



**Cátia Alexandra Ramos Patrício**

Licenciada em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

**Validação do Método Analítico de Dissolução,  
para a quantificação de Hidroclorotiazida em  
Comprimidos Telmisartan/Hidroclorotiazida,  
por HPLC, para o cálculo do Fator de  
Similaridade**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia  
Química e Bioquímica

Orientador: Dra. Adriana Leite, Sofarimex, Portugal  
Co-orientador Prof. Dr. Mário Eusébio, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Pedro Miguel Calado Simões,  
Arguente: Dr. Fausto Miguel Lameira da Cunha Piriquito  
Vogal: Dr.<sup>a</sup> Adriana da Silva Leite



**Cátia Alexandra Ramos Patrício**

Licenciada em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

**Validação do Método Analítico de Dissolução,  
para a quantificação de Hidroclorotiazida em  
Comprimidos Telmisartan/Hidroclorotiazida,  
por HPLC, para o cálculo do Fator de  
Similaridade**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia  
Química e Bioquímica

Orientador: Dra. Adriana Leite, Sofarimex  
Co-orientador Prof. Dr. Mário Eusébio, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Pedro Miguel Calado Simões,  
Arguente: Dr. Fausto Miguel Lameira da Cunha Piriquito  
Vogal: Dr.<sup>a</sup> Adriana da Silva Leite



**Validação do Método Analítico de Dissolução, para a quantificação de Hidroclorotiazida em Comprimidos Telmisartan/Hidroclorotiazida, por HPLC, para o cálculo do Fator de Similaridade**

Copyright © Cátia Alexandra Ramos Patrício, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## Agradecimentos

---

Gostaria de agradecer ao esforço conjunto da Sofarimex S.A (Grupo Azevedos) e da FCT-UNL por terem possibilitado a realização do presente trabalho. Desde conhecimentos adquiridos, aos equipamentos disponibilizados, tudo ajudou no meu crescimento pessoal, académico e profissional.

À Dra. Adriana Leite um especial agradecimento pelo tempo dispensado a transmitir conhecimentos e práticas tanto laboratoriais como profissionais, por toda a paciência nos momentos mais stressantes e por todo o apoio dado.

Ao professor Mário Eusébio, agradeço toda a disponibilidade e confiança depositada em mim que em muito me ajudou a prosseguir este percurso e atingir esta meta.

Às minhas recentes amigas do DID, que todos os dias dispensaram do seu tempo para me ajudar, ensinar e ouvir. Os dias no laboratório sempre foram mais divertidos graças a vocês.

À minha nova amiga Mafalda um sentido agradecimento, por toda a ajuda, incentivo, amizade, camaradagem e vivacidade que me transmitiu durante estes 6 meses.

Ao Christopher, à Rita e ao Elói por nunca se fartarem de mim e fazerem parte de todo este percurso.

Como não poderia deixar de ser, às minhas amigas de infância, Sara e Carol, que me têm acompanhado sempre para todo o lado. Sem a vossa companhia e especial amizade nada disto fazia sentido.

Ao Diogo, um especial agradecimento por toda a ajuda que me deu e acima de tudo pela paciência que tem em aturar-me nos momentos mais stressantes. Por toda a amizade, amor e tranquilidade que me tem dado.

E como os últimos são os primeiros, aos meus pais um enorme obrigada por toda a amizade, dedicação, ensinamentos e paciência em aturar-me ao longo destes anos. Sempre tão perseverantes em relação a mim.



Os medicamentos genéricos desempenham um papel determinante na diminuição de custos nos cuidados de saúde para a população, uma vez que não incluem no preço as despesas de investigação e desenvolvimento, podendo assim apresentar preços significativamente mais baixos que os medicamentos inovadores.

O presente trabalho está inserido num projeto em desenvolvimento da farmacêutica Sofarimex e tem como objetivo a **validação de um método analítico de dissolução** que permita quantificar, por cromatografia líquida de alta eficiência, a substância ativa hidroclorotiazida em ensaios de dissolução, com vista a ser utilizado no desenvolvimento de um medicamento genérico de uma associação de Telmisartan/Hidroclorotiazida em comprimidos. Pretende-se também **avaliar a similaridade *in vitro*** entre os lotes do medicamento teste e de referência (Micardis Plus®), a fim de escolher o lote teste mais adequado para o estudo de bioequivalência *in vivo*.

Foram avaliados os parâmetros de especificidade, linearidade (gama de trabalho), precisão (repetibilidade e precisão intermédia) e exatidão e verificada a similaridade entre os lotes através do cálculo do fator de similaridade ( $f_2$ ).

O método é válido uma vez que: foi considerado específico; é linear entre as concentrações 2,78 e 16,67 ( $\mu\text{m/L}$ ), correspondentes a 20%-120% da concentração de trabalho; a repetibilidade e precisão intermédia, têm valores de RSD que cumprem os critérios de aceitação; e a exatidão apresenta, para cada nível de concentração, percentagens de recuperação do ativo dentro dos limites de 95-105%.

Os resultados demonstram que apenas existe **similaridade** entre os produtos nos meios de dissolução pH 1,2 e pH 4,5. No entanto, uma vez que o passo limitante da absorção da hidroclorotiazida não é a dissolução, os resultados indicam que mesmo assim a formulação teste poderá ser bioequivalente à formulação de referência.

**Palavras-Chaves:** Bioequivalência, Hidroclorotiazida, Dissolução, Validação, HPLC



Generic drugs play a key role in reducing the costs with health care for the general population, since their price does not include research and development costs. These drugs therefore have significantly lower prices than innovate medicines.

This work falls within the scope of a project being developed by the pharmaceutical Sofarimex and aims to validate an analytical method to quantify, by HPLC, the active substance hydrochlorothiazide, in tests of dissolution profiles, which will be used in developing the generic drug Telmisartan/Hydrochlorothiazide (tablet). It also intends to evaluate the *in vitro* similarity between batches of the drug test and the reference product (Micardis Plus®) in order to choose the most suitable lot for the study of bioequivalence (*in vivo*).

The parameters evaluated are specificity, linearity (working range), precision (repeatability and intermediate precision) and accuracy. Similarity between batches was verified by calculating the similarity factor ( $f_2$ )

The method is valid due to the following reasons: it was considered specific; linear in concentrations between 2,78 and 16,67 ( $\mu\text{m/L}$ ), corresponding to 20%-120% of the concentration of the work; intermediate precision and repeatability have RSD values below acceptance criteria; and accuracy shows, for each level of concentration, that the percentage of active substance recovery is within the range of 95 – 105%.

The results show that there is only similarity between the products in dissolution media pH 1,2 and pH 4,5. However, since the limiting step in the absorption of hydrochlorothiazide is not dissolution, the results indicate that the test formulation may be bioequivalente to the reference formulation.

**Keywords:** Bioequivalence, Hydrochlorothiazide, Dissolution, Validation, HPLC



1.	Enquadramento e Objetivo.....	1
2.	Grupo Azevedos.....	3
2.1	Sofarimex .....	3
3.	Revisão Teórica.....	5
3.1	Medicamentos Genéricos.....	5
3.1.1	Genéricos na União Europeia .....	5
3.1.2	Genéricos em Portugal.....	6
3.2	Biodisponibilidade e Bioequivalência .....	6
3.3	Medicamentos Genéricos na prevenção da hipertensão.....	8
3.3.1	Hidroclorotiazida.....	8
3.4	Testes de Dissolução .....	10
3.4.1	Princípio do método de dissolução .....	11
3.4.2	Evolução e Fundamentos da Dissolução .....	12
3.4.3	Desenvolvimento de um método dissolução.....	14
3.4.4	Perfis de Dissolução.....	15
3.4.5	Equipamento de Dissolução.....	17
3.5	Fatores que interferem na Dissolução .....	19
3.5.1	Fatores associados com as propriedades físico-químicas do fármaco .....	19
3.5.2	Fatores relacionados com o ensaio de dissolução .....	23
3.5.3	Fatores relacionados com a Forma Farmacêutica.....	25
3.6	Sistema de Classificação Biofarmacêutica .....	25
3.7	Métodos cromatográficos .....	26
3.7.1	Método de análise de amostras .....	26
3.7.2	Cromatografia.....	26
3.8	Validação do método analítico .....	28
3.8.1	Especificidade .....	29
3.8.2	Gama de trabalho.....	30
3.8.3	Linearidade.....	30
3.8.4	Precisão.....	30
3.8.5	Exatidão.....	31

3.8.6	Estabilidade das soluções .....	31
4.	Metodologia experimental .....	33
4.1	Composição da Formulação teste.....	34
4.2	Reagentes .....	34
4.3	Materiais .....	34
4.4	Equipamentos.....	35
4.5	Métodos .....	35
4.5.1	Método de Dissolução .....	35
4.5.2	Método de Doseamento .....	40
4.5.3	Validação do Método Analítico para os estudos dos Perfis de Dissolução .....	42
5.	Apresentação e Discussão de Resultados .....	45
5.1	Resultados da Validação do método analítico .....	45
5.1.1	Especificidade .....	45
5.1.2	Linearidade e Gama de Trabalho.....	47
5.1.3	Precisão.....	49
5.1.4	Exatidão.....	51
5.1.5	Estabilidade das soluções .....	52
5.2	Resultados da Comparação de Perfis de Dissolução.....	53
5.2.1	Meio de dissolução: HCl 0,1N pH 1,2 .....	53
5.2.2	Meio de Dissolução: Tampão Acetato pH 4,5 .....	56
5.2.3	Meio de Dissolução: Tampão Fosfato de Potássio pH 6,8 .....	60
6.	Conclusão.....	67
	Referências Bibliográficas .....	69

## Índice de Figuras

Figura 2.1 - Distribuição das diferentes formas de produto .....	4
Figura 3.1 - Estrutura química da Hidroclorotiazida [23].....	9
Figura 3.2 - Representação do comprimido TEL/HCTZ [32] .....	10
Figura 3.3 - Diagrama ilustrativo do processo de dissolução do fármaco [78] .....	12
Figura 3.4 - Aparelho de Dissolução com cestos de rede (dimensão em mm) [51].....	19
Figura 3.5 - Representação do Equipamento HPLC .....	27
Figura 4.1 - Balança Micro Analítica onde se efetuam as pesagens dos padrões.....	37
Figura 4.2 - Fase da recolha das amostras do aparelho de dissolução, ao longo dos tempos e respetiva filtragem .....	37
Figura 4.3 - Fase de diluição das amostras dos vários tempos de recolha.....	38
Figura 4.4 - Comprimidos pulverizados .....	41
Figura 4.5 - Amostras a serem centrifugadas .....	41
Figura 5.1 - Cromatograma Correspondente à Fase Móvel .....	45
Figura 5.2 - Cromatograma Correspondente ao Meio de Dissolução de HCTZ pH 1,2 .....	45
Figura 5.3 - Cromatograma Correspondente ao Solvente A .....	46
Figura 5.4 - Cromatograma Correspondente à Solução Placebo.....	46
Figura 5.5 - Cromatograma Correspondente à Solução Padrão 80/25 mg TEL/HCTZ pH 1,2 ..	46
Figura 5.6 - Cromatograma Correspondente à Solução Amostra 80/25 mg TEL/HCTZ pH 1,2	47
Figura 5.7 - Reta de Calibração da Hidroclorotiazida .....	48
Figura 5.8 - Distribuição Residual .....	48
Figura 5.9 - Perfil de Dissolução HCTZ pH 1,2 dos três lotes teste e o de referência (80/25 mg TEL/HCTZ) .....	54
Figura 5.10 - Perfil de Dissolução HCTZ pH 1,2 dos três lotes teste e o de referência (80/12,5 mg TEL/HCTZ) .....	55
Figura 5.11 - Perfil de Dissolução HCTZ pH 1,2 dos três lotes teste e o de referência (40/12,5 mg TEL/HCTZ) .....	56
Figura 5.12 - Perfil de Dissolução HCTZ pH 4,5 dos três lotes teste e o de referência (80/25 mg TEL/HCTZ) .....	57
Figura 5.13 - Perfil de Dissolução HCTZ pH 4,5 dos três lotes teste e o de referência (80/12,5 mg TEL/HCTZ) .....	58
Figura 5.14 - Perfil de Dissolução HCTZ pH 4,5 dos três lotes teste e o de referência (40/12,5 mg TEL/HCTZ) .....	60
Figura 5.15 - Perfil de Dissolução HCTZ pH 6,8 dos três lotes teste e o de referência (80/25 mg TEL/HCTZ) .....	61
Figura 5.16 - Perfil de Dissolução HCTZ pH 6,8 dos três lotes teste e o de referência (80/12,5 mg TEL/HCTZ) .....	62
Figura 5.17 - Perfil de Dissolução HCTZ pH 6,8 dos três lotes teste e o de referência (40/12,5 mg TEL/HCTZ) .....	64



## Índice de Tabelas

Tabela 3.1 - Solubilidade das substâncias [51].....	20
Tabela 3.2 - Excipientes utilizados na formulação do medicamento teste e de referência .....	22
Tabela 3.3 - Valores Médios de pH em Humanos Saudáveis em Jejum/Após Alimentação ao longo do Trato Gastrointestinal [60] .....	23
Tabela 3.4 - Sistema de Classificação Biofarmacêutica [35] .....	25
Tabela 3.5 - Procedimentos necessários para a validação de um método analítico [81].....	29
Tabela 4.1 - Lotes analisados neste estudo .....	33
Tabela 4.2 - Composição do Comprimido TEL/HCTZ .....	34
Tabela 4.3 - Condições experimentais do ensaio de dissolução .....	35
Tabela 4.4 - Modo de preparação dos Meios de Dissolução .....	38
Tabela 4.5 - Gradiente das Fases Móveis A e B e respetivo fluxo (ml/min) .....	39
Tabela 4.6 - Gradiente Fase Móvel.....	41
Tabela 4.7 - Níveis de Concentração para o estudo da Linearidade (formulação 80/25 mg TEL/HCTZ) .....	42
Tabela 4.8 - Níveis de Concentração para o Estudo de Exatidão .....	44
Tabela 5.1 - Concentração do Padrão e respetiva Resposta .....	47
Tabela 5.2 - Resultados do ensaio de Linearidade (80/25mg TEL/HCTZ).....	48
Tabela 5.3 - Resultados obtidos no ensaio de Repetibilidade do Equipamento .....	49
Tabela 5.4 - Repetibilidade do Método para 80/25mg TEL/HCTZ.....	50
Tabela 5.5 - Repetibilidade do Método para 40/12,5 mg TEL/HCTZ.....	50
Tabela 5.6 - Precisão Intermédia do ensaio para 80/25mg TEL/HCTZ.....	51
Tabela 5.7 - Precisão Intermédia do ensaio para 40/12,5mg TEL/HCTZ.....	51
Tabela 5.8 - Resultados para o ensaio de Exatidão .....	52
Tabela 5.9 - Resumo dos resultados obtidos para o ensaio de estabilidade da Hidroclorotiazida .....	52
Tabela 5.10 - Valores médios de % Dissolvida de HCTZ na dosagem de 80/25 mg, em pH 1,2 .....	54
Tabela 5.11 - Valores médios de % Dissolvida de HCTZ na dosagem 80/12,5 mg em pH 1,2 .	55
Tabela 5.12 - Valores médios de % Dissolvida de HCTZ na dosagem de 40/12,5 mg em pH 1,2; .....	56
Tabela 5.13 - Valores médios de % Dissolvida de HCTZ na dosagem 80/25 mg em pH 4,5 ....	57
Tabela 5.14 - Determinação do fator de similaridade 80/25 mg (TEL/HCTZ), pH 4,5.....	57
Tabela 5.15 - Valores médios de % Dissolvida de HCTZ na dosagem 80/12,5 mg em pH 4,5 .	58
Tabela 5.16 - Valores médios de % Dissolvida de HCTZ na dosagem de 40/12,5 mg em pH 4,5; .....	59
Tabela 5.17 - Determinação do fator de similaridade 40/12,5 mg (TEL/HCTZ), pH 4,5.....	60
Tabela 5.18 - Valores médios de % Dissolvida de HCTZ na dosagem de 80/25 mg em pH 6,8; .....	61
Tabela 5.19 - Determinação do fator de similaridade 80/25 mg (TEL/HCTZ), pH 6,8.....	61

Tabela 5.20 - Valores médios de % Dissolvida de HCTZ na dosagem de 80/12,5 mg em pH 6,8; .....	62
Tabela 5.21 - Determinação do fator de similaridade 80/12,5 mg (TEL/HCTZ), pH 6,8.....	63
Tabela 5.22 - Valores médios de % Dissolvida de HCTZ na dosagem de 40/12,5 mg em pH 6,8; .....	63
Tabela 5.23 - Determinação do fator de similaridade 40/12,5 mg (TEL/HCTZ) – pH 6,8.....	64

## Índice de equações

---

Equação 3.1 .....	13
Equação 3.2 .....	13
Equação 3.3 .....	13
Equação 3.4 .....	13
Equação 3.5 .....	14
Equação 3.6 Fator de diferença .....	16
Equação 3.7 Fator de Similaridade .....	17
Equação 3.8 Equação Henderson-Hasselback .....	20
Equação 3.9 .....	31
Equação 4.1 % Dissolvida.....	39
Equação 4.2 .....	42



## Abreviaturas e Símbolos

---

<b>AIM</b>	Autorização de Introdução no Mercado
<b>API</b>	<i>Active Pharmaceutical Ingredient</i> / Substância Ativa
<b>BCS</b>	<i>Biopharmaceutics Classification System</i> /Sistema de Classificação Biofarmacêutica
<b>BD/BE</b>	Biodisponibilidade/Bioequivalência
<b>CIVIV</b>	Correlação <i>in vitro</i> – <i>in vivo</i>
<b>DP</b>	Desvio Padrão
<b>EMA</b>	<i>European Medicines Agency</i> /Agência Europeia de Medicamentos
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>HCTZ</b>	Hidroclorotiazida
<b>HPLC</b>	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i> / Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>I&amp;D</b>	Investigação e Desenvolvimento
<b>ICH</b>	<i>International Conference on Harmonization</i>
<b>RAS</b>	Sistema Renina Angiotensina
<b>RSD</b>	<i>Relative Standard Deviation</i> /Desvio Padrão Relativo
<b>RSD</b>	Relative Standard Deviation/Desvio Padrão Relativo
<b>SFX</b>	Sofarimex
<b>TEL</b>	Telmisartan
<b>TGI</b>	Trato Gastrointestinal
<b>TR</b>	Tempo de Retenção
<b>USP</b>	<i>United States Pharmacopeia</i> /Farmacopeia dos Estados Unidos



# 1. ENQUADRAMENTO E OBJETIVO

---

A substância ativa em estudo, hidroclorotiazida, está presente na formulação do medicamento genérico, baseado no medicamento de referência Micardis Plus®. Este é um medicamento que visa o tratamento da hipertensão arterial, uma das principais doenças que afetam a população mundial.

Um genérico é um medicamento idêntico, ou bioequivalente, a um medicamento inovador, em relação à forma farmacêutica (comprimido, cápsulas, suspensões orais, entre outros), segurança, dosagem, via de administração, qualidade, eficácia e propósito [1]. Atualmente cerca de metade dos medicamentos no mercado podem ser substituídos por um produto genérico [2]. A sua principal vantagem reside no preço reduzido a que são comercializados. Tal é possível uma vez que, os genéricos não implicam custos de investigação e desenvolvimento tão elevados, pois são desenvolvidos com base nas formulações de produtos inovadores cujas patentes expiraram e não precisam de demonstrar a eficácia clínica [3].

Com o aumento da disponibilidade e uso de medicamentos genéricos a comunidade científica é confrontada com uma crescente variedade de produtos, relativamente aos quais se torna necessário estudar a sua bioequivalência face aos produtos inovadores [4]. Os ensaios de biodisponibilidade e bioequivalência (BD/BE) são realizados em indivíduos saudáveis, e são uma ferramenta fundamental na avaliação de um medicamento genérico, uma vez que demonstram a sua equivalência em relação ao medicamento de referência. De acordo com o INFARMED, dois medicamentos são bioequivalentes se são equivalentes farmacêuticos e se as suas biodisponibilidades, após a administração na mesma dose molar, são tão semelhantes que os seus efeitos, tanto no que diz respeito à sua eficácia como à sua segurança, serão essencialmente os mesmos [5].

São realizados testes de dissolução *in vitro* antes de submeter os fármacos a um estudo de BD/BE, pois a partir destes consegue-se fazer uma previsão do desempenho *in vivo* do fármaco, e são um indicador da disponibilidade fisiológica do mesmo [6].

O objetivo da presente dissertação subdivide-se pelos seguintes pontos:

- 1) Validar um método analítico de dissolução** que permita quantificar, por cromatografia líquida de alta eficiência, a substância ativa hidroclorotiazida em ensaios dissolução de múltiplos pontos, com vista a ser utilizado no desenvolvimento do medicamento genérico de Telmisartan + Hidroclorotiazida na forma de comprimido.
- 2) Estudar os perfis de dissolução** de três lotes teste e de um lote do medicamento de referência Micardis Plus® para cada uma das dosagens de TEL/HCTZ (80/25 mg, 80/12,5 mg e 40/12,5 mg), em diferentes meios de dissolução de forma a avaliar a consistência e homogeneidade dos lotes produzidos.
- 3) Avaliar a similaridade *in vitro*** entre os lotes do medicamento teste e o de referência para cada uma das dosagens em estudo e nos diferentes meios de dissolução.

**4) Escolha do lote** da maior dosagem (80/25 mg TEL/HCTZ) para ser utilizado num **estudo *in vivo*** (estudo de bioequivalência)

Não obstante o facto de o comprimido ter presente as duas substâncias ativas, devido às diferenças existentes entre elas, não é possível quantificar simultaneamente ambas as moléculas, pelo que a validação e os respetivos estudos de dissolução têm de ser feitos separadamente.

O método utilizado e a validar está descrito na farmacopeia dos Estados Unidos (USP). Os parâmetros considerados durante a validação são a especificidade, linearidade (gama de trabalho), precisão (repetibilidade e precisão intermédia) e exatidão, que são avaliados segundo a norma "*Validation of analytical procedures: Definitions and Terminology*". Foi ainda avaliada a estabilidade da substância ativa em estudo, a fim de determinar as condições ideais de armazenamento das soluções e o tempo máximo em que estas podem ser armazenadas até serem analisadas sem que haja degradação das mesmas.

## 2. GRUPO AZEVEDOS

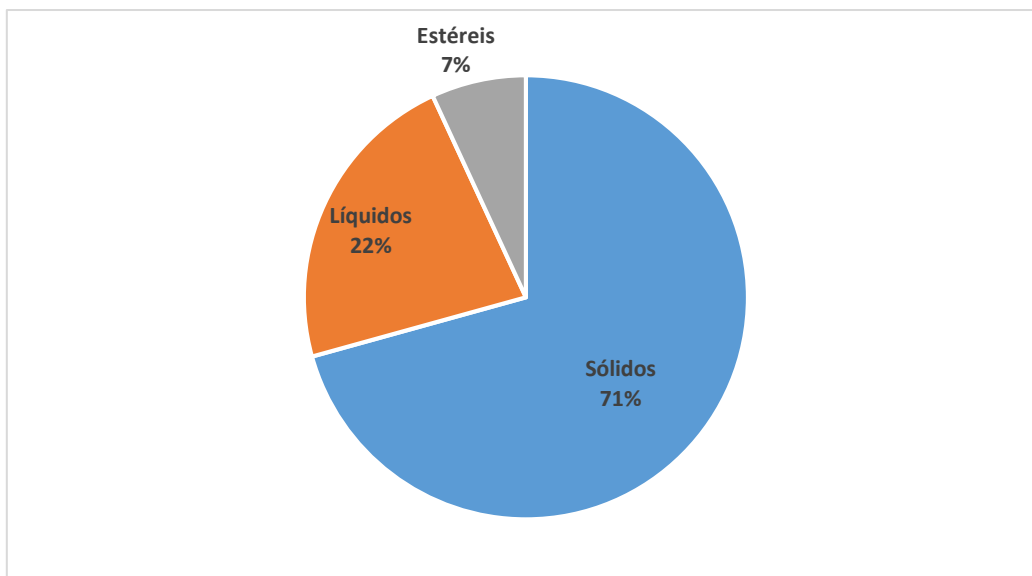
---

A existência dos Azevedos já conta com mais de dois séculos com uma trajetória totalmente dedicada ao serviço da medicina. Desde o início da década de 90 que os Azevedos procuram a internacionalização como um objetivo estratégico para o seu desenvolvimento e a sua presença estende-se em mais de 40 mercados internacionais: Europa, Médio Oriente, África, Ásia e todo o continente americano.

