorção na cavidade oral - Baixo índice terapêutico	- Absorção na cavidade oral - Baixo índice terapêutico
	Excipientes aceitos	Excipientes usuais em quantidade adequada. Quantidade e qualidade semelhante de excipientes críticos;	Classe I: Excipientes usuais em quantidade adequada. Nenhum que afete absorção; Classe III: Qualitativamente o mesmo e quantitativamente muito semelhante	Classe I: Excipientes usuais em quantidade adequada. Quantidade e qualidade semelhante de excipientes críticos; Classe III: Qualitativamente o mesmo e quantitativamente muito semelhante	Classe I: Excipientes usuais em quantidade ideais. Quantidade e qualidade semelhante de excipientes críticos; Classe III: Qualitativamente o mesmo e quantitativamente muito semelhante
	IFA	Aceitável para novos medicamentos	Alternativas farmacêuticas não aceitável para novos; Para pró-fármaco, o local de conversão determinar se a permeabilidade de pró-fármaco ou fármaco ativo deve ser determinado	Não elegível se for diferente ester, éter, isômero, mistura de isômero, complexo ou derivado	-
Linearidade <i>in vivo</i> do perfil farmacocinético		Linear	Linear	Linear	Linear

Tabela 3 – Requisitos exigidos por diferentes agências regulatórias no mundo para bioisenção baseada no SCB (continuação)

Critério	Parâmetro	ANVISA	FDA	EMA	WHO
Teste de solubilidade	pH	De 1,2 a 6,8	De 1,0 a 6,8: pH = pKa; pH = pKa + 1; pH = pKa - 1; pH = 1 e 6,8.	De 1,0 a 6,8: 1,2;4,5;6,8 e pKa (se for entre 1-6,8)	De 1,2 a 6,8
	Método	Shake-flask ou diagrama de fases	Shake-flask ou outro justificado	Shake-flask ou outro justificado	Shake-flask ou outro justificado
	Volume	Solúvel em ≤ 250 mL	Solúvel em ≤ 250	Solúvel em 250 mL	Solúvel em ≤ 250 mL
	Temperatura	37±1°C	37±1°C	37±1°C	37±1°C
	Dose de IFA	Maior	Maior	Maior dose terapêutica	Maior dose terapêutica (isolado)
	Medição do pH	No início e fim do estudo	Depois de adicionado o fármaco	Antes e depois de adicionado o fármaco	-
Permeabilidade	Indicado	- Alta permeabilidade em humanos Fa ≥ 85%; - Dados da Fa em estudos com humanos.	- Alta permeabilidade em humanos Fa ≥ 85%; - Dados da Fa em BD ou estudos de balanço de massa; -Perfusão intestinal humana in vivo; - Perfusão intestinal animal in vivo ou in situ; - Métodos in vitro com culturas celulares de epitélio em monocamada como Caco-2 (apenas para IFA de absorção passiva; - Sem degradação e metabolismo no TGI se os dados da BD vierem de estudos de balanço de massa radiomarcado	- Alta permeabilidade em humanos Fa ≥ 85%; - Dados da Fa em BD ou estudos de balanço de massa; - Estudos in vitro;	-

Tabela 3 – Requisitos exigidos por diferentes agências regulatórias no mundo para bioisenção baseada no SCB (conclusão)

Critério	Parâmetro	ANVISA	FDA	EMA	WHO
Permeabilidade	Suporte	-	Estudos de permeabilidade in vivo ou in vitro publicados em literatura científica	- Investigações in vitro	- In vivo ou in vitro perfusões animais - in vitro usando monocamada de células intestinais
Dissolução	Taxa de dissolução	- Similar; - Rápido.	- Similar; - Rápido ou muito rápido.	- Similar; - Rápido ou muito rápido.	- Similar; - Rápido ou muito rápido.
	Extensão dissolvida	≥ 85% 30 min	I: ≥ 85% 30 min III: ≥ 85% 15 min	I: ≥ 85% 30 min III: ≥ 85% 15 min	I: ≥ 85% 30 min III: ≥ 85% 15 min
	Aparatos e agitação	Cesto 100 rpm Pá 50 rpm	Cesto 100 rpm Pá 50-75 rpm	Cesto 100 rpm Pá 50 rpm	Cesto 100 rpm Pá 75 rpm
	Volume de meio	900 mL	500 mL	≤ 900 mL	≤ 900 mL
	Meio	-0,1 M HCl ou 1,2; 4,5 e 6,8. -Sem tensoativos -Enzimas somente para cápsulas de gelatina	- 0,1 M HCl ou 1,2; 4,5 e 6,8. - Sem tensoativos - Sem solventes orgânicos -Enzimas somente para cápsulas de gelatina	- 0,1 M HCl ou 1,2; 4,5 e 6,8. - Sem tensoativos -Enzimas somente para cápsulas de gelatina	- 0,1 M HCl ou 1,2; 4,5 e 6,8. - Sem tensoativos -Enzimas somente para cápsulas de gelatina
	Número de unidades	12	12	12	12
	Tempos de coleta	5, 10, 15, 20, 30 min	5, 10, 15, 20, 30 min	10, 15, 20, 30, 45 min	10, 15, 20, 30, 45 min
	Se ≥ 85% em 15 min	Nenhum teste estatístico	Nenhum teste estatístico	Nenhum teste estatístico	Nenhum teste estatístico
	Se ≥ 85% entre 15 e 30 minutos	F2	F2 ou outro teste estatístico	F2 ou outro teste estatístico	F2 ou outro teste estatístico
Dose fixa combinada		Bioisenção possível para um do IFAs	Se ambos IFAs forem bioisentos	Se ambos IFAs forem bioisentos	Bioisenção possível para um do IFAs

Fonte: Adaptado de DAVID et. al, 2016; BRASIL 2011; FDA 2017; WHO 2017.

2.2 Enxaqueca: causas, sintomas, profilaxia e tratamentos

A enxaqueca é um distúrbio neurológico paroxístico crônico caracterizado por ataques multifásicos de cefaleias incapacitantes com uma infinidade de sintomas neurológicos, gastrintestinais e autonômicos (DODICK, 2018; INTERNATIONAL HEADACHE SOCIETY, 2004; SANTOS, 2005). Cerca de 10 a 20% da população é atingida por essa doença que leva à redução de produtividade profissional de milhões de pessoas e é mais prevalente em mulheres. As crises de enxaqueca podem durar horas ou dias e com frequência variando geralmente de 1 a 2 vezes por ano a 1 a 4 vezes por mês. (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; SANTOS, 2005).

O mecanismo biológico envolvido no início da enxaqueca e as causas para tal ainda são mal compreendidos. No entanto, várias teorias foram desenvolvidas na tentativa de explicar essa doença. Acredita-se que pode estar relacionada a combinação de fatores ambientais, genéticos e alimentares. A teoria mais aceita a respeito do mecanismo etiológico está relacionada à dilatação de vasos cerebrais, aumentando o fluxo sanguíneo nas meninges e ativando receptores nociceptivos dos nervos sensoriais perivasculares, originando a dor pulsante. A dilatação dos vasos sanguíneos das meninges desencadeia a liberação de peptídeos vasoativos, que promovem a sensibilização das fibras sensoriais trigeminais, induzindo a resposta inflamatória neurogênica. A 5-hidroxitriptamina (5-HT) é um mediador chave na patogênese da enxaqueca, e desempenham um papel importante na mediação da vasoconstrição, sendo os receptores vasculares da 5-HT do tipo 1B, expressos nas células do músculo liso dos vasos sanguíneos intracranianos, e 1D, expressos nas fibras sensoriais do nervo trigêmeo (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; DODICK, 2018; JHEE, *et al.*, 2001; SANTOS, 2005).

Os sintomas mais característicos associados a enxaqueca incluem fotofobia, fonofobia, alodinia cutânea e sintomas gastrintestinais. Outros sintomas como vertigem, tontura, zumbido e comprometimento cognitivo podem ainda ser declarados por pacientes. Alguns sintomas podem marcar o início de uma crise de enxaqueca, tais como fadiga, comprometimento de concentração, rigidez no pescoço, ansiedade, depressão, irritabilidade, sonolência, lacrimação, bocejos, poliúria, náusea, diarreia e

desejos alimentares (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; DODICK, 2018; INTERNATIONAL HEADACHE SOCIETY, 2004; SANTOS, 2005). Esses sintomas podem ser divididos em quatro estágios principais: pródromo (ou estágio prévio), aura, cefaleia, pós-dromo (sintomas mantidos por dias, como cansaço, redução de raciocínio e sensação de ressaca) (KELMAN, 2006).

A aura corresponde a um conjunto de sintomas neurológicos que duram menos de 60 minutos e podem ser seguidos por cefaleia, náusea, fotofobia, hiperacusia, poliúria, diarreia, e variáveis distúrbios de humor e de apetite. A cefaleia é unilateral, pulsátil e com intensidade de leve a severa. Os sintomas mais comuns da aura são: parestesia, adormecimento das extremidades e da face, dificuldades de fala e de motricidade e, principalmente, distúrbios visuais como fosfenos (manchas, clarões ou ziguezagues brilhantes), névoa parcial do campo visual e escotomia cintilante (névoa visual central envolta por uma linha cintilante e em ziguezague). A aura pode ou não estar presente nas crises de enxaqueca (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; DODICK, 2018; INTERNATIONAL HEADACHE SOCIETY, 2004; SANTOS, 2005).

As crises de enxaqueca são tratadas com utilização de fármacos que atuam em sua provável fisiopatologia. Com o amplo desenvolvimento farmacológico para tratamento e prevenção da enxaqueca, há diversas opções de fármacos em formulações simples ou em associações em dose-fixa disponíveis. O tratamento profilático é recomendado para pacientes que sofrem com duas a três crises ao mês, envolvendo anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), bloqueadores de canais de cálcio, ergotamina, diidroergotamina, metisergina, bloqueadores β -adrenérgicos, inibidores da monoaminoxidase (IMAO), ácido valpróico e antidepressivos tricíclicos (SRINIVASU *et al.*, 2000; TROY, 2005; JHEE *et al.*, 2001).

O tratamento inicial de crises leves a moderadas se baseia no uso de analgésicos, AINEs e antieméticos para náusea. O principal mecanismo de ação dos AINEs consiste na inibição reversível e competitiva da atividade das prostaglandinas sintases (ciclo-oxigenase-COX) impedindo a conversão do ácido aracdônico em prostaglandina. Na enxaqueca, inibindo a síntese de prostaglandinas, reduzem a sensibilização central decorrente da ativação de células gliais no tronco cerebral e,

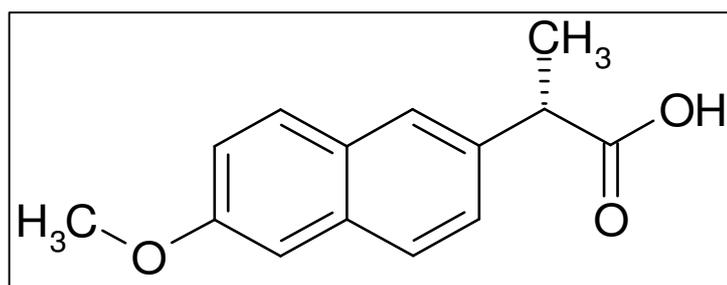
conseqüentemente a inflamação das meninges. O AINE que apresenta maior eficácia clínica na enxaqueca é o naproxeno. No entanto, esse grupo tem como forte inconveniente as lesões gástricas resultantes da inibição da síntese de prostaglandinas protetoras da mucosa gástrica (HABERER *et al.*, 2010; INTERNATIONAL HEADACHE SOCIETY, 2004; SANTOS, 2005).

Em crises mais intensas alguns fármacos específicos para enxaqueca, são mais indicados. As ergotaminas e diidroergotaminas são medicamentos antigos, mas ainda usados, e agem como vasoconstritores não seletivos, representando riscos, e podendo ainda levar ao abuso medicamentoso. Já os triptanos, embora mais novos, possuem efeitos farmacológicos mais seletivos, associados à sua capacidade de diminuir náuseas e vômitos causados pela enxaqueca, tornando o uso desses fármacos mais difundido. O succinato de sumatriptano foi o primeiro dos triptanos a ter seu uso aprovado, sendo amplamente empregado no tratamento de crises de enxaqueca (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; INTERNATIONAL HEADACHE SOCIETY, 2004; SANTOS, 2005).

2.2.1 Naproxeno sódico

Naproxeno ou ácido 2-(6-metoxinaftalen-2-il)-propanoico (Figura 5) é um AINE comercializado como ácido livre ou como sal sódico correspondente, com propriedades antiinflamatória, analgésica e antipirética. Esse fármaco é também utilizado para tratar a artrite reumatóide e outras doenças inflamatórias reumáticas (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; FLANAX®; ELSINGHORST *et al.*, 2011; VALITALO *et al.*, 2012).

Figura 5 - Estrutura química de naproxeno.



O naproxeno sódico (NAP) é um pó branco cristalino, solúvel em água, metanol, moderadamente solúvel em etanol, muito pouco solúvel em acetona, praticamente insolúvel em clorofórmio e tolueno. A constante de dissociação (pKa) do NAP é de aproximadamente 4,2 e o coeficiente de Partição ($\log P_{\text{octanol/água}}$) é de cerca de 3,2 (GILART *et al.*, 2012; MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2004; TROY, 2005; USP, 2017; YOON *et al.*, 2010). Segundo o SCB, NAP tem baixa solubilidade e alta permeabilidade, sendo considerado de classe II (WU; BENET, 2005).

Assim como de outros AINEs, o mecanismo de ação de NAP, baseia-se na inibição da atividade das enzimas prostaglandina H2 sintases, também conhecidas como ciclo-oxigenases (COX) que existem em pelo menos duas isoformas, a COX-1 e COX-2. A COX-1 catalisa a biossíntese de prostaglandinas que são importantes para manter as funções fisiológicas, como por exemplo, síntese de prostaciclina, que por sua vez é citoprotetora quando liberada pela mucosa gástrica, ou antitrombogênica, quando lançada pelo endotélio vascular. Já a COX-2 produz prostaglandinas que estão envolvidas em processos fisiopatológicos como inflamação, febre e dor. Os efeitos adversos, como, hemorragia gastrintestinal e ulceração, ao uso de AINEs foram associados à inibição da COX-1, o que levou ao desenvolvimento de inibidores COX-2 seletivos. O NAP é parcialmente seletivo para COX-2 (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; ELSINGHORST *et al.*, 2011).

As vias de administração usuais para NAP são a via oral na forma de suspensão ou em comprimidos, ou via retal na forma de supositório (ELSINGHORST *et al.*, 2011). Por via oral NAP é rápida e completamente absorvido no trato gastrintestinal, com níveis plasmáticos elevados, com o alívio da dor obtido por volta de 30 minutos após sua administração e picos plasmáticos atingidos em 1 a 4 horas, dependendo da fórmula, forma farmacêutica e da ingestão de alimentos. Os alimentos retardam a velocidade, mas não a extensão da absorção, sendo essa acelerada pela administração concomitante de bicarbonato de sódio, mas retardada por óxido de magnésio ou hidróxido de alumínio. O contrário ocorre por via retal, sendo absorvido mais lentamente. Em doses terapêuticas normais NAP é quase totalmente (99%) ligado as proteínas plasmáticas, atravessa a barreira placentária e atinge o líquido

sinovial (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; FLANAX®; ELSINGHORST *et al.*, 2011).

A biotransformação de NAP no fígado é extensa, sendo submetido a 6-desmetilação e excretado conjugado, com ácido glicurônico (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; FLANAX®; ELSINGHORST *et al.*, 2011; SLATTERY e LEVY, 1979; VALITALO *et al.*, 2012). A meia-vida de eliminação de NAP é de aproximadamente 14 horas, sendo variável de acordo com a faixa etária do paciente. A excreção dos metabólitos é quase inteiramente pela via urinária (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; FLANAX®).

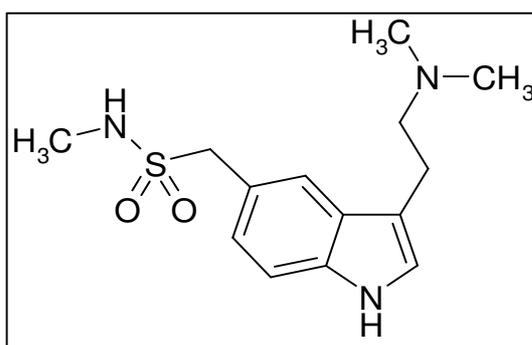
Os efeitos adversos mais comuns relacionados ao uso de NAP são dor abdominal, constipação, diarreia, náuseas, estomatite, azia, dispneia, sede, sonolência, vertigens, enxaquecas, tontura, erupções cutâneas, prurido, sudorese, fadiga, depressão, distúrbios auditivos e visuais, palpitações, púrpura, edemas e dispepsia. Existem poucos casos de icterícia, insuficiência da função renal, estomatite ulcerativa, esofagite, sangramento e/ou perfuração esofágica, angioedema, trombocitopenia e agranulocitose relatados na literatura (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; FLANAX®). NAP pode interagir com alguns medicamentos seja reduzindo o seu efeito (furosemida, propranolol e outros beta-bloqueadores) ou aumentando a atividade (varfarina, lítio, carbamazepina e probenecida) (FLANAX®).

2.2.2 Succinato de sumatriptano

Sumatriptano ou 3-[2-(dimetilamino)-etil]-N-metil-1H-indol-5-metano-sulfonamida (Figura 6), comercializado como succinato de sumatriptano (SUM), é um agonista seletivo do receptor de serotonina, eficaz no tratamento da fase aguda de enxaquecas. (BARBANTI; LE PERA; CRUCCU, 2007; BOULTON; DUNCAN; VACHHARAJANI, 2003; CHENG *et al.*, 1998; DUNNE e ANDREW, 1996; DUQUESNOY, *et al.*, 1998; FERRARI, *et al.*, 2008; GE *et al.*, 2004; JHEE, *et al.*, 2001; XU; BARTLETT; STEWART, 2001). O SUM é um pó branco a esbranquiçado, facilmente solúvel em água, solução salina e clorofórmio, levemente solúvel em metanol e praticamente insolúvel em hidrocarbonetos. Possui dois valores

aproximados de pKa: pKa₁ de 9,63 e pKa₂ maior que 11,24, e log P_{octanol/água} de 0,65 (SHESHALA; KHAN; DARWIS, 2012; USP, 2016; TROY, 2005). Segundo o SCB, SUM possui alta solubilidade e baixa permeabilidade, sendo considerado de classe III (VARMA; SATEESH; PANCHAGNULA, 2005).

Figura 6 – Estrutura química de sumatriptano.



SUM atua seletivamente nos receptores 5-HT_{1B} e 1D (5-HT_{1B} e 5-HT_{1D}) (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; IMIGRAN®; MCLOUGHLIN *et al.*, 1996). A eficácia de agonistas dos receptores 5-HT_{1B/1D} na enxaqueca pode ser explicada por meio de duas hipóteses. A primeira está relacionada ao fato de eventos desconhecidos levarem a dilatação anormal de anastomoses arteriovenosas carótidas na cabeça desviando o fluxo sanguíneo cerebral para pele, crânio e orelhas, onde estão localizados. Tal desvio leva à isquemia cerebral e hipóxia que podem ser, portanto, reguladas com a constrição dos vasos sanguíneos intracranianos (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; IMIGRAN®; GE *et al.*, 2004; MCLOUGHLIN *et al.*, 1996; XU; BARTLETT; STEWART, 2001). Outra hipótese baseia-se no fato de agonistas dos receptores 5-HT₁ poderem bloquear a liberação de neuropeptídeos pró-inflamatórios ao nível da terminação nervosa, no espaço perivascular reduzindo a dor (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; IMIGRAN®; GE *et al.*, 2004).

As vias de administração de SUM incluem oral, subcutânea ou intranasal (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; BOULTON; DUNCAN; VACHHARAJANI, 2003; CHENG *et al.*, 1998; DUQUESNOY, *et al.*, 1998; FERRARI, *et al.*, 2008; JHEE, *et al.*, 2001; XU; BARTLETT; STEWART, 2001). A dose recomendada de SUM é de 25 a 100 mg por via oral e de 5 a 20 mg por via intranasal, podendo ser repetida após 2

horas. No entanto, a dose máxima diária é de 200 mg e 40 mg por vias oral e intranasal, respectivamente (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

A biodisponibilidade por via oral e intranasal é de apenas 14% a 17%, respectivamente, sendo o pico plasmático alcançado dentro de 1 a 2 horas. Por via subcutânea a biodisponibilidade de SUM é de 96%, com alcance de pico plasmático em aproximadamente 10 minutos. Possui ainda, baixa taxa de ligação à proteínas plasmáticas (cerca de apenas 14%) (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; IMIGRAN®; CHENG *et al.*, 1998; FERRARI, *et al.*, 2008; JHEE, *et al.*, 2001; SRINVASU *et al.*, 2000). SUM é metabolizado principalmente no fígado por meio da ação de monoaminas oxidases tipo A (MAO-A) em um análogo do ácido indol-acético. Esses metabólitos e outros menores são excretados por via urinária, sendo a meia-vida de eliminação de SUM aproximadamente de 1 a 2 horas (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; CHENG *et al.*, 1998; JHEE, *et al.*, 2001; SRINVASU *et al.*, 2000).

Os efeitos adversos mais comuns com o uso de SUM são: pequeno aumento da pressão arterial; falta de ar; palpitações; ansiedade; parestesias; astenia e fadiga; rubor; sensação de pressão, aperto ou dor no peito; pescoço e mandíbula; sonolência; tonturas; náuseas; e sudorese. A maioria dos pacientes relata dor transitória leve, ardor, ou sensação de queimação no local da aplicação de SUM por via subcutânea. Quando administrado por via intranasal ou oral SUM apresenta sabor amargo. Seu uso é contra-indicado em pacientes com doença arterial coronariana (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; IMIGRAN®; JHEE, *et al.*, 2001).

O perfil farmacocinético é bastante alterado na presença de inibidores da MAO-A, como moclobemida, e pode ter efeito exacerbado quando administrado simultaneamente com ergotamina. Por outro lado não foram encontradas interação ou alterações significativas quando SUM é administrado simultaneamente a propranolol, flunarizina, pizotifeno, alimentos ou álcool (etanol). (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; IMIGRAN®; JHEE, *et al.*, 2001). O succinato de SUM é estável a exposição de ácido, base, oxidação e irradiação ultravioleta nas condições ambientes, mas degrada-se quando aquecido a 90°C (XU; BARTLETT; STEWART, 2001).

2.2.3 Associação de succinato de sumatriptano e naproxeno sódico

O uso de SUM e NAP em formulações individuais e em associação vem sendo amplamente utilizado no tratamento de crises de enxaqueca. Os benefícios dessa associação é comprovado em dados clínicos que relatam aumento da eficácia no tratamento agudo da enxaqueca com o uso concomitante de um triptano e de um AINE, frente ao uso isolado de um dos dois fármacos. Essa melhora pode ser explicada devido aos vários processos vasculares e inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da enxaqueca. Esses fármacos possuem ação sinérgica, tendo como alvos aspectos distintos na cefaleia da enxaqueca, prevenindo ou reduzindo tanto a ativação periférica das vias centrais da dor durante os estágios iniciais de uma crise de enxaqueca quanto à sensibilização central tardia. Desse modo, tem-se um alívio mais rápido e prolongado da dor, reduzindo a necessidade de medicação extra (BERGES *et al.*, 2010; HABERER *et al.*, 2010; LAW; DERRY; MOORE, 2016; MICHAEL *et al.*, 2012; PATEL *et al.*, 2012; SUMAXPRO®).

Farmacocineticamente o uso desses fármacos associados apresenta grande vantagem, uma vez que após a administração, SUM rapidamente alcança sua concentração plasmática máxima (C_{max}) e esta, reduz rapidamente, enquanto NAP, permanece no organismo oferecendo maior tempo de ação farmacológica. Esse perfil é alcançado independentemente de estarem os fármacos no mesmo comprimido (em dose fixa combinada) ou em comprimidos isolados, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os perfis farmacocinéticos nessas duas condições. Além disso, não foram observados efeitos adversos aumentados, teratogenicidade e nem alterações farmacocinéticas de SUM/NAP quando administrados com alimentos ou durante uma crise de enxaqueca. Os dados farmacocinéticos obtidos após administração de 85 mg de SUM combinado a 500 mg de NAP podem ser observados na Tabela 4 (BERGES *et al.*, 2010; HABERER *et al.*, 2010; LANDY *et al.*, 2013; PATEL *et al.*, 2012; SMITH *et al.*, 2005; SRINVASU *et al.*, 2000; SUMAXPRO®).

Tabela 4 - Dados farmacocinéticos obtidos após administração simultânea de SUM e NAP

Fármaco	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (horas)	T_{1/2} (horas)	ASC_{0-∞} (ng_xh/mL)	K_{EI} (horas⁻¹)
SUM	37,9 - 76,9	0,75 - 1,0	2,24 - 2,46	208	0,327
NAP	40,6 - 61,54 (x10 ³)	3,5 - 6,0	14,0 - 16,7	791,3 - 1132 (x10 ³)	0,05

Fonte: BERGES *et al.*, 2010; BRÊTAS *et al.*, 2016; HABERER *et al.*, 2010; PATEL *et al.*, 2012

A associação em dose fixa combinada foi produzida pela primeira vez pela indústria GlaxoSmithKline. O TREXIMET[®], contendo 119 mg de succinato de SUM (equivalente a 85 mg de base livre) e 500 mg de NAP, foi aprovado em 15 de abril de 2008 pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de crises de enxaqueca (BERGES *et al.*, 2010; HABERER *et al.*, 2010; MICHAEL *et al.*, 2012; PATEL *et al.*, 2012). No Brasil o medicamento SUMAXPRO[®] foi registrado apenas em 2014 pela indústria Libbs Farmacêutica Ltda, nas concentração de 119 mg de SUM e 500 de NAP, e 70 mg de SUM e 500 de NAP. Portanto o uso de medicamentos com essa associação é relativamente recente no âmbito mundial com tendência ao crescimento.

2.2.4 Métodos analíticos e bioanalíticos para quantificação simultânea de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de melhor desempenho na atualidade. Pode ser descrita por um tipo de cromatografia líquida que emprega pequenas colunas, preenchidas por materiais especiais (como sílicas e sílicas ligadas a grupos como octadesilsilano, fenil e ciano) e uma fase móvel (FM) que é eluída sob altas pressões geradas por bombas de propulsão. A CLAE tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em curto tempo, com alta resolução, eficiência e sensibilidade. O sistema CLAE é composto por bomba, injetor, coluna, detector e sistema de dados (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Diferentes técnicas de detecção podem ser empregadas com a CLAE usando diversos mecanismos (físicos ou químicos), permitindo a detecção de variações na fase móvel que elui da coluna cromatográfica. A detecção permite a identificação da amostra, por

meio da medição dos tempos de retenção (TR), ou determinação da relação massa/carga (m/z) dos analitos, e ainda a quantificação por representações gráficas (CIOLA, 1998; SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Na Farmacopeia Americana, são encontradas monografias para NAP e SUM isolados, contendo métodos cromatográficos para quantificação desses fármacos. Diferentes métodos cromatográficos são descritos na literatura para quantificação simultânea de NAP e SUM. No entanto, a grande maioria dos métodos descritos apresentam baixa retenção de SUM na coluna cromatográfica, fato que prejudica análises cujo início da corrida cromatográfica é marcado por grande número de interferentes. Na Tabela 5 estão apresentadas condições cromatográficas de diferentes métodos descritos na literatura para quantificação de NAP e SUM (USP, 2016).

Tabela 5 – Condições cromatográficas de métodos descritos na literatura para quantificação de NAP e/ou SUM por CLAE

Referência	Fármaco	Cromatografia/ Detecção	Coluna	Fase Móvel	Fluxo	Matriz	Tempo de retenção	Faixa de trabalho
REDDY <i>et al.</i> , 2011	NAP SUM	CLUE/UV (225 nm)	C ₁₈ , 50 x 4,8 mm, 1,8 µm	Gradiente composto por: A:0,2% ácido fosfórico B: Acetonitrila:água (90:10)	1,00	Comprimido	2,7 1,7	5,0-15 ng/mL 0,85-2,565 ng/mL
NUNI <i>et al.</i> , 2011	NAP SUM	CLAE/UV (285 nm)	C ₁₈ , 150 x 4,6 mm, 5 µm	Tampão fosfato:Acetonitrila	0,70	Comprimido	5,87 2,24	60-100 µg/mL 60-100 µg/mL
KRISHNA <i>et al.</i> , 2011	NAP SUM	CLAE/UV (285 nm)	C ₈ , 150 x 4,6 mm, 3,5 µm	Acetonitrila:tampão fosfato (70:30)	0,60	Comprimido	4,35 2,83	20 - 60 µg/mL 20 - 60 µg/mL
SOLANKI; PATEL. 2012	NAP SUM	CLAE/UV (277 nm)	C ₁₈ , 250 x 4,6 mm, 5 µm	Acetonitrila: solução 0,05% v/v ácido trifluoroacético (60:40)	1,00	Comprimido	5,79 2,26	5 - 80 µg/mL 5 - 80 µg/mL
MICHAEL <i>et al.</i> , 2012	NAP SUM	CLAE/MS	C ₁₈ , 250 x 2,1 mm, 5 µm	Acetonitrila:ácido acético 0,05% v/v (60:40)	-	Comprimido e Plasma	6,96 3,56	0,1-10 µg/mL 10-900 ng/mL
PATEL <i>et al.</i> , 2012	NAP SUM	CLUE/MS	C ₁₈ , 50 x 2,1 mm, 1,7µm	Metanol:acetonitrila:acetato de amônio 4,0 mM (70:10:20)	0,25	Plasma	0,91 1,25	0,05 - 100 µg/mL 0,05 - 100 ng/mL
SWAPNA; REDDY; SEKHAR.2013	NAP SUM	CLAE/UV (235 nm)	C ₁₈ , 100 x 4,6 mm, 5µm	Tampão fosfato pH 6,5:Acetonitrila (60:40)	1,00	Comprimido	3,14 2,28	20 - 120 µg/mL 125 - 750 µg/mL
REDDY; SAIT; HOTH., 2013	NAP SUM	CLUE/UV(260)	C ₁₈ , 100 x 2,1 mm, 1,7µm	Água:acetonitrila:ácido acético glacial (50:50:1)	0,50	Comprimido	1,38 0,6	- -
REDDY; SREELATHA; DEVI., 2015	NAP SUM	CLAE/UV (280 nm)	C ₈ , 250 x 4,6 mm, 5 µm	Gradiente composto por: A: Tampão (0,05M hexano sulfonato de sódio e 3 mL trietilamina):Acetonitrila:Metanol (65:30:5) B:Acetonitrila: água (90:10)	-	Comprimido	4,44 3,55	0,076-1,2 mg/mL 0,4-6,4 mg/mL
PATEL <i>et al.</i> , 2015	NAP SUM	CLUE/MS e UV(230)	Fenil 100 x 2,1 mm, 1,7µm	Gradiente composto por: A: 0,02M acetato de amônio pH 4,12 B:Acetonitrila	0,355	Comprimido	8,49 2,41	125-750 ng/mL 125-750 ng/mL
BRÊTAS <i>et al.</i> , 2016.	NAP SUM	CLAE/MS	C ₁₈ , 50 x 4,6 mm, 5 µm	Metanol: 2mM acetato de amônio com 0,025% ácido fórmico (62:38)	1,00	Plasma	2,8 0,90	2,5-130 µg/mL 1-50 ng/mL
USP, 2016.	NAP	CLAE/UV (254 nm)	C ₈ , 150 x 4,6 mm, 5 µm	Água: Acetonitrila:ácido acético (54:45:1)	1,20	Comprimido	-	-
USP, 2016.	SUM	CLAE/UV (282 nm)	C ₁₈ , 250 x 4,6 mm, 5 µm	Tampão*: Acetonitrila (75:25) *1,3 mL Dibutilamina, 0,4 mL ácido fosfórico, 2,9 g fosfato de sódio e água q.s.p 1 L (pH 6,5)	1,50	Comprimido	-	-

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar e discutir a bioisenção de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano por meio da realização de estudos de solubilidade, dissolução de comprimidos isolados e em dose fixa combinada, e permeabilidade *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

- a) Desenvolver e validar método analítico e bioanalítico para quantificação simultânea de NAP e SUM.
- b) Aplicar o método analítico desenvolvido e validado em um estudo de solubilidade de NAP e SUM isolados e simultaneamente.
- c) Aplicar o método analítico desenvolvido e validado na determinação de teor de comprimidos contendo NAP e SUM isolados em dose fixa combinada.
- d) Aplicar o método analítico desenvolvido e validado em um estudo de dissolução com comprimidos contendo NAP e SUM isolados em dose fixa combinada.
- e) Aplicar o método bioanalítico desenvolvido e validado em um estudo de permeabilidade *in vitro* empregando cultura de células Caco-2 de NAP e SUM isolados e simultaneamente.
- f) Avaliar e discutir a possibilidade de biosenção de NAP e SUM, isolados e em associação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Substâncias químicas de referência (SQR)

- a) naproxeno sódico SQR (USP – Rockville, USA), lote R04290, teor 99,9%;
- b) naproxeno SQR (USP – Rockville, USA), lote R03550, teor 99,9%;
- c) succinato de sumatriptano SQR (USP – Rockville, USA), lote G0L156, teor 98,4%.

4.1.2 Medicamentos

- a) FLANAX®, comprimidos revestidos de naproxeno sódico 275 mg (Bayer S.A. – São Paulo, Brasil), lote X22KP8, validade: novembro de 2018;
- b) Imigran®, comprimidos revestidos de succinato de sumatriptano 50 mg (GlaxoSmithKline Pharmaceuticals S.A. – Poznan, Polônia), lote ZC2425V3, validade: março de 2018;
- c) SUMAXPRO® 50-500 mg, comprimidos revestidos de succinato de sumatriptano 70 mg e naproxeno sódico 500 mg (Libbs Farmacêutica Ltda.– São Paulo, Brasil), lote 16J0058, validade: setembro de 2018;
- d) SUMAXPRO® 85-500 mg, comprimidos revestidos de succinato de sumatriptano 119 mg e naproxeno sódico 500 mg (Libbs Farmacêutica Ltda.– São Paulo, Brasil), lote 16I0413, validade: setembro de 2018;
- e) Naproxeno sódico, comprimidos revestidos de naproxeno sódico 550 mg (Neoquímica), lote B17K0484, validade: outubro de 2019.

4.1.3 Insumos Farmacêuticos ativos

- a) Naproxeno sódico (Zhejiang Charioteer Pharmaceutical Co.,LTD- Zhejiang Province, China), lote 176315444, data reteste: fevereiro de 2020;
- b) Naproxeno (Fagron – SM Empreendimentos Farmacêuticos LTDA – São Paulo, Brasil), lote 15105692B, validade: julho de 2018;
- c) Succinato de sumatriptano (Libbs Farmacêutica Ltda.– São Paulo, Brasil), lote 16L0550, data reteste: dezembro de 2018.

4.1.4 Solventes, reagentes e excipientes

- a) Água ultrapura;
- b) reagentes grau analítico: acetato de amônio; acetona; ácido acético glacial; ácido fórmico; clorofórmio; acetato de sódio triidratado; ácido clorídrico; cloreto de sódio; hidróxido de sódio; fosfato de potássio monobásico; cloreto de potássio; glucose; fosfato de sódio dibásico; sulfato de magnésio; cloreto de cálcio; e bicarbonato de sódio;
- c) reagentes grau cromatográfico: acetonitrila e metanol;
- d) excipientes: lactose; lactose monoidratada; celulose microcristalina; croscamelose sódica; estearato de magnésio; povidona; crospovidona; talco; hipromelose; macrogol; dióxido de titânio; laca azul; e opadry rosa.

4.1.5 Reagentes, materiais e equipamentos usados exclusivamente no cultivo celular e no estudo de permeabilidade

- a) Meio Dulbecco MEM (DMEM), GIBCO;
- b) solução de aminoácidos não essenciais, SIGMA ALDRICH;
- c) solução de glutamina 200 mM, SIGMA ALDRICH;
- d) soro fetal bovino, GIBCO;
- e) tampão HEPES, SIGMA ALDRICH;
- f) bicarbonato sódico, SIGMA ALDRICH;
- g) solução tampão Hanks (HBSS) 1X, GIBCO;
- h) solução de tripsina 0,25% e EDTA 1 mM, GIBCO;
- i) garrafas de cultivo celular 25 e 75 cm²;
- j) kits esterilizantes de meios de cultura;
- k) álcool etílico 70% v/v;
- l) placas TRANSWELL® Corning de 12 poços de 12 mm de diâmetro, com inserts de policarbonato de porosidade 0,4 µm;
- m) incubadora CO₂ Series II Water Jacket, THERMO SCIENTIFIC;
- n) microscópio Invertido, OLIMPUS CXX41;
- o) microscópio SM-LUX, LEITZ;

- p) capela de fluxo laminar VLFS-12M, VECO;
- q) banho aquecedor EM4B, IKA;
- r) incubadora com agitação AG-45, AGIMAXX;
- s) minivoltímetro Milicell ERS®, MILIPORE;
- t) estufa retilínea, FANEM;
- u) pipetas descartáveis estéreis 5 e 10 mL;
- v) ponteiros de Pasteur e pipeta de Pasteur estéreis.

