

Leonardo Henrique Toehwé

Avaliação do perfil de dissolução de comprimidos de prednisona bioequivalentes ao longo do estudo de estabilidade.

Rio de Janeiro

2013

Leonardo Henrique Toehwé

Avaliação do perfil de dissolução de comprimidos de prednisona bioequivalentes ao longo do estudo de estabilidade.

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ

Orientador: Prof. Dr. Helvécio Vinícius Antunes Rocha

Rio de Janeiro

2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

T641a

Toehwé, Leonardo Henrique

Avaliação do perfil de dissolução de comprimidos de prednisona bioequivalentes ao longo do estudo de estabilidade. / Leonardo Henrique Toehwé. – Rio de Janeiro, 2013.

xvii, 128f. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Helvécio Vinícius Antunes Rocha

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, 2013.

Bibliografia: f. 120-128

1. Perfil de dissolução. 2. Estudo de estabilidade.
3. Biodisponibilidade. 4. Permeabilidade. 5.Caco-2. I. Título.

CDD 615.1

Leonardo Henrique Toehwé

**Avaliação do perfil de dissolução de comprimidos de prednisona
bioequivalentes ao longo do estudo de estabilidade**

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ

Aprovado em 12 de julho de 2013.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Helvécio Vinícius Antunes Rocha
(Orientador – Presidente da Banca)
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ

Prof^a. Dr^a. Erika Martins de Carvalho
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ

Prof^a. Dr^a. Samanta Cardozo Mourão
Faculdade de Farmácia – UFF

Prof. Dr. Luiz Cláudio Rodrigues Pereira da Silva
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Rio de Janeiro

2013

AGRADECIMENTOS

À Renata Castro, pelo apoio e incentivo para a minha inscrição no processo seletivo do mestrado. “Tenho certeza que você irá passar”.

À direção do Laboratório Químico Farmacêutico da Aeronáutica pela liberação para realização do mestrado e por fornecer as condições para realização do estudo de estabilidade.

À minha chefia pelo apoio, compreensão e liberação para as atividades do mestrado.

À Danielle pelo amor, paciência e companheirismo de sempre.

Aos meus amigos que souberam compreender a minha ausência e impaciência durante este período.

Ao Helvécio, pela confiança no trabalho, incentivo, ajuda e explicações.

Aos professores e funcionários do programa de pós-graduação.

A Todos do controle de qualidade do LAQFA pelo apoio técnico e dedicação.

À Miretinha pela ajuda durante a realização dos perfis de dissolução.

À Lívia Prado na ajuda essencial para caracterização das amostras de prednisona.

Ao Thiago pela ajuda com o *software* GastroPlus™.

Ao Lula pela ajuda, explicações, dedicação e paciência em relação os testes com células Caco-2.

Aos meus colegas de trabalho Maria Fernanda, Bruno, André, Pamela, Samanta, Marcelle e Damiana pelo apoio e compreensão em relação as minhas ausências.

Aos integrantes dos Laboratórios de Microscopia Eletrônica da COPPE/UFRJ e do IME; do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica de Farmanguinhos/FIOCRUZ; do Laboratório do CENPES; dos Laboratórios Multiusuários da UFF, de Difração de Raios X, de Análise Térmica e de Espectroscopia Vibracional e Eletrônica que permitiram a realização de ensaios para condução desse trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho.

“Ninguém poderá jamais aperfeiçoar-se, se não
tiver o mundo como mestre. A experiência se
adquire na prática.”
(William Shakespeare)

RESUMO

TOEHWÉ, L.H. Avaliação do perfil de dissolução de comprimidos de prednisona bioequivalentes ao longo do estudo de estabilidade. 2013. 128f. Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2013.

As formas farmacêuticas sólidas de uso oral, sobretudo os comprimidos, são as mais utilizadas na terapêutica, pois são de fácil administração e apresentam alta produtividade e um custo relativamente baixo, além de proporcionarem ao fármaco um meio mais estável em relação às formas semi-sólidas e líquidas. No entanto, um medicamento na forma sólida pode sofrer alterações devido à ação de vários fatores como umidade, temperatura, luz e oxigênio do ambiente e pelas características do próprio estado sólido da substância ativa e dos excipientes empregados na formulação. A instabilidade de um fármaco, na forma isolada ou em uma formulação, pode alterar vários parâmetros de qualidade como aspecto, teor, dissolução e perfil de dissolução. O perfil de dissolução de um medicamento é um parâmetro de qualidade que deve ser avaliado durante a produção e estabilidade das formas farmacêuticas sólidas orais, pois a alteração do mesmo durante o período de armazenamento pode alterar a quantidade de fármaco disponível para absorção, podendo comprometer a sua biodisponibilidade e eficácia terapêutica. Nesse estudo o perfil de dissolução de comprimidos de prednisona 20mg bioequivalentes do medicamento referência e de três formulações teste foram avaliadas, ao longo do estudo de estabilidade. Durante o estudo os comprimidos de prednisona e o insumo farmacêutico ativo (IFA) prednisona de dois diferentes fabricantes foram caracterizado quanto às suas propriedades físicas e físico-químicas. O IFA também foi avaliado quanto a sua permeabilidade em células Caco-2. Os dados obtidos foram utilizados para elaborar um estudo de correlação *in vitro-in silico-in vivo* e desenvolver estudos de predição de biodisponibilidade *in silico*. Os resultados permitiram verificar que os perfis de dissolução entre os comprimidos do medicamento referência e dos lotes teste não se mantiveram equivalentes ao longo do estudo. Verificou-se também que ambas as amostras do IFA prednisona tratavam-se na mesma forma cristalina e que essa não sofreu transição durante o estudo, que uma correlação *C/VIV* não pode ser obtida e que A simulação da biodisponibilidade realizada para a prednisona utilizando o software GastroPlus™ foi bem sucedida comparada os resultados obtidos *in vivo*.

Palavras-chave: Perfil de dissolução. Estudo de estabilidade. Biodisponibilidade.

Permeabilidade. Caco-2.

ABSTRACT

The solid dosage forms for oral use, especially tablets are the most used in therapy because they are easily administered and have high productivity relatively low cost and to provide a more stable drug to the forms semi-solid net. However, a drug in solid form may change due to the action of various factors such as humidity, temperature, light and oxygen from the environment and the characteristics of the solid state of the active substance and the excipients used in the formulation. The instability of a drug, in alone or in a formulation can change various quality parameters such as aspect, content, dissolution and dissolution profile. The dissolution profile of a drug is a quality parameter that must be evaluated during the production and stability of solid oral dosage forms, for the same change during the storage period can change the amount of drug available for absorption, which may compromise the the bioavailability and therapeutic efficacy. In this study the dissolution profile of 20 mg prednisone tablets bioequivalent to the reference product and three test formulations were evaluated throughout the stability testing. During the study, prednisone tablets and the active pharmaceutical ingredient (API) prednisone, two different manufacturers were characterized with respect to their physical properties and physicochemical. The API was also evaluated for their permeability in Caco-2 cells. The data were used to develop a correlation study in *vitro-in silico* -vivo studies and develop *in silico* prediction of bioavailability. The results showed that the dissolution profiles of the drug from the tablets and the reference test batches did not remain equal throughout the study. It was also noted that both samples API prednisone treated in the same crystal form and that the transition has not suffered during the study, a correlation IVIVC can't be obtained and bioavailability of simulation performed for prednisone using software GastroPlus™ was successful compared the results obtained *in vivo*.

