



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Faculdade de Farmácia
Departamento de Medicamentos
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**PREDIÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE E CORRELAÇÃO *IN VITRO* – *IN VIVO* POR
SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL DE DIFERENTES ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO
COM EFAVIRENZ**

Thiago da Silva Honorio

Rio de Janeiro

2012

Thiago da Silva Honorio

**PREDIÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE E CORRELAÇÃO *IN VITRO* – *IN VIVO* POR
SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL DE DIFERENTES ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO
COM EFAVIRENZ**

**Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Faculdade de
Farmácia, Universidade Federal
do Rio de Janeiro, como parte
dos requisitos necessários à
obtenção do título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.**

Orientador: Prof.Dr. Carlos Rangel Rodrigues
Co-orientador: Prof. Dr. Lúcio Mendes Cabral

Rio de Janeiro

2012

Thiago da Silva Honorio

PREDIÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE E CORRELAÇÃO *IN VITRO* – *IN VIVO* POR SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL DE DIFERENTES ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO COM EFAVIRENZ

**Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Faculdade de
Farmácia, Universidade Federal
do Rio de Janeiro, como parte
dos requisitos necessários à
obtenção do título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.**

Aprovado em:

Orientadores:

Prof. Dr. Carlos Rangel Rodrigues – Faculdade de Farmácia - UFRJ

Prof. Dr. Lúcio Mendes Cabral – Faculdade de Farmácia - UFRJ

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Magaly Girão Albuquerque – Instituto de Química – UFRJ

Profa. Dra. Rita de Cássia Elias Estrela Marins – Faculdade de Farmácia – UFRJ

Profa. Dra. Alice Maria Rolim Bernardino – Instituto de Química - UFF

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus, por me abençoar, iluminar minha vida, proteger-me e permitir que todos os meus objetivos sejam alcançados. Muito obrigado Senhor!

Aos meus pais, Edineusa da Silva e José Honório, pelo grande apoio, confiança e conselhos nos momentos mais difíceis. Muito obrigado. Amo muito vocês!

Ao meu tio, Nilton Honório, pelo incentivo, confiança e apoio. Muito obrigado. Amo muito você!

Aos meus irmãos, Amanda Honório e Diego Honório, pela companhia e carinho. Amo muito vocês!

À Valéria Anselmo da Costa, pelo incentivo, por estar ao meu lado nos momentos bons e ruins e pela compreensão. Te amo muito!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Rangel Rodrigues, pelos ensinamentos, sugestões e confiança. Obrigado pela oportunidade!

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Lúcio Mendes Cabral, pelos esclarecimentos, lições e tolerância. Obrigado pela confiança!

Ao Eduardo Costa, pelo aprendizado, paciência e auxílio durante o desenvolvimento do meu trabalho.

À Ana Carolina Corrêa, Bianca Aloise, Lilian Amaral, Valéria Esteves, pelo companheirismo, conselhos e auxílio para o desenvolvimento da dissertação

Às professoras, Flavia Almada e Viviane Lione, pelos esclarecimentos, subsídios e conhecimento.

Aos amigos do Laboratório de Modelagem Molecular: Adriana Gomes, Ana Soderó, Alessandra Telles, Bárbara Abraham, Caroline Freitas, Giseli Muller, Juliana Mello, Natália Botelho, Thaiz Emanuelle, Larissa Silvério, Murilo Bello, Simone Souza e Uiaran Magalhães.

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia Industrial Farmacêutica: Aline Fraga, Arídio, Carolina Pupe, Carol Escudini, Jaqueline, Luis Claudio (LULA), Luisa Falcão, Letícia, Cléo, Maísa, Máira, Paloma, Pedro e professora Rita.

A Banca Examinadora Profa. Dra. Magaly Girão Albuquerque, Profa. Dra. Rita de Cássia Elias e Profa. Dra. Alice Mária Rolim, por ter aceitado o convite para participar da defesa desta dissertação.

A todos os professores, funcionários e alunos do programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Ao CNPq pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

“Sábio é aquele que conhece os limites da própria ignorância.”

(Sócrates)

RESUMO

HONORIO, THIAGO DA SILVA. **Predição da biodisponibilidade e correlação *in vitro* – *in vivo* por simulação computacional de diferentes estudos de dissolução com efavirenz.** Rio de Janeiro, 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

O antiviral efavirenz, um inibidor da transcriptase reversa, pertence à classe II, segundo o sistema de classificação biofarmacêutica (SCB), e sua absorção oral é, provavelmente, limitada pela dissolução *in vivo*. O GastroPlus™ é um *software* elaborado por um sistema de equações lineares e não lineares e é usado para simular o efeito das condições fisiológicas sobre a absorção, assim como o trânsito do fármaco ao longo dos compartimentos do trato gastrointestinal. A proposta deste trabalho é a predição da biodisponibilidade e estabelecer uma correlação *in vitro* - *in vivo* (CIVIV) de dois diferentes tipos de lote de efavirenz a partir dos estudos experimentais estabelecidos. Alguns parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos foram provenientes da literatura. Experimentalmente, foram determinados a solubilidade e o tamanho de partícula para dois lotes de efavirenz. As simulações para cada lote apresentaram diferenças na porcentagem do erro de predição (%EP) em função dos resultados encontrados segundo fatores como tamanho de partícula e solubilidade. Além disso, as CIVIV foram capazes de discriminar os diferentes perfis de dissolução decorrentes das diferentes metodologias estabelecidas para o comprimido de efavirenz.

ABSTRACT

HONORIO, THIAGO DA SILVA. **Predição da biodisponibilidade e a correlação *in vitro* – *in vivo* por simulação computacional de diferentes estudos de dissolução com efavirenz.** Rio de Janeiro, 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

Efavirenz is an inhibitor of the reverse transcriptase belonging to II class according biopharmaceutical classification system (BSC) and your oral absorption é limited by *in vivo* dissolution. GastroPlus™ is a software elaborated for a system of linear and nonlinear equation and it is used to simulate the effect of the physiological condition about the absorption, as well as the transit of the drug in the compartments of the gastrointestinal tract. The goal of the work is to simulate the bioavailable and establish the *in vitro* – *in vivo* correlation of biobatches from of the experimental studies. Some physical-chemical and pharmacokinetics parameters were obtained from literature. Experimentally, were determined the solubility and particle size to the biobatches of efavirenz. The simulation to each batch showed differences among percent prediction error (%PE) in factors like solubility and particle size. Moreover, suitable *in vitro* – *in vivo* correlations were found according with the different methodology establish to the tablet of efavirenz.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A	Área da superfície da membrana
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	Área sob a curva
A_n	Número de absorção
AS	Área superficial
C_{max}	Concentração plasmática máxima
cm/s	Centímetro por segundo
C_s	Solubilidade
C_w	Concentração do fármaco na membrana
CIVIV	Correlação in vitro/in vivo
D	Difusibilidade
D_o	Número de dose
D_n	Número de dissolução
EMEA	“European Medicine Agency”
FDA	“US Food and Drug Administration”
F e F_a	Fração absorvida
g/mL	Gramas por mililitro
HIV	Human immunodeficiency virus
IFA	Insumos farmacêuticos ativos
IP	Índice de polidispersão
ITRNN	Inibidor da transcriptase reversa não nucleosídeo
J_w	Fluxo do fármaco
LabCQ	Laboratório de Controle de Qualidade
Log D	Coeficiente de distribuição
Log P	Coeficiente de partição água-octanol
LAIF	Laboratório analítico de insumos farmacêuticos
LSS	Lauril sulfato de sódio
L/kg	Litros por kilo
L/h	Litros por hora
mg/comp.	Miligramas por comprimido
M	Massa em gramas
nm	Nanômetro

N°	Número
OBS	Parâmetros observados <i>in vivo</i>
P	Permeabilidade
P _w	Permeabilidade efetiva
PRED	Parâmetros simulados
P _{app}	Coefficiente de permeabilidade aparente
P _{eff}	Coefficiente de permeabilidade efetiva
r	Raio inicial da partícula
R	Raio do intestino
RD	Ritmo de dissolução
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
rpm	Rotações por minuto
R ²	Coefficiente de correlação linear quadrático
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
t _{max}	Tempo máximo
T _{res}	Tempo de residência
T _{abs}	Tempo de absorção
T _{dis}	Tempo de dissolução
TMD _{in vitro}	Tempo médio de dissolução <i>in vitro</i>
TMD _{in vivo}	Tempo médio de dissolução <i>in vivo</i>
TMR _{in vivo}	Tempo médio de Residência <i>in vivo</i>
TACA	Modelo de trânsito e absorção compartimental avançado
TW 20	Tween 20
UNIFAG	Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia
USP	United States Pharmacopeia
V _o	Volume de ingestão
µm	Micrômetro
ρ	Densidade
µg/mL	Micrograma por mililitro
µgh/mL	Micrograma hora por mililitro
%EP	Porcentagem do erro de predição

Lista de Figuras

		Página
Figura 1	Perfil da curva de concentração plasmática <i>versus</i> tempo e os parâmetros farmacocinéticos, concentração plasmática máxima C_{max} e área sob a curva (ASC), utilizados no cálculo da biodisponibilidade (adaptado de BONATE, 2011).	34
Figura 2	Relação entre permeabilidade humana e fração absorvida (Adaptado de LOBENBERG & AMIDON, 2000).	44
Figura 3	Modelo de trânsito e absorção compartimental avançado (TACA). (Adaptado de AGORAM, 2001).	51
Figura 4	CIVIV com auxílio da tecnologia de simulação gastrointestinal. a) parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos, b) Obtenção dos dados de liberação <i>in vitro</i> , c) Simulação de parâmetros como C_{max} , t_{max} , ASC e Fração absorvida (F_a), d) Predição do perfil da curva de concentração plasmática <i>versus</i> tempo baseado nos dados de liberação <i>in vitro</i> . (Adaptado de KOVACEVIC <i>et al.</i> , 2008).	52
Figura 5	Fórmula estrutural do efavirenz (VROUENRAETS <i>et al.</i> , 2007).	56
Figura 6	Curva padrão do lote A em suco gástrico simulado (A, pH=1,2), água (B, pH=5,5) e suco entérico simulado (C, pH=6,8).	63
Figura 7	Curva padrão do lote B em suco gástrico simulado (A, pH=1,2), água (B, pH=5,5) e suco entérico simulado (C, pH=6,8).	64
Figura 8	Curvas padrão do biolote A, segundo as metodologias de Farmanguinhos (A), da Farmacopéia Brasileira (B) e da	67

Farmacopéia Americana (C).

- Figura 9 Curvas padrão do biolote B, segundo as metodologias de Farmanguinhos (A), da Farmacopéia Brasileira (B) e da Farmacopeia Americana (C). 69
- Figura 10 Curva padrão do lote A em diferentes concentrações de lauril sulfato de sódio 0.5%-(A), 1,0%-(B) e 2,0%-(C). 70
- Figura 11 Curva padrão do lote B em diferentes concentrações de lauril sulfato de sódio (0.5%-(A), 1,0%-(B) e 2,0%-(C). 71
- Figura 12 Tela do Módulo “compound” do programa GastroPlus™. 72
- Figura 13 Procedimento de seleção dos itens presentes como arquivos suporte para o preenchimento dos dados derivados *in vitro* e *in vivo* no GastroPlus™. 73
- Figura 14 Preenchimento dos dados de solubilidade no GastroPlus™ em diferentes valores de pH conforme o arquivo suporte na extensão específica (.spd) 74
- Figura 15 Tela do módulo “ physiology ” do programa GastroPlus™. 75
- Figura 16 Tela do módulo “PKPlus™” do programa GastroPlus™. 75
- Figura 17 Tela do módulo “pharmacokinetics” do programa GastroPlus™. 76
- Figura 18 Tela do módulo “IVIVCPlus™” do programa GastroPlus™ com a opção “*In Vitro Data*” habilitada. 77
- Figura 19 Tela do módulo “IVIVCPlus™” do programa GastroPlus™ com 77

a opção “*In Vivo Data*” habilitada.

Figura 20	Tela do módulo “IVIVCPlus™” do programa GastroPlus™ com a opção “ <i>IVIVC</i> ” habilitada.	78
Figura 21	Tela do módulo “IVIVCPlus™” do programa GastroPlus™ com a opção “ <i>Convolution</i> ” habilitada.	79
Figura 22	Ionização do grupo –NH da molécula de efavirenz e estabilização da carga negativa presente sobre as espécies através do mecanismo de ressonância.	81
Figura 23	Distribuição do tamanho de partícula do efavirenz: Linha azul lote A e linha vermelha lote B.	83
Figura 24	Perfil de dissolução por dispersão comparativo entre os lotes A e B em diferentes concentrações de LSS 0,5-(A), 1,0-(B) e 2,0%-(C).	84
Figura 25	Perfil de dissolução por dispersão dos lotes A e B em diferentes concentrações de LSS (0,5 1,0 2,0%).	86
Figura 26	Perfil da curva de concentração plasmática <i>versus</i> tempo experimental (linha contínua) e predito (quadrado) do lote A.	92
Figura 27	Perfil da curva de concentração plasmática <i>versus</i> tempo experimental (linha contínua) e predito (quadrado) do lote B.	94
Figura 28	Comparativo entre os perfis de dissolução dos biolotes A e B elaborados por três metodologias: (A)-Farmanguinhos, (B)-Farmacopéia Brasileira, (C)-Farmacopéia Americana.	98
Figura 29	Perfil de dissolução dos comprimidos do biolote A de efavirenz elaborados por três diferentes metodologias: Farmanguinhos,	99

Farmacopéia Brasileira, Farmacopéia Americana.

- Figura 30 Perfil da curva de concentração plasmática *versus* tempo 101
experimental (linha contínua) e predito (quadrado) do biolote A
pelo modelo de Wagner-Nelson.
- Figura 31 Perfil da curva de concentração plasmática *versus* tempo 103
experimental (linha contínua) e predito (quadrado) do biolote A
pelo modelo de Loo - Riegelman.
- Figura 32 Perfil da curva de concentração plasmática *versus* tempo 106
observado e simulado a partir dos dados de dissolução por
dispersão do lote A em LSS 1%.

Lista de Tabelas

		Página
Tabela 1	Sistema de classificação biofarmacêutica dos fármacos segundo parâmetros de solubilidade e permeabilidade gastrointestinal (Adaptado de Emami, 2006).	37
Tabela 2	Solubilidade em diferentes meios dos lotes A e B de efavirenz.	80
Tabela 3	Número de dose (D_0) dos lotes A e B.	81
Tabela 4	Distribuição e tamanho da partícula, índice de polidispersão e área superficial dos lotes A e B de efavirenz.	83
Tabela 5	Parâmetros empregados para a simulação da biodisponibilidade dos cinco lotes de efavirenz. Em preto parâmetros derivados da literatura, em vermelho parâmetros derivados do GastroPlus™.	88
Tabela 6	Parâmetros farmacocinéticos derivados da literatura e simulados de 5 lotes de efavirenz.	88
Tabela 7	Parâmetros empregados para a simulação da biodisponibilidade. Em azul parâmetros derivados da literatura, em vermelho parâmetros derivados do GastroPlus™ e em preto valores experimentais dos estudos de biodisponibilidade.	90
Tabela 8	Adjuvantes farmacotécnicos presentes na formulação do biolote A.	90
Tabela 9	Parâmetros farmacocinéticos observados (Obs) do biolote A e simulados (Sim) do lote A em função do perfil	91

	da curva de Concentração plasmática <i>versus</i> tempo.	
Tabela 10	Adjuvantes farmacotécnicos presentes na formulação do biolote B.	93
Tabela 11	Parâmetros farmacocinéticos observados (Obs) do biolote B e simulados (Sim) do lote B em função do perfil da curva de concentração plasmática <i>versus</i> tempo.	94
Tabela 12	Porcentagem absorvida dos lotes A e B ao longo dos compartimentos.	95
Tabela 13	Coeficiente de correlação e parâmetros farmacocinéticos observados <i>in vivo</i> (biolote A) e simulado segundo Wagner-Nelson, baseado nos perfis de dissolução de três metodologias segundo Farmanguinhos, a Farmacopéia Brasileira e a Farmacopéia Americana.	100
Tabela 14	Coeficiente de correlação linear e parâmetros farmacocinéticos observado <i>in vivo</i> (biolote A) e simulado segundo o modelo de Loo-Riegelman, baseado nos perfis de dissolução de três metodologias segundo Farmanguinhos, a Farmacopéia Brasileira e a Americana.	102
Tabela 15	Coeficiente de correlação e parâmetros farmacocinéticos observado <i>in vivo</i> e simulado baseado nos perfis de dissolução por dispersão em LSS 0,5, 1,0 e 2,0%.	105

Súmario

I

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Solubilidade	19
1.2 Polimorfismo	20
1.3 pKa dos fármacos	22
1.4 pH do meio gastrointestinal	24
1.5 Solubilização por surfactantes e sua relação com as propriedades físico-químicas	25
1.6 Coeficiente de partição	26
1.7 Tamanho de partícula	27
1.8 Excipientes	28
1.9 Formas farmacêuticas	29
1.10 Tempo de trânsito gastrointestinal	30
1.11 Volume dos fluidos do trato gastrointestinal	30
1.12 Motilidade intestinal	31
1.13 Permeabilidade	31
1.14 Biodisponibilidade / Bioequivalência	33
1.15 Sistema de classificação biofarmacêutica (SCB)	36
1.15.1 Solubilidade e SCB	38
1.15.2 Permeabilidade e SCB	39
1.15.3 Dissolução	40
1.15.4 Correlação <i>in vitro</i> – <i>in vivo</i> (CIVIV)	45
1.16 Estimativas de biodisponibilidade <i>in silico</i>	49
1.16.1 Simulação de absorção do fármaco administrado por via oral	49
1.17 Efavirenz	55
2. JUSTIFICATIVA	58
3. OBJETIVOS	59
3.1 Objetivo geral	59

3.2 Objetivos específicos	59
4. MATERIAIS	60
4.1 Equipamentos	60
4.2 Reagentes	60
4.3 Lotes	61
4.4 Programa computacional	61
5. METODOLOGIA	62
5.1 Teste de Solubilidade	62
5.2 Análise por tamanho de partícula	65
5.3 Estudos de dissolução do comprimido e dissolução por dispersão do insumo farmacêutico.	65
5.4 Estudos de bioequivalência	69
5.5 Método de Simulação Gastrointestinal–Gastroplus™	72
5.6 Correlação <i>in vitro-in vivo</i>	76
5.7 Análises estatísticas	79
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
6.1 Teste de Solubilidade	80
6.2 Distribuição do tamanho de partícula	82
6.3 Simulação Gastrointestinal - GastroPlus™	86
6.4 Correlação <i>in vitro-in vivo</i>	96
7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	108
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, estudos sobre as diferentes vias de administração têm sido realizadas, mas a via de administração oral continua sendo a preferencial. Segundo dados de 2001, cerca de 84% de 50 produtos farmacêuticos vendidos nos Estados Unidos e na Europa, são medicamentos administrados por via oral. É a via de administração que mais é objeto de estudo no desenvolvimento de técnicas de liberação de fármacos, pois é mais conveniente, de baixo custo, menos invasiva, aumentando a adesão do paciente, além de ser mais segura do que outras vias de administração, como intravenosa e intramuscular (LENNERNAS & ABRAHAMSSON, 2005; SOUZA *et al.*, 2007; TAO & DESAI, 2005).

Uma vez administrado por via oral, a velocidade e a extensão de absorção do fármaco ao longo do trato gastrointestinal são altamente dependentes de fatores físico-químicos (e.q. solubilidade, polimorfismo, pKa, coeficiente de partição óleo/água), fisiológicos (e.q. pH gastrointestinal, tempo de trânsito gastrointestinal) e de formulação (e.q. tamanho de partícula, excipientes, forma farmacêutica), influenciando diretamente na biodisponibilidade sistêmica (LI *et al.*, 2005).

1.1 Solubilidade

A solubilidade é uma propriedade que influencia diretamente na liberação e absorção dos fármacos, desempenhando, portanto, um papel significativo na biodisponibilidade. Para que um fármaco alcance um alvo terapêutico específico, as moléculas devem estar solúveis no fluido intestinal fisiológico. Com o material dissolvido, é possível que ocorra a absorção em regiões específicas ao longo do trato gastrointestinal (STEGEMANN *et al.*, 2007).

A solubilidade aquosa de um fármaco é uma propriedade fundamental, pois, levando em consideração a constituição aquosa dos fluidos corporais, este parâmetro irá depender diretamente das propriedades moleculares e da

capacidade das moléculas do fármaco formar ligações hidrogênio com as moléculas de água (STEGEMANN *et al.*, 2007).

Atualmente, em toda comunidade científica é bem aceito que a solubilidade de um candidato a fármaco, especialmente a solubilidade aquosa, tem sido a principal questão durante a etapa de descoberta de novos fármacos bem como no processo de desenvolvimento farmacêutico (CLARRYSSE *et al.*, 2011; HORTER & DRESSMAN, 2001; STEGEMANN *et al.*, 2007).

A liberação de um fármaco a partir de uma forma farmacêutica está diretamente relacionada à solubilidade do mesmo, pois esta é a principal determinante da velocidade de dissolução. Um fármaco pouco solúvel apresentará baixa velocidade de dissolução, com conseqüente liberação lenta, acarretando num tempo de trânsito maior nas regiões de absorção. Assim, uma biodisponibilidade incompleta torna-se característica desse tipo de fármaco (HORTER & DRESSMAN, 2001).

Em casos onde o fármaco possui uma baixa solubilidade aquosa, o desenvolvimento do produto deve investigar outras características, como polimorfismo, pKa, composição dos fluidos intestinais, tamanho de partícula, pH do meio, volume, motilidade e trânsito gastrointestinal. Cerca de 40% dos fármacos apresentam problemas com relação à solubilidade aquosa (STEGEMANN *et al.*, 2007).

1.2 Polimorfismo

Na área farmacêutica, polimorfismo é a capacidade que o fármaco possui em apresentar duas ou mais formas cristalinas decorrentes de diferentes arranjos e/ou conformações moleculares (HORTER & DRESSMAN, 2001).

Neste contexto, polimorfos incluem produtos de solvatação (solvatos) e amorfos. No primeiro caso, as formas cristalinas contêm alguma quantidade de solvente, e quando o solvente é água, os solvatos são denominados hidratos. No segundo caso, consistem de arranjos desordenados de moléculas e, portanto, não possuem uma estrutura cristalina (RAW *et al.*, 2004).

Diferentes polimorfos (ou solvatos) de um mesmo fármaco também chamados de insumos farmacêuticos ativos (IFA) podem apresentar diferentes propriedades físico-químicas, como, ponto de fusão, solubilidade aparente, velocidade de dissolução, e densidade, afetando o desenvolvimento de uma forma farmacêutica, a qualidade e a biodisponibilidade de um candidato a fármaco. Tal fato é oriundo das diferentes conformações e/ou interações intra e intermoleculares que modificam os empacotamentos das moléculas nos polimorfos. Logo, é importante identificar e controlar o polimorfo durante o desenvolvimento e a fabricação do medicamento (HORTER & DRESSMAN, 2001; STORPIRTIS, 2008).

Os sólidos cristalinos podem ser obtidos de diversas maneiras, como, cristalização, solidificação da substância fundida, sublimação de um sólido, evaporação dos solventes de uma solução, difusão de vapor, tratamento térmico, etc. No entanto, o processo mais utilizado para o desenvolvimento dos IFA sólidos na indústria é a cristalização. Assim, A rota de síntese, teor de pureza, concentrações, temperaturas, solvente, taxa de resfriamento, adições (incluindo aditivos e sementes), entre outros, são parâmetros que devem ser avaliados (STORPIRTIS, 2008).

Existem casos em que a utilização de polimorfos metaestáveis, ou seja, polimorfos de menor estabilidade termodinâmica, pode ser interessante para resolver problemas de processabilidade. E como a energia interna dos polimorfos metaestáveis é maior que a energia interna do polimorfo termodinamicamente mais estável, os metaestáveis podem ser utilizados como uma estratégia viável para aumentar a dissolução e a biodisponibilidade dos fármacos pouco solúveis. O fármaco cristalizando numa forma metaestável, ele torna-se mais solúvel, promovendo seu efeito terapêutico mais rapidamente, aumentando a velocidade de dissolução e a absorção do fármaco (COSTA, 2005; HORTER & DRESSMAN, 2001; STORPIRTIS, 2008).

Entretanto, quando se emprega um polimorfo metaestável na produção de um medicamento, existe o risco potencial de conversão para o polimorfo termodinamicamente mais estável ou para outras formas sólidas do fármaco em algum ponto do processo produtivo ou no próprio produto final (STORPIRTIS, 2008).

Utilizar o polimorfo mais estável em vez da forma metaestável é a solução definitiva para resolver o problema da conversão. Porém, mesmo neste caso, também é possível que ocorram transformação durante os processos farmacêuticos. Assim, independente da forma sólida selecionada do fármaco, sempre se deve identificar as etapas críticas do processo produtivo e os controles necessários para garantir que as características do medicamento se mantenham íntegras até o término do seu prazo de validade (STORPIRTIS, 2008).

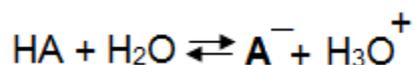
1.3 pKa dos fármacos

Grande parte dos fármacos é classificada como ácidos ou bases fracas. Logo, é importante o conhecimento do pH que representa a concentração de íons hidrogênio presentes no meio e o pKa, considerado como o valor de pH em que as concentrações entre as espécies ácida e básica são iguais, visto que existe uma relação entre estes parâmetros, a solubilidade do fármaco e, conseqüentemente, a sua dissolução (ANDRADE, 2010; MARTINEZ & AMIDON, 2002; PREVIDELLO *et al.*, 2006).

A capacidade de partição de um fármaco entre um ambiente lipídico e um ambiente aquoso, muitas vezes, é influenciada pelo pH do meio, devido ao efeito deste último sobre a ionização do fármaco. A fração ionizada do fármaco tende a ser mais solúvel no ambiente aquoso do que a fração não ionizada, conseqüentemente, a velocidade de dissolução do soluto em meio aquoso pode ser afetado pelo pH do meio (MARTINEZ & AMIDON, 2002).

Via transporte passivo, apenas as formas não ionizadas do fármaco atravessam o epitélio gastrointestinal, que é impermeável para as formas ionizadas. Assim, a absorção do fármaco na forma não ionizada ocorrerá de acordo com sua concentração nas regiões específicas de absorção (ASHFORD, 2005c; BONAMICI, 2009).

A influência do pH do meio na ionização do fármaco pode ser verificada segundo a equação de Henderson–Hasselback (MARTINEZ & AMIDON, 2002). O equilíbrio químico entre ácidos e bases pode ser ilustrado de acordo com a Equação 1, sendo HA a forma ácida e A⁻ a forma básica.



Equação 1

A determinação da constante de ionização para esse equilíbrio é realizada utilizando suas concentrações. Utilizaremos a concentração das espécies conforme a Equação 2.

$$K_a = \frac{[\text{A}^-][\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{HA}]}$$

Equação 2

Esta equação demonstra que a razão de concentrações da forma ácida pela básica pode ser controlada pela concentração de íons hidrogênio. Fazendo-se o logaritmo dos dois membros da igualdade dessa equação e sabendo que:

$$\text{pH} = -\log [\text{H}_3\text{O}^+]$$

Equação 3

$$\text{pKa} = -\log K_a$$

Equação 4

A Equação 2 pode ser reescrita como:

$$\text{pKa} = \text{pH} + \log\left\{\frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]}\right\}$$

Equação 5

A Equação 4 mostra que, quanto mais ácida a substância, ou seja, quanto maior o K_a , menor será o valor de seu pKa e a Equação 5 é a Equação de Henderson-Hasselback.

Sendo assim, os fármacos com caráter básico apresentam pouca dissociação em valores de pH elevados (maior fração na forma não-ionizada), enquanto que os fármacos com caráter ácido apresentam uma alta dissociação em valores de pH elevados (maior fração na forma ionizada) (MARTINEZ & AMIDON, 2002).