4.1.6 Acessórios e vidrarias

- a) Balões volumétricos calibrados de 2, 5, 10, 25, 50, 100, 500, 1000 e 2000 mL;
- b) bastões de vidro;
- c) béqueres;
- d) erlemeyers de 250 mL;
- e) coluna cromatográfica empacotada com grupos ciano de 150 mm x 4,6 mm e diâmetros de partícula de 5 µm ZORBAX Eclipse Plus, Agilent;
- f) frascos de vidro para soluções;
- g) frasco tipo *vial* de 12 x 32 mm com tampa de rosca e septos de silicone;
- h) tubos tipo *insert* de fundo plano de 250 µL.
- i) kit para filtração de soluções a vácuo;
- j) membrana de celulose regenerada para filtração com 47 mm de diâmetro e poros de 0,45 µm, SARTORIUS;
- k) filtros de seringa de celulose regenerada (CR) de 25 mm de diâmetro e poros de 0,45 µm Chromafil® Xtra, MACHEREY-NAGEL;
- l) pipetas graduadas;
- m) pipetas volumétricas;
- n) ponteiros de 200 e 1000 µL para uso em micropipetas;
- o) ponteiros de 0,5; 1,25; 2,50; 5,00 e 12,00 mL para pipetador automático HandyStep®, BRAND;
- p) provetas;
- q) tubos de ensaio de vidro com tampa;
- r) tubos de fundo cônico tipo Falcon de 15 e 50 mL;
- s) hastes para suporte e garras.

4.1.7 Equipamentos

- a) Agitador tipo vórtexMS1, IKA;
- b) balança analítica com precisão de 0,01 mg BP211D, SARTORIUS;
- c) banho de ultra-som 1400, UNIQUE;
- d) banho maria TIC-17C1400, FULL GAUGE;
- e) bomba de vácuo KNF N842, LABOPOINT;
- f) concentrador de amostras TecVap TE-0194, TECNAL;
- g) freezer vertical -70 °C UTL-2186, REVCO;
- h) micropipeta 20 a 200 µL FINNPIPETTE® F3, Thermo SCIENTIFIC;
- i) micropipeta 100 a 1000 µL FINNPIPETTE® F3, Thermo SCIENTIFIC;
- j) pipetador automático HandyStep®, BRAND;
- k) potenciômetro 827 pH Lab, METROHM;
- l) refrigerador 240, CONSUL;
- m) sistema CLAE-DAD AGILENT 1200 composto por: desgaseificador, bomba quaternária, forno de colunas, injetor automático e detector de arranjo de diodos (DAD) na região do ultravioleta e visível, AGILENT;
- n) sistema CLAE-DAD THERMO Surveyor Finnigan composto por: desgaseificador, bomba quaternária, forno de colunas, injetor automático e detector de arranjo de diodos (DAD) na região do ultravioleta e visível, THERMO;
- o) sistema de purificação de água Direct-Q, MILLIPORE;
- p) espectrofotômetro ultravioleta-visível (UV-Vis) UV1800 com software UV Probe versão 2.33, SHIMADZU;
- q) espectrômetro FTIR IR Prestige-21 com software IR Solution, SHIMADZU;
- r) dissolutor DT-80, ERWEKA;
- s) incubadora com plataforma de agitação orbital KS 4000i control, IKA;
- t) durômetroTBH 30, ERWEKA;
- u) durômetroTB 24, ERWEKA;
- v) desintegrador ZT3, ERWEKA;
- w) estufa TR 60, NABERTHERM.

4.2 Métodos

4.2.1 Desenvolvimento de método analítico para quantificação simultânea de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano por CLAE-DAD

Para iniciar-se o desenvolvimento do método analítico realizaram-se pesquisas bibliográficas em bases de dados, compêndios oficiais, dentre outras fontes para delineamento dos testes a serem executados. Foram selecionados métodos já desenvolvidos para quantificação de NAP e SUM (item 2.2.4). Os dados físico-químicos dos fármacos foram também fundamentais para definições e avaliações dos ensaios realizados (itens 2.2.1 e 2.2.2). A ampla diferença de pKa entre NAP e SUM torna o desenvolvimento de métodos analíticos para a quantificação simultânea desses fármacos um grande desafio (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; WAINER; LOUGH, 1996;).

Durante o desenvolvimento foram consideradas ainda as aplicações do método para avaliação das prováveis interferências e faixas de concentração adequadas. Para o desenvolvimento do método analítico foi empregada a técnica cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) cujas condições analíticas testadas estão apresentadas na Tabela 6. Diferentes concentrações dos fármacos foram analisadas com o objetivo de avaliar quais levariam a melhor a reprodutibilidade e linearidade da faixa escolhida, antes de validar os métodos analíticos (para estudos de solubilidade, dissolução e doseamento) e bioanalítico (para estudos de permeabilidade celular) desenvolvidos.

Tabela 6 – Condições testadas durante o desenvolvimento do método analítico

Coluna	Fase Móvel
C18 - 50 mm x 4,6 mm, 5 µm	Tampão acetato de amônio 2 mM com ácido fórmico 0,025%:metanol (38:62 v/v)
	Solução aquosa de ácido acético 0,1% em diferentes proporções de metanol ou acetonitrila
	Solução aquosa de acetato de amônio 4 mM diferentes valores de pH, ajustados com ácido acético, em diferentes proporções de metanol ou acetonitrila

Tabela 6 – Condições testadas durante o desenvolvimento do método analítico (continuação)

Coluna	Fase Móvel
C18 - 150 mm x 4,6 mm, 5 µm	Solução aquosa de ácido acético 0,1% em diferentes proporções de metanol ou acetonitrila
	Solução aquosa de acetato de amônio 4 mM diferentes pHs, ajustados com ácido acético, em diferentes proporções de metanol ou acetonitrila
	Solução aquosa de acetato de amônio 4 mM diferentes pHs, ajustados com ácido fórmico, em diferentes proporções de metanol ou acetonitrila
Ciano - 150 mm x 4,6 mm, 5 µm	Solução aquosa de ácido acético 0,1% em diferentes proporções de metanol ou acetonitrila
	Solução aquosa de acetato de amônio 4 mM diferentes pHs, ajustados com ácido acético, em diferentes proporções de metanol ou acetonitrila
	Solução aquosa de acetato de amônio 4 mM diferentes pHs, ajustados com ácido acético, em diferentes proporções de metanol ou acetonitrila
Fenil - 150 mm x 4,6 mm, 5 µm	Solução aquosa de acetato de amônio 4 mM pH 4,9, ajustado com ácido acético, em diferentes proporções de metanol ou acetonitrila

4.2.2 Validações de métodos analítico e bioanalítico para quantificação simultânea de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano por CLAE-DAD

Os métodos analítico (empregado nos estudos de solubilidade, doseamento e dissolução) e bioanalítico (empregado no estudo de permeabilidade) desenvolvidos para quantificação simultânea de NAP e SUM foram validados de acordo com as normas vigentes no Brasil. Para o emprego do método na quantificação em estudos de solubilidade, dissolução e doseamento usou-se a Resolução RDC nº166 de 24 de julho de 2017 da ANVISA. Já para o emprego em estudos de permeabilidade, usou-se adicionalmente a Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 da ANVISA, por ser a norma vigente no Brasil para validação de métodos bioanalíticos. Outros guias e normas mundiais foram usadas também na avaliação da validade dos métodos. Os

cálculos e avaliações estatísticas dos resultados foram realizados com auxílio do software Microsoft Excel 2013, baseando-se em planilhas desenvolvidas por SOUZA e colaboradores, e pelo sistema estatístico R versão 3.4.4 como forma de confirmação dos cálculos (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005; SOUZA, 2007).

Foram realizadas duas validações seguindo as mesmas condições cromatográficas e alterando apenas o preparo de amostra e as concentrações dos analitos nas soluções. Para o método analítico utilizou-se como diluente a fase móvel selecionada e concentrações baseadas em um estudo de dissolução seguido de diluição necessária para ideal detecção do equipamento utilizado. Já para o método bioanalítico o diluente utilizado foi solução HBSS.

Para cada validação, foram realizados os ensaios de seletividade, linearidade, faixa de trabalho, precisão, exatidão, estabilidade dos analitos e determinação dos limites de detecção e quantificação. Avaliou-se ainda, seguindo o método analítico a robustez do método desenvolvido.

4.2.2.1 Seletividade

A avaliação da seletividade foi realizada por meio da análise dos resultados obtidos com injeções em triplicata de soluções a serem empregadas nos testes de dissolução, solubilidade, doseamento e estudo de permeabilidade, conforme apresentado na Tabela 7. Avaliou-se a presença de interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos e a intensidade desse sinal. As áreas sob os picos cromatográficos correspondentes a interferentes foram comparadas aquelas obtidas para solução de NAP e SUM, não devendo ser superior a 2%.

Como forma de comprovar a capacidade do método em separar os analitos de interesse de possíveis produtos de degradação realizou-se estudo de degradação forçada submetendo-se as amostras a hidrólise ácida, hidrólise alcalina, oxidação, fotólise e calor. As condições do teste estão descritas na Tabela 7.

Tabela 7 – Preparo e composição das soluções injetadas na avaliação da seletividade do método

Solução	Preparo
Branco - Meio pH 1,2	Transferiram-se 200 µL de fluido gástrico simulado sem enzimas pH 1,2 para balão de 10 mL, completou o volume com fase móvel e homogeneizou-se.
Branco - Meio pH 4,5	Transferiram-se 200 µL de solução tampão acetato 0,05 M pH 4,5 para balão de 10 mL, completou o volume com fase móvel e homogeneizou-se.
Branco - Meio pH 6,8	Transferiram-se 200 µL de fluido intestinal simulado sem enzimas pH 6,8 para balão de 10 mL, completou o volume com fase móvel e homogeneizou-se.
Branco - Meio pH 7,5	Transferiram-se 200 µL de fluido intestinal simulado sem enzimas pH 7,5 para balão de 10 mL, completou o volume com fase móvel e homogeneizou-se.
Branco - Meio HBSS	Meio HBSS
Branco - Fase móvel	36% de acetonitrila e 64% de solução de acetato de amônio 4 mM com pH ajustado para 4,9 com com ácido acético glacial
Branco - Placebos	Pesou-se quantidade de placebo equivalente a quantidade em comprimidos transferiu-se para balão de 50 mL, solubilizou-se e preencheu-se do volume com fase móvel. Transferiu-se 1,0 mL, da solução obtida, para balão de 10 mL e completou-se o volume com o mesmo diluente
Hidrólise ácida	Prepararam-se soluções de NAP, SUM e associação dos fármacos em solução de ácido clorídrico 1 M, e acompanhou por 3 dias em temperatura ambiente e sob aquecimento o nível de degradação.
Hidrólise alcalina	Prepararam-se soluções de NAP, SUM e associação dos fármacos em solução de hidróxido de sódio 1 M, e acompanhou por 3 dias em temperatura ambiente e sob aquecimento o nível de degradação.
Oxidação	Prepararam-se soluções de NAP, SUM e associação dos fármacos em solução de peróxido de hidrogênio 3%v/v, e acompanhou por 3 dias em temperatura ambiente e sob aquecimento o nível de degradação.
Fotólise	Mantiveram-se os fármacos, placebos e comprimidos por 5 dias em câmara de fotoestabilidade (contendo luz ultravioleta e visível).
Calor	Mantiveram-se os fármacos por 5 dias a 50°C em estufa.
Soluções amostra	Pesaram-se exatamente cerca de 10,00 mg de fármacos e transferindo-se para balão de 50 mL, solubilizou-se e preencheu-se do volume com fase móvel. Transferiu-se 555 µL para NAP e 132 µL para SUM, da solução obtida, para balão de 10 mL e completou-se o volume com o mesmo diluente
Soluções padrão	Pesaram-se exatamente cerca de 10,00 mg de substância química de referência (SQR) e transferindo-se para balão de 50 mL, solubilizou-se e preencheu-se o volume com fase móvel. Transferiu-se 555 µL para NAP e 132 µL para SUM, da solução obtida, para balão de 10 mL e completou-se o volume com o mesmo diluente

Os placebos referente aos comprimidos utilizados nos estudos de dissolução, foram

preparados com a mistura dos componentes descritos na bula dos produtos em proporções comumente empregadas de acordo com a função esperada do excipiente. Tais proporções foram definidas após pesquisa bibliográfica (ROWE *et. al*, 2012). Nas Tabelas 8, 9 e 10 estão demonstradas as composições de placebos usados nos estudos para cada medicamento, levando-se em consideração o peso médio dos comprimidos (ver item 4.2.4.1).

Tabela 8 – Composição provável de formulação para comprimidos de IMIGRAN® 50 mg

Componentes da Fórmulação	Função esperada	% Esperada	Quantidade esperada (mg)
Succinato de sumatriptano	Fármaco	22,94	70,00
Lactose monoidratada	Diluyente	18,78	57,29
Lactose	Diluyente	18,78	57,30
Celulose microcristalina	Diluyente/ Desintegrante	30,00	91,53
Croscarmelose sódica	Desintegrante	3,00	9,15
Estearato de magnésio	Lubrificante	1,50	4,57
Opadry rosa (hipromelose, dióxido de titânio, triacetina, óxido de ferro vermelho)	Revestimento	5,00	15,25

Tabela 9 – Composição provável de formulação para comprimidos de FLANAX® 275 mg

Componentes da Fórmulação	Função esperada	% Esperada	Quantidade esperada (mg)
Naproxeno sódico	Fármaco	66,60	275,00
Celulose microcristalina	Diluyente Desintegrante	22,90	94,53
Povidona	Agente ligante	4,00	16,52
Estearato de magnésio	Lubrificante	1,50	6,19
Hipromelose	Agente de revestimento	3,75	15,48
Dióxido de titânio	Agente de revestimento	0,40	1,65
Macrogol	Agente de revestimento	0,40	1,65
Talco	Antiagregante	0,45	1,86
Laca azul	Corante	-	-
Água purificada	-	-	-

Tabela 10 – Composição provável de formulação para comprimidos de SUMAXPRO® 50-500 mg

Componentes da Formulação	Função esperada	% Esperada	Quantidade esperada (mg)
Succinato de sumatriptano	Fármaco	7,23	70,00
Naproxeno sódico	Fármaco	51,63	500,00
Celulose microcristalina	Diluyente/ Desintegrante	13,82	133,83
Lactose monoidratada	Diluyente	13,82	133,83
Povidona	Agente ligante	4,00	38,73
Crospovidona	Desintegrante	1,50	14,53
Croscarmelose sódica	Desintegrante	1,50	14,53
Estearato de magnésio	Lubrificante	1,50	14,53
Hipromelose	Agente de revestimento	3,75	36,30
Macrogol	Agente de revestimento	0,62	6,00
Talco	Antiaglomerante	0,63	6,10
Laca azul brilhante	Corante	-	-

A pureza espectral dos picos cromatográficos foi determinada empregando-se detector com arranjos de diodos (DAD). Desse modo, pode-se assegurar que o sinal obtido nos tempos de retenção relativos a NAP e SUM, advém exclusivamente ou majoritariamente desses fármacos.

4.2.2.2 Linearidade

A linearidade da faixa de trabalho foi avaliada por meio da análise dos resultados obtidos com a injeção de soluções com concentrações crescentes dos analitos NAP e SUM. Três curvas distintas foram construídas e as amostras injetadas aleatoriamente. Foi determinada a linearidade na faixa de concentração esperadas para os estudos de solubilidade, doseamento e dissolução, e a linearidade na faixa esperada para o método empregado para quantificação das amostras provenientes dos estudos de permeabilidade *in vitro*.

As respostas cromatográficas obtidas nos estudos foram plotadas graficamente em função das concentrações das soluções analisadas. Valores considerados dispersos (*outliers*) foram determinados por meio do teste de resíduo padronizado de *Jackknife*, considerando-se para tal um nível de significância de 5%. A exclusão desses valores

ocorreram apenas quando necessário e foi menor que 22% do total de dados originais, sendo excluído no máximo dois pontos por nível de concentração. (SOUZA, 2007).

Os resíduos foram avaliados estatisticamente quanto: a normalidade pelo teste de Ryan-Joiner; a independência pelo teste de Durbin-Watson; e a homocedasticidade usando o teste de Brown ou Levene modificado. A regressão foi estimada pelo Método dos Mínimos Quadrados e avaliada sua significância e o desvio da linearidade por meio do teste ANOVA. A equação da reta foi determinada e avaliou-se a relação entre as variáveis por meio dos coeficientes de correlação (r) e determinação (r^2), sendo que r deve ser maior que 0,990 (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005; SOUZA, 2007).

4.2.2.2.1 Linearidade do método para estudos de solubilidade, doseamento e dissolução

Devido a grande extensão da faixa de trabalho necessária nos estudos de perfis de dissolução foi necessário um número elevado de concentrações por curva, totalizando quatorze pontos. Na Tabela 11 está representado o preparo das soluções contendo diferentes soluções de NAP e SUM.

Tabela 11 – Preparo das soluções de contendo NAP e SUM para avaliação da linearidade do método analítico empregado em estudos de solubilidade, doseamento e dissolução

Concentração de NAP ($\mu\text{g/mL}$)	Volume de solução padrão estoque NAP 100 $\mu\text{g/mL}$ (μL)	Concentração de SUM ($\mu\text{g/mL}$)	Volume de solução padrão estoque SUM 20 $\mu\text{g/mL}$ (μL)	Diluyente (fase móvel) q.s.p (mL)
0,50	250	0,10	250	50
1,50	750	0,25	625	50
3,00	300	0,50	250	10
4,50	450	0,75	375	10
5,50	550	1,00	500	10
6,50	650	1,25	625	10
7,50	750	1,50	750	10
8,50	850	1,75	875	10
9,50	950	2,00	1000	10
10,50	1050	2,25	1125	10
11,50	1150	2,50	1250	10
12,50	1250	2,75	1375	10
13,50	1350	3,00	1500	10
14,50	1450	3,25	1625	10

A solução padrão estoque de NAP foi preparada transferindo-se exatamente cerca de 10 mg de SQR para balão volumétrico de 2 mL. Realizou-se a solubilização e completou-se o volume com diluente (fase móvel) e homogeneizou-se. Pipetou-se 1 mL da solução obtida e transferiu para balão de 50 mL, seguindo-se de solubilização e aferição do menisco com o mesmo diluente. A solução obtida foi utilizada nas diluições demonstradas na Tabela 11.

Já a solução padrão estoque de SUM foi preparada transferindo-se exatamente cerca de 10 mg de SQR para balão volumétrico de 10 mL. Realizou-se a solubilização, completou-se o volume com diluente (fase móvel) e homogeneizou-se. Pipetou-se 1 mL da solução obtida e transferiu para balão de 50 mL, seguindo-se de solubilização e aferição do menisco com o mesmo diluente. A solução obtida foi utilizada nas diluições demonstradas na Tabela 11. Todas as soluções foram injetadas em cromatógrafo de forma aleatória evitando-se erros por efeitos residuais do equipamento.

4.2.2.2.2 Linearidade do método para estudos de permeabilidade *in vitro*

Com a grande extensão da faixa de trabalho necessária no estudo de permeabilidade celular foi necessário um número elevado de concentrações por curva, totalizando treze pontos. Devido às limitações do estudo, incluindo saturação da superfície celular e a sensibilidade do cromatógrafo usado, a faixa de trabalho de NAP e SUM proposta é a mesma para esses dois fármacos. Na Tabela 12 está representado o preparo das soluções contendo diferentes soluções de NAP e SUM.

Tabela 12 – Preparo das soluções de contendo NAP e SUM para avaliação da linearidade do método analítico empregado em estudo de permeabilidade celular

Concentração de NAP (ng/mL)	Volume de solução padrão estoque NAP 20 µg/mL (µL)	Concentração de SUM (ng/mL)	Volume de solução padrão estoque SUM 20 µg/mL (µL)	Diluyente (HBSS) q.s.p (mL)
50	25	50	25	10
150	75	150	75	10
250	125	250	125	10
350	175	350	175	10
450	225	450	225	10
550	275	550	275	10
650	325	650	325	10
750	375	750	375	10
850	425	850	425	10
950	475	950	475	10
1050	525	1050	525	10
1500	750	1500	750	10
2000	1000	2000	1000	10

As soluções padrão estoque de NAP e de SUM foram preparadas transferindo-se exatamente cerca de 1,0 mg de cada SQR para balões volumétricos de 50 mL. Realizou-se a solubilização e completou-se o volume com diluyente (meio HBSS) e homogeneizou-se. As soluções obtidas foram utilizadas nas diluições demonstradas na Tabela 12. As soluções de diferentes concentrações foram injetadas em cromatógrafo de forma aleatória evitando-se erros por efeitos residuais do equipamento.

4.2.2.3 Precisão

A avaliação da precisão foi feita por uma série de determinações em dois dias distintos por dois analistas diferentes, como forma de avaliar a repetibilidade e a precisão intermediária.

Para o método a ser usado no estudo de permeabilidade, uma terceira série de determinações foi feita. Em cada série usou-se quatro concentrações, baixa, duas médias e alta, com três replicas cada nível. Por série, foram preparadas três soluções estoque transferindo-se exatamente cerca de 10 mg de insumo farmacêutico ativo

para balão volumétrico de 50 mL. Realizou-se a solubilização e completou-se o volume com diluente (meio HBSS) e homogeneizou-se. Pipetou-se 1 mL da solução obtida, transferiu-se para balão de 10 mL e completou-se o volume com o mesmo diluente. A solução obtida foi utilizada nas diluições demonstradas na Tabela 13.

Tabela 13 – Preparo das soluções de contendo NAP e SUM para avaliação da precisão do método analítico empregado em estudo de permeabilidade celular

Concentração de NAP (ng/mL)	Volume de solução estoque NAP 20 µg/mL (µL)	Concentração de SUM (µg/mL)	Volume de solução estoque SUM 20 µg/mL (µL)	Diluente (HBSS) q.s.p (mL)
100	50	100	50	10
500	250	500	250	10
1000	500	1000	500	10
2000	1000	2000	1000	10

Para o método analítico de solubilidade, doseamento e dissolução a precisão foi avaliada por meio do preparo de seis réplicas da concentração de trabalho dos fármacos. Cada analista, em dias diferentes, por seis vezes, transferiu exatamente cerca de 10,70 mg de pool de comprimidos revestidos de SUMAXPRO® 85-500 mg para balão volumétrico de 50 mL. Realizou-se a solubilização e completou-se o volume com diluente (fase móvel) e homogeneizou-se. Pipetou-se 1 mL da solução obtida e transferiu para balão de 10 mL, seguindo-se de solubilização e aferição do menisco com o mesmo diluente. Com o auxílio de filtros de seringa de celulose regenerada (CR) 0,45 µm transferiu-se para vial com tampa.

Todas as soluções preparadas foram injetadas em CLAE-DAD. As áreas correspondentes aos picos cromatográficos dos fármacos foram usadas para calcular a concentração real das soluções preparadas. O cálculo foi realizado usando-se as equações da reta obtida no teste de linearidade. O desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), foi utilizado para expressar a precisão do método, sendo calculado com base em todos os valores obtidos, conforme a equação (6).

$$DPR \text{ ou } CV\% = \frac{\text{Desvio padrão} \times 100}{\text{Concentração média experimental}} \quad (6)$$

A concentração média experimental foi dada usando a equação da reta correspondente obtida no teste de linearidade. Não foram aceitos valores superiores a 15% para o método de permeabilidade, exceto na menor concentração, em que aceitou-se 20% (BRASIL,2003). Para o método analítico não aceitaram-se valores superiores a 2% (AOAC, 2016).

4.2.2.4 Exatidão

A avaliação da exatidão foi feita por meio de doze determinações em quatro concentrações: duas baixas, uma média e uma alta, com três réplicas em cada nível.

Para o método de permeabilidade, avaliou-se por meio de preparações contendo padrão e IFA. As soluções padrão estoque de NAP e de SUM foram preparadas conforme descrito no teste de linearidade (item 4.2.2.2.2). Adicionalmente, preparou-se solução estoque contendo os IFAs conforme descrito no teste de precisão (item 4.2.2.3). As soluções obtidas foram utilizadas nas diluições demonstradas na Tabela 14.

Tabela 14 – Preparo das soluções de contendo NAP e SUM para avaliação da exatidão do método analítico empregado em estudo de permeabilidade celular

Concentração de NAP e SUM (ng/mL)	Volume de solução padrão estoque SUM 20 µg/mL (µL)	Volume de solução padrão estoque NAP 20 µg/mL (µL)	Volume de solução IFA estoque 20 µg/mL (µL)	Diluyente (HBSS) q.s.p (mL)
100	25	25	25	10
500	225	225	25	10
1000	475	475	25	10
2000	975	975	25	10

Para o método de solubilidade, doseamento e dissolução adicionou-se solução placebo a concentrações conhecidas de NAP e SUM. O preparo das soluções estoque padrão foram realizados conforme descrito no teste de linearidade (item 4.2.3.2.1). A solução placebo foi preparada transferindo-se exatamente cerca de 4,40 de uma mistura de excipientes (placebo) correspondentes a comprimidos revestidos usado em SUMAXPRO® 85-500 mg. As soluções obtidas foram utilizadas nas diluições demonstradas na Tabela 15.

Tabela 15 – Preparo das soluções de contendo NAP e SUM para avaliação da exatidão do método analítico empregado em estudos de doseamento, dissolução e solubilidade

Concentração de NAP (µg/mL)	Volume de solução padrão estoque NAP 100 µg/mL (µL)	Concentração de SUM (µg/mL)	Volume de solução padrão estoque SUM 20 µg/mL (µL)	Volume de solução placebo estoque 88 µg/mL (µL)	Diluyente (fase móvel) q.s.p (mL)
0,50	250	0,10	250	10	50
6,50	650	1,25	625	1	50
11,50	1150	2,50	1250	1	10
14,50	1450	3,25	1625	1	10

O Erro Padrão Relativo (EPR%) ou desvio da recuperação, foi utilizado para expressar a exatidão do método, sendo calculado com base em todos os valores obtidos, conforme a equação (7).

$$EPR\% = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal}) \times 100}{(\text{Valor nominal}) \times 100} \quad (7)$$

A concentração média experimental foi obtida usando a equação da reta correspondente obtida no teste de linearidade. Para o método empregado em estudos de permeabilidade não foram admitidos valores fora da faixa de $\pm 15\%$ do valor nominal, exceto para a menor concentração, para o qual não se admitiram valores fora da faixa de $\pm 20\%$ do valor nominal (BRASIL, 2012). Para o método analítico não aceitaram-se valores superiores a 2% (AOAC,2016).

4.2.2.5 Faixa de trabalho

A faixa de trabalho determinada foi aquela linear, precisa e exata estabelecida pelos testes de linearidade, precisão e exatidão.

Para o estudo de permeabilidade a faixa escolhida baseou-se nas concentrações usuais nesse estudo, considerando a não saturação da permeação dos fármacos, admitindo-se, dessa forma, um valor de no máximo 10% em relação à concentração do fármaco adicionado no compartimento doador (STORPIRTIS *et. al.*, 2009).

Já para os estudos de doseamento, dissolução e solubilidade a faixa de concentração baseou-se no estudo de perfil de dissolução considerando-se o preconizado na RDC 166, 20% abaixo da menor concentração esperada e 20% acima da maior concentração. Sendo assim uma faixa de aproximadamente 4 a 130% foi proposta para esses estudos.

4.2.2.6 Estabilidade

A estabilidade de NAP e SUM nos métodos propostos foi demonstrada a temperatura ambiente e a 8°C, ambos por 24 horas. Adicionalmente para o método de estudo de permeabilidade avaliou-se a estabilidade após dois ciclos de congelamento (a -70 °C) e descongelamento (temperatura ambiente). O período de congelamento em cada ciclo foi de no mínimo 12 horas. Foram utilizadas soluções preparadas conforme o estudo de exatidão (item 4.2.2.4). Para o método analítico avaliaram-se as concentrações de 2,5 µg/mL para SUM e 11,5 µg/mL para NAP. Já para o método bioanalítico, usaram-se três concentrações empregadas na exatidão (100, 500 e 1000 ng/mL), supondo ser a faixa mais próxima das concentrações obtidas.

Um desvio menor que 2% em relação ao valor nominal foi esperado após o período de condicionamento para o método dos estudos de doseamento, dissolução e solubilidade. Para o estudo de permeabilidade aceitou-se um desvio de até 15%.

4.2.2.7 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos métodos analítico e bioanalítico foram estabelecidos por meio de parâmetros da curva analítica usando as equações 8 e 9 demonstradas a seguir:

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{IC} \quad (8)$$

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{IC} \quad (9)$$

Em que: IC corresponde a inclinação da curva de calibração e σ ao desvio padrão, obtido pelo intercepto com o eixo Y das três curvas de calibração executadas no teste de linearidade.

A partir dos valores obtidos preparou-se soluções padrão nas concentrações estabelecidas de LQ e injetou-se em CLAE-DAD seguindo o método desenvolvido. Para o sinal obtido avaliou-se a razão sinal-ruído devendo essa ser superior a 10:1 para LQ.

4.2.2.8 Robustez

A avaliação da robustez do método foi realizada, usando-se o teste de Youden. Esse teste permite avaliar várias alterações nas condições analíticas ao mesmo tempo, sendo o efeito de cada alteração avaliada ao final do teste (INMETRO, 2007).

Sete parâmetros analíticos foram selecionados e variados em valores acima (representado por letras maiúsculas) e abaixo (letras minúsculas) dos estabelecidos no método analítico desenvolvido (valores nominais). Oito ensaios foram realizados sendo quatro realizados com parâmetros abaixo do valor nominal e quatro acima.

Os parâmetros estabelecidos para avaliação da robustez no método cromatográfico para quantificação de NAP e SUM, e as variações propostas, estão representados na Tabela 16. A combinação desses parâmetros nos oito testes foi realizada conforme apresentado na Tabela 17, sendo os resultados de cada um dos testes expresso pelas letras de s a z.

Tabela 16 - Parâmetros e variações para avaliação da robustez de método cromatográfico para quantificação de NAP e SUM

Letra	Parâmetro avaliado	Varição acima	Nominal	Varição abaixo
A/a	Proporção de acetonitrila na fase móvel (%)	37-A	36	35-a
B/b	Temperatura da coluna (°C)	37-B	35	33-b
C/c	Fluxo de fase móvel (mL/min)	1,1-C	1,0	0,9-c
D/d	Comprimento de onda (nm)	234-D	232	230-d
E/e	Marca da acetonitrila	JTBaker-E	JTBaker	Vetec-e
F/f	Tempo da amostra no ultrassom (min)	20-F	15	10-f
G/g	Marca e modelo do cromatógrafo	Thermo-G	Thermo	Agilent-g

Tabela 17 - Matriz de combinação fatorial os parâmetros analíticos para avaliação da robustez pelo teste de Youden

Parâmetro avaliado	Combinação fatorial							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Proporção de acetonitrila na fase móvel (%)	A	A	A	A	a	a	a	a
Temperatura da coluna (°C)	B	B	b	B	B	B	b	b
Fluxo de fase móvel (mL/min)	C	c	C	C	C	c	C	c
Comprimento de onda (nm)	D	D	d	D	d	d	D	D
Marca da acetonitrila	E	e	E	E	e	E	e	E
Tempo da amostra no ultrassom (min)	F	f	f	F	F	f	f	F
Marca e modelo do cromatógrafo	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	s	t	u	V	w	x	y	z

Em cada teste injetou-se em quadruplicata soluções padrão e amostra. Para cada cromatograma avaliou-se as áreas, tempo de retenção, assimetria e número de pratos teóricos dos picos cromatográficos referente a NAP e SUM. Calculou-se ainda o teor em porcentagem (%) da amostra baseando-se na resposta obtida para a solução padrão.

A solução padrão contendo NAP e SUM foi preparada pipetando-se 1,11 mL de uma solução estoque de NAP a 100 µg/mL e 1,32 mL de solução estoque de SUM a 20 µg/mL e transferindo-se para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com diluente (fase móvel), homogeneizou-se e transferiu-se a solução para vial.

Já a solução amostra foi obtida transferindo-se exatamente cerca de 10,80 mg de pool de comprimidos revestidos de SUMAXPRO® 85-500 mg para balão volumétrico de 50 mL. Realizou-se a solubilização e completou-se o volume com diluente (fase móvel) e

homogeneizou-se. Pipetou-se 1 mL da solução obtida e transferiu-se para balão de 10 mL, seguindo-se de solubilização e aferição do menisco com o mesmo diluente. Com auxílio de filtros de seringa de CR 0,45 µm transferiu-se a solução para vial.

4.2.3 Doseamento e identificação por IV dos insumos farmacêuticos ativos naproxeno sódico e succinato de sumatriptano

Os testes de doseamento e identificação dos IFAs NAP e SUM utilizados no estudo de solubilidade, foram realizadas como forma de caracterização e comprovação da qualidade dos insumos, afirmada pelos fornecedores, conforme certificados de análise (ANEXO A e B).

As matérias-primas adquiridas foram submetidas a identificação por espectrofotometria na região do infra-vermelho e o espectro obtido foi comparado com aquele gerado a partir da análise com padrões USP dos fármacos. Já para a realização do doseamento, usou-se o método analítico desenvolvido e validado para quantificação simultânea desses fármacos (itens 4.2.1 e 4.2.2).

O preparo das soluções foi realizado em triplicata baseado nas concentrações esperadas no estudo de dissolução (considerando 100% do fármaco e as diluições propostas). Desse modo pesou-se, exatamente, cerca de 1,36 mg de SUM e 5,50 mg de NAP (previamente dessecados) e transferiu-se para um balão de 50 mL. Solubilizou-se os fármacos em diluente (fase móvel), deixou-se em ultrassom por 15 minutos, completou-se o volume e homogeneizou. Da solução obtida, pipetou-se 1 mL e transferiu-se para balão de 10 mL. Completou-se o volume com o diluente e homogeneizou. A solução obtida foi filtrada com auxílio filtros de seringa de CR 0,45 µm e injetadas em sistema CLAE-DAD.

Soluções padrão foram preparadas nas concentrações 80%, 100% e 120% daquelas esperadas para as amostras. As áreas sobre os picos cromatográficos relativos a NAP e SUM nas amostras foram comparadas aquelas obtidas para soluções padrão contendo os fármacos. Com esses dados calculou-se as concentrações reais das amostras que deveriam estar de 98 a 102% dos valores esperados (USP, 2016).

4.2.4 Avaliação do peso médio, teor, dureza e desintegração de comprimidos revestidos de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano isolados e em dose fixa combinada

Os medicamentos utilizados no estudo de perfil de dissolução foram avaliados quanto ao peso médio, teor, dureza e desintegração. Esses parâmetros permitem a verificação da qualidade desses medicamentos para emprego nos estudos e ainda conhecer algumas características dos produtos.

Os medicamentos testados foram: FLANAX® 275 mg, IMIGRAN® 50 mg, SUMAXPRO® 50-500mg, SUMAXPRO® 85-500 mg e Naproxeno sódico 550 mg.

4.2.4.1 Determinação de peso médio dos comprimidos

A determinação de peso médio dos comprimidos permite avaliar a homogeneidade das amostras e foi avaliada pesando-se individualmente 20 unidades e em seguida fazendo-se a média dos valores obtidos. De acordo com testes prévios, sabe-se que todos os comprimidos pesam acima de 300 mg e portanto, o limite de variação dos comprimidos foi de $\pm 5,0\%$ (FARMACOPEIA, 2010).

4.2.4.2 Avaliação do teor dos comprimidos

A avaliação do teor dos comprimidos isolados e em dose fixa combinada de NAP e SUM, foi realizada usando o método analítico desenvolvido e validado para quantificação simultânea desses fármacos (itens 4.2.2 e 4.2.3).

O preparo das soluções foi realizado pesando-se quantidade de medicamento, previamente pulverizado, correspondente a massa de fármaco presente nas amostras com 100% de dissolução, de acordo com o peso médio obtido (item 4.2.4.1). Adicionou-se cerca de 25 mL de diluente e manteve-se em ultrassom por 15 minutos. Seguiu-se com as diluições propostas, conforme descrito na Tabela 18.

Tabela 18 – Preparo de soluções para doseamento dos medicamentos

Medicamento	Massa pesada (mg)	Balão 1* (mL)	Volume diluído (mL)	Diluyente	Balão 2** (mL)	Diluyente	Concentração (µg/mL)
FLANAX® 275 mg	4,60	50	1	Fase móvel	10	Fase móvel	NAP = 6,13
IMIGRAN® 50 mg	3,45						SUM = 1,58
SUMAXPRO® 50-500 mg	10,80						NAP = 11,15 SUM = 1,56
SUMAXPRO® 85-500 mg	10,80						NAP = 11,09 SUM = 2,64
Naproxeno sódico 550 mg	9,20						NAP = 12,27

*Balão volumétrico utilizado para solução estoque contendo os comprimidos;

**Balão volumétrico utilizado para solução final contendo os comprimidos.

As soluções descritas foram preparadas em triplicata, mantidas em ultrassom por 15 minutos e filtradas com auxílio de filtros de seringa de CR 0,45 µm e injetadas em sistema CLAE-DAD. Soluções padrão foram preparadas nas concentrações 80%, 100% e 120% daquelas esperadas para as amostras. As áreas sobre os picos cromatográficos relativos a NAP e SUM nas amostras foram comparadas àquelas obtidas para soluções padrão contendo os fármacos. Com esses dados calculou-se as concentrações reais das amostras que deveriam estar de 90 a 110% dos valores esperados (USP, 2016).