Keywords: Dissolution profile. *Stability testing*. Bioavailability. Permeability. Caco-2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura química da prednisona.....	22
Figura 2 –	Representação da curva de concentrações plasmáticas <i>versus</i> tempo e os parâmetros farmacocinéticos empregados nos cálculos da biodisponibilidade após a administração de uma dose de medicamento por via extravascular.....	31
Figura 3 –	Aparato para dissolução intrínseca.....	48
Figura 4 –	Sala climática para estudo de estabilidade de longa duração localizada no Laboratório Químico farmacêutico da aeronáutica.....	51
Figura 5 –	Aparelho dissolutor modelo SR8 PLUS da marca Hanson Research. Localizado no Laboratório Químico farmacêutico da Aeronáutica.....	56
Figura 6 –	Tela do Módulo “ <i>compound</i> ” do programa GastroPlus™.....	63
Figura 7 –	Tela do módulo “ <i>physiology</i> ” do programa GastroPlus™.....	63
Figura 8 –	Tela do módulo “ <i>pharmacokinetics</i> ” do programa GastroPlus™.....	64
Figura 9 –	Tela do módulo “ <i>simulation</i> ” do programa GastroPlus™.....	65
Figura 10 –	Tela do módulo “ <i>graph</i> ” do programa GastroPlus™.....	65
Figura 11 –	Tela do módulo <i>IVIVCPlus</i> ™ com a opção “ <i>In Vitro Data</i> ” habilitada.....	66
Figura 12 –	Tela do módulo <i>IVIVCPlus</i> ™ com a opção “ <i>In Vivo Data</i> ” habilitada.....	67
Figura 13 –	Tela do módulo <i>IVIVCPlus</i> ™ com a opção “ <i>IVIVC</i> ” habilitada.....	68
Figura 14 –	Tela do módulo <i>IVIVCPlus</i> ™ com a opção “ <i>Convolution</i> ” habilitada.....	69
Figura 15 –	Curvas de TG obtidas para as amostras A e B do IFA prednisona nos tempos zero e 360 dias de estudo.....	72
Figura 16 –	Curva de DSC das amostras A e B de prednisona sob uma taxa de aquecimento de 2,5°C/min	74
Figura 17 –	Curva de DSC das amostras A e B de prednisona sob uma taxa de aquecimento de 5°C/min.....	74
Figura 18 –	Curva de DSC das amostras A e B de prednisona sob uma taxa de aquecimento de 10°C/min.....	75
Figura 19 –	Padrões de difração das amostras A e B de prednisona nos tempos zero e 360 dias de estudo de estabilidade e do padrão simulado.....	76
Figura 20 –	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das amostras A e B de prednisona nos tempos zero e 360 dias de estudo de estabilidade e dos padrões de referencia USP (Pd USP) e Farmacopeia Brasileira (Pd FB).....	78
Figura 21 –	Dissolução intrínseca das amostras A e B de prednisona em 900 mL de água contendo 1,2% de laurilsulfato de sódio usando aparato 2 a 150 rpm.....	79

Figura 22 –	Comparação entre os perfis de dissolução intrínseca das amostras A e B de prednisona.....	82
Figura 23 –	Fotomicrografias do MEV amostra A (A e B); amostra B (C e D).....	85
Figura 24 –	Perfis de dissolução dos comprimidos de prednisona do lote R023 nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 dias de estudo.....	93
Figura 25 –	Perfis de dissolução dos comprimidos de prednisona do lote P0020020910 nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 dias de estudo.....	93
Figura 26 –	Perfis de dissolução dos comprimidos de prednisona do lote MEST01 nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 dias de estudo.....	94
Figura 27 –	Perfis de dissolução dos comprimidos de prednisona do lote MEST02 nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 dias de estudo.....	94
Figura 28 –	Perfis de dissolução comparativos dos comprimidos de prednisona dos lotes R023, P0020020910, MEST01e MEST02 no tempo zero do estudo de estabilidade.....	99
Figura 29 –	Perfis de dissolução comparativos dos comprimidos de prednisona dos lotes R023, P0020020910, MEST01e MEST02 no tempo 90 dias de estudo de estabilidade.....	99
Figura 30 –	Perfis de dissolução comparativos dos comprimidos de prednisona dos lotes R023, P0020020910, MEST01e MEST02 no tempo 180 dias de estudo de estabilidade.....	100
Figura 31 –	Perfis de dissolução comparativos dos comprimidos de prednisona dos lotes R023, P0020020910, MEST01e MEST02 no tempo 270 dias de estudo de estabilidade.....	100
Figura 32 –	Perfis de dissolução comparativos dos comprimidos de prednisona dos lotes R023, P0020020910, MEST01e MEST02 no tempo 360 dias de estudo de estabilidade.....	101
Figura 33 –	Estudo de citotoxicidade para amostra A do IFA prednisona e controles HBSS pH 6,8 HBSS pH 6,8 + EtOH 5%.....	106
Figura 34 –	Curva média da concentração plasmática da prednisolona <i>versus</i> tempo nos voluntários, após a administração de dose única dos comprimidos de prednisona 20mg do biolote P0020020910 e R023.....	109

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Cálculo do percentual dissolvido de ativo em cada tempo de amostragem.....	57
Equação 2 - Cálculo utilizado para determinar F1.....	57
Equação 3 - Cálculo utilizado para determinar F2.....	58
Equação 4 - Cálculo do coeficiente de permeabilidade aparente (Papp).....	61
Equação 5 - Cálculo da porcentagem de erro de predição (%EP).	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Propriedades de interesse para área farmacêutica que podem sofrer alterações com o polimorfismo.....	25
Tabela 2 –	Especificações e parâmetros para o estudo de estabilidade de medicamentos sólidos orais, preconizados pela ANVISA, no “Guia para Realização de Estudos de Estabilidade”.....	27
Tabela 3 –	Definições e aplicações dos estudos de BDA, BDR e BE.....	32
Tabela 4 –	Correlação IVIV para fármacos de liberação imediata baseada no SCB.....	33
Tabela 5 –	Fatores que podem influenciar na obtenção de uma CIVIV.....	37
Tabela 6 –	Principais vantagens e desvantagens referentes às técnicas utilizadas para caracterização de um IFA no estado sólido.....	41
Tabela 7 –	Equipamentos e acessórios utilizados na formulação e caracterização dos comprimidos de prednisona e da substância ativa	44
Tabela 8 –	Excipientes utilizados na produção dos lotes Testes e do medicamento referência.....	52
Tabela 9 –	Condições utilizadas para determinação do perfil de dissolução dos comprimidos de prednisona.....	55
Tabela 10 –	Dados obtidos a partir das curvas de DSC a 2,5 °C.min ⁻¹ , 5 °C.min ⁻¹ e 10 °C.min ⁻¹ <i>Tonset</i> (início da fusão), <i>Tpeak</i> (final da fusão) e ΔT (<i>Tpeak</i> – <i>Tonset</i>) das amostras A e B de prednisona.....	73
Tabela 11 –	Principais grupos e frequências selecionadas de FTIR das amostras A e B de prednisona e dos padrões USP (Pd USP) e Farmacopeia Brasileira (Pd FB) nos tempos t=0 e t=360.....	77
Tabela 12 –	Resultados da taxa de dissolução intrínseca (TDI) em mg.min ⁻¹ .cm ⁻² das amostras A e B de prednisona.....	80
Tabela 13 –	Quantidade de prednisona em (%) dissolvida das amostras A e B nos tempos t=5, t=10, t=15, t=20, t=25 e t=30 minutos.....	81
Tabela 14 –	Valores de solubilidade, segundo o SCB, obtidos experimentalmente para as amostras A e B de prednisona em estudo	83
Tabela 15 –	Resultados obtidos para o teste de Teor das amostras A e B de prednisona nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 dias de estudo.....	86
Tabela 16 –	Resultados obtidos no teste de peso médio nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 dias de estudo	87
Tabela 17 –	Resultados obtidos para o teste de Desintegração nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 dias de estudo.....	87
Tabela 18 –	Resultados obtidos para o teste de umidade nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 dias de estudo	88
Tabela 19 –	Resultados obtidos no teste de dureza nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 dias de estudo	90

Tabela 20 – Resultados obtidos para o teste de friabilidade nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 dias de estudo.....	90
Tabela 21 – Resultados da uniformidade de conteúdo no tempo zero.....	91
Tabela 22 – Resultados obtidos para o teste de Teor nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 dias de estudo.....	92
Tabela 23 – Quantidade de prednisona em (%) dissolvida do lote R023 nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 dias de estudo de estabilidade. Fator de diferença (F1) e Fator de semelhança (F2) em relação ao Tempo inicial.....	95
Tabela 24 – Quantidade de prednisona em (%) dissolvida do lote P0020020910 nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 dias de estudo. Fator de diferença (F1) e Fator de semelhança (F2) em relação ao Tempo inicial.....	95
Tabela 25 – Quantidade de prednisona em (%) dissolvida do lote MEST01 nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 dias de estudo. Fator de diferença (F1) e Fator de semelhança (F2) em relação ao Tempo inicial.....	96
Tabela 26 – Quantidade de prednisona em (%) dissolvida do lote MEST02 nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 dias de estudo. Fator de diferença (F1) e Fator de semelhança (F2) em relação ao Tempo inicial.....	96
Tabela 27 – Quantidade de prednisona em (%) dissolvida dos lotes R023, P0020020910, MEST01 e MEST02 no tempo zero do estudo de estabilidade. Fator de diferença (F1) e Fator de semelhança (F2) em relação ao lote R023.....	101
Tabela 28 – Quantidade de prednisona em (%) dissolvida dos lotes R023, P0020020910, MEST01 e MEST02 no tempo 90 dias de estudo de estabilidade. Fator de diferença (F1) e Fator de semelhança (F2) em relação ao lote R023.....	102
Tabela 29 – Quantidade de prednisona em (%) dissolvida dos lotes R023, P0020020910, MEST01 e MEST02 no tempo 180 dias de estudo de estabilidade. Fator de diferença (F1) e Fator de semelhança (F2) em relação ao lote R023.....	102
Tabela 30 – Quantidade de prednisona em (%) dissolvida dos lotes R023, P0020020910, MEST01 e MEST02 no tempo 270 dias de estudo de estabilidade. Fator de diferença (F1) e Fator de semelhança (F2) em relação ao lote R023.....	103
Tabela 31 – Quantidade de prednisona em (%) dissolvida dos lotes R023, P0020020910, MEST01 e MEST02 no tempo 360 dias de estudo de estabilidade. Fator de diferença (F1) e Fator de semelhança (F2) em relação ao lote R023.....	103
Tabela 32 – Valores de F1 e F2 calculados para os lotes P0020020910, MEST01 e MEST02 em relação ao lote R023 nos tempos inicial, t=90, t=180, t=270 e t=360 dias de estudo.....	105
Tabela 33 – Quantificação da prednisona no estudo de permeação em células caco-2.....	107