Um passo determinante para a evolução do Grupo Azevedos foi o seu compromisso em I&D. O resultado da investigação e desenvolvimento contínuo de conhecimentos permite explorar novas oportunidades. Esta área relevante de intervenção resulta em encontrar novas perspetivas, um caminho que permite uma melhoria constante em produtos e serviços com a marca Azevedos. Dos marcos mais importantes do grupo Azevedos conta-se com o aparecimento do primeiro medicamento em Portugal e a participação no prémio nobel da medicina atribuído ao professor Egas Moniz.

### 2.1 Sofarimex

Como opção de estratégia, a atividade foi dividida em segmentos, com vista à produção de um grupo de empresas e unidades funcionais correspondentes de uma forma especializada e com elevados padrões de competitividade. Inaugurada em 1994, a Sofarimex é uma empresa do Grupo Azevedos que se dedica ao fabrico de produtos farmacêuticos, constituída inicialmente com 60% do capital social pertencente aos Laboratórios Azevedos, e 40% pertencente ao grupo francês Sanofi – Aventis. Dotada de um nível tecnológico avançado, a Sofarimex é especialista na produção farmacêutica de pequenas e médias séries à escala europeia. Esta fábrica possui grande flexibilidade produtiva produzindo várias formas farmacêuticas nomeadamente, sólidos (pós, granulados, comprimidos, comprimidos revestidos, drageias e cápsulas), líquidos (xaropes, soluções, suspensões e solutos), pastosos (pomadas e cremes) e estéreis (líquidos de pequeno volume preparados assepticamente e liofilizados). A Sofarimex foi inicialmente criada para uma capacidade total de 30 milhões de unidades de produto acabado a um turno. Assim, a Sofarimex consegue responder a novas necessidades do mercado sem se alterar os conceitos base da sua conceção, uma vez que para tal basta alargar o período de funcionamento da fábrica e/ou substituir os atuais equipamentos por outros de maior capacidade produtiva. A enorme flexibilidade de produção possibilita o fabrico de inúmeras dimensões de lotes em todas as formas, de mais de 650 produtos diferentes, distribuídos da seguinte maneira (Figura 2.1):



**Figura 2.1 - Distribuição das diferentes formas de produto**

A organização da fábrica possui uma estrutura extremamente especializada, pois dispõe de um elevado número de licenciados e mestres nas diferentes funções chave da empresa. Essa estrutura é sustentada por um sistema integrado de gestão e informação.

A conceção das instalações, infraestruturas e a organização do sistema integrado de Gestão, permitem todas elas assegurar uma produção farmacêutica no cumprimento do Guia para o Bom Fabrico de Medicamentos (EUDRALEX Volume 4) e restante legislação aplicável.

É também um objetivo para a empresa, através da enumeração de potenciais focos de poluição, prevenir atempadamente os seus efeitos adversos e tomar as necessárias medidas corretivas.

São realizadas inspeções periódicas por parte das entidades oficiais de saúde e da indústria. A sua atividade está sujeita à supervisão da Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P (INFARMED) que certifica o cumprimento das Boas Práticas de Fabrico e autoriza o fabrico de medicamentos para o uso humano e da Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) que autentica o cumprimento das Boas Práticas de Fabrico e autoriza o fabrico de medicamentos veterinários.

As demais autorizações são geridas de acordo com os procedimentos internos:

- SG01, Controlo dos documentos;
- SG02, Controlo de requisitos legais e outros documentos de origem exterior (Qualidade, Ambiente, Segurança)

Sendo sujeitas a avaliação periódica da conformidade legal.

## 3. REVISÃO TEÓRICA

---

### 3.1 Medicamentos Genéricos

A grande maioria dos países Europeus pretendem assegurar níveis de cuidados de saúde mínimos e ao alcance de toda a população. O envelhecimento da população é um dos maiores desafios sociais e económicos na Europa, resultante da baixa taxa de natalidade. O aparecimento de doenças crónicas, nomeadamente doenças cardiovasculares, diabetes e asma, está diretamente relacionado com o envelhecimento da população. Por outro lado, a crise económica que se faz sentir por toda a Europa tem um efeito significativo no crescimento da despesa farmacêutica, o qual implica também uma urgência em retificar esta situação. Perante este cenário, onde a procura de medicamentos e cuidados de saúde é cada vez maior e há necessidade de diminuir a despesa farmacêutica, a Europa precisa de encontrar soluções eficazes, que permitam fazer frente a estes obstáculos [7].

Assim, o aparecimento de medicamentos genéricos surge como recurso aos desafios que são mencionados acima. Os genéricos desempenham um papel na diminuição de custos em cuidados de saúde para a população, pois não incorporam no preço as despesas de investigação e desenvolvimento, sendo que por isso apresentam preços significativamente mais baixos do que os medicamentos inovadores. Por outro lado, a legislação obriga a que no momento em que os medicamentos genéricos chegam ao mercado, estes tenham de ser 20-35% mais baratos que o medicamento original, aumentando a competição no mercado farmacêutico [8].

Apesar da produção constante de novos produtos, tem-se assistido também a um aumento de patentes em fase de expiração, o que implica o aparecimento de mais medicamentos genéricos [7,9].

#### 3.1.1 Genéricos na União Europeia

Segundo a diretiva 2004/27/CE do parlamento Europeu e do Conselho de 31 de Março de 2004 medicamento genérico é definido como “um medicamento com a mesma composição qualitativa e quantitativa em substâncias ativas, a mesma forma farmacêutica que o medicamento de referência e cuja bioequivalência com este último tenha sido demonstrada por estudos adequados de biodisponibilidade. Os diferentes sais, ésteres, éteres, isómeros, misturas de isómeros, complexos ou derivados de uma substância ativa são considerados uma mesma substância ativa, a menos que difiram significativamente em propriedades relacionadas com a segurança e/ou eficácia, caso em que o requerente deve fornecer dados suplementares destinados a fornecer provas da segurança e/ou da eficácia dos vários sais, ésteres ou derivados de uma substância ativa autorizada. As diferentes formas farmacêuticas orais de libertação imediata são consideradas como uma mesma forma farmacêutica. O requerente pode ser

dispensado de apresentação dos estudos de biodisponibilidade, se puder demonstrar que o medicamento genérico satisfaz os critérios pertinentes definidos nas diretrizes pormenorizadas na matéria [10].”

### **3.1.2 Genéricos em Portugal**

O Decreto-Lei n.º176/2006, de 30 de Agosto transpõe esta definição para o contexto nacional, definindo medicamento genérico como “ um medicamento com a mesma composição qualitativa e quantitativa em substâncias ativas, a mesma forma farmacêutica e cuja bioequivalência com o medicamento de referência haja sido demonstrada por estudos de biodisponibilidade apropriados”. O mesmo decreto de lei no artigo 19º, explica que medicamentos genéricos podem ser comercializados se [11]:

- a) 10 anos após a autorização inicial do medicamento de referência, concedida a nível nacional ou comunitário;
- b) 11 anos após a autorização inicial do medicamento de referência, caso, nos primeiros oito dos 10 anos, o titular da autorização de introdução no mercado do medicamento de referência tenha obtido uma autorização para uma ou mais indicações terapêuticas novas que, na avaliação científica prévia à sua autorização, se considere trazerem um benefício clínico significativo face às terapêuticas até aí existentes.

É definido como medicamento de referência (ou inovador) “medicamento que foi autorizado com base em documentação completa, incluindo resultados de ensaios farmacêuticos, pré-clínicos e clínicos” [11]. Os medicamentos de referência são habitualmente inovadores para um determinado efeito terapêutico, estes têm elevados custos de investimento por parte da indústria farmacêutica. Desta forma, estes medicamentos devem beneficiar da proteção intelectual através de patentes e certificados complementares de proteção, durante um longo período de tempo, normalmente 20 anos, em que comercializam o medicamento em exclusividade [12].

Para que um medicamento seja comercializado em Portugal é necessário que o INFARMED, I.P., a Agência Europeia do Medicamento (EMA) e a Comissão Europeia (CE) conceda uma Autorização de Introdução no Mercado (AIM) [3].

## **3.2 Biodisponibilidade e Bioequivalência**

Os ensaios e conceitos de biodisponibilidade e bioequivalência são alvo de grande importância pois, demonstram a equivalência entre o medicamento genérico e o medicamento de referência. A Autorização de Introdução de um medicamento genérico no mercado (AIM) só é aprovada quando os parâmetros farmacocinéticos,  $C_{máx}$  e AUC do medicamento genérico são equiparáveis aos do medicamento de referência e os resultados dos estudos de bioequivalência forem demonstrados com sucesso. Para além disso, tem que se demonstrar que os excipientes bem como o processo de produção não influenciam negativamente a segurança e a eficácia do

produto, e tem que haver uma relação positiva de risco-benefício. Pode ser considerado que os estudos de biodisponibilidade são inúmeras vezes a base da aprovação da AIM [12,13].

A **biodisponibilidade** é um termo farmacocinético que define a quantidade e velocidade com que a substância ativa é absorvida no trato gastrointestinal e se torna disponível no local de ação, por comparação à forma farmacêutica de referência. Para que esta consiga ser absorvida, existem três fases importantes: a desagregação da forma farmacêutica; a dissolução do fármaco nos fluidos biológicos do local de absorção e a absorção do fármaco através das membranas do TGI. A dissolução do fármaco é considerado o parâmetro mais sensível *in vitro* que se correlaciona com a biodisponibilidade, uma vez que antes de ser absorvido este tem de ser dissolvido na solução e a velocidade a que a substância se dissolve muitas vezes determina a quantidade e/ou a velocidade da absorção [4].

Quando se verifica que dois medicamentos apresentam a mesma biodisponibilidade no organismo, então a sua eficácia clínica é considerada semelhante. A biodisponibilidade é determinada por parâmetros farmacocinéticos calculados a partir da área sob a curva de concentração plasmática vs tempo (AUC), pico de concentração plasmática ( $C_{max}$ ) e, o tempo para se atingir a concentração plasmática máxima ( $T_{max}$ ) [12].

A **bioequivalência** permite comparar a biodisponibilidade entre o medicamento de referência e o medicamento genérico e assegurar que, quando administrada a mesma dosagem, estes são equivalentes a nível terapêutico [12]. Dois produtos que contêm a mesma substância ativa são considerados bioequivalentes se forem equivalentes farmacêuticos (se contiverem a mesma quantidade da mesma substância ativa na mesma forma farmacêutica) ou alternativos farmacêuticos (se contiverem diferentes sais, ésteres, éteres, isómeros, misturas de isómeros, complexos ou derivados ou que difiram na forma farmacêutica ou dosagem) e que apresentem a mesma biodisponibilidade [14].

## **Substituição de medicamentos de referência por genéricos**

Existem algumas dúvidas em relação à substituição dos medicamentos de referência por genéricos, quando se tratam de medicamentos com baixo índice terapêutico (limite entre a dose ideal de ação e a dose tóxica). Basta que exista uma ligeira diferença na concentração deste tipo de medicamentos, para ter um impacto significativo na segurança e na eficácia, exemplos desse tipo de medicamentos são os antiarrítmicos, antiepiléticos, imunossuppressores. Neste tipo de situações deve haver uma maior supervisão no controlo da quantidade de substância no sangue e/ou da resposta terapêutica.

Apesar disso, quando se inicia um tratamento os critérios de bioequivalência garantem que grande parte dos genéricos são terapêuticamente equivalentes. Excluindo o facto de se tratar de um medicamento de dose crítica, o grande motivo para optar pelo medicamento de referência ou

o genérico passa pela questão do genérico praticar preços mais baixos, e para além disso pode existir uma preferência por parte do doente na escolha do medicamento [12].

Foi estudado e publicado por Kesselheim et al., que a utilização de medicamentos genéricos no tratamento de doenças é favorável e eficaz [15].

### **3.3 Medicamentos Genéricos na prevenção da hipertensão**

#### **Hipertensão**

Estima-se que um bilião da população mundial sofre de hipertensão, sendo que existe uma maior prevalência desta doença na Europa [16]. Cerca de dois terços da população são tratados incorretamente e quando a hipertensão não é controlada e tratada pode aumentar o risco de doenças cardiovasculares, nomeadamente o enfarte do miocárdio, provocar a insuficiência cardíaca, AVC e doenças renais. A hipertensão é então uma das maiores causas da mortalidade humana. Este facto, levou ao desenvolvimento de medicamentos com características de vasodilatadores cada vez mais complexos e específicos [16-18]. Quando o tratamento da hipertensão não é eficaz, normalmente o que se faz é aumentar a dosagem do agente hipertensivo, ou adicionar outra substância ativa ou mudar de agente terapêutico [17]. Em muitos casos, a falta de capacidade de conseguir baixar a pressão arterial pode ser atribuído ao uso de monoterapia anti-hipertensiva [19].

Desta forma, para o tratamento da hipertensão é cada vez mais recorrente a utilização da associação de diferentes classes de anti-hipertensores. O crescente interesse no desenvolvimento de combinações de duas ou mais substâncias ativas (API), numa única forma de dosagem deve-se ao facto da terapia de combinação incitar a utilização de dosagens menores, evitar o contacto direto das duas substâncias incompatíveis e assim maximizar a eficácia [20]. O medicamento em estudo trata-se da associação de um anti hipertensor (Telmisartan) com um diurético (Hidroclorotiazida), que por serem duas substâncias incompatíveis são formuladas num comprimido bicamada, para minimizar o contacto entre as substâncias. Apesar do medicamento ser constituído por duas substâncias ativas, o presente trabalho vai-se focar exclusivamente na hidroclorotiazida.

#### **3.3.1 Hidroclorotiazida**

A Hidroclorotiazida é um medicamento pertence à classe de medicamentos denominados de diuréticos, destinado ao tratamento da hipertensão arterial, quer isoladamente ou em associação com outros fármacos anti-hipertensivos. Pode ainda ser utilizado no tratamento dos edemas de origem cardíaca, renal e hepática [21].

## Propriedades Físico Químicas

A Hidroclorotiazida designada quimicamente por 6-Cloro-1,1-dioxi-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiazina-7-sulfonamida, tem como fórmula molecular  $C_7H_8ClN_3O_4S_2$  e massa molecular correspondente de 297,74 g/mol. Na figura seguinte encontra-se representada a sua estrutura química [22].

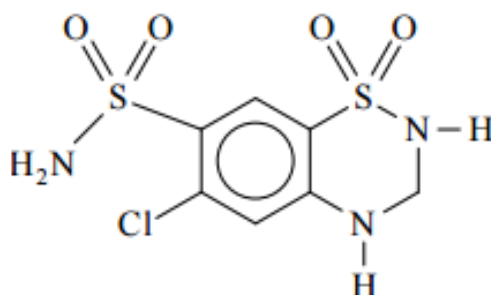


Figura 3.1 - Estrutura química da Hidroclorotiazida [23]

A Hidroclorotiazida apresenta-se como um pó cristalino branco ou quase branco livre de contaminantes visíveis, praticamente inodoro e não tem centros assimétricos. Apresenta uma densidade de  $1,693 \text{ g/cm}^3$  com um ponto de fusão que varia entre  $273\text{-}275 \text{ }^\circ\text{C}$ . Em relação à solubilidade, a hidroclorotiazida é pouco solúvel em água ( $722 \text{ mg/L}$  a  $25^\circ\text{C}$ ), é ligeiramente solúvel em etanol (96%) e em acetona. Dissolve-se em soluções diluídas de hidróxidos alcalinos. A HCTZ é insolúvel em éter, clorofórmio e ácidos minerais diluídos. A molécula de hidroclorotiazida apresenta duas constantes de dissociação,  $pK_{a1} = 8,6$  e  $pK_{a2} = 9,9$  e um coeficiente de partição LogP (octanol / água) de  $-0,07$  [22, 24, 25].

## Propriedades Farmacocinéticas

Após a administração oral, a HCTZ apresenta uma biodisponibilidade de cerca de 70%. O pico das concentrações plasmáticas é, normalmente, observado ao fim de 2 a 5 horas. A semi-vida de eliminação é de, aproximadamente, 6-8 horas com uma função renal normal. A taxa de ligação às proteínas plasmáticas da hidroclorotiazida é de 64% e o volume de distribuição relativo é de 0,5 a  $1,1 \text{ l/kg}$  [26]

### Mecanismo de ação

#### Diuréticos tiazídicos

Os diuréticos tiazídicos são muito utilizados no tratamento da hipertensão sendo a hidroclorotiazida um exemplo de substância que pertence a este grupo. Estudos feitos têm demonstrado que a hidroclorotiazida pode reduzir a mortalidade causada pela hipertensão, quer seja utilizada isoladamente (monodosagem) ou em combinação com outra substância ativa,

como por exemplo com substâncias com um comportamento de  $\beta$ -bloqueador, com inibidores de enzimas conversoras da angiotensina, com antagonistas do cálcio e com antagonistas dos recetores da angiotensina, nomeadamente o telmisartan [27]. O mecanismo do efeito anti-hipertensor dos diuréticos tiazídicos não é totalmente conhecido. No entanto, sabe-se que as tiazidas interferem com os mecanismos tubulares renais de reabsorção dos eletrólitos, aumentando diretamente a excreção de sódio e de cloro em quantidades aproximadamente equivalentes, e conseqüentemente de água [21, 28, 29].

A ação diurética direta da hidroclorotiazida reduz o volume plasmático e este facto origina a ativação do sistema renina angiotensina (RAS) que aumenta a secreção da aldosterona, com aumentos conseqüentes de potássio urinário. Com o aumento dos níveis de angiotensina II, provocados pela ligação da renina-aldosterona, causam a vasoconstrição e promovem a retenção de água e sódio, que são efeitos que se opõem diretamente ao objetivo dos anti hipertensivos do diurético [28, 30, 31].

### **Telmisartan/Hidroclorotiazida comprimido**

Devido aos efeitos descritos dos tratamentos com hidroclorotiazida em monoterapia, justifica a sua associação a outro tipo de anti-hipertensores. Desta forma, a associação à substância ativa telmisartan, que se trata de um antagonista dos recetores de angiotensina II, para além de reduzir a pressão arterial pelo seu mecanismo próprio, tende igualmente a reverter a perda de potássio associado aos diuréticos tiazídicos [28]. Foi também observado em estudos que a tolerância do antagonista do recetor de angiotensina II não é afetada pela associação de tiazidas em baixas dosagens [17].

Em suma, a associação das substâncias ativas telmisartan e hidroclorotiazida, têm um efeito aditivo que permite uma maior redução da pressão arterial face à que se conseguiria atingir se se tomasse cada um dos medicamentos isoladamente, sendo bastante eficazes no tratamento da hipertensão [17].



Figura 3.2 - Representação do comprimido TEL/HCTZ [32]

## **3.4 Testes de Dissolução**

A utilização de formas farmacêuticas orais em comprimidos ou cápsulas é a forma mais recorrente para o tratamento eficiente de doenças [33]. Após a toma oral do medicamento, a

absorção do fármaco depende da libertação do mesmo a partir da sua forma farmacêutica, da dissolução ou solubilização da substância ativa nos fluidos biológicos sob determinadas condições fisiológicas e da permeabilidade da substância ao longo do trato gastrointestinal [34]. Face à natureza crítica das duas primeiras etapas, os testes de dissolução são importantes pois permitem prever o comportamento que a substância terá quando for administrada *in vivo* [34]. Os testes de dissolução são assim uma ferramenta importante na monitorização dos processos de fabrico, como controlo de qualidade e também para avaliar a consistência entre vários lotes do mesmo produto [14,35-37]. Estes testes começaram a ser desenvolvidos para fármacos contidos em formas farmacêuticas sólidas de uso oral de libertação imediata, mais concretamente para comprimidos e cápsulas. Atualmente, também é possível através destes testes avaliar a libertação de fármacos a partir de outras formas farmacêuticas sólidas, semissólidas, suspensões, aerossóis e em formas de libertação imediata [38].

Para medicamentos de libertação imediata, existem três tipos de ensaios de dissolução [34]:

- I. Ensaio de dissolução de um único ponto:  
Serve como teste de rotina para o controlo de qualidade (para produtos com elevada solubilidade e que se dissolvem rapidamente).
- II. Ensaio de dissolução de dois pontos:  
Caracteriza a qualidade do produto e como teste de rotina para determinados produtos.
- III. Comparação de perfis de dissolução (múltiplos pontos) para avaliação da semelhança de produtos diferentes, para isentar de estudos *in vivo* dosagens mais baixas de um produto de desenvolvimento ou para isentar de estudo *in vivo* algumas classes de medicamentos (é explicado com mais detalhe no ponto 3.4.4).

Os testes de dissolução são bastante vantajosos, na medida em que reduzem os custos e o trabalho associados ao desenvolvimento de um produto farmacêutico, permitem em casos particulares que os produtos sejam aprovados sem estudos de BD/BE, como é o caso de medicamentos de classe I (alta solubilidade e permeabilidade) e em dosagens mais baixas (desde que cumpram todos os critérios da *guideline*) de medicamentos onde foi comprovada a bioequivalência através de um estudo de BD/BE na dosagem maior ou nas dosagens críticas [39,40].

### **3.4.1 Princípio do método de dissolução**

Os testes de dissolução determinam a quantidade acumulada de fármaco que entra no meio envolvente em função do tempo. Tal como é observado na Figura 3.3 a dissolução de uma forma farmacêutica envolve pelo menos dois passos consecutivos: libertação do soluto ou da substância da matriz de formulação (desagregação), seguido da dissolução do medicamento (solubilização das partículas do fármaco) no meio de dissolução [41].

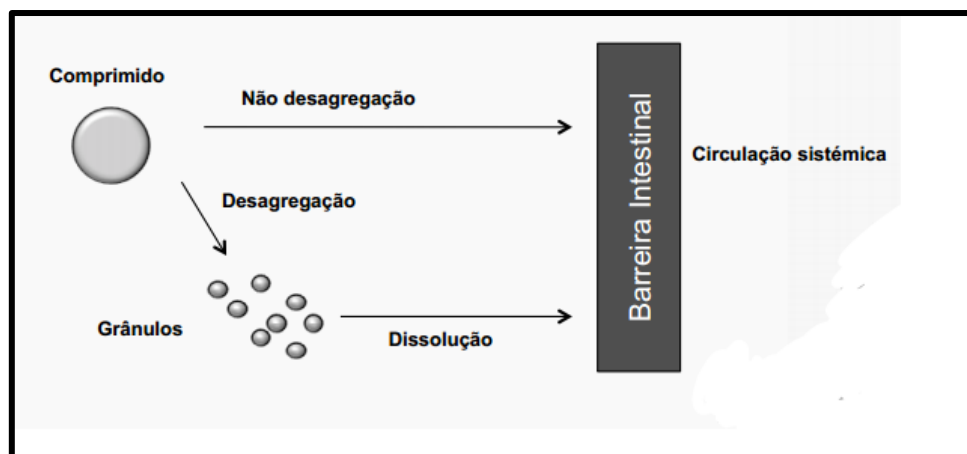


Figura 3.3 - Diagrama ilustrativo do processo de dissolução do fármaco [78]

A velocidade da dissolução é dependente do passo mais lento. A desagregação (primeiro passo) pode ser comprometida devido às propriedades coesivas do medicamento formulado, pois no caso de formas farmacêuticas sólidas, as propriedades de desagregação determinam se esta será a fase limitante da velocidade de dissolução. Se se verificar que esta primeira fase é o passo limitante da dissolução, deverá ser controlada a fase de desagregação da forma farmacêutica, e poderão ser avaliados aspetos relacionados com a formulação, como por exemplo o impacto da força de compressão, a porosidade, a utilização de excipientes lubrificantes, a inclusão de mais desagregantes, tensioativos entre outros. As propriedades físico químicas do fármaco, tais como a sua forma química (exemplo: sal, ácido livre, base livre) e forma física (exemplo: amorfa ou cristalina, tamanho da partícula) podem comprometer a dissolução (segundo passo), onde existe a solubilização das partículas da substância farmacêutica. Se este for o passo limitante então a dissolução é controlada pela dissolução intrínseca, caso que acontece por exemplo, em compostos menos solúveis [41].

### 3.4.2 Evolução e Fundamentos da Dissolução

Durante o último século foram feitas muitas pesquisas em torno do desenvolvimento e do conhecimento mais profundo sobre a dissolução, que se verificou ter um papel tão importante na previsão da biodisponibilidade de medicamentos.

Numa primeira fase a dissolução consiste na interação entre o soluto e as moléculas do solvente e numa segunda fase existe a difusão das moléculas mais externas do soluto no meio envolvente através da camada de difusão [42].

Nas primeiras experiências realizadas em 1897 por Noyes e Whitney, observaram e deduziram uma expressão matemática que determinava a velocidade de dissolução de uma substância. Concluíram, que a velocidade de dissolução ( $\frac{dC}{dt}$ ) é proporcional à diferença entre a concentração de saturação do fármaco no meio ( $C_s$ ) e a concentração do fármaco num momento  $t$  ( $C$ ). Essa expressão é representada da seguinte maneira [43]:

**Equação 3.1**

$$\frac{dC}{dt} = k(C_s - C)$$

Sendo que K é uma constante.