4.2.4.3 Avaliação da dureza dos comprimidos

O teste de dureza consiste em submeter os comprimidos a uma força aplicada diametralmente, de modo a permitir a avaliação da resistência do mesmo. Para tal, 10 comprimidos, foram individualmente testadas em um durômetro, sendo a força necessária para quebra dos comprimidos medida em newtons (N) (FARMACOPEIA, 2010).

Com o teste objetivou-se apenas conhecer o comportamento dos comprimidos, que por serem revestidos sofrem menores impactos quando submetidos a resistências mecânicas. O teste de friabilidade não é portanto, indicado já que o revestimento garante a resistência a abrasão.

4.2.4.4 Avaliação da desintegração dos comprimidos

O teste de desintegração foi realizado com 6 unidades dos comprimidos mantidos imersos em água a 37 ± 1 °C, sob movimento vertical em desintegrador, por 30 minutos. Após esse período todas as unidades testadas deveriam estar completamente desintegradas.

4.2.5 Estudo de solubilidade dos insumos farmacêuticos ativos naproxeno sódico e succinato de sumatriptano isolados e em associação

A solubilidade em equilíbrio dos insumos farmacêuticos ativos foi determinada pelo método da agitação orbital em frascos (*shake flask*). Os meios utilizados para o estudo abrangeram a faixa de pH fisiológico, sendo usado para tal o fluido gástrico simulado sem enzimas pH 1,2, solução tampão acetato 0,05 M pH 4,5, fluido intestinal simulado sem enzimas pH 6,8 e 7,5, além de água destilada. O preparo dos meios está descrito na Tabela 19.

Tabela 19 - Preparo dos meios utilizados no estudo de solubilidade em equilíbrio dos IFAs NAP e SUM

Meio	Preparo
Água destilada	-
Fluido gástrico simulado sem enzimas pH 1,2	Transferir 2 g de cloreto de sódio e 7 mL ácido clorídrico para balão volumétrico de 1000 mL. Dissolver em água e completar o volume com o mesmo solvente. Ajustar o pH se necessário com $1,2 \pm 0,1$ com ácido clorídrico ou hidróxido de sódio 10 M.
Solução tampão acetato 0,05 M pH 4,5	Transferir 2,99 g de acetato de sódio trihidratado e 1,66 mL de ácido acético glacial para balão volumétrico de 1000 mL. Dissolver em água e completar o volume com o mesmo solvente. Ajustar o pH se necessário
Fluido intestinal simulado sem enzimas pH 6,8	Transferir 6,8 g de fosfato de potássio monobásico e 112 mL de hidróxido de sódio 0,2 M para balão volumétrico de 1000 mL. Dissolver em água e completar o volume com o mesmo solvente. Ajustar o pH se necessário
Fluido intestinal simulado sem enzimas pH 7,5	Transferir 6,8 g de fosfato de potássio monobásico e 215 mL de hidróxido de sódio 0,2 M para balão volumétrico de 1000 mL. Dissolver em água e completar o volume com o mesmo solvente. Ajustar o pH se necessário

O estudo foi realizado em incubadora com plataforma de agitação orbital com temperatura controlada em 37 ± 1 °C. A rotação escolhida foi 100 rpm. Amostras em

triplicata para cada um dos IFAs, isolados e em associação, em cada um dos meios descritos na Tabela 19, foram mantidas nas condições descritas por 30 horas.

Coletas após 6, 24 e 30 horas do início do estudo foram realizadas como forma de avaliar o equilíbrio da solução obtida. Nos tempos citados coletou-se de 1 mL de cada amostra e filtrou-se com auxílio de filtros de seringa de CR 0,45 µm. Da solução obtida, pipetou-se 125 µL e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. Completou-se o volume com diluente (fase móvel), homogeneizou-se e transferiu-se para vial com tampa. As amostras foram injetadas em triplicata em sistema CLAE-UV usando-se o método desenvolvido e validado (itens 4.2.2 e 4.2.3).

Sabendo-se que NAP é solúvel e SUM é facilmente solúvel em água (USP, 2017), para que obtivesse a saturação do meio, seria necessária uma quantidade exorbitante de IFA por amostra, o que inviabilizaria o estudo (FARMACOPEIA, 2017; USP, 2017). Desse modo, para estabelecimento da quantidade de IFA utilizado nos experimentos calculou-se conforme a equação (10), baseando-se na maior dosagem de IFA em medicamentos comercialmente disponíveis, conforme recomendações oficiais (BRASIL, 2013). Levou-se ainda em consideração as diferenças de quantidade de fármaco em medicamentos isolados e em associação de NAP e SUM.

$$\text{Massa inicial de fármaco (mg)} = \frac{\text{Maior dose comercial (mg)} \times \text{Volume de meio (mL)}}{250 \text{ (mL)}} \quad (10)$$

Embora a classificação de NAP pelo SCB seja de baixa solubilidade (Classe II), é reconhecida sua alta solubilidade em água. Desse modo, testes preliminares com os meios na faixa de pH fisiológico proposta justificaram a escolha do modo de definição da massa inicial de fármaco. Isso, devido ao fato de em valores de pH mais baixos NAP ser insolúvel, permanecendo portanto, a solução saturada conforme recomendações oficiais. Em valores de pH maiores, NAP é altamente solúvel e portanto, pode ser utilizado o cálculo baseado na maior dose comercial.

Na Tabela 20 estão sintetizados os dados gerais referentes ao estudo de solubilidade.

Tabela 20 – Dados gerais do estudo de solubilidade

IFA usado no estudo	Maior dose comercial (mg)	Quantidade de meio (mL)	Massa inicial (mg)	Meios	Rotação (rpm)	Temperatura (°C)
NAP	550	50	110	Água pH 1,2 pH 4,5 pH 6,8 pH 7,5	100	37±1
SUM	140		28			
NAP + SUM	NAP = 500 SUM = 119		NAP = 100 SUM = 23,8			

As massas iniciais foram pesadas e transferidas para erlenmeyers de 250 mL com tampa. Adicionou-se, com auxílio de pipeta volumétrica, 50 mL dos meios anteriormente citados. Homogeneizou-se e fez-se a leitura do valor de pH da solução obtida. Ao final do experimento (após 30 horas) realizou-se novamente a leitura do pH, e o valor obtido não poderia ter uma variação superior a 0,1 unidade em comparação com o pH medido no início do teste (FARMACOPEIA, 2017).

As áreas sob os picos cromatográficos relativos a NAP e SUM foram comparadas àquelas obtidas para soluções padrão (na mesma concentração esperada das amostras) contendo os fármacos. Com esses dados calculou-se as concentrações reais das amostras, que corresponde a solubilidade dos fármacos. O preparo das soluções padrão foi realizado pesando-se exatamente cerca de 10,00 mg do fármacos e transferindo-se para balão de 50 mL. A solubilização e preenchimento do volume foram feitos com diluente (fase móvel). As soluções obtidas foram diluídas conforme sintetizado na Tabela 21.

Tabela 21 - Preparo de soluções padrão para o estudo de solubilidade

Padrão usado	Volume de solução estoque pipetado (µL)	Balão volumétrico (mL)	Diluente utilizado
NAP	550	10	Fase móvel
SUM	140		
NAP + SUM	NAP = 500 SUM = 119		

A solubilidade obtida para as amostras foi utilizada para classificação dos IFAs quanto à solubilidade, de acordo com o SCB. Para tal, calculou-se a razão entre a dose máxima comercial do IFA (em mg) por administração única descrita em bula e a solubilidade calculada no estudo, conforme a fórmula (11). Razões menores ou iguais

a 250 mL indicam que o IFA é classificado como de alta solubilidade, para valores maiores que 250 mL o IFA será considerado de baixa solubilidade (FARMACOPEIA, 2017; USP, 2017).

$$D/S = \frac{\text{Maior dose comercial (mg)}}{\text{Solubilidade (mg/mL)}} \quad (11)$$

4.2.6 Estudos de dissolução em comprimidos revestidos de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano isolados e em dose fixa combinada

4.2.6.1 Estudos de perfil de dissolução com comprimidos contendo NAP e SUM

O desenvolvimento de métodos de dissolução são guiados por estudos de solubilidade em valores de pH fisiológicos, como forma de escolha dos melhores meios, e perfis de dissolução com estes meios, variando-se ainda aparatos e rotação dos mesmos (STORPIRTIS *et. al.*, 2009). Desse modo, realizou-se inicialmente perfis de dissolução nos meios de fluido intestinal simulado sem enzimas em pH 6,8 e 7,5, preparados conforme descrito na Tabela 19. Foram usados os aparatos pá e cesto, usando rotações de 50 rpm e 75 rpm, respectivamente. Em todos os testes, a temperatura do sistema foi mantida a 37 ± 1 °C.

A cada perfil de dissolução foram utilizadas 6 unidades de comprimidos revestidos sendo uma unidade por cuba, cada uma contendo 900 mL de meio de dissolução. Foram realizadas coletas manuais, sem reposição de meio, nos tempos de 5, 10, 15, 20, 30 e 60 minutos.

As alíquotas coletadas foram imediatamente filtradas com auxílio de filtros de seringa de CR 0,45 µm, com a finalidade de interromper o processo de dissolução. A solução filtrada foi diluída pipetando-se 200 µL e transferindo-se para balão de 10 mL. Completou-se o volume com diluente (fase móvel), homogeneizou-se e transferiu-se para vial com tampa. Injetou-se cada amostra em triplicata em sistema CLAE-DAD, usando-se o método desenvolvido e validado (itens 4.2.2 e 4.2.3).

Para determinação das melhores condições de estudos de dissolução contendo NAP e SUM, como escolha de meio (pH 6,8 ou 7,5), aparatos (pá ou cesto) e velocidade de rotação (50 ou 75 rpm), usou-se comprimidos revestidos SUMAXPRO® 85-500 mg. Após testes preliminares, observou-se que NAP tem dissolução mais lenta sendo portando, mais crítica. Desse modo, adicionalmente realizou-se perfis de dissolução usando-se comprimidos revestidos FLANAX® 275 mg. Portanto, para esses dois medicamentos, 4 perfis de dissolução foram realizados: pH 6,8 com pá a 50 rpm; pH 7,5 com pá a rpm; pH 6,8 com cesto a 75 rpm; e pH 7,5 com cesto a 75 rpm.

Com a melhor condição estabelecida, após avaliações visuais dos perfis obtidos, realizou-se o perfil de dissolução para IMIGRAN® 50 mg, SUMAXPRO® 50-500 mg e Naproxeno sódico 550 mg. Para IMIGRAN® 50 mg, SUMAXPRO® 85-500 mg e FLANAX® 275 mg, realizou-se ainda perfis nos meios fluido gástrico simulado sem enzimas pH 1,2 e solução tampão acetato 0,05 M pH 4,5. Esses testes foram executados como forma de comparar os perfis obtidos para os fármacos isolados e em associação em diferentes concentrações e formulações encontradas no mercado.

As áreas sob os picos cromatográficos relativos a NAP e SUM foram comparadas àquelas obtidas para soluções padrão nas concentrações de 80, 100 e 120% daquela esperada das amostras contendo os fármacos. Com esses dados calculou-se as concentrações reais das amostras, que corresponde à fração dissolvida de fármaco a partir do medicamento. O preparo das soluções padrão foi realizado pesando-se exatamente cerca de 10,00 mg do fármaco e transferindo-se para balão de 50 mL. A solubilização e preenchimento do volume foram feitos com diluente (fase móvel). As soluções obtidas foram diluídas conforme sintetizado na Tabela 22.

Tabela 22 – Preparo de soluções padrão para estudos de perfil de dissolução

Amostra relacionada	Volume de solução estoque pipetado (µL)			Balão volumétrico (mL)	Dilúente utilizado
	80%	100%	120%		
FLANAX® 275 mg	NAP = 245	NAP = 306	NAP = 367	10	Fase móvel
IMIGRAN® 50 mg	SUM = 62	SUM = 78	SUM = 94		
SUMAXPRO® 50-500 mg	NAP = 444 SUM = 62	NAP = 555 SUM = 78	NAP = 666 SUM = 94		
SUMAXPRO® 85-500 mg	NAP = 444 SUM = 106	NAP = 555 SUM = 132	NAP = 666 SUM = 158		
Naproxeno sódico 550 mg	NAP = 489	NAP = 611	NAP = 733		

As porcentagens dissolvidas obtidas para as seis cubas não poderiam ter desvio padrão relativo (DPR%) superior a 20% para os primeiros pontos (até 40% dos pontos de coleta, ou seja, os dois primeiros pontos) e 10% para os demais pontos (BRASIL, 2010). Plotou-se curvas das porcentagens dissolvidas em relação aos tempos de coleta e realizou-se comparações entre os perfis obtidos.

4.2.6.2 Validação do estudo de dissolução desenvolvido para NAP e SUM

Os resultados dos perfis de dissolução possibilitaram o estabelecimento de um método para estudos de dissolução contendo esses fármacos. Esse método desenvolvido foi validado como forma de comprovar sua eficiência e qualidade para empregos em comprimidos contendo NAP e SUM. A validação do método de dissolução foi realizada pelos testes de precisão e recuperação (ou exatidão).

Para a avaliação da precisão, usou-se os dados obtidos nos perfis de dissolução realizados com o método escolhido, nos tempos de coleta de 30 e 60 minutos. As porcentagens dissolvidas obtidas para as seis cubas não poderiam ter DPR% superior a 10%, indicando homogeneidade entre os resultados (BRASIL, 2010).

A recuperação foi realizada avaliando-se 10%, 70% e 120% da concentração esperada quando ocorrida a total dissolução do comprimido. Para esse estudo usou-se comprimidos de SUMAXPRO® 50-500 mg. O preparo de amostra foi realizado macerando-se os comprimidos e pesando-se quantidade equivalente as

concentrações baixa média e alta. A massa pesada foi transferida quantitativamente para cuba contendo 900 mL de meio e o teste ocorreu conforme estabelecido no método. Para cada concentração o teste foi realizado em triplicata.

Após 30 minutos, alíquotas foram coletadas e imediatamente filtradas com auxílio de filtros de seringa de CR 0,45 µm. A solução filtrada foi diluída pipetando-se 200 µL e transferindo-se o mesmo para balão de 10 mL. Completou-se o volume com diluente (fase móvel), homogeneizou-se e transferiu-se para vial com tampa. Injetou-se cada amostra em triplicata em sistema CLAE-DAD, usando-se o método desenvolvido e validado (itens 4.2.2 e 4.2.3). As concentrações e massa pesada no estudo estão sumarizadas na Tabela 23.

Tabela 23 – Condições de preparo do teste de recuperação

%	Fármacos	Concentração (µg/mL)	Massa pesada (mg)
10	NAP	1,11	96,88
	SUM	0,16	
70	NAP	7,78	677,87
	SUM	1,09	
120	NAP	13,3	1162,06
	SUM	1,87	

Para cada amostra calculou-se o EPR% que deve ser inferior a 10% para o método ser considerado válido.

Para avaliar estabilidade e máxima dissolução realizou-se dissolução por 120 minutos com o método escolhido, e o resultado obtido foi comparado ao determinado no período limite estabelecido. Como forma de garantir que os filtros de seringa de CR 0,45 µm não interferiam no estudo injetou-se soluções padrão filtradas e não filtradas e comparou-se os dois resultados obtidos.

Como modo de avaliar a interferência de bolhas de ar na dissolução, realizou-se perfil comparativo usando-se comprimidos de SUMAXPRO® 50-500 mg no meio, com e sem processo de desaeração. Para desaeração do meio, aqueceu-se o meio a 41 °C,

filtrou-se sob vácuo com agitação e verteu-se o filtrado suavemente para cuba de dissolução (USP, 2016).

4.2.6.3 Proposta de estudo de Correlação In Vitro In Vivo

Um estudo farmacocinético de NAP e SUM foi realizado em 2014, por BRÊTAS e colaboradores (BRÊTAS *et al.*, 2016). No momento de realização do estudo, no Brasil, ainda não havia comercialização de comprimidos com dose fixa combinada dos fármacos. Portanto, foi usado medicamento referência dos dois IFAs: FLANAX® 275 mg e IMIGRAN® 50 mg.

O estudo foi conduzido com quatro voluntários sadios, sendo dois indivíduos do sexo masculino e dois indivíduos do sexo feminino. Não houve restrições quanto ao grupo étnico e possuíam idade de 18 a 50 anos e índice de massa corpórea (IMC) compreendido na faixa de 18,50 a 24,90, podendo variar até 15% quanto ao limite superior (18,50 a 28,63). Exames clínicos pré e pós-estudo foram realizados e os voluntários foram devidamente orientados. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, e foi conduzido de acordo com as diretrizes e normas de pesquisa envolvendo seres humanos vigentes no período do estudo: Resoluções RE nº 466 de 12 de dezembro de 2012, RE nº 251 de 07 de agosto de 1997 do Conselho Nacional de Saúde e RE nº 1170 de 19 de abril de 2006 da ANVISA.

Aos voluntários foram administrados, por via oral, um comprimido revestido de FLANAX® 275 mg (Roche) e um comprimido revestido de Imigran® 50 mg (GlaxoSmithKline). Coletas por meio de cateter intravenoso foram realizadas nos tempos de: 0h00 (pré-dose), 0h15, 0h30, 1h, 1h30, 2h, 2h30, 3h, 3h30, 4h, 5h e 6h (após a administração do medicamento). Após a coleta, separou-se o plasma em tubos criogênicos, os quais foram transferidos para freezer a -70 °C.

As amostras foram avaliadas no Laboratório de Controle de Qualidade Bioanalítico da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) por cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas. As concentrações plasmáticas obtidas ao longo do tempo foram usadas para cálculos de parâmetros

farmacocinéticos. Os dados obtidos nesse estudo foram tratados matematicamente, pelo modelo Wagner- Nelson, por serem monocompartimentais, a partir da equação (12), para estabelecimento da fração absorvida (EMAMI, 2006).

$$F_a = \frac{C_t + K_e \int_0^T C dt}{K_e \int_0^\infty C dt} \quad (12)$$

Em que F_a é a fração dissolvida em cada tempo t , C_t é a concentração plasmática do fármaco no tempo t e k_e é a constante de eliminação, $\int_0^T C dt$ é a integral da concentração em função do tempo.

As frações absorvidas obtidas foram plotadas graficamente com as frações dissolvidas obtidas nos perfis de dissolução, realizados com o melhor meio. A partir da curva obtida, calculou-se o coeficiente de correlação com o qual foi possível determinar o nível de correlação existente entre os testes *in vivo* e *in vitro*.

4.2.7 Estudo de permeabilidade celular de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano, isolados e em associação, usando células da linhagem CaCo-2

O estudo de permeabilidade celular foi realizado com a linhagem Caco-2. As células foram cedidas pelo Laboratório de Estudo de Permeabilidade em Culturas Celulares da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC). Para retorno da viabilidade celular foram descongeladas rapidamente em banho-maria contendo água a 37°C e transferidas para garrafas de cultivo.

4.2.7.1 Cultivo e avaliação da integridade de membranas de células da linhagem Caco-2

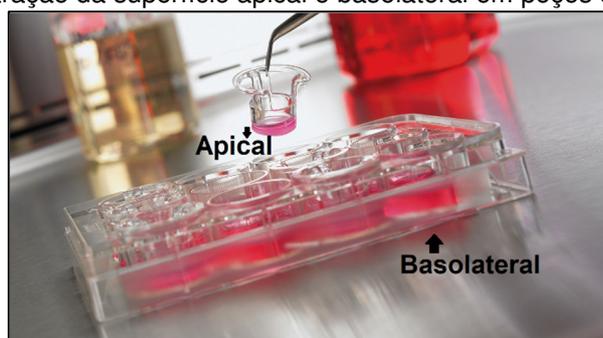
O cultivo celular foi realizado em garrafas de 75 cm² contendo meio DMEM glicosado, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução glutamina 200 mM e 1% de solução de aminoácidos. As culturas foram mantidas em estufa incubadora a 37°C

com atmosfera de CO₂ a 5% e 90% de umidade relativa. A cada dois dias o meio de cultivo foi trocado por meio novo.

Quando atingido crescimento de aproximadamente 90% de cobertura celular na parede da garrafa, realizou-se o subcultivo. Para tal, usou-se solução de Tripsina (0,25%) com EDTA (1 mM) para lavagens (1,5 mL) do tapete celular formado na parede da garrafa e posteriormente descolamento (0,5 mL) das células aderidas, mantendo-se a garrafa com a solução por 2 minutos em incubadora a 37°C. Adicionou-se 3,5 mL de meio DMEM, proporcionando uma passagem celular 4:1. Transferiu-se para garrafa nova contendo 13 mL de meio DMEM suplementado, 1 mL suspensão celular obtida, e seguiu-se o cultivo nas condições citadas.

Para realização dos estudos de permeabilidade celular transferiu-se densidade de aproximadamente 5×10^4 cel/cm², em fase lag do crescimento, para placas Transwell® contendo doze poços com suporte de policarbonato com porosidade de 0,4 µm e área a 1,12 cm² (Figura 7). O cultivo celular nas placas foi realizado com 0,5 mL de meio DMEM na porção apical da membrana celular formada e 1,5 mL do mesmo meio na porção basolateral. A cada dois dias os meios foram substituídos nas duas superfícies, até completado 21 dias de cultivo celular nas placas.

Figura 7 – Demonstração da superfície apical e basolateral em poços de placas Transwell®



Fonte: Adaptada do site www.corning.com

Durante os 21 dias de cultivo celular em placas Transwell®, ocorre diferenciação das células e formação de uma monocamada celular. Tal membrana apresenta resistividade elétrica, que foi monitorada utilizando-se minivoltímetro Milicell ERS® (marca Milipore). Os valores medidos acima de 200 Ω x cm² indicam integridade da

membrana celular e portanto viabilidade para realização do estudo de permeabilidade (STORPIRTIS *et. al.*, 2009).

4.2.7.2 Execução do estudo de permeabilidade Caco-2

O estudo foi realizado usando-se poços cuja membrana foi considerada íntegra a partir da medição da resistência elétrica transepitelial. Todo o meio DMEM foi retirado do compartimento apical e basolateral. Adicionou-se 1,5 mL de tampão HBSS na porção basolateral e 0,5 mL de solução contendo os fármacos em tampão HBSS na porção apical.

As soluções contendo os fármacos foram preparadas a partir de soluções estoque de padrão USP em tampão HBSS na concentração de 20 µg/mL. Desse modo, pipetou-se 5 mL de solução estoque e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com tampão HBSS e homogeneizou-se. Preparou-se três soluções distintas: 10 µg/mL de NAP, 10 µg/mL de SUM e 10 µg/mL de cada fármaco na mesma solução. Para quantificação dos fármacos durante o estudo preparou-se curva analítica nas concentrações de 50, 250, 450, 650, 850, 1050, 1500 e 2000 ng/mL de NAP e SUM em associação.

O estudo iniciou-se com adição das soluções contendo os fármacos na porção apical. Nesse momento, realizou-se a quantificação da solução adicionada por meio da injeção das amostras em sistema CLAE-DAD, usando-se o método desenvolvido e validado (itens 4.2.2 e 4.2.3). A placa foi mantida durante o estudo em incubadora com agitação orbital a 50 rpm e 37°C.

Foram realizadas coletas de 200 µL de solução do compartimento basolateral nos tempos de 30, 60, 120 e 180 minutos após o início do estudo. As amostras coletadas foram imediatamente avaliadas por CLAE-DAD. Foi realizada a reposição de tampão retirado adicionando-se 200 µL de HBSS.

As concentrações das amostras obtidas a partir dos cálculos realizados considerando-se a curva analítica, foram plotadas em uma curva de concentração versus tempo. O estabelecimento da permeabilidade foi dado por meio da avaliação dos valores de permeabilidade aparente (P_{app}) em cm/s calculados conforme apresentado na equação 3 (item 2.1.1.2).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

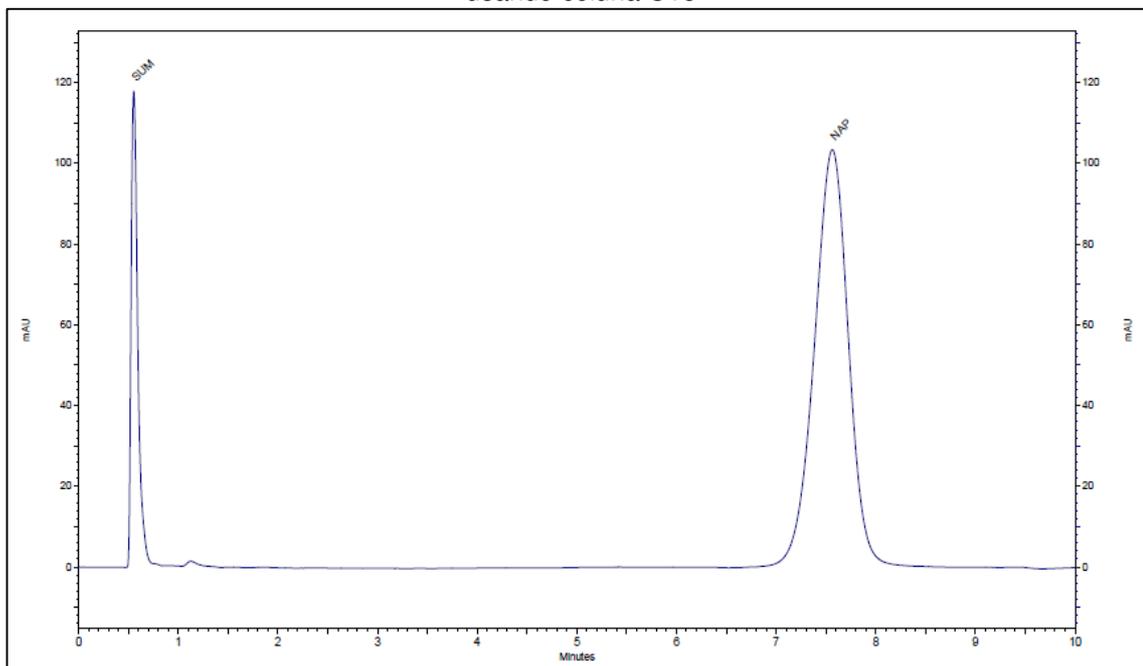
5.1 Desenvolvimento de método analítico para quantificação simultânea de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano por CLAE-DAD

A ampla diferença de pKa entre NAP e SUM torna o desenvolvimento de métodos analíticos para a quantificação simultânea desses fármacos um grande desafio. Em métodos cromatográficos por partição a retenção diferencial depende da polaridade do analíto, portanto a ionização do mesmo no sistema é determinante na separação (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). Desse modo, ajustes na composição da coluna cromatográfica e fase móvel, e a proporção desse último fator, permitem o estabelecimento do melhor método de separação.

O desenvolvimento do método analítico baseou-se inicialmente em métodos já descritos na literatura avaliando-se possíveis adequações e ajustes. A grande maioria dos métodos empregavam fases móveis acidificadas em colunas cromatográficas compostas por sílica quimicamente ligada a grupo octadesilano (C18) (Tabela 5). Diferentes condições empregando essa combinação foram testadas. Entretanto, essa fase estacionária tem caráter apolar, portanto SUM, que é uma molécula altamente polar na faixa de pH usada ($\log P_{\text{octanol/água}}$ aproximadamente -2,59), apresenta baixa retenção, ou nenhuma de acordo com a fase móvel usada nesse sistema.

O volume morto foi de aproximadamente 1,15 minutos, valor obtido por meio da injeção de solução de uracila. Esse composto tem a característica de não apresentar retenção devido a baixa interação com as cadeias carbônicas da coluna cromatográfica C18). A Figura 8 apresenta um exemplo de corrida analítica obtida com o uso de coluna C18 e fase móvel composta por acetonitrila e acetato de amônio 4 mM e pH ajustado com ácido acético para aproximadamente 4,5. Pode-se observar que o tempo de retenção para SUM foi inferior ao valor de volume morto obtido no estudo.

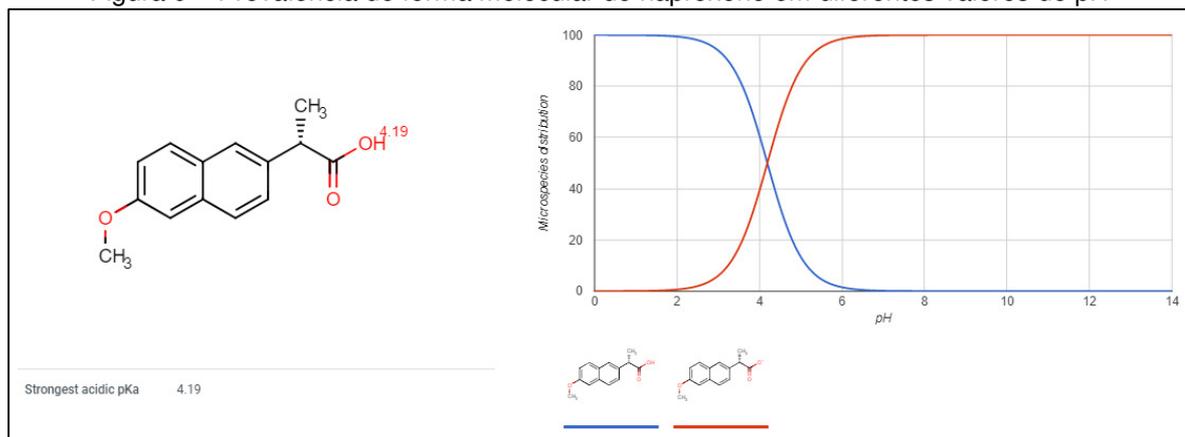
Figura 8 – Cromatograma obtido em corrida cromatográfica contendo NAP e SUM em associação usando coluna C18



Considerando-se as aplicações do método desenvolvido, foi necessário obter um tempo de retenção maior do que o obtido com colunas C18. Isso devido ao fato de no estudo de dissolução excipientes ou outros interferentes solúveis vindos do teste podem influenciar na quantificação e tendem a sair nos primeiros minutos de corrida analítica, prejudicando a pureza do pico cromatográfico. Já no estudo de permeabilidade, o uso de HBSS, é o fator limitante, já que esse meio é rico em sais que causam inibição na linha de base e picos acentuados nos primeiros minutos de corrida (até aproximadamente 3 minutos), o que prejudica a detecção e quantificação dos analitos de interesse nessa região de inibição.

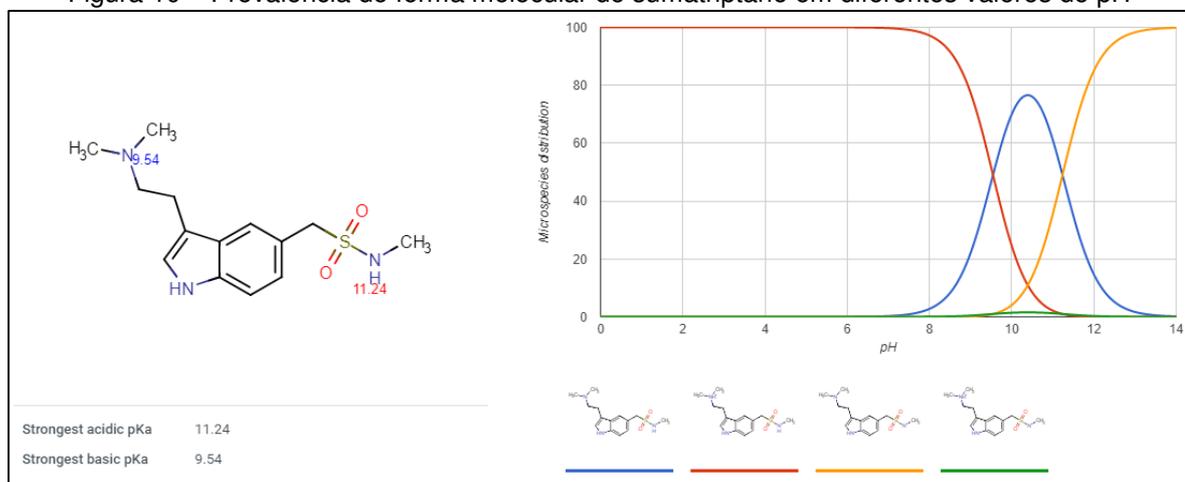
A fim de aumentar a polaridade da fase estacionária, testou-se colunas com diferentes composições químicas como: fenil, nitrila e ciano. Apenas a coluna ciano apresentou uma retenção maior de SUM, sendo por esse motivo a escolhida. Entretanto, em valores de pH muito baixos, NAP se torna pouco ionizável e portanto menos retido, já que a coluna apresenta caráter mais polar. Avaliando-se o grau de ionização dos fármacos em diferentes valores de pH, foi possível selecionar o pH da porção aquosa da fase móvel. Nas figuras 9,10 e 11, está demonstrada o grau de inonização dos fármacos em diferente valores de pH.

Figura 9 – Prevalência de forma molecular de naproxeno em diferentes valores de pH



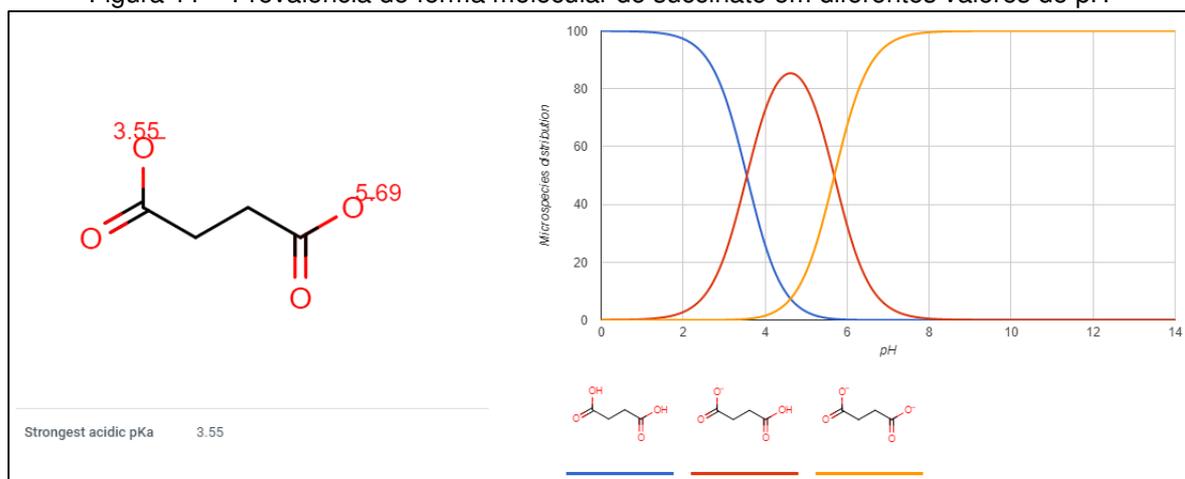
Fonte: <https://chemicalize.com/>

Figura 10 – Prevalência de forma molecular de sumatriptano em diferentes valores de pH



Fonte: <https://chemicalize.com/>

Figura 11 – Prevalência de forma molecular de succinato em diferentes valores de pH

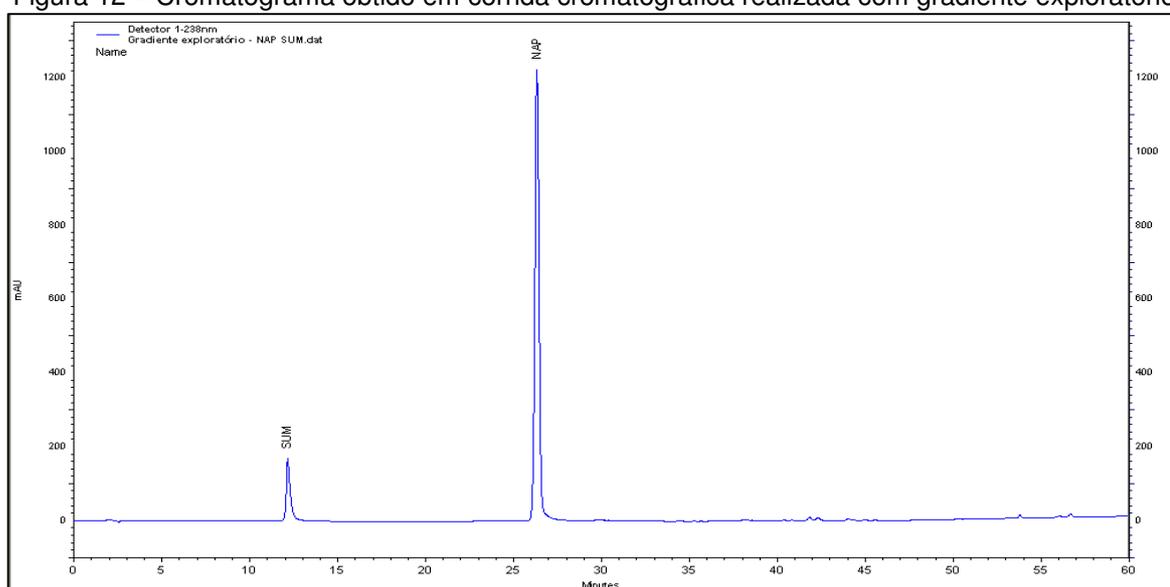


Fonte: <https://chemicalize.com/>

Selecionada a faixa de pH a ser testada, realizou-se uma corrida em gradiente exploratório para definição da melhor proporção de solvente orgânico, no método

cromatográfico (Figura 12). Para tal iniciou-se a corrida com 95% de solução aquosa de ácido acético ou solução aquosa de acetato de amônio 4 mM, com pH ajustado com ácido acético, reduzindo até 5% durante 60 minutos. Os solventes orgânicos usados de 5 a 95% nas corridas exploratórias foram acetonitrila e metanol. Testou-se os valores de pH na faixa de 4,5 a 5,5. A partir da corrida de gradiente exploratório calculou-se a proporção de cada solvente na composição da fase móvel, equivalente ao tempo de retenção do pico de NAP e SUM. O melhor resultado obtido foi fase móvel composta por 36% de acetonitrila e 64% de solução de acetato de amônio 4 mM com pH ajustado para 4,9 com ácido acético glacial (aproximadamente 2,28 mM).