Conseqüentemente, os fármacos ácidos devem apresentar uma maior absorção na região do estômago, pois prevalece a sua forma não ionizada, e os fármacos básicos devem apresentar uma maior absorção na região do intestino, pois também prevalece a sua forma não ionizada. Entretanto, outros fatores devem ser considerados, como o fármaco com caráter ácido que é mais absorvido no intestino do que no estômago, mesmo que esteja predominantemente na forma ionizada no intestino. Este fato é devido à maior área superficial de absorção nesta região, compensando o elevado grau de ionização observado para os fármacos ácidos neste ambiente. Além disso, o tempo de residência mais prolongado nas regiões de absorção no intestino delgado também favorece a absorção dos ácidos fracos (ASHFORD, 2005c; BONAMICI, 2009).

1.4 pH do meio gastrointestinal

O pH ao longo do trato gastrointestinal exibe uma alta variabilidade. Assim, com a influência do pH na partição do fármaco, pode-se prever sua absorção em regiões do tubo digestivo (AVDEEF, 2001).

No ambiente gástrico em jejum, o valor de pH pode variar entre 1,0 e 3,5. Por outro lado, após a ingestão de alimentos, ocorre o tamponamento do suco gástrico. Assim, o valor de pH nessa região passa a variar entre 3,0 e 7,0 (ASHFORD, 2005c; BONAMICI, 2009).

No ambiente intestinal, o valor de pH aumenta gradualmente até a região do íleo, apresentando uma variação de pH entre 4,9 e 7,4, em jejum, e pH entre 5,2 e 7,5 no estado alimentado. Na região do cólon, ocorre uma diminuição do valor de pH, que varia entre 5,0 e 8,0, devido às bactérias existentes nessa região que metabolizam carboidratos e ácidos graxos. (ASHFORD, 2005b; AVDEEF, 2001; BONAMICI, 2009; GRBIC *et al.*, 2010).

1.5 Solubilização por surfactantes e sua relação com as propriedades físico-químicas

Outro caminho para o aumento da solubilidade dos fármacos além de variar os valores de pH, é a adição de surfactantes ao meio ou o uso de emulsões (LOBENBERG & AMIDON, 2000).

A solubilização por surfactantes pode ser definida como “a preparação de uma solução termodinamicamente estável de uma substância normalmente pouco ou praticamente insolúvel em um dado solvente pela ação de um ou mais componentes anfifílicos” (ATTWOOD & FLORENCE, 1983; HORTER & DRESSMAN, 2001).

A emulsão é uma dispersão entre dois líquidos imiscíveis na forma de gotículas, geralmente com diâmetro entre 0,1 e 100 μm , existindo uma camada interfacial entre as duas fases que pode ser ocupada com agentes de superfície ativa. As emulsões comumente são descritas como sendo óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), onde a primeira fase mencionada é a representada pela fase dispersa e a segunda fase representa a fase dispersante (SINGH *et al.*, 2009).

No trato gastrointestinal, sais biliares e lecitina estão fisiologicamente presentes, e melhoram a umectação e a solubilidade de muitas substâncias lipofílicas. Segundo a literatura, as interações do suco intestinal com os componentes lipídicos e alimentares podem aumentar a formação de emulsões que contribui na melhora da solubilidade de componentes pouco solúveis (LOBENBERG & AMIDON, 2000).

Nos estudos desenvolvidos por métodos *in vitro*, além dos componentes biliares naturais, um número de surfactantes sintéticos está disponível para o desenvolvimento dos estudos de dissolução. De acordo com a literatura, estudos realizados com diferentes tipos de surfactantes sintéticos (Lauril sulfato de sódio (LSS), Tween 20 (TW 20)) apresentaram aumento na solubilização da griseofulvina em comparação a sua solubilização em água) (LOBENBERG & AMIDON, 2000).

Logo, o melhoramento da solubilização dos fármacos provenientes dos efeitos dos surfactantes sintéticos, tem levado pesquisadores a desenvolver novos meios dissolução que mimetizem um ambiente *in vivo*, sendo

comprovado com auxílio do estabelecimento de correlações *in vitro*–*in vivo* (CIVIV).

1.6 Coeficiente de partição

O coeficiente de partição (P) água-octanol de um fármaco é a razão entre as concentrações do composto não ionizado em octanol e água mutuamente saturados. Os valores de P podem variar em algumas ordens de magnitude, sendo que o logaritmo ($\text{Log } P$) é comumente usado por conveniência (LI *et al.*, 2005).

Dentre os solventes disponíveis, o *n*-octanol foi selecionado porque mimetiza a membrana biológica em diversos aspectos: possui uma cadeia alquila saturada apolar com grupo hidroxila polar que pode agir como doador ou aceptor de ligação hidrogênio, dissolve-se em água na extensão de 1,7 M e seu parâmetro de solubilidade é próximo ao da membrana biológica, por exemplo, a pele (LI *et al.*, 2005).

Sendo o valor do pH fisiológico igual a 7,4, o coeficiente de partição pode ser calculado usando *n*-octanol em tampão de mesmo valor. O coeficiente de partição determinado em um dado valor de pH é denominado coeficiente de distribuição (D) e corresponde a razão entre as concentrações do composto não ionizado na fase orgânica de ambas as espécies na fase aquosa em um dado valor de pH (LI *et al.*, 2005).

Na década de 90, Kramer comparou os valores de $\text{Log } D$ de uma diversidade de fármacos com seus respectivos coeficientes de permeabilidade aparente (P_{app}) através de estudos com monocamada de células Caco-2, e com a fração absorvida em humanos após administração oral. Os fármacos altamente permeáveis foram aqueles com o $\text{log } D$ nos valores entre 0 e 3, já os fármacos com baixo valor de permeabilidade foram aqueles com o valor de $\text{log } D < -1,5$ ou $> 4,5$ (LI *et al.*, 2005, KRAMER, 1999).

1.7 Tamanho de partícula

Quando a solubilidade aquosa e a dissolução de um fármaco são designadas como um fator limitante aos testes *in vitro* e *in vivo*, a redução do tamanho de partícula torna-se uma importante estratégia a ser investigada (STEGEMANN *et al.*, 2007).

A dissolução é diretamente proporcional a área superficial dos fármacos. Seu perfil de dissolução aumenta de acordo com a diminuição do tamanho de partícula. O processo de micronização que fornece um tamanho de partícula em torno de 3-5 μm é uma estratégia bem sucedida para aumentar a velocidade de dissolução. Logo, essa propriedade pode influenciar a desintegração do comprimido, a dissolução *in vivo* e a absorção dos fármacos (HORTER & DRESSMAN, 2001).

Jinno e colaboradores (2006) investigaram os efeitos do tamanho de partícula incluindo três tipos de técnicas de trituração sobre o ritmo de dissolução do cilostazol em água. O diâmetro médio das partículas conforme suas respectivas técnicas foram nos valores de 13, 2,4 e 0,22 μm . O perfil de dissolução em água foi claramente afetado pelo respectivo parâmetro sobre cada ingrediente ativo.

45% do cilostazol de maior valor de seu respectivo diâmetro médio foram dissolvidos em 60 minutos. O ingrediente ativo triturado pela segunda técnica (2,4 μm) obteve uma dissolução de 80% no tempo de 15 minutos, esta fração chegou a 95% em 60 minutos. Por fim, na terceira técnica (0,22 μm), a dissolução foi concluída imediatamente (JINNO *et al.*, 2006).

Os resultados de dissolução do cilostazol baseados nas técnicas de trituração seguiram a equação de Noyes–Whitney, ou seja, o ritmo de dissolução é diretamente proporcional ao aumento da área de superfície como consequência do processo de trituração (JINNO *et al.*, 2006).

Entretanto, nem sempre a diminuição do tamanho de partícula resulta no aumento da velocidade de absorção. Fármacos muito solúveis possuem um mesmo valor de concentração plasmática, independente de seu tamanho de partícula. A solubilidade, neste caso, não é um fator limitante para que o

tamanho da partícula possa apresentar influência sobre a absorção (BONAMICI, 2009).

Em determinados casos, a redução do tamanho de partícula pode ocasionar ações tóxicas. Entre 1972-1973, problemas de intoxicação com a digoxina ocorreram provenientes da redução do seu tamanho de partícula (BONAMICI, 2009).

1.8 Excipientes

Grande parte dos fármacos voltados para uma administração via oral necessita de uma formulação com excipientes para permitir uma administração adequada, para facilitar a fabricação do produto, para aumentar a estabilidade da formulação ou por razões estéticas. Tradicionalmente, os excipientes são considerados inertes, mas algumas pesquisas realizadas mostram que os adjuvantes podem interagir com o fármaco, afetando sua absorção e biodisponibilidade (JACKSON *et al.*, 2000).

Os excipientes são tradicionalmente classificados de acordo com a função que eles desempenham em uma formulação, embora muitos deles apresentem múltiplas funções (JACKSON *et al.*, 2000).

Os diluentes são adicionados com o objetivo de proporcionar um volume adequado para a produção da forma farmacêutica sólida. Devem ser inertes para não alterar a estabilidade e a biodisponibilidade do fármaco. No entanto, vários estudos comprovaram a interferência dos excipientes na estabilidade e velocidade de dissolução. Os diluentes mais utilizados nas formas farmacêuticas sólidas são manitol, lactose, celulose e carbonato de cálcio (JACKSON *et al.*, 2000; STORPIRTIS, 2008).

Os desintegrantes aumentam em muitas vezes o seu volume original quando em água ou líquidos orgânicos, sendo adicionados a uma formulação para facilitar a desagregação de uma forma de dosagem dentro dos grânulos ou partículas em pó. Os desintegrantes mais utilizados são amido, derivados de celulose e polivinilpirrolidona (JACKSON *et al.*, 2000; STORPIRTIS, 2008).

Os lubrificantes são substâncias hidrofóbicas usadas no revestimento do comprimido, que evitam a adesão e auxiliam na ejeção dos comprimidos

durante a sua produção em compressoras. Além disso, podem reduzir o atrito do pó e as superfícies metálicas durante o processo de fabricação. O estereato de magnésio é um exemplo dentre os mais utilizados (JACKSON *et al.*, 2000; STORPIRTIS, 2008).

Os aglutinantes são substâncias mais utilizadas para facilitar a agregação das partículas e a formação dos grânulos, geralmente ativadas pelo agente umectante, formando mucilagens e soluções viscosas. Como exemplo de aglutinantes, podemos destacar as gomas, a polivinilpirrolidona e os derivados de celulose (STORPIRTIS, 2008).

Os tensoativos são adjuvantes que têm a função de melhorar a dissolução, exercendo, na maioria das vezes, efeito sobre a membrana. Podem ser prejudiciais quando o fármaco é quimicamente sensível ao suco gástrico, pois a dissolução precoce no estômago pode desencadear a degradação do fármaco em pH ácido (STORPIRTIS, 2008).

O revestimento pode ser utilizado nos comprimidos para proteção contra oxidação e umidade, para mascarar sabor e odor, assim como para modular a liberação do fármaco (STORPIRTIS, 2008).

1.9 Formas farmacêuticas

A escolha da forma farmacêutica é considerada como uma etapa bastante importante, pois pode influenciar na dissolução do fármaco nos fluidos gastrointestinais (ASHFORD, 2005c; BONAMICI, 2009).

Como mencionado anteriormente, para que os fármacos possam ser absorvidos, eles devem estar em solução. Muitas etapas podem interferir na absorção dos fármacos. Logo, o grande número de obstáculos sobre uma determinada forma farmacêutica pode desencadear em problemas na biodisponibilidade (ASHFORD, 2005c; BONAMICI, 2009).

Os comprimidos são formas farmacêuticas sólidas e comprimidas provenientes de uma mistura entre o fármaco e os excipientes. É uma forma de dosagem com grande potencial em apresentar problemas em termos da biodisponibilidade, devido aos fatores relacionados com a tecnologia farmacêutica e os excipientes empregados (BONAMICI, 2009).

As formas farmacêuticas em suspensão são desenvolvidas, muitas vezes, para veicular fármacos insolúveis ou pouco solúveis em um ambiente aquoso. A variação da biodisponibilidade pode estar relacionada com características da matéria-prima como tamanho de partícula, forma cristalina, complexação dos fármacos com excipientes, elementos que favorecem a dissolução ou aumentam a viscosidade (ASHFORD, 2005c; BONAMICI, 2009).

As soluções são as formas de dosagem adequadas quando uma rápida e completa absorção é requerida. Fatores que influenciam a biodisponibilidade a partir desta forma farmacêutica estão relacionados com a estabilidade dos fármacos nos fluidos do trato gastrointestinal ou a incorporação dos fármacos no interior das micelas com o objetivo de solubilizar os fármacos solúveis no ambiente aquoso (ASHFORD, 2005c; BONAMICI, 2009).

1.10 Tempo de trânsito gastrointestinal

Os tempos de esvaziamento gástrico e o de trânsito intestinal são muito importantes nos estudos de liberação de fármacos. A administração de fármacos junto com líquidos ou sólidos podem afetar de uma forma diferente o esvaziamento gástrico. Na administração de fármacos junto com líquidos, o esvaziamento total do estômago ocorre em torno de 1 hora após a administração. Na administração junto com sólidos, o esvaziamento gástrico ocorre em torno de 2 a 3 horas após administração. Por outro lado, não há uma grande diferença entre o tempo de trânsito na região do intestino delgado das diferentes formas de dosagem. Geralmente, o tempo de trânsito intestinal das diferentes formas de dosagem varia de 3 a 4 horas (LI *et al.*, 2005).

1.11 Volume dos fluidos do trato gastrointestinal

A concentração do fármaco presente em solução e disponível para ser absorvido, depende também do volume dos fluidos do trato gastrointestinal (MASAOKA *et al.*, 2006).

De acordo com a literatura, o volume total de fluido no trato gastrointestinal produzidos diariamente é de aproximadamente 8,5 litros. A quantidade e as características das secreções produzidas podem ser alteradas em resposta ao conteúdo luminal, como por exemplo, nas secreções intestinais, a água pode mover-se do sangue ao duodeno em resposta a uma refeição hipertônica para manter a isotonicidade do lúmen com o plasma (DESESSO & JACOBSON, 2001).

A dissolução do fármaco vai depender do volume de líquido administrado com o fármaco, das secreções e do fluxo de água através da superfície do intestino (MASAOKA *et al.*, 2006).

1.12 Motilidade intestinal

Existem dois tipos principais de movimentos intestinais: o propulsor e o de mistura. Os movimentos propulsores estão relacionados diretamente com a velocidade de absorção e, conseqüentemente, com o tempo de permanência do fármaco ou da forma farmacêutica no intestino delgado (ASHFORD, 2005b).

A motilidade intestinal afeta a absorção dos fármacos. O fármaco possui um movimento cinético ao longo do trato gastrointestinal, a perfusão do fármaco deve ocorrer antes que seja translocado para regiões do sistema gastrointestinal em que a absorção é comprometida (ASHFORD, 2005b).

A permanência do fármaco nas regiões de absorção são dependentes da motilidade intestinal. O maior tempo de permanência do fármaco nas regiões de absorção conduz a uma maior quantidade absorvida. Logo, esse parâmetro é importante na liberação dos fármacos de diferentes formulações existentes (ASHFORD, 2005b; BONAMICI, 2009; CHARMAN *et al.*, 1997; GIBALDI, 1991).

1.13 Permeabilidade

A maior fração de um fármaco é absorvida no intestino delgado, principalmente na região do duodeno e na parte proximal do jejuno. Este processo ocorre nas paredes do intestino delgado que é recoberto por um

epitélio cilíndrico simples, constituído por pregas, depressões e microvilosidades para aumentar sua área superficial e, conseqüentemente, a absorção (DESESSO & JACOBSON, 2001; SOUZA *et al.*, 2007).

A parede do intestino delgado é constituída de uma camada serosa, uma submucosa e uma mucosa intestinal. As últimas formam a principal barreira que controla a absorção dos fármacos e também dos alimentos após dissolução no conteúdo luminal. A mucosa consiste de quatro camadas: monocamada superficial, membrana basal, lâmina própria (tecido conectivo, nervos, linfócitos, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, macrófagos e mastócitos) e células musculares lisas (DEFERME *et al.*, 2008).

A membrana basal é constituída por uma bicamada fosfolípídica, proteínas e, associados a ela, glicoproteínas, glicolípideos, oligossacarídeos, por fim, a presença de canais (DEFERME *et al.*, 2008). A capacidade que uma molécula possui em atravessar a membrana biológica é denominada como permeabilidade que está sob influência das características físico-químicas de ambos. A permeabilidade é muito importante, pois governa a absorção, a distribuição, o metabolismo e a excreção dos fármacos (PANCHAGNULA & THOMAS, 2000).

A passagem dos fármacos através da membrana intestinal é considerada complexa e dinâmica. Esta passagem pode ocorrer via transporte passivo, quando o fármaco passa através dos enterócitos (transcelular) ou pelas junções, i.e., entre os entérocitos (paracelular), em função de seu gradiente de concentração e as características do fármaco. Esta passagem também pode ocorrer via transporte ativo, dependendo de transportadores de captação (BALIMANE *et al.*, 2000). A endocitose também é um processo que auxilia no transporte de fármacos. Muitas proteínas e nucleotídeos utilizam esse tipo de via (DEFERME *et al.*, 2008).

Alguns fatores podem influenciar na permeabilidade dos fármacos, como solubilidade do fármaco, dissolução do fármaco, forma farmacêutica, excipientes, líquidos corporais, valor do pH na região de absorção, tamanho de partícula e área superficial de contato (contribuindo para a desintegração do fármaco) (CUSTODIO *et al.*, 2008; METSUGI *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2007; TRAN *et al.*, 2009). As condições fisiológicas também influenciam na absorção dos fármacos como tempo de esvaziamento gástrico, tempo de trânsito

intestinal, atividades enzimáticas e da flora intestinal, condições do trato gastrointestinal de um determinado indivíduo (METSUGI *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2007).

Os fármacos mais lipofílicos normalmente atravessam a membrana pela via transcelular passiva, ou seja, atravessando-a internamente. A passagem dos fármacos através do epitélio depende do gradiente de concentração do fármaco e das características do fármaco que o tornam apto a permear através da água estacionária existente na superfície luminal e através das membranas apical e basolateral (DEFERME *et al.*, 2008).

O mecanismo de transporte dos fármacos pode ocorrer de modo inverso. Com o auxílio de proteínas denominadas como transportadores, pode ocorrer a passagem do fármaco do interior da célula para o meio extracelular. Assim, a absorção pode ser retardada, influenciando a biodisponibilidade. A esse tipo de transporte denominamos como efluxo. A afinidade e a interação do fármaco com as proteínas de efluxo pode levar o fármaco das células epiteliais de volta para o lúmen intestinal. Um exemplo de transportadores de efluxo é a glicoproteína-P localizada ao longo do trato gastrointestinal no lado apical das células epiteliais (DEFERME *et al.*, 2008).

Para aumentar a biodisponibilidade, podemos citar duas estratégias utilizadas, como, o aumento de dose administrada, provocando a saturação dos transportadores de efluxo, e a co-administração de fármacos que inibe a ação de um transportador de efluxo e, conseqüentemente, acarreta no aumento da absorção de outra substância (AUNGST, 1999).

1.14 Biodisponibilidade / Bioequivalência

Mundialmente, o conceito de biodisponibilidade é similar em todos os guias regulatórios. A agência americana que regulamenta alimentos e medicamentos (*US Food and Drug Administration*, FDA) define biodisponibilidade como a velocidade e a extensão com que um fármaco ou uma entidade farmacêutica é absorvida a partir de um medicamento e está disponível no sítio de ação (FDA, 2003). No Brasil, para a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a biodisponibilidade indica a velocidade e a

extensão de absorção de um princípio ativo em uma forma de dosagem, a partir de sua curva concentração plasmática *versus* tempo na circulação sistêmica ou sua excreção na urina (ANVISA, 1999).

A biodisponibilidade é determinada a partir de parâmetros farmacocinéticos como a área sob a curva (ASC), que corresponde à quantidade de fármaco absorvida, e a concentração plasmática máxima (C_{max}), relacionada ao tempo (t_{max}) que representa a velocidade do processo de absorção (Figura 1) (STORPIRTIS, 2008).

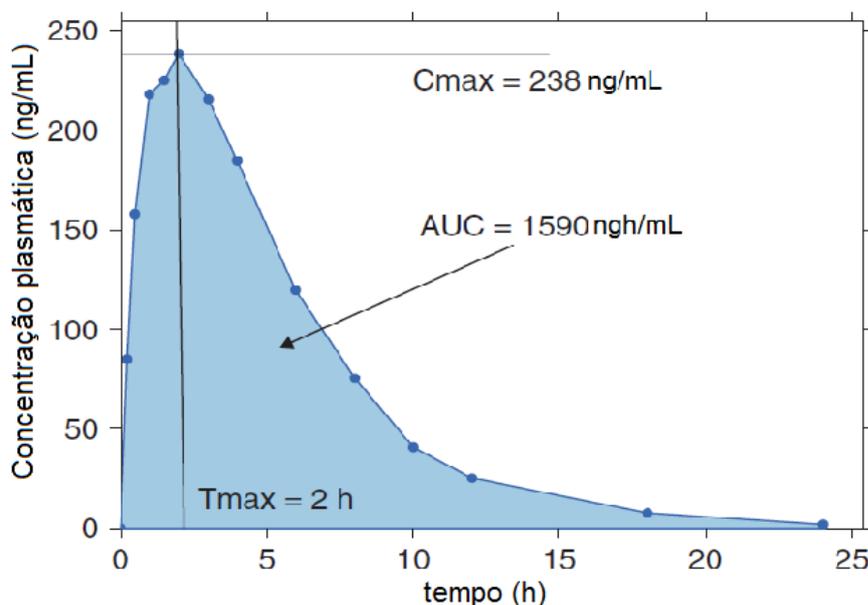


Figura 1 – Perfil da curva de concentração plasmática *versus* tempo e os parâmetros farmacocinéticos, concentração plasmática máxima C_{max} e área sob a curva (ASC), utilizados no cálculo da biodisponibilidade (adaptado de BONATE, 2011).

Por definição, a biodisponibilidade de um fármaco administrado por via intravenosa é total ou 100%, pois toda a quantidade de fármaco administrada está disponível para exercer o efeito. Entretanto, a administração por outras vias, implica em barreiras que levam ao comprometimento do aproveitamento total da dose (STORPIRTIS, 2008).

Assim, o desenvolvimento de medicamentos inovadores administrados por vias extravasculares, por exemplo, necessitam de estudos de biodisponibilidade absoluta, adotando-se, como referência, o medicamento na mesma dose, mas administrado por via intravascular (STORPIRTIS, 2008).

Outra medida conhecida é a biodisponibilidade relativa que corresponde a comparação das biodisponibilidades de medicamentos quando administrados pela via extravascular. Normalmente, a determinação da biodisponibilidade é necessária para o registro de medicamentos genéricos quando estabelecido aos critérios de bioequivalência (STORPIRTIS, 2008).

A bioequivalência consiste na demonstração da equivalência farmacêutica entre os produtos apresentados sob a mesma forma farmacêutica, contendo idêntica composição qualitativa e quantitativa de princípio ativo e que tenham sido estudados sob um mesmo desenho experimental (ANVISA, 1999).

Os estudos de biodisponibilidade têm como objetivo (STORPIRTIS *et al*, 2008):

- Obter uma avaliação de bioequivalência entre as formas farmacêuticas;
- Realizar uma avaliação dos medicamentos que possuam novos fármacos na terapia;
- Efetuar uma avaliação de novas formulações que possuam um mesmo fármaco;
- Fazer uma avaliação das formas farmacêuticas de liberação modificadas;
- Desenvolver uma avaliação de formas farmacêuticas contendo vários fármacos;
- Fazer uma avaliação no momento de alteração das formas farmacêuticas;
- Avaliar a alteração de posologia/esquema terapêutico.

Os estudos de biodisponibilidade e bioequivalência de uma determinada forma farmacêutica visam confirmar a segurança e a eficácia da mesma. Com base nos princípios éticos, estudos envolvendo modelo animal são utilizados para garantir a biodisponibilidade. Entretanto, na ausência do modelo animal, os testes devem envolver seres humanos sob condições normais e padronizadas. No entanto, esses estudos são suscetíveis a variabilidade entre os indivíduos, a diferenças quanto às formulações de um mesmo lote, ou até mesmo o erro experimental na determinação dos parâmetros farmacocinéticos

(BONAMICI, 2009). Adicionalmente, os estudos de bioequivalência, em geral, são de alto custo e demorados, além de exporem voluntários sadios a riscos resultantes da utilização do medicamento (FLACH & DALLA COSTA, 1999).

Assim, foi criado um Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) relativos aos resultados de dissolução *in vitro* e permeabilidade, com objetivo de avaliar o comportamento da absorção dos fármacos e, conseqüentemente, sua farmacocinética, indicando a isenção dos estudos de biodisponibilidade /bioequivalência (AMIDON *et al*, 1995).

1.15 Sistema de classificação biofarmacêutica (SCB)

A discussão sobre a necessidade de estudos de biodisponibilidade/bioequivalência nos processos regulatórios tem sido um dos principais tópicos nos debates internacionais. Embora essas pesquisas sejam de extrema importância, nos últimos anos, diversos medicamentos vêm sendo desenvolvidos baseados quanto a sua classificação biofarmacêutica (BLUME & SHUG, 1999; CHENG *et al.*, 2004; LEHTO *et al.*, 2011).

O sistema de classificação biofarmacêutica (SCB), elaborado em 1995 por Amidon e colaboradores, é uma ferramenta de prognóstico criada para facilitar o desenvolvimento dos fármacos. O SCB é baseado em estudos de dissolução e estabelece os métodos ideais para solicitar a isenção dos estudos de bioequivalência *in vivo*, dando ênfase à avaliação *in vitro* para os produtos, desde o ponto de vista mecanístico mais do que empiricamente ou *in vivo*. Assim, a predição a partir de propriedades físico-químicas do comportamento *in vivo* dos fármacos traz várias vantagens como a redução de custo durante o desenvolvimento dos medicamentos e a prevenção dos riscos que cada voluntário possa ser suscetível nos estudos de bioequivalência (LENNERNAS & ABRAHAMSSON, 2005; STORPIRTIS, 2008).

Segundo esse sistema, os fármacos são classificados em quatro classes (Tabela 1), de acordo com a contribuição de três fatores fundamentais: solubilidade, dissolução, e permeabilidade intestinal. Esses parâmetros governam o ritmo e a extensão de absorção dos fármacos em uma forma de

dosagem oral sólida de liberação imediata (MARTINEZ & AMIDON *et al.*, 2002; WEI *et al.*, 2006; KORTEJARVI *et al.*, 2007).

Tabela 1 – Sistema de classificação biofarmacêutica dos fármacos segundo parâmetros de solubilidade e permeabilidade gastrointestinal (Adaptado de Emami, 2006).

Classe	Solubilidade	Permeabilidade	Fator Limitante para absorção	Fármaco
I	Alta	Alta	RD / Esvaziamento gástrico	Metoprolol
II	Baixa	Alta	Solubilidade	Efavirenz
III	Alta	Baixa	Permeabilidade	Cimetidina
IV	Baixa	Baixa	Solubilidade/Permeabilidade	Furosemida

RD – Ritmo de dissolução

Para fármacos de classe I (alta solubilidade e alta permeabilidade), como o metoprolol, o fator limitante para a absorção do fármaco está relacionado às velocidades de dissolução e ao de esvaziamento gástrico, caso a dissolução do fármaco seja muito rápida. Nos fármacos de liberação imediata, a velocidade de absorção é controlada pelo esvaziamento gástrico (EMAMI, 2006).

Fármacos de classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade), como efavirenz, a dissolução *in vivo* do fármaco é o fator limitante para a sua absorção, que é mais lenta do que os fármacos de classe I (EMAMI, 2006).

Fármacos de classe III (alta solubilidade e baixa permeabilidade), como a cimetidina, são rapidamente dissolvidos e a permeabilidade é o fator limitante para a absorção do fármaco. Com uma rápida dissolução, o tempo de contato entre o fármaco dissolvido e a mucosa de absorção é maximizado. É relatada uma alta variabilidade quanto à velocidade e à extensão de absorção para esta classe, que é atribuída diretamente ao trânsito gastrointestinal, ao conteúdo luminal e à velocidade de permeação do fármaco através da membrana (EMAMI, 2006).

Por último, os fármacos de classe IV (baixa solubilidade e baixa permeabilidade), como a furosemida, apresentam baixas solubilidade e permeabilidade. Este grupo exhibe grandes problemas quanto à liberação oral efetiva (EMAMI, 2006).