Tabela 34 –	Parâmetros farmacocinéticos obtidos a partir da curva média de concentração plasmática versus tempo da prednisolona.....	109
Tabela 35 –	Parâmetros empregados na simulação da biodisponibilidade da amostra A do IFA prednisona, obtidos experimentalmente (E), na literatura(L) e no estudo de bioequivalencia (BE).....	111
Tabela 36 –	Parâmetros farmacocinéticos obtidos no estudo de BE e os simulados pelo software GastroPlus™.....	111
Tabela 37 –	Simulação da porcentagem absorvida da amostra A do IFA prednisona ao longo dos compartimentos.....	112
Tabela 38 –	Parâmetros farmacocinéticos obtidos <i>in vivo</i> (EXP) e simulado (SIM) por meio da correlação entre os perfis de dissolução para o lote R023 obtidos nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 e a concentração plasmática da prednisolona obtida no estudo de BE....	113
Tabela 39 –	Parâmetros farmacocinéticos obtidos <i>in vivo</i> (EXP) e simulado (SIM) por meio da correlação entre os perfis de dissolução para o lote P0020020910 obtidos nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 e a concentração plasmática da prednisolona obtida no estudo de BE..	114
Tabela 40 –	Parâmetros farmacocinéticos obtidos <i>in vivo</i> (EXP) e simulado (SIM) por meio da correlação entre os perfis de dissolução para o lote MEST01 obtidos nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 e a concentração plasmática da prednisolona obtida no estudo de BE....	114
Tabela 41 –	Parâmetros farmacocinéticos obtidos <i>in vivo</i> (EXP) e simulado (SIM) por meio da correlação entre os perfis de dissolução para o lote MEST02 obtidos nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 e a concentração plasmática da prednisolona obtida no estudo de BE.....	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	Área sob a curva
BE	Bioequivalência
BD	Biodisponibilidade
BDA	Biodisponibilidade Absoluta
BDR	Biodisponibilidade Relativa
C_{max}	Concentração Máxima Plasmática
CIVIV	Correlação <i>in vitro/in vivo</i>
IVISIV	Correlação <i>in vitro- in silico- in vivo</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DMF	<i>Drug Master File</i>
DRX	Difração de raio x
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIP	<i>International Pharmaceutical Federation</i>
GC	Glicocorticoide
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
IFA	Insumo farmacologicamente ativo
LAQFA	Laboratório Químico-Farmacêutico da Aeronáutica
Log D	Coeficiente de distribuição
Log P	Coeficiente de partição água-octanol
LTF	Laboratório de tecnologia Farmacêutica
MS	Ministério da Saúde
NuBEC	Núcleo de Bioequivalência e Ensaios Clínicos
P_{app}	Coeficiente de permeabilidade aparente
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
R^2	Coeficiente de correlação linear quadrático
RE	Resolução específica
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
TACA	Modelo de transito e absorção compartimental avançado
TGA	Análise Termogravimétrica
TEER	<i>Transepithelial Electric Resistance</i>
T_{max}	Tempo máximo
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	18
1	REVISÃO DA LITERATURA	20
1.1	Prednisona	20
1.1.1	<u>Farmacocinética</u>	21
1.1.2	<u>Características físicas e Físico-químicas</u>	22
1.1.3	<u>Permeabilidade e Biodisponibilidade</u>	23
1.2	Estabilidade de formulações farmacêuticas sólidas orais	23
1.3	Dissolução	27
1.3.1	<u>Estabilidade de Dissolução</u>	29
1.4	Biodisponibilidade e Bioequivalência	30
1.4.1	<u>Sistema de classificação biofarmacêutica</u>	33
1.4.2	<u>Permeabilidade intestinal</u>	34
1.4.3	<u>Estudos <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i> e bioisenção</u>	35
1.4.4	<u>Estudos <i>in silico</i></u>	38
1.4.4.1	GastroPlus™.....	39
1.5	Técnicas para caracterização do estado sólido	40
2	OBJETIVOS	42
2.1	Objetivo geral	42
2.2	Objetivos específicos	42
3	MATERIAL E METODOS	43
3.1	Material	43
3.1.1	<u>Comprimidos de prednisona e IFA</u>	43
3.1.2	<u>Equipamentos e acessórios</u>	43
3.2	Métodos	45
3.2.1	<u>Caracterização física do insumo farmacêutico prednisona</u>	45
3.2.1.1	Calorimetria Exploratória Diferencial	45
3.2.1.2	Análise Termogravimétrica	46
3.2.1.3	Difração de raios X de Pó.....	46
3.2.1.4	Espectroscopia de infravermelho.....	47
3.2.1.5	Dissolução intrínseca.....	47
3.2.1.6	Dissolução por dispersão.....	49
3.2.1.7	Microscopia eletrônica de varredura.....	49
3.2.2	<u>Avaliação do insumo farmacêutico ativo de acordo com os critérios farmacopeicos</u>	50
3.2.3	<u>Avaliação dos comprimidos de prednisona ao longo da estabilidade</u>	51
3.2.3.1	Determinação de peso médio.....	53

3.2.3.2	Determinação da dureza.....	53
3.2.3.3	Determinação de friabilidade.....	53
3.2.3.4	Determinação do tempo de desintegração	53
3.2.3.5	Uniformidade de conteúdo.....	54
3.2.3.6	Doseamento.....	54
3.2.3.7	Determinação da umidade.....	54
3.2.3.8	Perfil de dissolução.....	55
3.3	Estudo de permeação do fármaco em células Caco-2.....	58
3.3.1	<u>Estudo de citotoxicidade.....</u>	58
3.3.2	<u>Ensaio de permeabilidade em monocamada de células Caco-2.....</u>	59
3.4	Estudo de bioequivalência.....	61
3.5	Simulação <i>in silico</i>.....	62
3.5.1	<u>Simulação da Biodisponibilidade.....</u>	62
3.5.2	<u>Correlação <i>in vitro-in vivo</i>.....</u>	66
3.5.3	<u>Análises estatísticas.....</u>	70
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4.1	Caracterização física do insumo farmacêutico prednisona.....	71
4.1.1	<u>Análise Termogravimétrica (TGA)</u>	71
4.1.2	<u>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</u>	72
4.1.3	<u>DRX</u>	75
4.1.4	<u>Espectroscopia no infravermelho.....</u>	76
4.1.5	<u>Dissolução Intrínseca</u>	79
4.1.6	<u>Dissolução por dispersão</u>	81
4.1.7	<u>Solubilidade.....</u>	82
4.1.8	<u>Microscopia eletrônica de varredura</u>	84
4.2	Avaliação do insumo farmacêutico ativo de acordo com os critérios farmacopeicos.....	85
4.3	Avaliação dos comprimidos de prednisona ao longo da estabilidade.....	86
4.3.1	<u>Determinação de peso médio</u>	86
4.3.2	<u>Desintegração.....</u>	87
4.3.3	<u>Umidade</u>	88
4.3.4	<u>Dureza</u>	89
4.3.5	<u>Friabilidade.....</u>	90
4.3.6	<u>Uniformidade de conteúdo.....</u>	91
4.3.7	<u>Doseamento</u>	91
4.3.8	<u>Perfil de dissolução.....</u>	92
4.3.9	<u>Comparação entre os perfis de dissolução.....</u>	98

4.4	Estudos de permeação em células Caco-2	106
4.4.1	<u>Estudo de citotoxicidade</u>	106
4.4.2	<u>Ensaio de permeabilidade em monocamada de células Caco-2</u>	107
4.5	Estudo de bioequivalência	108
4.6	Simulação da biodisponibilidade <i>in silico</i>	110
4.7	Correlação <i>in vitro-in vivo</i>	113
5	CONCLUSÃO	117
6	PERSPECTIVAS	119
7	REFERÊNCIAS	120

INTRODUÇÃO

A prednisona é um dos glicocorticóides mais utilizados na prática clínica. Por se tratar de uma molécula inativa, esse fármaco deve ser convertido a prednisolona no fígado para exercer seu efeito terapêutico (YOKOYAMA, 1992; RANG, 2001). Seu uso clínico é indicado para inúmeras doenças crônicas e agudas como artrite, hepatite, hanseníase, doenças auto-imunes, inflamatórias e alérgicas (KAISER & KLER, 2002).