Figura 12 – Cromatograma obtido em corrida cromatográfica realizada com gradiente exploratório



A coluna foi mantida a 35 °C, com fluxo de 1 mL/min. O amostrador automático foi mantido a 8 °C. O volume de injeção a princípio foi de 10 µL, entretanto observou-se que o pico cromatográfico associado a NAP saturava o detector e desse modo reduziu-se o volume de injeção para 5 µL como modo de reduzir a massa de fármaco inserida no sistema.

Avaliou-se o espectro na região do ultravioleta obtido nas corridas para definição do melhor comprimento de onda das análises. Para NAP, o máximo de absorção foi obtido em 232 nm e para SUM em 229 nm. O sinal obtido para NAP é mais intenso que o obtido para SUM, portanto inicialmente realizou-se testes usando o comprimento de onda máximo de absorção para SUM. Entretanto, avaliando-se os cromatogramas em diferentes comprimentos de ondas observou-se que em 232 nm

os picos apresentavam-se mais simétricos e com intensidade satisfatória, sendo portanto o comprimento de onda escolhido para o método. As Figuras 13 e 14 apresentam a varredura espectral de 200 a 400 nm para NAP e SUM, obtida em detector DAD.

Figura 13 – Varredura espectral de SUM

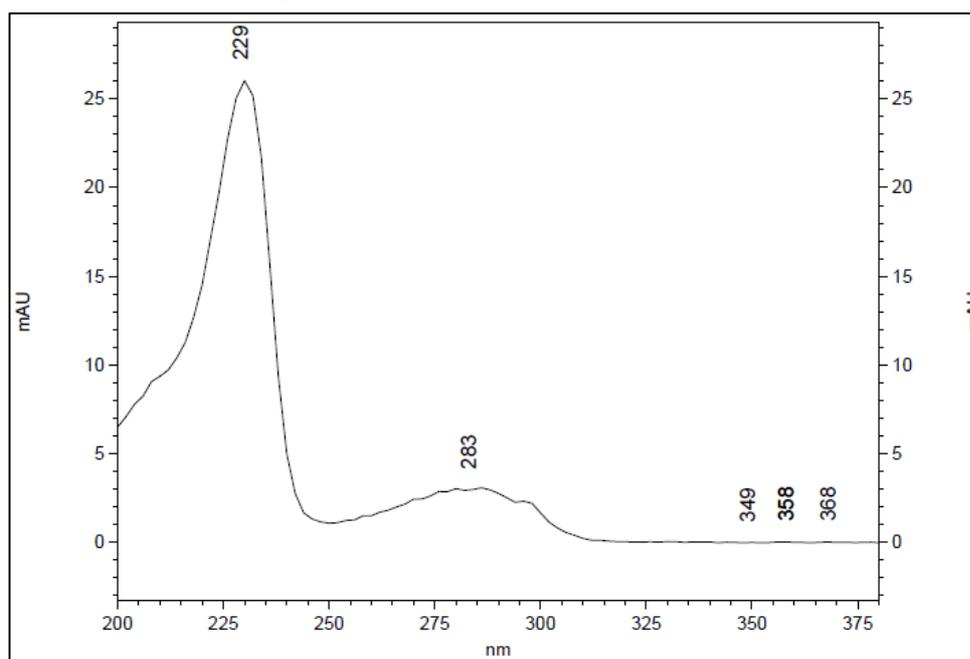
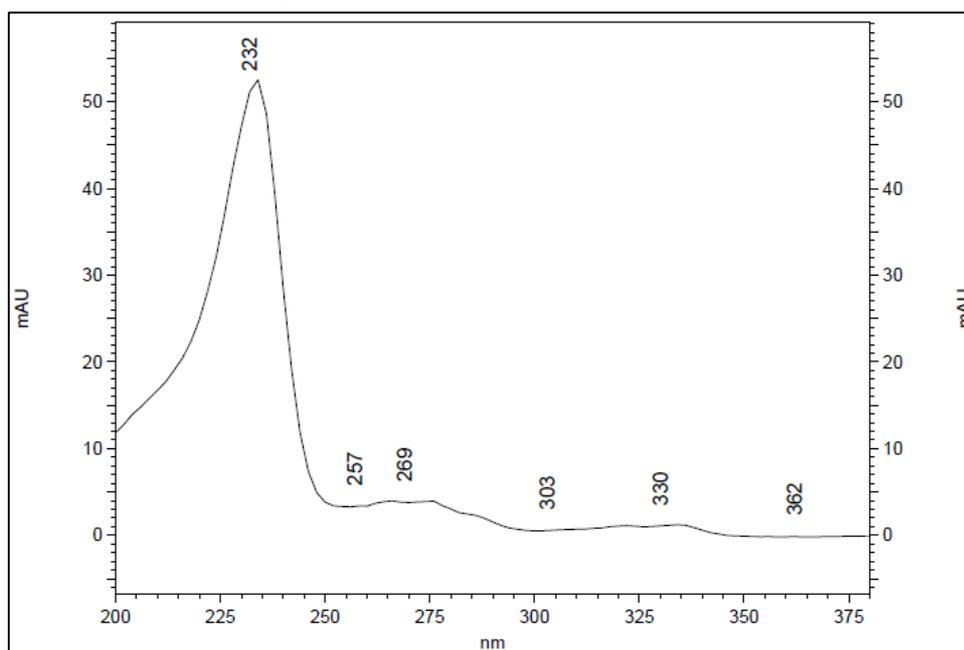


Figura 14 – Varredura espectral de NAP



Desse modo o melhor método cromatográfico obtido foi realizado em cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a detector DAD no comprimento de onda de 232 nm. O amostrador foi mantido a 8°C e foram injetados 5 µL de amostra. A separação foi realizada em coluna Agilent Zorbax SB-CN 150 mm × 4,6 mm, 5µm, mantida a 35°C e fase móvel constituída de acetato de amônio 4 mM pH 4,90, ajustado com ácido acético glacial, e acetonitrila (64:36 v/v) a um fluxo de 1 mL/min.

As Figuras 15 e 17 demonstram os cromatogramas resultantes da injeção de amostra contendo NAP e SUM usando como diluente fase móvel (método analítico) e meio HBSS (método bionalítico), respectivamente. Os espectros em 3D dispostos nas Figuras 16 e 18 permitem observar a intensidade do sinal dos fármacos ao longo do tempo em todos os comprimentos de onda avaliados. A Tabela 24 sumariza os parâmetros cromatográficos obtidos com o método desenvolvido.

Figura 15 – Cromatograma obtido com o método analítico desenvolvido para quantificação de NAP e SUM

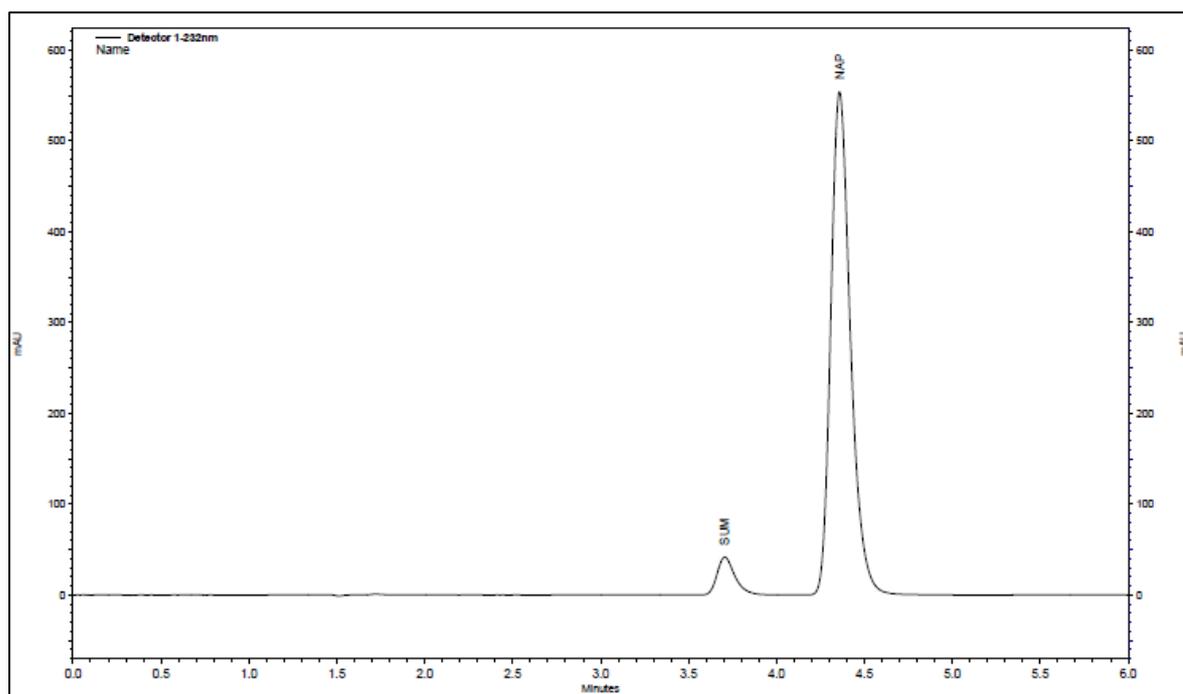


Figura 16 – Espectro cromatográfico 3D obtido com o método analítico desenvolvido para quantificação de NAP e SUM

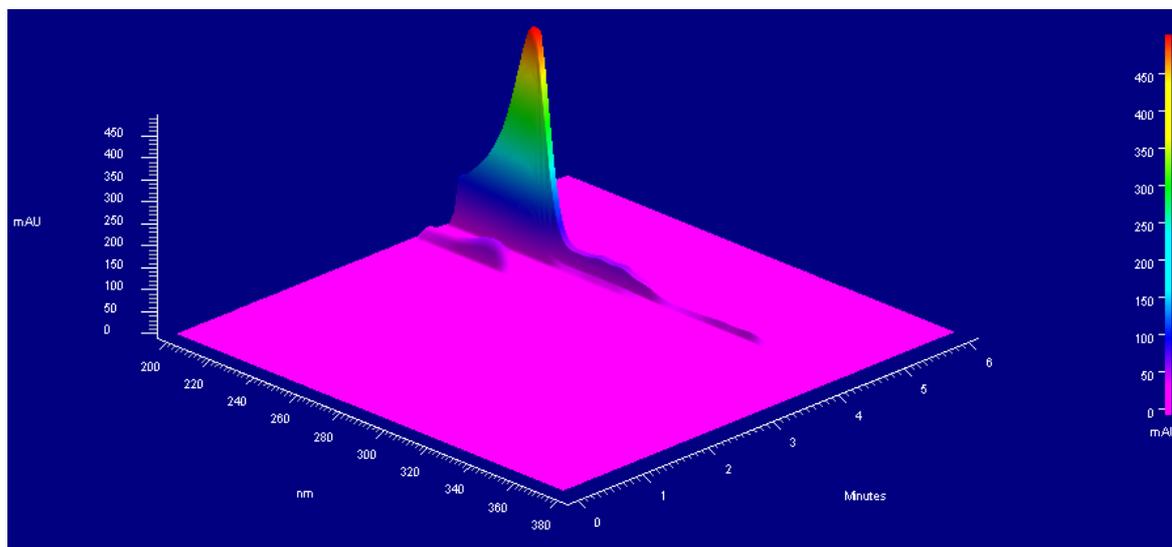


Figura 17 – Cromatograma obtido com o método bioanalítico desenvolvido para quantificação de NAP e SUM

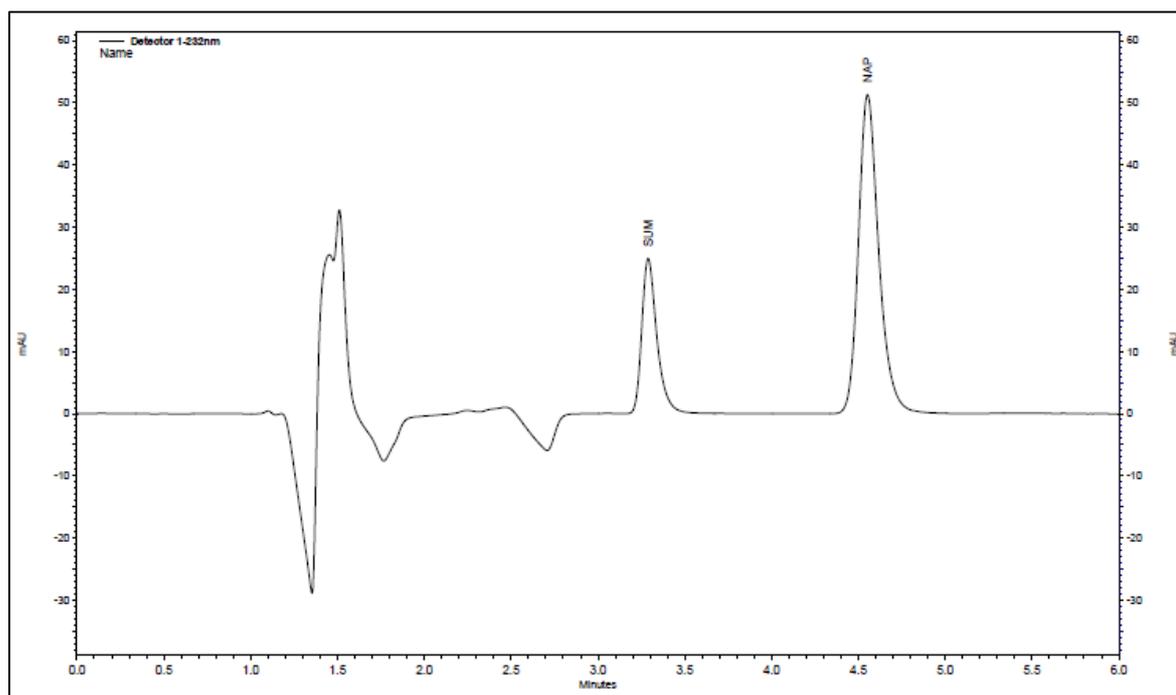


Figura 18 – Espectro cromatográfico 3D obtido com o método bioanalítico desenvolvido para quantificação de NAP e SUM

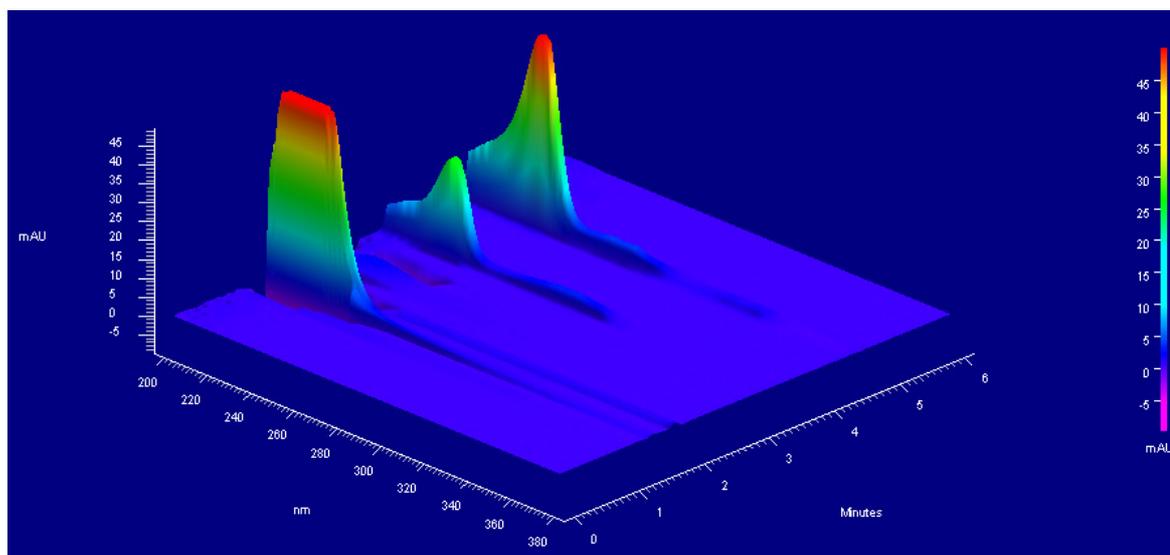


Tabela 24 – Resultados dos parâmetros cromatográficos obtidos com o método analítico e bioanalítico desenvolvido para quantificação de NAP e SUM

Parâmetro avaliado	Método analítico		Método bioanalítico	
	NAP	SUM	NAP	SUM
Tempo de retenção (min)	4,358	3,705	4,552	3,288
Área do pico cromatográfico	4298396	293077	414744	149656
Número de pratos teóricos	7341	6528	7405	7071
Assimetria do pico	1,286	1,362	1,263	1,411
Fator de capacidade	2,487	1,964	2,641	1,631
Pureza de pico	0,998	0,999	0,999	0,999
Resolução entre picos	3,377		6,866	
Tempo de corrida (min)	6,0			

Todos os parâmetros cromatográficos obtidos para o método analítico e bioanalítico estão de acordo com o sugerido na literatura (DOLAN, 2003; SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; USP, 2016). Portanto, os métodos são adequados para o emprego em quantificações simultâneas desses fármacos. O tempo de corrida foi relativamente curto, sendo prático para realizações de análises de rotina e econômico por consumir menor quantidade de solvente orgânico e tempo de vida útil do equipamento e da coluna cromatográfica.

5.2 Validações de métodos analítico e bioanalítico para quantificação simultânea de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano em estudos de solubilidade, dissolução, doseamento e permeabilidade celular por CLAE-DAD

Após o desenvolvimento do método analítico para quantificação simultânea de NAP e SUM por CLAE-DAD, foram realizadas duas validações do método considerando a diferença entre as amostras aplicadas em estudos analíticos (solubilidade, doseamento e dissolução) e bioanalíticos (permeabilidade celular). Os resultados obtidos para as validações, estão de acordo com o preconizado nas legislações vigentes e estão apresentados nos itens 5.2.1 a 5.2.8.

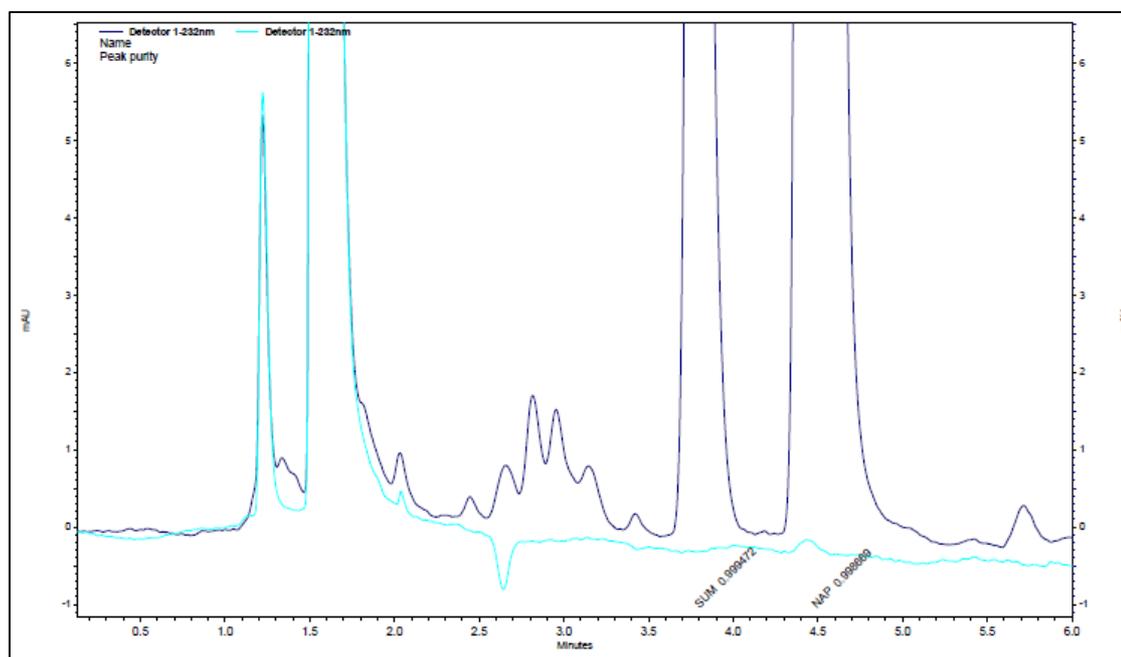
5.2.1 Seletividade

A seletividade consiste na capacidade do método em diferenciar e quantificar de forma confiável analitos na presença de interferentes, podendo estes ser componentes da formulação (excipientes), metabólitos celulares (em estudos de permeabilidade), produtos de degradação, impurezas, dentre outros.

Para as amostras submetidas a calor e luminosidade não foi observada diferença no teor em comparação com amostras não expostas. Não foram observados ainda, picos cromatográficos relativos a produtos de degradação.

Os analitos foram expostos a hidrólise ácida, básica e a oxidação por um período de até três dias com e sem aquecimento de 50°C. Para as soluções submetidas a meio ácido e básico, não foram observadas reduções significativas nos valores das áreas relativas aos analitos e nem produtos de degradação. Já as amostras mantidas em solução contendo peróxido de hidrogênio 3% v/v apresentaram degradação de aproximadamente 20% após seis horas de exposição com aquecimento. Os prováveis produtos de degradação formados após o período de exposição apresentam boa separação dos fármacos de interesse, conforme demonstrado na Figura 19. Além disso, pode-se observar que os picos cromatográficos relativos aos fármacos permaneceram puros, já que os valores de pureza de pico foram superiores a 0,99.

Figura 19 – Cromatogramas sobrepostos referente às corridas do branco (linha azul claro) da solução contendo peróxido de hidrogênio e amostra (linha azul escuro) degradada após ser submetida a essa solução



Conforme demonstrado nas Figuras 20 e 21, não foram observados picos interferentes no mesmo tempo de retenção dos analítos para os brancos: fase móvel, HBSS, fluido gástrico simulado sem enzimas pH 1,2, solução tampão acetato 0,05 M pH 4,5, fluido intestinal simulado sem enzimas pH 6,8 e 7,5. Já nas soluções contendo apenas os placebos, foram observados interferentes no mesmo tempo de retenção dos fármacos de interesse (Figura 22). No entanto, os valores foram inferiores a 2% das áreas sob os picos cromatográficos correspondentes NAP e SUM obtido na solução padrão, sendo o maior valor 1,05%.

Figura 20 - Cromatogramas sobrepostos referente às corridas dos diluentes: fase móvel e HBSS

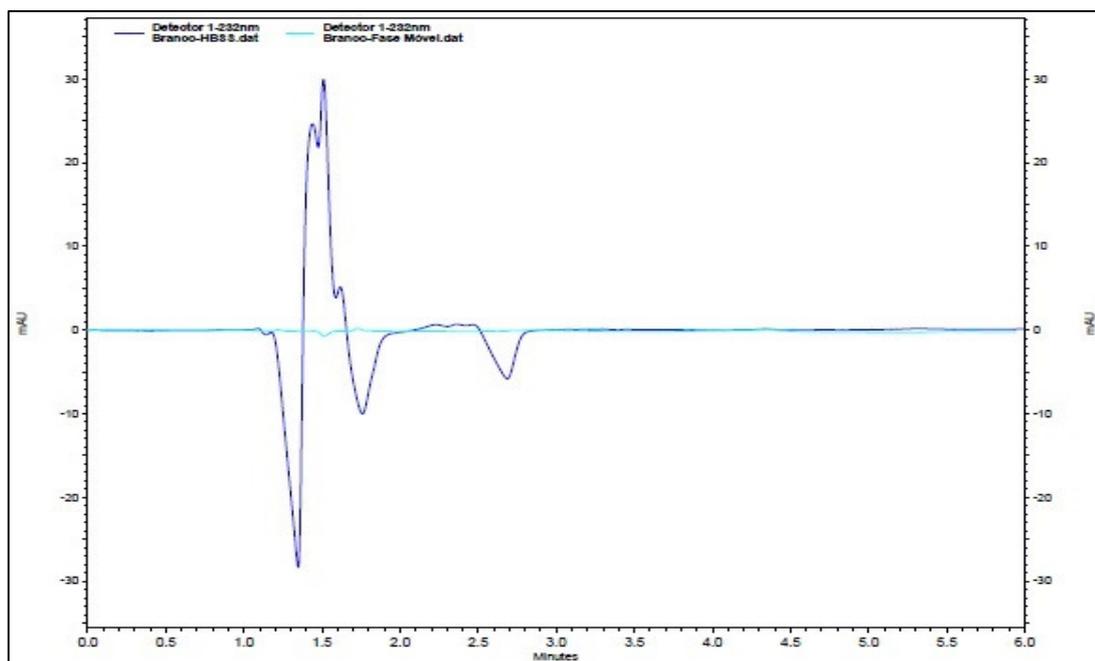


Figura 21 - Cromatogramas sobrepostos referente às corridas do branco das soluções usadas como meios de dissolução

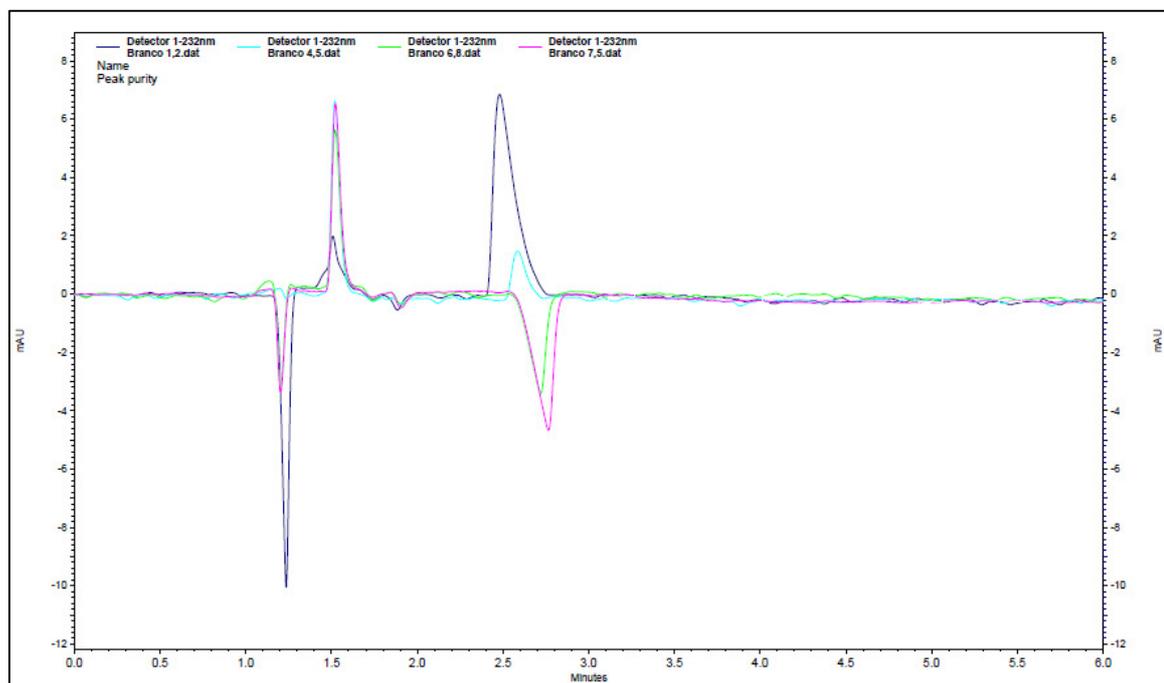
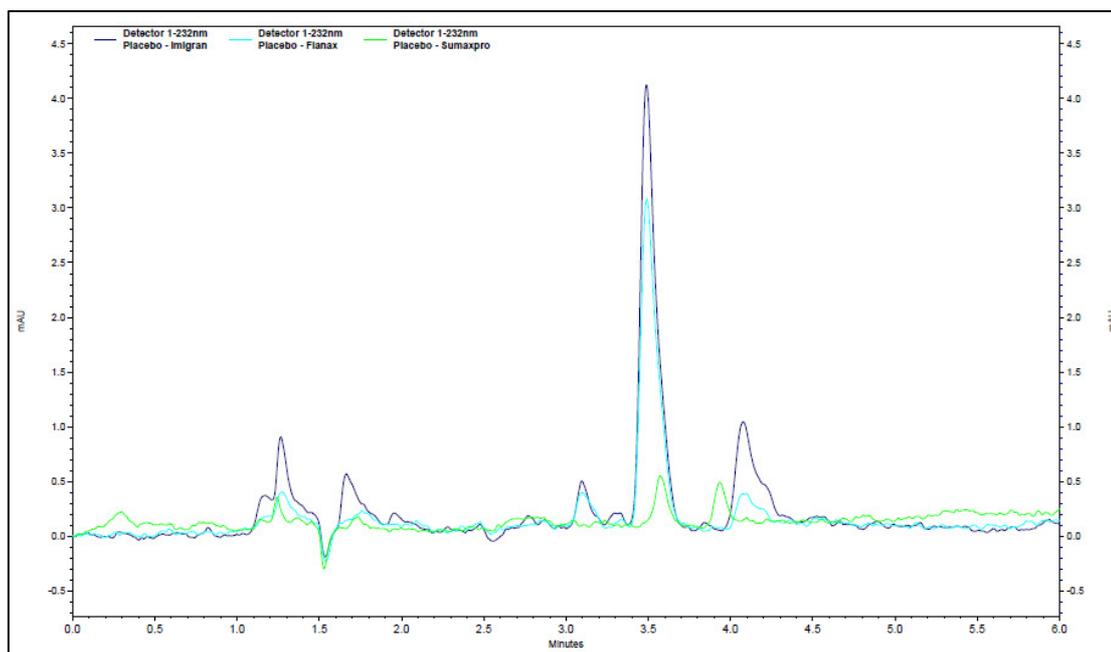
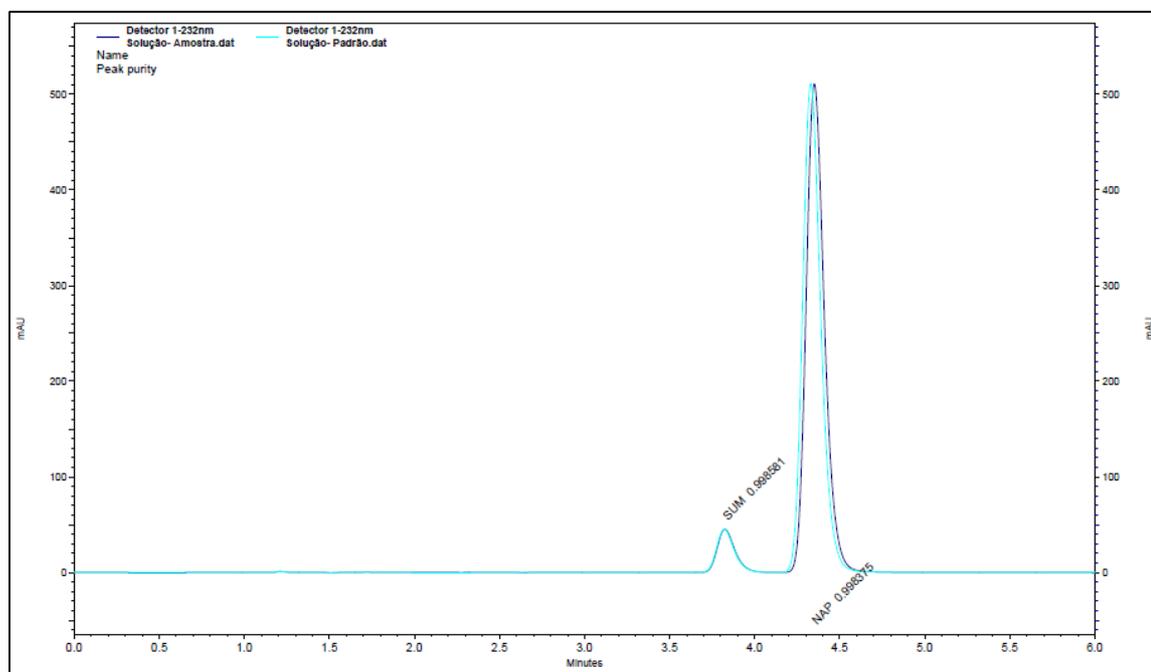


Figura 22 - Cromatogramas sobrepostos referente às corridas das soluções placebo



A pureza espectral dos picos cromatográficos relativos a NAP e SUM, tanto nas soluções amostra quanto padrão, foram superiores a 0,99 indicando a ausência de interferentes coeluinto com esses analitos, conforme apresentado na Figura 23.

Figura 23 - Cromatogramas sobrepostos referente às corridas da solução amostra e padrão



5.2.2 Linearidade

5.2.2.1 Linearidade do método para estudos de permeabilidade celular

Na faixa de concentração testada, de 50 a 2000 ng/mL para NAP e SUM, obteve-se resultados satisfatórios e a linearidade pelo método dos mínimos quadrados ordinários foi comprovada. Para ambos os fármacos o modelo de regressão linear utilizado foi $y = ax + b$ sendo, y a área sob os picos dos analitos, a o coeficiente angular, x a concentração nominal de NAP ou SUM e b o coeficiente linear. Na Tabela 25 estão dispostos os resultados dos testes estatísticos referentes a cada um dos fármacos. As Figuras 24 e 25 correspondem aos gráficos de linearidade e resíduos obtidos no estudo. A inspeção visual do gráfico de resíduos indica a distribuição homogênea e portanto, a homoscedasticidade dos resultados.