Em 2000, a FDA publicou uma orientação para a indústria denominada “*Guidance for industry on Waiver of in vivo BA and BE studies for immediate release solid oral dosage forms containing certain active moieties/ active ingredient based on BCS*”, um guia para indústria sobre a isenção dos estudos de biodisponibilidade e bioequivalência para as formas de dosagem oral sólidas de liberação imediata contendo fármacos baseados no SCB, mudando o paradigma a respeito das regulamentações sobre bioequivalência nos Estados Unidos (LÖBENBERG & AMIDON, 2000).

“A ANVISA, na resolução RDC Nº 37 de 3 de agosto de 2011, publicou “o Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência” baseado no SCB. Assim, métodos para a determinação dos dados de solubilidade, permeabilidade e dissolução foram protocolados de acordo com os guias específicos.

1.15.1 Solubilidade e SCB

Segundo o SCB, a solubilidade é determinada como o volume de meio aquoso necessário para dissolver a mais alta dose estabelecida em uma formulação oral com faixa de pH determinada conforme as agências regulatórias (STORPIRTIS, 2008).

No guia emitido pela FDA em 2000, a solubilidade deve ser determinada variando o pH nos intervalos entre 1,0 a 7,5 e com temperatura de ensaio de 37°C (FDA, 2000). De acordo com a ANVISA, a solubilidade deve ser determinada em pH entre 1,2 a 6,8 e com temperatura de ensaio também de 37°C (ANVISA, 2011).

O fármaco é considerado altamente solúvel quando sua mais alta dose é solúvel em um volume igual ou menor do que 250 mL nos intervalos de pH determinados. O valor 250 mL representa o volume de água ingerido em uma administração oral, sendo equivalente a um copo de água (YU, *et al.*, 2002).

O método utilizado nos estudos de solubilidade segue o padrão clássico de determinação por saturação de um excesso de sólido no meio de dissolução. As soluções tampão utilizadas são condições padronizadas pela Farmacopéia Americana. Não sendo convenientes, as soluções podem ser

substituídas por outras mais favoráveis, desde que o valor do pH seja controlado (STORPIRTIS, 2008).

Outros métodos podem ser usados, desde que possa prever a solubilidade do fármaco. A concentração do fármaco no tampão selecionado deverá ser determinada, usando um ensaio validado e indicativo de estabilidade, i.e., que possa distinguir o fármaco do seu produto de degradação (FDA, 2000).

1.15.2 Permeabilidade e SCB

A classificação da permeabilidade é baseada diretamente sobre a extensão da absorção intestinal de um composto em humanos ou indiretamente sobre as medidas da velocidade de transferência de massa através da membrana intestinal humana (YU *et al.*, 2002).

Os métodos e as técnicas para avaliar a permeabilidade são fundamentais para compreender a limitação da permeabilidade através das membranas do trato gastrointestinal. Os métodos podem ser desde o mais simples até um mais complexo de avaliação (STORPIRTIS, 2008).

Os métodos de determinação da permeabilidade rotineiramente utilizados são:

- Estudos em humanos (biodisponibilidade absoluta, estudo do balanço de massas e perfusão intestinal);
- Estudos de perfusão intestinal *in vivo* ou *in situ* em um modelo animal conveniente;
- Métodos *in vitro* utilizando-se seções de tecidos intestinais;
- Monocamadas de células epiteliais (e.g., Caco-2).

Nos estudos de biodisponibilidade absoluta, a biodisponibilidade oral é determinada e comparada com a biodisponibilidade de uma administração intravascular de referência (STORPIRTIS, 2008).

No método pelo balanço de massas, substâncias marcadas com isótopos estáveis ou radiomarcadores são usadas para determinar a extensão

da absorção. Entretanto, por meio deste método obtém-se uma estimativa altamente variável de permeabilidade, e, por consequência, outros métodos alternativos estão sendo desenvolvidos (STORPIRTIS, 2008).

Os métodos *in vitro* baseados em tecidos, como câmaras de Ussing, e em cultura de células, como células Caco-2, são utilizados atualmente para prever os mecanismos de transporte ativo e passivo. As câmaras de Ussing foram inicialmente utilizadas para estudar e discriminar o transporte ativo de sódio como uma potencial fonte de corrente elétrica em um circuito fechado de pele de sapo. Desde então, essa técnica tem sido utilizada para estudar o transporte de fármacos através das diferentes regiões intestinais (STORPIRTIS, 2008).

Na ausência de evidências sugerindo instabilidade no trato gastrointestinal, um fármaco é considerado altamente permeável quando a extensão de sua absorção, a partir da dose administrada em humanos, é de, no mínimo, 90%, segundo a FDA (FDA, 2000). Os novos medicamentos genéricos sujeitos a bioequivalência pela ANVISA devem conter um dos fármacos especificados pela agência, todos apresentando uma fração de dose absorvida $\geq 85\%$ (ANVISA, 2011).

1.15.3 Dissolução

Durante o desenvolvimento de uma formulação, é importante o investimento nos estudos dos ensaios de dissolução. O teste *in vitro* de dissolução é utilizado como ferramenta de pesquisa para otimizar novas formulações ou teste de controle de qualidade para monitorar rotineiramente a uniformidade e a reprodutibilidade dos lotes produzidos. Nos sistemas biológicos, a dissolução dos fármacos é um importante atributo antes da absorção sistêmica. O teste de dissolução reflete diferenças significativas na biodisponibilidade decorrentes das diferenças na dissolução. Quando o teste de dissolução é usado para prever a performance *in vivo* de um fármaco, é fundamental que o teste *in vitro* mimetize as condições *in vivo* o quanto possível (SINGLA *et al.*, 2009).

Quanto aos estudos de dissolução protocolados pela FDA, uma formulação de liberação imediata com fármacos da classe I é considerada altamente dissolvida quando, pelo menos 85% do fármaco está dissolvido no tempo de 30 minutos com a utilização do *apparatus* e volume de dissolução específico, i.e., fluido gástrico simulado e fluido intestinal simulado, segundo a Farmacopéia Americana (USP), ambos sem enzimas e tampão (pH = 4,5) (FDA, 2000). As condições quanto ao estudo do perfil de dissolução segundo a ANVISA são semelhantes à descrição do método da agência anteriormente citada (ANVISA, 2011).

Segundo Martinez e Amidon (2002), a isenção dos estudos de bioequivalência provenientes dos estudos de dissolução *in vitro* deve ser baseada no entendimento da relação entre permeabilidade, solubilidade e dissolução, considerando que:

- A comparação do perfil de dissolução *in vitro* de duas formulações deve refletir as diferenças no comportamento de dissolução *in vivo* destas formulações;
- Caso duas formulações apresentem semelhantes perfis de dissolução *in vivo*, sob todas as condições do lúmen intestinal, essas formulações apresentarão concentrações equivalentes de fármaco na superfície da membrana;
- Para que a comparação do perfil de dissolução garanta a comparação da absorção *in vivo*, a velocidade e a extensão de absorção do fármaco, presente na superfície da membrana, devem determinar as características de absorção da formulação.

Lobenberg e Amidon (2000) têm sumarizado uma relação entre dose, características de dissolução, solubilidade e absorção. Essa relação pode ser definida por três números adimensionais, número de dose (D_0), número de dissolução (D_n) e número de absorção (A_n), definindo o grupo que o fármaco pertence, representando o ponto de vista mais fundamental da absorção do fármaco no trato gastrointestinal.

- **Número de absorção** (A_n): é a razão entre permeabilidade (P) e raio do intestino (R) vezes o tempo de residência no intestino delgado (T_{res}) ou, ainda, a razão entre T_{res} e tempo de absorção (T_{abs}) (Equação 6).

$$A_n = \frac{P}{R} \times T_{res} = \frac{T_{res}}{T_{abs}}$$

Equação 6

- **Número de dissolução** (D_n): é a razão entre T_{res} e tempo de dissolução (T_{dis}) incluindo a solubilidade (C_s), a difusibilidade (D), a densidade (ρ) e o raio (r) inicial da partícula do fármaco (Equação 7).

$$D_n = (3D/r^2) \times (C_s/\rho) \times T_{res} = \frac{T_{res}}{T_{dis}}$$

Equação 7

- **Número de dose** (D_o): é a razão entre a massa do fármaco (em gramas) e o produto do volume de ingestão ($V_o = 250$ mL) pela solubilidade do fármaco (C_s) (Equação 8).

$$D_o = \frac{M/V_o}{C_s}$$

Equação 8

O valor de D_o aumenta ou diminui em função da concentração do fármaco no local de absorção (intestino delgado). Quando o valor de D_o é menor do que 0,1 é garantido que as condições sejam cumpridas (STORPIRTIS, 2008).

Na definição de A_n (Equação 6), existe uma relação entre o tempo de permanência do fármaco no local de absorção e o tempo necessário para as moléculas serem absorvidas. Assim, um alto valor de A_n indica que a absorção

será produtiva durante o tempo de permanência do fármaco na região de absorção (STORPIRTIS, 2008).

Na definição de D_n (Equação 7), também existe uma relação entre tempos, pois, segundo esta equação, quanto maior o valor de D_n menor é a possibilidade de que a dissolução seja o fator limitante da absorção (STORPIRTIS, 2008).

Consequentemente, o rendimento da absorção de um fármaco dependerá (STORPIRTIS, 2008):

- Da velocidade de dissolução do fármaco;
- Do tempo de permanência do fármaco no local de absorção;
- Da capacidade intrínseca do fármaco de atravessar a membrana.

A fração absorvida (F), segue uma função exponencial, como pode ser observado na Equação 9:

$$F = 1 - e^{-2An}$$

Equação 9

Para seguir o trânsito de uma forma de dosagem ao longo do trato gastrointestinal, todo o processo deve ser dividido em partes a fim de observá-lo mecanicamente. Aplicando a lei de Fick a uma membrana, o processo de absorção através da superfície da mucosa pode ser descrito como na Equação 10:

$$J_w = P_w \times C_w = dM / dt \times 1 / A$$

Equação 10

Na Equação 10, J_w é o fluxo do fármaco transportado através da parede intestinal, P_w é a permeabilidade efetiva, C_w é a concentração do fármaco na membrana intestinal e A é a área da superfície.

Assim, de acordo com a Equação 10, tanto a permeabilidade quanto a solubilidade são parâmetros fundamentais que descrevem o fluxo do fármaco através da membrana intestinal.

Uma relação entre o coeficiente de permeabilidade efetiva humana (P_{eff}) e a fração de dose absorvida (F) é apresentada na Figura 2. Quando o valor da P_{eff} de um fármaco é menor do que 2×10^{-4} cm/s, a absorção do fármaco será considerada incompleta. Por outro lado, quando o valor de P_{eff} é maior do que 2×10^{-4} cm/s, a absorção é considerada completa (LOBENBERG & AMIDON, 2000). Em fármacos pouco solúveis, algumas variáveis são incluídas, como volume do fluido intestinal, pH gastrointestinal e tempo de trânsito gastrointestinal (onde um intervalo de tempo é necessário para dissolver os materiais pouco solúveis) (MARTINEZ & AMIDON, 2002).

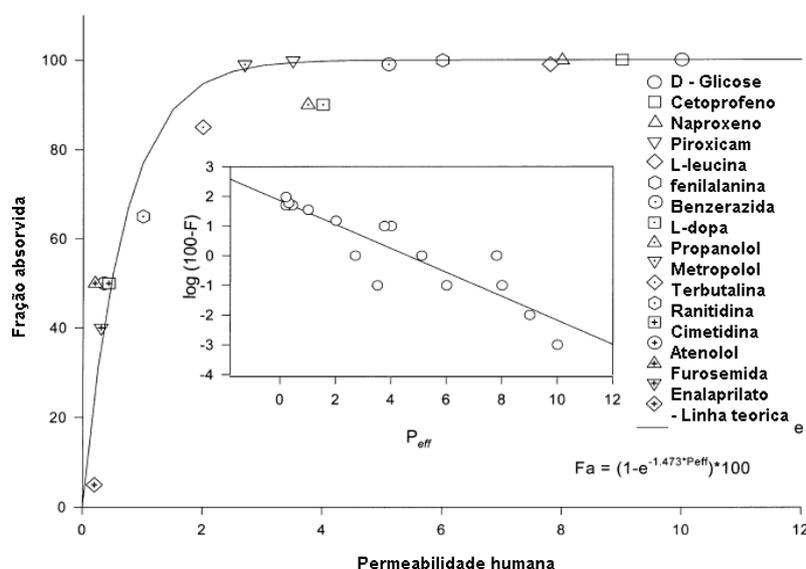


Figura 2 – Relação entre permeabilidade humana e fração absorvida (Adaptado de LOBENBERG & AMIDON, 2000).

O SCB é caracterizado por ser conservativo em relação às fronteiras entre os parâmetros de solubilidade, permeabilidade e critérios de dissolução. Muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas objetivando as modificações frente a essas fronteiras e critérios para promover a isenção dos estudos de bioequivalência (YU *et al.*, 2002).

Dentre os trabalhos desenvolvidos, existem estudos elaborados com os fármacos pertencentes à classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade). A

razão científica em conceder a isenção dos estudos de bioequivalência a esse grupo está na absorção oral que é limitada pela dissolução *in vivo*. Novas propostas envolvendo o desenvolvimento de novos meios de dissolução, como lauril sulfato de sódio, taurocolato de sódio e lecitinas, nas metodologias *in vitro*, e a determinação de uma correlação *in vitro–in vivo*, comprovando o estabelecimento das condições *in vivo*, vem sendo desenvolvidas de modo intensificado, mas a barreira quanto a estes métodos consiste nos difíceis processos *in vivo* envolvidos (KOVACEVIC *et al.*, 2008; OKUMU *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2002).

Além da classificação do fármaco, o SCB é também um guia regulatório de fundamental importância para estabelecer correlações *in vitro-in vivo* (EMAMI, 2006).

1.15.4 Correlação *in vitro–in vivo* (CIVIV)

No processo de desenvolvimento e otimização de uma formulação há um alto consumo de tempo e de custos financeiros decorrentes de mudanças tanto na composição do medicamento quanto no próprio processo. Dessa forma, estudos solicitando a participação de voluntários saudáveis são realizados objetivando a comprovação da bioequivalência com a formulação de referência (EMAMI, 2006).

Assim, o desenvolvimento de testes *in vitro* que reflitam os dados de biodisponibilidade é de grande interesse. Nos últimos anos, a aplicação da correlação *in vitro-in vivo* para novas formas farmacêuticas tem sido o principal foco de atenção da indústria farmacêutica e agências regulatórias. A CIVIV é definida como um modelo matemático preditivo que descreve a relação entre uma característica *in vitro* de uma determinada forma farmacêutica e uma resposta variável *in vivo*. A característica *in vitro* mais utilizada é a quantidade de fármaco liberado em um determinado tempo e a resposta variável *in vivo* é representada pela fração absorvida no mesmo tempo (EMAMI, 2006).

Algumas definições de CIVIV foram sugeridas por algumas agências regulatórias. Segundo a FDA (1997), uma CIVIV é um modelo matemático preditivo que descreve a relação entre as propriedades *in vitro* a resposta *in*

vivo relevante das formas de farmacêuticas de liberação imediata e modificada. Geralmente, uma propriedade *in vitro* é a velocidade e extensão da dissolução ou liberação de fármacos enquanto que a resposta *in vivo* é determinada pela concentração plasmática ou a quantidade de fármaco absorvido (FDA, 1997).

A ANVISA segundo a resolução - RE N°482 de 19 de março de 2002, conceitua CIVIV como “o estabelecimento de uma relação racional entre as propriedades biológicas, ou parâmetros derivados destas, produzidas por uma forma farmacêutica e suas propriedades ou características físico-químicas” (ANVISA, 2002).

As propriedades biológicas mais comumente utilizadas nas CIVIV são um ou mais parâmetros farmacocinéticos tais como área sob a curva de concentrações plasmáticas do fármaco ou concentração plasmática máxima *versus* tempo, obtidos após a administração da forma farmacêutica. A característica físico-química mais empregada é o comportamento de dissolução *in vitro* (isto é, porcentagem do fármaco dissolvido sob determinadas condições experimentais). A relação entre as duas propriedades, biológica e físico-química é, então, expressa quantitativamente (ANVISA, 2002).

A CIVIV tem como objetivo reduzir o número de estudos em voluntários durante o desenvolvimento de uma nova forma farmacêutica, agindo como substituto para os estudos de biodisponibilidade e, conseqüentemente, sugerindo a isenção desses estudos. A CIVIV também pode estabelecer especificações nos estudos de dissolução e validar o uso de um novo método empregado. Isto porque a CIVIV inclui relevâncias *in vivo* para especificações dos estudos de dissolução *in vitro*. Pode também assistir no controle de qualidade, como na melhoria das formulações ou em mudanças no processo de produção (EMAMI, 2006).

Cinco níveis de CIVIV têm sido definidos pela FDA. O conceito de nível de correlação tem como base a capacidade de uma correlação de refletir o completo perfil da concentração plasmática do fármaco em função do tempo resultante da administração de uma dada forma farmacêutica (FDA, 1997).

Correlação de nível A: É uma relação ponto a ponto entre os dados de dissolução *in vitro* e os dados *in vivo* de um determinado fármaco. As correlações são lineares. No entanto, correlações não-lineares, menos habituais, podem ser adequadas. Independente do tipo de método utilizado

para estabelecer uma correlação de nível A, o modelo prediz os níveis plasmáticos a partir dos dados *in vitro*. É um tipo de correlação que fornece bem mais informações quando comparado aos demais níveis. Esta correlação tem a capacidade de prever o comportamento de um fármaco *in vivo* com relação aos dados *in vitro*;

Correlação de nível B: Uma CIVIV de nível B utiliza os princípios de análises dos momentos estatísticos. Neste nível de correlação, o tempo médio de dissolução *in vitro* (TMD_{vitro}) de um produto é comparado ao tempo médio de residência *in vivo* (TMR_{vivo}) ou ao tempo médio de dissolução *in vivo* (TMD_{vivo}). Embora a correlação de nível B use todos os dados *in vitro* e *in vivo*, não é uma correlação ponto a ponto. A correlação de nível B não é única, uma vez que diferentes curvas *in vivo* podem produzir valores similares de TMR;

Correlação de nível C: Neste nível de correlação, um parâmetro de dissolução *in vitro* (tempo de dissolução: $t_{50\%}$, $t_{90\%}$, etc.), é comparado a um parâmetro farmacocinético médio semelhante como ASC, t_{max} ou C_{max} . Entretanto, esta correlação representa um simples ponto e não reflete toda a curva de concentração plasmática, sendo então, um fator crucial, indicando uma performance dos produtos de liberação modificada. É o nível mais fraco dentre as correlações quando uma relação parcial entre absorção e dissolução é estabelecida;

Múltiplas correlações de nível C: Relata um ou mais parâmetros farmacocinéticos de interesse (C_{max} , ASC ou alguns outros parâmetros disponíveis) a uma dada quantidade de fármaco dissolvido em um determinado ponto do tempo de um perfil de dissolução. A múltipla correlação de nível C pode ser usada para justificar a isenção dos estudos de biodisponibilidade/bioequivalência, desde que a correlação tenha sido estabelecida sobre todo o perfil de dissolução com um ou mais parâmetros farmacocinéticos de interesse. A relação será demonstrada em cada ponto do tempo em um mesmo parâmetro tal que o efeito sobre a performance *in vivo* de alguma mudança na dissolução possa ser ensaiada. Caso exista semelhança entre as múltiplas correlações de nível C, então, é provável o desenvolvimento de uma correlação de nível A. Uma múltipla correlação de nível C será baseada, no mínimo, em três pontos do tempo do perfil de dissolução: fase inicial, intermediário e estágio final;

Correlação de nível D: Não é considerado útil para as propostas regulatórias. Não é uma correlação formal, mas funciona como um auxílio no desenvolvimento de uma suposta forma farmacêutica (FDA, 1997).

Diferente do guia desenvolvido pela FDA, a ANVISA estabelece apenas três níveis de correlação, A, B e C, sendo definidos e classificados em ordem decrescente de importância.

Como o SCB agrupa os fármacos segundo as características de solubilidade e permeabilidade, a CIVIV pode ser definida mais claramente (EMAMI, 2006).

Para fármacos de classe I, que têm altos valores de número de absorção (A_n) e de dissolução (D_n), não é esperada uma correlação entre os dados *in vivo* com a velocidade de dissolução (EMAMI, 2006).

Para fármacos de classe II, que têm um alto valor de absorção (A_n) e um baixo valor de número de dissolução (D_n), pode ser estabelecida uma forte correlação entre a velocidade de dissolução e a performance *in vivo*. É de extrema importância que os testes de dissolução *in vitro* reflitam situações *in vivo* quando solicitado uma CIVIV. Caso necessário, métodos e meios de dissolução que reflitam a performance *in vivo* são considerados para que uma boa correlação possa ser obtida (EMAMI, 2006).

Para fármacos de classe III, onde a permeação é o fator limitante, é esperada nenhuma ou uma limitada CIVIV. Por último, para fármacos de classe IV, que apresentam grandes problemas de liberação oral efetiva, é possível uma CIVIV caso a velocidade de dissolução permita que o fármaco esteja disponível na região de absorção (EMAMI, 2006).

O auxílio do método de CIVIV para fármacos de classe II tem sido empregado nas pesquisas farmacêuticas. O desenvolvimento de novos meios de dissolução para este grupo é complementado pela CIVIV na tentativa de promover o desenvolvimento das melhores condições, de modo que sejam discriminativos com relação às características dessa classe de fármacos.

Muitos estudos relacionando o SCB e as condições fisiológicas com os fármacos de classe II vêm sendo desenvolvidas na literatura. Esta relação pode ser auxiliada por metodologias *in silico*, modelos matemáticos computacionais que promovem a predição dos parâmetros farmacocinéticos em função das propriedades físico-químicas dos fármacos, objetivando elaborar o melhor perfil

para o desenvolvimento de uma formulação. Além disso, muitas pesquisas propondo o desenvolvimento de um meio de dissolução que mimetize as condições *in vivo* pode ser determinado pelos modelos de correlação *in vitro-in vivo* desenvolvidos também pela metodologia *in silico* (GRBIC *et al.*, 2011; KOVACEVIC *et al.*, 2008; OKUMU *et al.*, 2009).

1.16 Estimativas de biodisponibilidade *in silico*

Terstappen e Reggiani (2001) promoveram uma visão geral quanto às áreas envolvendo os estudos na descoberta de fármacos, na qual a abordagem *in silico* é utilizada. Normalmente, os programas são empregados na predição das propriedades físico-químicas de novos candidatos a fármacos, na simulação da absorção ao longo do trato gastrointestinal e na abordagem do comportamento farmacocinético no organismo humano (TERSTAPPEN & REGGIANI, 2001; TUBIC *et al.*, 2006).

Assim, este tipo de método pode ser útil nas predições da biodisponibilidade, em particular, de parâmetros como C_{max} , t_{max} e ASC após administração, principalmente, dos comprimidos de liberação imediata (TERSTAPPEN & REGGIANI, 2001; TUBIC *et al.*, 2006).

1.16.1 Simulação de absorção do fármaco administrado por via oral

Sabendo que os fatores que influenciam a absorção de um fármaco ao longo do trato gastrointestinal são os parâmetros físico-químicos, fisiológicos e de formulação, os métodos *in silico* tem auxiliado muitos pesquisadores durante a elaboração da melhor estratégia de formulação, a fim de se promover a melhor predição da performance *in vivo* de um fármaco durante o desenvolvimento de um produto farmacêutico, evitando desnecessários estudos de biodisponibilidade/bioequivalência, diminuindo tempo e custo nas pesquisas (AGORAM *et al.*, 2001; JIANG *et al.*, 2011).

Dentre os métodos *in silico* utilizados, destacamos o emprego do programa GastroPlus™ que conduz a interpretação de cada processo envolvido sobre o fármaco ao longo do trânsito gastrointestinal (LI *et al.*, 2005).

1.16.1.1 GastroPlus™

O GastroPlus™ é um programa computacional de tecnologia avançada que simula a absorção gastrointestinal, ocular, nasal e pulmonar durante a etapa de desenvolvimento ou de descoberta dos fármacos (SIMULATION PLUS, 2010).

O conceito de fração absorvida no GastroPlus™ segue a definição de absorção, segundo a FDA, que é a fração da dose absorvida através da membrana apical e que permanece dentro das células epiteliais no trato gastrointestinal (SIMULATION PLUS, 2010).

Baseado na teoria do SCB e nas condições fisiológicas do trato gastrointestinal, o modelo de trânsito e absorção compartimental avançado (TACA) (Figura 3) é utilizado para realizar a simulação gastrointestinal no GastroPlus™ (GRBIC *et al.*, 2010).

O modelo descreve a liberação, a dissolução, a degradação no lúmen (se alguma), o metabolismo, a absorção / “exsorção” do fármaco, uma vez que ele transita através dos sucessivos compartimentos. As cinéticas associadas com esse processo são modeladas por um sistema de equações lineares e não lineares, considerando 6 estados do fármaco (não liberado, não dissolvido, dissolvido, degradado, metabolizado, absorvido), 18 compartimentos, sendo 9 gastrointestinais (estômago, 7 do intestino delgado e cólon), 9 enterócitos, 3 estados do material excretado (não liberado, não dissolvido e dissolvido) e a quantidade de fármaco em até 3 compartimentos farmacocinéticos (quando os parâmetros farmacocinéticos estão disponíveis). A quantidade de material absorvido é determinada pelos valores integrados de absorção / “exsorção” em cada compartimento de absorção / trânsito (SIMULATION PLUS, 2010).

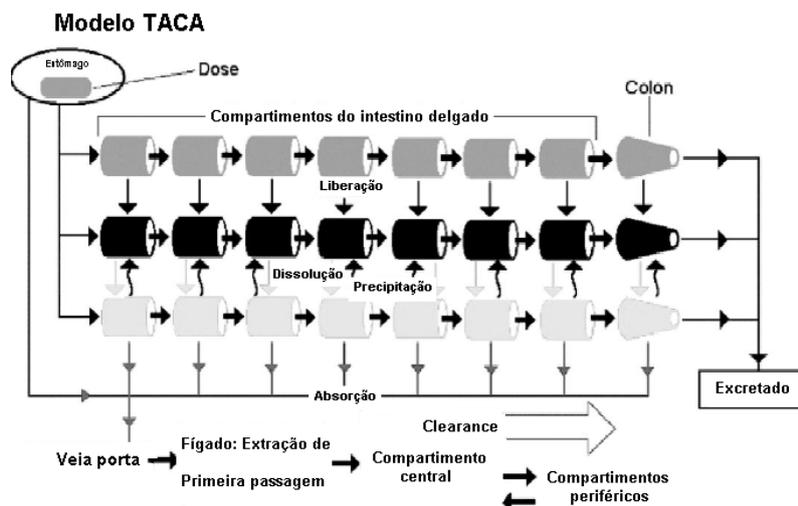


Figura 3 – Modelo de trânsito e absorção compartimental avançado (TACA) (Adaptado de AGORAM, 2001).

Para realizarmos a simulação de absorção, são necessárias informações quanto aos seguintes parâmetros no programa (SIMULATION PLUS, 2010):

- Propriedades físico-químicas dos compostos em estudo;
- Dados de solubilidade em função do pH, do perfil de dissolução para os diferentes tamanhos de partícula quando especificados;
- Tipo de formulação para liberação imediata ou controlada;
- Notificação quanto ao tipo de dose (simples ou múltipla);
- Modelo fisiológico (jejum ou alimentado);
- Variáveis fisiológicas em cada compartimento: pH, tempo de trânsito, comprimento, volume, proteínas enzimáticas e transportadoras, distribuição no intestino em diferentes espécies (efluxo/influxo), massa corporal, degradação dependente do pH no lúmen antes da absorção;
- Variação na velocidade de absorção/“exsorção” devido a diferenças no gradiente de concentração, na permeabilidade regional, no transporte mediado por carreadores.

Outra importante função exercida pelo GastroPlus™ é a possibilidade da predição da biodisponibilidade durante o desenvolvimento dos fármacos. Logo, o perfil da curva de concentração plasmática *versus* tempo, assim como, C_{max} , t_{max} , e ASC, são disponíveis ao final da simulação. Para determinação desses valores, são necessários alguns parâmetros farmacocinéticos acurados, por

exemplo, o volume de distribuição e a depuração do fármaco (SIMULATION PLUS, 2010).