No Brasil, a prednisona pode ser encontrada no mercado na forma de comprimidos de uso oral de liberação imediata, nas concentrações de 5,0 mg, 20mg e 50mg, sendo que o medicamento referência para essas concentrações é o Meticorten, produzido pela Mantecorp (ANVISA, 2013).

As formas farmacêuticas sólidas de uso oral, sobretudo os comprimidos, são as mais utilizadas na terapêutica, pois são de fácil administração e apresentam alta produtividade e um custo relativamente baixo, além de proporcionarem ao fármaco um meio mais estável em relação às formas semi-sólidas e líquidas (LACHMAN *et al.*, 2001). No entanto, um medicamento na forma sólida pode sofrer alterações devido à ação de vários fatores como umidade, temperatura, luz e oxigênio do ambiente e pelas características do próprio estado sólido da substância ativa e dos excipientes empregados na formulação (FLORENCE & ATTWOOD, 2003).

A instabilidade de um fármaco, na forma isolada ou em uma formulação, pode alterar vários parâmetros de qualidade como aspecto, teor, dissolução e perfil de dissolução. Dessa forma, a avaliação da estabilidade de um medicamento faz-se necessária no seu desenvolvimento e durante todo seu o período de prateleira (QIU, 2009; MURTY & GUEBRE-SELLASSIE, 1992).

O perfil de dissolução de um medicamento é um parâmetro de qualidade que deve ser avaliado durante a produção e estabilidade das formas farmacêuticas sólidas orais, pois a alteração do mesmo durante o período de armazenamento pode alterar a quantidade de fármaco disponível para absorção, podendo comprometer a sua biodisponibilidade e eficácia terapêutica (MURTY & GUEBRE-SELLASSIE, 1992). Cabe ressaltar que a legislação brasileira não prevê o acompanhamento do

perfil de dissolução para produtos farmacêuticos sólidos orais durante o estudo de estabilidade, sendo esse teste preconizado somente durante o estudo de equivalência farmacêutica para fins de registro ou em alterações pós-registro de um medicamento.

Dessa forma, a proposta desse trabalho consiste na avaliação do perfil de dissolução de comprimidos de prednisona 20mg bioequivalentes e na caracterização química e física do insumo farmacêutico ativo (IFA) e da formulação, para que essa sirva como fonte de dados para justificar uma possível alteração no perfil de liberação do fármaco durante a estabilidade. Os dados obtidos nos testes de bioequivalência, perfil de dissolução, solubilidade e permeabilidade em células Caco-2 foram utilizados no desenvolvimento de um estudo de predição de biodisponibilidade *in silico* e na elaboração de um estudo de correlação *in vitro-in silico-in vivo*.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 *Prednisona*

A prednisona é um glicocorticóide (GC) intensamente empregado na prática clínica (ROMANHOLI & SALGADO, 2007). Seu uso terapêutico é recomendado para uma grande variedade de doenças crônicas e agudas como artrite, hepatite, doenças alérgicas, asma, hanseníase, doenças auto-imunes e muitas outras doenças inflamatórias (KAISER & KLER, 2002).

Os GC de modo geral atuam no organismo promovendo a redução radical do processo inflamatório. O mecanismo de ação pela qual essa classe farmacêutica promove tal redução está relacionado a uma modulação dos efeitos supressores dos leucócitos periféricos sobre as quimocinas e citocinas inflamatórias. Outra forma dos GC reduzirem a resposta inflamatória é por meio da redução da síntese do fator de ativação plaquetária dos leucotrienos e das prostaglandinas (KATZUNG, 2003).

No Brasil, existem várias indústrias que produzem e comercializam a prednisona na forma de comprimidos simples para uso oral, sendo esses registrados no Ministério da Saúde (MS) como medicamentos similares ou genéricos. Atualmente o Meticorten[®] é o medicamento referência, para as formulações de comprimidos simples de liberação imediata nas concentrações de 5, 20 e 50mg (ANVISA, 2013).

Na corticoide-terapia, as menores doses de prednisona prescritas variam entre 5 e 7,5 mg/dia. Na literatura não existe dados referentes a dose diária máxima recomendada, contudo as prescrições devem ser elaboradas de forma individual e levando em consideração a gravidade da doença e a resposta terapêutica do paciente (KAISER & KLER, 2002).

A prednisona é um fármaco considerado seguro em relação ao seu índice terapêutico. Dessa forma, o monitoramento dos seus níveis séricos só necessita ser feito no caso de doenças graves e que requerem altas doses. A interrupção do tratamento com a prednisona deve ocorrer gradualmente, com a redução da dose

diária administrada (KAISER & KLER, 2002). Essa forma de descontinuação do tratamento deve-se à possibilidade da ocorrência de uma insuficiência adrenal secundária, causada pela supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HOCHBERG *et al.*, 2003).

1.1.1 Farmacocinética

A prednisona é uma molécula inativa e possui baixa afinidade pelos receptores de glicocorticóides, sendo necessária sua conversão *in vivo* a prednisolona para que essa exerça sua ação. Após ser administrada por via oral a prednisona é rapidamente absorvida e convertida em prednisolona no fígado pela ação da enzima 11-beta-hidroxiesteróide desidrogenase (YOKOYAMA, 1992; RANG, 2001), sendo que 45% dessa conversão ocorre durante o efeito de primeira passagem (FREY *et al.*, 1986).

Após ser metabolizada a prednisona forma vários metabólitos, que são eliminados pela via renal na forma livre ou conjugada. Apenas uma pequena taxa de 2 a 2,5% é excretada de forma inalterada pela mesma via (ROSE *et al.*, 1981).

A prednisona apresenta uma taxa de ligação às proteínas plasmáticas de aproximadamente 90%, biodisponibilidade de 80% e seu volume de distribuição varia entre 0,4 e 1,0 L.Kg⁻¹. Sua meia-vida é de 3,6 horas e sua concentração sérica máxima é atingida entre uma e três horas após a administração oral (VOGT *et al.*, 2007).

Vale à pena ressaltar que os parâmetros farmacocinéticos de um medicamento podem ser alterados devido a vários fatores de origem fisiológica ou intrínsecos a esse medicamento (GOODMAN & GILMAN'S, 2006). Segundo Faiçal e colaboradores (1998) a meia-vida sérica da prednisona pode ser influenciada pela prática de exercícios físicos, gravidez, sexo e pela hora do dia em que é administrada.

1.1.2 Características físicas e Físico-químicas

A prednisona quimicamente corresponde a 17,21-diidroxipregna-1,4-dieno-3,11,20-triona, possui fórmula molecular $C_{21}H_{25}O_5$ e massa molar 358,43 g/mol (FB, 2010).

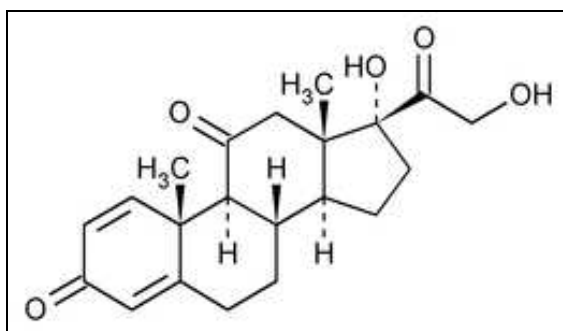


Figura 1- Estrutura química da prednisona
Fonte: Farmacopeia Brasileira (FB, 2010).

Apresenta-se na forma de cristais inodoros, brancos ou quase brancos, que fundem a 233°C com decomposição e podem apresentar polimorfismo. Este fármaco, à temperatura ambiente, é pouco solúvel em metanol, etanol, clorofórmio e dioxana, sendo também muito pouco solúvel em água (FB, 2010).

A prednisona é uma molécula neutra e valores para o seu pK_a não são encontrados na literatura. Sua solubilidade em água é de 0.133 mg/mL a 25°C e três valores para o coeficiente de partição (Log P) são encontrados na literatura para esse fármaco: 1.46, 1.47 e 1.6 (VOGT *et al.*, 2007; PAIXÃO *et al.*, 2012).

Comercialmente o insumo farmacêutico ativo (IFA) prednisona é encontrado nas formas anidra, monoidratada ou na forma do sal acetato de prednisona. Todavia, somente as formas anidra e monoidratada são referenciadas nas farmacopéias brasileira, europeia e americana (FB, 2010; EP, 2010; USP 35, 2012).