Estes autores atribuíram o mecanismo de dissolução das moléculas a uma fina camada que se forma em torno das partículas, através da qual estas se difundem para o meio envolvente, denominado de modelo da camada de difusão.

Em 1900 Brunner e Tolloczko acrescentaram novas condições para as quais a equação é válida demonstrando que, a velocidade de dissolução depende da área de superfície da partícula exposta, da velocidade de agitação, temperatura, da estrutura de superfície e da disposição do equipamento [43]. Isto poderá observar-se a partir da Equação 3.2:

**Equação 3.2**

$$\frac{dC}{dt} = K_1 S (C_s - C)$$

Sendo que S é a área de superfície e K uma constante.

Entre vários métodos e várias descobertas uma delas, foi a introdução de condições mais realistas que utilizassem por exemplo, fluidos gástricos que permitissem simular a desagregação [43].

Em 1904 após mais avanços e estudos na área, a Equação 3.2 foi alterada e baseada no conceito da camada de difusão da segunda lei de Fick, sendo que foram introduzidos novos parâmetros, tais como o coeficiente de difusão (D), a superfície (S), a espessura da camada de difusão (h) e o volume do meio de dissolução (V), expresso na Equação 3.3 [43].

**Equação 3.3**

$$\frac{dC}{dt} = \frac{D S}{V h} (C_s - C)$$

A teoria da velocidade de dissolução, expressa na Equação 3.3 é a mais aceita no meio científico. No entanto, a velocidade de dissolução pode ser relacionada com a massa inicial da substância e a massa que fica por dissolver em função do tempo. Hixon e Crowell desenvolveram a equação Equação 3.4 que expressa a superfície do soluto em massa e assumiram que uma parte da massa da substância inicial dissolve-se para o meio envolvente e a partícula vai diminuindo o seu tamanho ao longo do tempo [43].

**Equação 3.4**

$$dw = \frac{DS}{Vh} C_s dt$$

Ao integrar a Equação 3.4 obtém-se a Equação 3.5 conhecida por lei da raiz cubica, que relaciona a massa inicial da substância e a que fica por se dissolver, em função do tempo. Em que  $m w_0$  é a massa inicial e  $K_2$  é uma constante.

$$\text{Equação 3.5} \\ m w_0^{1/3} - m w^{1/3} = K_2 t$$

Em 1951 Edwards publica que no caso da aspirina comprimido a dissolução no ambiente gástrico seria o passo limitante da velocidade de absorção. Desde 1960 até ao início de 1970, foram realizados inúmeros estudos de forma a demonstrar o efeito que a dissolução tem na biodisponibilidade, para uma variedade de produtos. No final dos anos 60 percebeu-se que as diferenças na formulação do produto podem levar a grandes diferenças de velocidade, intensidade e duração de resposta da substância. Em 1970, com a crescente evidência da associação entre a dissolução e o desempenho do medicamento, o teste oficial de dissolução foi finalmente adotado pela *United States Pharmacopeia* (USP). Desde então, uma série de revisões e acréscimos ocorrem como resultado de avanços na investigação sobre a dissolução, absorção oral e biodisponibilidade [43, 44].

### 3.4.3 Desenvolvimento de um método dissolução

O procedimento de dissolução segue vários componentes diferenciados e todos estes componentes são adequadamente escolhidos para desenvolver um método que é reprodutível no dia-a-dia e exequível no laboratório e noutros laboratórios. Estes componentes são os seguintes: meio de dissolução, aparelho de dissolução, tipo de ensaio de dissolução (um, dois e múltiplos pontos) e o modo de ensaio.

Na escolha do meio de dissolução tem-se em consideração as características físico químicas da substância ativa (ex. solubilidade, ou estabilidade da solução em função do pH). O volume do meio pode variar entre 500-1000 mL dependendo da solubilidade da substância e da dosagem em teste, pois deve ser escolhido o volume que garanta a completa solubilidade da quantidade em estudo, sendo 900 mL o valor mais vulgarmente utilizado. O aparelho de dissolução deve ser escolhido em função da forma farmacêutica e que permita fornecer resultados relacionados com o comportamento *in vivo*. A velocidade de rotação a utilizar é diferente consoante o produto em estudo e deve ser ajustada para que o ensaio consiga ser discriminatório. Para formas farmacêuticas de libertação imediata ou rápida, normalmente o ensaio tem uma duração de 30 a 60 minutos, podendo a duração do ensaio chegar às 24h no caso de determinados produtos de libertação modificada. Para análises de libertação de produto acabado em muitos casos são suficientes testes de um único ponto. No entanto, durante o desenvolvimento da formulação, é necessário realizar perfis de dissolução que são ensaios que permitem avaliar quais os pontos que deverão ser controlados durante as análises de rotina e se apenas é necessário controlar um único ponto, dois pontos e múltiplos pontos. A filtração da solução amostra deve ser também

considerada durante o desenvolvimento experimental. Esta etapa é necessária para evitar que partículas não dissolvidas da substância ativa ou de excipientes insolúveis que poderiam causar turbidez na solução entrem na amostra analítica e que as mesmas possam distorcer os resultados do teste. A filtração é um aspeto que também deve ser bem avaliado durante o desenvolvimento uma vez que o tipo de filtro utilizado pode reter a substância ativa em estudo ou ceder substâncias para a amostra adulterando os resultados do ensaio. Em alguns casos a filtração pode ser substituída por centrifugação ou apenas por uma decantação para evitar o contacto da amostra com os filtros [45].

Por fim, as maneiras mais comuns de se analisar amostras de um teste de dissolução, é por espectrofotometria (UV) e HPLC. Este método deve ser suficientemente sensível para quantificar com exatidão a substância ativa das diferentes amostras [45].

Como existe uma monografia desenvolvida pela USP para o comprimido em estudo, as condições de ensaio utilizadas já são conhecidas, não tendo sido necessário realizar testes para encontrar as condições ideais de ensaio.

#### **3.4.4 Perfis de Dissolução**

Os perfis de dissolução são obtidos a partir da percentagem dissolvida do fármaco em diferentes tempos de amostragem e permitem uma análise mais conclusiva em todo o processo de desenvolvimento e controlo de qualidade do produto. As vantagens da sua utilização passam por permitir seleccionar formulações durante o processo de desenvolvimento de fármacos, avaliar a estabilidade, otimizar formulações, demonstrar que alterações efetuadas ao processo de fabrico não alteraram o comportamento do produto tal como indicado no seu *dossier* de registo, avaliar a qualidade lote a lote durante o controlo de qualidade do produto, estabelecer a similaridade entre medicamentos genéricos e medicamentos de referência e estabelecer em alguns casos correlações *in vitro- in vivo* (CIVIV) [28, 29, 41].

A presente dissertação seguiu a “*Guideline on the Investigation of Bioequivalence*”, pelo que foram avaliados os perfis de dissolução de 3 lotes teste para cada uma das dosagens (80/25 mg, 80/12,5 mg e 40/12,5 mg), de modo a avaliar a consistência e a homogeneidade dos lotes produzidos. Para além disso é estudado um lote do produto de referência para cada uma das dosagens. Cada lote deverá ser avaliado em pelo menos três pH's diferentes (normalmente pH 1,2, 4,5 e 6,8) de forma a simular o ambiente fisiológico do trato gastrointestinal, com o objetivo de relacionar a libertação do fármaco *in vitro* com a libertação do mesmo *in vivo*. Para além disso é avaliado o meio escolhido para análise do produto pelo controlo de qualidade [46].

Como já foi referido anteriormente, uma das utilizações importantes dos ensaios de dissolução é evitar que tenham de ser realizados ensaios de BD/BE (estudos *in vivo*) das dosagens menores do mesmo produto. No entanto, para que essa isenção seja possível, para além de apresentar perfis de dissolução semelhantes ao produto de referência em todos os meios é necessário considerar outros critérios, tais como [14]:

- a) As diferentes dosagens são produzidas pelo mesmo processo de fabrico;

- b) A composição qualitativa das diferentes dosagens tem de ser a mesma;
- c) A composição deve ser quantitativamente proporcional à da dosagem para a qual foi demonstrada bioequivalência;
- d) Os testes de dissolução *in vitro* devem ser aceitáveis para as dosagens que se pretende isentar de estudos *in vivo*;

Neste caso particular, em que o produto em estudo se trata de uma associação de substâncias ativas (Telmisartan e Hidroclorotiazida) formuladas num comprimido em bicamada, cada substância ativa deve ser considerada independente uma da outra [14]. Verifica-se que a maior dosagem (80/25 mg) é proporcional à menor dosagem (40/12,5 mg). No caso específico da hidroclorotiazida, a dosagem de 80/12,5 mg é igual à de 40/12,5 mg.

### Similaridade dos perfis de dissolução

A similaridade dos perfis de dissolução e todas as conclusões que possam ser retiradas dos resultados, podem ser considerados válidos unicamente se o perfil de dissolução se mostrar satisfatório utilizando um número suficiente de pontos [14].

Vários métodos são propostos para a comparação de perfis de dissolução, e podem ser agrupados nas seguintes categorias [47]:

- Método baseado na Análise de Variância;
- Métodos de Modelos Independentes;
- Métodos de Modelos Dependentes;

Segundo a *Guideline* de dissolução da FDA, o método do modelo independente é o recomendado para a comparação de perfis de dissolução. Existem duas equações na literatura, desenvolvidas em 1996 por Moore e Flanner, que continuam atualmente a ser os métodos mais utilizados para a comparação de perfis de dissolução. As duas equações serão apresentadas no decorrer deste capítulo, a primeira equação corresponde ao fator de diferença ( $f_1$ ) e a segunda equação corresponde ao fator de similaridade ( $f_2$ ) [48].

O fator de diferença ( $f_1$ ) mede o erro percentual entre duas curvas, ao longo de todos os pontos, ou seja, mede a diferença entre duas curvas. A percentagem do erro é zero quando os perfis do medicamento teste e do de referência são idênticos e aumentam proporcionalmente com a desigualdade entre os dois perfis de dissolução [47]. É representado pela Equação 3.6:

**Equação 3.6 Fator de diferença**

$$f_1 = \left[ \frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \right] \times 100$$

n = número de pontos de amostragem (tempos de amostragem);

R<sub>t</sub> = % dissolução do medicamento de referência no tempo t;

T<sub>t</sub> = % dissolução do medicamento teste no tempo t;

Segundo a “*Guidance for Industry – Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms*”, os valores devem estar entre 0 e 15 [49].

Segundo a “*Guideline on the Investigation of Bioequivalence,2010*” a avaliação do fator de similaridade (Equação 3.7) deve ser baseada em várias condições, tais como [14]:

- Devem ser considerados no mínimo de três pontos (excluindo o zero);
- Os pontos devem ser os mesmos para os dois produtos em estudo;
- Realizar o ensaio para 12 unidades, para cada ponto e para cada formulação;
- Para cada formulação não considerar mais do que um valor médio acima de 85% dissolvido;
- O coeficiente de variação não deve ser superior a 20% no primeiro tempo e nos restantes tempos não deve ser superior a 10%.

Se o valor de  $f_2$ , estiver entre 50 e 100 os dois perfis de dissolução são similares [14].

Equação 3.7 Fator de Similaridade

$$f_2 = 50 \times \log \left[ \frac{100}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{t=1}^{t=n} [R(t) - T(t)]^2}{n}}} \right]$$

Apesar de existirem duas fórmulas que são utilizadas na comparação de perfis de dissolução que dão informações distintas, a “*Guideline on the Investigation of Bioequivalence,2010*” apenas considera a utilização do fator de similaridade ( $f_2$ ) [14,48].

No caso de formulações de libertação imediata, a comparação feita aos 15 minutos é essencial pois permite saber se se atingiu a dissolução completa antes do esvaziamento gástrico. Quando mais de 85% da substância ativa é dissolvida durante os primeiros 15 minutos, os perfis de dissolução são considerados semelhantes, não havendo necessidade de qualquer outra avaliação matemática [14].

### 3.4.5 Equipamento de Dissolução

Segundo a Farmacopeia Europeia, o ensaio de dissolução para formas farmacêuticas sólidas pode ser realizado através de vários aparelhos tais como: em cestos (aparelho 1), com pás (aparelho 2), no aparelho de pistões (aparelho 3) ou no aparelho de fluxo contínuo (aparelho 4) [50]. Os aparelhos que são normalmente a primeira opção para realizar ensaios de dissolução de formas farmacêuticas sólidas de libertação imediata são o equipamento com cestos de rede ou com pá [36]. Será apenas focado neste trabalho o equipamento de cestos de rede, pois é nesse que é conduzido todo o ensaio de dissolução da molécula em estudo, hidroclorotiazida.

## **Aparelho com cestos de rede**

O equipamento é constituído por recipientes cilíndricos de fundo hemisférico de vidro, ou outro material transparente e inerte, com uma capacidade de 1L, estes são colocados num banho de água quente ou aquecidos através de resistências elétricas que mantêm a temperatura pretendida,  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Os recipientes devem estar equipados com uma tampa que evite a evaporação do meio de dissolução. No entanto, estas tampas têm orifícios que permitem a passagem da haste do agitador, do termómetro e outros dispositivos. O agitador consiste numa haste vertical ligada a um motor que regula a velocidade de rotação e a um cesto cilíndrico fixo na sua extremidade. Tanto as hastes como os cestos devem ser constituídos por material de aço inoxidável 316 [50].

Para realizar o ensaio neste equipamento, a amostra é introduzida no cesto, que deverá estar seco no início de cada teste, e é posteriormente preso à haste. O conjunto formado por ambos é então imerso no recipiente previamente aquecido, e deverá rodar com uma velocidade especificada no método analítico. A distância entre o fundo do recipiente e o fundo do cesto é mantida a uma distância de  $25 \pm 2\text{mm}$  durante o teste. Foi determinado que a velocidade de rotação mais adequada deverá estar compreendida entre 50-100 rpm. As velocidades que estão fora do intervalo de 50-150 rpm não são aceitáveis, pois abaixo de 50 rpm a hidrodinâmica associada não é fiável bem como a turbulência sentida acima de 150 rpm compromete os resultados. Quando a turbulência é elevada e se faz sentir no recipiente, origina uma perda de poder discriminatório associado ao método de dissolução [50].

Segundo a farmacopeia, as amostras devem ser retiradas a meia distância da superfície do meio de dissolução. A recolha da amostra é feita no momento indicado ou em intervalos de tempo previamente estabelecido ou ainda de forma contínua. Nos casos em que se retira a amostra e não se repõe esse volume, essa variação de volume é tida em consideração nos cálculos da dissolução [50].

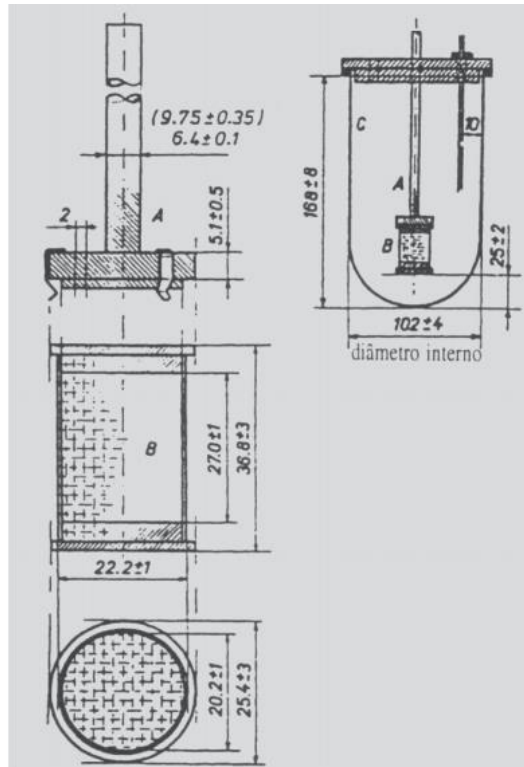


Figura 3.4 - Aparelho de Dissolução com cestos de rede (dimensão em mm) [51]

### 3.5 Fatores que interferem na Dissolução

Existem diversos fatores que podem alterar o perfil de dissolução das substâncias ativas. É importante identificar estes fatores durante o desenvolvimento do produto e estes podem ser agrupados da seguinte forma [33,52]:

- (i) Fatores associados com as propriedades físico-químicas do fármaco;
- (ii) Fatores relacionados com o ensaio de dissolução;
- (iii) Fatores associados à forma farmacêutica;

#### 3.5.1 Fatores associados com as propriedades físico-químicas do fármaco

O conhecimento das propriedades físico químicas do fármaco desempenha um papel importante no controlo da dissolução. A velocidade de dissolução pode ser determinada a partir da solubilidade da molécula.

- **Solubilidade**

A solubilidade é uma propriedade muito importante dos produtos farmacêuticos pois afeta a eficácia do fármaco, o seu desenvolvimento futuro e pode influenciar a farmacocinética da substância, nomeadamente na libertação, transporte e no grau de absorção no organismo [53].

A solubilidade é definida como a quantidade de uma substância que se dissolve num determinado volume de solvente, quando submetido a uma determinada temperatura [54].

A Tabela 3.1 mostra como as substâncias podem ser classificadas quanto à sua solubilidade:

Tabela 3.1 - Solubilidade das substâncias [51]

	Quantidades aproximadas do solvente, em mililitros, para um grama da substância
<b>Muito Solúvel</b>	Menos de 1
<b>Facilmente Solúvel</b>	De 1 a 10
<b>Solúvel</b>	De 10 a 30
<b>Ligeiramente Solúvel</b>	De 30 a 100
<b>Muito pouco solúvel</b>	De 1.000 a 10.000
<b>Praticamente Insolúvel</b>	Mais de 10.000

A baixa solubilidade é das causas de maior insucesso durante o desenvolvimento de um medicamento. Este pode ser devido à elevada lipofilia ou às fortes interações intramoleculares, que para ocorrer a solubilização necessitam de uma maior quantidade de energia [55].

A natureza lipofílica da membrana celular permite apenas a passagem da fração não ionizada de qualquer substância. O grau de ionização de cada substância depende da sua estrutura molecular e do pH da solução em que está dissolvida e essa relação pode ser dada pela equação de Henderson – Hasselbalch [56]:

Equação 3.8 Equação Henderson-Hasselback

$$pH = pK_a + \log\left(\frac{[A^-]}{[AH]}\right)$$

O pKa é definido como o pH em que 50% das moléculas estão ionizadas e 50% na forma não ionizada. O valor de pKa depende da estrutura molecular da substância e é independente se este é ácido ou básico [56].

A solubilidade é influenciada por diversas variáveis, tais como, a polaridade, o tamanho da partícula e a forma farmacêutica [54]. Quanto maior a solubilidade do fármaco, maior será a quantidade de fármaco dissolvido no meio e, conseqüentemente, maior poderá ser a sua biodisponibilidade [55].

- **Tamanho da partícula**

Entre os vários métodos conhecidos, a moagem é a técnica mais utilizada para aumentar a velocidade de dissolução, aumentando a área superficial. Deste processo, obtém-se através da ruptura de partículas maiores, partículas mais pequenas. Cospite e Dominici mostraram que medicamentos micronizados têm melhor eficácia clínica [57]. O tamanho da partícula influencia diretamente a velocidade de dissolução. Com a redução do tamanho da partícula do fármaco,

obtem-se uma maior área superficial do sólido em contacto com o meio de dissolução, resultando assim numa maior velocidade de dissolução [58]. No entanto, o método de moagem apresenta ainda algumas limitações devido ao processo de preparação ser pouco eficaz. O *input* de alta energia pode perturbar a estrutura cristalina, causando problemas de estabilidade física e química. Regiões defeituosas, desordenadas ou amorfas em cristais, são termodinamicamente instáveis e afetam a energia superficial [57].

No desenvolvimento de medicamentos genéricos, é fundamental controlar o tamanho das partículas de uma substância ativa pouco solúvel em água para atingir perfis de dissolução equivalentes e com perfis de concentração sanguínea bioequivalentes. A diminuição no tamanho da partícula, leva a um aumento na taxa de dissolução, através de um aumento da área de superfície e da diminuição da espessura da camada de difusão em torno de cada partícula [57]. Torna-se assim necessário, durante a fase de desenvolvimento de uma formulação, definir o tamanho de partícula das matérias-primas.

No caso da substância ativa em estudo, a técnica utilizada para melhorar a solubilidade da mesma, foi a redução do tamanho da partícula, que garante que o API seja micronizado e assim permita obter velocidades de dissolução desejadas. O tamanho das partículas de HCTZ utilizados na empresa foi de cerca 44 µm. Este tamanho foi escolhido, uma vez que garante uma rápida dissolução da substância ativa a partir do comprimido já desintegrado, que origina uma rápida absorção no lúmen do intestino delgado. Os autores Zahra, Thomas, Sampada e Ali [59], também estudaram o efeito que o tamanho da partícula exerce sobre a molécula hidroclorotiazida, com o objetivo de conhecer o efeito que tinha sobre a velocidade de dissolução e sustentam a ideia de que particularmente para esta molécula, esta estratégia é eficaz e viável de se adotar.

#### ▪ **Natureza Química**

É importante o estudo do polimorfismo e da cristalização de produtos farmacêuticos, pois estes têm uma grande influência sobre as propriedades físico químicas, nomeadamente no ponto de fusão, densidade, estabilidade, solubilidade e velocidade de dissolução [60]. Os fármacos podem ser produzidos de forma amorfa ou cristalina, sendo que a predominante é a forma cristalina [58]. É importante ter conhecimento sobre o polimorfismo de modo a atingir a rápida absorção da forma farmacêutica na corrente sanguínea, assegurando assim a estabilidade do fármaco e a biodisponibilidade da mesma [61]. Estudos reportam que a HCTZ apresenta quatro formas polimórficas, isto é, a molécula apresenta a capacidade de existir em mais do que uma forma cristalina podendo cada uma destas formas possuir diferentes propriedades físico químicas, e apresentar eficácias terapêuticas diferentes [62]. Apesar das informações encontradas na bibliografia indicarem a existência de vários polimorfos, o fornecedor de HCTZ usada no desenvolvimento do produto teste garante que apenas é fornecida uma forma de HCTZ e que independentemente dos solventes usados na recristalização é obtida sempre a mesma forma,

pelo que se pode esperar um comportamento constante e reprodutível em todos os lotes produzidos independentemente do lote de substância ativa que seja utilizado.

- **Excipientes**

Grande parte dos medicamentos de administração oral necessitam que a formulação contenha para além da substância ativa, outros excipientes para permitir uma apropriada administração, facilitar o fabrico do produto, aumentar a estabilidade da formulação ou também por razões estéticas ao melhorar o aspeto exterior, o sabor e o odor do medicamento [63,64].

Embora os excipientes sejam considerados normalmente como inertes, estes podem interagir com a substância ativa, acabando por alterar a sua dissolução e assim a sua biodisponibilidade. Os excipientes podem ainda ser classificados consoante a função que desempenham na formulação [63, 65].

- a. **Diluentes:** são substâncias que permitem dar volume ao comprimido, fazendo com que este tenha um peso conveniente [66];
- b. **Desagregantes:** são adicionados à formulação para facilitar a rutura da forma farmacêutica em grânulos e partículas. São importantes pois a desagregação dos comprimidos expõe mais rapidamente o fármaco aos fluidos do TGI [63, 66];
- c. **Ligantes:** proporcionam a coesão da mistura em pó para assegurarem que a formulação dos comprimidos será compressível e que estes irão permanecer intactos e que irão continuar a desagregar *in vivo* durante todo o seu período de vida útil [66];
- d. **Lubrificantes:** são substâncias que se distribuem pela superfície das partículas da formulação, reduzindo a fricção durante o processo de compressão. São utilizadas pequenas quantidades deste tipo de excipientes uma vez que são insolúveis em água, e a sua utilização em grandes quantidades podem dificultar a desagregação e dissolução [63, 66].

Os excipientes utilizados na formulação do medicamento teste e do de referência são os mesmos e estão apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Excipientes utilizados na formulação do medicamento teste e de referência

	<b>Categoria [67]</b>
<b>Lactose Monohidratada</b>	Diluyente
<b>Celulose Microcristalina</b>	Ligante e Diluyente
<b>Amido de Milho</b>	Desagregante, Diluyente e Ligante
<b>Óxido de ferro vermelho</b>	Agente de coloração
<b>Amido Glicolato de sódio</b>	Super desagregante
<b>Estearato de Magnésio</b>	Lubrificante

O amido glicolato de sódio, super desagregante, acelera o processo de desagregação. A desagregação dos comprimidos é um pré requisito para a rápida libertação da substância ativa presente na forma farmacêutica oral sólida, permitindo que esta esteja disponível para ser dissolvida. Os autores Zhao e Augsburger estudaram a eficácia que os super desagregantes têm em promover a desagregação e a dissolução da hidroclorotiazida no pH 1,2 e em água. Um dos super desagregante estudado por esses autores foi o amido glicolato de sódio, e chegaram à conclusão que a presença deste aumenta a eficácia de desagregação e que existe uma diferença significativa na velocidade de dissolução e na quantidade dissolvida de HCTZ [68].