A correlação *in vitro-in vivo* também pode ser diagnosticada pelo *software* através do módulo IVIVCPlus™. Pesquisas na literatura têm sido realizadas a fim de diagnosticar o melhor método de dissolução biorrelevante para auxiliar na redução dos estudos *in vivo* com humanos durante o desenvolvimento de um medicamento e propor sua aprovação pelas agências regulatórias. Uma CIVIV é possível quando as propriedades farmacocinéticas do fármaco são controladas pela liberação do mesmo de sua forma de dosagem (SIMULATION PLUS, 2010; OKUMU *et al.*, 2008, WEI, LOBENBERG, 2006).

A combinação entre a simulação gastrointestinal com a correlação *in vitro-in vivo* pode ser bem sucedida para justificar uma isenção dos estudos de bioequivalência (Figura 4).

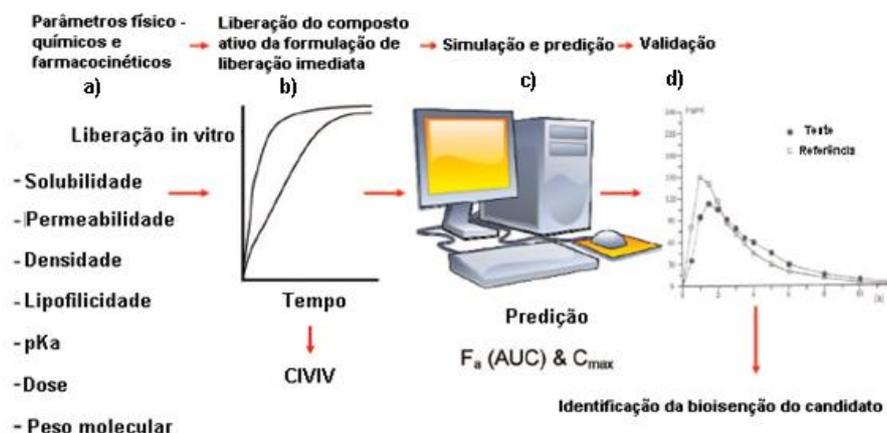


Figura 4 – CIVIV com auxílio da tecnologia de simulação gastrointestinal. a) parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos, b) Obtenção dos dados de liberação *in vitro*, c) Simulação de parâmetros como C_{max} , t_{max} , ASC e Fração absorvida (F_a), d) Predição do perfil da curva de concentração plasmática *versus* tempo baseado nos dados de liberação *in vitro* (Adaptado de KOVACEVIC *et al.*, 2008).

Kovacevic e colaboradores (2008) utilizaram a tecnologia de simulação gastrointestinal como ferramenta para investigar uma possível extensão de isenção dos estudos de biodisponibilidade/bioequivalência para comprimidos de liberação imediata e liberação controlada de carbamazepina e propôs um

meio de dissolução que seria preditivo do comportamento *in vivo* do medicamento.

A absorção e a disposição *in vivo* do fármaco foi simulada baseada nas propriedades físico-químicas e farmacocinéticas e na cinética de dissolução do fármaco observados *in vitro*. Alguns parâmetros foram determinados experimentalmente, e alguns foram obtidos da literatura (KOVACEVIC *et al.*, 2008).

Os parâmetros farmacocinéticos preditos e observados *in vivo* foram semelhantes. O valor de C_{max} predito foi de 3,76 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que o valor observado foi de 3,78 $\mu\text{g/mL}$; o valor de t_{max} predito e observado foi 6 e 7 h, respectivamente; enquanto os valores da ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ preditos e observados foram 201,2/224,6 $\mu\text{gh/mL}$ e 226,9/229,1 $\mu\text{gh/mL}$, respectivamente (KOVACEVIC *et al.*, 2008).

Os dados de dissolução em água e LSS 1% obtidos para comprimidos de liberação imediata e liberação controlada foram usados para prever o perfil da curva de concentração plasmática *versus* tempo para desenvolver um modelo de CIVIV de nível A. A análise do coeficiente de correlação linear dos dados para ambos os fármacos genérico e referência dos comprimidos de liberação imediata e controlada indicaram uma correlação de nível A. O trabalho sugeriu que a solução aquosa de LSS 1% pode ser considerada um meio de dissolução biorrelevante para os estudos com comprimidos de liberação imediata e controlada de carbamazepina (KOVACEVIC *et al.*, 2008).

Assim, a metodologia proposta pela pesquisa envolvendo a tecnologia de simulação gastrointestinal e a CIVIV sugerem que existe uma lógica para levar em consideração a extensão da isenção dos estudos de biodisponibilidade/bioequivalência para a carbamazepina (KOVACEVIC *et al.*, 2008).

O GastroPlusTM também auxiliou no desenvolvimento de uma forma de dosagem do composto LAB687 da Novartis. O LAB687 é um material com baixa solubilidade e uma alta permeabilidade, três diferentes formulações foram desenvolvidas e analisadas em cães. As formulações foram encapsuladas e uma dose de 50 mg de LAB687 foi administrada em cada cão. Porém, antes de administrá-los nos animais, um modelo de absorção em cães foi desenvolvido no GastroPlusTM. O modelo simulou que a fração absorvida é

sensível a solubilidade e também ao tamanho de partícula, sugerindo que alterações na formulação para melhorar a solubilidade, pode aumentar a biodisponibilidade. Logo a simulação no GastroPlus™ foi útil no entendimento entre a formulação e os parâmetros associados (JIANG *et al.*, 2011).

O GastroPlus™ também foi bastante importante no desenvolvimento de formulações envolvendo o composto R1315 da Roche. O composto R1315 é pouco solúvel e possui uma alta permeabilidade. Um modelo de absorção em humanos no GastroPlus™ foi desenvolvido administrando em cápsula, 160 mg do composto. Neste estudo uma análise da sensibilidade dos parâmetros foi realizado sobre a solubilidade e o tamanho de partícula. Segundo os resultados de simulação, a redução do tamanho de partícula e o melhoramento da solubilidade por meios tecnológicos não conduziria no aumento da velocidade de absorção, sendo consistente com os estudos de biodisponibilidade realizados em cães. Assim, baseados na simulação e também nos resultados de biodisponibilidade, o estudo de liberação de fármacos não foram realizados para o composto R1315. Sendo o contrário do que foi inicialmente planejado para esse composto pertencente a classe II segundo o SCB (JIANG *et al.*, 2011).

Assim, o auxílio do GastroPlus™ na simulação da biodisponibilidade durante a elaboração das melhores estratégias de formulação, tem direcionado o desenvolvimento de pesquisas de modo mais rápido e mais econômico.

A FDA reconheceu que as melhores concepções quanto aos modelos de absorção e também no desenvolvimento das correlações *in vitro-in vivo* estão nas áreas de pesquisas envolvendo simulação e modelagem. A primeira aplicação da modelagem molecular pela FDA foi na avaliação do risco fetal na exposição à tretinoína, um ingrediente ativo altamente teratogênico. A agência regulatória concluiu que o risco era mínimo e o medicamento foi aprovado (JIANG *et al.*, 2011).

Hoje, a FDA busca os métodos por modelagem e simulação nas decisões sobre a necessidade em construir um estudo farmacológico clínico específico e nas recomendações para o planejamento de um determinado estudo específico (JIANG *et al.*, 2011).

A capacidade do GastroPlus™ em prever a biodisponibilidade também foi analisado e avaliado neste trabalho, o fármaco utilizado foi o efavirenz que

segundo o SCB é pertencente a classe II, como os outros representantes, possui solubilidade limitada, conseqüentemente, dissolução limitada, influenciando a pouca absorção deste fármaco ao longo do trato gastrointestinal.

1.17 Efavirenz

O efavirenz [(4S)-6-cloro-4-(ciclopropiletinil)-1,4-dihidro-4-(trifluorometil)-2H-3,1-benzoxazin-2-ona] (Figura 5), foi sintetizado como parte de um programa de pesquisa entre Dupont Pharma e Merck Pharmaceuticals (MOYLE *et al.*, 1999). Em 1998, a FDA e, em 1999 a Agência Européia de Avaliação de Medicamentos (EMA) aprovaram o efavirenz no tratamento de pacientes infectados com o vírus HIV-1, que logo depois se tornou um importante componente na terapia altamente ativa nos países em desenvolvimento como inibidor da transcriptase reversa não nucleosídeo (ITRNN). Todos os ITRNNs interferem com a função da transcriptase reversa do HIV-1, não apresentam nenhum efeito inibitório sobre a transcriptase reversa do HIV-2, e também sobre os diferentes tipos de DNA polimerase humano. Ligado a uma região hidrofóbica dentro da transcriptase reversa do HIV-1, o ITRNN inibe o processo de polimerização do duplo filamento de DNA (VROUENRAETS *et al.*, 2007).

O efavirenz é um sólido cristalino branco, fórmula molecular $C_{14}H_9ClF_3NO_2$, massa molecular de 315,68 g/mol, pKa no valor de 10,2 e um Log P de 5,4, sendo praticamente insolúvel em água (< 10 µg/mL) em pH igual a 8,3 a 25°C (GAO *et al.*, 2007; SATIGARI *et al.*, 2009; VROUENRAETS *et al.*, 2007).

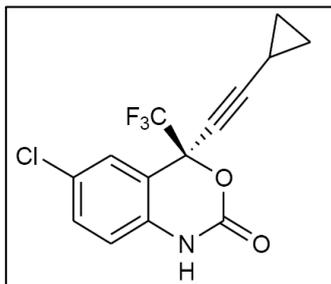


Figura 5 – Fórmula estrutural do efavirenz (VROUENRAETS *et al.*, 2007).

No mercado, o efavirenz pode ser encontrado como cápsula de 50, 100 ou 200 mg, como comprimido de 600 mg e, também, como formulação líquida de 30 mg/mL. A combinação do efavirenz com outros fármacos também utilizados na terapia altamente ativa já vem sendo realizada em muitos países. Recomenda-se que a dose por via oral diária em adultos seja de 600 mg, devendo ser ingerido com o estômago vazio, preferivelmente, ao se deitar, para diminuir os efeitos colaterais neuropsiquiátricos. O efavirenz é teratogênico, sendo, então, contra indicado para mulheres portadoras do vírus HIV-1 grávidas ou com intenção de engravidar (MOYLE *et al.*, 1999; VROUENRAETS *et al.*, 2007).

As reações adversas do efavirenz, em destaque devido aos aspectos toxicológicos importantes para a monitoração terapêutica, são: exantema, síndrome de Stevens-Johnson, distúrbios do sono (sono agitado, insônia, sonolência), tonturas, vertigens, irritabilidade, agitação, depressão, euforia, dificuldade de concentração, amnésia, alucinações (VROUENRAETS *et al.*, 2007).

Seu pico de concentração plasmática está em torno de 1,6 a 9,1 μM , em 5 horas, após uma dose simples de 100 a 1600 mg, quando administrado em voluntários saudáveis. O tempo necessário para alcançar o pico de concentração plasmática fica em torno de 3 a 5 horas e o estado estável da concentração plasmática é alcançado em torno de 6 a 10 dias. (VROUENRAETS *et al.*, 2007).

A ingestão de alimentos junto com o efavirenz aumenta o C_{max} e a ASC comparados ao estado em jejum. O efavirenz atravessa a barreira hematoencefálica, com a concentração no fluido cérebro espinhal variando de 0,26 a 1,19% da concentração no plasma sanguíneo. O fármaco está

altamente ligado a proteínas plasmáticas (~99,5 a 99,75%), predominantemente albumina (MOYLE *et al.*, 1999; VROUENRAETS *et al.*, 2007).

A metabolização do efavirenz ocorre via sistema citocromo P(CYP)-450, predominantemente, CYP3A4 e CYP2B6. Menos de 1% do fármaco está em estado inalterado na urina. O efavirenz induz a sua própria metabolização, mas inibe, também, várias isoenzimas do sistema CYP450, incluindo CYP3A4, CYP2C9 e CYP2C19. Conseqüentemente, pode chegar a afetar a farmacocinética de outros fármacos que são metabolizados por essas enzimas (MOYLE *et al.*, 1999; VROUENRAETS *et al.*, 2007).

O efavirenz possui um tempo de meia-vida elevado (52 a 76 horas com uma dose simples, 40 a 55 horas com doses múltiplas). Pacientes com danos hepáticos ou co-infectados com hepatites B (HBV) ou C (HCV) devem ter as enzimas hepáticas monitoradas cuidadosamente nos primeiros meses do tratamento com o efavirenz (VROUENRAETS *et al.*, 2007).

2. JUSTIFICATIVA

O efavirenz, sendo um fármaco de classe II, possui sua solubilidade como fator limitante para absorção e, conseqüentemente, a biodisponibilidade sistêmica. Assim, é de extrema importância, com auxílio da metodologia *in silico*, promover a predição da biodisponibilidade referente aos fatores físico-químicos, fisiológicos e de formulação estabelecidos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a eficiência do GastroPlus™ na predição de biodisponibilidade *in silico* com o uso do efavirenz e determinar a simulação de correlação *in vitro–in vivo* em função dos dados de dissolução dos comprimidos, da dissolução por dispersão do insumo farmacêutico e dos dados obtidos nos estudos de biodisponibilidade *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar os parâmetros experimentais para a simulação da biodisponibilidade dos lotes de IFA – Solubilidade e tamanho de partícula;
- Obter os dados de dissolução do comprimido e da dissolução por dispersão dos lotes de IFA;
- Obter os dados dos estudos de bioequivalência com os comprimidos de cada biolote;
- Avaliar o uso no GastroPlus™ na predição da biodisponibilidade com os dados físico-químicos, fisiológicos e farmacocinéticos derivados de cada lote de IFA;
- Estabelecer uma CIVIV com o auxílio do GastroPlus™ entre os dados de entrada dos perfis de dissolução do comprimido, da dissolução por dispersão e o perfil da curva de concentração plasmática *versus* tempo dos estudos de biodisponibilidade.

4. MATERIAIS

4.1 Equipamentos

- Analisador de tamanho de partícula - Malvern Mastersizer 2000 modo úmido hydro 2000
- Analisador de área superficial - Micromeritics Gemini VI 2385C
- Balança analítica – Mettler Toledo AG204
- Centrifuga – Eppendorf 5430R
- Dissolutor – Vankel UK 7010
- Espectrofotômetro UV-vis – Varian Vankel 50 UV-vis
- Placa de agitação e aquecimento – Corning
- Placa de agitação multipontos– Mettler
- Membrana filtrante – 0,45 µm Millipore

4.2 Reagentes

- Ácido clorídrico P.A.– Vetec
- Cloreto de sódio P.A. – Vetec
- Fosfato monobásico de sódio anidro P.A. – Vetec
- Lauril sulfato de sódio – Vetec
- Tween 80% P.A. – Vetec

4.3 Lotes

- 811613
- 8CGS040
- 9CGS025
- Micro 10839
- Micro 10840
- 0806EX180 - Biolote A
- 0708EX216 - Biolote B
- 712847 - Lote A
- 0640/07 - Lote B

4.4 Programa computacional

- GastroPlusTM – Versão 7.0, Simulation Plus Inc.

5. METODOLOGIA

Neste trabalho, foram usadas duas amostras do fármaco efavirenz denominadas lotes A e B e suas respectivas formulações (comprimido), designadas biolotes A e B, representando as formulações aprovada e reprovada, respectivamente, segundo os critérios dos estudos de bioequivalência presentes na resolução-RE nº 894/2003 de acordo com a ANVISA. As amostras e suas respectivas formulações foram cedidas por Farmanguinhos.

5.1 Teste de Solubilidade

Para cada lote, um excesso foi adicionado a um béquer em banho-maria, a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, em um volume de 10 mL contendo três diferentes meios: suco gástrico simulado, água e suco entérico simulado, com pH nos valores de 1,2, 5,5 e 6,8, respectivamente. Cada béquer foi mantido em agitação magnética a uma velocidade de 50 rpm durante 24 horas. Ao final deste período, o material foi transferido para um tubo Falcon e centrifugado a 3500 rpm durante 30 minutos. Em seguida, a solução resultante foi filtrada através de uma membrana de $0,45\ \mu\text{m}$ de porosidade e a solubilidade foi determinada por espectrofotometria UV-Vis no comprimento de onda de 248nm. A partir do valor de absorvância encontrado para cada amostra, foi calculada a solubilidade no meio analisado por uma equação da reta, que foi previamente preparada para cada meio (Figuras 6 e 7). Cada experimento foi realizado em duplicata. O pH de cada amostra foi medido durante o experimento (OKUMU *et al.*, 2009; USP 34, 2011).

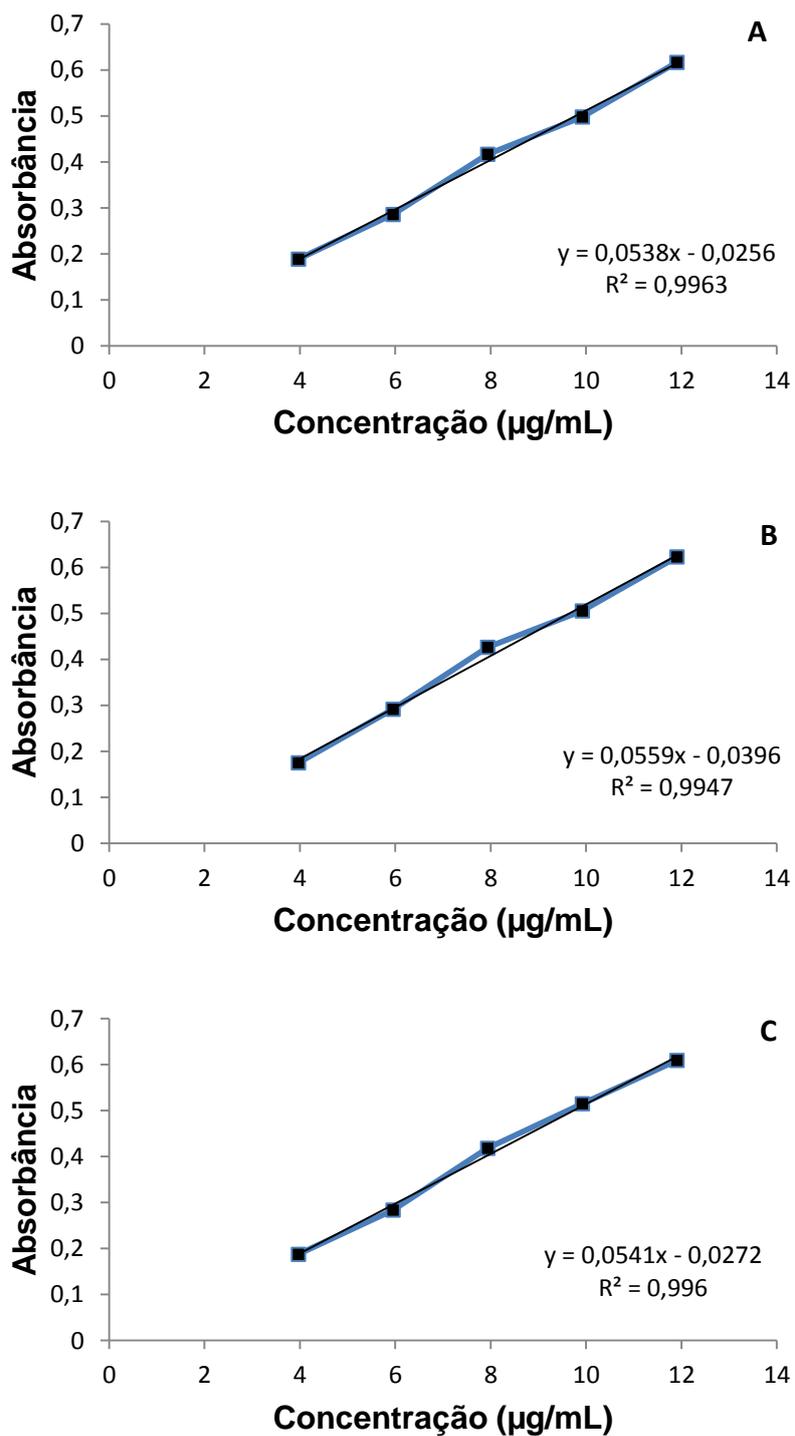


Figura 6 –Curva padrão do lote A em suco gástrico simulado (A, pH=1,2), água (B, pH=5,5) e suco entérico simulado (C, pH=6,8).

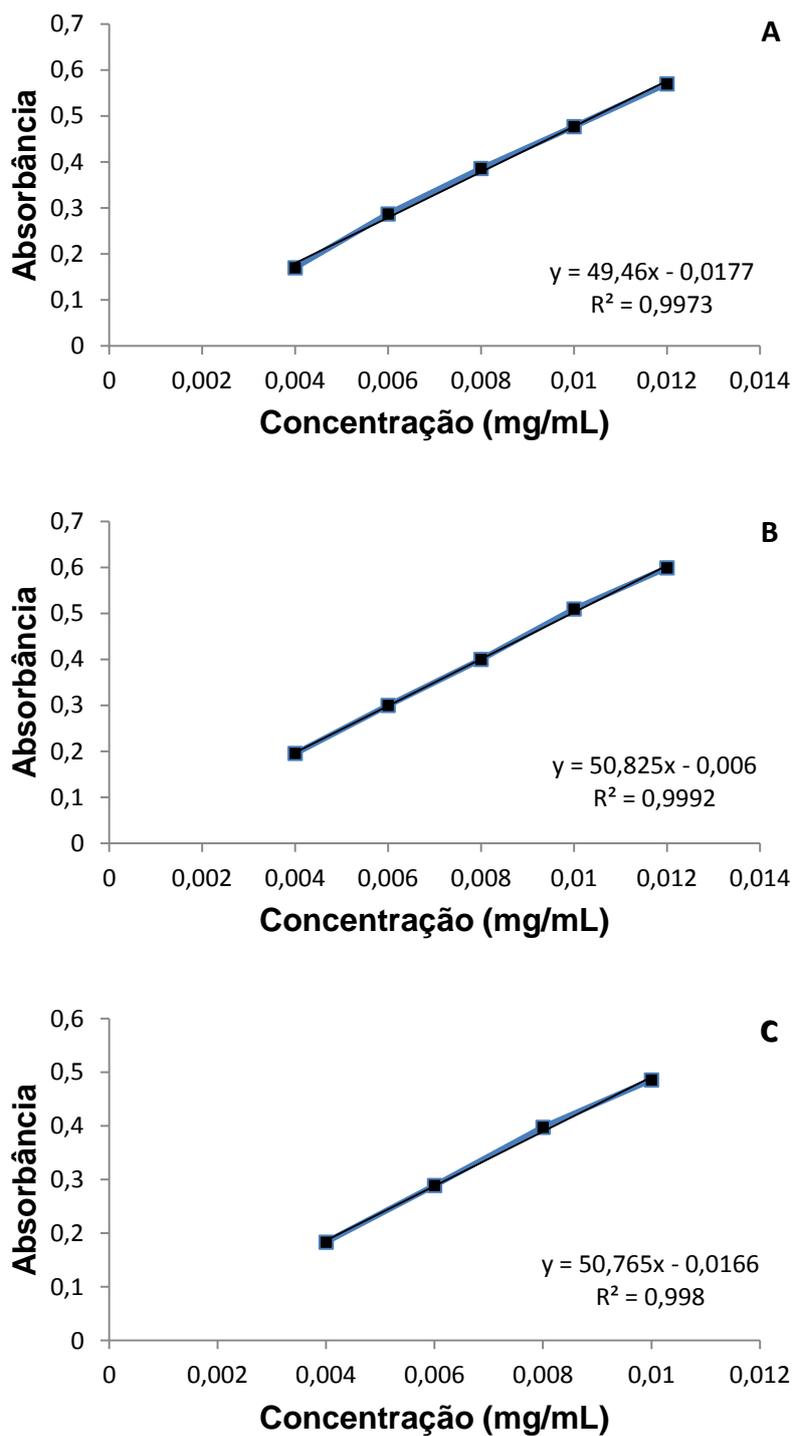


Figura 7 - Curva padrão do lote B em suco gástrico simulado (A, pH=1,2), água (B, pH=5,5) e suco entérico simulado (C, pH=6,8).

5.2 Análise por tamanho de partícula

Os lotes A e B foram submetidos a uma análise de determinação do tamanho e distribuição de partícula no Laboratório de Controle de Qualidade (LabCQ/UFRJ). Para cada lote, 15 mg de efavirenz são colocados em um béquer de 25 mL e 10 mL de solução 0,02% (m/v) de Tween 80 são vertidos no recipiente. Em seguida, o béquer com a mistura foi colocado no ultrassom durante um tempo de 15 minutos para a completa dispersão do efavirenz em água, evitando a aglomeração das partículas. A dispersão foi colocada no analisador de tamanho de partícula (Mastersizer 2000) e a leitura realizada. Os dados de distribuição do tamanho de partícula foram apresentados na forma de 10% (D10), 50% (D50) e 90% (D90). Estes valores referem-se à média dos diâmetros de partículas nos intervalos abaixo de 10, 50 e 90% na curva de distribuição de tamanho. A partir destes dados, o índice de polidispersão (IP) para o tamanho das partículas foi calculado (WEI & LOBENBERG, 2006).

A determinação de área superficial (AS) pelo método de sorção física com gás nitrogênio foi realizada de acordo com a metodologia desenvolvida no Laboratório Analítico de Insumos Farmacêuticos (LAIF/PUCRS), baseando-se na USP (USP 34, 2011) e literatura relacionada. Cada amostra (lotes A e B) foi previamente desgaseificada, usando gás hélio para determinação do volume morto. A aquisição e o tratamento dos dados da análise, realizados em triplicata, foram efetuados com o programa ASAP[®] 2420 versão V2.05, utilizando os métodos BET (Brunauer, Emmett e Teller) Single point e Multi Point.

5.3 Estudos de dissolução do comprimido e dissolução por dispersão do insumo farmacêutico.

Os estudos de dissolução dos comprimidos dos biolotes A e B foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade (LabCQ/UFRJ) pelo aluno Eduardo Costa. Três metodologias foram utilizadas: Farmanguinhos, Farmacopéia Brasileira e Farmacopéia Americana que se diferenciam em relação a velocidade de agitação e a concentração de LSS. Os parâmetros são

apresentados no Quadro 2. Os dados de dissolução foram determinados a partir de uma equação da reta derivados de uma curva de calibração (Figuras 8 e 9).

Farmanguinhos (2009)	Farmacopéia Brasileira (2010)	Farmacopéia Americana (2009)
LSS 0,5%	LSS 1,0%	LSS 2,0%
Volume - 900 ml	Volume - 900 ml	Volume - 900 ml
<i>Apparatus</i> pá a 50 rpm	<i>Apparatus</i> pá a 100 rpm	<i>Apparatus</i> pá a 50 rpm
Temperatura a 37°C	Temperatura a 37°C	Temperatura a 37°C
Tempo de 5 a 60 minutos	Tempo de 5 a 60 minutos	Tempo de 5 a 60 minutos
Comprimento de onda - 248 nm	Comprimento de onda - 248 nm	Comprimento de onda - 248 nm

Quadro 1 – Metodologias de dissolução dos comprimidos de efavirenz do biolotes A e B (USP 34, Farmacopéia Brasileira, 2010, Farmanguinhos, 2009).

Os estudos de dissolução por dispersão dos lotes A e B também foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade (LabCQ/UFRJ) pelo aluno Eduardo Costa. Os dados foram determinados variando as concentrações de LSS (0,5, 1,0, 2,0%), em um volume de 900 mL, utilizando o *apparatus* pá a 50 rpm. As alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo específicos variando de 5 a 60 minutos. Os dados de dissolução foram determinados por espectrofotometria UV-Vis no comprimento de onda de 248nm. A partir do valor de absorbância encontrado para cada alíquota, foram calculados os dados de dissolução por uma equação da reta, previamente preparada para os lotes A (Figura 10) e B (Figura 11).