Tabela 25 – Resultados da avaliação da linearidade de método analítico para quantificação de NAP e SUM em estudo de permeabilidade celular

Item avaliado	NAP	SUM
Equação da reta	$y = 393,7170x - 994,8745$	$y = 144,35x - 850,36$
Coeficiente de correlação (r)	0,9999	0,9999
Método usado	MMQO	MMQO
Outliers descartados (Máximo permitido = 8,58)	4	0
Normalidade dos resíduos ($R_{eq} > R_{crítico 0,05}$)	Resíduos seguem a normal (0,9859 > 0,9682)	Resíduos seguem a normal (0,9896 > 0,9709)
Independência dos resíduos ($du < d < 4-du$)	Resíduos independentes (1,5198 < 2,3121 < 2,4801)	Resíduos independentes (1,5404 < 1,8971 < 2,4596)
Homocedasticidade dos resíduos ($p > 0,05$)	Resíduos homocedásticos (0,3917 > 0,0500)	Resíduos homocedásticos (0,2583 > 0,0500)
Desvio da Linearidade – ANOVA ($p > 0,05$)	Não há desvio da linearidade (0,7626 > 0,0500)	Não há desvio da linearidade (0,4266 > 0,0500)

Figura 24 - Curva média de concentração versus resposta e gráfico de resíduos para método analítico de quantificação de NAP em estudos de permeabilidade celular

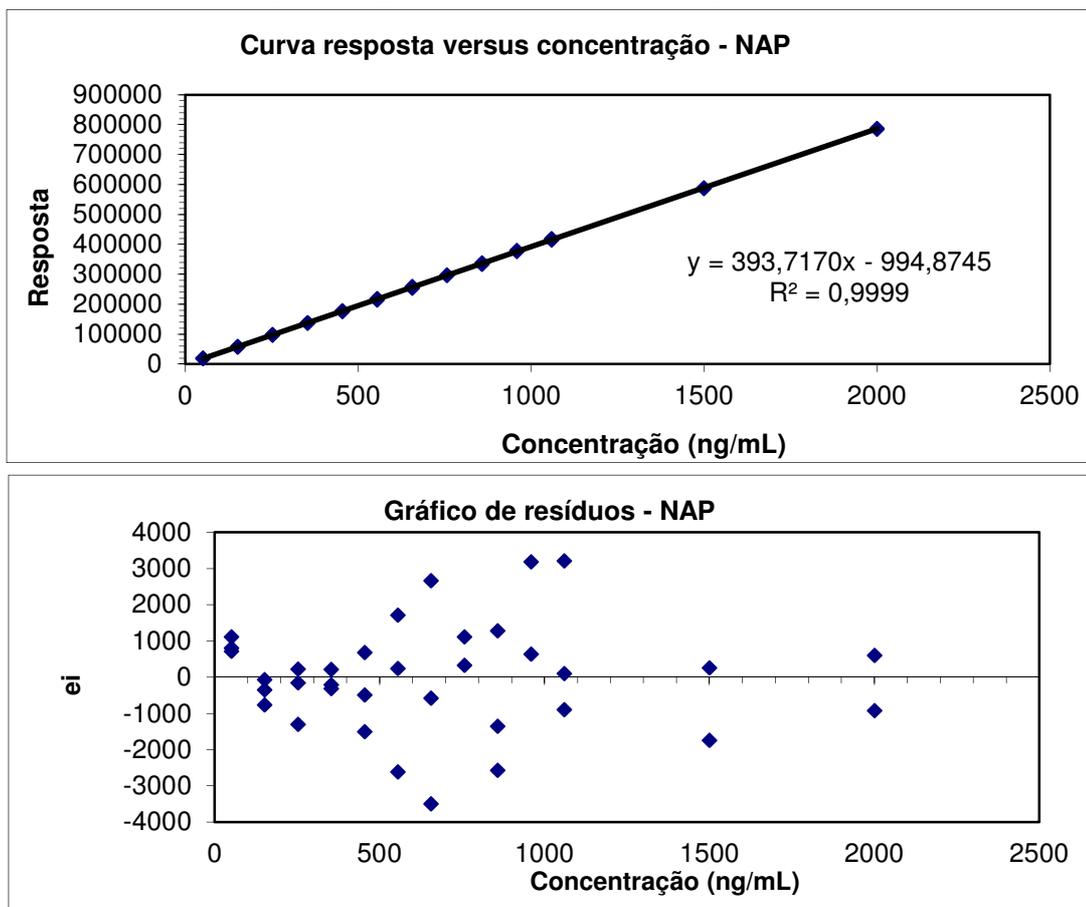
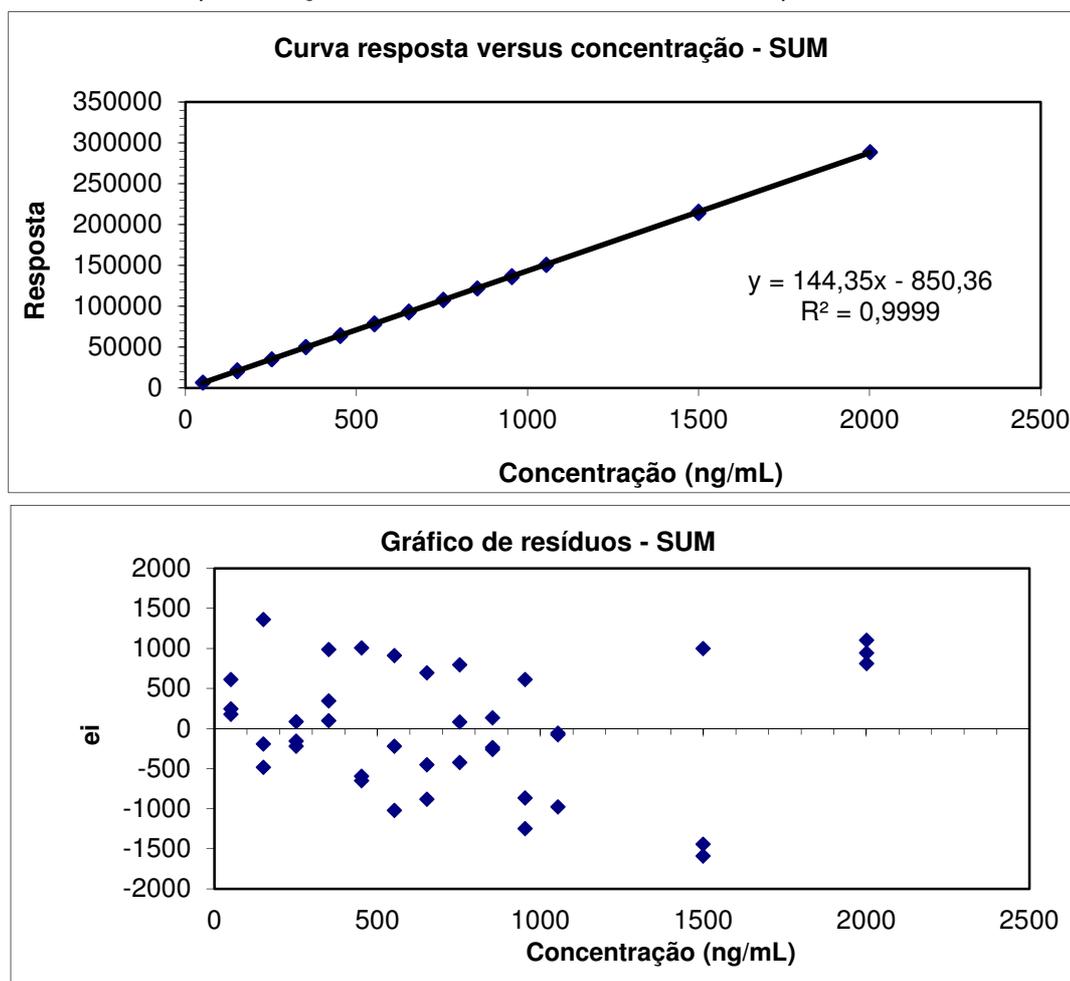


Figura 25 - Curva média de concentração versus resposta e gráfico de resíduos para método analítico de quantificação de SUM em estudos de estudos de permeabilidade celular



O método é linear para ambos fármacos e pode ser empregado em estudos de permeabilidade celular, empregando células Caco-2, em meio HBSS.

5.2.2.2 Linearidade do método para estudos de solubilidade, doseamento e dissolução

A avaliação da linearidade do método para estudo de solubilidade, doseamento e dissolução foi realizada considerando aproximadamente de 4 a 130 % das concentrações de trabalho escolhidas para NAP e SUM. Tais concentrações foram baseadas no estudo de dissolução de comprimidos SUMAXPRO® dose fixa combinada de 500 mg de NAP e 85 mg de SUM, e levou-se em consideração diluições necessárias devido à alta sensibilidade do equipamento para o analito NAP.

Para SUM, na faixa de concentração testada, de 0,1 a 3,25 µg/mL, obteve-se resultados satisfatórios e a linearidade pelo método dos mínimos quadrados ordinários foi comprovada.

A utilização de amplas faixas de concentração resulta frequentemente em variâncias diferentes para níveis de concentração baixos e altos, afetando a regressão linear. A distribuição homogênea indica uniformidade das variâncias, chamada de homoscedasticidade, enquanto a distribuição tendenciosa para uma determinada direção ou em forma curva demonstra a heterocedasticidade. Para NAP, a faixa de 0,5 a 14,50 µg/mL levou a distribuição dos resíduos em forma de curva por ser muito extensa e, portanto, heterocedástica e apresentando desvio da linearidade quando empregado o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). Desse modo, o modelo mais adequado foi o método dos mínimos quadrados generalizados (MMQG), aplicando-se um método quadrático (polinomial de segunda ordem). Com esse modelo todos os parâmetros estatísticos foram aprovados e a linearidade corretamente avaliada. A faixa ampla foi necessária para os estudos de perfil de dissolução para o qual na RDC 166 de 2017 está determinado que seja $\pm 20\%$ dos limites de concentrações esperados no teste.

Para SUM o modelo de regressão linear utilizado foi $y = ax + b$ sendo, y a área sob o pico do analito, a o coeficiente angular, x a concentração nominal de SUM e b o coeficiente linear. Já para NAP o modelo empregado foi $y = ax^2 + bx + c$, onde y corresponde a área sob o pico do analito, a o coeficiente quadrático, x a concentração nominal de NAP, b o coeficiente linear e c coeficiente constante.

Na Tabela 26 estão dispostos os resultados finais dos testes estatísticos referentes a cada um dos fármacos. As Figuras 26 e 27 correspondem a curva de linearidade e gráfico de resíduos obtidos no estudo para NAP e SUM, respectivamente. A inspeção visual do gráfico de resíduos foi também realizada para avaliação da dispersão. Conforme observado e avaliado estatisticamente os resíduos estão distribuídos homocedasticamente com os modelos estatísticos utilizados.

Tabela 26 - Resultados da avaliação da linearidade de método analítico para quantificação de NAP e SUM em estudos de doseamento, dissolução e solubilidade

Item avaliado	NAP	SUM
Equação da reta	$y = -0,0025 x^2 + 360,36 x - 3149,36$	$y = 132,34 x + 276,28$
Coefficiente de correlação (r)	1,0000	0,9999
Modelo estatístico	MMQG	MMQO
Outliers descartados (Máximo permitido = 9,24)	5	3
Normalidade dos resíduos ($R_{eq} > R_{crítico 0,05}$)	Resíduos seguem a normal (0,9814 > 0,9696)	Resíduos seguem a normal (0,9899 > 0,9709)
Independência dos resíduos ($du < d < 4-du$)	Resíduos independentes (1,5030 < 1,7286 < 2,4696)	Resíduos independentes (1,5403 < 1,7619 < 2,4596)
Homocedasticidade dos resíduos ($p > 0,05$)	Resíduos homocedásticos (0,0773 > 0,0500)	Resíduos homocedásticos (0,0573 > 0,0500)
Análise de variância ANOVA ($p > 0,05$)	Variância satisfatória (0,0654 > 0,0500)	Não há desvio da linearidade (0,6581 > 0,0500)

Figura 26 – Curva média de concentração versus resposta e gráfico de resíduos para método analítico de quantificação de NAP em estudos de estudos de solubilidade, doseamento e dissolução

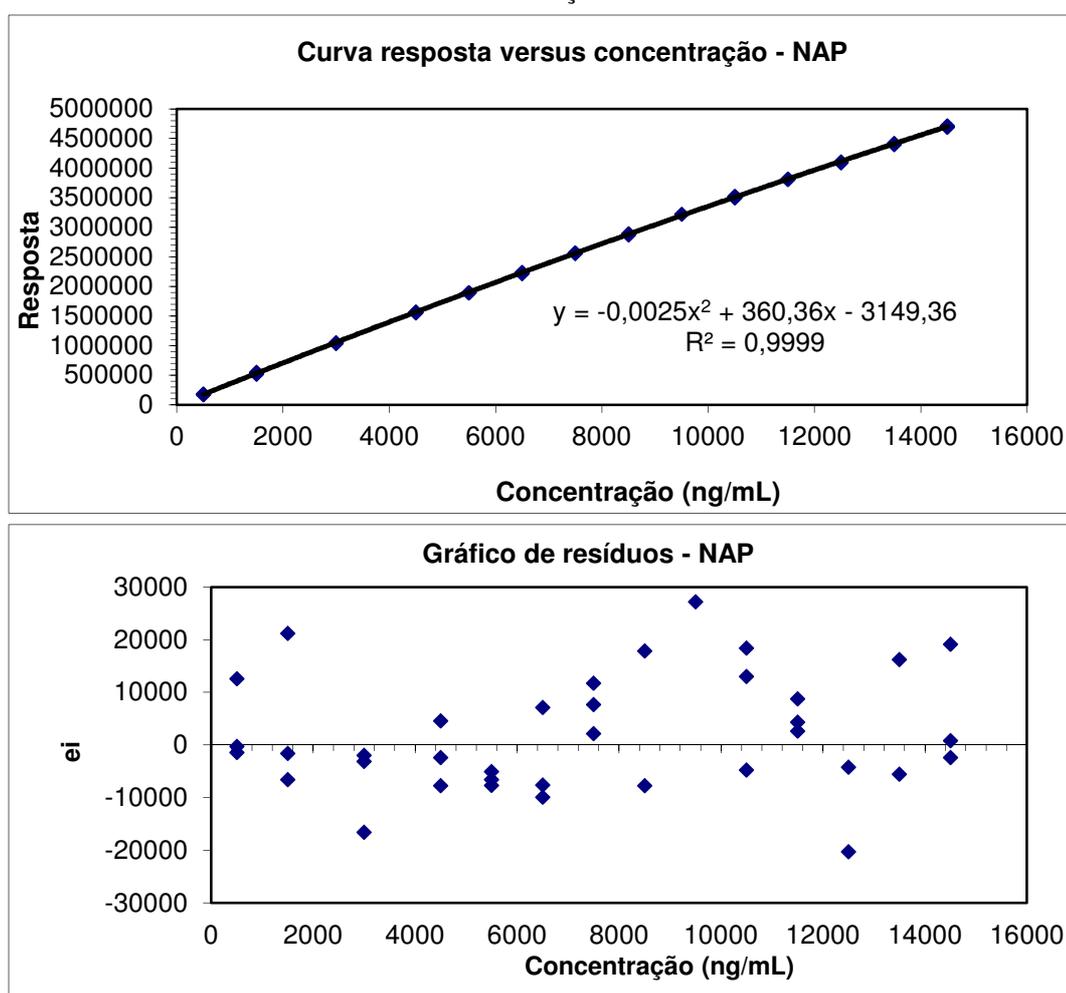
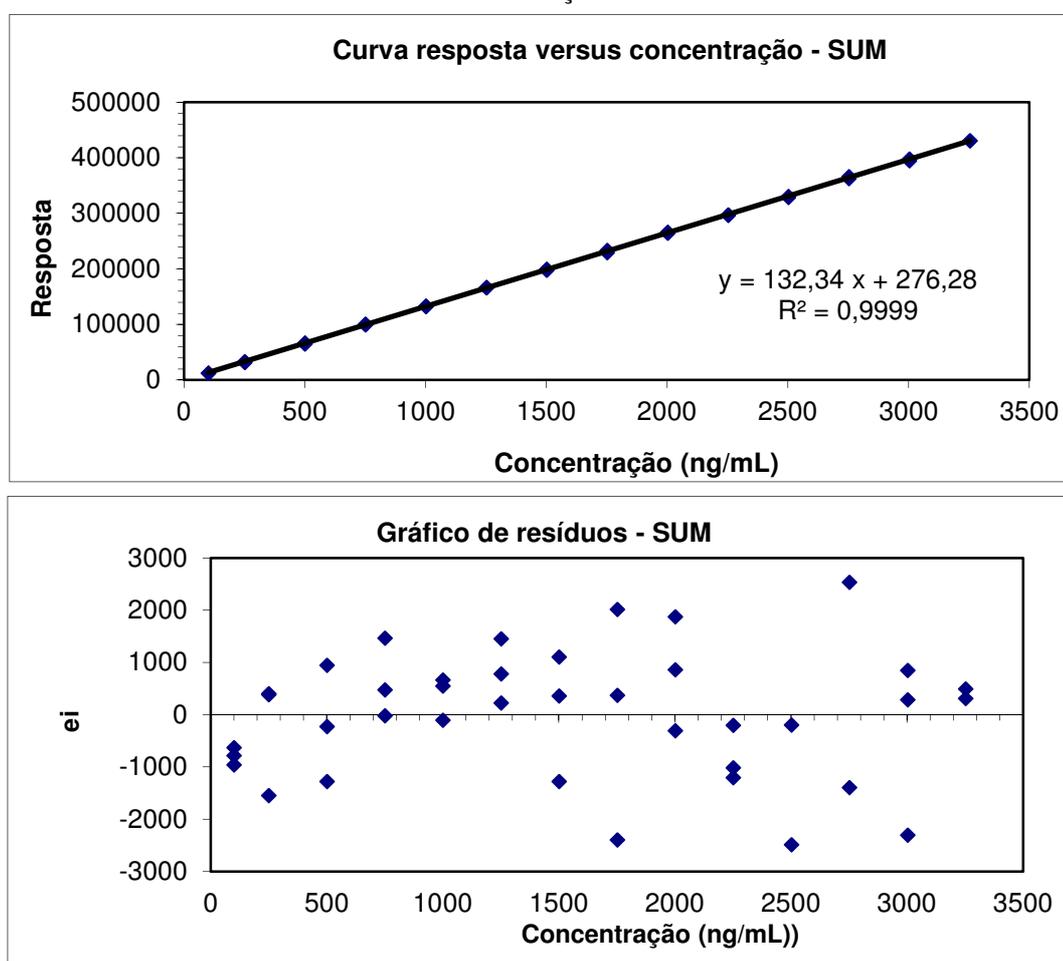


Figura 27 – Curva média de concentração versus resposta e gráfico de resíduos para método analítico de quantificação de SUM em estudos de estudos de solubilidade, doseamento e dissolução

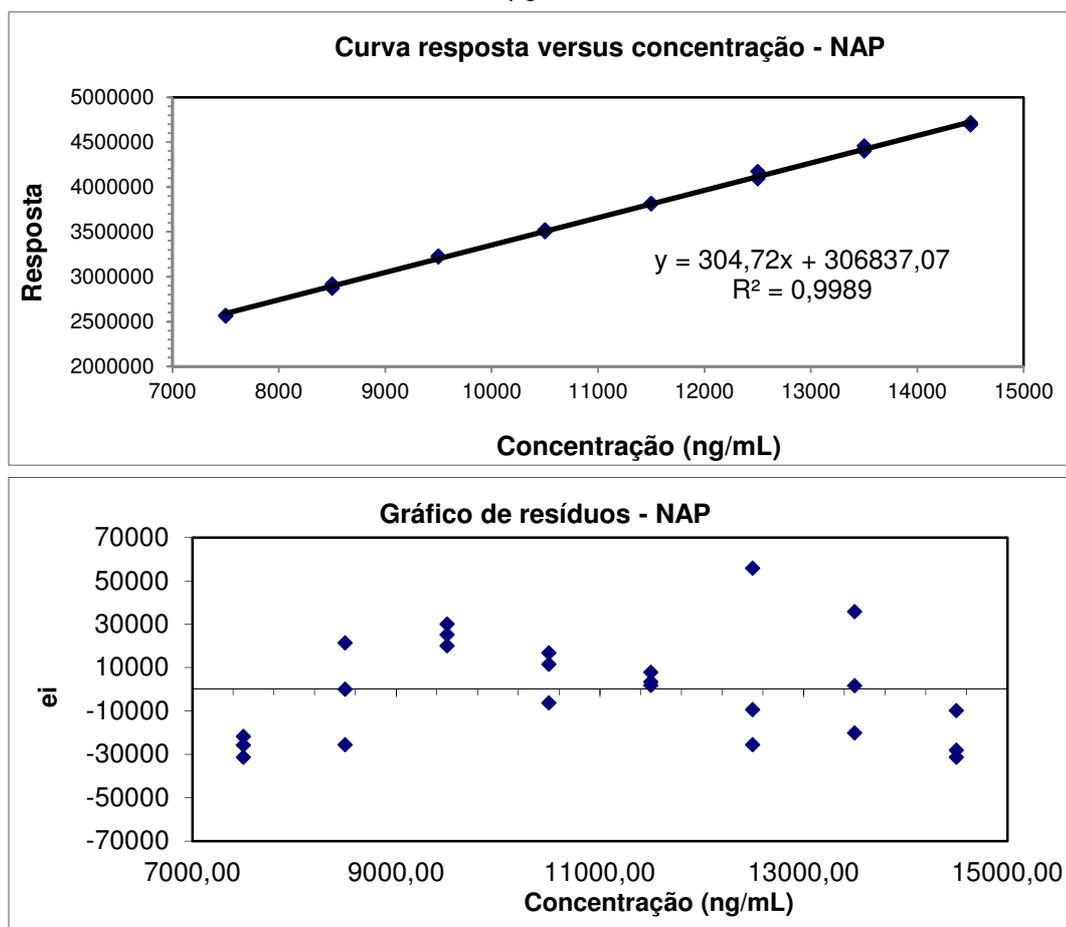


Para métodos aplicados em estudo de solubilidade, doseamento, e até dissolução que não empreguem perfis, onde a faixa de trabalho é consideravelmente menor, o método analítico testado pode ser avaliado pelo modelo do método dos mínimos quadrados ordinários e tem linearidade comprovada para a faixa de 7,5 a 14,5 $\mu\text{g/mL}$ por testes estatísticos conforme observado na Tabela 27. Para tal avaliação usou-se os pontos de concentração 7,5, 8,5, 9,5, 10,5, 11,5, 12,5, 13,5 e 14,5 $\mu\text{g/mL}$. A Figura 28 corresponde ao gráfico de linearidade e resíduos obtidos para essa faixa de trabalho.

Tabela 27 – Resultados da avaliação da linearidade de método analítico para quantificação de NAP em estudos de doseamento e solubilidade na faixa de 7,5 a 14,5 µg/mL

Item avaliado	Resultados obtidos para NAP
Equação da reta	$y = 304,72x + 306837,07$
Coefficiente de correlação (r)	0,9994
Método usado	MMQO
Outliers descartados (Máximo permitido = 5,28)	0
Normalidade dos resíduos ($R_{eq} > R_{crítico 0,05}$)	Resíduos seguem a normal (0,9655 > 0,9569)
Independência dos resíduos ($du < d < 4-du$)	Resíduos independentes (1,4458 < 1,6391 < 2,5542)
Homocedasticidade dos resíduos ($p > 0,05$)	Resíduos homocedásticos (0,6869 > 0,0500)
Desvio da Linearidade – ANOVA ($p > 0,05$)	Não há desvio da linearidade (0,0578 > 0,0500)

Figura 28 – Curva média de concentração versus resposta e gráfico de resíduos para método analítico de quantificação de NAP em estudos de doseamento e solubilidade na faixa de 7,5 a 14,5 µg/mL



5.2.3 Precisão

A avaliação da precisão, ou seja a proximidade dos resultados obtidos por uma série de medidas de soluções de uma mesma amostra, foi feita em dois dias distintos por dois analistas diferentes, como forma de avaliar a repetibilidade (mesmo dia e analista) e a precisão intermediária (dias e analistas diferentes). Os métodos analítico e bioanalítico foram considerados precisos.

O método bioanalítico para estudos de permeabilidade celular apresentou resultados satisfatórios para a precisão avaliada por meio do preparo em dois dias distintos e por um analista no primeiro dia e dois no segundo, três réplicas de amostras nas concentrações de 100, 500, 1000 e 2000 ng/mL para ambos os analitos. O DPR para as análises de repetibilidade e precisão intermediária foi inferior a 15% em todas as concentrações, conforme observado na Tabela 28.

Tabela 28 - Resultados para avaliação da precisão do método para quantificação de NAP e SUM empregado em estudos de permeabilidade celular

Fármaco	Concentração nominal (ng/mL)	Média e DPR das concentrações obtidas	Repe. 1*	Repe. 2**	Repe. 3***	Repr.****
NAP	100	Média (µg/mL)	94,05	97,53	94,13	95,24
		DPR (%)	2,92	2,53	1,83	2,94
	500	Média (µg/mL)	472,16	472,42	468,16	470,91
		DPR (%)	1,77	0,61	0,62	1,17
	1000	Média (µg/mL)	948,88	942,64	927,07	939,53
		DPR (%)	1,58	0,85	0,21	1,42
	2000	Média (µg/mL)	1986,16	1983,53	1986,16	1985,29
		DPR (%)	0,24	0,33	0,27	0,28
SUM	100	Média (µg/mL)	90,34	94,94	91,23	92,17
		DPR (%)	4,76	4,32	3,55	4,63
	500	Média (µg/mL)	457,35	465,04	454,11	458,83
		DPR (%)	2,95	2,34	0,81	2,37
	1000	Média (µg/mL)	915,75	925,54	900,18	913,82
		DPR (%)	2,64	1,30	0,90	2,02
	2000	Média (µg/mL)	1993,59	2001,54	1999,55	1998,23
		DPR (%)	1,43	0,46	0,59	0,45

*Resultados referentes a análise de repetibilidade realizada no primeiro dia por analista 1 (9 dados por concentração)

**Resultados referentes a análise de repetibilidade realizada no segundo dia por analista 2 (9 dados por concentração)

***Resultados referentes a análise de repetibilidade realizada no segundo dia por analista 1 (9 dados por concentração)

****Resultados referentes a precisão intermediária realizada nos dois dias por analistas 1 e 2 (27 dados por concentração)

Para o método analítico de solubilidade, doseamento e dissolução, a precisão avaliada por meio do preparo de seis réplicas de amostras nas concentrações de 2,6 µg/mL para SUM e 11,00 µg/mL para NAP, injetadas em triplicata, apresentou resultados satisfatórios. Os valores de DPR para as análises de repetibilidade e precisão intermediária foram inferiores a 2% para os dois fármacos, conforme observado na Tabela 29.

Tabela 29 - Resultados para avaliação da precisão do método para quantificação de NAP e SUM empregado em estudos de solubilidade, doseamento e dissolução

Fármaco	Precisão testada	Concentração nominal (µg/mL)	Média de concentração obtida (µg/mL)	DPR (%)
NAP	Repetibilidade – 1*	11,02	11,16	1,22
	Repetibilidade – 2**	11,01	11,29	1,43
	Intermediária***	11,02	11,20	1,53
SUM	Repetibilidade – 1*	2,62	2,43	1,49
	Repetibilidade – 2**	2,62	2,47	1,04
	Intermediária ***	2,62	2,45	1,51

*Resultados referentes a análise realizada no primeiro dia por um analista (18 dados)

**Resultados referentes a análise realizada no segundo dia por outro analista (18 dados)

*** Resultados referentes a análise realizada nos dois dias pelos dois analistas (36 dados)

Avaliação da precisão de NAP no método analítico foi ainda realizada usando-se a equação da reta obtida no teste de linearidade na faixa de concentração de 7,5 a 14,5 µg/mL, onde foi possível confirmar a linearidade pelo método dos mínimos quadrados ordinários (item 5.2.2.2). A precisão do método pode ser confirmada também considerando apenas essa faixa, conforme observado na Tabela 30.

Tabela 30 - Resultados para avaliação da precisão do método para quantificação de NAP usando a equação da reta obtida com análise estatística por MMQO

Fármaco	Precisão testada	Concentração nominal (µg/mL)	Média de concentração obtida (µg/mL)	DPR (%)
NAP	Repetibilidade – 1*	11,02	11,11	1,22
	Repetibilidade – 2**	11,01	11,28	1,43
	Intermediária ***	11,02	11,20	1,53

*Resultados referentes a análise realizada no primeiro dia por um analista (18 dados)

**Resultados referentes a análise realizada no segundo dia por outro analista (18 dados)

*** Resultados referentes a análise realizada nos dois dias pelos dois analistas (36 dados)

5.2.4 Exatidão

A avaliação da exatidão de um método analítico comprova a concordância entre os resultados individuais obtidos com o método em relação a um valor aceito como verdadeiro. Para tal usou-se quatro concentrações que permitiram mostrar que o método é exato para estudos analíticos e bioanalíticos.

O método bioanalítico para estudos de permeabilidade celular apresentou resultados satisfatórios para a exatidão avaliada por meio do preparo de três réplicas de amostras nas concentrações de 100, 500, 1000 e 2000 ng/mL para ambos os analitos. Os valores de EPR% foram inferiores a 15% em todas as concentrações, conforme observado na Tabela 31.

Tabela 31 - Resultados para avaliação da exatidão do método para quantificação de NAP e SUM empregado em estudos de permeabilidade celular

Fármaco	Concentração nominal (ng/mL)	Média de concentração obtida (ng/mL)	EPR (%)
SUM	100	95,86	4,14
	500	473,90	5,22
	1000	950,97	4,90
	2000	1976,46	1,18
NAP	100	104,11	4,44
	500	561,45	12,29
	1000	1130,94	13,09
	2000	1988,81	0,56

Para o método analítico de solubilidade, doseamento e dissolução a exatidão avaliada por meio do preparo de três réplicas de amostras nas concentrações de 0,5, 6,5, 11,5 e 14,5 µg/mL para NAP e 0,1, 1,25, 2,50 e 3,25 µg/mL para SUM, apresentou resultados satisfatórios. Os valores de EPR% foram inferiores a 2% para os dois fármacos, conforme observado na Tabela 32.

Tabela 32 - Resultados para avaliação da exatidão do método para quantificação de NAP e SUM empregado em estudos de solubilidade, doseamento e dissolução

Fármaco	Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Média de concentração obtida ($\mu\text{g/mL}$)	EPR (%)
NAP	0,50	0,51	1,97
	6,50	6,59	0,91
	11,50	11,63	1,10
	14,50	14,73	1,62
SUM	0,10	0,0986	1,51
	1,25	1,2620	0,88
	2,50	2,4948	0,28
	3,25	3,2530	0,02

Avaliação da exatidão de NAP no método analítico foi ainda realizada usando-se a equação da reta obtida no teste de linearidade na faixa de concentração de 7,5 a 14,5 $\mu\text{g/mL}$, onde foi possível confirmar a linearidade pelo método dos mínimos quadrados ordinários (item 5.2.2.2). Embora os dois primeiros pontos testados na exatidão não se incluam na faixa proposta, avaliou-se considerando o ponto 6,5 $\mu\text{g/mL}$ como concentração baixa, 11,5 $\mu\text{g/mL}$ como média e 14,5 $\mu\text{g/mL}$ como alta de forma a abranger toda a faixa testada. A exatidão do método pode ser confirmada também considerando apenas essa faixa, conforme observado na Tabela 33.

Tabela 33 - Resultados para avaliação da exatidão do método para quantificação de NAP usando a equação da reta obtida com análise estatística por MMQO

Fármaco	Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Média de concentração obtida ($\mu\text{g/mL}$)	EPR (%)
NAP	6,5	6,38	1,74
	11,5	11,62	1,07
	14,5	14,63	0,87

5.2.5 Faixa de trabalho

A faixa de trabalho usada para estudos de solubilidade, doseamento e dissolução foi de 7,5 a 14,5 $\mu\text{g/mL}$ para NAP e 0,1 a 3,25 $\mu\text{g/mL}$ para SUM, já que o método analítico é linear, preciso e exato entre essas concentrações. Para NAP foi obtida faixa mais

ampla para estudos de perfis de dissolução de 0,5 a 14,5 µg/mL, sendo essa faixa, precisa, exata e com curva analítica estatisticamente satisfatória.

O método bioanalítico foi linear, preciso e exato entre 50 a 2000 ng/mL, sendo portanto a faixa de trabalho estabelecida nos estudos de permeabilidade celular.

5.2.6 Estabilidade

A estabilidade de amostras contendo NAP e SUM nos métodos propostos foi comprovada quando mantidos a temperatura ambiente e a 8 °C, por 24 horas. Adicionalmente, amostras do método bioanalítico são estáveis após dois ciclos de congelamento (a -70 °C) e descongelamento (temperatura ambiente), tendo um período de congelamento em cada ciclo de aproximadamente 24 horas. Os valores de desvio em relação ao valor nominal (EPR%) foram menores que 2% nos dados analíticos e 15% para bioanalíticos, conforme demonstrados na Tabela 34.

Tabela 34 - Resultados para avaliação da estabilidade dos métodos analítico e bioanalítico para quantificação simultânea de NAP e SUM

Método	Fármaco	Concentração nominal	EPR (%) Temperatura ambiente	EPR (%) 8°C	EPR (%) 70°C
Bioanalítico	SUM	100 ng/mL	14,56	10,04	13,42
		500 ng/mL	8,18	9,70	9,17
		1000 ng/mL	5,89	6,57	6,84
	NAP	100 ng/mL	5,30	5,21	4,74
		500 ng/mL	5,81	6,52	6,05
		1000 ng/mL	4,83	4,99	5,73
Analítico	SUM	2,3 µg/mL	0,28	0,63	NA
	NAP	11,0 µg/mL	1,17	0,98	NA

5.2.7 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos métodos analítico e bioanalítico estão sumarizados na Tabela 35.

Tabela 35 - Resultados para avaliação dos limites de detecção e quantificação para método analítico e bioanalítico

Método	Fármaco	Tipo de Limite	Concentração limite (ng/mL)
Bioanalítico	SUM	LD	11,99
		LQ	39,98
	NAP	LD	10,16
		LQ	33,86
Analítico	SUM	LD	26,80
		LQ	89,35
	NAP	LD	23,84
		LQ	79,48

Os valores de LQ calculados foram confirmados por meio da razão sinal-ruído que foi superior ao estabelecido em todos os casos.

5.2.8 Robustez

Oito ensaios foram realizados variando-se, de forma combinada, os parâmetros de proporção de acetonitrila na fase móvel (%), temperatura do forno da coluna, fluxo da fase móvel, comprimento de onda de detecção, marca da acetonitrila usada, tempo da amostra no ultrassom durante o preparo e marca e modelo do cromatógrafo. Os resultados de teor, área, assimetria, tempo de retenção e pratos teóricos relativos aos picos cromatográficos de NAP e SUM, obtidos para cada ensaio do teste de Youden estão descritos nas Tabelas 36 e 37.

Tabela 36 - Resultados obtidos nos testes de variação combinada de parâmetros para avaliação da robustez de método cromatográfico para quantificação de NAP

Teste	Área		Teor	Tempo de retenção (min)		Assimetria		Número de pratos teóricos	
	Amostra	Padrão		Amostra	Padrão	Amostra	Padrão	Amostra	Padrão
1	3567701	3521569	101,31	3,17	3,17	1,17	1,17	7386	7384
2	880,748134	898,568558	98,02	4,20	4,19	0,86	0,86	9563	9534
3	797,121745	806,818983	98,80	3,38	3,38	0,86	0,86	8822	8896
4	3945424	3892514	101,36	4,09	4,08	1,20	1,20	8264	8215
5	806,812372	810,948228	99,49	3,49	3,49	0,88	0,88	9167	9225
6	3940259	3919190,5	100,54	4,27	4,27	1,18	1,19	8404	8398
7	3584580	3582821	100,05	3,70	3,70	1,16	1,16	7760	7728
8	880,554440	876,704055	100,44	4,57	4,55	0,86	0,87	10149	10321

Tabela 37 - Resultados obtidos nos testes de variação combinada de parâmetros para avaliação da robustez de método cromatográfico para quantificação de SUM

Teste	Área		Teor	Tempo de retenção (min)		Assimetria		Número de pratos teóricos	
	Amostra	Padrão		Amostra	Padrão	Amostra	Padrão	Amostra	Padrão
1	260479	273274	95,32	2,83	2,84	1,21	1,21	7542	7579
2	53,090860	56,134188	94,58	3,77	3,77	0,85	0,83	9004	9128
3	65,335927	68,904128	94,82	3,04	3,03	0,85	0,85	8450	8377
4	389022	407473	95,47	3,58	3,56	1,23	1,23	8624	8582
5	64,778417	68,952413	93,95	3,03	3,02	0,85	0,85	8634	8498
6	393625	408081	96,46	3,59	3,57	1,23	1,22	8644	8661
7	261116	273190	95,58	2,91	2,89	1,19	1,20	7508	7494
8	64,383102	68,952413	93,37	3,03	3,02	0,85	0,85	8634	8498

A diferença significativa entre as áreas apresentadas se deve a diferença dos equipamentos que possuem sensibilidade e representações diferentes. O uso de uma solução padrão dos fármacos permitiu corrigir essa diferença, e por meio do cálculo do teor realizar uma avaliação correta da influência dos parâmetros testados.

Os resultados obtidos em cada teste foram agrupados àqueles originados de outros testes em que se empregou a mesma variação, de modo a permitir uma avaliação da influência de cada parâmetro na quantificação dos fármacos pelo método proposto. As Tabelas 38 e 39 sintetizam os efeitos nos resultados quando realizadas variações acima e abaixo dos valores nominais estabelecidos no método desenvolvido.

Tabela 38 - Resultados das amostras de avaliação do efeito da variação superior e inferior em cada parâmetro testado na robustez de método cromatográfico para quantificação de NAP

Parâmetro avaliado	Teor (%)*	Tempo de retenção (min)*	Assimetria*	Número de pratos teóricos*
Proporção de acetonitrila na fase móvel	99,87 - 100,13 = -0,26	3,71 - 4,01 = -0,30	1,02 - 1,02 = 0,00	8508,56 - 8869,75 = -361,19
Temperatura da coluna	99,84 - 100,16 = -0,32	3,78 - 3,93 = -0,15	1,02 - 1,02 = 0,00	8629,75 - 8748,56 = -118,81
Fluxo da fase móvel	99,91 - 100,09 = -0,18	3,44-4,28 = -0,84	1,02 - 1,03 = -0,01	8283,56 - 9094,75 = -811,19
Comprimento de onda	99,95 - 100,05 = -0,10	3,91 - 3,81 = 0,10	1,01 - 1,03 = -0,02	8714,13 - 8664,19 = 49,94
Marca da acetonitrila	100,27 - 99,73 = 0,54	3,85 - 3,87 = -0,02	1,02 - 1,02 = 0,00	8689,94 - 8688,38 = 1,56
Tempo da amostra no ultrassom	100,65 - 99,35 = 1,30	3,83 - 3,89 = -0,06	1,03 - 1,02 = 0,01	8741,25 - 8637,06 = 104,19
Marca do cromatógrafo	100,81 - 99,09 = 1,73	3,81-4,10 = -0,29	1,18 - 0,94 = 0,24	7953,25 - 9234,25 = -1281,00

*Diferença entre a média dos dados de valores superiores e inferiores aos nominais, respectivamente.

Tabela 39 - Resultados das amostras de avaliação do efeito da variação superior e inferior em cada parâmetro testado na robustez de método cromatográfico para quantificação de SUM

Parâmetro avaliado	Teor (%)*	Tempo de retenção (min)*	Assimetria*	Número de pratos teóricos*
Proporção de acetonitrila na fase móvel	95,05-94,84 = 0,21	3,30-3,14 = 0,16	1,03 - 1,02 = 0,01	8404,81-8354,94 = 49,87
Temperatura da coluna	95,08-94,81 = 0,27	3,30-3,14 = 0,16	1,03 - 1,03 = 0,00	8455,75 - 8304,00 = 151,75
Fluxo da fase móvel	94,92-94,97 = -0,05	2,95 - 3,49 = -0,54	1,02 - 1,04 = -0,02	8033,44 - 8726,31 = -692,87
Comprimento de onda	94,71-95,17 = -0,46	3,14 - 3,31 = -0,17	1,02 - 1,04 = -0,02	8171,81 - 8587,94 = -416,13
Marca da acetonitrila	94,99 - 94,89 = 0,10	3,12 - 3,32 = -0,20	1,03 - 1,03 = 0,00	8317,38 - 8442,38 = -125,00
Tempo da amostra no ultrassom	94,53-95,36 = -0,83	3,11 - 3,33 = -0,22	1,03 - 1,03 = 0,00	8358,44 - 8401,31 = -42,87
Marca do cromatógrafo	95,71-94,73 = 0,98	3,23 - 3,36 = -0,13	1,21 - 0,94 = 0,27	8079,13 - 8682,94 = -603,81

*Diferença entre a média dos dados de valores superiores e inferiores aos nominais.