### 3.5.2 Fatores relacionados com o ensaio de dissolução

- **Meio de dissolução**

Como foi referido anteriormente, os ensaios de dissolução permitem correlacionar os resultados obtidos *in vitro* com o comportamento *in vivo*. Assim, estes ensaios deverão ser representativos das condições fisiológicas que o medicamento encontra no organismo humano. De acordo, com a “*Guideline Dissolution Testing Of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms, 1997*”, está descrito que os ensaios de dissolução para a indústria farmacêutica, devem ser realizados meios adequados a fim de simular o ambiente do TGI. Desta forma, os meios com pH 1,2 permitem simular o estômago, e os meios com pH 4,5, 6,8 e 7,5 permitem simular as várias zonas do intestino [41, 49, 69].

Vários parâmetros como o pH, a tensão superficial, a presença de bÍlis, o volume e a viscosidade são tidos em consideração e deverão ser controlados e ajustados durante a dissolução. A presença de sais biliares e fosfolípidos têm um efeito significativo sobre a dissolução de medicamentos pouco solúveis [70].

Na Tabela 3.3 podem-se observar os valores do pH médio em jejum e após a alimentação ao longo do trato gastrointestinal.

**Tabela 3.3 - Valores Médios de pH em Humanos Saudáveis em Jejum/Após Alimentação ao longo do Trato Gastrointestinal [60]**

<b>Localização</b>	<b>pH médio</b>
<b>Estômago</b>	1,3/4,9
<b>Duodeno</b>	6,5/5,4
<b>Jejuno</b>	6,6/(5,2-6)
<b>Íleo</b>	7,4/7,5

A temperatura do meio de dissolução é outra variável como intuito de simular a temperatura corporal interna, segundo as farmacopeias esta deve ser mantida a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  [49].

#### ▪ **Equipamento de dissolução**

Como foi referido anteriormente, os equipamentos mais utilizados nos ensaios de dissolução são o método de cesto de rede e de pá. Para avaliar o perfil de dissolução de uma substância ativa e consoante a sua forma farmacêutica, o método utilizado deve apresentar características hidrodinâmicas específicas e parâmetros de velocidade de agitação [70].

##### **a) Velocidade de Rotação**

O ensaio de dissolução é diretamente afetado pela velocidade de rotação. Deste modo, a velocidade de rotação deve ser adequada e mantida constante ao longo de todo o ensaio de dissolução. Como a espessura da camada de difusão é inversamente proporcional à velocidade de rotação, quando existem alterações na velocidade existe também alteração na dissolução. O aumento das rotações faz diminuir a camada de difusão, aumentando o contacto da partícula com o meio de dissolução. O que por sua vez faz aumentar a velocidade de dissolução, uma vez que evita o aumento da concentração de soluto na camada de difusão, favorecendo a homogeneização do meio [49].

##### **b) Vibração do Sistema**

Idealmente não deve existir nenhum tipo de vibração no sistema, uma vez que qualquer alteração no fluxo hidrodinâmico altera a camada de difusão, logo altera a velocidade de dissolução [33]. Deste modo, o aparelho de dissolução deve estar colocado em bancadas fixas e livres de vibração proveniente de outros equipamentos, tais como banhos ultrassónicos, centrifugadoras, bombas de vácuo, impressoras, entre outros. São tomadas em consideração as vibrações provenientes do próprio equipamento, que são também motivo de alterações nos ensaios de dissolução, por exemplo peças gastas ou soltas que necessitam de lubrificação e/ou turbulência no banho de água [71].

##### **c) Posicionamento das hastes**

São estabelecidas especificações pelas farmacopeias para o posicionamento da haste dentro do copo, pois o mau posicionamento pode alterar os resultados [49].

##### **d) Posição e método de amostragem**

Todas as amostras devem ser retiradas o quanto possível do mesmo local. O ponto de amostragem situa-se a meia distância da superfície do líquido e acima do cesto, e a pelo menos 1 cm da parede do recipiente [72].

##### **e) Bolhas de ar**

É recomendado a eliminação de bolhas de ar durante os ensaios de dissolução. A presença de bolhas influencia os resultados obtidos, pois associam-se às partículas e diminuem o contacto do soluto com o solvente. Para eliminar as bolhas deve-se recorrer ao método de degaseificação do meio no aparelho de ultrassons antes de iniciar o ensaio de dissolução [52].

### 3.5.3 Fatores relacionados com a Forma Farmacêutica

Consoante o tipo de forma farmacêutica oral utilizada, esta terá um efeito no número de possíveis etapas desde a administração do fármaco até à sua dissolução nos fluidos do trato gastrointestinal para posterior absorção.

A biodisponibilidade está relacionada com o número de etapas envolvidas no processo de absorção depois da administração do fármaco até à sua absorção, e esta é tanto mais rápida quanto menor for o número de etapas envolvidas. No caso das soluções normalmente resultam numa absorção mais rápida e mais completa do fármaco, uma vez que a etapa de dissolução não é necessária, ao contrário de alguns comprimidos revestidos, que antes de iniciarem o processo de dissolução, têm um processo de desagregação mais lento [4].

## 3.6 Sistema de Classificação Biofarmacêutica

A introdução do sistema de classificação biofarmacêutica (BCS) em 1995, foi o resultado de vários estudos e análises matemáticas para melhor compreender a cinética e dinâmica da substância ativa ao longo do trato gastrointestinal (TGI). Após a introdução do sistema de BCS, este tem sido utilizado como ferramenta para isentar de estudos de bioequivalência, alguns produtos com características particulares baseadas em resultados de testes de dissolução *in vitro* [73].

O sistema BCS quando integrado com os testes de dissolução do medicamento classifica as substâncias farmacêuticas tendo em conta três principais fatores: a dissolução, a solubilidade e a permeabilidade intestinal, sendo estabelecido que estes três fatores regulam a velocidade e extensão de absorção do fármaco a partir da forma farmacêutica sólida [35]. De acordo com o sistema de BCS as substâncias farmacêuticas podem ser classificadas em quatro classes diferentes, como está representado na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Sistema de Classificação Biofarmacêutica [35]

Classe	Solubilidade	Permeabilidade
I	Alta	Alta
II	Baixa	Alta
III	Alta	Baixa
IV	Baixa	Baixa

No que diz respeito à substância em estudo, a hidroclorotiazida, não existe consenso em relação à sua classificação BCS, uma vez que estudos realizados por diferentes autores indicam que esta substância tanto pode ser classificada como classe III [74] ou à classe IV [73, 75].

## **3.7 Métodos cromatográficos**

### **3.7.1 Método de análise de amostras**

As formas mais usuais de análise de amostras de testes de dissolução, são a de espectrofotometria (UV) e por HPLC. As análises feitas a partir do UV são um método bastante utilizado pois é mais rápido, mais simples e requer menos solvente quando comparado com o HPLC. No caso do método de HPLC este traz grandes vantagens durante a análise de amostras pois é utilizado quando existe interferência significativa devido a excipientes ou a ingredientes ativos na formulação, quando é necessário que haja um aumento da sensibilidade, e/ou quando se pretende automatizar o procedimento do teste de dissolução [45].

Apesar do presente trabalho se focar apenas na análise da hidroclorotiazida, o medicamento em estudo é uma associação de duas moléculas diferentes, com características diferentes e que apresentam dois comprimentos de onda diferentes mas bastante próximos (270 nm e 298 nm), e por esse motivo poderia haver uma sobreposição dos máximos conduzindo a uma alteração dos resultados, caso fosse utilizado o método do UV. Desta forma, o método de UV não apresentaria grande segurança, nem resultados fiáveis.

Assim, o HPLC é o método utilizado para analisar as amostras dos testes de dissolução, por ser o mais seletivo e com resultados fidedignos, como será demonstrado no capítulo de validação.

### **3.7.2 Cromatografia**

Os métodos de separação são normalmente uma parte importante das análises e a cromatografia é das técnicas separativas mais importantes em química analítica. Esta separação é feita com base na diferença na distribuição dos analitos entre as duas fases não miscíveis, que são a fase móvel e a fase estacionária [76, 77]. Tem por base a separação de moléculas com diferenças na sua estrutura e/ou na sua composição. De forma geral, a cromatografia consiste na passagem de componentes da amostra através de uma fase estacionária, com a qual têm diferentes afinidades e interações e que são arrastadas com velocidades diferentes por um fluido, a fase móvel, conduzindo à separação de moléculas. Existem moléculas que fazem interações mais fortes com a fase estacionária e por isso movem-se mais lentamente através da coluna, do que moléculas com interações mais fracas. São utilizadas diferentes fases estacionárias, que permitem realizar diferentes separações cromatográficas. Algumas são constituídas por sílica imobilizada em placas de vidro (cromatografia em camada fina), fases voláteis (cromatografia gasosa), cromatografia de papel e os líquidos (cromatografia líquida) [78].

## Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida é uma técnica que envolve a injeção de um pequeno volume de amostra líquida num tubo preenchido por partículas porosas, denominado de fase estacionária, através da qual os componentes individuais da amostra em estudo são transportados por um líquido, a fase móvel. Os componentes da amostra são separados pois, cada componente interage física e quimicamente de modo diferente com as duas fases [79]. No final, os componentes separados são recolhidos à saída da coluna e identificados através de um detetor, que podem ser de UV-VIS, condutividade eletrolítica, de índice de refração diferencial, flurimétricos, ou outro detetor que permita identificar e quantificar o analito em causa [79, 80].

Com o desenvolvimento da cromatografia em coluna, desenvolveu-se a utilização de suportes com partículas menores que aumentam a eficiência e assim é necessário o uso de bombas de alta pressão para a eluição da fase móvel, daí o aparecimento de cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*.



Figura 3.5 - Representação do Equipamento HPLC

Na Figura 3.5, pode-se observar um equipamento de HPLC e os respetivos constituintes.

- (1) **Bomba:** A bomba tem como função forçar a(s) fase(s) móvel(eis) através da coluna a uma taxa de fluxo (mL/min) específica. A bomba pode alcançar pressões entre os 6000-9000 psi (400-600 bar). Durante a experiência de cromatografia, a bomba pode distribuir uma composição constante de fase móvel (isocrática) ou uma composição variável (gradiente) [79].
- (2) **Injetor:** O injetor introduz a amostra líquida na coluna, podendo ser automático ou manual. Este deve conseguir resistir a pressões elevadas. Os volumes de injeção mais frequentes são de 5 a 20 microlitros [79].
- (3) **Coluna:** A coluna faz a separação dos componentes da amostra em estudo, usando parâmetros físicos e químicos. As partículas pequenas dentro da coluna são

responsáveis pela resistência à fase móvel e que fazem alterar a pressão no cromatógrafo [79].

- (4) **Detetor:** O detetor, tal como o nome indica, deteta as moléculas individuais que saem da coluna permitindo quantificar os componentes da amostra. O detetor envia um sinal ao computador originando um cromatograma, ou seja, um gráfico de resposta.
- (5) **Computador:** Funciona como uma base de dados, permite controlar todos os módulos do HPLC, identifica e regista o sinal enviado pelo detetor e é ainda utilizado para determinar o tempo de retenção dos componentes da amostra (análise qualitativa) e a quantidade de amostra (Análise quantitativa)

### 3.8 Validação do método analítico

A validação é um requisito básico para garantir a qualidade e a credibilidade dos resultados para todas as aplicações analíticas. O objetivo da validação de um método analítico é demonstrar que é adequado para a sua finalidade pretendida e que o mesmo é digno de confiança [81]. Precisão e credibilidade dos resultados analíticos são cruciais para garantir a qualidade, segurança e eficácia dos produtos farmacêuticos [82, 83]. Os requisitos para a validação de métodos analíticos foram sujeitos a uma harmonização levada a cabo pela conferência *International Conference on Harmonization* (ICH) [82]

Assim, os requisitos para a validação do método analítico os procedimentos foram seguidos pela “*Validation of analytical Procedures : Text and Methodology Q2(R1)*” Os parâmetros de validação a utilizar estão diretamente relacionados com os quatro tipos mais comuns de procedimento/métodos analíticos e dependem do objetivo do método analítico. Estes procedimentos analíticos podem ser classificados da seguinte maneira [81]:

- Testes de identificação
- Testes quantitativos das impurezas
- Testes limites para controle de impurezas
- Testes quantitativos do grupo funcional em amostras de matéria-prima ou de produto final, ou de outro (s) componente (s) do produto final.

A Tabela 3.5 trata-se de uma tabela resumo, que detalha as características de validação que devem ser aplicadas para os diferentes tipos de métodos.

Tabela 3.5 - Procedimentos necessários para a validação de um método analítico [81]

Características	Tipo de procedimento analítico			
	Identificação	Teste de Impurezas		Dissolução Conteúdo/Potência
		Quantificação	Limite	
<b>Exatidão</b>	-	+	-	+
<b>Precisão</b>				
Repetibilidade	-	+	-	+
Precisão intermedia	-	+ (1)	-	+ (1)
<b>Especificidade <sup>(2)</sup></b>	+	+	+	+
<b>Limite de deteção</b>	-	- (3)	+	-
<b>Limite de quantificação</b>	-	+	-	-
<b>Linearidade</b>	-	+	-	+
<b>Gama de trabalho</b>	-	+	-	+

(-) Significa que esta característica não é normalmente avaliada

(+) Significa que esta característica é normalmente avaliada

(1) Nos casos em que a reprodutibilidade foi realizada, não é necessário verificar a precisão intermédia

(2) A falta de especificidade de um procedimento analítico pode ser compensada por apoio de outros procedimento(s) analítico(s)

(3) Pode ser necessário em alguns casos

No decorrer do trabalho pretende-se validar o método que se destina aos ensaios de dissolução da molécula hidroclorotiazida, num produto final, tendo sido por isso efetuado o estudo de especificidade, linearidade, gama de trabalho, precisão e exatidão.

### 3.8.1 Especificidade

É a capacidade de um método analítico para discriminar o analito de outras substâncias presentes na amostra, como por exemplo alguns conservantes ou solventes. O analito não deve ter a interferência de outros compostos e, no caso em particular da cromatografia, deve haver resolução entre o analito em estudo e os restantes compostos, ou seja, deve haver uma separação completa dos picos do analito em análise, dos picos dos restantes compostos [83].

### 3.8.2 Gama de trabalho

A gama de trabalho de um procedimento analítico é o intervalo das concentrações máximas e mínimas do analito na amostra, para o qual é verificado que o procedimento analítico é preciso, exato e linear [81, 83].

### 3.8.3 Linearidade

A linearidade de um procedimento analítico mostra a capacidade, dentro de um certo intervalo, para obter resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. E os requisitos mínimos são [83]:

- Linearidade deverá ser testada numa gama que cubra a concentração de trabalho da substância em análise, num mínimo de cinco níveis de concentração;
- As concentrações devem estar distribuídas igualmente ao longo da gama de trabalho;
- Os padrões são preparados no mesmo meios que a amostra (se aplicável)
- O número de leituras por nível deverá ser o mesmo que as que serão realizadas em rotina

A linearidade é avaliada com base na representação gráfica e na determinação do coeficiente de determinação ( $r^2$ ) da equação da reta de calibração obtida. Para isso é necessário calcular o desvio padrão residual, desvio padrão do declive, desvio padrão da ordenada na origem, dos intervalos de confiança e representação gráfica dos resíduos.

### 3.8.4 Precisão

A precisão de um procedimento analítico representa a dispersão dos resultados obtidos e correspondentes a várias análises sobre uma mesma amostra ou amostras semelhantes, em condições definidas. É uma medida do grau de repetibilidade ou de reprodutibilidade do método analítico e ainda reflete o grau de proximidade entre valores, para um certo número de análises e para o mesmo método analítico [84].

Podem ser considerados três níveis de precisão:

1. **Repetibilidade: repetibilidade do equipamento e do método-** representa a precisão nas mesmas condições operatórias, o mesmo analista e o mesmo equipamento, no mesmo laboratório durante um curto intervalo de tempo.
2. **Precisão intermedia:** é também designada de variabilidade intralaboratorial, mostra variações obtidas no resultado final quando os procedimentos são efetuados por diferentes analistas, em diferentes dias e com equipamentos diferentes, mas equivalentes, no mesmo laboratório;

**3. Reprodutibilidade:** representa a precisão entre laboratórios.

#### *Repetibilidade do equipamento*

Representa a precisão do equipamento ou a repetibilidade da injeção. Faz-se analisando a mesma solução que normalmente corresponde a concentração de 100% da gama de trabalho, um certo número de vezes (normalmente 6 vezes). Na repetibilidade do equipamento não tem em consideração variações resultantes da preparação da amostra [84].

#### *Repetibilidade do método*

Analisar num curto espaço de tempo várias alíquotas de uma amostra homogénea, cada uma delas preparada e processada de maneira independente ou em alternativa podem ser analisadas matrizes fortificadas. As concentrações estudadas correspondem aos extremos e aos 100% da gama de trabalho. Por concentração deverão ser processadas e analisadas 3 réplicas independentes [84].

### **3.8.5 Exatidão**

A exatidão mostra a concordância entre o resultado obtido e o verdadeiro valor ou valor de referência. É definida em termos de percentagem de recuperação do analito, juntamente com intervalos de confiança e precisão. Existem vários métodos que permitem calcular a exatidão, neste caso foi utilizado um método que calcula a percentagem de recuperação do analito numa amostra com concentração conhecida. O cálculo da % de recuperação pode ser visto na Equação 3.9, em que o  $C_{obs}$  representa a concentração recuperada do analito na solução de referência e o  $C_{ref}$  é a concentração conhecida/de referência [84].

#### **Equação 3.9**

$$\%_{Recuperação} = \frac{C_{obs}}{C_{ref}} \times 100$$

### **3.8.6 Estabilidade das soluções**

O estudo das estabilidades das soluções é efetuado para definir as condições de armazenamento e o tempo durante o qual as soluções se mantêm inalteradas de modo a garantir resultados reais das análises efetuadas. Deverão ser testadas várias condições de armazenamento (por exemplo: temperatura ambiente e frigorífico) e também vários períodos de tempo adequados à duração da análise em causa. A estabilidade de uma solução é a capacidade da solução, após um determinado período de tempo, dar uma resposta com uma variação inferior a um valor pré-definido relativamente à resposta obtida no tempo zero [84].



## 4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Todo o desenvolvimento experimental foi realizado nos laboratórios do Grupo Azevedos – Sofarimex, Cacém. Todos os materiais, equipamentos e reagentes foram disponibilizados por este laboratório. A presente dissertação tem como objetivo a validação de um método analítico para quantificar a substância ativa, hidroclorotiazida, em ensaios de dissolução para permitir fazer um estudo comparativo entre o medicamento teste e o medicamento de referência. Validou-se o método analítico de acordo com a norma “*Validation of analytical procedures: Definitions and Terminology*”.

Foram estudados 9 lotes do medicamento de teste e 3 lotes do medicamento de referência (Micardis Plus®) e as respectivas dosagens, são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Lotes analisados neste estudo

Lotes Teste	Dosagem TEL/HCTZ		
	80/25 mg	80/12,5 mg	40/12,5 mg
40245	x		
50209	x		
50210	x		
50219		x	
50220		x	
50221		x	
50216			x
50217			x
50218			x
<b>Micardis Plus (Referência)</b>			
208030	x		
502430		x	
504200			x

## 4.1 Composição da Formulação teste

Pode ser observado na Tabela 4.2 a composição da formulação teste para cada dosagem em estudo.

Tabela 4.2 - Composição do Comprimido TEL/HCTZ

API/Excipientes	Quantidade (mg)		
	Dosagem (80/25mg)	Dosagem (80/12,5mg)	Dosagem (40/12,5mg)
<b>Telmisartan</b>	80	80	40
Excipientes	644	644	322
Total da camada TEL	724	724	362
<b>HCTZ</b>	25	12,5	12,5
Excipientes	375	187,5	187,5
Total da camada HCTZ	400	200	200
<b>Massa Total Comprimido</b>	1124	924	562

## 4.2 Reagentes

Os reagentes utilizados foram:

- Acetonitrilo  $\geq 99,9$  da Merck;
- Ácido Clorídrico  $\geq 37\%$  da Sigma-Aldrich;
- Ácido fosfórico a 85% da Merck;
- Água Milli-Q (água purificada) da Millipore
- Fosfato de Amônio Monobásico da Panreac;
- Hidróxido de Sódio da Eka;
- Metanol da Carlo Erba;

## 4.3 Materiais

Foram utilizados os seguintes materiais de laboratório ao longo do trabalho:

- Almofariz
- Balões volumétricos de 10 mL, 25 mL, 100 mL, 200 mL, 250 mL, 1L e 5L
- Espátula
- Filtros de papel nº 41 da VWR
- Frascos de vidro
- Funis
- Pipetas Pasteur descartáveis
- Pipetas Volumétricas
- Provetas

- Seringas
- Tubos de centrífuga
- Vials

## 4.4 Equipamentos

- Agitador mecânico da Vibromatic
- Aparelho de dissolução da Erweka
- Aparelho de ultra-sons da VWR
- Balança analítica com precisão  $\pm 0,20$  mg da Mettler Toledo
- Balança Microanalítica com precisão  $\pm 0,1$   $\mu$ g da Mettler Toledo (Figura 4.1)
- Centrífuga da Thermo Scientific
- Coluna cromatográfica, Ascentis Express C8 5cm x3.0mm 5 $\mu$ m (Supelco – Cat: 50377-U)
- Coluna cromatográfica, Luna C8 100<sup>a</sup> 125x4mm 5 $\mu$ m
- Equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Agilent Technologies modelo 1200 séries, detetor UV, injeção automática, refrigerado e sistema de aquisição de dados
- Placa de gitação magnética
- Potenciômetro da Metrohm

## 4.5 Métodos

### 4.5.1 Método de Dissolução

Os ensaios de dissolução feitos no decurso deste trabalho seguem-se pela “*Guideline On The Investigation Of Bioequivalence, 2010*”.

As condições experimentais do ensaio de dissolução encontram-se na Tabela 4.3

Tabela 4.3 - Condições experimentais do ensaio de dissolução

Método de Dissolução	Cestos de Rede
Meio de Dissolução	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ácido Clorídrico 0,1N pH= 1,2</li> <li>▪ Tampão Acetato pH = 4,5</li> <li>▪ Tampão Fosfato de potássio pH=6,8</li> </ul>
Temperatura	37,0 $\pm$ 0,5°C
Tempos de Recolha de amostras	5, 10, 15, 20, 30 e 45 minutos
Velocidade de Dissolução	100 rpm
Volume do meio de dissolução	900 mL

#### 4.5.1.1 Preparação de soluções

- Solução Hidróxido de Sódio 0,1 M

Pesar rigorosamente cerca de 0,4 g de hidróxido de sódio para um balão volumétrico de 100 mL. Adicionar cerca de 80 mL de água purificada e agitar bem até completar a dissolução. Perfazer o volume com o mesmo solvente e agitar bem manualmente.

- Solvente A (Hidróxido de Sódio 0,005M)

Pipetar 10 mL da solução de hidróxido de sódio 0,1M para um balão volumétrico de 200 mL. Perfazer o volume com metanol e agitar bem manualmente.

- Solução Padrão Stock

**A) Dosagem 80/25 mg Telmisartan/Hidroclorotiazida**

Pesar rigorosamente cerca de 44,4 mg de telmisartan padrão a 100% e 13,9 mg de hidroclorotiazida padrão a 100% para um balão volumétrico de 100 mL. Adicionar cerca de 70 mL de solvente A e agitar bem até completar a dissolução. Perfazer o volume com o mesmo solvente e agitar bem manualmente.

( $C_{\text{Telmisartan}}=0,444\text{mg/mL}$ )

( $C_{\text{Hidroclorotiazida}}=0,139\text{mg/mL}$ )

**B) Dosagem 80/12,5 mg Telmisartan/Hidroclorotiazida**

Preparação do padrão de igual forma ao apresentado no ponto A), à exceção que a pesagem da substância ativa de hidroclorotiazida é de metade, ou seja, deve ser pesado 6,95 mg.

( $C_{\text{Telmisartan}}=0,444\text{mg/mL}$ )

( $C_{\text{Hidroclorotiazida}}=0,0695\text{mg/mL}$ )

**C) Dosagem 40/12,5 mg Telmisartan/Hidroclorotiazida**

Nesta dosagem faz-se a preparação de igual forma, à exceção que se pesam as substâncias ativas em metade do peso, quando comparado com o procedimento em A)

( $C_{\text{Telmisartan}}=0,222\text{mg/mL}$ )

( $C_{\text{Hidroclorotiazida}}=0,0695\text{mg/mL}$ )

- Solução Padrão/Solução de referência

Pipetar 1 mL da solução padrão stock para um balão volumétrico de 10 mL e perfazer o volume com o meio de dissolução. Agitar bem manualmente.