1.1.3 Permeabilidade e Biodisponibilidade

Como já mencionado, a prednisona apresenta uma taxa de 90% de ligação a proteínas plasmáticas e uma biodisponibilidade oral de 80% (LEMKE & WILLIAMS, 2008). Existem vários estudos relatando a alta biodisponibilidade da prednisona, após sua administração por via oral, porém poucos estudos *in vitro* sobre a sua permeabilidade são encontrados na literatura (VOGT *et al.*, 2007).

A taxa de permeabilidade da prednisona em membrana fosfolipídica artificial é de $0,3 \times 10^{-6}$ cm/s. Essa taxa é ligeiramente menor a que a expressa para o metoprolol, fármaco utilizado como referência de alta permeabilidade (VOGT *et al.*, 2007; STORPISTIS *et al.*, 2009).

De acordo com parâmetros adotados pela *International Pharmaceutical Federation* (IPF), a prednisona é classificada como um fármaco pertencente à classe I do sistema de classificação biofarmacêutica (SCB), ou seja, altamente solúvel e permeável (STORPISTIS *et al.*, 2009). Porém, Vogt *et al* (2007) concluíram em um estudo de revisão que, devido à ausência de dados conclusivos sobre permeabilidade, absorção e solubilidade, nas condições preconizadas pela SCB, esse fármaco não apresenta uma classificação definida em relação ao SCB.

1.2 Estabilidade de formulações farmacêuticas sólidas orais

A estabilidade é um fator que está diretamente relacionado com a qualidade, segurança e eficácia de um produto farmacêutico (KHAN *et al.*, 2010). Esse fator pode ser definido como o tempo durante o qual o mesmo produto mantém suas características e propriedades dentro de limites pré-estabelecidos, desde a sua produção até todo o seu período de uso e/ou estocagem (ALLEN *et al.*, 2007). Segundo os mesmos autores, a estabilidade de interesse farmacêutico é classificada em cinco tipos, a saber:

- Química
“A substância ativa retém sua integridade química e sua potência rotulada dentro dos limites especificados.”
- Física
“As propriedades físicas originais, incluindo aparência, paladar, uniformidade, dissolução e suspensibilidade, são mantidas.”
- Microbiológica
“A esterilidade ou resistência ao crescimento microbiano é retida de acordo com os critérios especificados.”
- Terapêutica
“Os efeitos terapêuticos permanecem inalterados.”
- Toxicológica
“Nenhum aumento significativo na toxicidade ocorre.”

A manutenção da estabilidade de um produto farmacêutico é dependente de vários fatores extrínsecos, como umidade, temperatura, luz, pH e de outros intrínsecos como a natureza física e química de substâncias ativas e excipientes, tecnologia de fabricação, composição da formulação, forma farmacêutica e natureza dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005; KHAN *et al.*, 2010).

Segundo Florence & Attwood (2003), os principais fatores que contribuem para instabilidade de uma forma farmacêutica sólida incluem a umidade, temperatura, luz e o oxigênio do ambiente e os excipientes empregados na formulação. Além disso, outro fator que pode alterar a estabilidade de um produto farmacêutico é a existência de polimorfismo no IFA utilizado na formulação, visto que o polimorfismo pode modificar as propriedades físico-químicas, farmacêuticas e biofarmacêuticas do IFA e, conseqüentemente, do medicamento. A Tabela 1 mostra algumas propriedades de interesse para área farmacêutica que podem sofrer alterações com o polimorfismo.

Tabela 1 - Propriedades de interesse para área farmacêutica que podem sofrer alterações com o polimorfismo.

Propriedades Farmacêuticas e Biofarmacêuticas	
Densidade	Propriedades ópticas e elétricas
Dureza	Estabilidade química e física
Tensão superficial	Solubilidade
Fluidez	Velocidade de dissolução
Ponto de Fusão	Velocidade de reação do estado sólido
Higroscopicidade	Bioequivalência
Cor	Biodisponibilidade

Fonte: Adaptado Storpirtis *et al.*, 2009

Qiu e colaboradores (2009) descreveram que a incompatibilidade entre a substância ativa e os excipientes de uma formulação sólida oral pode comprometer a estabilidade física e química de um medicamento, causando alterações como mudança de cor, perda das propriedades mecânicas, redução da velocidade de dissolução, perda de potência e aumento dos produtos de degradação.

Estudos de estabilidade térmica realizados por Medeiros *et al* (2001) demonstraram a existência de um pequeno grau de incompatibilidade entre a prednisona e os excipientes lactose, amido, povidona e estearato de magnésio, utilizados em duas formulações de comprimidos de 20mg desse fármaco.

A avaliação da estabilidade química e física de um IFA, isolado ou associado aos excipientes em uma formulação, durante o processo de desenvolvimento e após a sua produção e comercialização, é de suma importância para garantir a qualidade, segurança e eficácia dos produtos comercializados (ALLEN *et al.*, 2007; STORPIRTIS *et al.*, 2009; QIU *et al.*, 2009).

Todavia, a forma com que o estudo de estabilidade de um produto farmacêutico é realizado depende das características individuais desses e das condições climáticas das regiões onde são produzidos e comercializados. Devido ao grande processo de globalização e ao crescente número de indústrias farmacêuticas e farmoquímicas instaladas em países com diferentes condições climáticas, as regiões geográficas, para efeito de estudo de estabilidade, foram divididas em quatro

zonas: zona I, temperada; zona II, subtropical; zona III, quente e seca; zona IV, quente e úmida (ALLEN *et al.*, 2007).

Com o objetivo de delinear os estudos de estabilidade, vários países preconizam a utilização de guias para a condução desses estudos em seus produtos farmacêuticos. Entretanto, esses guias divergem em relação às condições de temperatura, umidade relativa e período pelo qual o IFA ou o medicamento deve ser avaliado (KHAN *et al.*, 2010).

No Brasil, a ANVISA estabelece o uso do “Guia para Realização de Estudos de Estabilidade” (BRASIL, 2005). Esse Guia tem o intuito de delinear estudos para prever, determinar e/ou acompanhar o prazo de validade de um medicamento durante um período de tempo pré-estabelecido e sob condições de temperatura e umidade controladas (Tabela 2). Além disso, o referido guia prevê três tipos de estudo de estabilidade:

- Estudo de estabilidade acelerado

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

- Estudo de estabilidade de acompanhamento

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

- Estudo de estabilidade de longa duração

“Estudo projetado para verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento.”

Tabela 2 - Especificações e parâmetros para o estudo de estabilidade de medicamentos sólidos orais, preconizados pela ANVISA, no “Guia para Realização de Estudos de Estabilidade”.

Forma farmacêutica	Tipo de estudo	Tempo de armazenamento	Embalagem	Condições de armazenamento
Sólido	Longa duração	24 meses	Semi-permeável	40°C ± 2°C 75% UR ± 5 %
			Impermeável	40°C ± 2°C
	Acelerado	6 meses	Semi-permeável	30°C ± 2°C 75% UR ± 5 %
			Impermeável	30°C ± 2°C

Fonte: Adaptado do Guia para Realização de Estudos de Estabilidade (Brasil, 2005).

Cabe ressaltar que o modelo de avaliação da estabilidade física para um IFA e para um medicamento deve ser capaz de identificar possíveis alterações em seu estado sólido (STORPIRTIS *et al.*, 2009). Contudo, de acordo com a legislação brasileira, os testes preconizados no Guia para realização de estudos de estabilidade não permitem fazer a referida avaliação de forma completa, uma vez que, os testes indicados não são destinados a identificar esse tipo de alteração de forma completa (BRASIL, 2005).

1.3. Dissolução

A dissolução de um fármaco pode ser definida como o processo em que o IFA no estado sólido, na presença de um solvente, é liberado da sua forma farmacêutica tornando-se dissolvido no meio e disponível para absorção. Contudo, para que isso ocorra, o medicamento deve passar pelas etapas de desintegração, desagregação e dissolução. Já para ser absorvida, a substância ativa necessita estar dissolvida nos fluidos do trato gastrointestinal (ALLEN, 2007).

A quantificação *in vitro* de um fármaco, quando dissolvido em um meio, pode ser obtida através do teste de dissolução no qual se utiliza uma aparelhagem específica e condições experimentais pré-estabelecidas (FB, 2010).

Segundo Marques (2002), o estudo de dissolução é de suma importância na detecção de desvios durante a fabricação e na reprodutibilidade lote a lote na indústria farmacêutica. Além disso, o ensaio de dissolução é utilizado para avaliar o desempenho de diferentes polimorfos no desenvolvimento de uma formulação, uma vez que formas polimórficas de um mesmo IFA podem apresentar diferentes velocidades de dissolução.

Na literatura, três possíveis formas de testes para avaliar e/ou comparar a cinética e a eficiência da dissolução de um medicamento são encontradas: dissolução de um único ponto, dissolução de dois pontos e a dissolução em vários pontos. Essa última forma de avaliação é denominada perfil de dissolução e permite uma análise mais conclusiva do processo de liberação do fármaco (CHORILLI, *et al.*, 2010).