De modo geral, pode-se observar que as variações realizadas tiveram influências mínimas na qualidade dos picos cromatográficos obtidos referentes a NAP e SUM, e também na concentração. Desse modo, o método mostrou-se altamente robusto para quantificação dos fármacos.

O teor sofreu influência mais pronunciada quando alterou-se a marca do cromatógrafo, entretanto, essa diferença mínima (1,73% para NAP e 0,98% para SUM) não altera a eficiência do método em quantificar. Essa variação corresponde a um desvio de aproximadamente 1,7% NAP e 1% para SUM, valores inferiores a 2% sendo portanto, aceitável. Esse fato comprova a robustez do método para ser empregado em diferentes laboratórios, onde normalmente existem equipamentos de diversas marcas e modelos, exigindo do método a capacidade de responder igualmente em todos os casos.

O tempo de retenção dos analitos foi mais fortemente influenciado pelo fluxo da fase móvel, o que é esperado, já que um aumento do fluxo leva ao aumento da força de arraste do analito retido na coluna. Desse modo, quanto maior o fluxo, menor o tempo de retenção. Tal fato pode ser observado nos valores negativos (-0,84 min para NAP e -0,54 min para SUM) obtidos na subtração do tempo de retenção obtido para fluxo de 1,1 mL/minuto por aqueles obtidos com um fluxo de 0,9 mL/minuto.

A assimetria dos picos cromatográficos foi praticamente influenciada apenas pela mudança de equipamento, já que para todos os outros parâmetros a diferença esteve muito próxima de zero. Com a troca do equipamento, muda-se o volume morto e tubulações gerais. Muda-se também o software utilizado nos cálculos de integração dos sinais obtidos e com isso os valores. Entretanto, essas mudanças devem impactar minimamente na qualidade do sinal, fato que foi observado no estudo, já que a diferença máxima foi de apenas 0,27. Todos os picos apresentaram simetria satisfatória, já que estiveram entre a faixa recomendada de 0,8 a 2,0 (DOLAN, 2003), mostrando mais uma vez a robustez do método.

As diferenças entre valores obtidos para o número de pratos teóricos (N) foi mais pronunciada quando variou-se a marca do cromatógrafo e o fluxo de fase móvel. Este parâmetro está relacionado à eficiência da coluna e depende diretamente do tempo

de retenção e assimetria que conforme avaliado anteriormente, também apresentaram maiores variações para marca do cromatógrafo e o fluxo de fase móvel. O N também depende das condições do sistema cromatográfico, desse modo a mudança de equipamento leva a comportamentos diferentes e com isso maiores alterações nos valores. Entretanto, em todos os testes os valores de N foram satisfatoriamente altos, mostrando boa eficiência da coluna.

Desse modo, os resultados confirmam que o método é robusto e resiste a pequenas alterações sem perder a qualidade e confiabilidade dos resultados para quantificação de NAP e SUM.

5.3 Doseamento e identificação por IV dos insumos farmacêuticos ativos naproxeno sódico e succinato de sumatriptano

Os espectros na região do infravermelho obtidos para os IFAs NAP e SUM foram superponíveis àqueles gerados a partir da análise com SQR dos fármacos. Os máximos de absorção são correspondentes conforme observado nas Figuras 29 e 30. Desse modo, pode-se comprovar que os insumos obtidos tratam-se de fato de NAP e SUM.

Figura 29- Espectros de NAP IFA (linha preta) e SQR (linha azul)

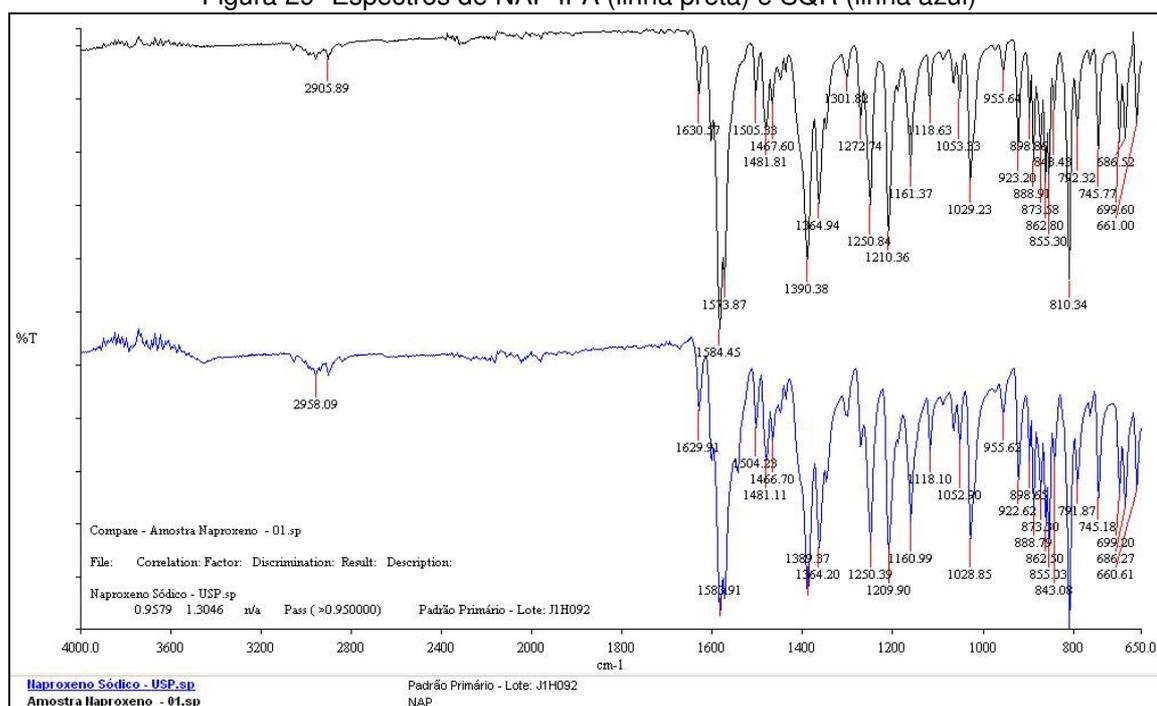
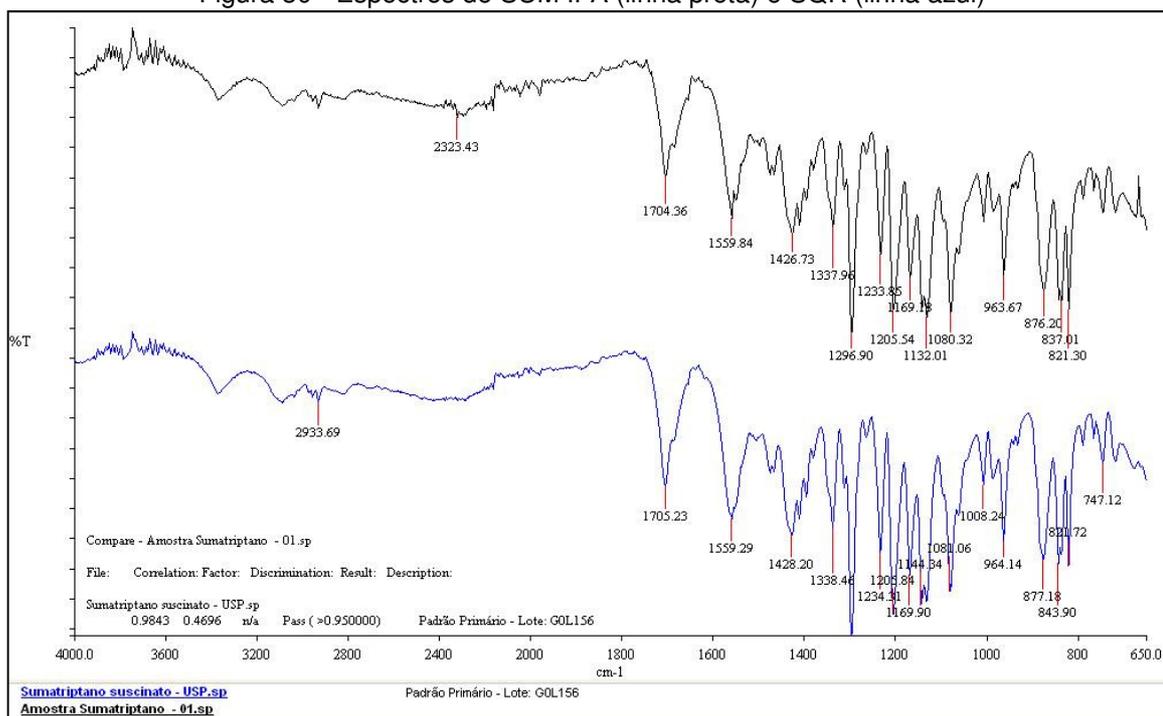


Figura 30 - Espectros de SUM IFA (linha preta) e SQR (linha azul)



Uma vez comprovada a autenticidade dos insumos, realizou-se o doseamento dos mesmos como forma de comprovar quantitativamente a qualidade das matérias-primas. Os resultados obtidos nesse teste foram satisfatórios sendo 101,83% para NAP e 99,65% para SUM, valores que se encontram dentro da faixa geralmente preconizada para IFAs (98 a 102%). O estudo foi considerado válido já que o DPR (%) entre as respostas das três amostras foi inferior a 2%, sendo 0,19% para NAP e 1,91% para SUM.

Desse modo, os IFAs foram considerados adequados para o estudo de solubilidade sendo identificados e quantificados com êxito.

5.4 Avaliação do peso médio, teor, dureza e desintegração de comprimidos revestidos de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano isolados e em dose fixa combinada

Os resultados para avaliação geral da qualidade dos medicamentos indicam que os mesmos podem ser usados nos estudos de perfil de dissolução já que estão dentro dos limites estabelecidos para teor, dureza e desintegração. A determinação de peso médio foi fundamental para delineamento de testes envolvendo os medicamentos e

preparo de placebos dos medicamentos. A seguir estão detalhados os resultados obtidos para estes testes.

5.4.1 Determinação de peso médio dos comprimidos

O peso médio dos comprimidos obtidos após pesagem de 20 unidades foram superiores a 300 mg e nenhum comprimido apresentou variação superior a $\pm 5\%$ do valor médio, conforme observado na Tabela 40.

Tabela 40 – Resultados para a determinação de peso médio dos comprimidos

Medicamento	Peso médio (mg)	Menor variação (%)	Maior variação (%)
FLANAX® 275 mg	412,88	-1,93	2,55
IMIGRAN® 50 mg	305,09	-1,44	0,94
SUMAXPRO® 50-500 mg	968,38	-1,08	0,77
SUMAXPRO® 85-500 mg	973,47	-0,58	0,86
Naproxeno sódico 550 mg	824,80	-2,41	3,30

5.4.2 Avaliação do teor dos comprimidos

Os resultados comprovam que os medicamentos estão com teores adequados para o uso já que estão dentro da faixa estabelecida de 90 a 110% (USP, 2016). O estudo foi considerado válido já que o DPR (%) entre as respostas das três amostras foi inferior a 2%. Os dados obtidos podem ser observados na Tabela 41.

Tabela 41 – Resultados para o teste de doseamento dos medicamentos

Medicamento	Concentração calculada ($\mu\text{g/mL}$)	Teor (%)	DPR (%)
FLANAX® 275 mg	6,35	103,26	1,92
IMIGRAN® 50 mg	1,58	100,01	1,87
SUMAXPRO® 50-500 mg	NAP = 11,47 SUM = 1,45	NAP = 102,59 SUM = 92,73	NAP = 1,43 SUM = 1,96
SUMAXPRO® 85-500 mg	NAP = 11,10 SUM = 2,55	NAP = 99,12 SUM = 94,51	NAP = 0,46 SUM = 1,93
Naproxeno sódico 550 mg	12,31	100,57	0,46

5.4.3 Avaliação da dureza dos comprimidos

Os comprimidos foram submetidos a uma força aplicada diametralmente suficiente para a quebra. Os valores obtidos são informativos como modo de conhecer características de resistência mecânica dos comprimidos.

A média de força necessária para quebra dos comprimidos foi: 108 N para FLANAX® 275 mg, 92 N para IMIGRAN® 50 mg, 240 N para SUMAXPRO® 50-500 mg, 282 N para SUMAXPRO® 85-500 mg e 133 N para Naproxeno sódico 550 mg. Tais valores são apenas informativos.

Os comprimidos contendo a associação dos fármacos (SUMAXPRO®) possui um sistema de dupla camada, desse modo, pode-se supor que a maior dureza observada nesses comprimidos é devido a esse sistema e ainda ao peso médio maior, oferecendo maior resistência mecânica.

5.4.4 Avaliação da desintegração dos comprimidos

As seis unidades testadas de cada medicamento desintegraram completamente em água após 30 minutos, conforme estabelecido. Desse modo, pode-se inferir uma desintegração adequada e portanto, a disponibilidade dos fármacos para solubilizarem-se e serem absorvidos quando em ambiente fisiológico.

5.5 Estudo de solubilidade dos insumos farmacêuticos ativos naproxeno sódico e succinato de sumatriptano isolados e em associação

A solubilidade quantitativa de NAP e SUM avaliada isoladamente e em associação foi calculada após 6, 24 e 30 horas de estudo pelo método da agitação orbital em frascos (*shake flask*). Os resultados obtidos com os meios de fluido gástrico simulado sem enzimas pH 1,2, solução tampão acetato 0,05 M pH 4,5, fluido intestinal simulado sem enzimas pH 6,8 e 7,5, e água destilada estão descritos na Tabela 42.

Tabela 42 - Resultados de solubilidade quantitativa após 6, 24 e 30 horas em cada um dos meios utilizados no estudo de solubilidade em equilíbrio dos IFAs NAP e SUM

Meio	Tempo (horas)	Média da Solubilidade NAP (mg/mL)	Média da Solubilidade SUM (mg/mL)	Média da Solubilidade NAP + SUM (mg/mL)	
				NAP	SUM
Água destilada	6	2,19	0,52	1,78	0,46
	24	2,19	0,55	1,82	0,48
	30	2,19	0,55	1,81	0,48
Fluido gástrico simulado sem enzimas pH 1,2	6	0,03	0,52	0,03	0,47
	24	0,03	0,56	0,03	0,48
	30	0,03	0,55	0,03	0,48
Solução tampão acetato 0,05 M pH 4,5	6	0,14	0,53	0,13	0,46
	24	0,14	0,55	0,13	0,48
	30	0,11	0,55	0,12	0,48
Fluido intestinal simulado sem enzimas pH 6,8	6	2,22	0,53	1,99	0,47
	24	2,19	0,55	2,02	0,48
	30	2,19	0,55	2,03	0,48
Fluido intestinal simulado sem enzimas pH 7,5	6	2,21	0,54	2,01	0,48
	24	2,21	0,56	2,03	0,48
	30	2,20	0,55	2,03	0,48

Considerando-se as quantidade de massa dos IFAs adicionadas aos meios, as concentrações esperadas (solubilidade) eram: 2,20 mg/mL para NAP isolado; 0,56 mg/mL para SUM isolado; 2,0 mg/mL para NAP associado e 0,48mg/mL para SUM associado. Os teores dos IFAs usados estão entre 98 e 102% de fármacos conforme demonstrado no item 5.3 e apresentado na Tabela 43 com os dados obtidos no estudo de solubilidade, para os meios em que os fármacos são solúveis. Desse modo, pode-se observar que as soluções obtidas estão dentro da faixa requerida para doseamentos desses insumos.

Tabela 43 - Resultados do teor de fármaco obtido nas soluções após 6, 24 e 30 horas em cada um dos meios utilizados no estudo de solubilidade em equilíbrio dos IFAs NAP e SUM

Meio	Tempo (horas)	Teor NAP (%)	Teor SUM (%)	Teor NAP + SUM (%)	
				NAP	SUM
Água destilada	6	99,43	93,52	89,03	97,17
	24	99,16	98,88	91,17	100,35
	30	99,32	98,05	90,67	99,81
Fluido gástrico simulado sem enzimas pH 1,2	6	1,37	92,13	1,49	97,99
	24	1,36	99,36	1,51	100,24
	30	1,16	98,32	1,35	101,25
Solução tampão acetato 0,05 M pH 4,5	6	6,36	95,12	6,41	97,49
	24	6,32	98,23	6,49	101,73
	30	5,04	98,70	5,79	101,50
Fluido intestinal simulado sem enzimas pH 6,8	6	100,94	94,30	99,37	98,72
	24	99,57	97,36	101,06	100,38
	30	99,42	98,06	101,27	100,99
Fluido intestinal simulado sem enzimas pH 7,5	6	100,42	96,71	100,21	99,83
	24	100,44	99,93	101,51	101,54
	30	99,92	99,04	101,63	101,38

Conforme esperado em meios ácidos (fluido gástrico simulado sem enzimas pH 1,2 e solução tampão acetato 0,05 M pH 4,5) NAP tem solubilidade reduzida em meio aquoso. NAP é uma molécula ácida e em soluções com pH inferior a 4,19 (pka correspondente ao ácido carboxílico presente estrutura molecular de NAP) permanece em sua forma não ionizada, aliada a sua polaridade reduzida para solubilizar-se em meio aquoso. Em solução tampão acetato 0,05 M pH 4,5 a solubilidade melhora muito pouco, embora tem-se predominância de moléculas na forma ionizada nessa condição.

O DPR (%) das solubilidades obtidas com as três amostras em cada um dos meios foi inferior a 2%, exceto para amostras contendo NAP no meio fluido gástrico simulado sem enzimas pH 1,2, já que por não ser solúvel a homogeneidade da soluções torna-se prejudicada. Para essas últimas amostras o DPR máximo foi de 5,9%

Os tempos de coleta foram satisfatórios, no entanto, no tempo de 6 horas muitas amostras não apresentaram total solubilização sendo necessário mais dois tempos

para comprovar o equilíbrio. Portanto, estudos posteriores podem ser realizados apenas com os tempos de 24 e 30 horas, sendo estes suficientes para avaliar a solubilidade em equilíbrio.

A classificação da solubilidade foi avaliada comparando-se as D/S obtidas (com a solubilidade do último tempo testado) e o valor esperado de 250 mL, já que para definição da massa de fármaco usada no estudo usou-se a dose máxima comercial como base. Desse modo, para ser considerado de alta solubilidade em determinado meio os valores de D/S deveriam estar o mais próximo de 250 mL. Permitiu-se uma variação de até 5% dos valores em relação a 250 mL. Na Tabela 44 estão demonstrados os valores de D/S obtidas em cada meio e o desvio em relação a 250 mL.

Tabela 44 - Resultados da média das razões dose máxima comercial/solubilidade obtidos após 30 horas de estudo em cada um dos meios utilizados no estudo de solubilidade dos IFAs NAP e SUM

Meio	NAP		SUM		NAP + SUM			
					NAP		SUM	
	D/S (mL)	Desvio (%)	D/S (mL)	Desvio (%)	D/S (mL)	Desvio (%)	D/S (mL)	Desvio (%)
Água destilada	255,38	-2,15	257,32	-2,93	275,76	-10,30	250,58	-0,23
Fluido gástrico simulado sem enzimas pH 1,2	21563,65	-8525,46	254,29	-1,71	18590,32	-7336,13	246,97	1,21
Solução tampão acetato 0,05 M pH 4,5	4962,39	-1884,96	253,30	-1,32	4317,53	-1627,01	246,38	1,45
Fluido intestinal simulado sem enzimas pH 6,8	251,25	-0,50	255,24	-2,10	246,78	1,29	247,55	0,98
Fluido intestinal simulado sem enzimas pH 7,5	249,87	0,05	252,52	-1,01	245,89	1,64	244,85	2,06

Com os dados obtidos no estudo pode-se confirmar ser NAP de baixa solubilidade segundo o SCB, já que não é solúvel nos meios fisiológicos ácidos, onde o desvio é aproximadamente 350 vezes maior que o estabelecido no estudo (WU; BENET, 2005). Demonstrando, portanto, que a solubilidade do fármaco é maior na porção intestinal do trato gastrointestinal, onde ocorre sua absorção. Para SUM, observa-se desvio inferior a 5 % em todos os meios testados, sendo esse fármaco classificado como alta

solubilidade, conforme descrito na literatura (VARMA; SATEESH; PANCHAGNULA, 2005).

A associação dos dois fármacos não influencia em seus valores de solubilidade de forma significativa, o que pode ser observado pela manutenção dos desvios dentro da faixa citada e ainda pela manutenção da solubilidade ou insolubilidade observada quando os IFAs foram estudados individualmente. A independência dos fármacos quanto a solubilidade foi confirmada por testes estatístico *t* de *Student* com grau de significância de 0,05. Para todos os dados *t* calculado foi menor que *t* tabelado, comprovando não haver diferença estatisticamente significativa entre as solubilidades dos fármacos isolados ou associados.

A solução aquosa obtida com SUM, apresenta pH ácido (4,5 a 5,3 segundo a farmacopeia europeia), essa observação justifica a menor solubilidade de NAP e, portanto, um desvio de D/S superior a 5 %, quando o estudo em associação dos fármacos foi realizado.

O pH das amostras foram avaliados no início e ao fim do estudo. A variação dos valores obtidos foi inferior a 0,1 conforme apresentado na Tabela 45, o que demonstra que as soluções tampão foram capazes de manter a faixa de pH esperada, mesmo após adição dos fármacos.

Tabela 45 - Valores médios de pH medidos nas amostras no início e no fim do estudo de solubilidade em equilíbrio para NAP e SUM

Meio	NAP		SUM		NAP + SUM	
	pH inicial	pH final	pH inicial	pH final	pH inicial	pH final
Água destilada	6,65	6,67	4,87	4,91	6,30	6,31
Fluido gástrico simulado sem enzimas pH 1,2	1,28	1,27	1,29	1,26	1,29	1,26
Solução tampão acetato 0,05 M pH 4,5	4,81	4,81	4,55	4,55	4,79	4,79
Fluido intestinal simulado sem enzimas pH 6,8	6,73	6,72	6,71	6,71	6,70	6,68
Fluido intestinal simulado sem enzimas pH 7,5	7,47	7,46	7,42	7,43	7,42	7,40

Os resultados do estudo de solubilidade permitem observar que para solubilização de ambos os fármacos os melhores meios apresentaram valores de pH próximos da neutralidade e que mimetizam o fluido intestinal sem enzimas nos pHs 6,8 e 7,5. As diferenças entre os dados obtidos com esses dois meios não foram significativas e portanto, ambos podem ser empregados em estudos de dissolução para obter-se bons resultados. Embora o meio contendo apenas água destilada apresente boa solubilidade para ambos os fármacos, esse não é um meio biorelevante. Desse modo, esse meio foi utilizado apenas como indicativo da solubilidade dos fármacos em soluções aquosas.

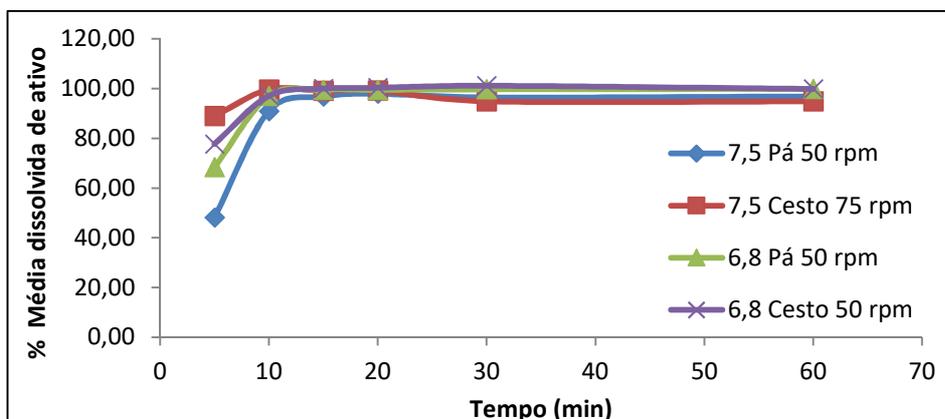
5.6 Estudos de dissolução em comprimidos revestidos de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano isolados e em dose fixa combinada

5.6.1 Estudos de perfil de dissolução com comprimidos contendo NAP e SUM

A seleção do meio empregado no estudo de dissolução foi baseada no estudo de solubilidade. Os melhores meios para a dissolução dos dois analitos simultaneamente são os meios de fluido intestinal simulado sem enzimas nos pHs 6,8 e 7,5, devido a melhor solubilidade de NAP nessa faixa de pH. Desse modo, realizou-se perfis de dissolução com esses meios, usando por estudo seis cubas contendo 900 mL de meio, sendo um comprimido de SUMAXPRO® 85-500 mg por cuba. Para cada meio testou-se a dissolução usando pá a 50 rpm e cesto a 75 rpm.

Conforme esperado, devido a sua alta solubilidade, SUM apresentou rápida dissolução atingindo o platô da curva em apenas 15 minutos, independente do meio e aparato utilizado, conforme observado na Figura 31. Esse período coincide com o requerido no método farmacopeico para comprimidos contendo esse fármaco, embora o meio empregado seja solução de ácido clorídrico 0,01 M, utilizando pás mantidas sob agitação a 30 rpm (USP, 2016).

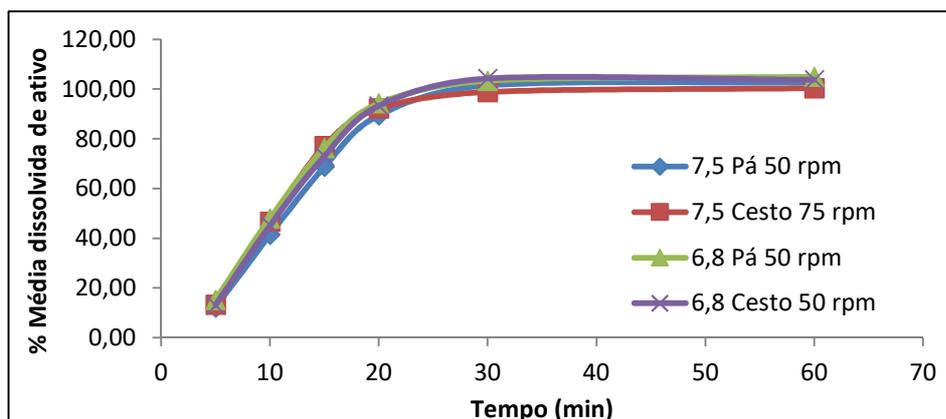
Figura 31 - Perfis de dissoluções obtidos para SUM em comprimidos de SUMAXPRO® 85-500 mg



As variações entre os perfis foram sutis e mais significativas apenas nos dois primeiros tempos de coleta (5 e 10 minutos). Nesses tempos os perfis realizados empregando-se cesto a 75 rpm apresentaram porcentagem dissolvida mais alta. Tal fato pode ser justificado tanto pela velocidade maior, quando comparada com o estudo com pá (realizado a 50 rpm), quanto pela disponibilidade de fármaco no meio ser mais uniformemente distribuída em estudos com cesto em comparação com estudos com pá.

Os perfis de dissolução obtidos para NAP apresentaram dissolução mais lenta quando comparado a SUM, sendo o equilíbrio atingido apenas após 30 minutos. Esse período é inferior aos 45 minutos de teste requeridos no método farmacopeico para comprimidos contendo esse fármaco, em que o meio empregado é solução tampão fosfato 1 M pH 7,4, utilizando pás a 50 rpm (USP, 2016). As diferenças entre os perfis foram mínimas conforme observado na Figura 32.

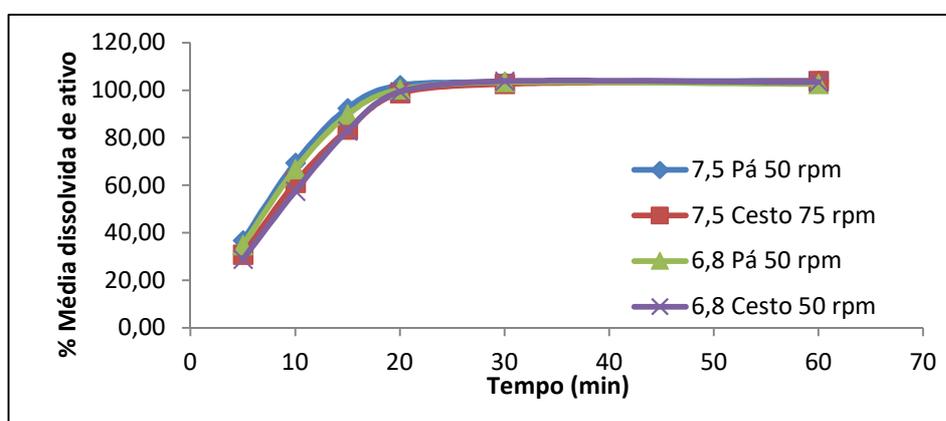
Figura 32 - Perfis de dissoluções obtidos para NAP em comprimidos de SUMAXPRO® 85-500 mg



NAP apresentou velocidade de dissolução crescentes ao longo dos pontos testados para comprimidos de SUMAXPRO® 85-500 mg, portanto uma dissolução mais lenta. Como forma de avaliação suplementar realizou-se os mesmos perfis, com os comprimidos desse fármaco isolado, usando-se para tal o medicamento referência FLANAX® 275 mg.

Conforme observado na Figura 33, os perfis obtidos para NAP isolado atingem equilíbrio em 30 minutos, tempo inferior ao tempo de análise farmacopeico e ao obtido para comprimidos de SUMAXPRO® 85-500 mg. Tal resultado, pode ser explicado pela quantidade de fármaco nos medicamentos SUMAXPRO® ser 1,8 vezes maior que a encontrada em comprimidos de FLANAX® 275 mg e pelas diferenças intrínsecas às formulações dos dois comprimidos avaliados.

Figura 33 - Perfis de dissoluções obtidos para NAP em comprimidos de FLANAX® 275 mg



Após observadas as semelhanças, tanto para NAP quanto para SUM, entre os perfis de dissolução algumas avaliações sobre o comportamento dos medicamentos *in vivo*, foram necessárias para a escolha do melhor meio. Sabendo-se que a porção intestinal de maior absorção de medicamentos, tanto por sua extensão quanto por suas vilosidades e transportadores, é o intestino delgado, para preconização do meio de estudo considerou-se o pH dessa região, que é por volta de 6,8 (DAHAN *et. al.*, 2010). Além disso, diversas agências regulatórias preconizam para estudos de solubilidade e dissolução faixa de pH com valores de 1,2 a 6,8 (BRASIL, 2011; EMA, 2010; FDA, 2017; WHO, 2017). Desse modo, considerou-se mais adequado o meio fluido intestinal simulado sem enzimas pH 6,8, quando comparado ao pH 7,5.

A escolha do aparato a ser utilizado foi realizada considerando-se a praticidade e redução de erros inerentes do teste. Os cestos são um material de precisão, e variações em suas malhas levam a desvios entre os resultados intra e interlaboratoriais (STORPIRTIS *et. al.*, 2009). Já as pás, são mais práticas e promovem uma homogeneização eficiente, sendo geralmente a primeira escolha durante o desenvolvimento de métodos de dissolução (STORPIRTIS *et. al.*, 2009).

Desse modo, preconizou-se no método de dissolução desenvolvido para avaliação de comprimidos contendo NAP e SUM em dose fixa combinada o meio fluido intestinal simulado sem enzimas pH 6,8 mantido sobre agitação por pás a 50 rpm por 45 minutos. Como forma de aplicar o método proposto em medicamentos de diferentes concentrações e formulações, avaliou-se o perfil de dissolução (realizando coletas nos tempos anteriormente citados), com o método preconizado para os comprimidos: IMIGRAN® 50 mg (medicamento referência de SUM isolado); Naproxeno Sódico 550 mg (medicamento genérico de NAP) e SUMAXPRO® 50-500 mg.

Foram realizados ainda perfis nos meios fluido gástrico simulado sem enzimas pH 1,2 e solução tampão acetato 0,05 M pH 4,5 mantidos sobre agitação por pás a 50 rpm, com a finalidade de comparar os perfis de dissolução de diferentes formulações. Para esse teste realizou-se coletas nos tempos realizados nos demais perfis e usou-se comprimidos de: IMIGRAN® 50 mg, FLANAX® 275 mg e SUMAXPRO® 85-500 mg.

Os resultados de todos os perfis realizados estão dispostos nas Tabelas 46 e 47 e representados nas Figuras 34 a 39.