Figura 4.1 - Balança Micro Analítica onde se efetuam as pesagens dos padrões

▪ Solução Amostra

Colocar 900 mL de meio de dissolução em cada copo do aparelho de dissolução e esperar que a temperatura atinja os  $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . De seguida colocar em cada um dos cestos 1 comprimido e colocar o aparelho em funcionamento com velocidade de 100 rpm. a cada tempo apresentado na Tabela 4.3 colher e filtrar 10 mL de amostra. Pipetar 5 mL da solução filtrada para um balão de 10 mL e perfazer com o meio de dissolução. Agitar bem.

Pode-se observar nas Figura 4.2 e Figura 4.3 algumas das fases de preparação da solução amostra explícitas no parágrafo anterior.



Figura 4.2 - Fase da recolha das amostras do aparelho de dissolução, ao longo dos tempos e respetiva filtragem



Figura 4.3 - Fase de diluição das amostras dos vários tempos de recolha

- Fase móvel A (Tampão fosfato pH=3,0)

Pesar rigorosamente cerca de 4,0 g de fosfato de amónio monobásico ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ) para um balão volumétrico de 2000 mL. Adicionar 1900 mL água purificada e agitar bem até completar a dissolução. Ajustar o pH a  $3.00 \pm 0.05$  com ácido fosfórico a 85% e perfazer o volume com o mesmo solvente. Agitar bem manualmente.

- Fase móvel B : Acetonitrilo

#### 4.5.1.2 Meios de dissolução

Para o ensaio de dissolução, foram utilizadas três soluções diferentes que permitem simular o trato gastro intestinal. Os meios de dissolução foram preparados segundo a USP, e pode ser visto o modo de preparação na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Modo de preparação dos Meios de Dissolução

Meios de Dissolução	Preparação
<p><b>pH=1,2</b> Ácido Clorídrico 0.1N</p>	<p>Mede-se 43 mL de HCl fumante a 37% e transfere-se esse volume para um balão volumétrico de 5 L e perfaz-se com água. Agitar bem.</p>
<p><b>pH=4,5</b> Tampão Acetato</p>	<p>Num balão 10 L dissolve-se 63 g de acetato de sódio em água destilada e junta-se 90 mL de ácido acético 2M. Ajusta-se o pH e perfaz-se o volume com água destilada;</p>
<p><b>pH=6,8</b> Tampão Fosfato de Potássio</p>	<p>Colocam-se 68 g de fosfato de potássio monobásico 0,2M e 9 g de Hidróxido de sódio 0,2M para um balão volumétrico de 1 L e perfaz-se o volume com água destilada.</p>

### 4.5.1.3 Condições Cromatográficas

O método do HPLC para a quantificação da substância hidroclorotiazida está descrito na Farmacopeia Americana. As condições cromatográficas de trabalho são apresentadas a seguir:

#### A. Equipamento

Cromatógrafo líquido gradiente equipado com detetor de comprimento de onda variável ou detetor DAD e *software* de suporte.

#### B. Condições Cromatográficas

- **Coluna:** Ascentis Express C8 5cm x3.0mm 5µm (Supelco – Cat: 50377-U)
- **Fase Móvel:** Fase Móvel A: Solução Tampão Dihidrogenofosfato Amônio pH 3.0  
Fase Móvel B: Acetonitrilo
- **λ:** 270nm Hidroclorotiazida e 298nm Telmisartan
- **Volume de Injeção:** 4 µl
- **Temperatura da Coluna:** 30°C
- **Tempo de Análise:** 9.70 min

Tabela 4.5 - Gradiente das Fases Móveis A e B e respectivo fluxo (ml/min)

Tempo (min.)	Fase Móvel A (%)	Fase Móvel B (%)	Fluxo (ml/min)
0	85	15	0,6
1.5	85	15	0,6
1.51	60	40	0,6
5.00	60	40	0,6
5.01	20	80	1,0
6.20	20	80	1,0
6.21	85	15	0,6
9.70	85	15	0,6

A Equação 4.1 permite determinar a percentagem dissolvida da substância ativa hidroclorotiazida libertada em cada tempo de ensaio:

$$\text{Equação 4.1 \% Dissolvida}$$
$$\% \text{ Dissolvida} = \frac{A_a}{A_p} \times \frac{T_{\text{padrão}}}{100} \times \frac{1}{10} \times P \times \frac{(100 - \% \text{Perda}_{\text{secagem}})}{100} \times \frac{V_{\text{meio}}}{M_{\text{ta}}} \times \frac{10}{5} \times 100$$

Em que  $A_a$  é o valor da média das áreas obtidas das amostras,  $A_p$  é o valor da média das áreas do padrão,  $T_{\text{padrão}}$  é a toma do padrão (mg),  $P$  é a potência do padrão,  $\% \text{Perda}_{\text{secagem}}$  é a perda por secagem do padrão,  $V_{\text{meio}}$  é o volume do meio de dissolução e  $M_{\text{ta}}$  é a massa teórica da amostra (g).

No caso do perfil de dissolução, em cada tempo é corrigido o volume do meio porque não é feita a compensação do volume retirado e é também introduzido um novo fator relacionado com a concentração da solução no ponto anterior.

## 4.5.2 Método de Doseamento

O ensaio de doseamento permite avaliar se a quantidade de substância(s) ativa(s) no produto acabado esta presente na dosagem pretendida. Apesar de existirem diferentes metodologias, os métodos cromatográficos são os mais utilizados como métodos de doseamento.

### 4.5.2.1 Preparação de Soluções

- Solução Hidróxido de Sódio 0,1 M, Solvente A (Hidróxido de Sódio 0.005M) e Fase móvel A (Tampão fosfato pH=3.0): Preparados como descrito no ponto 4.5.1.1
- Fase móvel: Transferir 500 mL de tampão fosfato pH 3,0, 250 mL de acetonitrilo e 250 mL de metanol para um balão volumétrico de 1000 mL. Agitar bem manualmente.
- Fase móvel B: Acetonitrilo:Metanol (50:50 v/v)
  
- Solução Padrão: Pesar rigorosamente cerca de 20 mg de telmisartan padrão a 100% e 6,25 mg de hidroclorotiazida padrão a 100% para um balão volumétrico de 50 mL. Adicionar 40 mL de solvente A e agitar bem até completar a dissolução. Perfazer o volume com o mesmo solvente e agitar bem manualmente. Pipetar 1 mL da solução anterior para um balão volumétrico de 10 mL e perfazer o volume com fase móvel. Agitar bem manualmente.  
( $C_{\text{Telmisartan}}=0,04\text{mg/mL}$ )  
( $C_{\text{Hidroclorotiazida}}=0,0125\text{mg/mL}$ )
  
- Solução amostra: Pulverizar 20 comprimidos num almofariz. Pesar cerca de 1124 mg de pó, equivalente a 25 mg de hidroclorotiazida para um balão volumétrico de 100 mL. Adicionar cerca de 80 mL de solvente A e levar ao aparelho de ultra-sons durante 5 minutos e posteriormente, agitar mais 30 minutos num agitador mecânico. Perfazer o volume com o solvente A e centrifugar a 4000 rpm durante 15 minutos. Pipetar 1 mL do sobrenadante para um balão volumétrico de 20 mL e perfazer o volume com fase móvel. Agitar bem manualmente. Efetuar 2 ensaios.  
( $C_{\text{Telmisartan}}=0,04\text{mg/mL}$ )  
( $C_{\text{Hidroclorotiazida}}=0,0125\text{mg/mL}$ )



Figura 4.4 - Comprimidos pulverizados

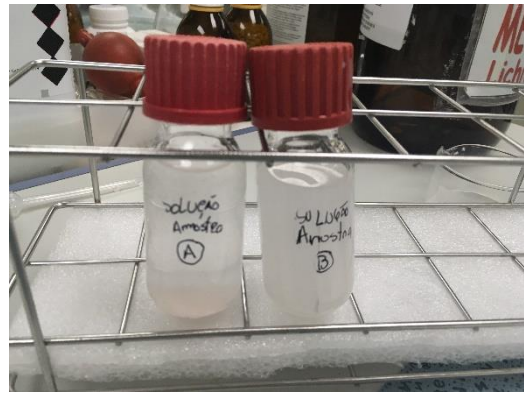


Figura 4.5 - Amostras a serem centrifugadas

#### 4.5.2.2 Condições cromatográficas

##### A. Equipamento:

Cromatógrafo líquido gradiente equipado com detetor de comprimento de onda variável ou detetor DAD e *software* de suporte.

##### B. Condições Cromatográficas:

- **Coluna:** Luna C8 100<sup>a</sup> 125x4 mm 5 µm
- **Fase Móvel:** Fase Móvel A: Solução Tampão pH 3,0  
Fase Móvel B: Acetonitrilo:Metanol (50:50 v/v)
- **Fluxo:** 1.2 mL/min
- **Volume de Injeção:** 10 µl
- **λ:** 270nm (Hidroclorotiazida) e 298 nm (Telmisartan)
- **Gama de Aquisição:** 210 a 400 nm
- **Temperatura da Coluna:** 40°C
- **Tempo de Corrida:** 15,5 minutos
- **Tempo de Retenção:** Telmisartan - Aproximadamente 8 minutos  
Hidroclorotiazida - Aproximadamente 2 minutos

Tabela 4.6 - Gradiente Fase Móvel

Tempo (min.)	Fase Móvel A (%)	Fase Móvel B (%)
0	85	15
3.5	85	15
3.51	45	55
7.70	45	55
7.71	20	80
12.0	20	80
12.1	85	15
15.5	85	15

Deve-se introduzir no aparelho a concentração real do padrão usado, dada pela Equação 4.2

$$\text{Equação 4.2}$$
$$Cr (\text{Hidroclorotiazida}) = \frac{Q_p}{50} \times \frac{1}{10} \times \frac{P \times (100 - H)}{100} \times 100 \times \frac{20}{1} \times \frac{100}{80}$$

Onde  $Q_p$  corresponde ao peso do padrão de hidroclorotiazida (mg), P à potência do padrão de hidroclorotiazida (mg) e H à humidade do padrão de hidroclorotiazida (%).

### 4.5.3 Validação do Método Analítico para os estudos dos Perfis de Dissolução

Pretende-se validar o método analítico para a quantificação de hidroclorotiazida nos ensaios de dissolução, para esse efeito foram estudados os parâmetros de especificidade, linearidade, gama de trabalho, exatidão e precisão. Em todas as soluções preparadas para os parâmetros de validação foi utilizado como meio de dissolução o meio ótimo da substância ativa, ou seja ácido clorídrico 0,1 N pH 1,2, como especificado na monografia “*Telmisartan and Hydrochlorothiazide*”. Todas as soluções amostra e soluções padrão são preparadas de acordo com o explicitado no ponto 4.5.1.1, no entanto apenas se faz uma colheita de amostra ao final de 45 minutos.

#### 4.5.3.1 Linearidade e Gama de Trabalho

Inicialmente preparou-se uma solução padrão de 80/25 mg TEL/HCTZ como descrito no ponto 4.5.1.1. A fim de avaliar a linearidade prepararam-se 5 soluções a partir da solução anteriormente referida, com concentrações na gama entre 20% e 120% (Tabela 4.7), tendo sido cada uma delas injetadas três vezes. Posteriormente, foi construída uma curva de calibração com as concentrações obtidas por regressão linear.

Tabela 4.7 - Níveis de Concentração para o estudo da Linearidade (formulação 80/25 mg TEL/HCTZ)

Concentração da solução (%)	Hidroclorotiazida ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volume (mL)	Balão Volumétrico (mL)
20	2,78	0,5	250
50	6,95	1	200
80	11,11	2	250
100	13,89	1	100
120	16,67	3	250

### 4.5.3.2 Especificidade

Para verificar que o placebo e os solventes não apresentam picos cromatográficos no tempo de retenção da hidroclorotiazida, foram feitas duas injeções de cada uma das seguintes soluções:

- Fase móvel (85% Tampão fosfato pH=3 /15% Acetonitrilo);
- Meio de dissolução (Ácido clorídrico 0,1N pH 1,2);
- Solvente de dissolução (corresponde ao solvente A descrito no capítulo 4.5.1.1);
- Solução de Placebo;
- Solução padrão (80/25 mg TEL/HCT), como descrito no capítulo 4.5.1.1
- Solução amostra (80/25 mg TEL/HCT)

Para preparar a solução placebo pesaram-se 71,56 mg de placebo de TEL e 41,67 mg de placebo de HCTZ para um balão volumétrico de 100 mL. Adicionaram-se 80 mL do meio de dissolução da HCTZ e agitou-se o balão num agitador mecânico durante 15 minutos. Posteriormente completou-se o volume com o mesmo solvente e filtrou-se a solução. Pipetaram-se 10 mL da solução filtrada para um balão volumétrico de 20 mL e completou-se o volume com o meio de dissolução da HCTZ. Finalmente, agitou-se manualmente.

### 4.5.3.3 Precisão

No ensaio da precisão foram avaliados os parâmetros explicitados no ponto 3.8.4

#### **Repetibilidade do equipamento**

Preparou-se a solução amostra (correspondente à concentração de 100% da gama de trabalho) como descrito no ponto 4.5.1.1. A solução preparada foi injetada 6 vezes.

#### **Repetibilidade do método**

Foram preparadas 6 amostras independentes correspondentes a 100% das dosagens de 80/25 mg TEL/HCZ e de 40/12,5 mg TEL/HCZ. Cada amostra foi injetada 3 vezes.

#### **Precisão Intermédia**

Prepararam-se 6 amostras independentes conforme descrito no ponto 4.5.1.1 para as dosagens de 80/25 mg TEL/HCZ e para a de 40/12,5 mg TEL/HCZ em dois dias diferentes, por analistas diferentes que foram analisadas em equipamento diferentes. Cada amostra foi injetada 3 vezes.

### 4.5.3.4 Exatidão

A exatidão foi estudada para a dosagem 80/25 mg TEL/HCZ, para amostras conhecidas para quatro níveis de concentração 25%, 50%, 100% e 120%. Para cada nível prepararam-se três amostras e cada amostra foi injetada 3 vezes.

Trituraram-se 20 comprimidos correspondentes à formulação em estudo e fez-se o seu doseamento, como explicitado no ponto 4.5.2. De seguida pesou-se o correspondente a cada nível de concentração como representado na Tabela 4.8. Cada amostra foi injetada 3 vezes.

**Tabela 4.8 - Níveis de Concentração para o Estudo de Exatidão**

<b>Concentração (%)</b>	<b>Telmisartan (mg)</b>	<b>Hidroclorotiazida (mg)</b>
120%	96	30
100%	80	25
50%	40	12,5
25%	20	6,25

#### **4.5.3.5 Estabilidade das Soluções**

Pretende-se avaliar a estabilidade de uma solução padrão e de uma solução amostra, ambos têm presentes os dois princípios ativos (TEL e HCTZ). Para este efeito prepararam-se estas soluções para as dosagens de 80/25 mg e 40/12,5 mg, e dissolveram-se no meio de dissolução ótimo da substância ativa em estudo, HCTZ.

Prepararam-se 7 vials para cada uma destas soluções.

1. Um vial de cada solução foi analisado logo no imediato. Dos restantes 6 vials de cada solução, 3 vials foram mantidos à temperatura ambiente e os outros 3 vials foram guardados no frigorífico.
2. As soluções de amostra foram quantificadas às 0h, 24h, 48h e 72h, com uma solução de padrão, preparada diariamente.
3. As soluções padrão foram quantificadas às 24h, 48h e 72h, com uma solução de padrão, preparada diariamente.

## 5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

### 5.1 Resultados da Validação do método analítico

#### 5.1.1 Especificidade

Da Figura 5.1 à Figura 5.6 estão representados os cromatogramas obtidos para a avaliação especificidade.

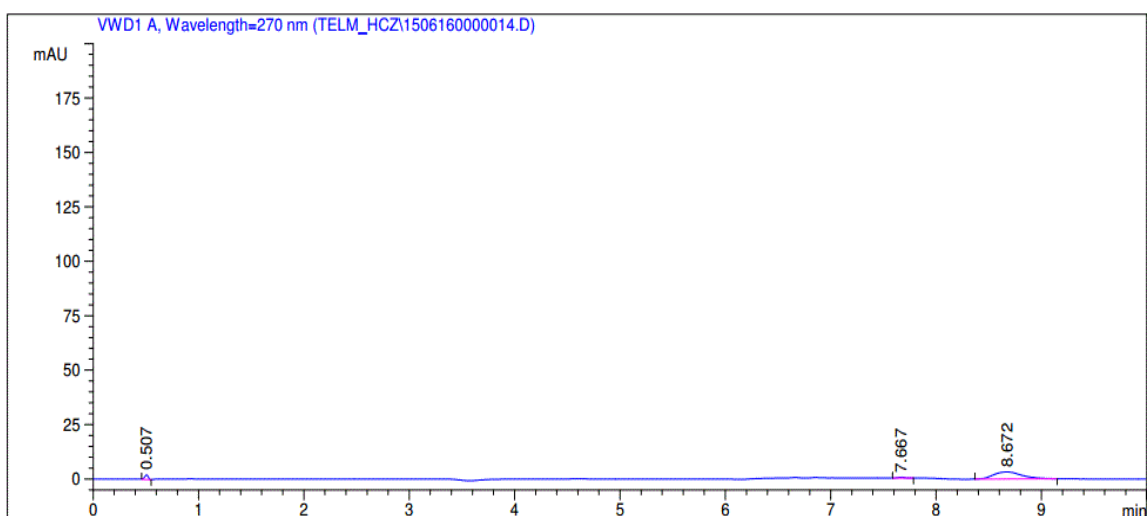


Figura 5.1 - Cromatograma Correspondente à Fase Móvel

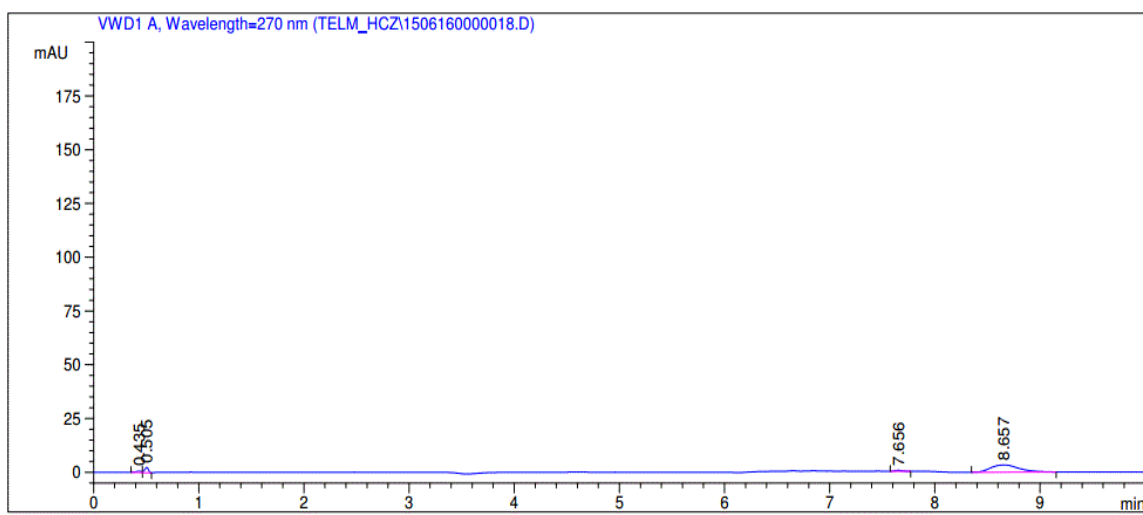


Figura 5.2 - Cromatograma Correspondente ao Meio de Dissolução de HCTZ pH 1,2

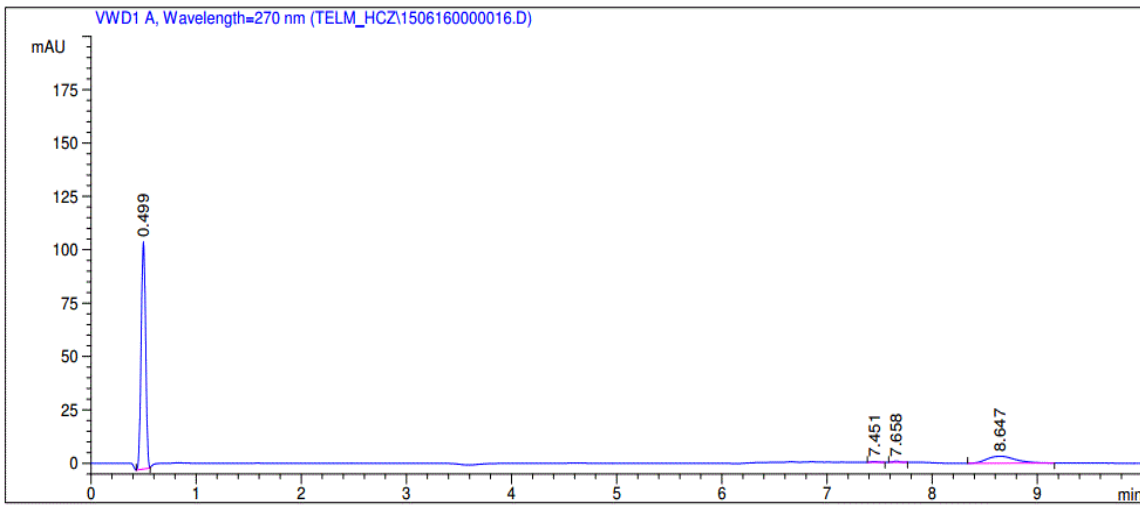


Figura 5.3 - Cromatograma Correspondente ao Solvente A

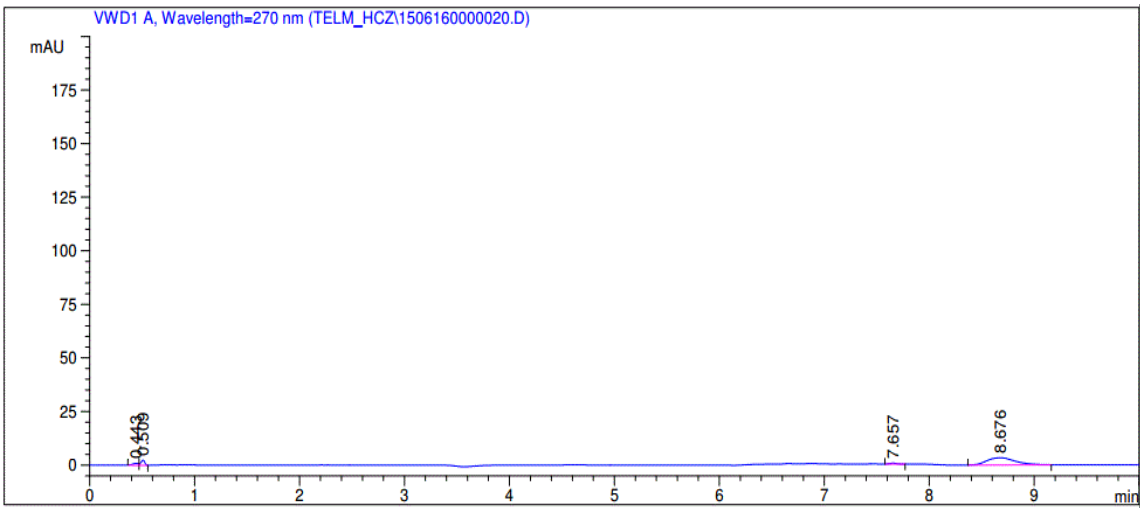


Figura 5.4 - Cromatograma Correspondente à Solução Placebo

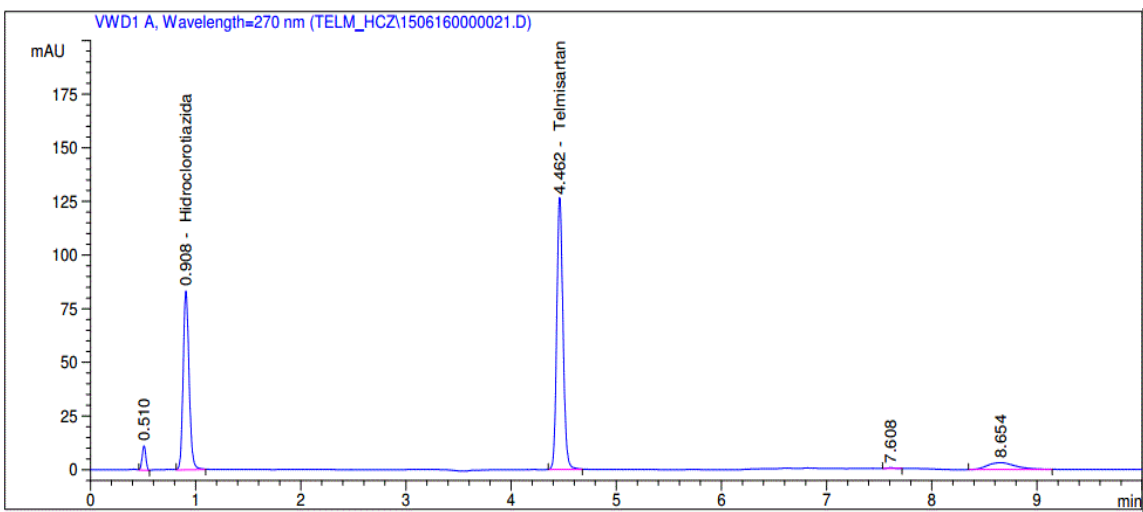


Figura 5.5 - Cromatograma Correspondente à Solução Padrão 80/25 mg TEL/HCTZ pH 1,2

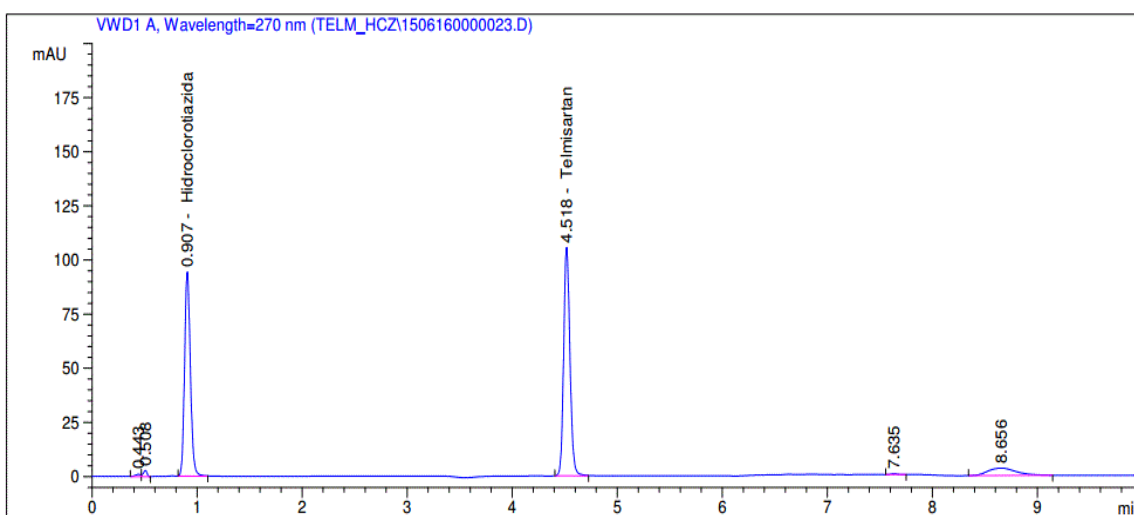


Figura 5.6 - Cromatograma Correspondente à Solução Amostra 80/25 mg TEL/HCTZ pH 1,2

Verifica-se que o método é específico para a hidroclorotiazida, uma vez que cumpre o critério de aceitação definido, isto é, não há picos cromatográficos interferentes no tempo de retenção da hidroclorotiazida.