De acordo com a RDC 31/2010 (BRASIL, 2010b) o teste de perfil de dissolução entre medicamentos é preconizado em algumas condições: determinação de equivalência farmacêutica para obtenção ou renovação de registro, estudos comparativos entre formulações que sofreram alterações pós-registro e para os medicamentos isentos do estudo de biodisponibilidade relativa de acordo com a RDC 37/2011 (BRASIL, 2011).

Segundo Manadas e colaboradores (2002), os métodos utilizados na comparação de perfis de dissolução são baseados na análise de variância, no método dependente ou no método independente. A legislação brasileira preconiza o uso do Método Modelo Independente Simples, onde dois fatores são empregados, fator de semelhança (F2) e fator de diferença (F1); no entanto, nos termos da referida resolução somente o fator (F2) deverá ser calculado e contemplado para efeitos comparativos (BRASIL, 2010b).

1.3.1 Estabilidade de dissolução

O termo estabilidade de dissolução pode ser definido como a manutenção da velocidade de dissolução de um medicamento, desde o momento em que é fabricado até a expiração da sua validade (MURTHY & GHEBRE-SELLASSIE, 1993).

A dissolução de um medicamento pode ser alterada por vários fatores como natureza química da substância ativa e/ou dos excipientes, interação entre fármaco e excipientes, tecnologia de produção, forma e condições de armazenamento (JACKSON *et al.*, 2000; AULTON, 2005) e, como citado na seção anterior, pela presença de polimorfismo. Durante o período de armazenamento, polimorfos metaestáveis podem ser lentamente convertidos em outros polimorfos termodinamicamente mais estáveis e geralmente de menor solubilidade. Essa variação de solubilidade pode resultar em uma alteração no perfil de dissolução de um medicamento e, conseqüentemente, na sua biodisponibilidade (ZHANG *et al.*, 2004).

Murthy e Guebre-Sellassie (1993) relataram que mudanças no perfil de dissolução de um medicamento, durante o seu armazenamento, podem alterar de forma direta a quantidade de fármaco disponível para absorção, comprometendo a biodisponibilidade e a eficácia terapêutica desse produto. Segundo os mesmos autores, a estabilidade de dissolução de uma formulação farmacêutica durante a estocagem depende da quantidade e qualidade da substância ativa e dos excipientes que compõem essa formulação.

De acordo com Florence e Attwood (2003), o teste de dissolução é fundamental para avaliar a qualidade de um medicamento durante seu desenvolvimento, produção e vida de prateleira. Todavia, para que essa avaliação seja realizada de forma mais criteriosa, a dissolução do fármaco deve ser determinada em vários pontos da curva, possibilitando assim a obtenção de um perfil de liberação do fármaco (MURTHY & GUEBRE-SELLASSIE, 1993; HUANG *et al.*, 2010). No entanto, a legislação brasileira prevê o acompanhamento da dissolução de um medicamento apenas em um único ponto da curva (BRASIL, 2005). Dessa forma, um perfil de liberação do fármaco não é obtido e o que se

avalia é apenas um possível decaimento ou aumento do valor absoluto da dissolução em relação ao tempo zero.

1.4 Biodisponibilidade e Bioequivalência

A literatura relata que no início do século XX ocorreram as primeiras publicações sobre a absorção de compostos sintéticos. Na década de 40, dados referentes à absorção de vitaminas a partir de formas farmacêuticas foram descritas. Tais estudos colaboraram diretamente para dar origem ao termo biodisponibilidade (BD) (ABDOU, 1989).

De acordo com a Farmacopeia Brasileira, a BD indica a velocidade e a extensão da absorção de um medicamento a partir de sua curva de concentração plasmática *versus* tempo na circulação sistêmica ou a sua extensão na urina, quando esse está disponível para exercer o efeito farmacológico esperado (FB, 2010). De acordo com a *European Medicines Agency* (EMA), a BD é dada como “a extensão com que um fármaco ou uma entidade terapêutica é liberado a partir de uma formulação e atinge a circulação sistêmica” (EMA, 2003); já o *Food and Drug Administration* (FDA) define BD como “a taxa na qual uma substância ativa, proveniente de um medicamento, torna-se disponível no seu local de ação”.

A BD é obtida por meio de alguns parâmetros farmacocinéticos como a área sob a curva (ASC), que indica a quantidade de fármaco absorvida, e a concentração plasmática máxima (C_{max}) que quando relacionada ou tempo (T_{max}) expressa à velocidade do processo de absorção (Figura 2) (FB, 2010).

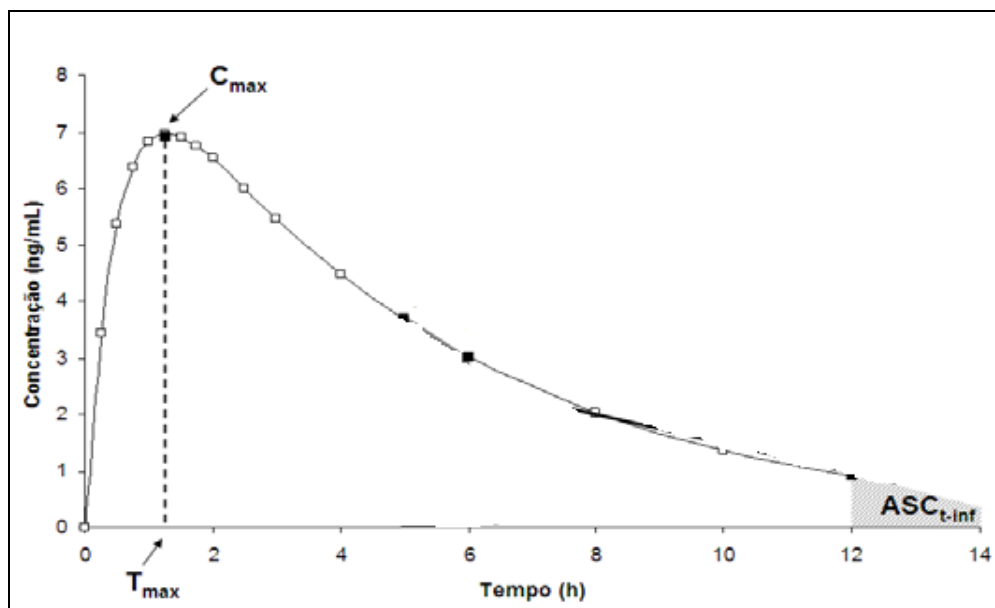


Figura 2 - Representação da curva de concentrações plasmáticas *versus* tempo e os parâmetros farmacocinéticos empregados nos cálculos da biodisponibilidade após a administração de uma dose de medicamento por via extravascular (FB, 2010).

Para efeitos de estudos de BD e dependendo do objetivo e desenho destes, a Farmacopeia Brasileira prevê três tipos de testes para determinação desses: teste de biodisponibilidade absoluta (BDA), de biodisponibilidade relativa (BDR) e de bioequivalência (BE). As definições e a aplicabilidade desses estudos encontram-se na Tabela 3 (FB, 2010).

Os estudos de BE e BDR são realizados por meio do recrutamento criterioso de voluntários sadios. Essa forma de seleção, somada à escolha apropriada do tipo de estudo, a um método estatístico adequado e a um planejamento clínico para coleta das amostras, é de fundamental importância para obtenção de resultados confiáveis (STORPIRTIS *et al.*, 2009).

Dois tipos de estudos são normalmente utilizados para condução da BE e BDR. “O delineamento paralelo, onde os voluntários são alocados para um dos grupos e cada grupo recebe somente um tratamento”, e o delineamento cruzado completo em que “os voluntários são alocados aleatoriamente em diferentes grupos, sendo que cada grupo recebe todas as formulações de um mesmo fármaco em períodos diferentes do ensaio” (STORPIRTIS *et al.*, 2009).

Tabela 3 – Definições e aplicações dos estudos de BDA, BDR e BE.

Estudo	Definição	Aplicação
Biodisponibilidade Absoluta	Fração efetivamente absorvida de um fármaco após a sua administração extravascular	Aplica-se a medicamentos inovadores de uso extravascular.
Biodisponibilidade Relativa	Comparação entre a biodisponibilidade de medicamentos administrados por via extravascular	Aplica-se aos medicamentos genéricos e similares em adequação da sua formulação.
Bioequivalência	Particularidade da BDR onde se compara a biodisponibilidade entre dois medicamentos levando em consideração os riscos pré-estabelecidos, os critérios de aceitação e a análise estatística.	Utilizado como critério de avaliação no processo para obtenção de registro de medicamentos no Brasil

Fonte: Farmacopeia Brasileira (FB, 2010)

No Brasil, os testes BE e BDR são conduzidos por centros clínicos, devidamente credenciados pela ANVISA, sendo esses responsáveis pelo acompanhamento da saúde dos voluntários durante e por um período após o término dos estudos (BRASIL, 2006), uma vez que esses expõem os voluntários a riscos provenientes da utilização do medicamento (FLACH & DALLA, 1999).