Tabela 46 – Média das porcentagens dissolvidas de NAP em cada tempo de coleta nos diferentes estudos de perfis de dissolução realizados

Medicamento	Condições do estudo	% Dissolvida por tempo de coleta em minutos					
		5	10	15	20	30	60
SUMAXPRO® 85-500 mg	7,5 Pá 50 rpm	12,08	41,32	68,68	89,41	101,48	102,65
	7,5 Cesto 75 rpm	13,21	46,57	77,11	92,19	98,80	100,36
	6,8 Pá 50 rpm	15,20	47,91	76,27	94,21	103,29	104,96
	6,8 Cesto 75 rpm	13,01	45,04	72,99	93,23	104,22	103,73
	1,2 Pá 50 rpm	0	0	0,20	0,11	0,13	0,22
	4,5 Pá 50 rpm	0,26	3,93	9,28	12,67	15,28	25,30
FLANAX® 275 mg	7,5 Pá 50 rpm	36,71	69,36	92,44	102,04	103,45	104,02
	7,5 Cesto 75 rpm	30,72	60,96	83,39	98,76	102,64	103,78
	6,8 Pá 50 rpm	34,79	66,72	89,70	100,28	103,39	102,56
	6,8 Cesto 75 rpm	28,77	57,44	82,89	99,34	103,82	103,36
	1,2 Pá 50 rpm	0	0	0,03	0,02	0,06	0,19
	4,5 Pá 50 rpm	0,25	1,37	1,82	1,96	2,30	2,28
Naproxeno sódico 550 mg	6,8 Pá 50 rpm	11,27	47,68	73,18	88,17	98,54	100,54
SUMAXPRO® 50-500 mg	6,8 Pá 50 rpm	16,89	49,74	76,35	93,10	101,64	103,38

Figura 34 - Perfis de dissoluções obtidos para NAP em comprimidos de SUMAXPRO® (S), FLANAX® (F) e NAP (NAP) em meio pH 6,8 e 7,5

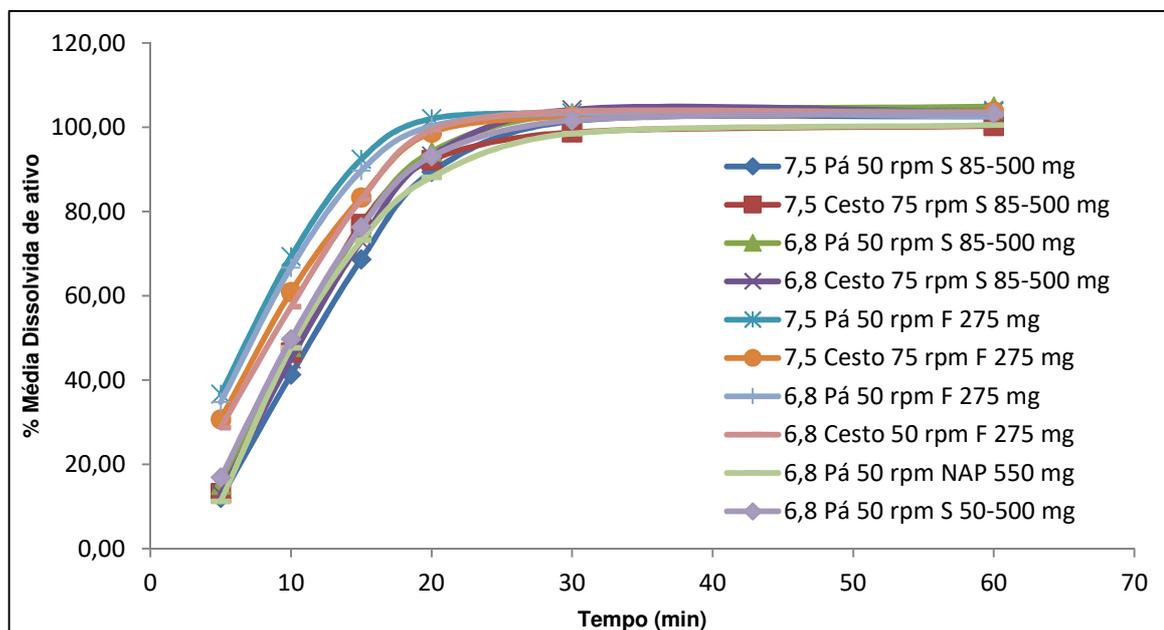


Figura 35 - Perfis de dissoluções obtidos para NAP em comprimidos de SUMAXPRO® (S), FLANAX® (F) e NAP (NAP) em meio pH 6,8 e pá a 50 rpm

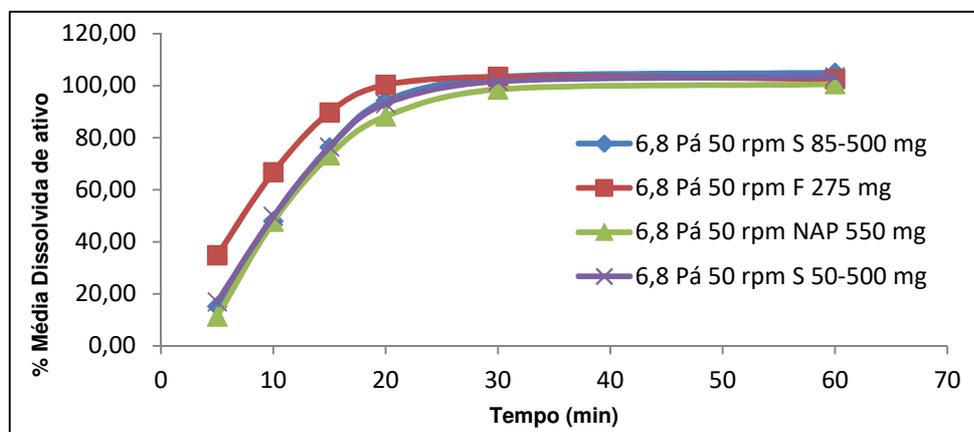


Figura 36 - Perfis de dissoluções obtidos para NAP em comprimidos de SUMAXPRO® (S) e FLANAX® (F) em os meios 4,5 e 1,2

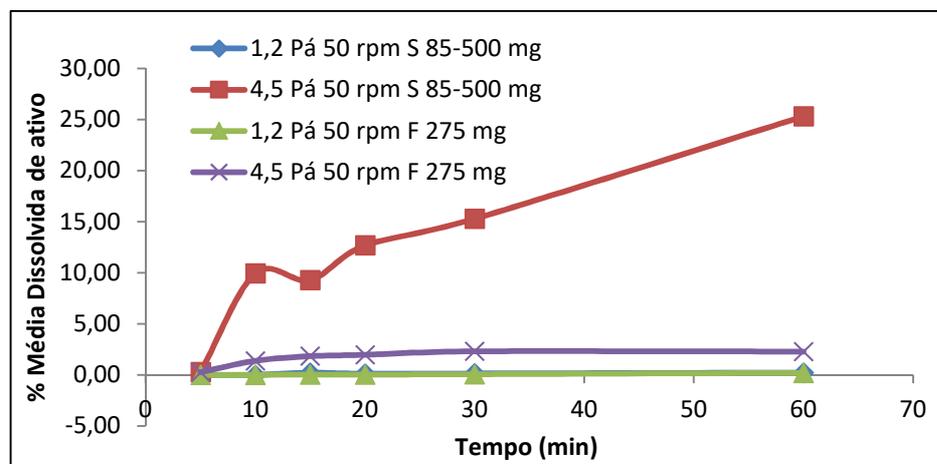


Tabela 47 - Média das porcentagens dissolvidas de SUM em cada tempo de coleta nos diferentes estudos de perfis de dissolução realizados

Medicamento	Condições do estudo	% Dissolvida por tempo de coleta em minutos					
		5	10	15	20	30	60
SUMAXPRO® 85-500 mg	7,5 Pá 50 rpm	48,09	90,96	96,77	97,98	96,48	96,86
	7,5 Cesto 75 rpm	88,98	99,69	99,15	99,27	94,93	94,84
	6,8 Pá 50 rpm	68,40	97,12	99,54	99,52	99,71	99,88
	6,8 Cesto 75 rpm	77,72	97,09	100,01	100,36	101,17	99,90
	1,2 Pá 50 rpm	48,65	88,98	98,10	100,13	100,26	98,33
	4,5 Pá 50 rpm	64,80	97,22	100,81	101,29	101,62	101,44
IMIGRAN® 50 mg	6,8 Pá 50 rpm	80,00	95,22	98,07	99,24	100,37	100,01
	1,2 Pá 50 rpm	94,42	101,39	101,19	102,13	101,87	102,34
	4,5 Pá 50 rpm	68,46	98,68	101,78	102,20	102,90	102,00
SUMAXPRO® 50-500 mg	6,8 Pá 50 rpm	79,08	93,23	96,50	99,81	100,30	100,36

Figura 37 - Perfis de dissoluções obtidos para SUM em comprimidos de SUMAXPRO® (S) e IMIGRAN® (I) em meio pH 6,8 e 7,5

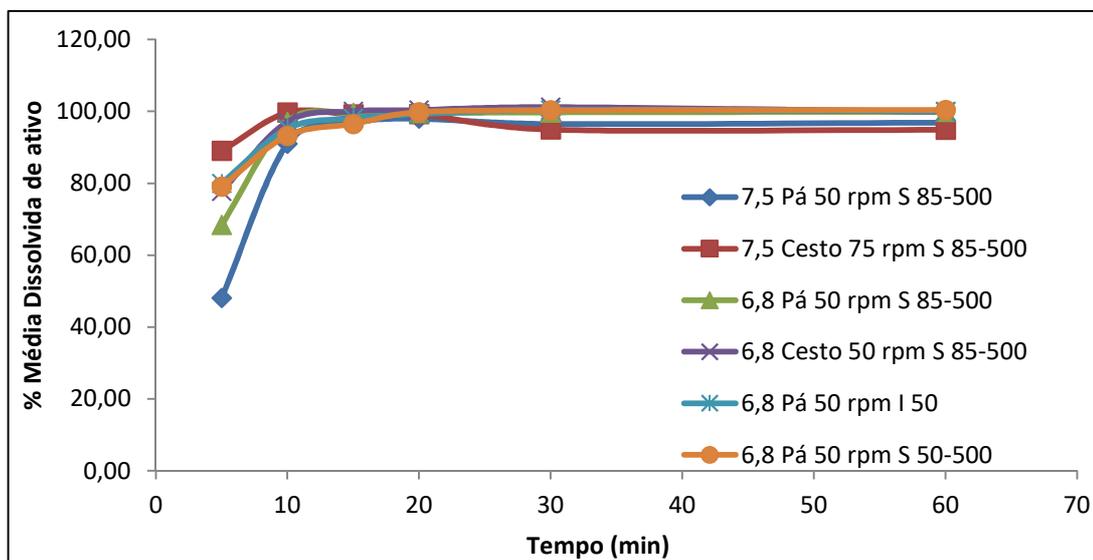


Figura 38 - Perfis de dissoluções obtidos para SUM em comprimidos de SUMAXPRO® (S) e IMIGRAN® (I) em meio pH 6,8 e pá a 50 rpm

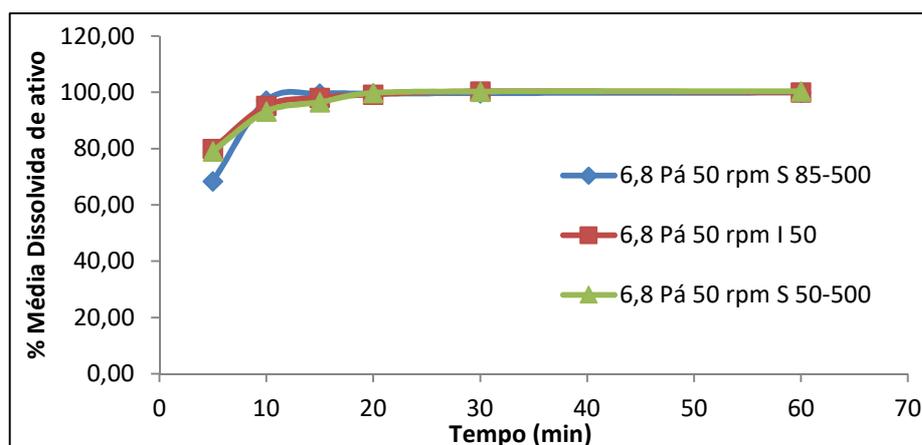
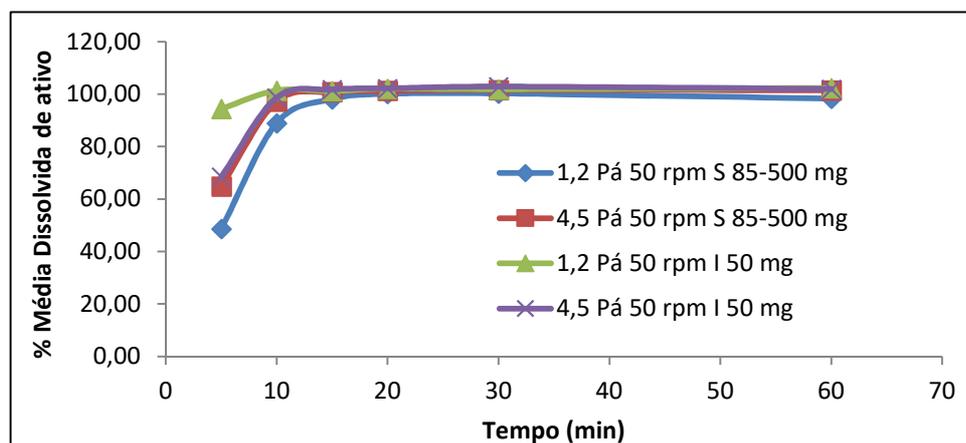


Figura 39 - Perfis de dissoluções obtidos para NAP em comprimidos de SUMAXPRO® (S) e IMIGRAN® (I) em meio pH 1,2 e 4,5



O perfil de dissolução de NAP em comprimidos de SUMAXPRO® 85-500 mg em meio pH 4,5 apresentou perfil diferente quantitativamente do perfil observado em FLANAX® 275 mg, onde as concentrações foram mais baixas. No entanto, para ambos os casos a dissolução é baixa e insuficiente para boa absorção do fármaco.

Em todos os tempos de coleta os resultados obtidos para NAP estiveram com valores de DPR dentro do especificado de 20% para 5 e 10 minutos e 10% para os demais. Para SUM todos os valores para o tempo de 5 minutos apresentaram desvio superior ao estabelecido (20%). Esse resultado se deve ao fato desse fármaco apresentar solubilidade muito alta e no tempo de cinco minutos, que é um período muito curto, a porcentagem de dissolução apresenta-se ainda instável e com pouco equilíbrio entre as cubas.

5.6.2 Validação do estudo de dissolução desenvolvido para NAP e SUM

Os tempos de coleta 30 e 60 minutos dos perfis de dissolução realizados usando 900 mL do meio fluido intestinal simulado sem enzimas pH 6,8 mantido sobre agitação por pás a 50 rpm foram utilizados para avaliação da validade do método de dissolução.

O método desenvolvido foi considerado validado já que os valores de DPR entre dados dos tempos de coleta de 30 e 60 minutos, foram inferiores ao estabelecido (10%) conforme observado na Tabela 48.

Tabela 48 – Desvio padrão relativo (DPR) obtido entre as seis cubas analisadas nos tempos de coleta de 30 e 60 minutos

Medicamento	Fármaco	DPR (%) por tempo de coleta	
		30	60
SUMAXPRO® 85-500 mg	NAP	1,09	0,68
	SUM	2,26	0,83
SUMAXPRO® 50-500 mg	NAP	5,43	2,10
	SUM	3,38	2,84
IMIGRAN®50 mg	SUM	1,93	2,08
FLANAX®275 mg	NAP	1,28	1,17
Naproxeno sódico 550 mg	NAP	2,02	2,12

O teste recuperação ou exatidão do método de dissolução desenvolvido mostrou resultados satisfatórios conforme observado na Tabela 49. Todos os valores de EPR% obtidos foram inferiores a 10%, conforme estabelecido.

Tabela 49 – Erro padrão relativo (EPR%) obtido no teste de exatidão do método de dissolução

Exatidão	Fármaco	EPR%
10%	NAP	2,75
	SUM	0,69
70%	NAP	-1,20
	SUM	3,23
120%	NAP	-2,23
	SUM	6,37

O teste com coleta realizada após 120 minutos de dissolução mostrou manutenção do valor de cedência obtida em 60 minutos já que para NAP o valor mudou de 99,88% em 60 minutos para 99,87% em 120 minutos, e para SUM de 104,96% para 104,01%. Desse modo, o tempo de estudo foi suficiente e as amostras permanecem estáveis por até 120 minutos de estudo.

A avaliação da utilização do filtro de seringa demonstrou ser esse adequado para o uso nos testes contendo os fármacos. Para NAP, obteve-se área média de 3874965, injetando-se em quintuplicata a solução padrão, e após filtrar a solução e injetá-la também em quintuplicata obteve-se área média de 3899551, o que corresponde a um desvio de 0,63%. Para SUM o desvio foi de 0,93, relacionado as áreas 348428 para a solução não filtrada e 351675 para a solução filtrada. A não influência do filtro foi confirmada por teste estatístico *t* de *Student* com grau de significância de 0,05. Para todos os dados *t* calculado foi menor que *t* tabelado, comprovando não haver diferença estatisticamente significativa entre as soluções submetidas a filtração e àquelas injetadas sem esse processo.

Os perfis de dissolução realizados com meio pH 6,8 desaerado e sem esse processo, foram similares. Conforme observado na Tabela 50 e Figuras 40 e 41, os valores encontrados foram próximos nessas duas condições.

Tabela 50 – Média das porcentagens dissolvidas de NAP e SUM em cada tempo de coleta nos perfis de dissolução realizados com e sem desaeração do meio

Medicamento	Condições do estudo		% Dissolvida por tempo de coleta em minutos					
			5	10	15	20	30	60
SUMAXPRO® 50-500 mg	6,8 Desaerado Pá 50rpm	NAP	15,93	49,84	82,01	101,60	103,61	104,10
		SUM	82,31	93,94	97,29	97,03	97,46	98,44
SUMAXPRO® 50-500 mg	6,8 Pá 50rpm	NAP	16,66	53,70	83,53	102,50	103,89	103,55
		SUM	93,91	100,63	101,74	101,83	100,47	99,67

Figura 40 - Perfis de dissolução obtidos para NAP em comprimidos de SUMAXPRO® 50-500 mg com e sem desaeração do meio 6,8

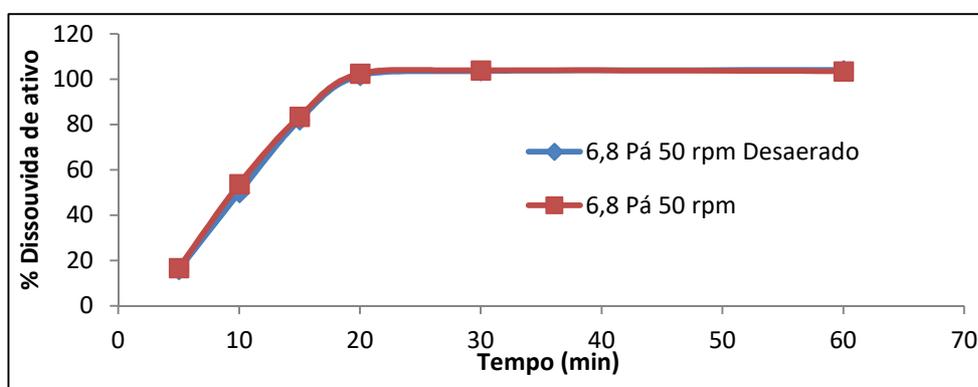
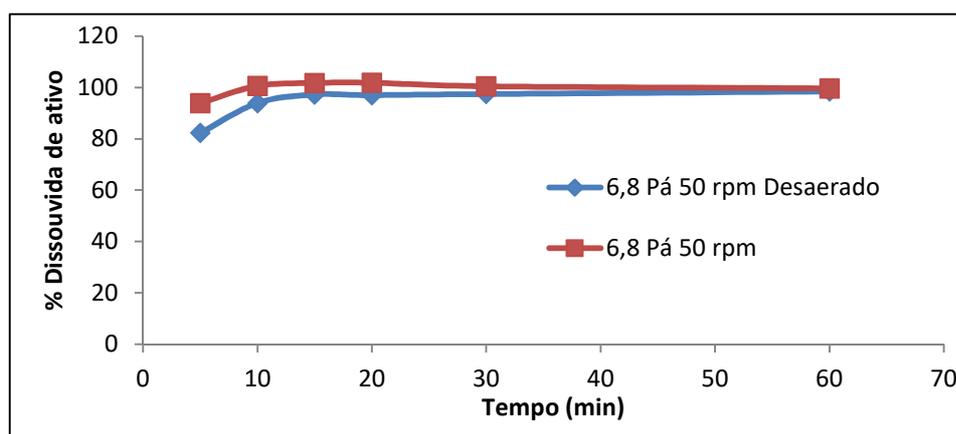


Figura 41 - Perfis de dissolução obtidos para SUM em comprimidos de SUMAXPRO® 50-500 mg com e sem desaeração do meio 6,8

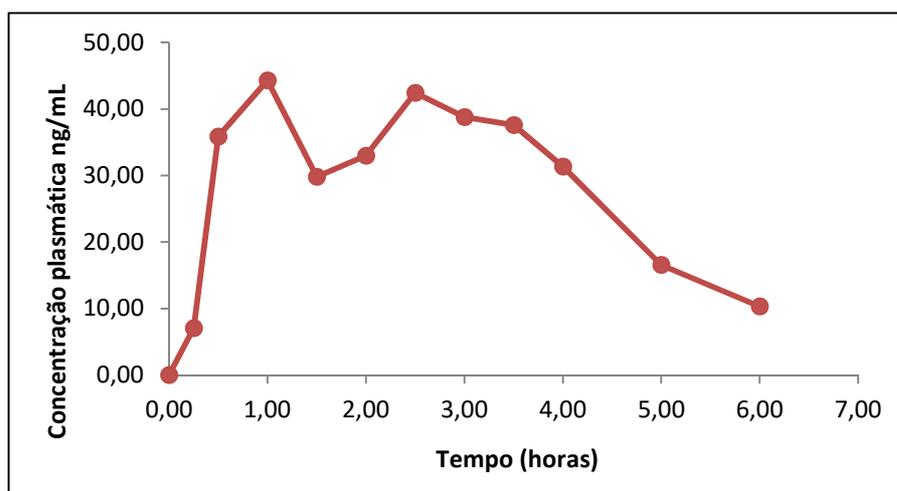


Conforme demonstrado no item 5.2.1 no meio selecionado não encontra-se interferentes nos tempos de retenção relativos aos fármacos de interesse. Assim, o método de dissolução desenvolvido se mostrou válido para uso em estudos de NAP e SUM em comprimidos isolados ou em dose fixa combinada.

5.6.3 Proposta de estudo de Correlação In Vitro In Vivo

Durante a execução dos perfis de dissolução, conforme esperado, observou-se que comprimidos contendo SUM apresentam rápida dissolução, por possuir alta solubilidade em todos os meios fisiológicos. Desse modo, a dissolução não é etapa limitante na biodisponibilidade desse fármaco, sendo a permeabilidade e absorção etapas mais críticas para a eficácia de SUM. Assim, não realizou-se a correlação dos dados *in vitro* e *in vivo* para esse fármaco, que rapidamente atinge a concentração plasmática máxima e é eliminado do organismo, conforme observado curva de concentração plasmática versus tempo (Figura 42).

Figura 42 - Curva de concentração plasmática de SUM ao longo do tempo obtida em estudo farmacocinético BRÊTAS, 2016



Para medicamentos administrados por via oral contendo NAP, a dissolução é etapa limitante para a biodisponibilidade desse fármaco, devido à baixa solubilidade desse fármaco em meios fisiológicos ácidos e alta solubilidade na região intestinal. Sendo assim, a CIVIV é bastante interessante por reduzir o número de estudos com humanos e também para redução de custos associados a essa linha de estudo.

Desse modo, os dados obtidos no estudo de BRÊTAS e colaboradores (2016), e Patel e colaboradores (2012), para NAP foram usados para calcular as frações absorvidas e propor CIVIV para FLANAX® 275 mg. Na Figura 43 está demonstrada a curva de

concentração plasmática versus tempo para NAP. Na Tabela 51, está sumarizado os dados gerais relacionados a farmacocinética de NAP.

Figura 43 - Curva de concentração plasmática de NAP ao longo do tempo obtida em estudo farmacocinético de BRÊTAS, 2016

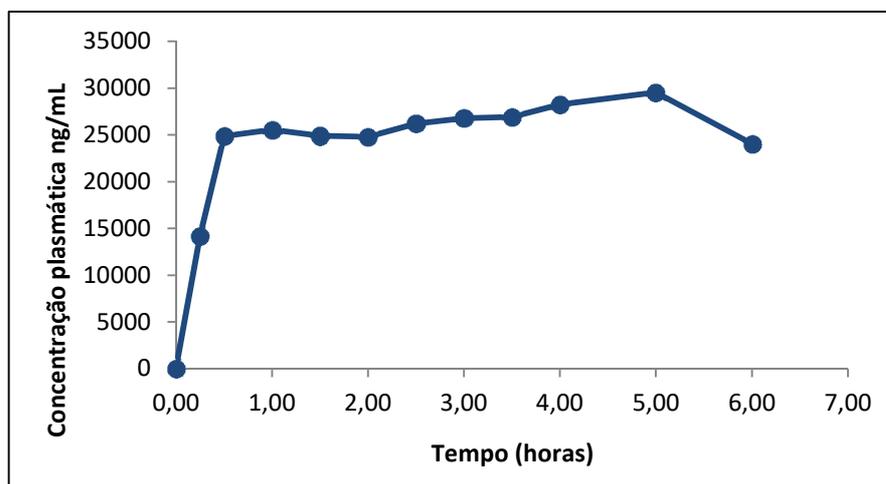


Tabela 51 - Parâmetros farmacocinéticos relacionados a NAP

Parâmetros Farmacocinéticos	Valores para NAP
$C_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{g/mL}$)*	41,21
$T_{m\acute{a}x}$ (h)*	3,63
$ASC_{m\acute{a}x0-t}$ ($\mu\text{g.h/mL}$)*	0,16
K_{El} **	0,05
$T_{1/2}$ **	13,82

*Fonte: Brêtas *et. al.*, 2016.

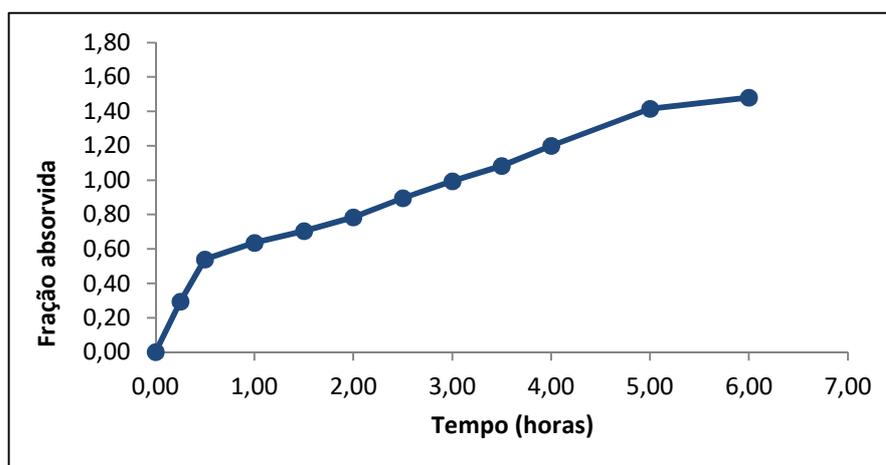
**Fonte: Patel *et. al.*, 2012.

Com as concentrações obtidas no estudo de BRÊTAS e colaboradores, calculou-se as frações absorvidas ao longo do tempo conforme descrito na Tabela 52 e visto na Figura 44.

Tabela 52 – Concentração plasmática e fração absorvida de NAP ao longo do tempo

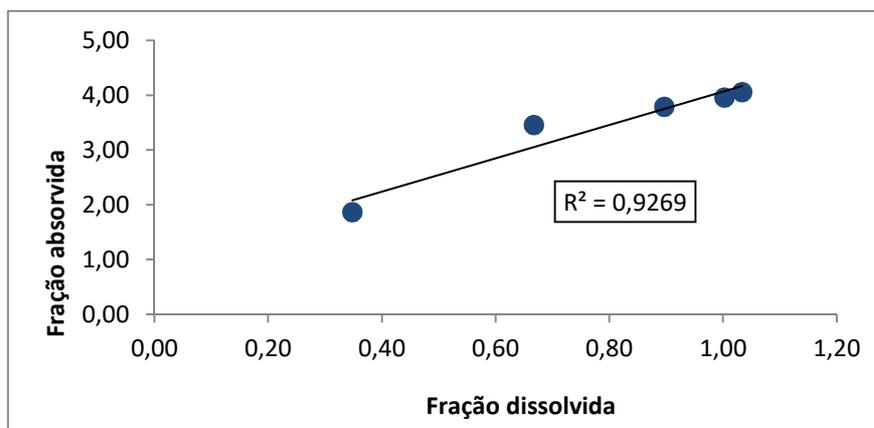
Tempo (horas)	Concentração plasmática obtida ($\mu\text{g/mL}$)	Fração absorvida
0,00	0	0,0000
0,25	14,19	1,8638
0,50	24,87	3,2902
1,00	25,56	3,4626
1,50	24,88	3,4570
2,00	24,78	3,5251
2,50	26,18	3,7906
3,00	26,79	3,9567
3,50	26,90	4,0582
4,00	28,25	4,3255
5,00	29,55	4,6834
6,00	24,04	4,1387

Figura 44 - Fração absorvida de NAP ao longo do tempo obtida a partir de dados do estudo farmacocinético de BRÊTAS, 2016



As frações absorvidas foram plotadas com a fração dissolvida obtida no perfil de dissolução de comprimidos de FLANAX® 275 mg em meio fluido intestinal simulado sem enzimas no pH 6,8, mantido em rotação constante de pás a 50 rpm, conforme observado na Figura 45.

Figura 45 - Curva de fração absorvida por fração dissolvida obtida por estudos de dissolução e farmacocinético com FLANAX® 275 mg



Os valores de coeficiente de determinação (r^2) e coeficiente de correlação (r) obtidos, 0,9269 e 0,9628 respectivamente, foram próximos de 1, indicando boa correlação entre a fração absorvida e a fração dissolvida. Desse modo, pode-se propor uma correlação nível A.

O estabelecimento de CIVIV é dado pela avaliação da correlação entre a fração absorvida (F_a) e a fração dissolvida (F_d). A determinação ideal da fração dissolvida é realizado por um método de dissolução que seja discriminativo. Para tal realiza-se o estudo farmacocinético e perfis de dissolução de três formulações farmacotécnicas diferentes do medicamento estudado: formulação de interesse, formulação de baixa dissolução e formulação de alta dissolução. Sendo necessário, ainda, que o método seja capaz de identificar as diferenças dessas formulações (EMAMI, 2006).

Os perfis de dissolução executados durante esse estudo foram realizados com formulações comerciais não sendo realizadas alterações na formulação. Da mesma forma, o estudo farmacocinético foi realizado apenas para a formulação comercial e não em diferentes formulações. Desse modo, embora tenha-se observado boa correlação entre F_a e F_d , as avaliações aqui realizadas permitem apenas uma proposta de CIVIV usando o método de dissolução desenvolvido e validado no estudo.

5.7 Estudo de permeabilidade celular com células Caco-2

O estudo de permeabilidade foi realizado com sucesso e cumpriu as premissas esperadas como controle de temperatura, rotação e garantia da integridade da membrana. Conforme os dados encontrados na literatura, NAP é altamente permeável enquanto SUM possui menor permeabilidade. As Figuras 46 e 47 demonstram graficamente os valores de concentração obtidos para NAP e SUM, isolados e associados, ao longo do tempo estudado.

Figura 46 - Concentração de SUM permeada ao longo do tempo durante estudo de permeabilidade de SUM isolado e associado

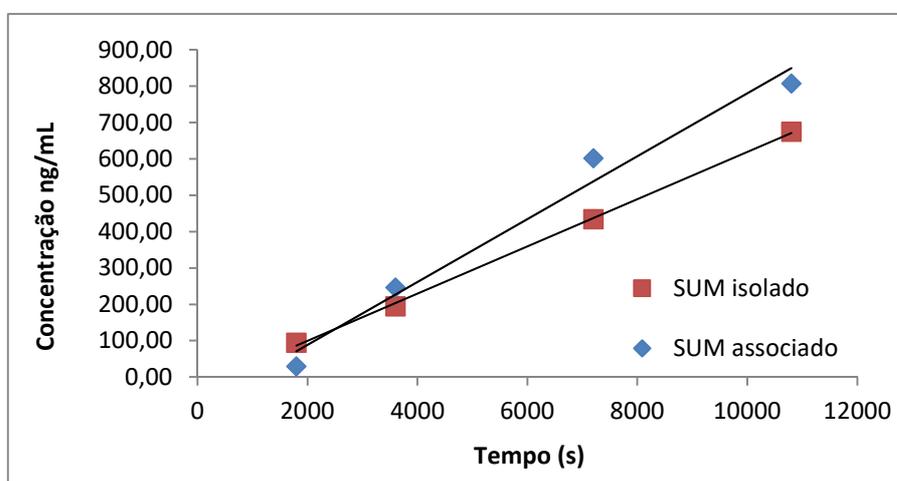
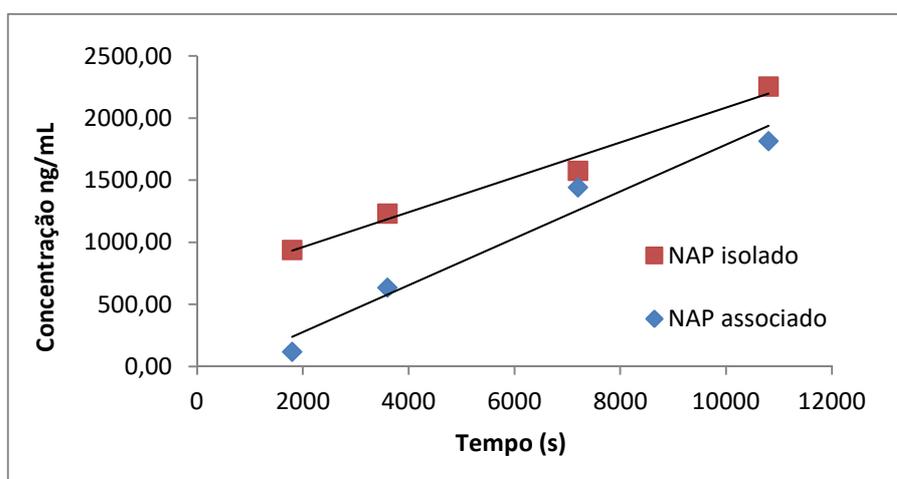


Figura 47 - Concentração de NAP permeada ao longo do tempo durante estudo de permeabilidade de NAP isolado e associado



Para cálculo de todas as concentrações, levou-se em consideração a massa de fármaco previamente retirada nas coletas anteriores. Com os dados obtidos, incluindo

concentrações iniciais e inclinação da reta, os valores de Papp foram calculados conforme exposto na Tabela 53.

Tabela 53 - Concentrações de NAP e SUM nas soluções obtidas nos compartimentos receptores após diferentes tempos de estudo e os respectivos valores de permeabilidade

Fármaco	Concentração corrigida(ng/mL) por tempo(s)				Papp (cm/s)	Log Papp
	1800	3600	7200	10800		
SUM (isolado)	94,48	193,97	434,17	674,83	$6,51 \times 10^{-6}$	- 5,19
NAP (isolado)	941,78	1232,39	1578,57	2255,76	$17,18 \times 10^{-6}$	- 4,77
SUM (associado)	28,87	246,13	602,00	807,18	$8,76 \times 10^{-6}$	- 5,06
NAP (associado)	119,21	636,13	1444,85	1816,34	$22,86 \times 10^{-6}$	-4,64

No estudo de permeabilidade fármacos que apresentam Papp menor que 1×10^{-6} são considerados pouco absorvidos (0 a 20%), para Papp entre 1 e 10×10^{-6} classifica-se como moderadamente absorvidos (20 a 70%) e quando obtém-se valores superiores a 10×10^{-6} elevada absorção (70 a 100%) (YEE, 1997). Sendo assim, SUM apresenta moderada absorção enquanto NAP é altamente absorvido. De acordo com a classificação SCB, fármacos com absorção igual ou superior a 85% são considerados de alta permeabilidade, e os demais de baixa permeabilidade (EMA, 2010; FARMACOPEIA, 2017; FDA, 2017). Desse modo, pode-se confirmar os dados da literatura que relatam NAP ser de alta permeabilidade e SUM de baixa permeabilidade.

Analisando-se os resultados apresentados, nota-se ainda diferença entre as concentrações obtidas para os fármacos avaliados isoladamente quando comparados a aos dados em associação. No entanto, ambos fármacos, quando associados, permanecem com a mesma classificação no SCB e com a mesma taxa de absorção observada quando testados isoladamente. Com isso, pode-se inferir que a permeabilidade e absorção de NAP e SUM são pouco influenciadas pela associação dos mesmos.

5.8 Discussões gerais

O desenvolvimento de método analítico e bioanalítico para quantificação simultânea de NAP e SUM foi grande desafio. Inicialmente devido à grande diferença de pKa entre os fármacos (4,19 para NAP e 9,54 para SUM) gerando comportamentos cromatográficos distintos de acordo com as condições empregadas no método, especialmente pH da fase móvel. A particularidade dos métodos empregados também representou fatores limitantes. Para o método de dissolução, preocupou-se em garantir que os analitos apresentassem retenção cromatográfica considerável, a fim de evitar a coeluição dos fármacos com interferentes. No método de permeabilidade celular, devido à alta quantidade de sais presentes no meio HBSS, ocorreu inibição considerável da linha de base e vários picos relativos a interferentes eluíram nos primeiros minutos de corrida (até aproximadamente 3 minutos), sendo necessária também uma maior retenção dos analitos. Desse modo, foi necessário o uso de coluna cromatográfica com grupos ciano, que embora seja menos usual que as colunas de octadesilsilano, é também bastante empregada.

No método analítico, outro fator limitante foi a diferença de concentração e sinal entre os analitos. Nos medicamentos de dose fixa combinada, NAP possui concentração no mínimo dez vezes maior que SUM. Além disso, o sinal analítico referente a NAP é consideravelmente superior a SUM. Desse modo, vários testes foram necessários para chegar a uma faixa de concentração, considerando-se diluições realizadas após um estudo de dissolução (um comprimido por cuba contendo 900 mL).

O método analítico empregado para estudos de perfil de dissoluções abrangeu ampla faixa de concentração, especialmente para NAP, cuja dissolução é crescente, com concentrações iniciais baixas. A alta sensibilidade do equipamento possibilitou o uso de concentrações muito elevadas de NAP, levando a uma saturação do detector. No entanto, diluições muito altas levaram a redução intensa de sinal de SUM, tornando o método pouco robusto a mudanças de equipamentos. Desse modo, foi necessário o uso de um método polinomial de segunda ordem para esse estudo.

Com as mesmas condições cromatográficas, conseguiu-se avaliar a dissolução e a permeabilidade dos fármacos associados e isolados. Os métodos analítico e bioanalítico apresentaram resultados satisfatórios em validação completa com análise estatística apropriada. O método analítico desenvolvido e validado pode ainda ser empregado para doseamentos. Essa possibilidade é bastante relevante na rotina de uma indústria farmacêutica, já que permite a otimização do tempo, especialmente de horas dedicadas do cromatógrafo a determinado produto.

Os resultados de solubilidade e permeabilidade obtidos nas amostras contendo SUM, tanto associado quanto isolado, comprovam a classificação, segundo o SCB, como III (VARMA; SATEESH; PANCHAGNULA, 2005). Além disso, em todos os meios testados, a dissolução de SUM em comprimidos é muito rápida, sendo em apenas 10 minutos de dissolução alcançado valores de fração dissolvida acima de 90%.

SUM não possui baixo índice terapêutico e é encontrado em comprimidos de liberação imediata (ROLAN, 2012). Os excipientes contidos nas formulações analisadas estão no banco de dados de ingredientes inativos publicada pelo FDA, com última atualização em 5 de março de 2018. As quantidades foram supostas considerando as funções e recomendações mais comuns (ROWE *et al.*, 2012).

Baseando-se nos principais guias mundiais (WHO, FDA e EMA), SUM pode ser considerado um fármaco forte candidato à bioisenção. No Brasil, ainda não são aprovadas bioisenções para fármacos classe III. Entretanto, foi aberto em 2015 um edital de chamamento público que inicia no país os estudos e avaliações da inclusão dessa classe como passível de ser bioisenta.

NAP apresentou resultados de solubilidade e permeabilidade coerentes a um fármaco de classe II, confirmando sua classificação no SCB (WU; BENET, 2005). Na dissolução em meios ácidos (pH 1,2 e 4,5) NAP foi pouco dissolvido, justificando sua classificação com baixa solubilidade. Entretanto, em valores de pH na faixa intestinal, 6,8 (entre jejuno proximal e meados do intestino delgado) e 7,5 (íleo distal), esse fármaco possui alta solubilidade, indicando boa biodisponibilidade (DAHAN *et al.*, 2010).

Os perfis de dissolução realizados com NAP foram semelhantes em todos os valores de pH, dentro das diferentes formulações testadas. Esse fármaco foi rapidamente dissolvido em meios de pH na faixa intestinal, alcançando em 20 minutos mais de 85% de fração dissolvida. Portanto, na região do trato gastrointestinal onde ocorre a maior absorção de substâncias, NAP encontra-se dissolvido. Como para ser absorvido, o fármaco deve estar em solução, pode-se pressupor que NAP terá altas taxas de permeação quando administrado em comprimidos de liberação imediata, fato comprovado por estudos farmacocinéticos (BRÊTAS, 2016).