### 5.1.2 Linearidade e Gama de Trabalho

Na Tabela 5.1 observam-se as diferentes concentrações do padrão (20% - 120%), a média das respostas obtidas e o respetivo valor de RSD (%). A Figura 5.7 representa graficamente a regressão linear das respostas da hidroclorotiazida e a respetiva equação da reta.

Tabela 5.1 - Concentração do Padrão e respetiva Resposta

Concentração (%)	Concentração (µg/ml)	Resposta (mAU*s)	RSD (%)
20	2,76	54,17	0,20
50	6,90	149,50	0,31
80	11,05	236,42	0,12
100	13,81	308,61	0,06
120	16,57	358,06	0,09

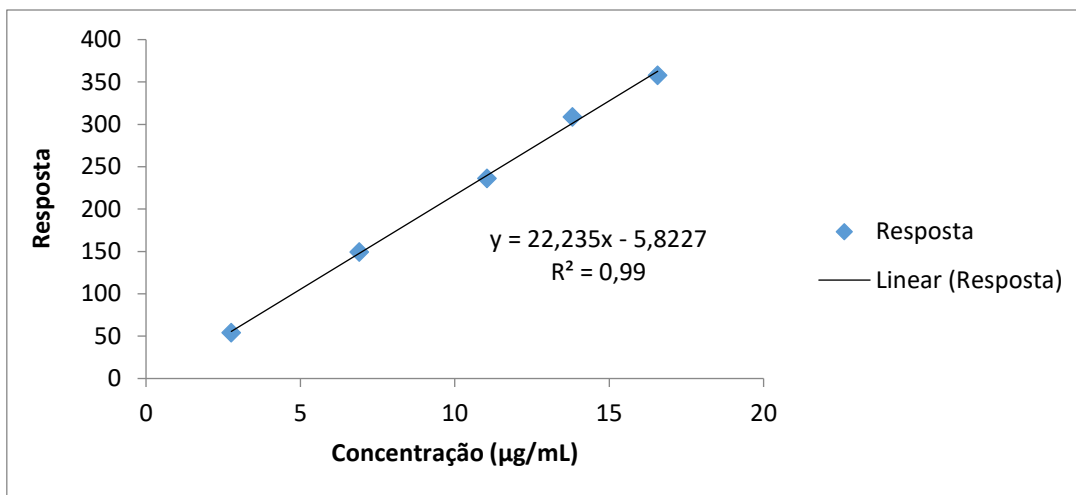


Figura 5.7 - Retas de Calibração da Hidroclorotiazida

Na Tabela 5.2 apresenta-se o resumo dos resultados do ensaio de linearidade para a hidroclorotiazida. Na Figura 5.8 pode-se observar a distribuição dos resíduos.

Tabela 5.2 - Resultados do ensaio de Linearidade (80/25mg TEL/HCTZ)

Parâmetro	Resultado
Limite do declive superior no IC <sub>95%</sub>	23,87
Limite do declive inferior no IC <sub>95%</sub>	20,60
Limite de interceção superior no IC <sub>95%</sub>	12,75
Limite de interceção inferior no IC <sub>95%</sub>	-24,35
Coefficiente de correlação (r)	0,99
Coefficiente de determinação (r <sup>2</sup> )	0,99

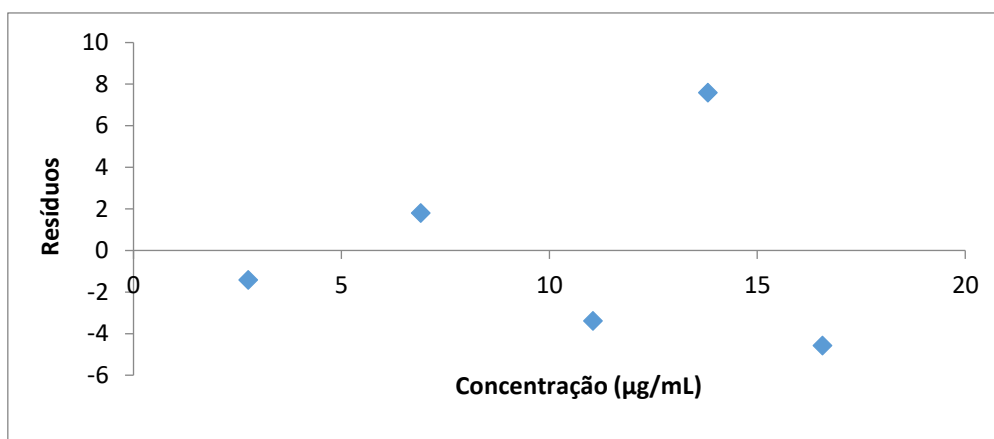


Figura 5.8 - Distribuição Residual

Os resultados obtidos através da regressão linear na gama de 2,76 µg/mL a 16,57 µg/mL, permitem concluir que o método é linear e que cumpre os critérios de aceitação definidos:

- $r \geq 0,99$ , logo o ensaio é válido;

- Análise dos resíduos apresenta uma distribuição aleatória em torno de zero;
- Os limites de interseção, para um IC<sub>95%</sub>, contêm o valor zero, pelo que a reta passa na origem;
- Os limites do declive, para um IC<sub>95%</sub>, não contêm o valor zero, indicam que a reta tem declive, logo que existe proporcionalidade;

Em relação à gama de trabalho, esta fica estabelecida num intervalo de concentrações de 2,76 µg/mL a 16,57 µg/mL.

### 5.1.3 Precisão

#### 5.1.3.1 Repetibilidade do Equipamento

Para avaliar este parâmetro realizaram-se 6 injeções de uma solução de concentração de 100% e calculou-se o desvio padrão relativo das áreas e dos tempos de retenção.

Os resultados da repetibilidade do equipamento podem ser observados na Tabela 5.3.

**Tabela 5.3 - Resultados obtidos no ensaio de Repetibilidade do Equipamento**

<b>Injeção</b>	<b>Áreas (mAU *s)</b>	<b>TR (min)</b>
<b># 1</b>	344,12	0,89
<b># 2</b>	343,15	0,89
<b># 3</b>	343,52	0,89
<b># 4</b>	342,65	0,89
<b># 5</b>	342,97	0,90
<b># 6</b>	342,93	0,90
<b>Média</b>	<b>343,23</b>	<b>0,89</b>
<b>Desvio padrão</b>	<b>0,53</b>	<b>0,01</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0,15</b>	<b>1,12</b>

Os resultados obtidos para o ensaio de repetibilidade do equipamento cumprem o critério de aceitação definido quer para as áreas como para o tempo de retenção:

- Desvio padrão relativo ≤ 2,0%

#### 5.1.3.2 Repetibilidade do método

O resumo dos resultados obtidos do ensaio da repetibilidade do método para as formulações de 80/25 mg e 40/12,5 mg TEL/HCTZ, podem ser vistos na Tabela 5.4 e Tabela 5.5 respetivamente. Os resultados entre as 3 amostras são expressos em termos da média, desvio padrão e desvio padrão relativo (RSD). O total dos resultados entre as 6 amostras é expresso em termos do desvio padrão relativo.

Tabela 5.4 - Repetibilidade do Método para 80/25mg TEL/HCTZ

Amostra	Áreas (mAU *s)
#1	343,60
#2	339,29
#3	342,23
#4	345,40
#5	328,44
#6	334,28
<b>Média</b>	338,87
<b>DP</b>	6,43
<b>RSD (%)</b>	1,90

Tabela 5.5 - Repetibilidade do Método para 40/12,5 mg TEL/HCTZ

Amostra	Áreas (mAU *s)
#1	171,62
#2	170,90
#3	173,47
#4	172,76
#5	173,148
#6	174,75
<b>Média</b>	172,77
<b>DP</b>	1,37
<b>RSD (%)</b>	0,79

Pela análise dos resultados, para ambas as formulações verifica-se que os valores de desvio padrão (RSD) obtidos para cada dia cumprem os critérios de aceitação:

- RSD ≤ 3,0% para o total das amostras

### 5.1.3.3 Precisão intermédia

O resumo dos resultados obtidos do ensaio de precisão intermédia para as formulações de 80/25 mg e 40/12,5 mg TEL/HCTZ podem ser vistos na Tabela 5.6 e Tabela 5.7 respetivamente. Os resultados entre as 6 amostras são expressos em termos da média, desvio padrão e desvio padrão relativo (RSD). O total dos resultados entre as 12 amostras é expresso em termos do termos da média, desvio padrão e desvio padrão relativo (RSD).

Tabela 5.6 - Precisão Intermédia do ensaio para 80/25mg TEL/HCTZ

Amostra	Concentração (%)	
	Analista 1/Equipamento 1/Dia 1	Analista 2/Equipamento 2/Dia 2
#1	102,74	101,71
#2	101,45	101,89
#3	102,33	104,03
#4	103,28	105,29
#5	98,20	100,40
#6	99,95	102,94
<b>Média</b>	101,32	102,71
<b>DP</b>	1,92	1,76
<b>RSD (%)</b>	1,90	1,71
<b>Média 12 Amostras</b>	102,02	
<b>DP 12 Amostras</b>	1,90	
<b>RSD (%) 12 amostras</b>	1,86	

Tabela 5.7 - Precisão Intermédia do ensaio para 40/12,5mg TEL/HCTZ

Amostra	Concentração (%)	
	Analista 1/Equipamento 1/Dia 1	Analista 2/Equipamento 2/Dia 2
#1	99,37	103,84
#2	102,11	106,15
#3	103,65	106,13
#4	103,22	107,22
#5	103,45	104,64
#6	104,41	104,34
<b>Média</b>	102,70	105,39
<b>DP</b>	1,79	1,31
<b>RSD (%)</b>	1,75	1,24
<b>Média 12 Amostras</b>	104,04	
<b>DP 12 Amostras</b>	2,05	
<b>RSD (%) 12 Amostras</b>	1,97	

Pela análise dos resultados, para ambas as concentrações (80/25 mg e 40/12,5mg TEL/HCTZ) verifica-se que os valores de desvio padrão (RSD) obtidos para cada analista e inter-analista cumprem os critérios de aceitação:

- RSD ≤ 2,0% para cada analista
- RSD ≤ 2,5% para inter-analistas

#### 5.1.4 Exatidão

Através da Tabela 5.8 pode-se observar os resultados obtidos para a exatidão do ensaio, este ensaio foi avaliado para quatro níveis de concentração. Os resultados são expressos em termos da média, desvio padrão e desvio padrão relativo (RSD).

Tabela 5.8 - Resultados para o ensaio de Exatidão

	Níveis de Concentração			
	25%	50%	100%	120%
Recuperação (%)	99,47	99,11	99,70	98,06
	99,17	100,56	98,58	99,07
	102,99	99,12	99,47	95,60
<b>Média</b>	10,54	99,60	99,25	97,58
<b>DP</b>	2,13	0,83	0,59	1,78
<b>RSD (%)</b>	2,12	0,83	0,59	1,83
<b>12 Determinações</b>				
<b>Média</b>	99,24			
<b>DP</b>	1,69			
<b>RSD (%)</b>	1,70			

Os resultados obtidos no ensaio de exatidão cumprem o critério de aceitação definido para a recuperação nos quatro níveis de concentração.

Critério de aceitação:

- A percentagem de recuperação da substância ativa está compreendida entre 95% e 105%;

### 5.1.5 Estabilidade das soluções

Na Tabela 5.9 está representado os resultados obtidos para o ensaio de estabilidade da solução padrão e da solução amostra da hidroclorotiazida.

Tabela 5.9 - Resumo dos resultados obtidos para o ensaio de estabilidade da Hidroclorotiazida

Temperatura	Ambiente			Refrigerada			
	Tempo (h)	24h	48h	72h	24h	48h	72h
<b>Solução Padrão (%)</b> <b>(80/25 mg TEL/HCTZ)</b>		100,89	100,40	98,22	100,85	100,27	99,04
<b>Variação (%)</b>		-0,89	-0,40	1,78	-0,85	-0,27	0,96
<b>Solução Amostra (%)</b> <b>(80/25 mg TEL/HCTZ)</b>		99,58	99,13	99,00	100,01	100,98	100,43
<b>Variação (%)</b>		0,42	0,87	1,00	-0,01	-0,98	-0,43
<b>Solução Amostra (%)</b> <b>(40/12,5 mg TEL/HCTZ)</b>		100,15	92,44	98,58	99,72	93,98	100,34
<b>Variação (%)</b>		-0,15	7,56	1,42	0,28	6,02	-0,34

- A solução padrão é estável por um período de 72h à temperatura ambiente e refrigerada, pois a variação é inferior a 3%.
- A solução amostra 80/25 mg é estável por um período de 72h à temperatura ambiente e refrigerada, pois a variação é inferior a 3%.
- A solução amostra 40/12,5 mg é estável por um período de 72h para a temperatura ambiente e refrigerada, embora tenha sido obtida às 48h uma variação superior ao limite definido de 3%. Trata-se de um comportamento anormal que deve ser verificado com novos ensaios. No entanto, de acordo com os resultados obtidos às 72h e com as tendências do padrão e das amostras de 80/25 mg a estabilidade destas amostras pode ser considerada pelo mesmo período de 72h.

## 5.2 Resultados da Comparação de Perfis de Dissolução

Ao longo deste subcapítulo serão avaliados os resultados obtidos nos perfis de dissolução para os lotes estudados, apresentados na Tabela 4.1. Pretende-se avaliar o perfil de dissolução de cada lote em diferentes meios de dissolução, nomeadamente pH 1,2; pH 4,5 e pH 6,8.

O estudo foi constituído de 2 etapas a saber:

Primeiramente avaliou-se o perfil de dissolução de cada lote teste/dosagem e dos respetivos medicamentos de referência, de modo a avaliar a homogeneidade da formulação e posteriormente, calculou-se o grau de semelhança entre o produto teste e o medicamento de referência através do cálculo do fator de similaridade ( $f_2$ ).

Estão apresentados nos gráficos e tabelas os resultados obtidos para os diferentes meios de dissolução, e estes são expressos em termos de percentagem média de substância ativa dissolvida ao longo do tempo para 12 unidades.

### 5.2.1 Meio de dissolução: HCl 0,1N pH 1,2

#### Dosagem 80/25 mg TEL/HCTZ

Na Figura 5.9 estão representados os perfis de dissolução, para os produtos teste e de referência na dosagem de 80/25 mg e no meio HCL 0,1 N pH 1,2. Os valores de dissolução obtidos são superiores a 85% aos 15 minutos e apresentam valores de RSD dentro dos limites especificados para o estudo (Tabela 5.10). De acordo com a “*Guideline on the Investigation of Bioequivalence*”, quando isto se verifica os perfis de dissolução são considerados similares e não é necessário recorrer ao cálculo do fator de similaridade ( $f_2$ ).

Portanto, conclui-se que os medicamentos testes e referência são semelhantes no meio de dissolução HCL 0,1 N pH 1,2.

Tabela 5.10 - Valores médios de % Dissolvida de HCTZ na dosagem de 80/25 mg, em pH 1,2

Tempo (min)	Lotes							
	SFX 40245		SFX 50209		SFX 50210		Micardis Plus® 208030	
	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	73,93	4,74	64,90	7,65	76,56	10,15	63,73	7,87
10	86,97	6,20	84,34	4,79	94,35	5,59	79,87	5,46
15	90,34	5,80	92,96	3,53	100,84	7,81	86,50	4,16
20	92,23	5,74	96,30	3,68	101,34	5,76	9,26	3,13
30	94,31	4,20	100,70	3,54	102,41	4,89	93,93	1,77
45	96,66	2,77	101,09	3,84	104,23	5,10	95,78	1,83

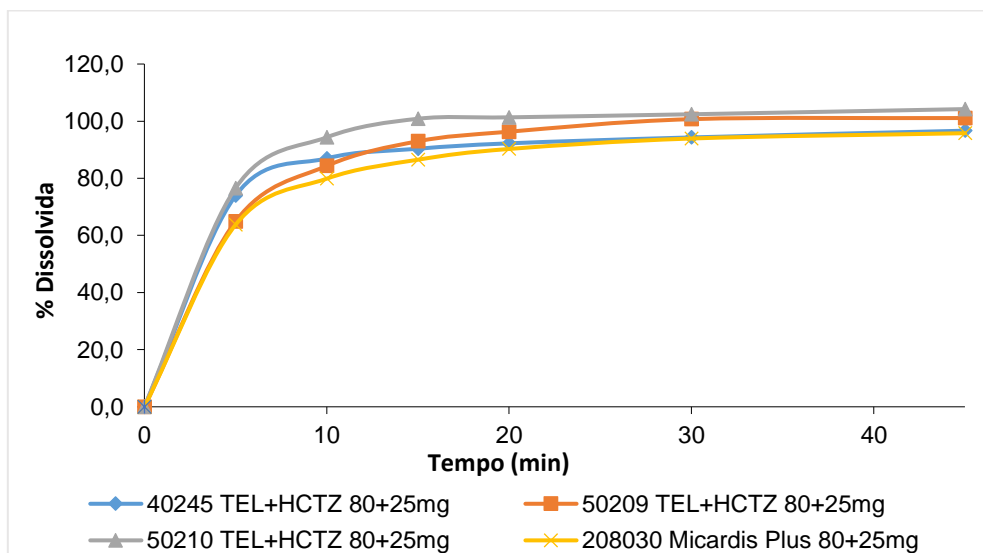


Figura 5.9 - Perfil de Dissolução HCTZ pH 1,2 dos três lotes teste e o de referência (80/25 mg TEL/HCTZ)

### Dosagem 80/12,5 mg TEL/HCTZ

Na Figura 5.10 estão representados os perfis de dissolução, para os produtos teste e de referência na dosagem de 80/12,5mg e em HCL 0,1 N pH 1,2. Os valores de dissolução obtidos são superiores a 85% aos 15 minutos e apresentam valores de RSD dentro dos limites especificados para o estudo (Tabela 5.11). À semelhança do que foi concluído na dosagem anterior, os medicamentos testes e referência são semelhantes no meio de dissolução HCL 0,1 N pH 1,2.

Tabela 5.11 - Valores médios de % Dissolvida de HCTZ na dosagem 80/12,5 mg em pH 1,2

Tempo (min)	Lotes							
	SFX 50219		SFX 50220		SFX 50221		Micardis Plus® 502430	
	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	69,15	8,92	63,07	9,74	69,52	6,75	71,99	3,63
10	89,70	4,37	86,36	6,26	87,70	5,10	86,21	1,51
15	95,96	3,79	96,28	3,81	94,72	4,01	90,61	1,82
20	99,09	3,40	100,35	3,91	98,44	3,16	92,73	1,56
30	100,94	3,81	102,72	4,37	101,45	1,83	94,52	1,85
45	102,29	3,86	103,80	4,01	102,54	1,06	95,92	1,33

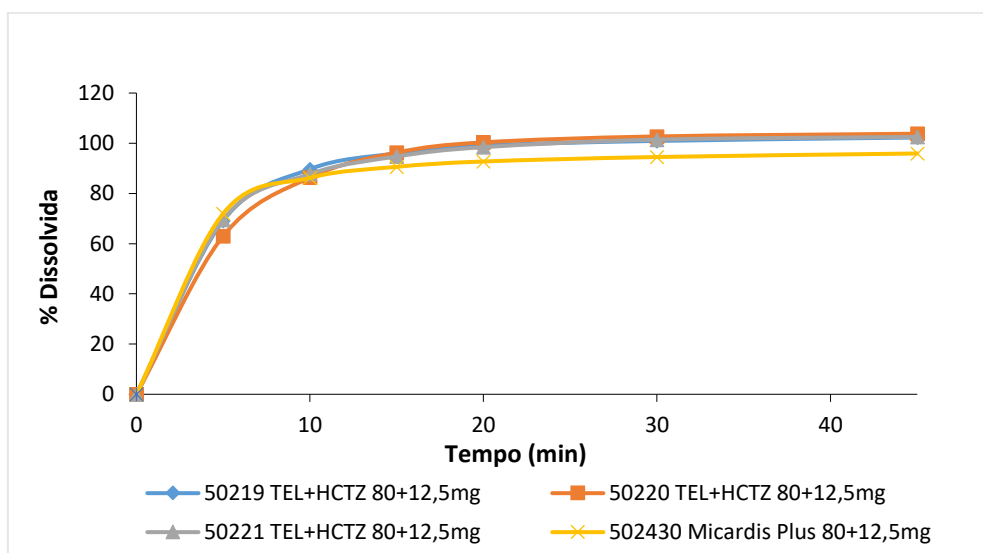


Figura 5.10 - Perfil de Dissolução HCTZ pH 1,2 dos três lotes teste e o de referência (80/12,5 mg TEL/HCTZ)

### Dosagem 40/12,5 mg TEL/HCTZ

Na Figura 5.11 estão representados os perfis de dissolução, para os produtos teste e de referência na dosagem de 40/12,5mg e em HCL 0,1 N pH 1,2. À semelhança do que foi concluído para as dosagens anteriores, os medicamentos teste e referência são semelhantes no meio de dissolução HCL 0,1 N pH 1,2 e apresentam valores de RSD dentro dos limites especificados para o estudo (Tabela 5.12).