De acordo com a legislação brasileira, os ensaios clínicos para avaliação da eficácia e segurança de um medicamento não inovador podem ser substituídos pelos estudos de BDR e BE que visam confirmar esses parâmetros (STORPIRTIS *et al.*, 2009). Desta forma, em 2007 a ANVISA tornou os referidos testes um requisito obrigatório para obtenção do registro de medicamentos genéricos e similares no Ministério da Saúde (BRASIL, 2007a; BRASIL, 2007b), excetuando-se as particularidades dispostas pela regulamentação de bioisenção (BRASIL, 2011; BRASIL, 2013). No entanto, esses testes são realizados uma única vez e, geralmente, utilizando medicamentos recém-fabricados, o que gera uma incerteza quanto à manutenção dos seus resultados ao longo do período de validade desses medicamentos (BANAKAR, 1992).

1.4.1 Sistema de classificação biofarmacêutica

Visando auxiliar a indústria farmacêutica no processo de desenvolvimento de uma nova formulação (MEYER *et al.*, 1992) e na solicitação de isenção dos estudos de BE, o SCB foi criado por Amidon e colaboradores (AMIDON *et al.*, 1995).

Esse sistema baseia-se em ensaios de dissolução e nas características de solubilidade e permeabilidade dos fármacos com o objetivo de estabelecer uma correlação entre estudos *in vitro* e *in vivo*, que possam servir como base para solicitação de um pedido de bioisenção, para formas farmacêuticas sólidas de uso oral, liberação imediata e ação sistêmica (STORPIRTIS *et al.*, 2009).

De acordo com o SCB, os fármacos são classificados em quatro classes, dependendo das suas características de solubilidade, e permeabilidade intestinal. A classificação e as respectivas expectativas de correlação *in vitro-in vivo* são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Correlação IVIV para fármacos de liberação imediata baseada no SCB.

Classe	Solubilidade	Permeabilidade	Correlação IVIV
I	Alta	Alta	Existe uma correlação IVIV, se a taxa de dissolução for mais lenta que a taxa de esvaziamento gástrico. Caso contrário, a correlação é limitada ou inexistente.
II	Baixa	Alta	Se a taxa de dissolução <i>in vitro</i> for similar à <i>in vivo</i> , uma correlação é esperada.
III	Alta	Baixa	Correlação é limitada ou inexistente
IV	Baixa	Baixa	Correlação é limitada ou inexistente

Fonte: Adaptado de Amidon *et al.*, 1995

De acordo com a SCB, a solubilidade de um fármaco é determinada à temperatura de 37°C e em um intervalo de pH de 1 a 8. Nessas condições o IFA é considerado altamente solúvel se sua maior dose dissolver em 250 mL ou menos de um meio aquoso. Já para o IFA ser considerado altamente permeável, esse deverá apresentar mais de 90% de absorção de sua dose administrada (AULTON *et al.*, 2005).

1.4.2 Permeabilidade intestinal

A absorção de um fármaco, ou de qualquer outra substância, administrados por via oral, através de membranas do trato gastrointestinal, é um processo complexo e influenciado por diferentes fatores, dentre eles a capacidade de permear o epitélio intestinal (YAMASHITA *et al.*, 2000; STORPIRTIS *et al.*, 2009).

A permeabilidade intestinal pode ser avaliada por meio de inúmeras metodologias *in vitro* e *in silico*. Contudo, atualmente, os modelos experimentais PAMPA (parallel artificial membrane permeability assay), que avalia somente a difusão passiva, e o modelo que utiliza cultura de células Caco-2, que permite avaliar mecanismos múltiplos, são os mais utilizados pela indústria farmacêutica (SOUZA *et al.*, 2007).

A linhagem de células Caco-2 (ATCC® HTB-37™) são derivadas de adenocarcinoma de cólon humano. Essas células são ferramentas úteis quando utilizadas na avaliação da permeabilidade intestinal *in vitro* de vários fármacos, uma vez que tem a capacidade de diferenciação e apresentam características funcionais e morfológicas semelhantes às dos enterócitos permitindo assim, um modelo de mecanismos múltiplos. De maneira simplificada, a técnica é baseada no cultivo e amadurecimento de uma monocamada celular sobre um suporte poroso, durante um período de 15 a 21 dias, a 37°C e com um fornecimento controlado de nutrientes e gases específicos sendo que após essa passagem a integridade da monocamada deve ser avaliada previamente ao início do experimento (AULTON *et al.*, 2005., SMETANOVÁ *et al.*, 2011).

O coeficiente de permeabilidade aparente (Papp) de um fármaco é obtido por meio das concentrações acumuladas em cada coleta no experimento *versus* o tempo de amostragem levando em consideração também de outras considerações como a área de permeação, a concentração inicial de fármaco no compartimento apical, e variação de tempo durante a permeação. Os resultados do Papp são expressos em centímetro por segundo (cm/s) (STORPIRTIS *et al.*, 2009). De acordo com a literatura, um fármaco é considerado pouco absorvido (0-20%) quando o Papp é menor que $0,1 \times 10^{-5}$ cm/s, moderadamente absorvido (20-70%) quando esta

compreendido entre 1 e 1×10^{-5} cm/s e muito absorvido (70-100%) quando é maior que 1×10^{-5} cm/s (YEE, 1997).

1.4.3 Estudos *in vitro*, *in vivo* e bioisenção

De acordo com a legislação brasileira a correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV) pode ser definida como uma relação racional entre as propriedades biológicas, ou parâmetros derivados desta, produzidas por uma forma farmacêutica e suas propriedades ou características físico-químicas (BRASIL, 2002). Para o FDA é um modelo matemático preditivo que descreve a relação entre as propriedades *in vitro* e a resposta *in vivo* de formas farmacêuticas de liberação imediata e/ou modificada (FDA, 1997).

De acordo com as definições relatadas, as CIVIV são determinadas de forma preditiva, através de modelos matemáticos que correlacionam os comportamentos CIVIV de um fármaco. Geralmente a velocidade de dissolução e a absorção do fármaco são as características mais avaliadas em uma predição (AULTON *et al.*, 2005).

A necessidade da indústria farmacêutica de obter uma ferramenta segura que permita uma correlação CIVIV para uma possível bioisenção é cada dia maior. Dessa forma, o conceito e a aplicação dessa correlação tem sido um dos principais focos de atenção nas universidades, indústrias farmacêuticas e nos setores regulatórios (JABER, 2006).

No entanto, critérios de aceitação para obtenção de uma bioisenção dependem da legislação do país em que essa é solicitada. De acordo com o FDA, a bioisenção pode ser requerida para fármacos de classe I, desde que os excipientes da formulação não interfiram na absorção do fármaco (FDA, 2000).

A EMA também adota o SCB para delinear os processos de bioisenção, porém os critérios adotados apresentam pequenas diferenças em relação ao FDA (STORPIRTIS *et al.*, 2009). No Brasil os requisitos para a bioisenção são preconizados pela RDC 37/2011 (BRASIL, 2011), que dispõe sobre o Guia para

isenção e substituição de estudos de BDR e BE, e pela IN 02/2013 (BRASIL, 2013) que prevê uma lista de fármacos candidatos a bioisenção baseada no SCB.

O principal objetivo de uma *CIVIV* é fornecer subsídio para um pedido de bioisenção, contudo essa correlação apresenta outras finalidades como: estabelecer especificações para novos métodos de dissolução ou para adequação dos já existentes, fornecer dados para otimização de uma formulação ou para mudança de um processo de fabricação (JABER, 2006., EMAMI, 2006).

Apesar das inúmeras informações que uma *CIVIV* pode fornecer, devido à existência de vários fatores que podem interferir no grau de uma *CIVIV*, nem sempre essa pode ser obtida de forma adequada (FLORENCE & ATTWOOD, 2006). A Tabela 5 ilustra os referidos fatores que podem influenciar na obtenção de uma *CIVIV*.

Tabela 5 - Fatores que podem influenciar na obtenção de uma *CIVIV*

Fatores	Interferências
Propriedades do fármaco	Solubilidade, pK _a , tamanho de partícula, característica do estado cristalino.
Método de dissolução	Tipo e intensidade de agitação, dispersão de partículas, composição e volume do meio de dissolução
Forma farmacêutica	Tipos de formas farmacêuticas (comprimidos, cápsulas, suspensão, comprimidos de liberação controlada), presença de substâncias reativas (agentes tamponantes ou complexantes) presença de tensoativos, substâncias hidrofóbicas e desintegrantes
Absorção <i>in vivo</i>	Velocidade relativa de permeação, ação do pH, enzimas, bile, mucina sobre a dissolução, absorção e degradação do fármaco, condições experimentais do indivíduo (doença, descanso, jejum, volume do fluido dado)

Fonte: Florence & Attwood, 2006.