Do mesmo modo que SUM, NAP não possui baixo índice terapêutico e é comercializado em comprimidos de liberação imediata (SEGRE, 1989). Os excipientes contidos nas formulações usadas nos testes são também inativos e calculados considerando as quantidades usuais (ROWE *et al.*, 2012).

Os guias preconizados pela WHO de 2006 a 2017, incluía como potencial bioisencões, fármacos também de classe II. A justificativa envolve o fato de que, fármacos que são ácidos fracos dotados de alta permeabilidade e alta solubilidade sob condições de pH 6,8 comportarem-se de maneira semelhante aos fármacos da classe I do SCB na região intestinal, onde ocorre a quase totalidade do processo de absorção (YAZDANIAN *et al.*, 2004; WHO, 2006). Desse modo, NAP seria considerado bioisento nessas condições. No entanto, o novo guia da WHO não inclui fármacos de classe II, harmonizando-se com outras agências regulatórias. Baseando-se nos dados farmacocinéticos obtidos para NAP, pode-se considerar adequados, para NAP, os conceitos anteriores dispostos no antigo guia da WHO. Tais resultados mostram a importância de serem discutidas e estudadas as bioisencões de fármacos de classe II.

Outro modo de bioisentar NAP seria a CIVIV. A correlação da fração absorvida com a fração dissolvida, resultou em coeficiente de correlação de 0,9628 (e coeficiente de determinação de 0,9269), valores próximos a 1, o que indica tendência a CIVIV nível A. Outros estudos com diferentes formulações precisariam ser realizados para validar os resultados preliminares (STORPIRTIS *et al.*, 2009).

Segundo os principais guias mundiais é possível a bioisenção de medicamentos em dose fixa combinada. Para o FDA e EMA, ambos os fármacos devem ser bioisentos para que a formulação seja isenta do estudo de bioequivalência. Já a ANVISA e a WHO permitem que apenas um dos fármacos seja bioisento, devendo ser realizado o estudo de bioequivalência para o outro fármaco envolvido. No entanto, apenas fármacos de classe I e III são atualmente aceitos como candidatos de bioisenção por essas agências. Desse modo, considerando as atuais legislações, não é possível estabelecer bioisenção para medicamentos de NAP e SUM em dose fixa combinada (BRASIL, 2011; EMA, 2010; FDA, 2017; WHO, 2017).

Muitos estudos com NAP e SUM, demonstram que o efeito sinérgico dessa associação é notado tanto em comprimidos administrados isoladamente, quanto em dose fixa combinada. Esse dados, indicam que a bioisenção desses fármacos em comprimidos isolados, ainda é importante para o tratamento da enxaqueca, já que muitas vezes opta-se por usar os comprimidos contendo os fármacos separadamente como forma de aumentar as possibilidades de combinações de diferentes concentrações (BERGES *et al.*, 2010; HABERER *et al.*, 2010; LAW; DERRY; MOORE, 2016; MICHAEL *et al.*, 2012; PATEL *et al.*, 2012).

6 CONCLUSÕES

Os métodos analítico e bioanalítico desenvolvidos permitiram análises rápidas, simples e eficazes para quantificação simultânea de NAP e SUM. Os métodos foram validados e demonstraram ser lineares, precisos, exatos, seletivos, estáveis e robustos. O método analítico pode ser empregado em estudos de solubilidade, doseamento e perfis de dissolução. Já o método bioanalítico pode ser utilizado em estudos de permeabilidade celular empregando células Caco-2. Os métodos desenvolvidos e validados foram aplicados em estudos contendo NAP e SUM em associação e isolados.

Os resultados dos testes de solubilidade, dissolução e permeabilidade realizados com SUM permitem concluir que esse fármaco de classe III é um bom candidato a bioisenção, segundo as legislações mundiais. Os estudos em associação com NAP não demonstram alterações consideráveis nos dados para SUM isolado.

NAP foi altamente solúvel em valores de pH intestinais (6,8 e 7,5) e permeável em monocamada de células Caco-2. Os perfis de dissolução de medicamentos contendo esse fármaco, demonstram rápida dissolução nesses valores de pH. Em toda a região de maior absorção do trato gastrointestinal, NAP encontra-se solubilizado, podendo portanto ser absorvido com facilidade. Além disso, estudo de correlação *in vitro in vivo* pode ser estabelecido com nível considerável para esse fármaco.

Sendo assim, pode-se concluir que ambos fármacos tem potencial para bioisenção, fato que aumentaria a disponibilidade de medicamentos contendo NAP e SUM no mercado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIDON, G.L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability, **Pharmaceutical Research**, New York, v.12, n. 3, p.413-420, 1995.

AOAC. Guidelines for Standard Method Performance Requirements. *Official Methods of Analysis*, Appendix F, 2016. Disponível em: <http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf>. Acesso em: maio de 2018.

BALIMANE, P.V.; CHONG, S.; MORRISON, R.A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **Journal Pharmacological and toxicological methods**, New York, v. 44, n.1, p. 301-312, 2000.

BARBANTI, P.; LE PERA, D.; CRUCCU, G. Sumatriptan fast-disintegrating/rapid-release tablets in the acute treatment of migraine. **Expert Review of Neurotherapeutics**, London, v. 7, n. 8, p. 927-934, 2007.

BERGES, A.; WALLS, C.; LENER, S.E.; MCDONALD, S.A. Pharmacokinetics and Tolerability of Sumatriptan After Single-Dose Administration of a Fixed-Dose Combination Tablet of Sumatriptan/Naproxen Sodium 85/500 mg Followed Two Hours Later by Subcutaneous Sumatriptan 4- or 6-mg Injection: A Randomized, Open-Label, Three-Period Crossover Study in Healthy Volunteers. **Clinical Therapeutics**, Princeton, v. 32, n. 6, p. 1165-1177, 2010.

BOULTON, D.W.; DUNCAN, G.F.; VACHHARAJANI, N.N. Validation and application of a high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay, for sumatriptan in human plasma. **Biomedical Chromatography**, London, v. 17, n. 1, p. 48-52, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade e Bioequivalência**. 1 ed. v.1. 146 p., Brasília, 2002a. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/bioequivalencia/publicacoes/index.asp>>. Acesso em: maio de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 482, de 19 de março de 2002. Guia para estudos de correlação *in vitro in vivo* (CIVIV). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, mar. 2002b. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/legislacao>>. Acesso em: maio de 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº.135, de 29 de maio de 2003. *Regulamento técnico para medicamentos genéricos*. Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun. 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/legis/resolucoes/2003/135_03rdc.htm>. Acesso em: maio de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 27, de 17 de maio de 2003. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, mai. 2003. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/legislacao>>. Acesso em: maio de 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 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, 2010. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legislacao>>. Acesso em: maio de 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 37, de 3 de agosto de 2011. *Dispõe sobre o Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência e dá outras providências*. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legislacao>>. Acesso em: maio de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Edital de Chamamento Público nº 4, de 3 de julho de 2015. "Avaliação da capacidade preditiva dos resultados de dissolução in vitro conduzidos de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 37, de 03 de agosto de 2011 acerca dos resultados dos estudos de bioequivalência para medicamentos contendo fármacos da Classe 3 do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, jul. 2013. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: maio de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução normativa- IN nº 10, de 29 de setembro de 2016. Determina a publicação da "Lista de fármacos candidatos à bioisenção baseada no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB)" e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, set. 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/legislacao>>. Acesso em: maio de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, jul. 2017. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/legislacao>>. Acesso em: maio de 2018.

BREEMEN VAN, R.B.; LI, Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. **Expert opinion on drug metabolism and toxicology**, London, v.1, n.2, p.175-185, 2005.

BRÊTAS, Juliana Machado Brêtas. Avaliação da influência de anticoagulantes sobre parâmetros da validação de métodos bioanalíticos para estudos farmacocinéticos e de biodisponibilidade/bioequivalência de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano. 2014. 191 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

BRÊTAS, J. M.; CÉSAR, I. C.; BRÊTAS, C. M.; TEIXEIRA, L. S.; BELLORIO, K. B. ; MUNDIM, I. M.; PIANETTI, G. A. Development and validation of an LC-ESI-MS/MS

method for the simultaneous quantification of naproxen and sumatriptan in human plasma: application to a pharmacokinetic study. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 408, n. 15, p.3981-3992, 2016.

BRUNTON, L.L; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. **Goodman&Gilman As bases farmacológicas da terapêutica**.12.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012 .2112 p.

CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho**. 1 ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 1998. 179 p.

CHENG, K.N.; REDRUP, M.J.; BARROW, A.; WILLIAMS, P.N. Validation of a liquid chromatographic tandem mass spectrometric method for the determination of sumatriptan in human biological fluids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, New York, v. 17, n. 3, p. 399-408, 1998.

CHONG, S.; DANDO, S.A.; SOUCEK, K.M.; MORRISON, R.A. In vitro permeability through caco-2 cells is not quantitatively predictive of in vivo absorption for peptide-like drugs absorbed via the dipeptide transporter system. **Pharmaceutical Research**, New York, v.13, n.1, p.120-123, 1996.

COOK, J.A.; DAVIT, B.M.; POLLI, J.E. Impact of Biopharmaceutics Classification System-based biowaivers. **Molecular pharmaceuticals**, Washington, v.7, n.5, p.1539-1544, 2010.

COOK, J. A.; ADDICKS, W.; WU, Y. H. Application of the biopharmaceutical classification system in clinical drug development— an industrial view. **AAPS Journal**, v. 10, n. 2, 306-310, 2008.

DAHAN, A.; MILLER, J.M.; HILFINGER, J.M.; YAMASHITA, S.; YU, L.X.; LENNERNÄS, H.; AMIDON, G.L. High-permeability criterion for BCS classification: segmental/pH dependent permeability considerations. **Molecular Pharmaceuticals**, Washington, v.7, n.5, p.1827-1834, 2010.

DAVIT, B. M.; KANFER, I.; TSANG, Y. C.; CARDOT, J. M. BCS Biowaivers: Similarities and Differences Among EMA, FDA, and WHO Requirements. **The AAPS Journal**, Vol. 18, Nº. 3, 2016.

DOLAN, J. W. Why Do Peaks Tail? **Lc troubleshooting**, 2003.

DODICK, D. W. Migraine. **The lancet**, v.391, n.10127, p. 1315-1330, 2018.

DUNNE, M.; ANDREW, P. Fully automated assay for the determination of sumatriptan in human serum using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, New York, v. 14, n. 6, p. 721-726, 1996

DUQUESNOY, C.; MAMET, J.P.; SUMNER, D.; FUSEAU, E. Comparative clinical pharmacokinetics of single doses of sumatriptan following subcutaneous, oral, rectal

and intranasal administration. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 99-104, 1998.

ELSINGHORST, P.W.; KINZIG, M.; RODAMER, M.; HOLZGRABE, U.; SÖRGEL, F. An LC–MS/MS procedure for the quantification of naproxen in human plasma: Development, validation, comparison with other methods, and application to a pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B: analytical technologies in the biomedical and life sciences**, Amsterdam, v. 879, n. 19, p. 1686-1696, 2011.

EMAMI, J. *In vitro - In vivo* Correlation: From Theory to Applications. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v. 9, p. 30-50, 2006.

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

<http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf>. Acesso em: maio de 2018.

FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010. v 2. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/farmacopeias-virtuais>>. Acesso em: maio de 2018.

FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Segundo Suplemento. Brasília: ANVISA, 2017. v 2. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/farmacopeias-virtuais>>. Acesso em: maio de 2018.

FERRARI, A.; PINETTI, D.; BERTOLINI, A.; COCCIA, C.; STERNIERI, E. Interindividual variability of oral sumatriptan pharmacokinetics and of clinical response in migraine patients. **European Journal of Clinical Pharmacology**, Berlin, v. 64, n. 5, p. 489-495, 2008.

FLANAX®: comprimidos revestidos. Responsável técnico: Dra. Dirce Eiko Mimura. São Paulo: Bayer S.A., [20--?]. Bula de remédio.

FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION (FDA). Guidance for industry: *Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system*. Rockville: FDA, 2000. p.1-13. Disponível em : <<http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/3657gd3.pdf>>. Acesso em: maio de 2018.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for Industry. Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products — General Considerations**. Rockville, mar. 2003. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070124.pdf>>. Acesso em: maio de 2018.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation**. Rockville, sep. 2013. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM368107.pdf>>. Acesso em: maio de 2018.

FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION (FDA). Guidance for industry: *Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system*. Rockville: FDA, 2017. p.1-14. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070246.pdf>>. Acesso em: maio de 2018.

GE, Z.; TESSIER, E.; NEIRINCK, L.; ZHU, Z. High performance liquid chromatographic method for the determination of sumatriptan with fluorescence detection in human plasma. **Journal of Chromatography B: analytical technologies in the biomedical and life sciences**, Amsterdam, v. 806, n. 2, p. 299-303, 2004.

GILART, N.; MARCÉ, R.M.; BORRULL, F.; FONTANALS, N. Determination of pharmaceuticals in wastewaters using solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 35, n. 7, 875-882, 2012.

HABERER, L.J.; WALLS, C.M.; LENER, S.E.; TAYLOR, D.R.; MCDONALD, S.A. Distinct Pharmacokinetic Profile and Safety of a Fixed-Dose Tablet of Sumatriptan and Naproxen Sodium for the Acute Treatment of Migraine. **Headache**, Hoboken, v. 50, n. 3, p. 357-373, 2010.

HAYES, S.; DUNNE, A.; SMART, T.; DAVIS, J. Interpretation and optimization of the dissolution specifications for a modified release product with an in vivo-in vitro correlation (IVIVC). **Journal pharmaceutical sciences**, Easton, v.93, n.3, p. 571-581, 2004

HÖRTER, D.; DRESSMAN, J.B. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. **Advanced drug delivery reviews**, Amsterdam, v.46, n.1-3, p. 75-87, 2001.

HUBATSCH, I.; RAGNARSSON, E. G. E.; ARTURSSON, P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. **Nature Protocols**, Londres, v.2, n.9, p. 2111-2119, 2007.

IMIGRAN®: comprimidos revestidos. Farmacêutico responsável: Edinilson da Silva Oliveira. Rio de Janeiro: GlaxoSmithKline Brasil Ltda., 2014. Bula de remédio.

INTERNATIONAL HEADACHE SOCIETY. Headache Classification Subcommittee. The International Classification of Headache Disorders. **Cephalalgia: A International Journal of Headache**, New York, v. 24, n. 1, p. 9-160, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). Orientação sobre validação e métodos de ensaios químicos. DOQ-CGCRE-008, Ver. 02, 2007.

JHEE, S.S.; SHIOVITZ, T.; CRAWFORD, A.W.; CUTLER, N.R. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Triptan Antimigraine Agents: A Comparative Review. **Clinical Pharmacokinetics**, New York, v. 40, n. 3, p. 189-205, 2001.

KELMAN, L. The postdrome of the acute migraine attack. **Cephalalgia: A International Journal of Headache**, New York, v. 26, n. 2, p. 214-220, 2006.

KRISHNA, B. A.; KIRANMAI, K.; ROJY, G.; MEENAMADURI, K.; RAVINDER, R.; PANI KUMAR, A.D. Simultaneous estimation of Naproxen sodium and Sumatriptan succinate in tablet dosage forms by RP-HPLC method. **Journal of Pharmacy Research**, India, v. 4, n.9, p.3021-3023, 2011

LANDY, S.; HOAGLAND, R.; HOAGLAND, D.; SAIERS, J.; REUSS, G. Sumatriptan/naproxen sodium combination *versus* its components administered concomitantly for the acute treatment of migraine: a pragmatic, crossover, open-label outcomes study. **Therapeutic advances in neurological disorders**, London, v. 6, n.5, p. 279–286, 2013.

LAW, S.; DERRY, S.; MOORE, R.A. Sumatriptan plus naproxen for the treatment of acute migraine attacks in adults. **The cochrane database of systematic reviews**, Oxford, v.4, CD008541, 2016

LENNERNÄS, H. Human intestinal permeability. **Journal of pharmaceutical sciences**, Easton, v. 87, n. 4, p. 403-410, 1998.

LENNERNÄS, H.; ABRAHAMSSON, B. The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 57, n. 3, p. 273-285, 2005.

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

MARCOLONGO, Raquel Marcolongo. Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica. 2003. 127 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MARTINEZ, M.N.; AMIDON, G.L. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. **Journal of clinical pharmacology**, Stamford, v.42, n.6, p. 620-643, 2002

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

MCLOUGHLIN, D.A.; OLAH, T.V.; ELLIS, J.D.; GILBERT, J.D.; HALPIN, R.A. Quantitation of the 5HT_{1D} agonists MK-462 and sumatriptan in plasma by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 726, n. 1-2, p. 115-24, 1996.

MICHAEL, A.M.; LOTFY, H.M.; REDA, M.R.; MICHAIL, K.; SOMAYAJI, V.; SIRAKI, A.G.; EL-KADI, A.O.S.; SHEHATA, M. A. Simultaneous Determination of Sumatriptan and Naproxen in Dosage Forms and Human Plasma Using LC/MS. **Current Analytical Chemistry**, Cambridge, v. 8, n. 4, p. 512-519, 2012.

MIDHA, K. K.; MCKAY, G. Bioequivalence; Its History, Practice, and Future. **American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**, Arlington, v. 11, n. 4, p. 664-660, 2009

MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M.D; WIDDOP, B. (Ed.). **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material**. 3. ed., v. 2, London:Pharmaceutical Press, 1935 p., 2004.

NUNI, R.; SUMITHRA, M.; KUMAR, B.V.V.S.; SATYANARAYANA, P.; RAO, D. N. Analytical method development and validation for simultaneous determination of sumatriptan and naproxen by RP-HPLC. **International Journal of Advances in Pharmaceutical Research**, Gwalior ,v. 2, n. 7, p. 363 – 379, 2011.

OUDTSHOORN, V.J.E.; GARCÍA-ARIETA, A.. SANTOS, G.M.L.; CRANE, C.; RODRIGUES, C.; SIMON, C.; KIM, J.M.; PARK, S.A.; OKADA, Y.; KURIBAYASHI, R.; PFÄFFLI, C.; NOLTING, A.; LOJERO, I.O.C.; MARTÍNEZ, Z.R.; HUNG, W.Y.; BRADY, A.C.; LEAL, N.A.; TRIANA, D.G.; CLARKE, M.; BACHMANN, P. A Survey of the Regulatory Requirements for BCS-Based Biowaivers for Solid Oral Dosage Forms by Participating Regulators and Organisations of the International Generic Drug Regulators Programme. **Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences**, Canada, v. 21, n.1, p. 27-37, 2018.

PATEL, D.P.; SHARMA, P.; SANYAL, M.; SINGHAL, P.; SHRIVASTAV, P.S. Challenges in the simultaneous quantitation of sumatriptan and naproxen in human plasma: Application to a bioequivalence study. **Journal of Chromatography B: analytical technologies in the biomedical and life sciences**, Amsterdam, v. 902, n. 1, p. 122-131, 2012.

PATEL, P. N.; KARAKAM, V. S.; SAMANTHULA, G.; RAGAMPETA, S. Quality-by-design-based ultra high performance liquid chromatography related substances method development by establishing the proficient design space for sumatriptan and naproxen combination. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 38, n. 19, p. 3354–3362, 2015.

PIANETTI, G. A.; CÉSAR, I. C. *Uso Racional de Medicamentos: fundamentação em condutas terapêuticas e nos macroprocessos da Assistência Farmacêutica*. ISBN: 978-85-7967-108-1. Vol. 1, nº 6. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS), 2016.

REDDY, Y. R.; KUMAR, K. K. REDDY, MRP.; MUKKANTI, K. Rapid Simultaneous Determination of Sumatriptan Succinate and Naproxen Sodium in Combined Tablets by Validated Ultra Performance Liquid Chromatographic Method. **Journal Analytical & Bioanalytical Techniques**, Hyderabad, v. 2, n. 3, 2011.

REDDY, P. S.; SAIT, S.; HOTHAN, K. K. Estimation of Naproxen Related Substances in Sumatriptan Succinate and Naproxen Sodium Tablets by UPLC. **Asian Journal of Chemistry**, Shibabad, v. 25, n. 17, p. 9717-972, 2013.

REDDY, D.V.; SREELATHA, P.; DEVI, B.R. A rapid novel RP- HPLC stability indicating assay method development and validation of simultaneous determination of Sumatriptan Succinate and Naproxen Sodium. **Analytical chemistry an Indian Journal**, Hampshire, v.15, n.5, p. 151-159, 2015.

ROLAN, P.E. Drug interactions with triptans : which are clinically significant? **CNS Drugs**, Mairangi Bay, v.26, n.11, p. 949-957, 2012.

ROWE et al (eds). Handbook of Pharmaceutical Excipients, 7th edn. London:Pharmaceutical Press, 2012.

SANTOS, Sónia Alexandra Pinto Ribeiro da Silva. **Efeitos adversos dos triptanos: suas bases farmacológicas**. Orientador: Carlos Alberto Fontes Ribeiro. 2005. 184 f. Tese (Doutorado em Farmácia) - Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2005.

SEGRE, E.J. Naproxen sodium (Anaprox): pharmacology, pharmacokinetics and drug interactions. **The journal of reproductive medicine**, v.25, n.4, p.222-225,1980.

SHESHALA, R.; KHAN, N.; DARWIS, Y. Validated high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of sumatriptan in rabbit plasma: application to pharmacokinetic study. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Nigeria, v. 6, n. 2, p. 98-107, 2012

SLATTERY, J.T.; LEVY, G. Determination of Naproxen and its Desmethyl Metabolite in Human Plasma or Serum by High Performance Liquid Chromatography. **Clinical Biochemistry**, Toronto, v. 12, n. 3, p. 100-103, 1979.

SMITH, T.R.; SUNSHINE, A.; STARK, S.R.; LITTLEFIELD, D.E.; SPRUILL, S.E.; ALEXANDER, W.J. Sumatriptan and naproxen sodium for the acute treatment of migraine, **Headache**, St. Louis, v.45, n.8, p. 983-991, 2005.

SNYDER, Lloyd R; KIRKLAND, J. J; GLAJCH, Joseph L. Practical HPLC method development. 2. ed. New York: Wiley, c1997. 765 p.

SOLANKI, S. D.; PATEL, P. U. Development and validation of reversed-phase high performance liquid chromatographic method for simultaneous estimation of sumatriptan succinate and naproxen sodium in pharmaceutical dosage form. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Bhopal, v. 4, n. 1, p. 276-278, 2012.

SOUZA, S. V. C. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análise de alimentos**. 2007. 297f. Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG, 2007.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p. 25-35, 2005.

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

SRINIVASU, P.; RAMBHAU, D.; RAO, B.R.; RAO, Y.M. Lack of pharmacokinetic interaction between sumatriptan and naproxen. **Journal of Clinical Pharmacology**, Stamford, v. 40, n. 1, p. 99-104, 2000.

SRINIVASU, P.; RAMBHAU, D.; RAO, B.R.; RAO, Y.M. Lack of pharmacokinetic interaction between sumatriptan and naproxen. **Journal of Clinical Pharmacology**, Stamford, v. 40, n. 1, p. 99-104, 2000.

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

SUMAXPRO®: comprimidos revestidos. Farmacêutico responsável: Cintia Delphino de Andrade. São Paulo: Libbs Farmacêutica Ltda.. Bula de remédio.

SWAPNA, Y.; REDDY, G.N.; SEKHAR, C. K. A new RP-HPLC method for simultaneous estimation of naproxen and sumatriptan in tablet dosage form. **International Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, Bhopal, v.3, n. 1, p. 179-185, 2013.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). 39 ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2016.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). Revision: <1236> Solubility Measurements, 43(2) InProcess. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2017.

TROY, D.B. (Ed.). **Remington: The Science and Practice of Pharmacy**. 21. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. 2393 p.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). Material Safety Data Sheet. Rockville, 2016.

VÄLITALO, P.; KUMPULAINEN, E.; MANNER, M.; KOKKI, M.; LEHTONEN, M.; HOOKER, A.C.; RANTA, V.P.; KOKKI, H. Plasma and Cerebrospinal Fluid

Pharmacokinetics of Naproxen in Children. **Journal of Clinical Pharmacology**, Stamford, v. 52, n. 10, p. 1516-1526, 2012.

VARMA, M.V.; SATEESH; K.; PANCHAGNULA, R. Functional role of P-glycoprotein in limiting intestinal absorption of drugs: contribution of passive permeability to P-glycoprotein mediated efflux transport. **Molecular Pharmaceutics**, Washington, v.2, n.1, p.12-21, 2005.

XU, X.; BARTLETT, M.G.; STEWART, J.T. Determination of degradation products of sumatriptan succinate using LC-MS and LC-MS-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, New York, v. 26, n. 3, p. 367-377, 2001.

YAZDANIAN, M.; BRIGGS, K.; JANKOVSKY, C.; HAWI, A. The "high solubility" definition of the current FDA Guidance on Biopharmaceutical Classification System may be too strict for acidic drugs **Pharmaceutical Research**, New York, v. 21, n.2, p.293-299, 2004.

YEE, S. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man--fact or myth. **Pharmaceutical research**, Stuttgart, v.14, n.6, p.763-766, 1997.

YOON, Y.; RYU, J.; OH, J.; CHOI, B.G.; SNYDER, S.A. Occurrence of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals, and personal care products in the Han River (Seoul, South Korea). **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 408, n. 3, p. 636-643, 2010.

YU, L.X.; AMIDON, G.L.; POLLI, J.E.; ZHAO, H.; MEHTA, M.U.; CONNER, D.P.; SHAH, V.P.; LESKO, L.J.; CHEN, M.L.; LEE, V.H.; HUSSAIN, A.S. Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. **Pharmaceutical Research**, New York, v.19, n.7, p. 921-925, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for WHO Model List of Essential Medicines immediate-release, solid oral dosage forms. *Technical Report Series*, nº 937, 40th Report, Annex 8 of WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. 2006. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_937_eng.pdf>. Acesso em: maio de 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Multisource (Generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability. *Technical Report Series*, nº 992, Annex 7 of WHO technical report series. 2017. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s23245en/s23245en.pdf>>. Acesso em: maio de 2018.

WU, C.Y.; BENET, L. Z. Predicting Drug Disposition via Application of BCS: Transport/Absorption/ Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 22, n. 1, p. 11-23, 2005.

ANEXO A – Certificado de Análise do Insumo Farmacêutico Ativo Succinato de Sumatriptano



AV. D. DONA CECILIA CAMARGO DE OLIVEIRA, 633 – JD. VISTA ALEGRE – EMBU DAS ARTES – SP – BRASIL
CEP 06907-320 - TEL. +55 (0) 11 – 2168-8660

CERTIFICATE OF ANALYSIS Certificado de Análise

PRODUCT:	SUCCINATO DE SUMATRIPTANA	CODE: 100150	ANALYSIS DATE:	Janeiro/2017
Produto:		Código:	Data de análise:	
BATCH N°:	16L0550		MANUFACTURING DATE:	Dezembro/2016
Lote:			Data de fabricação:	
CONTROL LOT:	40000029040		RETEST DATE:	Dezembro/2016
Lote de controle:			Data de reteste:	

TEST Teste	SPECIFICATION Especificação	METHOD Método	RESULT Resultado
Aparência	Pó branco a quase branco	USP 38	Passa Teste
Solubilidade	Água	Livremente solúvel	Passa Teste
	Metanol	Ligeiramente solúvel	Passa Teste
	Clorato de Metileno	Praticamente insolúvel	Passa Teste
Identificação	Teste A – Espectro de FTIR	Corresponde ao espectro do padrão	Positivo
	Teste B – HPLC	Corresponde ao tempo de retenção do padrão	Positivo
Limite de Impureza A por HPLC	Impureza A	Máximo 0,6 %	USP 38 0,1%
Substâncias relacionadas por HPLC	Impurezas individuais conhecidas		
	Impureza B	Máximo 0,5 %	< 0,05%
	Impureza C	Máximo 0,5 %	< 0,05%
	Impureza D	Máximo 0,2 %	< 0,05%
	Impureza E	Máximo 0,1%	< 0,05%
	Impurezas individuais desconhecidas	Máximo 0,1%	< 0,05%
	Total de impurezas (incluindo a impureza A)	Máximo 1,5%	< 0,05%
Água	Karl Fischer	Máximo 1,0%	USP 38 Método I <921> 0,3%
Resíduo de Ignição		Máximo 0,1%	USP 38 <281> 0,1%
Teor (base anidra e livre de solventes)	HPLC	98,0% a 102,0%	USP 38 101,7%
Solventes Residuais por CG	Metanol	Máximo 3000 ppm	Interno 990 ppm
	Etanol	Máximo 5000 ppm	Interno 623 ppm
Contagem total de micro-organismos mesofílicos	CTMA CTBL	Máximo 2000 UFC/g Máximo 200 UFC/g	FB 5ªed. 25 UFC/g 30 UFC/g
Pesquisa de micro-organismos patogênicos	Escherichia coli	Ausente	FB 5ªed. Ausente
	Pseudomonas aeruginosa	Ausente	Ausente
	Staphylococcus aureus	Ausente	Ausente
	Salmonella ssp	Ausente	Ausente

Impureza A = Succinato de [3-(2-(dimetilamino)etil)-2-[[3-(2-(dimetilamino)etil)-1H-indol-5-il]metil]-1H-indol-5-il]-N-metilmetanossulfonamida;

Impureza B = Maleato de [3-(2-(metilamino)etil)-1H-indol-5-il]-N-metilmetanossulfonamida;

Impureza C = Succinato de [3-(2-(dimetilamino)etil)-1-(hidroximetil)-1H-indol-5-il]-N-metilmetanossulfonamida;

Impureza E = [3-(2-(aminoetil)-1H-indol-5-il)-N-metilmetanossulfonamida];

Impureza D = 3-(2-(dimetilamino N-óxido)etil)-1H-indol-5-il]-N-metilmetanossulfonamida.

STATUS:	Approved by:	POSITION:	SIGNATURE:	DATE:
Condição:	Aprovado por:	Cargo:	Assinatura:	Data:
APPROVED	Flavia Motta Sant'Anna	Coordenadora de GMP		30/01/2017
Aprovado				

**ANEXO B – Certificado de Análise do Insumo Farmacêutico Ativo Naproxeno
Sódico**

Certificate of Analysis

Zhejiang Charioteer Pharmaceutical Co., Ltd.

Address: Tongyuanxi, Dazhan, Xianju, Zhejiang Province, P.R. China, 317321

Tel: +86 576 87641661

Fax: +86 576 87641987

The product name	Naproxen Sodium		
Batch No.	176315444	Inspection Basis	USP38
Manufacturing Date	2017.03.01	Retest Date	2020.02.29
Packing	100g/bag	Amount	100g
<u>The items and results of Inspection</u>			
Items	Specification	Test results	
[Appearance]	White to almost white crystalline powder	White crystalline powder	
[Identification]			
A. Infrared absorption	The infrared absorption spectrum is concordant with the reference spectrum	Conform	
B. Ultraviolet Absorption	Absorptivities at 272nm, calculated on the dried base, do not differ by more than 3%	<1%	
[Specific rotation]	-17.0° to -15.3°	-16.8°	
[Loss on drying]	≤1.0%	0.1%	
[Heavy metals]	≤0.002%	<0.002%	
[Free Naproxen]	≤1.0%	0.1%	
[Related substances] (HPLC)			
Impurity D(in-house)	≤0.10%	<0.01%	
Impurity E(in-house, Impurity C in EP)	≤0.10%	<0.01%	
Any other impurity	≤0.10%	<0.01%	
Total impurities	≤0.5%	<0.01%	
[Residual Solvents]			
Toluene	≤50ppm	<1ppm	
Methanol	≤50ppm	<4ppm	
[Assay] (On the dried basis) It contains C ₁₄ H ₁₃ NaO ₃	98.5% to 101.5%	99.9%	
Conclusion	Analysis according to USP38, Conform		
QA Manager	<i>Zhang Xia</i>	Release Date	<i>20170408</i>

**ANEXO C – Certificado de apresentação de trabalho no II Simpósio em
Ciências Farmacêuticas – SIMCIFAR 2016.**

SIMPÓSIO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

SIMCIFAR 2016

Certificado

Certificamos que o resumo DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE-UV PARA QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE NAPROXENO E SUCCINATO DE SUMATRIPTANO , dos autores: Camila Machado Brêtas; Gerson Antônio Pianetti; Isabela Costa César, foi apresentado por Camila Machado Brêtas durante sessão de painéis no II Simpósio em Ciências Farmacêuticas (SIMCIFAR 2016) realizado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, no período de 17 a 19 de novembro de 2016, na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.



Prof. Fernão Castro Braga
Comissão organizadora



Renata Salgado Fernandes
Comissão organizadora

Belo Horizonte, 19 de novembro de 2016.

APÊNDICE A – Resumo enviado ao II Simpósio em Ciências Farmacêuticas – SIMCIFAR 2016.

Desenvolvimento de método analítico por CLAE-UV para quantificação simultânea de Naproxeno e Succinato de Sumatriptano

Brêtas, C. M.¹; Pianetti, G. A.¹; César, I.C.¹

¹Universidade Federal de Minas Gerais
camilambretas@gmail.com

A enxaqueca é uma cefaléia incapacitante que afeta de 10 a 20% da população mundial, sendo os sintomas mais comuns, além da cefaléia: náusea, fotofobia, hipersuscusia, poliúria, diarreia, aura, distúrbios de humor e de apetite. O Naproxeno (NAP) é um antiinflamatório não esteroidal ácido (pKa 4,80) e age no controle da dor relacionada a crises de enxaqueca leves a moderadas. Já o succinato de sumatriptano (SUM), uma base nitrogenada (pka 9,63), age como agonista seletivo do receptor 5-hidroxitriptamina-1 e pertence à classe dos triptanos que são específicos para o tratamento de crises de enxaqueca de intensidade moderada a severa. A associação de NAP e SUM leva a um efeito sinérgico com atuação tanto no início dos sintomas quanto após a exacerbação da dor, permitindo assim o restabelecimento das atividades normais e bem estar do paciente por tempo prolongado. O uso de medicamentos por via oral com essa associação é recente no âmbito mundial com tendência ao crescimento. O desenvolvimento de método analítico por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) para quantificação simultânea dos fármacos dessa associação tem como limitação a diferença acentuada do caráter ácido-base de NAP e SUM. Inicialmente, utilizaram-se colunas de octadesilsilano com diferentes fases móveis, no entanto, SUM não apresentou retenção adequada nas condições testadas. Sequencialmente, substituiu-se por uma coluna ciano, com a qual foi possível obter as melhores condições de separação. Durante a escolha da fase móvel, avaliou-se o comportamento dos fármacos em diferentes valores de pH. O melhor método obtido foi realizado em cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado a detector ultravioleta no comprimento de onda de 232 nm. O amostrador foi mantido a 8 °C e foram injetados 5 µL de amostra. A separação foi realizada em coluna Agilent Zorbax SB-CN 150 mm × 4,6 mm, 5µm, mantida a 35 °C e fase móvel constituída de acetato de amônio 4 mM pH 4,90, ajustado com ácido acético glacial, e metanol (55:45 v/v), a um fluxo de 1 mL/min. O tempo de corrida foi de 8 minutos com resolução de 8,16 entre os picos correspondentes a NAP e SUM. O pico correspondente a SUM apresentou tempo de retenção de 3,30 minutos, fator de retenção 1,64, assimetria 1,14 e número de pratos teóricos 5730. Já para o pico correspondente a NAP o tempo de retenção obtido foi 5,41 minutos, fator de retenção 3,32, assimetria 1,04 e número de pratos teóricos 3874. O método desenvolvido será validado para aplicação em estudos de quantificação simultânea de NAP e SUM em testes de dissolução e doseamento.

APÊNDICE B – Síntese de naproxeno sódico

1 Objetivo

Sintetizar naproxeno sódico a partir de naproxeno e hidróxido de sódio, baseando-se no fundamento químico: $C_{14}H_{14}O_3 + NaOH \leftrightarrow C_{14}H_{13}NaO_3 + H_2O$

2 Materiais

- a) Vidrarias, equipamentos e acessórios: balão de fundo redondo, agitador magnético, garras, barra magnética, funil de separação e concentrador de amostras;
- b) Solventes e matérias-primas: água destilada, naproxeno, hidróxido de sódio, clorofórmio.

2 Método

- a) Em um balão de fundo redondo dissolveu-se 0,82 g de NaOH em 175 mL de água destilada. Aguardou-se a solução obtida estar em temperatura ambiente;
- b) Adicionou-se gradativamente, à solução, 5 g de naproxeno, mantendo-se sob a agitação magnética;
- c) Manteve-se a mistura sob agitação por 30 minutos;
- d) Adicionou-se 25 mL de clorofórmio, e transferiu-se a mistura para funil de separação, após homogeneização, reservou-se a porção orgânica. Repetiu-se esse processo três vezes;
- e) Secou-se as porções aquosa e orgânica em frascos previamente tarados;
- f) Calculou-se o rendimento da síntese;
- g) O produto de síntese adquirido foi submetido a identificação por espectrofotometria na região do infra-vermelho e o espectro obtido foi comparado com aquele gerado a partir da análise com substâncias química de referência (SQR).

3 Resultado

Com a síntese proposta obteve-se rendimento de 94,2%. Na figura a seguir estão demonstrados os espectros na região do infra-vermelho de amostras sintetizadas comparadas a SQR.

Figura - Espectro de naproxeno sódico sintetizado (linha preta) e SQR (linha azul)