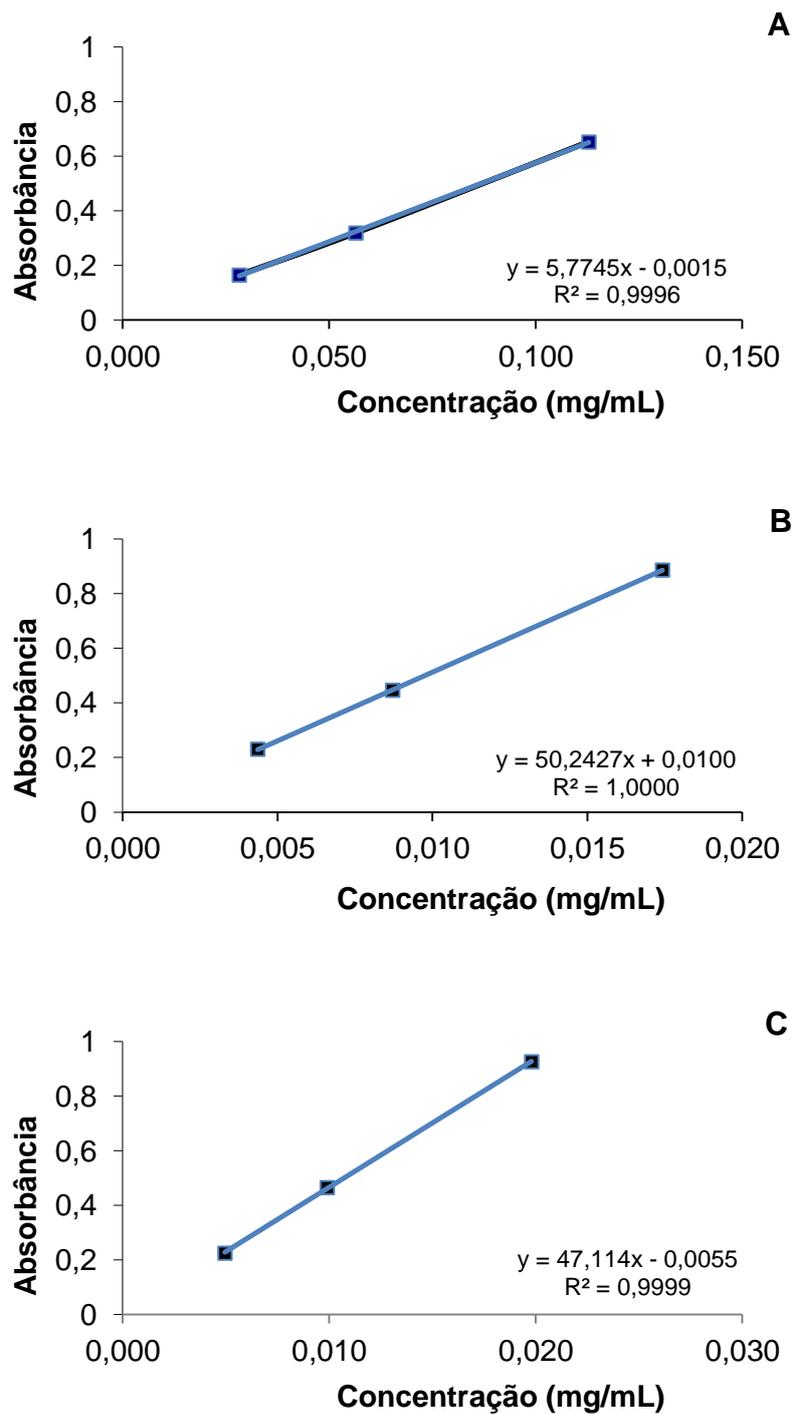


Figura 8 - Curvas padrão do biolote A, segundo as metodologias de Farmanguinhos (A), da Farmacopéia Brasileira (B) e Farmacopéia Americana (C).

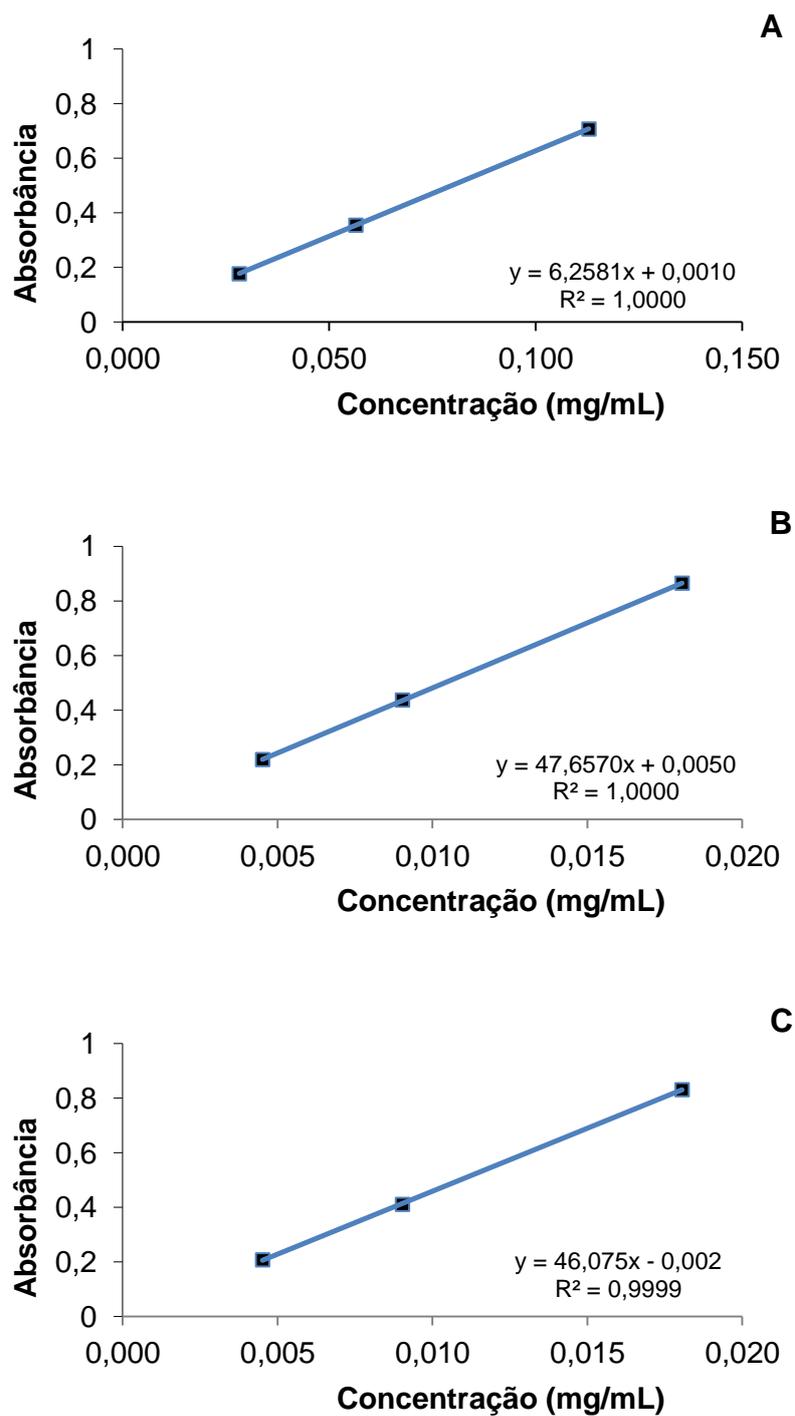


Figura 9 - Curvas padrão do biolote B, segundo as metodologias de Farmanguinhos (A), da Farmacopéia Brasileira (B) e da Farmacopéia Americana (C).

5.4 Estudos de bioequivalência

Os estudos de bioequivalência envolvendo o biolote A foram realizados na Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia (UNIFAG), pertencente à Ação Social Franciscana/Casa de Nossa Senhora da Paz, com participação de 14 voluntários na faixa etária entre 18–45 anos. O peso corporal médio foi em torno de 64,72 kg. A última coleta foi realizada no tempo de 192 horas. O volume ingerido para a administração oral do comprimido com 600 mg de efavirenz foi de 200 ml.

Para o biolote B os estudos de bioequivalência foram realizados na Scentryphar com participação de 53 voluntários na faixa etária entre 18–50 anos, o peso corporal médio foi em torno de 66,9 kg e a última coleta realizada no tempo de 168 h. O volume ingerido para a administração oral do comprimido com 600 mg de efavirenz foi de 200 ml.

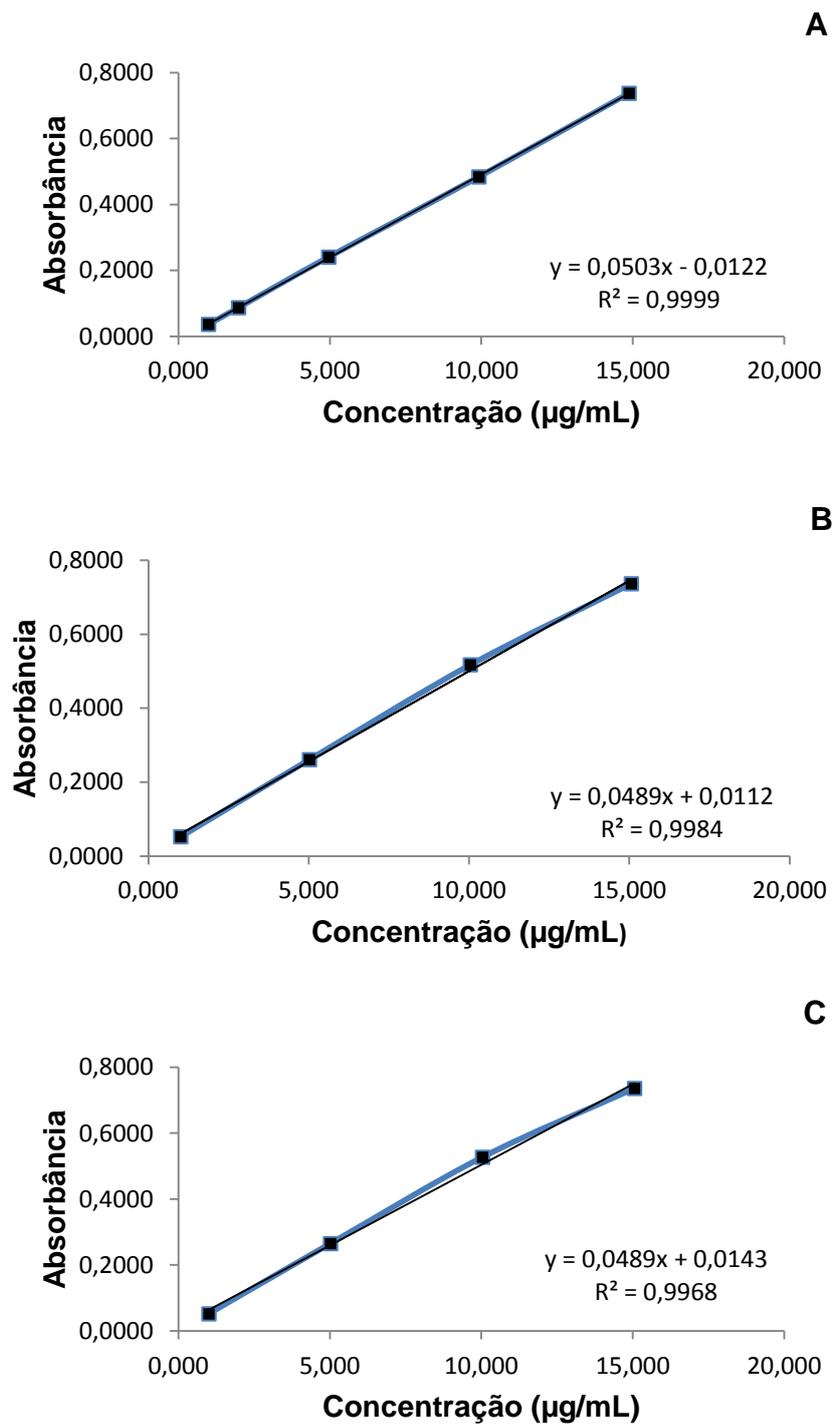


Figura 10 - Curva padrão do lote A em diferentes concentrações de lauril sulfato de sódio 0,5%-(A), 1,0%-(B) e 2,0%-(C).

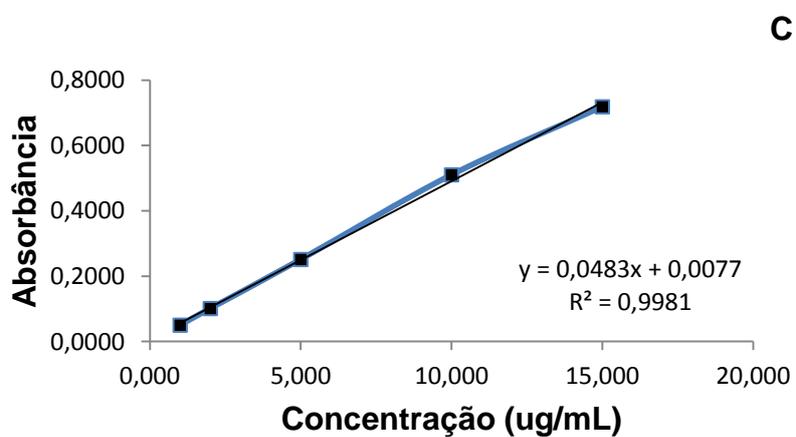
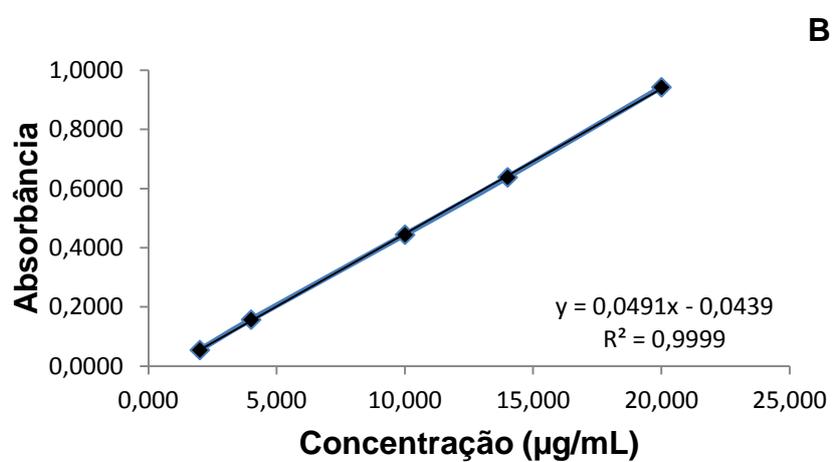
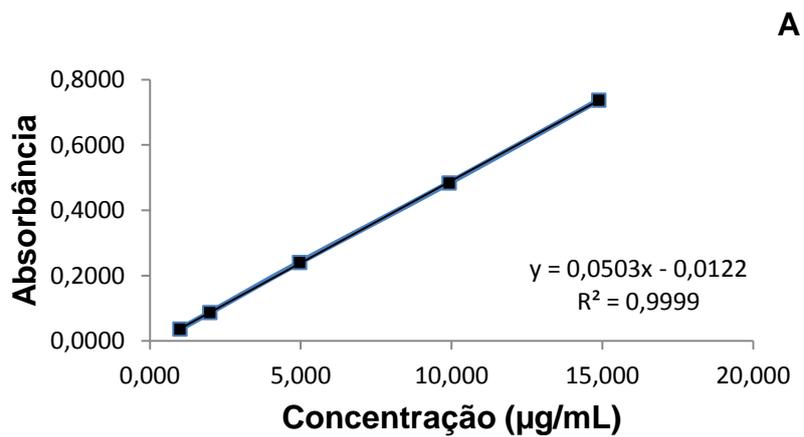


Figura 11 - Curva padrão do lote B em diferentes concentrações de lauril sulfato de sódio (0,5%-(A), 1,0%-(B) e 2,0%-(C)).

5.5 Método de Simulação Gastrointestinal–GastroPlus™

O programa GastroPlus™ (versão 7.0, Simulation Plus Inc., Lancaster, California, USA) foi utilizado para simular a biodisponibilidade dos lotes A e B do efavirenz e para estabelecer uma correlação *in vitro-in vivo*.

O programa possui três módulos de entrada: composto, fisiologia e farmacocinética, respectivamente. No módulo composto (Figura 12) são introduzidos dados das propriedades físico-químicas do fármaco, como por exemplo, solubilidade, pKa, coeficiente da permeabilidade efetiva humana e tamanho de partícula (WEI & LOBENBERG, 2006).

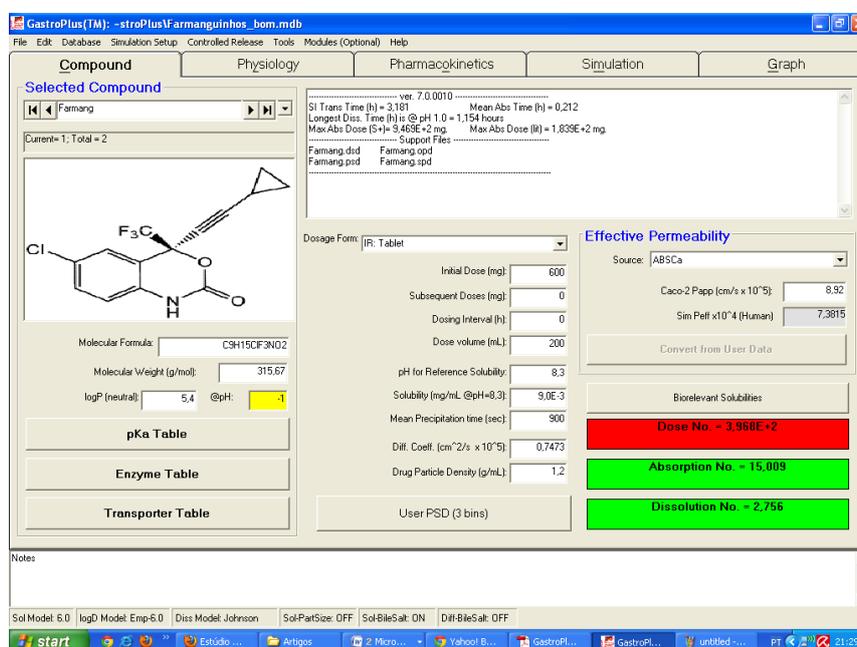


Figura 12 –Tela do Módulo “compound” do programa GastroPlus™.

No GastroPlus™, informações com relação as metodologias determinadas experimentalmente para os lotes de efavirenz e seus respectivos biolotes foram preenchidos em arquivos de suporte para que essas informações junto com os demais dados preenchidos simulem a biodisponibilidade de cada lote. Para criar um desses arquivos é necessário clicar em *File* na barra de menu principal e selecionar os itens presentes no menu (Figura 13).

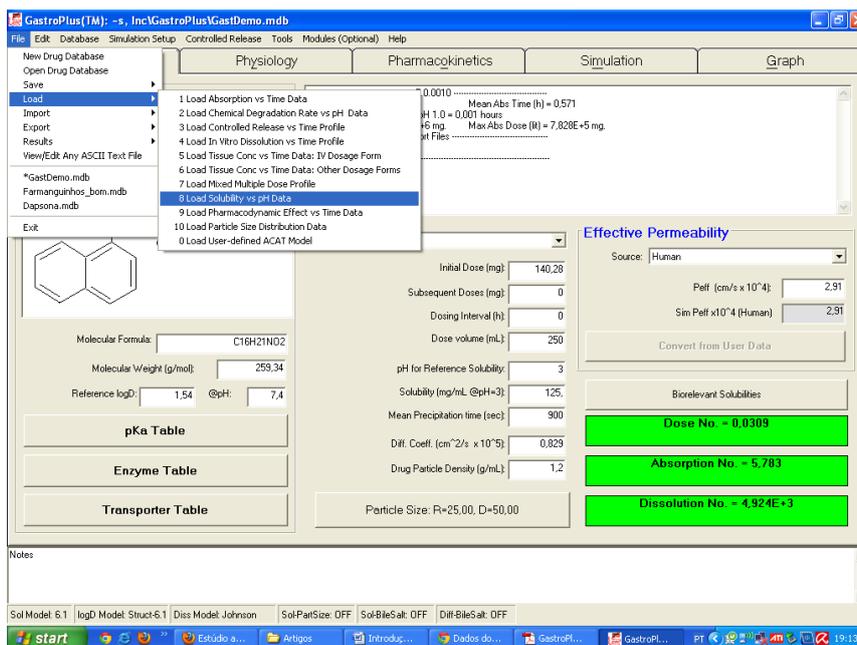


Figura 13 – Procedimento de seleção dos itens presentes como arquivos suporte para o preenchimento dos dados derivados *in vitro* e *in vivo* no GastroPlus™.

Os dados de solubilidade, da distribuição e tamanho de partícula e da dissolução obtidos experimentalmente, foram preenchidos e salvos com suas respectivas extensões que denotam o tipo de dado que possui, a Figura 14 exemplifica os dados de solubilidade preenchidos em sua extensão específica. Os demais dados foram obtidos na literatura ou foram estimados com auxílio do *software*. Como o trabalho foi realizado apenas com as formas de dosagem de liberação imediata, foi selecionado o modelo “IR: Tablet”.

O perfil de dissolução dos biolotes de efavirenz foram usados no GastroPlus™. Os dados foram utilizados para calcular a concentração do fármaco em cada compartimento. O método *in silico* calculou a fração absorvida baseado no modelo TACA considerando a influência de cada parâmetro que compõe cada compartimento (WEI & LOBENBERG, 2006).

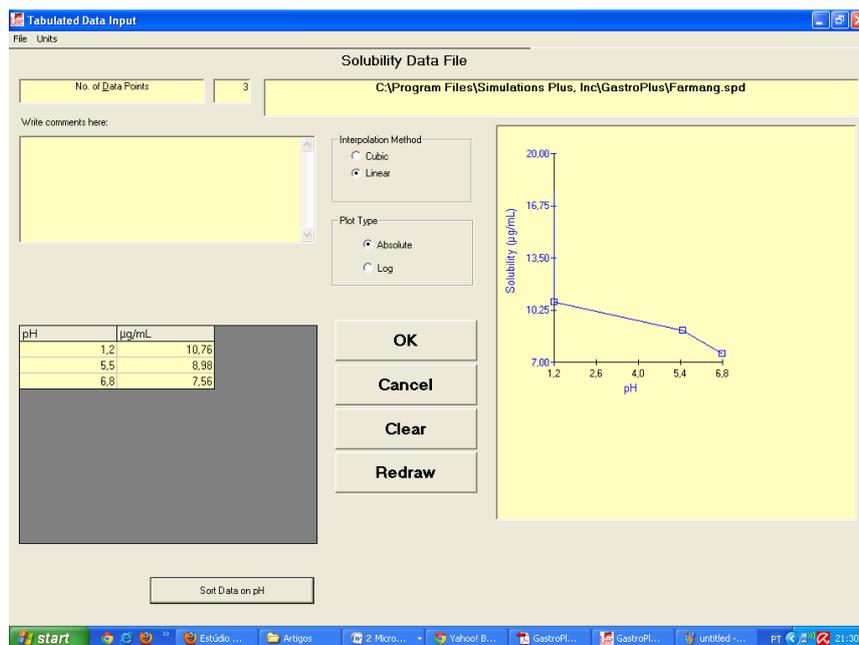


Figura 14 – Preenchimento dos dados de solubilidade no GastroPlus™ em diferentes valores de pH conforme o arquivo suporte na extensão específica (.spd).

No módulo seguinte, fisiologia (Figura 15), o modelo ASF Opt logD Model SA/V 6.1 foi selecionado para estimar as mudanças na permeabilidade ao longo do trato gastrointestinal. Todos os outros parâmetros foram fixados em valores padrões que representam uma fisiologia humana em jejum (WEI & LOBENBERG, 2006).

Os dados clínicos para cada biolote foram derivados dos estudos de bioequivalência. Com o auxílio do módulo PKPlus™ (Figura 16), o melhor modelo compartimental foi selecionado e os parâmetros farmacocinéticos ajustados, sendo imediatamente importados no módulo Farmacocinética (Figura 17) para habilitar o *software* a prever a curva de concentração plasmática *versus* tempo (OKUMU *et al.*, 2009). Com os dados acurados e preenchidos em cada módulo, o programa promoveu a predição dos dados de biodisponibilidade dos lotes A e B de efavirenz.

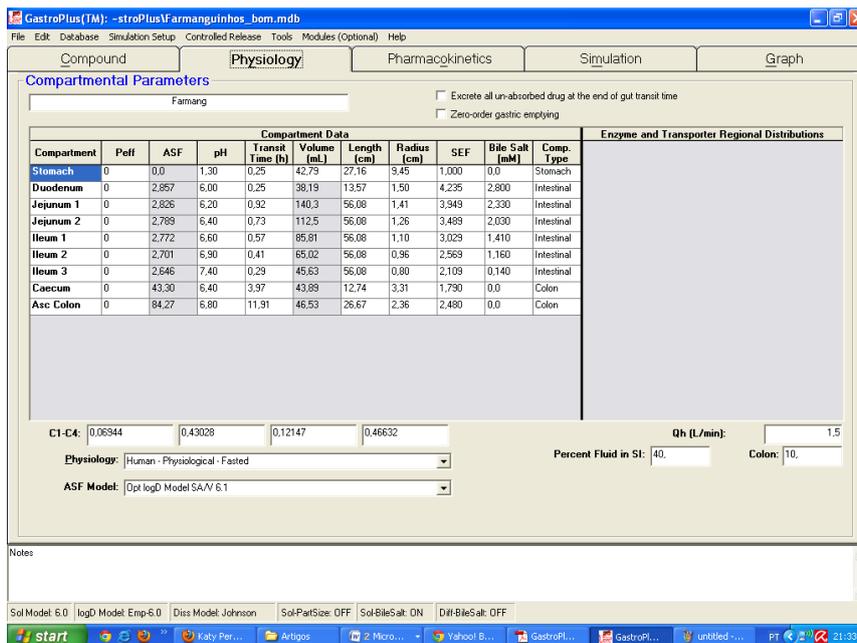


Figura 15 – Tela do módulo “physiology” do programa GastroPlus™.

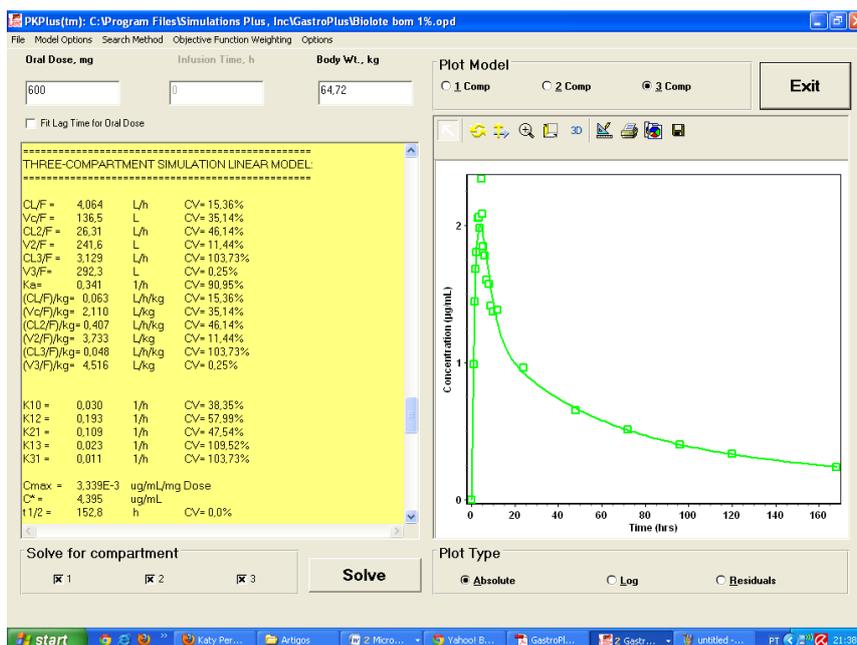


Figura 16 – Tela do módulo “PKPlus™” do programa GastroPlus™.