Tabela 5.12 - Valores médios de % Dissolvida de HCTZ na dosagem de 40/12,5 mg em pH 1,2;

Tempo (min)	Lotes							
	SFX 50216		SFX 50217		SFX 50218		Micardis Plus 544200	
	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	66,26	8,24	63,28	3,60	95,3	2,60	77,53	2,97
10	83,98	4,15	83,87	2,14	97,8	2,41	92,85	3,72
15	89,93	2,60	91,93	2,28	96,2	3,00	96,77	4,99
20	92,36	2,60	94,93	2,41	93,1	2,12	98,99	5,21
30	92,68	3,23	97,70	1,58	92,2	1,06	100,22	6,65
45	93,77	1,96	99,13	1,24	94,2	3,46	100,59	7,66

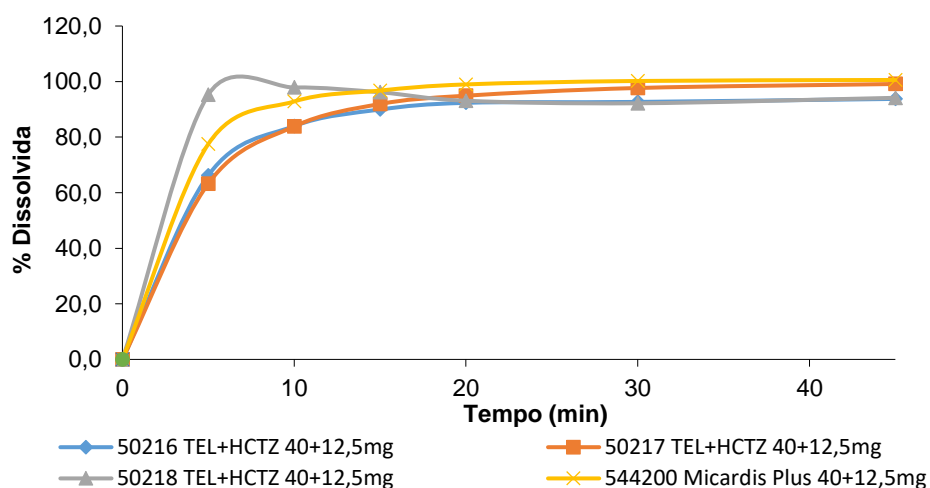


Figura 5.11 - Perfil de Dissolução HCTZ pH 1,2 dos três lotes teste e o de referência (40/12,5 mg TEL/HCTZ)

## 5.2.2 Meio de Dissolução: Tampão Acetato pH 4,5

### Dosagem 80/25 mg TEL/HCTZ

Na Figura 5.12 estão representados os perfis de dissolução, para os produtos teste e de referência na dosagem de 80/25mg em tampão acetato pH 4,5. Neste meio verifica-se que o produto de referência não apresenta uma percentagem dissolvida superior a 85% em 15 minutos, logo o cálculo de similaridade é aplicável a todos os lotes dos medicamentos teste, independentemente da percentagem dissolvida ao final dos 15 minutos. Além disso, apresentam valores de RSD dentro dos limites especificados para o estudo (Tabela 5.13)

Os valores obtidos de fator de similaridade, estão compreendidos no intervalo 50-100 (Tabela 5.14), o que segundo a mesma *Guideline* permite concluir que os lotes em estudo são considerados similares com o de referência.

Tabela 5.13 - Valores médios de % Dissolvida de HCTZ na dosagem 80/25 mg em pH 4,5

Tempo (min)	Lotes							
	SFX 40245		SFX 50209		SFX 50210		Micardis Plus® 208030	
	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	66,44	8,75	57,35	8,23	68,85	7,34	51,73	15,20
10	82,45	6,27	68,15	5,65	78,72	4,56	72,73	6,77
15	87,46	5,51	72,53	4,48	81,11	4,77	81,66	4,83
20	90,32	4,70	76,38	7,97	84,97	4,16	86,35	3,07
30	92,88	4,28	83,74	6,03	87,43	2,98	90,03	1,89
45	94,66	2,71	88,63	5,16	92,73	10,06	92,59	1,45

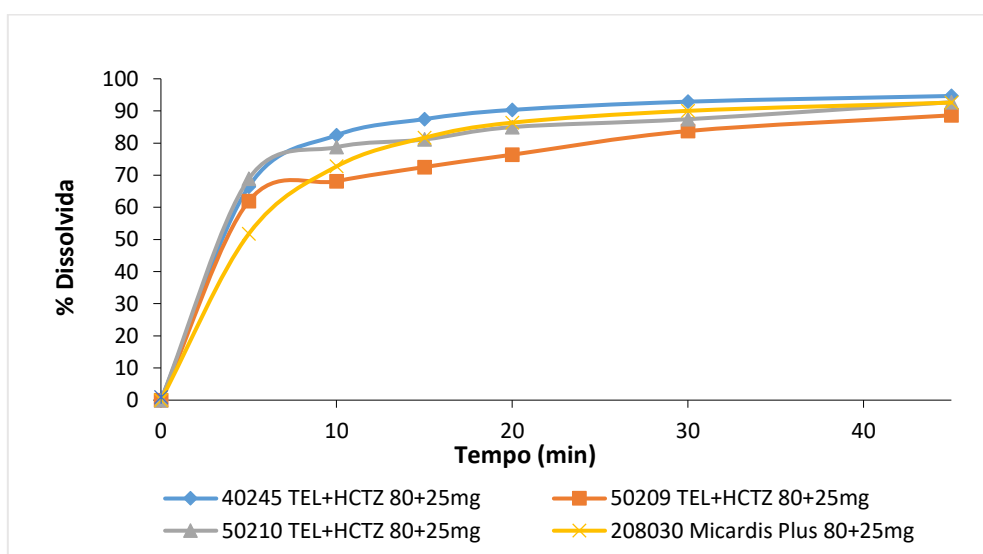


Figura 5.12 - Perfil de Dissolução HCTZ pH 4,5 dos três lotes teste e o de referência (80/25 mg TEL/HCTZ)

Tabela 5.14 - Determinação do fator de similaridade 80/25 mg (TEL/HCTZ), pH 4,5

Dosagem 80/25 mg (TEL/HCTZ) - pH 4,5	$f_2$	Similaridade
40245	51,02	Sim
50209	55,30	Sim
50210	54,10	Sim

## Dosagem 80/12,5 mg TEL/HCTZ

Na Figura 5.13 estão representados os perfis de dissolução, para os produtos teste e de referência na dosagem de 80/12,5mg em tampão acetado pH 4,5. Os valores de dissolução obtidos são superiores a 85% aos 15 minutos e apresentam valores de RSD dentro dos limites especificados para o estudo (Tabela 5.15). De acordo com a “*Guideline on the Investigation of Bioequivalence*”, quando isto se verifica os perfis de dissolução são considerados similares e não é necessário recorrer ao cálculo do fator de similaridade ( $f_2$ ). Portanto, conclui-se que os medicamentos testes e referência são semelhantes no meio de dissolução pH 4.5.

Tabela 5.15 - Valores médios de % Dissolvida de HCTZ na dosagem 80/12,5 mg em pH 4,5

Tempo (min)	Lotes							
	SFX 50219		SFX 50220		SFX 50221		Micardis Plus® 502430	
	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	74,67	7,54	67,59	12,91	65,66	8,92	77,89	5,25
10	90,51	9,07	84,04	9,68	84,63	8,09	93,11	3,29
15	97,66	6,06	91,90	7,74	89,22	6,85	97,67	3,81
20	100,49	6,22	94,28	6,29	91,05	7,18	99,05	4,33
30	101,89	5,53	95,69	7,55	94,57	5,27	101,37	4,23
45	102,64	5,36	96,73	6,05	96,18	4,67	102,22	3,62

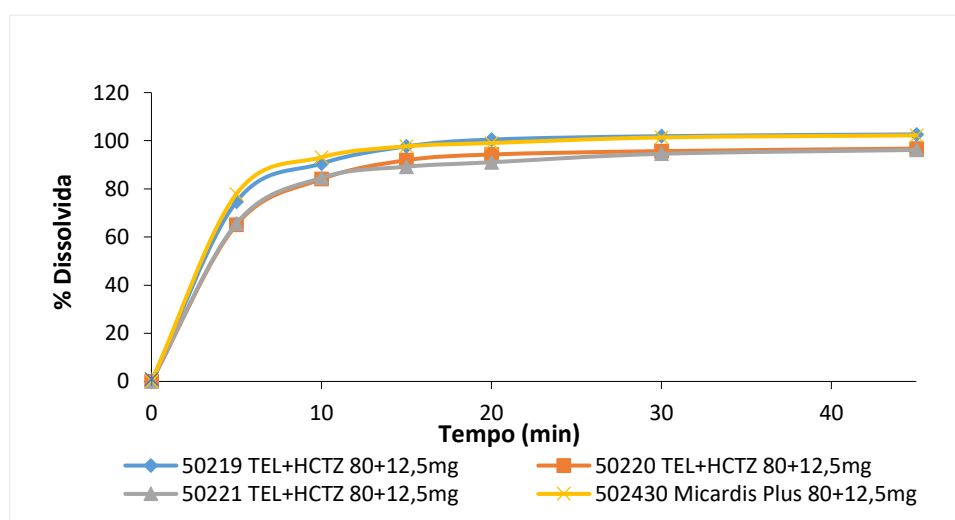


Figura 5.13 - Perfil de Dissolução HCTZ pH 4,5 dos três lotes teste e o de referência (80/12,5 mg TEL/HCTZ)

## Dosagem 40/12,5 mg TEL/HCTZ

Na Figura 5.14 estão representados os perfis de dissolução, para os produtos teste e de referência na dosagem de 40/12,5mg em tampão acetado pH 4,5. Verifica-se que nesta dosagem, o produto de referência apresenta valores de dissolução superiores a 85% em 15 minutos. O mesmo comportamento não se verifica nos lotes do produto teste. Apenas o lote 50217 apresenta similaridade com o produto de referência. Calculou-se o fator de similaridade ( $f_2$ ) para os lotes 50216 e 50218 e estes valores não estão dentro do intervalo especificado, logo não são semelhantes ao produto de referência (Tabela 5.17).

Tendo em conta que todos os lotes do produto teste utilizaram o mesmo lote de API – Hidroclorotiazida, tais diferenças deverão ser investigadas, uma vez que estes lotes apresentaram um comportamento anormal em relação ao espectável para esta molécula neste pH, tal como pode ser observado nas dissoluções realizadas nos lotes das outras dosagens neste mesmo meio. Deverá assim ser confirmado se os valores obtidos são resultantes de um erro analítico ou se são devidos a outros fatores, como por exemplo os parâmetros usados durante o processo de compressão tal como é sugerido por Ibrahim que refere que a força de compressão usadas têm uma grande influência na porosidade, dureza e desagregação do comprimido, sendo que a combinação destes fatores se reflete na velocidade de dissolução [85].

Tabela 5.16 - Valores médios de % Dissolvida de HCTZ na dosagem de 40/12,5 mg em pH 4,5;

Tempo (min)	Lotes							
	50216		50217		50218		Micardis Plus® 544200	
	<i>Média</i> (%)	<i>RSD</i> (%)	<i>Média</i> (%)	<i>RSD</i> (%)	<i>Média</i> (%)	<i>RSD</i> (%)	<i>Média</i> (%)	<i>RSD</i> (%)
<b>0</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>5</b>	59,37	7,10	74,29	4,19	57,36	13,79	77,85	3,98
<b>10</b>	71,73	7,61	88,58	4,12	72,22	10,54	94,29	2,36
<b>15</b>	74,66	5,69	92,38	5,41	78,52	9,10	99,70	3,07
<b>20</b>	76,91	6,86	94,46	6,30	82,74	8,11	101,82	2,20
<b>30</b>	77,88	5,94	96,02	4,98	87,59	7,24	103,75	1,75
<b>45</b>	79,56	5,16	97,77	5,23	90,92	7,06	104,62	1,76

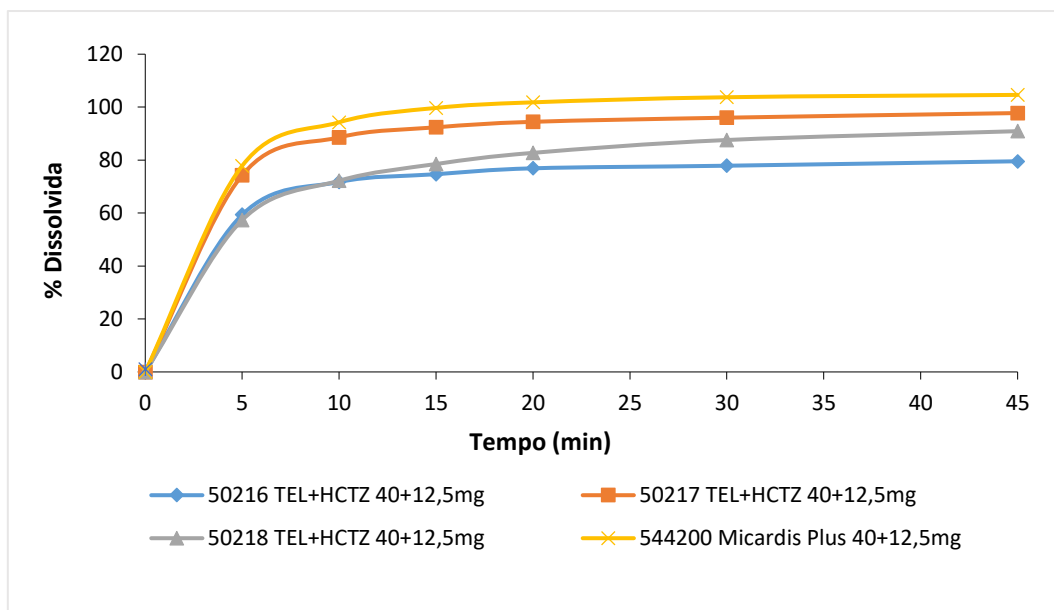


Figura 5.14 - Perfil de Dissolução HCTZ pH 4,5 dos três lotes teste e o de referência (40/12,5 mg TEL/HCTZ)

Tabela 5.17 - Determinação do fator de similaridade 40/12,5 mg (TEL/HCTZ), pH 4,5

Dosagem 40/12,5 mg (TEL/HCTZ)	$f_2$	Similaridade
50216	31,16	Não
50218	35,03	Não

### 5.2.3 Meio de Dissolução: Tampão Fosfato de Potássio pH 6,8

#### Dosagem 80/25 mg TEL/HCTZ

Na Figura 5.15 estão representados os perfis de dissolução, para os produtos teste e de referência na dosagem de 80/25mg em fosfato pH 6,8. Não sendo este o meio de pH ideal para a dissolução da HCTZ, pode-se observar que tanto o produto de referência como os produtos testes apresentam dissoluções lentas e incompletas ao final do tempo estipulado de dissolução. Recorrendo ao cálculo do  $f_2$ , os produtos não são semelhantes, uma vez que os valores de  $f_2$  são inferiores a 50 (Tabela 5.19). No entanto, este facto não é considerado relevante para a submissão do produto aos estudos de bioequivalência *in vivo*, uma vez que no local de absorção desta molécula o pH é inferior a 6,8, estando assim a molécula completamente dissolvida tal como demonstrado anteriormente.

Tabela 5.18 - Valores médios de % Dissolvida de HCTZ na dosagem de 80/25 mg em pH 6,8;

Tempo (min)	Lotes							
	SFX 40245		SFX 50209		SFX 50210		Micardis Plus® 208030	
	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	50,11	4,74	40,70	6,14	49,09	7,97	57,71	8,98
10	61,21	8,91	47,07	6,53	56,32	7,17	78,10	5,50
15	63,44	4,49	50,58	5,95	60,95	6,77	80,77	2,91
20	65,56	4,61	54,14	5,48	63,28	5,16	84,73	2,78
30	70,48	4,22	57,79	5,34	67,02	5,18	88,09	2,66
45	74,91	3,74	63,81	4,51	72,67	7,51	90,71	1,86

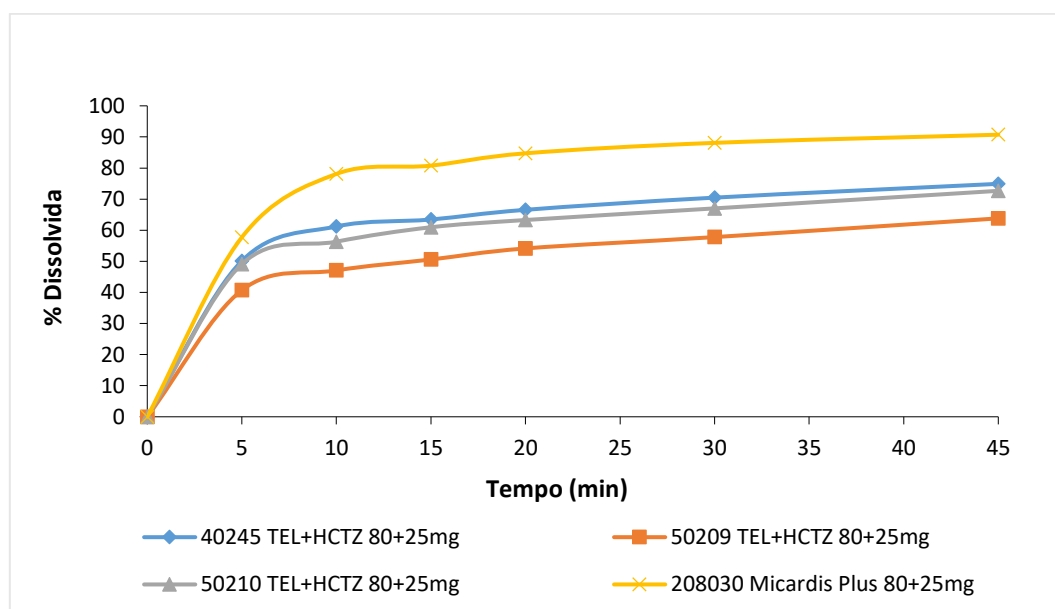


Figura 5.15 - Perfil de Dissolução HCTZ pH 6,8 dos três lotes teste e o de referência (80/25 mg TEL/HCTZ)

Tabela 5.19 - Determinação do fator de similaridade 80/25 mg (TEL/HCTZ), pH 6,8

Dosagem 80/25 mg (TEL/HCTZ) - pH 6,8	$f_2$	Similaridade
40245	39,72	Não
50209	27,54	Não
50210	36,01	Não

## Dosagem 80/12,5mg TEL/HCTZ

Na Figura 5.16 estão representados os perfis de dissolução, para os produtos teste e de referência na dosagem de 80/12,5 mg em fósforo pH 6,8. À semelhança do que se verificou na dosagem anterior (80/25 mg) o produto apresenta valores de  $f_2$  inferiores a 50 (Tabela 5.21), não sendo semelhante ao medicamento de referência. Tal como para a dosagem anterior, este facto não é relevante para a submissão do produto aos estudos de bioequivalência *in vivo*, uma vez que no local de absorção desta molécula o pH é inferior a 6,8, estando assim a molécula completamente dissolvida tal como demonstrado anteriormente.

Tabela 5.20 - Valores médios de % Dissolvida de HCTZ na dosagem de 80/12,5 mg em pH 6,8;

Tempo (min)	Lotes							
	SFX 50219		SFX 50220		SFX 50221		Micardis Plus® 502430	
	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	60,41	12,68	53,49	10,37	52,96	8,73	74,50	4,05
10	71,24	10,98	64,48	9,65	65,08	9,96	85,79	2,83
15	77,14	10,66	69,10	7,12	71,48	9,95	90,04	2,36
20	80,49	9,65	75,42	8,80	75,59	8,84	93,05	2,62
30	84,72	8,34	79,82	8,63	80,51	8,92	95,07	2,37
45	86,87	7,91	83,24	8,74	84,33	9,85	96,52	1,69

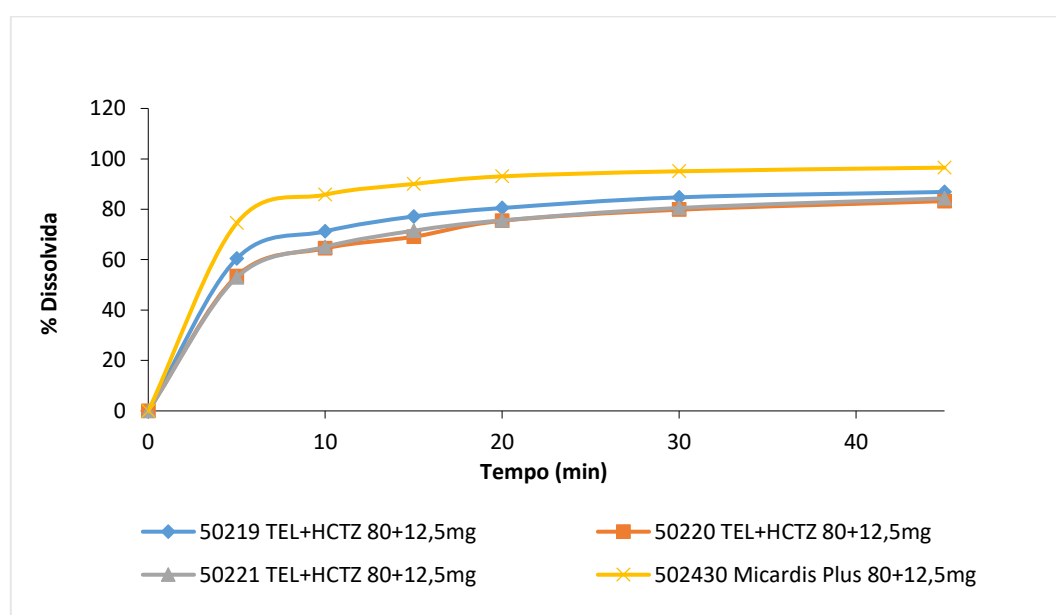


Figura 5.16 - Perfil de Dissolução HCTZ pH 6,8 dos três lotes teste e o de referência (80/12,5 mg TEL/HCTZ)

Tabela 5.21 - Determinação do fator de similaridade 80/12,5 mg (TEL/HCTZ), pH 6,8

Dosagem 80/12,5 mg (TEL/HCTZ) - pH 6,8	$f_2$	Similaridade
50219	45,12	Não
50220	36,61	Não
50221	37,44	Não

### Dosagem 40/12,5 mg TEL/HCTZ

Na Figura 5.17 estão representados os perfis de dissolução, para os produtos teste e de referência na dosagem de 40/12,5 mg em fosfato pH 6,8. Apesar de ter sido referido anteriormente que este meio de pH não é o ideal para a dissolução da HCTZ, verifica-se uma maior dissolução nesta dosagem da molécula de HCTZ tanto do produto de referência como dos produtos teste. Tal facto pode ser explicado pela menor massa total do comprimido, o que origina uma menor saturação do meio, aumentando o seu poder de dissolução.

Neste caso verifica-se então um aumento da percentagem dissolvida, verificando-se deste modo que todos os lotes são semelhantes seja, por apresentarem uma dissolução superior a 85% em 15 minutos, quer seja pelo cálculo de  $f_2$  (Tabela 5.23).