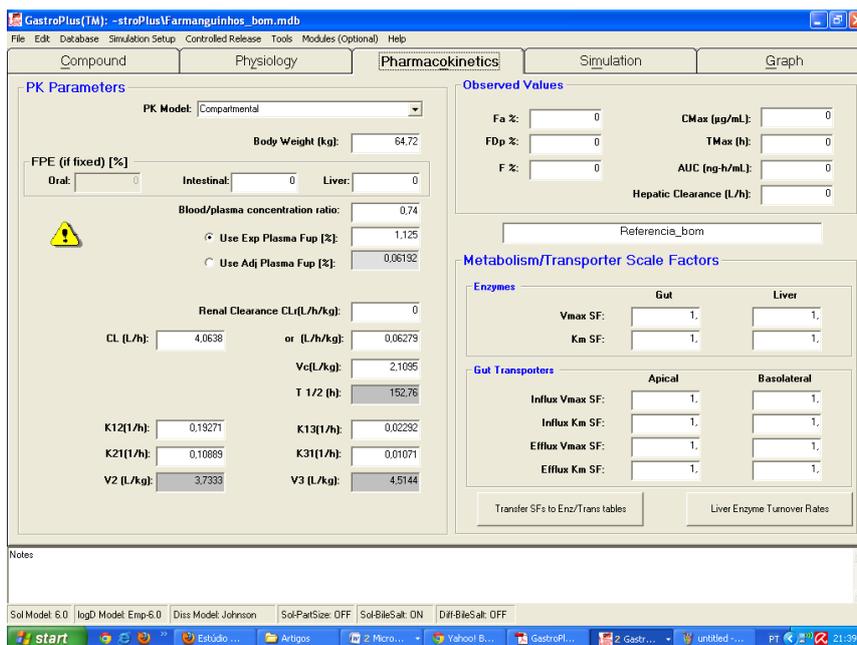


Figura 17 – Tela do módulo “pharmacokinetics” do programa GastroPlus™.

5.6 Correlação *in vitro-in vivo*

Os dados necessários para determinar uma correlação são derivados dos estudos de dissolução *in vitro* obtidos do biolote A, da dissolução por dispersão do lote A, além dos dados do perfil da curva de concentração plasmática *versus* tempo observados *in vivo* do biolote A. Os valores foram carregados no *software* e utilizados no módulo *IVIVCPlus* para o estabelecimento das correlações.

Habilitando o módulo *IVIVCPlus*, existem 4 opções: a primeira esta relacionada com os dados dos estudos *in vitro* representados pela dissolução do lote A e seu respectivo biolote (Figura 18).

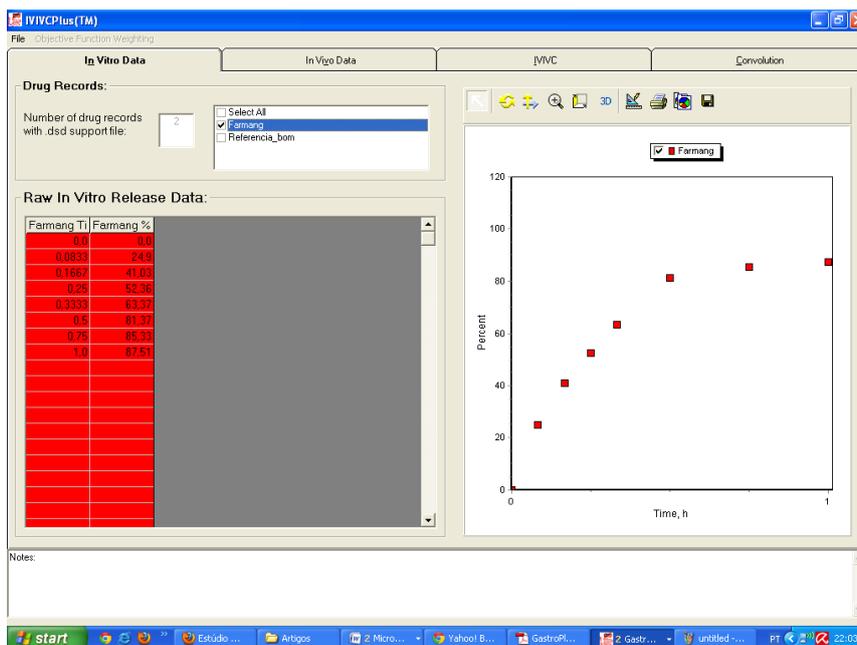


Figura 18 – Tela do módulo “IVIVCPlus™” do programa GastroPlus™ com a opção “In Vitro Data” habilitada.

A segunda opção solicita os valores do perfil da curva de concentração plasmática *versus* tempo derivados dos estudos de biodisponibilidade com o biolote A (Figura 19).

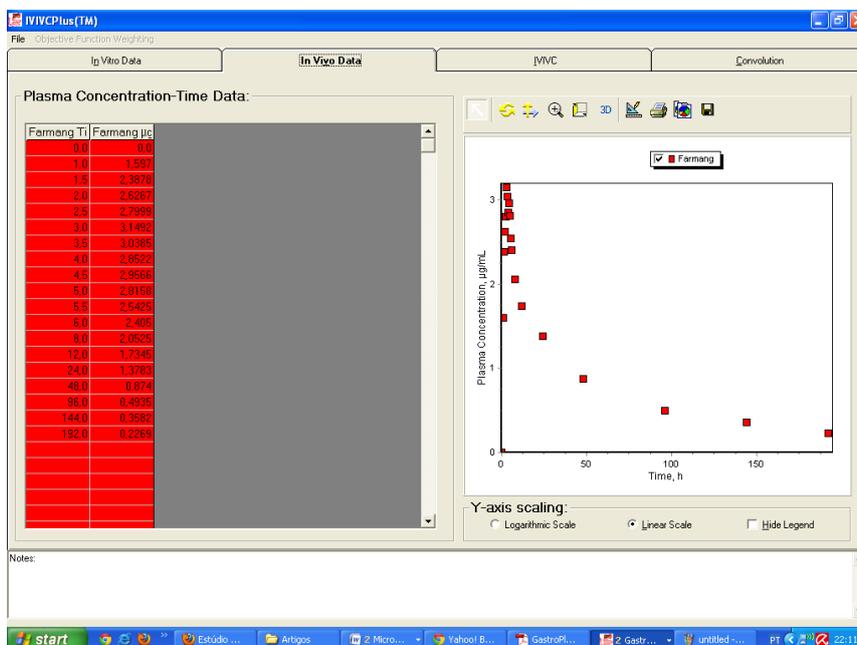


Figura 19 – Tela do módulo “IVIVCPlus™” do programa GastroPlus™ com a opção “In Vivo Data” habilitada.

A terceira opção representa *IVIVC* em que são selecionados os métodos de deconvolução, neste trabalho os métodos selecionados foram baseados na equação segundo Wagner-Nelson (monocompartimental) e Loo-Riegelman (3 compartimentos), somente os fármacos registrados com os dados de dissolução e os dados *in vivo* estarão presentes (Figura 20).

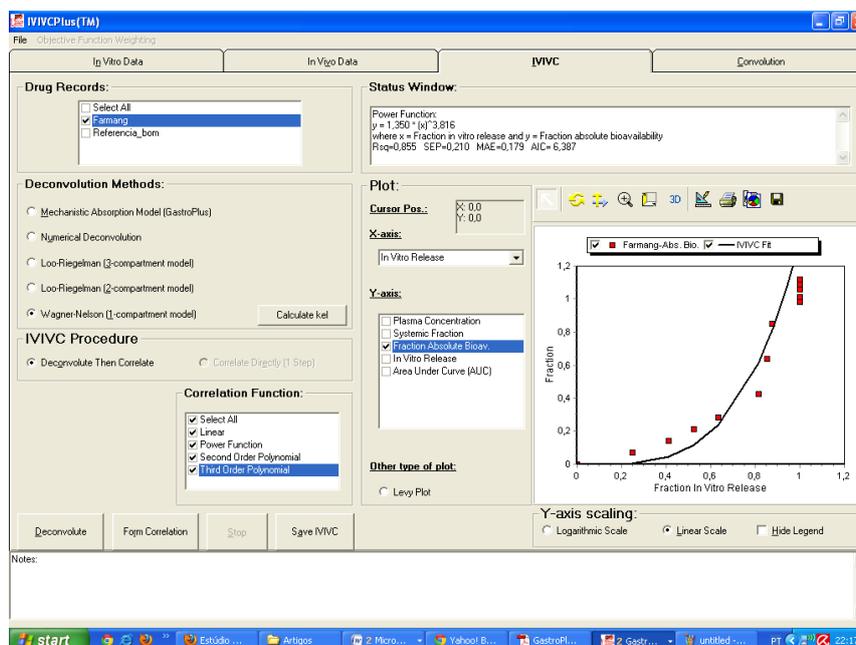


Figura 20 – Tela do módulo “IVIVCPlus™” do programa GastroPlus™ com a opção “IVIVC” habilitada.

A próxima etapa ocorre habilitando a última opção (convolução) (Figura 21). Executando a correlação, todos os dados quanto aos parâmetros farmacocinéticos serão apresentados com suas estatísticas de erro de predição e os seus respectivos coeficientes de regressão (GRBIC *et al.*, 2011; SIMULATION PLUS, 2010).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Teste de Solubilidade

Os resultados do teste de solubilidade em suco gástrico simulado, água e suco entérico simulado são apresentados na Tabela 2. Os valores de solubilidade não foram discriminativos ($P > 0,05$) tanto nos diferentes meios estudados para cada lote quanto em comparação entre os lotes A e B.

Tabela 2 - Solubilidade em diferentes meios dos lotes A e B de efavirenz.

Lote	Suco gástrico simulado	Água	Suco entérico simulado
A	10,76 µg/mL*	8,98 µg/mL*	7,56 µg/mL*
B	8,40 µg/mL*	8,23 µg/mL*	7,52 µg/mL*

* $P > 0,05$

De acordo com a literatura a solubilidade aquosa do efavirenz é menor do que 10 µg/mL a temperatura ambiente. Apesar da variação na temperatura, os dados experimentais obtidos com os lotes submetidos aos diferentes tampões, com seus respectivos valores de pH, indicam que a solubilidade está de acordo com os dados de literatura (VROUENRAETS *et al.*, 2007).

Um dos fatores físico-químicos que pode influenciar na solubilidade de um fármaco é o pKa. Segundo a literatura, o efavirenz apresenta valor de pKa igual a 10,2. De acordo com a literatura, sua dissociação aumenta em pH acima de 9, devido a ionização do grupo -NH que torna-se desprotonado e vai do estado neutro para uma carga -1. Há uma ionização da molécula conforme a Figura 22 (RABEL *et al.*, 1996).

Assim, com base nos dados experimentais, podemos observar que os valores de solubilidade podem estar relacionados com a baixa dissociação do composto ativo em tampões com valores de pH abaixo do pKa.

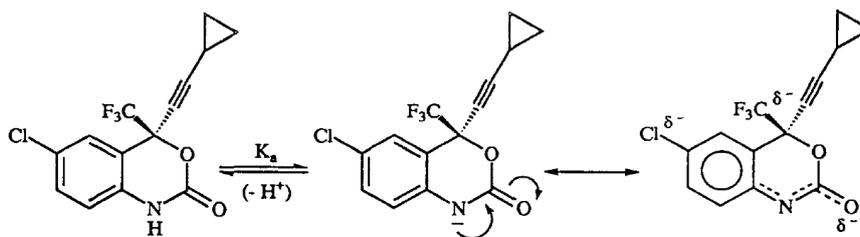


Figura 22 - Ionização do grupo –NH da molécula de efavirenz e estabilização da carga negativa presente sobre as espécies através do mecanismo de ressonância.

Para reforçar a solubilidade como uma propriedade físico-química limitante nos meios simulados em estudo para o efavirenz, o número de dose foi determinado (D_0 , na dose de 600 mg e volume de 200 mL) usando o valor de solubilidade em cada pH para cada lote (Tabela 3). Nos fármacos pouco solúveis (Classe II), o valor de D_n é menor do que um. No entanto, D_0 e A_n são parâmetros adimensionais normalmente altos (LÖBENBERG; AMIDON, 2000). O D_0 estabelecido para cada lote em estudo apresentou valores bem acima da faixa limite para este parâmetro adimensional.

Tabela 3 - Número de dose (D_0) dos lotes A e B.

Lote	Suco gástrico simulado	Água	Suco entérico simulado
A	278,81	334,07	396,82
B	357,14	364,52	398,93

A digoxina e a griseofulvina são fármacos pertencentes à classe II. Segundo o SCB, os valores de solubilidade destes fármacos são similares (aproximadamente 20 mg/mL). Entretanto, a dose de administração é diferente (0,5 mg para digoxina e 500 mg para griseofulvina). Conseqüentemente, o volume necessário para dissolver a digoxina em sua dose de administração é de aproximadamente 20 mL para uma solubilidade de 0,024 mg/mL na faixa de pH fisiológico. Por outro lado, a griseofulvina com uma solubilidade de 0,015 mg/mL, na faixa de pH fisiológico, precisa de um volume de aproximadamente 33,3 litros para solubilizar a dose de administração, sendo um volume muito grande para ser ingerido (LÖBENBERG & AMIDON, 2000).

Neste último caso, o mesmo pode ser observado para o efavirenz, cuja dose de administração de 600 mg, para um comprimido de liberação imediata, necessita de um volume de aproximadamente 79,4 litros, que excede o volume total de fluido intestinal. Isto indica que a solubilidade é o fator limitante para a absorção e também para a biodisponibilidade.

Apesar da baixa solubilidade notificada com os fármacos de efavirenz, um fator importante pode influenciar o valor de D_n e assim proporcionar alterações quanto ao comportamento dos compostos frente a sua absorção ao longo do trato gastrointestinal e concomitantemente a biodisponibilidade. Esse parâmetro é o tamanho de partícula.

6.2 Distribuição do tamanho de partícula

A análise da distribuição do tamanho de partícula, o índice de polidispersão e a área superficial dos lotes A e B são apresentadas na Tabela 4 e na Figura 23. Para o lote A 10%, 50% e 90% das partículas apresentaram tamanho igual a 0,996 μm , 3,288 μm e 10,045 μm , respectivamente. Para o lote B, 10%, 50% e 90% das partículas apresentaram tamanho igual a 2,302 μm , 17,077 μm e 48,824 μm , respectivamente. O índice de polidispersão calculado nos valores de 2,75 para o lote A e 2,72 para o lote B, indicam uma heterogeneidade entre o diâmetro das partículas. Podemos observar que os valores quanto a distribuição do tamanho de partícula para o lote A é menor do que o lote B, sendo compatível com os valores da área superficial observados (8,67 m^2/g para A e 2,00 m^2/g para B), visto o índice de polidispersão observado.

Logo, podemos sugerir que o lote A com uma distribuição do tamanho de partícula menor e conseqüentemente, uma maior área superficial presente uma maior solubilização quando comparado ao lote B que em função de seu maior valor de distribuição do tamanho de partícula e uma menor área superficial pode apresentar uma menor solubilização.

Tabela 4 – Distribuição e tamanho da partícula, índice de polidispersão e área superficial dos lotes A e B de efavirenz.

Lote	D (10)	D(50)	D(90)	IP	AS (m ² /g)
A	0,996 µm	3,288 µm	10,045 µm	2,75	8,67
B	2,302 µm	17,077 µm	48,824 µm	2,72	2,00

D(10)µm: diâmetro de partícula correspondente a 10% da distribuição acumulada.

D(50)µm: diâmetro de partícula correspondente a 50% da distribuição acumulada.

D(90)µm: diâmetro de partícula correspondente a 90% da distribuição acumulada.

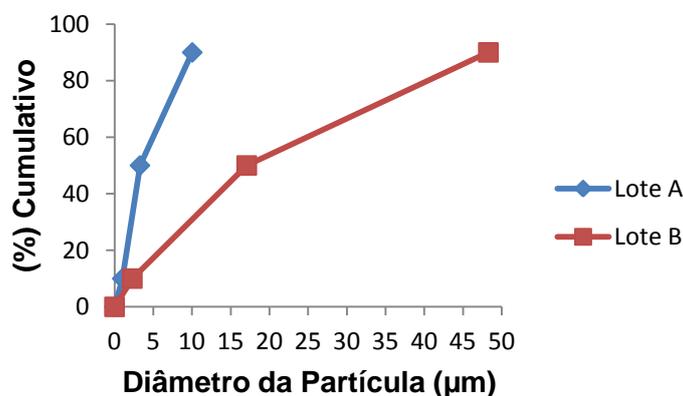


Figura 23 – Distribuição do tamanho de partícula do efavirenz: Linha azul lote A e linha vermelha lote B.

O perfil de dissolução por dispersão comparativo entre os lotes A e B em diferentes concentrações de LSS são apresentados na Figura 24. Análises estatísticas quanto a comparação entre a solubilização do lote A e o lote B nos diferentes meios de dissolução foram discriminativos ($P < 0,05$). Logo, há diferença na distribuição do tamanho de partícula entre os fármacos, consequentemente, resultando em diferentes valores de solubilização.

Lobenberg e colaboradores (2000) realizaram o estudo de dissolução do pó de glibenclamida. Diferenças significativas quanto ao tamanho e distribuição da partícula micronizada e normal do fármaco foram encontradas. Foi considerado que um dos fatores que influenciam a dissolução, consequentemente, a absorção do fármaco é o tamanho de partícula. As partículas menores com uma maior área superficial dissolveram mais rápido comparadas as maiores partículas do pó de glibenclamida.

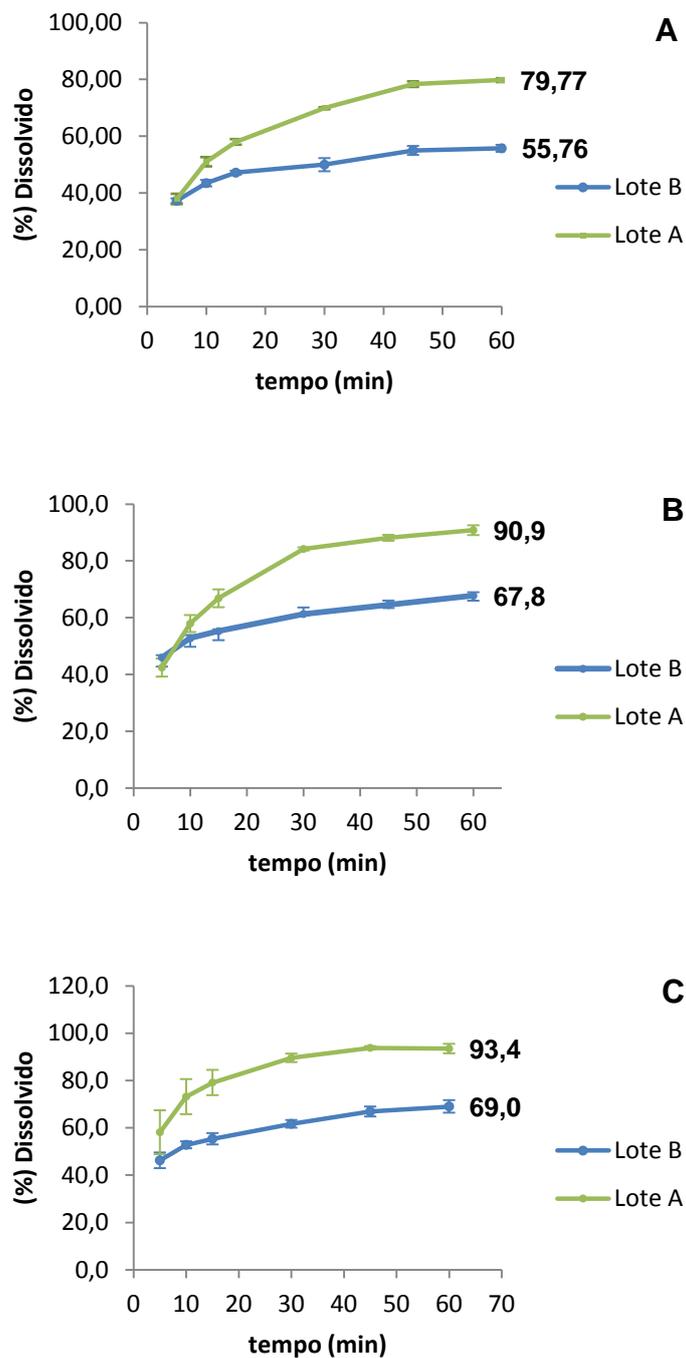


Figura 24 – Perfil de dissolução por dispersão comparativo entre os lotes A e B em diferentes concentrações de LSS 0,5-(A), 1,0-(B) e 2,0%-(C).

O perfil de dissolução por dispersão entre os lotes A e B em diferentes concentrações de LSS são apresentados na Figura 25. De acordo com as análises estatísticas entre os diferentes meios de dissolução, a solubilização do

lote A em LSS 0,5% não foi discriminativo quando comparado com LSS 1% ($P > 0,05$), mas comparado a LSS 2% os valores foram significantes estatisticamente ($P < 0,0001$). Por outro lado, baseados nos valores estatísticos, a solubilização do lote B nos diferentes meios (LSS 0,5, 1,0 e 2,0%) não foram discriminativos, podendo estar atribuído a própria característica do fármaco que não proporcionou uma boa dissolução nos diferentes ambientes.

A maior porcentagem do lote A solubilizado foi encontrada no meio de dissolução com LSS 2% (93,4%) seguido pela concentração em LSS 1% (90,9%) e LSS 0,5% (79,77%). Por outro lado, o lote B apresentou uma solubilização menor do que o lote A. No entanto, o lote B também apresentou uma maior solubilização no meio com concentração de LSS 2% (69,0%) seguido pela concentração de LSS 1% (67,8%) e LSS 0,5% (55,76%).

Segundo Okumo e colaboradores (2008), a solubilização dos fármacos pode aumentar em função da concentração de surfactantes presentes no meio de dissolução. Assim, a maior porcentagem de solubilização nos estudos de dissolução por dispersão pode estar atribuído as diferentes concentrações de LSS.

Simulações foram realizadas em função dos fatores físico-químicos, de formulação e fisiológicos para cada lote, sendo possível a predição da biodisponibilidade.

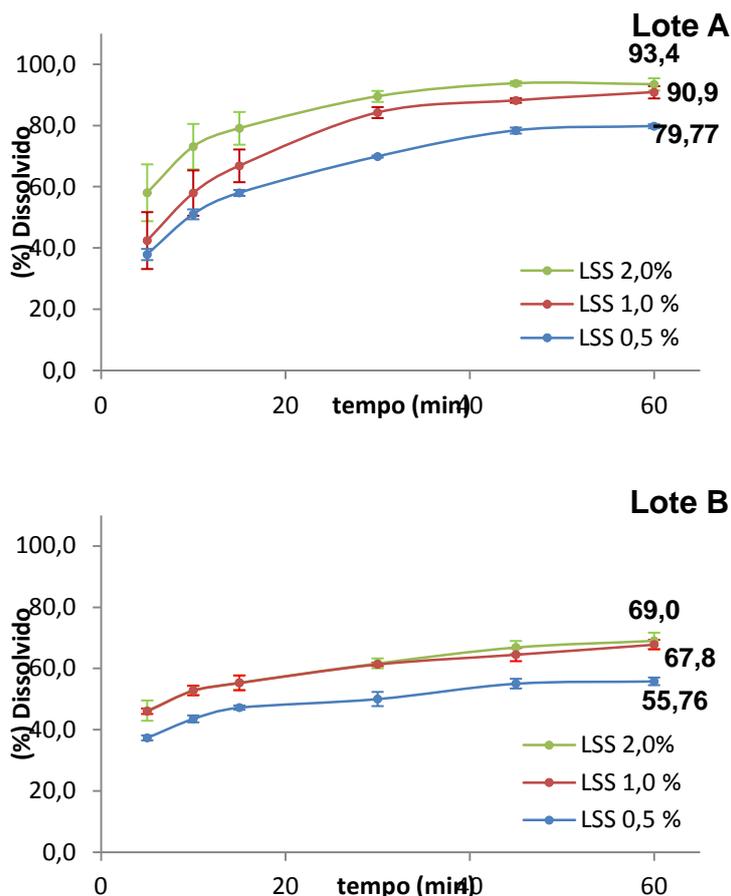


Figura 25 - Perfil de dissolução por dispersão dos lotes A e B em diferentes concentrações de LSS (0,5 1,0 2,0%).

6.3 Simulação Gastrointestinal - GastroPlus™

O GastroPlus™ é um *software* que tendo a capacidade em promover a simulação da absorção e também a biodisponibilidade, vem auxiliando muitas pesquisas durante a descoberta e o desenvolvimento de fármacos. Para que seja realizado as predições é necessário valores determinados quanto aos parâmetros físico-químicos, fisiológicos e de formulação. Alguns parâmetros são derivados da literatura, do próprio *software* ou determinados experimentalmente, e no caso desse trabalho, a solubilidade, o tamanho de partícula e dissolução. Outro parâmetro importante que contribui na velocidade e extensão da absorção de um determinado fármaco é a permeabilidade. Sua opção esta presente no módulo composto e pode ser determinada por metodologias *in vitro*, como por exemplo, estudos de permeabilidade com

células Caco-2. Entretanto, a permeabilidade em diferentes metodologias ainda não foi desenvolvida. Esses estudos têm como objetivo buscar entre as metodologias a que menor irá variar quanto aos resultados simulados referente ao coeficiente de permeabilidade efetiva em comparação com valores já estabelecidos. Logo, foi necessário simular a permeabilidade efetiva humana com dados da permeabilidade em células Caco-2 derivados da literatura.

Inicialmente foi realizada a predição da biodisponibilidade a partir de parâmetros físico-químicos (solubilidade) e de formulação (tamanho de partícula) utilizando 5 lotes de efavirenz para avaliar a sensibilidade do *software* quanto aos diferentes resultados derivados desses parâmetros para cada lote. As Tabelas 5 e 6 apresentam os parâmetros adicionais para a simulação da biodisponibilidade e os parâmetros farmacocinéticos preditos, respectivamente.

Diferenças quanto aos valores de F_a , C_{max} , t_{max} e ASC_{0-t} foram observados para os 5 diferentes lotes de efavirenz. O lote 10839 apresentou a maior valor de C_{max} (2,06 $\mu\text{g/mL}$) dentre os avaliados, por outro lado, o lote 8CGS040 apresentou a menor valor de C_{max} (1,32 $\mu\text{g/mL}$). Quanto aos respectivos valores de t_{max} simulados, para o lote 10839, t_{max} simulado foi de 4,32 h, enquanto para o lote 8CGS040, t_{max} foi de 6,06 h. Os resultados preditos da ASC_{0-t} para o lote 10839 foi de 95,66 $\mu\text{gh/mL}$, para o lote 8CGS040 o valor simulado foi de 68,92 $\mu\text{gh/mL}$. Quanto a fração de absorção, F_a para o lote 10839 foi no valor de 88,25%, já para o lote 8CGS040, F_a foi no valor de 64,90%.

Assim, os valores simulados de acordo com os dados de solubilidade e tamanho de partícula para cada lote de efavirenz demonstraram-se diferentes. No entanto, os parâmetros farmacocinéticos para todos os lotes foram diferentes dos dados resultantes dos estudos de biodisponibilidade derivados da literatura, podendo sugerir que tal fato pode estar atribuído as diferentes características para cada matéria-prima. Logo, o GastroPlusTM foi sensível aos fatores físico-químicos e de formulação, indicando a importância desses parâmetros na influência quanto a biodisponibilidade.

Baseados nos resultados provenientes da avaliação foram realizados a predição da biodisponibilidade dos lotes A e B em função dos fatores físico-químicos, fisiológicos e de formulação.

Tabela 5 – Parâmetros empregados para a simulação da biodisponibilidade dos cinco lotes de efavirenz. Em preto parâmetros derivados da literatura, em vermelho parâmetros derivados do GastroPlus™.

Parâmetros	Efavirenz
Peso molecular (g/mol)	315,67
Log P	5,4
pKa	10,2
Dose (mg)	600
Permeabilidade (cm/s x 10 ⁻⁵)	8,92
Relação Sangue/plasma	0,74
Peso corporal (kg)	64,72
Volume de distribuição (L/Kg)	3,33
Depuração (L/h)	3,87
Volume de dose (ml)	250
C _{max} (µg/mL)	3,67
t _{max} (h)	4,84
ASC _{0-t} (µgh/mL)	112
Coeficiente de difusão	0,7473
Densidade de partícula (g/ml)	1,2
Tempo de precipitação (s)	900
Fisiologia	Fasted
Modelo AFS	SA/V 6.1

Tabela 6 – Parâmetros farmacocinéticos derivados da literatura e simulados de cinco lotes de efavirenz.

Lotes	F_a(%)	C_{max} (µg/mL)	t_{max} (h)	ASC_{0-t} (µgh/mL)
811613	83,01	1,76	5,68	89,40
9CGS025	74,11	1,56	5,78	79,30
8CGS040	64,90	1,32	6,06	68,92
10839	88,25	2,06	4,32	95,66
10840	78,61	1,68	5,58	84,44
Literatura	-	3,67	4,84	112

A simulação gastrointestinal para comprimidos de liberação imediata do efavirenz baseados nos parâmetros de entrada provenientes da literatura, de valores determinados pelo GastroPlus™ e provenientes dos estudos de biodisponibilidade de cada biolote, são apresentados na Tabela 7. Os resultados de solubilidade e tamanho de partícula já apresentados foram preenchidos nos arquivos de suporte em suas extensões específicas.

Todas as vantagens proporcionadas por uma forma de dosagem sólida são diretamente relacionadas aos processos de produção empregados e, principalmente, aos excipientes utilizados durante o desenvolvimento de uma formulação (TOLLER *et al.*, 2005).

A composição de excipientes e a dose do fármaco presente no biolote A são apresentados na Tabela 8.

Para o biolote A com uma dose no valor de 600 mg do lote A, a mistura de excipientes é composta por: celulose microcristalina 101 atuando como diluente, lactose monohidratada com sua ação aglutinante e diluente, coscarmelose sódica com sua característica em intumescer no contato com a água, aumentando seu volume em até oito vezes o tamanho inicial (a este excipiente tem-se um grande poder de desintegração), o lauril sulfato de sódio agindo como um tensoativo facilitando a dissolução do composto ativo, o estearato de magnésio tendo como função a ação lubrificante e o hidroxipropilcelulose agindo como um desintegrante (ROWEL *et al.*, 2009).

A variação quantitativa e qualitativa dos adjuvantes farmacotécnicos pode interferir com o desempenho das formas farmacêuticas, conseqüentemente, influenciando na velocidade de absorção, assim como, na biodisponibilidade (BONAMICI, 2009; KALÁSZ, 2006).

Tabela 7 – Parâmetros empregados para a simulação da biodisponibilidade. Em azul parâmetros derivados da literatura, em vermelho parâmetros derivados do GastroPlus™ e em preto valores experimentais dos estudos de biodisponibilidade.

Parâmetros	Lote A	Lote B
Peso molecular (g/mol)	315,67	315,67
Log P	5,4	5,4
pKa	10,2	10,2
Dose (mg)	600	600
Permeabilidade (cm/s x 10 ⁻⁵)	8,92	8,92
Relação Sangue/plasma	0,74	0,74
Tempo de precipitação (s)	900	900
Coeficiente de difusão	0,7473	0,7473
Densidade de partícula (g/mL)	1,2	1,2
Fisiologia	Fasted	Fasted
Modelo AFS	AS/V 6.1	AS/V 6.1
Peso corporal (kg)	64,72	66,9
Volume de distribuição (L/Kg)	1,56	4,68
Depuração (L/h)	2,65	6,26
T _{1/2} (h)	266,63	163,72
Volume de dose (ml)	200	200

Tabela 8 – Adjuvantes farmacotécnicos presentes na formulação do biolote A.

Matéria-prima	Biolote A (mg/comp.)
Efavirenz	600
Celulose Microcristalina 101	228,0
Celulose Microcristalina 102	0
Lactose Monohidratada (200 mesh)	237,6
Croscarmelose sódica	72,0
Lauril sulfato de sódio	12,0
Estearato de magnésio	12,0
Hidroxipropilcelulose LF	38,4

O perfil da curva de concentração plasmática *versus* tempo e os parâmetros farmacocinéticos preditos comparados aos dados obtidos *in vivo* para o biolote A são apresentados na Figura 26 e Tabela 9.

Segundo Grbic e colaboradores (2011), os parâmetros farmacocinéticos preditos de um comprimido de liberação imediata de glicazida (80 mg), apresentaram uma porcentagem de erro de predição (%EP) menor do que 10%, seguindo as normas de acordo com a FDA presente no guia “*Guidance for Industry Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation, and Application of In Vitro/In Vivo Correlations*”, em que uma boa predição deve apresentar valores quanto a %EP igual ou menor que 10%. Assim, os parâmetros estabelecidos sobre a glicazida foi considerado como um bom modelo para promover a predição de absorção do mesmo. Entretanto, valor de t_{max} foi relativamente alto (18,22%), sendo que para este parâmetro simulado, o cálculo de %EP foi determinado em comparação a um valor de t_{max} médio estimado a partir de uma série de dados observados *in vivo*.

A mesma condição foi apresentada para os parâmetros farmacocinéticos simulados pelo biolote A. A %EP foi menor do que 10% para os parâmetros farmacocinéticos C_{max} e ASC, indicando que este modelo (ASF Opt logD Model SA/V 6.1) promoveu uma boa predição da absorção do lote A com base nos estudos observados *in vivo*. Entretanto, os valores quanto a t_{max} são relativamente altos (24,4%).

Portanto, sugere-se que o alto valor de %EP aos parâmetros farmacocinéticos para o biolote A ocorra em função da variabilidade existente entre os voluntários envolvidos no estudo, já que de acordo com os resultados quanto ao estudo de biodisponibilidade do biolote A, o coeficiente de variação de Pearson variou numa faixa em torno de 34,64.

Tabela 9 – Parâmetros farmacocinéticos observado (Obs) do biolote A e simulados (Sim) do lote A em função do perfil da curva de concentração plasmática *versus* tempo.

Parâmetros	Referência	Biolote A (Obs)	A (Sim)	EP _A (%)
C_{max} (µg/mL)	3,14	2,93	2,81	4,1
t_{max} (h)	3	4,5	3,4	24,4
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	139,42	137,95	131,94	4,3
ASC _{0-∞} (µg.h/mL)	163,28	184,52	188,49	-2,1

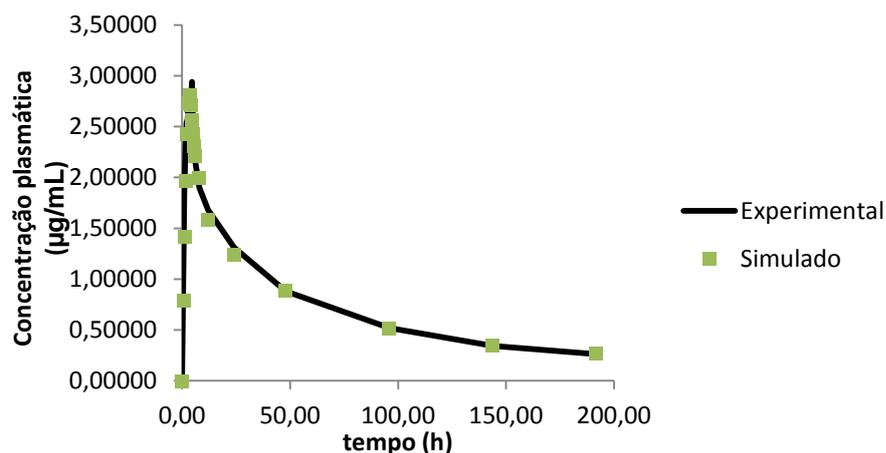


Figura 26 – Perfil da curva de concentração plasmática *versus* tempo experimental (linha contínua) e predito (quadrado) do lote A.

O biolote B apresentou diferenças quanto a sua composição quando comparado ao biolote A. A composição de excipientes e a dose do fármaco presente no biolote B são apresentadas na Tabela 10.

Diferenças quantitativas e qualitativas são presentes na composição da formulação do biolote B em comparação com a composição do biolote A. Para o biolote B com uma dose no valor de 600 mg, a mistura de excipientes é composta por: celulose microcristalina 101 e 102 atuando como desintegrante, lactose monohidratada com sua ação aglutinante e diluente, o estearato de magnésio tendo como função a ação lubrificante. A croscarmelose sódica e o lauril sulfato de sódio foram os excipientes que apresentaram uma quantidade duas vezes maior do que seu limite (5 e 2%) para a composição do comprimido (ROWEL *et al.*, 2009). Além disso, na composição desta formulação o hidroxipropilcelulose esteve ausente. O excesso de croscarmelose sódica presente na formulação do biolote B sugere seu afastamento quanto as características de uma formulação de liberação imediata, já que com uma porcentagem acima de 5% este adjuvante passa a apresentar efeito retardante.

Tabela 10 – Adjuvantes farmacotécnicos presentes na formulação do biolote B.

Matéria-prima	Biolote B (mg/comp.)
Efavirenz	600
Celulose Microcristalina 101	54,90
Celulose Microcristalina 102	55,50
Lactose Monohidratada (200 mesh)	233,10
Croscarmelose sódica	111,00
Laurilsulfato de sódio	44,40
Estearato de magnésio	11,10
Hidroxipropilcelulose LF	0

O perfil da curva de Concentração plasmática *versus* tempo e os parâmetros farmacocinéticos preditos do lote B comparados aos dados obtidos *in vivo* para o biolote B são apresentados na Figura 27 e na Tabela 11.

Em termos do lote B, pode ser visto que a simulação resultou em valores subestimados e superestimados. Portanto, fora dos valores padrões determinados pela FDA. O alto valor da %EP pode estar atribuído ao efeito dos excipientes. O GastroPlusTM sendo um programa derivado de uma relação entre o SCB e as condições fisiológicas, durante a predição da biodisponibilidade, não são considerados efeitos dos adjuvantes farmacotécnicos sobre o ingrediente ativo. Logo, o alto valor quanto a %EP em relação ao biolote B pode estar atribuído a interferência dos excipientes, tornando mais difícil a tarefa de se antecipar os parâmetros farmacocinéticos da formulação estudada.

Tabela 11 – Parâmetros farmacocinéticos observados (Obs) do biolote B e simulados (Sim) do lote B em função do perfil da curva de concentração plasmática *versus* tempo.

Parâmetros	Referência	Biolote B (OBS)	lote B (SIM)	EP _B (%)
C _{max} (µg/mL)	2,34	1,03	0,72	33,09
t _{max} (h)	4,5	4,5	3,8	15,5
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	135,39	65,10	72,09	-10,59
ASC _{0-∞} (µg.h/mL)	99,80	92,86	53,78	42,08

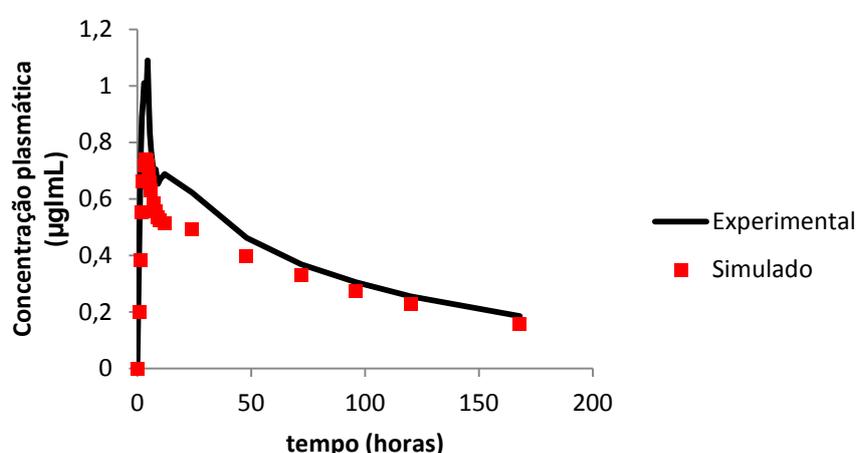


Figura 27 – Perfil da curva de concentração plasmática *versus* tempo experimental (linha contínua) e predito (quadrado) do lote B.

O efavirenz é um composto ativo hidrofóbico com baixa densidade e alta resistência ao fluxo. Logo, propriedades como o tamanho de partícula são de extrema importância no desenvolvimento de formulações para uma distribuição do fármaco de modo efetivo ao longo do trato gastrointestinal, influenciando quanto a sua biodisponibilidade (SATHIGARI *et al.*, 2009; WEI *et al.*, 2008).

Diferenças no tamanho de partícula foram apresentadas para cada lote como mencionado anteriormente (Tabela 4). Um impacto sobre os resultados simulados para cada lote foi observado. O lote A com uma distribuição do tamanho de partícula menor obteve, conseqüentemente, um maior valor quanto

a sua absorção e quanto a sua biodisponibilidade. Por outro lado, o lote B com uma distribuição do tamanho de partícula maior, obteve resultados quanto a sua biodisponibilidade tanto observados *in vivo* quanto simulados fora dos padrões estabelecidos.

A Tabela 12 apresenta a porcentagem de cada fármaco em cada compartimento. A absorção em cada região gerada pelo GastroPlus™ demonstrou que grande parte do efavirenz foi absorvido no jejuno (1 e 2) e o íleo (1). Os resultados da distribuição estão de acordo com os testes de solubilidade do fármaco, indicando que esta propriedade nos compartimentos da parte proximal do intestino decorrente as condições dos parâmetros existentes, não são suficientes para que a absorção do fármaco seja completa. Assim, nas demais regiões (íleo2 e 3, ceco e cólon ascendente), a solubilidade torna-se em condições suficiente para que o fármaco seja completamente dissolvido e, então, alcance a circulação sistêmica.

Assim, a simulação elaborada pelo programa GastroPlus™ foi efetiva para a distribuição do tamanho de partícula e a solubilidade especificada para os lotes A e B, demonstrando mais uma vez que o programa pode auxiliar na busca do desenvolvimento de melhores formulações em função de sua capacidade em simular a biodisponibilidade baseado nas características específicas do fármaco, neste caso, o efavirenz.

Tabela 12 – Porcentagem absorvida dos lotes A e B ao longo dos compartimentos.

Compartimentos	Lote A (%)	Lote B (%)
Estômago	0,0	0,0
Duodeno	7,6	6,0
Jejuno 1	27,5	22,2
Jejuno 2	21,9	17,3
Íleo 1	13,1	10,2
Íleo 2	8,2	6,0
Íleo 3	2,3	1,9
Ceco	9,7	7,8
Cólon ascendente	8,6	14,5

6.4 Correlação *in vitro-in vivo*

A absorção dos fármacos de uma forma de dosagem sólida após uma administração oral depende da liberação do ingrediente ativo, sua dissolução ou solubilização do fármaco sobre as condições fisiológicas, e a permeabilidade através do trato gastrointestinal. Devido a natureza crítica das duas primeiras etapas, a dissolução *in vitro* pode ser relevante na predição da performance *in vivo* (EMAMI, 2006).

Um dos principais pontos quanto ao estabelecimento das CIVIV é estabelecer especificações da dissolução e validar o uso do método para atuar como um substituto em relação aos estudos de biodisponibilidade dos fármacos (EMAMI, 2006).

Casos onde a velocidade de dissolução é dependente da ação de surfactantes, o perfil da curva deconvoluída de concentração plasmática *versus* tempo após administração de lotes do produto com diferentes velocidades de dissolução são correlacionados com os dados de dissolução sobre as mesmas condições de dissolução (EMAMI, 2006).

Assim, para o estabelecimento de uma boa CIVIV, padrões de dissolução rigorosos podem ser necessários para uma isenção *in vivo*. Geralmente, uma metodologia de dissolução, que é capaz em discriminar entre os estudos das formulações com diferentes padrões de liberação e melhor refletir o comportamento *in vivo*. Mudanças durante os testes de dissolução como velocidade de agitação, escolha do apparatus, pH do meio, e temperatura podem alterar o perfil de dissolução. Uma vez desenvolvido um sistema discriminativo, as condições de dissolução devem ser a mesma para todas as formulações testadas no bioestudo para o desenvolvimento da correlação (EMAMI, 2006).

Adicionalmente, a correlação deve apenas ser estabelecida para uma mesma forma de dosagem farmacêutica, com seu mecanismo de liberação particular, com os principais aditivos e excipientes. Uma correlação deve ser considerada real e preditiva unicamente caso as modificações da forma de dosagem permaneçam dentro de certos limites, consistentes com o mecanismo de liberação e excipientes envolvidos (EMAMI, 2006).

Quanto aos estudos de biodisponibilidade, devem ser realizados para caracterizar o perfil da curva de concentração plasmática *versus* tempo, com um número suficiente de indivíduos (6 a 36) com o objetivo de caracterizar adequadamente a performance do produto em estudo (EMAMI, 2006).

Os resultados dos estudos de biodisponibilidade do produto referência podem ser derivados de uma administração intravenosa, oral aquosa ou um produto de liberação imediata. As CIVIVs normalmente são estabelecidas em indivíduos no estado em jejum. Situações em que o fármaco não é tolerado no estado em jejum, a CIVIV pode ser estabelecida no estado alimentado (EMAMI, 2006).

A absorção de determinado composto ativo pode ser influenciada por algumas variáveis entre os indivíduos como, por exemplo, idade, sexo e condição física, sendo necessário eliminá-las ou promover um controle para evitar o comprometimento da CIVIV (EMAMI, 2006).

O perfil de dissolução comparativo entre os biolotes A e B em cada metodologia são apresentadas na Figura 28. Apenas a metodologia estabelecida por Farmanguinhos foi discriminativo ($p < 0,05$) com relação aos dados de dissolução entre os biolotes A e B. O percentual dissolvido de efavirenz no tempo de 60 minutos para o biolote A foi no valor de 87,51%, para o biolote B o valor total do percentual dissolvido no tempo de 60 minutos foi igual a 66,93%. Os dados de dissolução entre os biolotes A e B segundo as metodologias estabelecidas pela Farmacopéia Americana e Brasileira não foram discriminativos ($p > 0,05$). O valor total de percentual dissolvido de efavirenz para os biolotes A e B segundo a Farmacopéia Brasileira foi de 108,4% e 98,91% respectivamente. Para as condições dos estudos segundo a Farmacopéia Americana, o valor total da percentagem dissolvida de efavirenz para os biolotes A e B foi de 104,37% e 91,56% respectivamente.

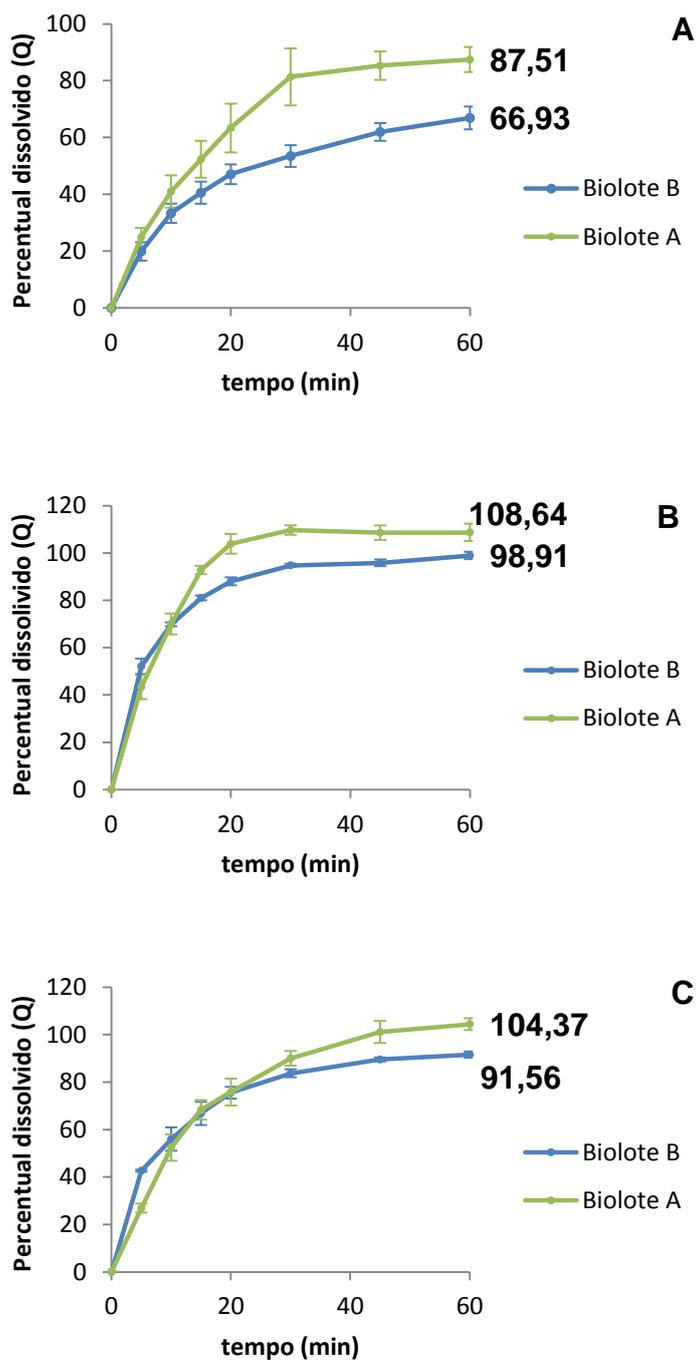


Figura 28 – Comparativo entre os perfis de dissolução dos biolotes A e B elaborados por três metodologias: (A)-Farmanguinhos, (B)-Farmacopéia Brasileira, (C)-Farmacopéia Americana.

O perfil de dissolução comparativo entre as três metodologias são apresentadas na Figura 29. Podemos observar que a maior quantidade de fármaco liberado no tempo total de 60 minutos foi pela metodologia

estabelecida pela Farmacopéia Brasileira (108,64%), seguido pela Farmacopéia Americana (104,37%) e por fim Farmanguinhos (87,51%).

De acordo com as análises estatísticas, as metodologias estabelecidas por Farmanguinhos ($P < 0.0001$) e a Farmacopéia Americana ($P < 0,001$) foram discriminativas em relação à metodologia segundo a Farmacopéia Brasileira. No entanto, essas metodologias não foram estatisticamente significantes.

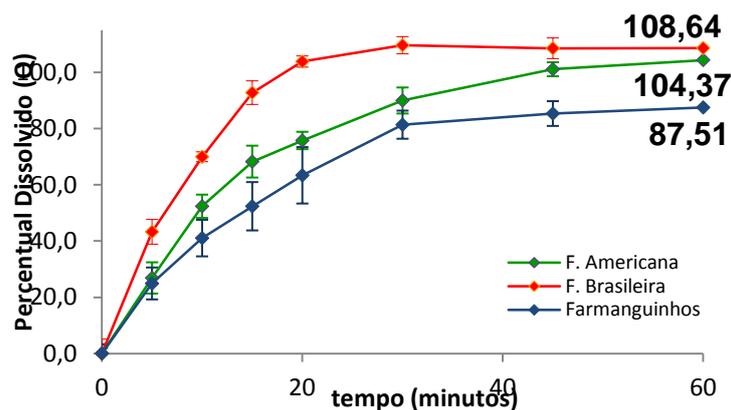


Figura 29 - Perfil de dissolução dos comprimidos do biolote A de efavirenz elaborados por três diferentes metodologias: Farmanguinhos, Farmacopéia Brasileira, Farmacopéia Americana.

Okumu e colaboradores (2008) realizando estudos de dissolução dos comprimidos de montelucaste de sódio em um mesmo meio, mas variando a velocidade de agitação, concluiu que a maior velocidade (100 rpm–88.9%) obteve uma grande quantidade de fármaco liberado do que a menor velocidade de agitação (75 rpm–69,4%). Tal justificativa está atribuída a melhor condição hidrodinâmica fornecida quando agitado a 100 rpm comparado a 75 rpm.

Dentre as metodologias avaliadas, a metodologia segundo a Farmacopéia brasileira foi a que possui uma maior velocidade de agitação. Assim, o resultado do perfil de dissolução comparativo está de acordo com os estudos provenientes da literatura, resultando em diferenças em relação as metodologias de Farmanguinhos e da Farmacopéia americana.

Durante o estabelecimento das CIVIVs, a correlação com o fármaco referência não pode ser realizado, o comprimido foi sujeito aos estudos de dissolução apenas pela metodologia estabelecida por Farmanguinhos. Sendo

assim, como o biolote A foi aprovado quanto aos estudos de bioequivalência então as correlações foram realizadas baseados nos dados *in vivo* derivados do biolote A.

Os parâmetros farmacocinéticos simulados e observados, com seus respectivos coeficientes de correlação segundo o modelo de Wagner-Nelson (1 compartimento) baseados nos dados de dissolução do comprimido de liberação imediata do biolote A do efavirenz são apresentados na Tabela 13.

Os resultados obtidos indicam que as melhores correlações foram diagnosticadas segundo a metodologia de Farmanguinhos com o coeficiente de correlação no valor de 0,85, seguido pela metodologia segundo a Farmacopéia americana (0,83).

Tabela 13 – Coeficiente de correlação e parâmetros farmacocinéticos observados *in vivo* (Biolote A) e simulado segundo Wagner-Nelson, baseado nos perfis de dissolução de três metodologias segundo Farmanguinhos, a Farmacopéia Brasileira e a Farmacopéia Americana.

Biolote A		Farmanguinhos	F. Brasileira	F. Americana
R²		0,85	0,48	0,83
	Observado	2,94	2,94	2,94
C_{max}	Simulado	2,34	1,52	2,29
	EP (%)	20,33	48,2	21,7
ASC_{0-t}	Observado	136,4	136,4	136,4
	Simulado	168,9	73,96	164,2
	EP (%)	-23,83	45,76	-20,38

F - Farmacopéia

Okumu e colaboradores (2008) realizaram um estudo de correlação *in vitro-in vivo* baseados no estudo de dissolução *in vitro* em diferentes condições e o perfil da curva de concentração plasmática *versus* tempo com o fármaco montelucaste de sódio (fármaco pouco solúvel). Os melhores coeficientes de correlação linear foram 0,979 e 0,834.

Podemos atribuir que às metodologias de Farmanguinhos e da Farmacopéia Americana estabelecidas para o comprimido de liberação

imediate do biolote A de efavirenz proporcionaram uma boa correlação com os dados observados *in vivo*.

O perfil da curva de concentração plasmática *versus* tempo baseados no perfil de dissolução desta metodologia foi a que mais se aproximou dos parâmetros farmacocinéticos observados *in vivo* (Figura 30). Podemos observar com relação à concentração plasmática, um lento declínio na medida em que o fármaco é eliminado do organismo. À medida que a concentração do fármaco no plasma diminui a quantidade de fármaco distribuído e eliminado também diminui. Sendo característico de um modelo farmacocinético em que o fármaco é restrito apenas a um compartimento.

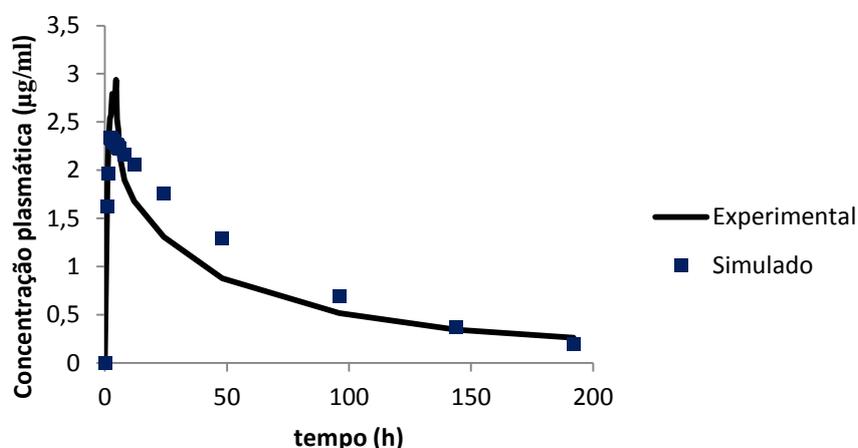


Figura 30 – Perfil da curva de concentração plasmática *versus* tempo experimental (linha contínua) e predito (quadrado) do biolote A pelo modelo de Wagner-Nelson.

Nos estudos de correlação, há um forte indício que as metodologias de Farmanguinhos e a Farmacopéia Americana comportam-se como ideais para os estudos de dissolução com os comprimidos de efavirenz.

Os parâmetros farmacocinéticos simulados e observados, com seus respectivos coeficientes de correlação segundo o modelo de Loo–Riegelman (3 compartimentos) baseados nos dados de dissolução do comprimido de liberação imediata do biolote A de efavirenz é apresentado na Tabela 14.