Tabela 5.22 - Valores médios de % Dissolvida de HCTZ na dosagem de 40/12,5 mg em pH 6,8;

Tempo (min)	Lotes							
	SFX 50216		SFX 50217		SFX 50218		Micardis Plus® 544200	
	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	75,74	9,02	67,18	13,03	59,51	11,38	73,43	3,93
10	86,24	8,16	77,51	8,94	71,94	12,55	84,84	2,10
15	91,03	8,16	82,99	7,40	80,50	10,00	89,72	1,96
20	94,42	8,40	86,81	5,54	85,07	9,29	91,87	2,20
30	96,57	8,86	90,34	3,78	91,90	7,70	93,04	2,06
45	97,88	8,24	92,44	3,72	94,77	6,26	96,30	1,38

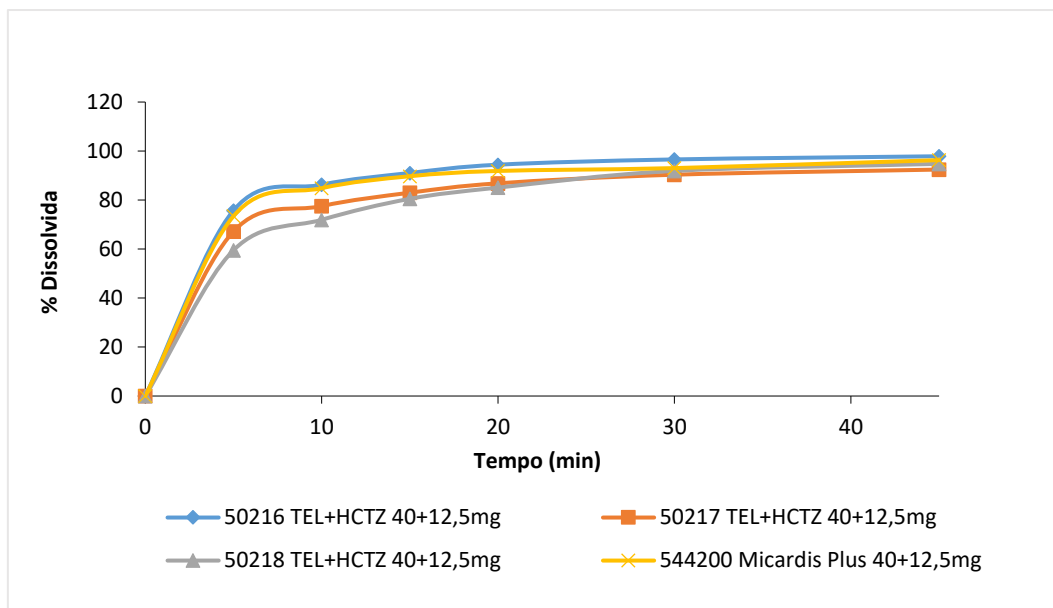


Figura 5.17 - Perfil de Dissolução HCTZ pH 6,8 dos três lotes teste e o de referência (40/12,5 mg TEL/HCTZ)

Tabela 5.23 - Determinação do fator de similaridade 40/12,5 mg (TEL/HCTZ) – pH 6,8

Dosagem 40/12,5 mg (TEL/HCTZ) - pH 6,8	$f_2$	Similaridade
50217	59,44	Sim
50218	50,05	Sim

Avaliando de uma forma geral os resultados pode-se observar que para cada dosagem os lotes produzidos apresentam consistência e homogeneidade, uma vez que nos três meios testados os comportamentos são semelhantes entre eles. A única exceção a esta homogeneidade é encontrada no perfil de dissolução na dosagem 40/12,5 mg (TEL/HCTZ) no tampão acetato pH 4,5, no qual se observa uma grande diferença nos 3 lotes ao nível das quantidades de HCTZ dissolvida ao longo dos vários tempos, que se traduz no facto de apenas um dos 3 lotes ser considerado similar ao produto referência. Sendo estes resultados tão diferentes dos resultados esperados e também dos resultados obtidos nas dissoluções dos lotes das restantes dosagens deverá ser realizada uma repetição destas análises para despistar um possível problema analítico uma vez que não era espectável que estes lotes apresentassem um comportamento tão diferente.

Comparando os resultados obtidos por meio de dissolução verifica-se que nos meios de dissolução com pH 1,2 e com pH 4,5 o comportamento dos vários lotes das diferentes dosagens é semelhante tendo sido todos os lotes considerados similares às respetivas referências em ambos os meios. A única exceção são novamente os dois lotes da dosagem de 40/12,5mg (TEL/HCTZ) que apresentaram dissoluções mais lentas e incompletas, tal como foi já referido anteriormente.

No meio de dissolução com pH 6,8 é novamente observado um comportamento diferente nos lotes da dosagem 40/12,5 mg (TEL/HCTZ). Como foi referido, este não é o meio ideal para a dissolução da HCTZ e por esse motivo as dosagens mais elevadas, 80/25 mg (TEL/HCTZ) e 80/12,5 mg (TEL/HCTZ), apresentaram uma maior dificuldade para se dissolverem completamente, possivelmente devido ao facto dos excipientes presentes na camada do Telmisartan contribuírem mais nestas dosagens para uma maior saturação do meio. Uma vez que nestas duas dosagens as dissoluções foram mais lentas do que as observadas no produto referência não foi possível considerá-las similares aos respetivos produtos de referência. Em relação à dosagem de 40/12,5 mg (TEL/HCTZ), apesar destes comprimidos possuírem a mesma quantidade de HCTZ do que na dosagem 80/12,5 mg (TEL/HCTZ), a massa total dos comprimidos desta dosagem é significativamente inferior à massa dos comprimidos das outras duas dosagens, havendo assim uma menor saturação do meio que permitiu uma maior percentagem dissolvida e rápida dissolução do que nos outros lotes. Esta alteração nos perfis de dissolução dos lotes desta dosagem fez com que, ao contrário das outras dosagens, estes lotes tivessem sido considerados similares ao produto referência.



## 6. CONCLUSÃO

---

Face aos resultados obtidos na validação do método analítico, conclui-se o seguinte:

- O método é específico, pois não existem picos a interferir no mesmo tempo de retenção da substância hidroclorotiazida;
- A linearidade foi verificada entre as concentrações de 2,78 e 16,67 ( $\mu\text{g/mL}$ ), correspondentes ao intervalo entre 20 e 120% da concentração de trabalho;
- Em relação à repetibilidade do equipamento encontra-se validado uma vez que os valores de RSD são inferiores a 2%;
- A repetibilidade do método encontra-se validada, uma vez que cumpre os critérios de aceitação definidos, ou seja, o  $\text{RSD} \leq 3,0\%$  para o total das amostras;
- Na análise da precisão intermédia, esta metodologia encontra-se validada uma vez que ao fazer-se variar os dias, o equipamento e o analista verificou-se que o valor de RSD é inferior a 2% para cada analista e 2,5% para os resultados globais dos dois analistas;
- Relativamente à exatidão do método, foram realizados ensaios de recuperação, para diferentes níveis de concentração tendo sido observadas percentagens de recuperação do ativo para cada nível de concentração dentro dos limites de 95% -105%. Este parâmetro encontra-se por isso validado.

Em relação ao ensaio de estabilidade, todas as soluções analisadas cumpriram o critério de aceitação, à exceção da solução amostra da formulação 40/12,5 mg, que teve uma variação superior a 3%. No entanto, avaliando globalmente todos os dados de estabilidade é possível verificar que todas as outras soluções de padrão e de amostras das duas dosagens apresentam estabilidades de 72h quer no frigorífico quer à temperatura ambiente. Tendo em conta que após esta variação superior a 3% obtida às 48h se voltou a obter uma variação inferior a 3% às 72h, pode-se considerar que este resultado superior a 3% foi devido a um erro analítico e que a estabilidade para todas as soluções fica estabelecida para um período de 72h.

Em relação aos ensaios de dissolução *in vitro* e após a análise feita aos resultados obtidos, verifica-se que todos os lotes das três dosagens do produto teste são similares ao produto de referência nos pH's 1,2 e pH 4,5. Há apenas uma exceção na dosagem 40/12,5 mg no pH 4,5 em que o produto teste apresenta alguma discrepância de valores acabando por haver dois lotes não semelhantes ao produto de referência. Este facto deverá ser investigado, uma vez que pode estar diretamente relacionado com um erro analítico, ou ser devido aos parâmetros usados durante o processo de compressão.

Apesar de ter sido referido previamente, no ponto 3.6, que não existe consenso em relação à classe do sistema BCS (classe III ou IV) à qual a hidroclorotiazida pertence, perante os resultados obtidos e relativamente à decisão de efetuar o estudo de bioequivalência com este produto, esta

classificação torna-se irrelevante. Independentemente da HCTZ ser considerada de classe III (alta solubilidade) ou classe IV (baixa solubilidade), será sempre a permeabilidade o passo limitante nesta molécula, uma vez que ao chegar ao estômago (pH 1,2) a HCTZ se dissolverá rapidamente nos fluidos biológicos (> 85% após 15 minutos), ficando de imediato disponível para ser absorvida. Apesar do produto teste apresentar uma dissolução inferior à do produto de referência no meio pH 6,8, esse facto não se torna crítico dado que antes de chegar à zona do intestino, que apresenta valores de pH nesta gama, a HCTZ já terá sido, em princípio, toda absorvida. Por esta razão, o facto dos perfis de dissolução dos lotes teste não serem similares aos do produto de referência no meio pH 6,8, não é limitativo de avançar para o estudo de bioequivalência.

Caso seja tomada a decisão de se efetuar o estudo de bioequivalência contra o lote do produto de referência, os resultados indicam que o lote que deverá ser utilizado para a realização deste estudo é o lote 40245 da dosagem 80/25 mg (TEL/HCTZ), uma vez que é o que apresenta o comportamento mais semelhante ao produto de referência no meio com pH 1,2.

Apesar dos resultados indicarem a possibilidade da formulação de HCTZ poder ser bioequivalente, não se pode ignorar o facto de que no mesmo comprimido está presente outra substância ativa (TEL), pelo que deverá ser realizada uma avaliação simultânea também aos resultados obtidos nas dissoluções do TEL, pois poderá haver resultados que contrariem a escolha do lote ou até que desaconselhem a realização de um estudo de bioequivalência *in vivo*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] C. for D. E. and Research, "Generic Drugs: Questions and Answers." [Online]. Available: <http://www.fda.gov/Drugs/ResourcesForYou/Consumers/QuestionsAnswers/ucm100100.htm>. [Accessed: 27-Aug-2016].
- [2] G. Kahsay and A. G. Egziabher, "Quality Assessment of the Commonly Prescribed Antimicrobial Drug , Ciprofloxacin Tablets , Marketed in Tigray , Ethiopia," 2010.
- [3] J. A. Carrillo Norte, "Medicamentos genéricos - Qualidade, Segurança e Eficácia," *INFARMED*, vol. 38, no. 5, pp. 362–365, 2011.
- [4] R. Chereson, "Bioavailability, Bioequivalence, and Drug Selection," *Basic Pharmacokinet.*, no. V, p. 8.1-8.111, 1999.
- [5] E. Costa, "Avaliação da Biodisponibilidade e Bioequivalência Aspectos Críticos," *INFARMED*, 2004.
- [6] S. Cascone, F. De Santis, G. Lamberti, and G. Titomanlio, "The Influence of Dissolution Conditions on the Drug ADME Phenomena," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 79, no. 2, pp. 382–391, 2011.
- [7] Ims, "The Role of Generic Medicines in Sustaining Healthcare Systems : A European Perspective Introduction," no. June, 2015.
- [8] J. A. Carrillo Norte, "Medicamentos genéricos," *INFARMED*, vol. 38, no. 5, pp. 362–365, 2009.
- [9] "Centro Regional de informação das Nações Unidas." [Online]. Available: <http://www.unric.org/pt/actualidade/26453-envelhecimento-da-populacao-e-um-dos-maiores-desafios-da-europa>.
- [10] C. Europeias, "Directiva 2004/27/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 31 de Março de 2004," *J. Of. da União Eur.*, pp. 48–53, 2004.
- [11] Ministério da Saúde, "Decreto-Lei n.º 20/2013, de 14 de Fevereiro," *Diário da Repub.*, vol. 1, no. 32, pp. 799–912, 2013.
- [12] R. Minas, "Regulamentação Farmacêutica na garantia da qualidade , eficácia e segurança dos medicamentos genéricos," *Ordem dos Farm.*, p. 52, 2014.
- [13] C. Baumgärtel, "Myths, questions, facts about generic drugs in the EU," *Generics Biosimilars Initiat. J.*, vol. 1, no. 1, pp. 34–38, Feb. 2012.
- [14] EMA, "Guideline on the Investigation of Bioequivalence," *Eur. Med. Agency*, no. January, pp. 1–27, 2010.
- [15] A. S. Misono, J. L. Lee, M. R. Stedman, and M. A. Brookhart, "Clinical Equivalence of Generic and Brand-Name Drugs Used in Cardiovascular Disease," *JAMA*, vol. 300, no. 21, pp. 2514–2526, 2012.
- [16] G. L. Plosker and W. B. White, "Telmisartan/hydrochlorothiazide: A review of its use as fixed-dose combinations in essential hypertension," *Adis Drugs Eval.*, vol. 68, no. 13, pp. 1877–1899, 2008.
- [17] M. P. Maillard and M. Burnier, "Is the fixed-dose combination of telmisartan and hydrochlorothiazide a good approach to treat hypertension?," *Vasc. Health Risk Manag.*, vol. 3, no. 3, pp. 265–278, 2007.
- [18] J. Melorose, R. Perroy, and S. Careas, "No Title No Title," *Statew. Agric. L. Use Baseline 2015*, vol.

- 1, pp. 1–29, 2015.
- [19] J. B. McGill and P. A. Reilly, "Telmisartan plus Hydrochlorothiazide vs Telmisartan or Hydrochlorothiazide monotherapy in Patients with mild to moderate hypertension: A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group trial," *Clin. Ther.*, vol. 23, no. 6, pp. 833–850, 2001.
- [20] A. G. Vishwakarma, R. T. Mogal, and A. Y. Pawar, "Bi-layer tablet - A New Ways in Oral Drug Delivery System," *Int. J. PharmTech Res.*, vol. 6, no. 5, pp. 1416–1428, 2014.
- [21] B. Indústria, "Hidroclorotiazida - Brainfarma Indústria Química e Farmacêutica S.A.," *neo Quim.*
- [22] E. Data, "Hydrochlorothiazide," *IARC -Monographs -108*, vol. 5, 2013.
- [23] S. Qutab, S. Razzaq, and M. Ashfaq, "Simple and Sensitive LC-UV Method for Simultaneous Analysis of Hydrochlorothiazide and Candesartan Cilexetil in Pharmaceutical Formulations," *Acta Chromatogr.*, no. 19, pp. 119–129, 2007.
- [24] EMA, "Scientific Discussion," *EMA*, no. November 2004, pp. 1–29, 2005.
- [25] F. Europeia, "Norma de Análise - Sofarimex," *Farm. Eur.* 8, 2013.
- [26] Infarmed, "Resumo das Características do Medicamento: Hidroclorotiazida," pp. 1–21, 2008.
- [27] R. H. G. Olde Engberink, W. J. Frenkel, B. van den Bogaard, L. M. Brewster, L. Vogt, and B.-J. H. van den Born, *Effects of Thiazide-Type and Thiazide-like Diuretics on cardiovascular Events and Mortality*, vol. 65, no. 5. 2015.
- [28] J. D. Duarte and R. M. Cooper-DeHoff, "Mechanisms for blood pressure lowering and metabolic effects of thiazide and thiazide-like diuretics.," *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.*, vol. 8, no. 6, pp. 793–802, 2010.
- [29] J. Melorose, R. Perroy, and S. Careas, "Hidroclorotiazida Diurético," *pharmanostras*, vol. 1, pp. 3–5, 2015.
- [30] D. a Sica, "Current concepts of pharmacotherapy in hypertension - Thiazide-Type Diuretics: Ongoing Considerations on Mechanism of Action," *J. Clin. Hypertens. (Greenwich).*, vol. 6, no. 11, pp. 661–664, 2004.
- [31] W. Wienen and H. Schierok, "Effects of telmisartan , hydrochlorothiazide and their combination on blood pressure and renal excretory parameters in spontaneously hypertensive rats," *J. Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst.*, pp. 123–128, 2001.
- [32] MIMS, "Image of micardis plus 40/12.5 mg tab Tablet," 2016. [Online]. Available: <http://www.mims.com/indonesia/image/info/micardis plus 40-12-5 mg tab>. [Accessed: 20-Jul-2016].
- [33] S. Ghayas, M. A. Sheraz, F. Anjum, and M. T. Baig, "Factors influencing the dissolution testing of drugs," *Pak. J. Heal. Res.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–11, 2013.
- [34] FDA, "Guidance for Industry Dissolution Testing of Immediate," *FDA*, vol. 4, no. August, pp. 15–22, 1997.
- [35] O. Anand, L. X. Yu, D. P. Conner, and B. M. Davit, "Dissolution testing for generic drugs: an FDA perspective.," *AAPS J.*, vol. 13, no. 3, pp. 328–35, 2011.

- [36] P. Sciences, "In Vitro Dissolution Testing for Solid Oral Dosage Forms," *Part. Sci. Drug Dev. Serv.*, vol. 5, p. 2, 2010.
- [37] V. Shah, "Dissolution: A Quality Control Test vs. A Bioequivalence Test," *Dissolution Technol.*, vol. 8, no. 4, p. 2, 2001.
- [38] S. Azarmi, W. Roa, and R. Löbenberg, "Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms," *Int. J. Pharm.*, vol. 328, no. 1 SPEC. ISS., pp. 12–21, 2007.
- [39] T. O'Hara, A. Dunne, J. Butler, and J. Devane, "A review of Methods Used to Compare Dissolution Profile Data," *Pharm. Sci. Technol. Today*, vol. 1, no. 5, pp. 214–223, 1998.
- [40] T. Sant and A. Moreira, "Perfil de Dissolução."
- [41] C. K. Brown, H. P. Chokshi, B. Nickerson, R. A. Reed, B. R. Rohrs, and P. A. Shah, "Acceptable Analytical Practices for Dissolution Testing of Poorly Soluble Compounds," *Pharm. Technol.*, no. December 2004, pp. 56–65, 2004.
- [42] H. Allaboun, K. A. Alkhamis, and N. D. Al Jbour, "Effect of Surfactant on Dissolution of Spherical Particles in Micellar Systems," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 65, no. 2, pp. 188–197, 2007.
- [43] A. Dokoumetzidis and P. Macheras, "A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System," *Int. J. Pharm.*, vol. 321, no. 1–2, pp. 1–11, 2006.
- [44] Z. Deliang and Q. Yihong, "Dissolution and In vitro-In vivo Correlation," *J. Valid. Technol.*, no. 250, pp. 57–70, 2010.
- [45] M. Swartz and E. Mark, "Developing and Validating Dissolution Procedures for Improved Product Quality," *Pharma Times*, vol. 43, no. 2, pp. 13–17, 2011.
- [46] C. Wharf, "Note for Guidance on The Investigation of Bioavailability and Bioequivalence," *EMA*, no. December 2000, pp. 0–18, 2001.
- [47] P. Costa and J. M. Sousa Lobo, "Modeling and comparison of dissolution profiles," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 13, no. 2, pp. 123–133, 2001.
- [48] A. Prior, P. Frustos, and C. P. Correa, "Comparison of dissolution profiles: Current guidelines," *VI Congr. SEFIG y*, vol. 3, pp. 507–509, 2004.
- [49] FDA, "Guidance for Industry Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms," *U.S. Department of Health and Human Services - Food Drug Administration*, vol. 4, no. August, pp. 15–22, 1997.
- [50] European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare, "2.9.3. Dissolution Test for Solid Dosage Forms," *Eur. Pharmacopoeia*, no. 2, pp. 5117–5123, 2016.
- [51] R. Manadas, M. E. Pina, and F. Veiga, "A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada," *Rev. Bras. Ciências Farm.*, vol. 38, no. 4, pp. 375–399, 2002.
- [52] P. S. Meher, S. Neeraj, and J. Neeraj, "Dissolution specifications, dissolution profiling and dissolution profiles comparison methods," *Int. J. Res. Technol.*, vol. 2, no. 4S, pp. 297–305, 2012.
- [53] F. L. Mota, A. P. Carneiro, A. J. Queimada, S. P. Pinho, and E. A. Macedo, "Temperature and solvent effects in the solubility of some pharmaceutical compounds: Measurements and modeling," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 37, no. 3–4, pp. 499–507, 2009.

- [54] J. Alsenz and M. Kansy, "High throughput solubility measurement in drug discovery and development," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 59, no. 7, pp. 546–567, 2007.
- [55] B. Faller and P. Ertl, "Computational approaches to determine drug solubility," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 59, no. 7, pp. 533–545, 2007.
- [56] T. Peck, S. Hill, and M. Williams, "Drug passage across the cell membrane," *Pharmacol. Anaesth. Intensive Care, third Ed.*, pp. 1–10, 2008.
- [57] K. R. Chu, E. Lee, S. H. Jeong, and E.-S. Park, "Effect of particle size on the dissolution behaviors of poorly water-soluble drugs," *Arch. Pharm. Res.*, vol. 35, no. 7, pp. 1187–95, 2012.
- [58] S. Storpirtis, R. Marcolongo, F. S. Gasparotto, and C. M. Vilanova, "A Equivalência Farmacêutica no Contexto da Intercambialidade entre Medicamentos Genéricos e de Referência : Bases Técnicas e Científicas," *infarma*, vol. 16, pp. 51–56, 2004.
- [59] Z. N. Mahmoudi, T. Farrell, S. B. Upadhye, and A. R. Rajabi-siahboomi, "Effect of Drug Particle Size on Blend Segregation and Content Uniformity of Low Dose Tablets Poster Reprint," pp. 18–21.
- [60] D. Horter and J. B. Dressman, "Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 25, no. 1, pp. 3–14, 1997.
- [61] E. Thiruvengadam and G. Vellaisamy, "Polymorphism in Pharmaceutical Ingredients - A Review," *World J. Pharm. Pharmaceutical Sci.*, vol. 3, no. 3, pp. 621–633, 2014.
- [62] B. H. Kim and J. K. Kim, "Pharmaceutical studies on the polymorphism of hydrochlorothiazide," *Arch. Pharm. Res.*, vol. 7, no. 1, pp. 47–52, 1984.
- [63] K. Jackson, D. Young, and S. Pant, "Drug-excipient interactions and their affect on absorption," *Pharm. Sci. Technol. Today*, vol. 3, no. 10, pp. 336–345, 2000.
- [64] M. L. Chen, "Lipid excipients and delivery systems for pharmaceutical development: A regulatory perspective," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, no. 6, pp. 768–777, 2008.
- [65] R. Panakanti and A. S. Narang, "Impact of Excipient Interactions on Drug Bioavailability from Solid Dosage Forms," *Pharm. Res.*, vol. 29, no. 10, pp. 2639–2659, 2012.
- [66] K. Jackson, D. Young, and S. Pant, "Drug – excipient interactions and their affect on absorption," *PSTT*, vol. 3, no. 10, pp. 336–345, 2000.
- [67] R. Rowe, P. Sheskey, and M. Quinn, "Handbook of Pharmaceutical Excipients," *Handb. Pharm. excipients, Sixth Ed.*, pp. 549–553, 2009.
- [68] N. Zhao and L. L. Augsburger, "The influence of swelling capacity of superdisintegrants in different pH media on the dissolution of hydrochlorothiazide from directly compressed tablets.," *AAPS PharmSciTech*, vol. 6, no. 1, pp. E120-6, 2005.
- [69] S. A. Qureshi, "Developing Discriminatory Drug Dissolution Tests and Profiles: Some Thoughts for Consideration on the Concept and Its Interpretation," *Heal. (San Fr.*, no. November, pp. 18–23, 2006.
- [70] Q. Wang, N. Fotaki, and Y. Mao, "Biorelevant Dissolution: Methodology and Application in Drug Development," *Dissolution Technol.*, vol. 16, no. 3, pp. 6–12, 2009.
- [71] Agilent, "Dissolution Reference Guide," no. August, p. 1, 2010.

- [72] T. Schauble, "A Comparison of Various Sampling Methods for Tablet Release Tests Using the Stirrer Methods IUSP Apparatus 1 li 2)," *Dissolution Technol.*, 1996.
- [73] B. Basanta Kumar Reddy and A. Karunakar, "Biopharmaceutics classification system: A regulatory approach," *Dissolution Technol.*, vol. 18, no. 1, pp. 31–37, 2011.
- [74] J. Wolfgang, "Proposal to Waive In Vivo Bioequivalence Requirements For the Who Model List of Essential Medicines Immediate release , Solid Oral Dosage Forms," *World Heal. Organ.*, pp. 1–45, 2005.
- [75] B. Vikaas and N. Arun, "The Biopharmaceutical Classification System (BCS): Present Status and Future Prospectives," *Int. Res. J. Pharm.*, vol. 3, no. 9, pp. 7–11, 2012.
- [76] E. 8.3 Pharmacopeia, "2.2.29. liquid chromatography –," *Eur. Pharmacopoeia 8.3*, no. 1, pp. 4175–4176, 2015.
- [77] J. C. Pessoa, "Cromatografia," *Técnicas Exp.*, 1993.
- [78] T. Kupiec, "Quality-Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography.," *Int. J. Pharm. Compd.*, vol. 8, no. 3, pp. 223–227, 2004.
- [79] Agilent Technologies Incorporated, "HPLC Basics Fundamentals of Liquid Fundamentals of High Performance Liquid Chromatography ( HPLC )," *Agil. Technol.*, pp. 1–37, 2012.
- [80] R. B. Chust, "Introdução Cromatografia de Líquidos," *Bol. SPQ*, vol. 39, pp. 43–54, 1990.
- [81] ICH, "ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology," *Int. Conf. Harmon.*, vol. 1994, no. November 1996, p. 17, 2005.
- [82] J. Ermer and J. Miller, *Method validation in pharmaceutical analysis. A Guide to best Practice*. 2005.
- [83] A. Ferreira, "Validação De Métodos Analíticos (1ª Parte)," *Arq. do Mus. Dinâmico Interdiscip.*, vol. 11, no. 2, pp. 26–31, 2016.
- [84] G. VALENTINI, S. R.; SOMMER, A. S.; MATIOLI, "Validação de métodos analíticos (2ªParte)," *Arq. Mudj*, vol. 11, no. 2, pp. 26–31, 2007.
- [85] G. Ibrahim, "Observations on the Dissolution Behavior of a Tablet Formulation : Effect of Compression Forces," *J. Pharm. Sci.*, vol. 74, no. 5, pp. 575–577, 1985.