Os resultados obtidos indicam que as melhores correlações novamente foram diagnosticadas segundo a metodologia de Farmanguinhos com o coeficiente de correlação no valor de 0,83, seguido pela metodologia

estabelecida pela Farmacopéia Americana (0,68). O perfil da curva de concentração plasmática *versus* tempo da metodologia estabelecida por Farmanguinhos é apresentado na Figura 31. Podemos observar uma acentuada queda da concentração plasmática do fármaco, representando a fase de distribuição seguida por declínios mais lentos representados pela fase de eliminação. Estas são resultantes da presença do fármaco nos tecidos que se difundem para o sangue substituindo o que foi eliminado, sendo característico de um modelo multicompartmental.

Tabela 14 – Coeficiente de correlação linear e parâmetros farmacocinéticos observado *in vivo* (biolote A) e simulado segundo o modelo de Loo-Riegelman, baseado nos perfis de dissolução de três metodologias segundo Farmanguinhos, a Farmacopéia Brasileira e a Americana.

Biolote A		Farmanguinhos	F. Brasileira	F. Americana
R²		0,83	0,43	0,68
	Observado	2,94	2,94	2,94
C_{max}	Simulado	4,17	0,28	4,65
	EP (%)	-42,0	90,51	-58,22
	Observado	136,4	136,4	136,4
ASC_{0-t}	Simulado	120,2	-	113,6
	EP (%)	11,8	-	16,76

F - Farmacopéia

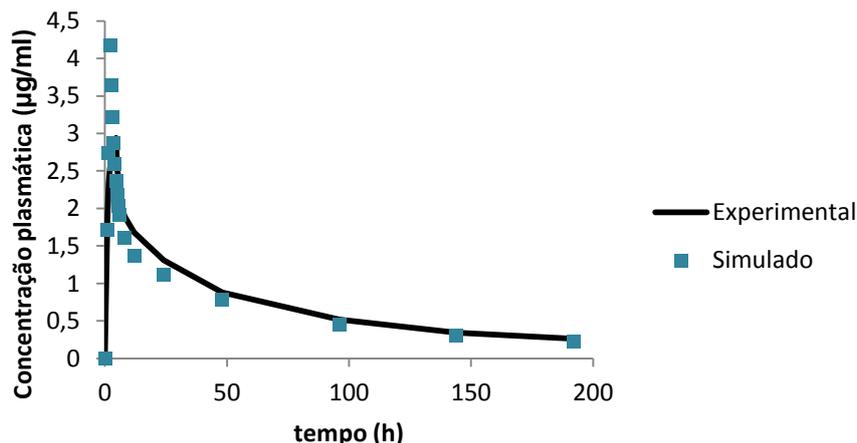


Figura 31 – Perfil da curva de concentração plasmática *versus* tempo experimental (linha contínua) e predito (quadrado) do biolote A pelo modelo compartimental de Loo - Rielgelman.

Para o desenvolvimento das correlações é necessário estimar a absorção *in vivo* ou tempo de dissolução usando técnicas de deconvolução apropriadas como Wagner-Nelson e Loo-Rielgelman.

Ambos os métodos de Wagner-Nelson e Loo-Rielgelman são modelos dependentes. O método estabelecido por Wagner-Nelson é usado para um compartimento, a fração cumulativa de fármaco absorvido em um determinado tempo t é dependente da constante de velocidade de eliminação e os dados quanto a administração intravenosa não são requisitos para a estimativa da absorção (EMAMI, 2006; WAGNER, 1974).

No caso do método Loo-Rielgelman, para determinarmos a quantidade de fármaco absorvido em função do tempo, estimativas de parâmetros como volume de distribuição aparente e a constante da velocidade de eliminação do fármaco no compartimento central são necessários dados da concentração do fármaco após uma administração intravenosa e oral a um mesmo indivíduo (EMAMI, 2006; WAGNER, 1974).

Logo, com o dado de administração intravenosa indisponível, o método de Wagner-Nelson passa ser um modelo atrativo.

Logo, apesar de um maior perfil de dissolução dentre as técnicas em função de sua velocidade de agitação, a metodologia estabelecida pela Farmacopéia Brasileira apresentou o menor valor quanto ao coeficiente de

correlação linear, ou seja, os dados de dissolução *in vitro* não foram diferentes dos valores quanto aos dados de dissolução *in vivo*, sugerindo que as metodologias de Farmanguinhos e da Farmacopéia Americana comportam-se como as metodologias ideais para os estudos de dissolução com os comprimidos de efavirenz, possuindo a capacidade em desenvolver um perfil de dissolução *in vitro* capaz de predizer o perfil da curva de concentração plasmática *versus* tempo semelhante aos resultados provenientes dos estudos observados *in vivo*.

No entanto, diversos estudos de dissolução que utilizaram LSS indicam que um menor percentual do surfactante proporciona maior discriminação entre os medicamentos avaliados (HE *et al.*, 2004; PABLA *et al.*, 2009). Neste trabalho realizado com comprimidos de efavirenz, condições mais brandas de dissolução e, portanto, mais discriminativas, foram observadas principalmente na metodologia de Farmanguinhos, que utiliza LSS 0,5%, ou seja, para os estudos de dissolução de comprimidos de liberação imediata de efavirenz, baseado nos dados de CIVIV segundo Wagner-Nelson e também estudos provenientes da literatura, a metodologia de Farmanguinhos é a mais recomendada.

Os estudos de dissolução são uma ferramenta indispensável nas várias etapas dos processos de desenvolvimento galênico. É de extrema importância a necessidade real de estabelecer o perfil de liberação com objetivo de prever de forma mais eficaz o comportamento *in vivo* das formas farmacêuticas e de seus respectivos compostos ativos em função de suas propriedades físico-químicas (GRBIC *et al.*, 2011; MANADAS *et al.*, 2002).

Entretanto, é importante definir a metodologia de liberação do fármaco que deverá predizer a performance clínica e estabelecer uma CIVIV. Com o modelo de CIVIV validado e, conseqüentemente, o método de dissolução biorelevante identificado, pode-se auxiliar na redução dos números de estudos *in vivo* durante o desenvolvimento das formulações genéricas, sua aprovação pelas agências regulatórias e mudanças pós-aprovação (GRBIC *et al.*, 2011; MANADAS *et al.*, 2002).

No atual projeto, foi elaborado o estudo de dissolução por dispersão com o pó do lote A em diferentes meios (LSS 0,5, 1,0 e 2,0%) com objetivo de

avaliar a capacidade do método em discriminar as diferentes características pertencentes a cada fármaco.

O coeficiente de correlação e os parâmetros farmacocinéticos simulados e observado baseados nos dados da dissolução por dispersão do lote A em função do perfil da curva de concentração plasmática *versus* tempo são apresentados na Tabela 15.

Segundo os dados apresentados, as correlações foram altas em função do valor de cada coeficiente de correlação apesar da diferença entre os perfis de dissolução em cada concentração de LSS (Figura 24). As maiores correlações foram encontradas nas dissoluções de LSS1,0% e 2,0% ($R^2= 0,85$) seguido pela dissolução em LSS 0,5% ($R^2= 0,84$). O perfil da curva de concentração plasmática *versus* tempo predito e observado *in vivo* para o meio de dissolução em LSS1,0% é apresentado na Figura 32.

Tabela 15 – Coeficiente de correlação e parâmetros farmacocinéticos observado *in vivo* e simulado baseado nos perfis de dissolução por dispersão em LSS 0,5, 1,0 e 2,0%.

Lote A		LSS 0,5%	LSS 1,0%	LSS 2,0%
R ²		0,84	0,85	0,85
C _{max}	Observado	2,94	2,94	2,94
	Simulado	2,36	2,34	2,34
	EP (%)	19,73	20,34	20,25
ASC _{0-t}	Observado	136,4	136,4	136,4
	Simulado	170,0	168,9	169,1
	EP (%)	-24,68	-23,86	-23,97

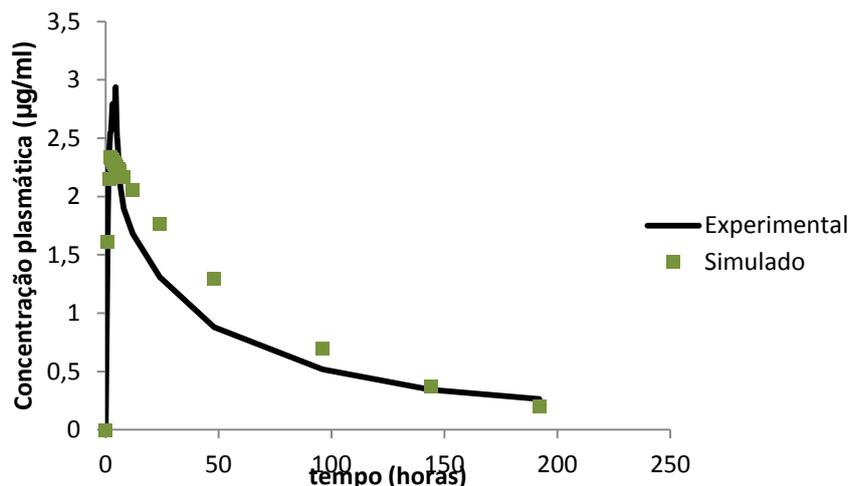


Figura 32 – Perfil da curva de concentração plasmática *versus* tempo observado e simulado a partir dos dados de dissolução por dispersão do lote A em LSS 1%.

Okumu e colaboradores (2009) realizaram uma CIVIV a partir de diferentes meios de dissolução em função do perfil da curva de concentração plasmática *versus* tempo do etoricoxibe (fármaco pouco solúvel). As melhores correlações foram encontradas no fluido gástrico simulado e no fluido intestinal simulado no estado em jejum em um volume de 900 ml, seus coeficientes de correlação foram nos valores 0,899 e 0,898 respectivamente.

Logo, baseado nos resultados de correlação (Tabela 15) podemos sugerir que todos os meios de dissolução (LSS 0,5%, 1,0% e 2,0%) comportam-se como meios de dissolução em condições necessárias para avaliarmos os efeitos das propriedades físico-químicas sobre este fármaco.

No entanto, a metodologia de dissolução por dispersão esta fora dos padrões quanto ao estabelecimento de uma correlação, devido as suas características como sendo voltada apenas na avaliação da matéria-prima, ou seja, a correlação não esta sendo derivada a partir de uma formulação com seus respectivos componentes. Confirmando ilustrativamente que na ausência dos critérios para a determinação de uma correlação, o software não é capaz em discriminar as metodologias empregadas para o desenvolvimento dos estudos de dissolução. Sendo assim, o GastroPlus™ mais uma vez demonstrou sua eficiência quanto a uma de suas funções, neste caso, a CIVIV,

tendo o potencial em discriminar as diferentes metodologias de dissolução do comprimido de efavirenz.

7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A solubilidade e o número de dose dos lotes confirmaram este parâmetro como fator limitante para esse fármaco.

O lote A que apresentou a menor distribuição de tamanho e, conseqüentemente, uma maior área superficial em comparação com o lote B, obteve uma maior solubilização nos meios de dissolução em estudo.

As simulações realizadas para cada lote utilizando o GastroPlusTM determinou diferenças quanto aos parâmetros relacionados com a biodisponibilidade, sendo então o *software* uma importante ferramenta na identificação de diferenças na farmacocinética dos lotes em função de fatores como o tamanho de partícula e a solubilidade.

A CIVIV estabelecida para a dissolução do comprimido para cada biolote sugeriu que as técnicas de dissolução determinadas por Farmanguinhos e a Farmacopéia americana foram as que mais se aproximaram dos valores determinados pelos resultados clínicos. No entanto, por ser uma metodologia mais discriminativa, a metodologia estabelecida por Farmanguinhos pode ser considerada como ideal para os estudos de dissolução dos comprimidos de efavirenz.

A CIVIV baseado em dados provenientes da dissolução por dispersão atribuído aos lotes de efavirenz sugeriu que todos os meios com diferentes concentrações de LSS apresentaram um alto valor quanto ao coeficiente de correlação.

No entanto, esta metodologia esta fora das condições para o estabelecimento de uma boa correlação. Demonstrando ilustrativamente que o software não consegue discriminar os meios de dissolução quando não estão de acordo com os critérios de CIVIV. Sendo um aspecto positivo do programa quanto aos estudos de dissolução na busca do melhor meio que mimetize as condições *in vivo*.

Novas estratégias de formulação podem ser desenvolvidas principalmente para fármacos de classe II utilizando o GastroPlusTM como ferramenta na predição da biodisponibilidade em função dos valores físico-químicos, fisiológicos e de formulação.

Novas CIVIV podem ser desenvolvidas em busca da melhor metodologia de dissolução envolvendo outras formulações com seus respectivos IFA com o auxílio do GastroPlusTM na determinação do melhor método que mimetiza as condições *in vivo* e futuramente sugerir a isenção dos estudos de bioequivalência justificados pelo método *in silico*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Lei nº 9.787, de 10 de Fevereiro de 1999. **Dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências.** Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/482_02re.htm

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - RE nº 482, de 19 de março de 2002. **Dispõe sobre o guia para estudos de correlação In vitro-In vivo (CIVIV).** Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/482_02re.htm

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - RE nº 894, de 29 de maio de 2003. **Guia para protocolo e relatório técnico de estudo de bioequivalência.** Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/894_03re.htm

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - RDC N° 37, de 03 de agosto de 2011. **Dispõe sobre o Guia para isenção e substituição dos estudos de biodisponibilidade relativa/ bioequivalência e dá outras providências.** Disponível em: http://www.bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0037_03_08_2011.html

AGORAM, B.; WOLTOSZ, W.S.; BOLGER, M.B. **Predicting the impact of physiological and biochemical processes on oral drug bioavailability.** Advanced Drug Delivery Reviews. V. 50, p. 41–67, 2001.

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

ANDRADE, J. C. **Química Analítica Básica: Os conceitos ácido-base e a escala de pH.** Chemkeys, p. 1-6, 2010.

ASHFORD, M. O trato gastrointestinal – fisiologia e absorção de fármacos. In: AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas.** 2.ed. Porto Alegre: Artmed, cap. 16, p. 229-244, 2005b.

ASHFORD, M. Biodisponibilidade – fatores físico – químicos e relacionados à forma farmacêutica. In: Aulton, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas.** 2.ed. Porto Alegre: Artmed, cap.17, p. 245- 263, 2005c.

AVDEEF, A. **Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state).** Current Topics in Medicinal Chemistry. V.1, p. 301 – 212, 2000.

AUNGUST, B.J. **P-glycoprotein, secretory transport, and others barriers to the oral delivery of anti-HIV drugs.** *Advanced Drug Delivery Reviews*. V. 39, p. 105 – 116, 1999.

BALIMANE, P.V.; CHONG, S.; MORRISON, R.A. **Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption.** *Journal of pharmacological and toxicological methods*. V. 44, p. 301 – 312, 2000.

BLUME, H.H.; SHUG, B.S. **The biopharmaceutics classification system (BCS): Class III drugs — better candidates for BA/BE waiver?.** *European journal of pharmaceutical sciences*. V. 9, p. 117–121, 1999.

BONAMICI, D. **Sistema de classificação biofarmacêutica e bioisêntes.** São Paulo, 2009. 159p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

BONATE, P.L. **Pharmacokinetics.** *Advanced review*. V. 3, p. 332 -342, 2011.

CHARMAN, W.N.; PORTER, C.J.H.; MITHANI, S.; DRESSMAN, J. **Physicochemical and physiological mechanism for the effects of food on drug absorption: the role of lipids and pH.** *Journal of Pharmaceutical Sciences*. V. 86, p. 269-282, 1997.

CHENG, C.-L.; LAWRENCE, Y.X.; LEE, H.-L.; YANG, C.-Y.; LUE, C.-S.; CHOU, C.-H. **Biowaiver extension potential to BCS Class III high solubility-low permeability drugs: bridging evidence for metformin immediate-release tablet.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. V.22, p. 297–304, 2004.

CLARYSSE, S.; BROUWERS, J.; TACK, J.; ANNAERT, P.; AUGUSTIJNS, P. **Intestinal drug solubility estimation based on simulated intestinal fluids: Comparison with solubility in human intestinal fluids.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. V. 43, p. 260–269, 2011.

COSTA, L.L. **Avaliação do polimorfo de fármacos utilizados para a produção de medicamentos genéticos no Brasil.** Porto Alegre, 2005. 109p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

CUSTODIO, J.M.; WU, C.-Y.; BENET, L.Z. **Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption.** *Advanced Drug Delivery Reviews*. V. 60, p. 717-733, 2008.

DEFERME, S.; ANNAERT, P.; AUGUSTIJNS, P. **in vitro screening models to assess intestinal drugs absorption and metabolism.** In: EHRHARDT, C.; KIM, K.J., eds. *Drug absorptions studies: in situ, in vitro and in silico models*. New York: Springer, p. 182 - 215, 2008.

DESESSO, J.M.; JACOBSON, C.F. **Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats.** Food and Chemical Toxicology. V.39, p. 209 – 228, 2001.

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

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 5ª ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

FLACH, A.O.P.; DALLA COSTA, T. **Avaliação dos critérios de isenção de estudos de bioequivalência in vivo para medicamentos orais em forma farmacêutica sólida de liberação imediata.** Caderno de Farmácia. V. 15, p. 49-58, 1999.

GAO, J.Z.; HUSSAIN, M.A.; MOTHERAM, R.; GRAY, D.A.B.; BENEDEK, I.H.; FISKE, W.D.; DOLL, W.J.; SANDEFER, E.; PAGE, R.C.; DIGENTS, G.A. **Investigation of Human Pharmacoscintigraphic Behavior of Two Tablets and a Capsule Formulation of a High Dose, Poorly Water Soluble/Highly Permeable Drug (Efavirenz).** Journal of Pharmaceutical Sciences. V. 96, p. 2970-2977, 2007.

GIBALDI, M. **Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics.** 4 ed. Philadelphia: Lea & Febier, 1991. 406p.

GRBIC, S.; PAROJCIC, J.; IBRIC, S.; DJURIC, Z. **In Vitro–In Vivo Correlation for Gliclazide Immediate-Release Tablets Based on Mechanistic Absorption Simulation.** Pharmaceutical Science Technology. V. 12, p. 165-171, 2011.

HE, Z.; ZHONG, D.; CHEN, X.; LIU, X.; TANG, X.; ZHAO, L. **Development of medium for nimodipine tablets based on bioavailability evaluation.** European Journal of Pharmaceutical Sciences. V.21, p.487-491, 2004.

HORTER, D.; DRESSMAN, J.; B. **Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract.** Advanced Drug Delivery Reviews. V. 46, p. 75-87, 2001.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM FÁRMACOS. Monografia n. CAP-017/02 - Efavirenz 600mg COM. REV. Rio de Janeiro: Farmanguinhos, 2009.

JACKSON, K.; YOUNG, D.; PANT, S. **Drug–excipient interactions and their affect on absorption.** PSTT. V. 3, p. 336-345, 2000.

JIANG, W.; KIM, S.; ZHANG, X.; LIONBERGER, R.A.; DAVIT, B.M. CONNER, D.P.; YU, L.X. **The role of predictive biopharmaceutical modeling and simulation in drug development and regulatory evaluation.** International Journal of Pharmaceutics. V. 418, p. 151– 160, 2011.

JINNO, J.; KAMADA, N.; MIYAKE, M.; YAMADA, K.; MUKAI, T.; ODOMI, M.; TOGUCHI, H.; LIVERSIDGE, G.;G.; HIGAKI, K.; KIMURA, T. **Effect of particle size reduction on dissolution and oral absorption of a poorly water-soluble drug, cilostazol, in beagle dogs.** Journal of Controlled Release. V.111, p. 56 – 64, 2006.

KALÁSZ, H.; ANTAL, I. **Drug excipients.** Current medicinal chemistry. V. 13, p.2535 – 2563, 2006.

KORTEJARVI, H.; YLIPERTTULA, M.; URTTI A. **Pharmacokinetic simulation of biowaiver criteria: The effects of gastric emptying, dissolution, absorption and elimination rates.** European journal of pharmaceutical sciences. V. 30, p. 155–166, 2007.

KOVACEVIC, I.; PAROJCIC, J.; HOMSEK, I.; TUBIC-GROZDANIS, M.; LANGGTH, P. **Justification of Biowaiver for Carbamazepine, a Low Soluble High Permeable Compound, in Solid Dosage Forms Based on IVIVC and Gastrointestinal Simulation.** Molecular pharmaceuticals. V.6, p. 40–47, 2008.

KRÄMER, S.D. **Absorption prediction from physicochemical parameters.** PSTT. V. 9, P. 373-380, 1999.

LEHTO, P.; KORTEJARVI, H.; LIIMATAINEN, A.; OJAKA, K.; KANGAS, H.; HIRVONEN, J.; TANNINEN, V.P.; PELTONEN, L. **Use of conventional surfactant media as surrogates for FaSSIF in simulating in vivo dissolution of BCS class II drugs.** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. V. 78, p. 1 – 8, 2011.

LENNERNAS, H.; ABRAHAMSSON, B. **The use of biopharmaceutic classification of drug discovery and development: current status and future extension.** Journal of pharmacy and pharmacology. V. 57, p. 273-285. 2005.

LI, S.; HE, H.; PARTHIBAN, L.J.; YIN, H.; SERAJUDDIN, A.T.M. **IV-IVC Considerations in the Development of Immediate-Release Oral Dosage Form.** Journal of pharmaceutical sciences. V. 94, p. 1396 – 1417, 2005.

LÖBENBERG, R., AMIDON, G. L. **Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards.** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. V. 50, p. 3-12, 2000.

MANADAS, R.; PINA, M.; E.; VEIGA, F. **A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. V. 38, p. 375 – 399, 2002.

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

MASAOKA, Y.; TANAKA, Y.; KATAOKA, M.; SAKUMA, S., YAMASHITA, S. **Site of drug absorption after oral administration: assessment of membrane permeability and luminal concentration of drugs in each segment of gastrointestinal tract.** European Journal of Pharmaceutical Sciences. V. 29, p. 240 – 250, 2006.

METSUGI, Y.; MIYAJI, Y.; OGAWARA, K.-I.; HIGAKI, K.; KIMURA, T. **Appearance of double peaks in plasma concentration-time profile after oral administration depends on gastric emptying profile and weight function.** Pharmaceutical research. V. 25, p. 886-895, 2008.

MOYLE, G. Efavirenz: **shifting the HAART paradigm in adult HIV-1 infection.** Expert Opinion on Investigational Drugs. V.8, p. 473-486, 1999.

OKUMU, A.; DIMASO, M.; LOBENBERG, R. **Dynamic Dissolution Testing To Establish In Vitro/In Vivo Correlations for Montelukast Sodium, a Poorly Soluble Drug.** Pharmaceutical Research. V. 25, p. 2778 – 2785, 2008.

OKUMU, A.; DIMASO, M.; LOBENBERG, R. **Computer simulations using GastroPlus™ to justify a biowaiver for etoricoxib solid oral drug products.** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. V. 72, p. 91 – 98, 2009.

PABLA, D.; AKHLAGHI, F.; ZIA, H. **A comparative pH-dissolution profile study of selected commercial levothyroxine products using inductively coupled plasma mass spectrometry.** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. V. 72, p.105-110, 2009.

PANCHAGNULA, R.; THOMAS, N.S. **Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research.** International Journal of Pharmaceutics. V. 201, p. 131-150, 2000.

PREVIDELLO, B.A.F.; CARVALHO, F.R.; TESSARO, A.L.; SOUZA, V.R. **O pKa de indicadores ácido-base e os efeitos de sistemas coloidais.** Química Nova. V. 29, p. 600-606, 2006.

RABEL, S.R.; MAURIN, M.B., ROWE, S.M.; HUSSAIN, M. **Determination of the pK, and pH-Solubility Behavior of an Ionizable Cyclic Carbamate, (S)-6-Chloro-4-(cyclopropylethynyl)-1, 4- dihydro-4-(trifluoromethyl)-2H-3,1-benzoxazin-2-one (DMP 266).** Pharmaceutical Development and Technology. V.1, p. 91-95, 1996.

RAW, A.S.; FURNESS, M.S.; GILL, D.S.; ADAMS, R.C.; HOLCOMBE, F.O.; YU, L.X. **Regulatory considerations of pharmaceutical solid polymorphism in abbreviated new drug applications (ANDAs).** Advanced Drug Delivery Reviews. V. 56, p. 397-414, 2004.

REKIC, D.; RÖSHAMMAR, D.; MUKONZO, J.; ASHTON, M. **Prediction of efavirenz and rifampicin drug–drug interaction considering weight and**

CYP2B6 phenotype. British Journal of Clinical Pharmacology. V. 71, p. 536-543, 2010.

ROWEL, R.C.; SHESKEY, P.J.; QUINN, M.E. **Handbook of pharmaceutical excipients.** 6 ed., London, 2009.

SATHIGARI, S.; CHADHA, G.; LEE, Y-H.P.; WRIGHT, N., PARSONS, D.L.; RANGARI, V.K.; FASINA, O.; BABU, J. **Physicochemical Characterization of Efavirenz Cyclodextrin Inclusion Complexes.** Pharmaceutical Science & Technology. V. 10, p. 81-87, 2009.

SIMULATIONS PLUS, Manual GastroPlus™, California, EUA, 2010.

SINGLA, N., GUPTA, G.D., KOHLI, K., SINGLA, A.K. **A Discriminatory and Biorelevant Dissolution Test Method for Simvastatin Drug Products.** p. 11-13, 2009.

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

STEGEMANN, S.; LEVEILLER, F.; FRANCHI, DE JONG, H.; LINDÉN H. **When poor solubility becomes an issue: From early stage to proof of concept.** European Journal of Pharmaceutical Sciences. V. 31, p. 249 – 261, 2007.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. **Biofarmacotécnica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. Cap. 18, p. 188 – 203.

TAO, S.; L.; DESAI, T.; A. **Gastrointestinal patch systems for oral drug delivery.** Drug discovery today. V.3, p. 909 – 915, 2005.

TERSTAPPEN, G. C.; REGGIANI A. **In silico research in drug discovery.** Pharmacological sciences. V. 22, p. 23-26, 2006.

TOLLER, A.B.; SCHMIDT, C.A. **Excipientes à base de celulose e lactose para compressão direta.** Ciências da Saúde. V. 6, p. 61 - 80, 2005.

TRAN, H.T.T.; TRAN, P.H.L.; LEE, B.-J. **New findings on melatonin absorption and alterations by pharmaceutical excipients using the uising chamber technique with mounted rat gastrointestinal segments.** International Journal of Pharmaceutics. V. 378, p. 9-16, 2009.

TUBIC, M.; WAGNER, D.; SPAHN-LANGGUTH, H.; BOLGER, M.B.; LANGGUTH, P. **In Silico Modeling of Non-Linear Drug Absorption for the P-gp Substrate Talinolol and of Consequences for the Resulting Pharmacodynamic Effect.** Pharmaceutical Research. V. 23, p. 1712-1720, 2006.

UNITED STATES. Department of health and Human Services. Food and Drug Administration. **Guidance for industry: Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation, and Application of In Vitro/In Vivo Correlations**, Rockville: FDA, p.1 – 21, 1997.

UNITED STATES. Department of health and Human Services. Food and Drug Administration. **Guidance for industry: Waiver of in vivo BA and BE studies for immediate release solid oral dosage forms containing certain active moieties/ active ingredient based on BCS**, Rockville: FDA, p. 1-13, 2000.

UNITED STATES. Department of health and Human Services. Food and Drug Administration. **Guidance for industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products — General Considerations**. Rockville: FDA, p. 1-21, 2003.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). 34^a Ed. Rockivalle: U.S.P. Convention, 2011.

VROUENRAETS S.M, WIT, F.W., VAN TONGEREN, J. Efavirenz: a review. Expert Opin Pharmacother. V. 8, p. 851-857, 2007.

WAGNER, J.G. **Application of the Wagner-Nelson Absorption Method to the Two-Compartment Open Model**. Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics, V. 2, p. 469 - 486, 1974.

WEI, H.; LOBENBERG R. **Biorelevant dissolution media as a predictive tool for glyburide a class II drug**. European journal of pharmaceutical sciences. V. 29, p. 45–52, 2006.

YU, X.L; AMIDON, G.L.; POLLI, E.J.; ZHAO, H.; MEHTA, M.U.; CONNER, P.D.; SHAH, P.V.; LESKO, J.L.; CHEN, M.; LEE, L.H.V.; HUSSAIN. S.A. **Biopharmaceutics Classification System: The Scientific Basis for Biowaiver Extensions**. Pharmaceutical Research. V.19, p. 921-925, 2002.