De acordo com a legislação brasileira três níveis de *CIVIV* podem ser obtidos de acordo com a sua importância (BRASIL, 2002):

- Correlação de nível A

“É o nível de correlação mais alto que pode ser obtido. Representa uma relação ponto a ponto entre a dissolução *in vitro* do fármaco, a partir da forma farmacêutica, e a velocidade de entrada do mesmo no organismo *in vivo* (algumas vezes referido como dissolução *in vivo*). Neste nível de correlação, as curvas de dissolução *in vitro* e *in vivo* são diretamente sobreponíveis, ou podem ser sobrepostas utilizando-se uma constante. A descrição matemática de ambas é a mesma. Esta relação é mais facilmente obtida para formas farmacêuticas de liberação modificada, que possuem liberação *in vitro* essencialmente independente do meio de dissolução comumente utilizado nos testes. Entretanto, isto não é requisito para uma correlação de nível A.”

- Correlação de nível B

“A correlação de nível B utiliza os princípios da análise de momento estatístico. A média do tempo de dissolução *in vitro* é comparada ao tempo de residência médio ou ao tempo de dissolução médio *in vivo*. Da mesma forma que o nível A, o nível B utiliza todos os dados *in vitro* e *in vivo*, mas não é considerada uma correlação ponto a ponto, porque não reflete inteiramente a curva de nível plasmático, uma vez que uma série de diferentes curvas *in vivo* podem produzir valores similares de tempo de residência médio. Por esta razão, diferentemente da correlação de nível A, não se pode considerar somente a correlação de nível B para avaliar modificações da formulação, alteração do local de fabricação, alteração do fornecedor, dos excipientes, entre outros. Além disso, os dados *in vitro* de tal correlação não podem ser usados para obter os limites extremos do padrão do controle de qualidade.”

- Correlação de nível C

“Esta categoria relaciona um ponto de dissolução ($t_{50\%}$, $t_{90\%}$) a um parâmetro farmacocinético tal como ASC, C_{max} ou T_{max} . Representa uma correlação de um único ponto. Não reflete o formato completo da curva de concentração plasmática versus tempo, um fator crítico para definir o desempenho dos produtos de liberação modificada. Uma vez que este tipo de correlação não permite prever o real desempenho do produto *in vivo*, ela é útil somente como orientação no desenvolvimento de formulações ou como um método de controle de qualidade da rotina de produção do medicamento. Devido às suas limitações, tem utilidade restrita em prever o desempenho do fármaco *in vivo* e está sujeita às mesmas restrições que a correlação de nível B, em relação a sua capacidade de avaliar alterações do produto e do local de fabricação, bem como de fornecer os extremos do padrão do controle de qualidade.”

1.4.4 Estudos *in silico*

Avaliar a biodisponibilidade *in vivo* de um determinado medicamento é primordial para garantir a sua eficácia e segurança. Todavia, tal avaliação requer estudos clínicos que geralmente são demorados e apresentam um custo elevado, além de exporem os voluntários selecionados aos riscos associados ao medicamento. Devido aos referidos obstáculos, o desenvolvimento de métodos *in vitro* e *in silico*, que permitam prever a BD de um IFA ainda na fase de desenvolvimento, é cada vez mais pleiteado pela indústria farmacêutica (WEI & LÖBENBERG, 2006). De acordo com Terstappen e Reggiani (2001) esse tipo de método pode ser utilizado na predição de parâmetros farmacocinéticos como T_{max} , C_{max} e ASC para a simulação da BD de comprimidos de liberação imediata.

Uma avaliação *in silico* é realizada por meio de simulações computacionais que delineiam um processo natural ou realizado em laboratório. A correlação da simulação *in silico* com os estudos *in vitro* e *in vivo* pode ser utilizada para prever processos de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação de vários medicamentos (STORPIRTIS *et al.*, 2009). Para realização de uma simulação *in silico*, alguns *softwares*, como SIMCYP™, PK-sim™, CLOEPK™ e Gastroplus™ estão disponíveis no mercado. Porém, para obter-se uma correlação, esses *softwares* necessitam ser abastecidos com alguns dados do IFA, como taxa de permeabilidade, pK_a , $\log P$, $\log D$ e solubilidade (WATERBEEND & TESTA, 2009).

Na literatura são encontrados alguns estudos utilizando o Gastroplus™ para realização de simulações *in silico*. Wei & Löbenberg (2006) utilizaram-no em seu estudo para prever a absorção oral e a BE de duas formulações de gliburida (glibenclamida). Já Okumu e colaboradores (2009) utilizaram resultados *in vitro* combinados com uma simulação *in silico* para justificar uma bioisenção para o medicamento etoricoxibe. Apesar de apresentar grande utilidade na previsão da BD de medicamentos na fase de desenvolvimento, atualmente a legislação brasileira não considera os resultados *in silico* para concessão de isenção ou substituição dos estudos de BDR e BE (BRASIL, 2011; BRASIL, 2013).

1.4.4.1 GastroPlus™

O GastroPlus™ é um programa computacional que simula a absorção gastrointestinal, ocular, nasal e pulmonar de medicamentos de uso humano e animal por meio de uma tecnologia avançada. Esse programa trabalha com o conceito de fração absorvida, segundo o FDA e as suas simulações gastrintestinais são baseadas na teoria do SCB e no modelo de trânsito e absorção compartimental avançado (TACA) que descreve, a liberação, a degradação, o metabolismo, a absorção do fármaco através de sucessivos compartimentos.

A cinética associada a esse modelo é delineada por equações lineares e não lineares e consideram o fármaco nos estados não liberado, não dissolvido, dissolvido, degradado, metabolizado e absorvido ao longo de 18 compartimentos, sendo 9 enterócitos e 9 gastrointestinais. A quantidade simulada de fármaco absorvida é determinada pelos valores integrados de absorção em cada compartimento (SIMULATION PLUS, 2010).

1.5 Técnicas para caracterização do estado sólido

Um IFA no estado sólido pode apresentar-se nas formas de cristais, co-cristais, solvatos, polimorfos ou na forma amorfa. Além disso, podem sofrer um processo de interconversão de uma forma cristalina em outra durante a armazenagem e/ou produção de um medicamento. As diferentes formas do estado sólido de um fármaco influenciam nas suas propriedades físicas, químicas e mecânicas, o que pode impactar diretamente na qualidade e biodisponibilidade de um produto farmacêutico final (IACOCAA *et al.*, 2009).

Dessa forma, a identificação e caracterização de um IFA são de fundamental importância para o desenvolvimento de uma formulação e para escolha da tecnologia de fabricação a ser usada (ZHANG *et al.*, 2004)

As principais técnicas para caracterização de um IFA podem ser classificadas em cinco grupos: técnicas para determinação da estrutura cristalina, para caracterização morfológica, para avaliação de desempenho, técnicas termoanalíticas e espectrofotométricas (STORPIRTIS *et al.*, 2009). A Tabela 6 apresenta as principais vantagens e desvantagens referentes às técnicas utilizadas para caracterização de um IFA no estado sólido.

Tabela 6 - Principais vantagens e desvantagens referentes às técnicas utilizadas para caracterização de um IFA no estado sólido.

Técnicas	Vantagens	Desvantagens
Difração de raios X (pó) (DRX)	Permite identificação de diferenças significativas entre as forma de cristais	Interferência dos excipientes
Difração de raios X (monocristal)	Permite um profundo entendimento da estrutura do cristal	Dificuldade de preparar a amostra (monocristal)
Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	Informações sobre a fase de transição e interação com os excipientes. Necessita de uma pequena quantidade de amostra	Não identifica a natureza da transição
Análise termogravimétrica	Permite quantificar solvatos e hidratos	Utilizado apenas para solvatos e hidratos. Interferência da

(TGA)		água contida nos excipientes
Espectroscopia de infravermelho	Necessita de pouca amostra quando acoplado a um microscópio	Sofre interferência na presença de umidade e/ou excipientes
Espectroscopia Raman	Método para identificação. Utiliza pequena quantidade de amostra, sofre mínima interferência da água	Sofre interferência dos excipientes
Microscopia de luz polarizada	Fornecer informações sobre a morfologia e tamanho do cristal. Informações qualitativas sobre a cristalinidade	Interferência com excipientes com os excipientes

Fonte: Adaptado Zhan *et al.*, 2004

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil de dissolução ao longo da estabilidade, em comprimidos de prednisona 20mg bioequivalentes, correlacionando com estudos de permeabilidade *in vitro* e predição de biodisponibilidade *in silico*.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o IFA e as formulações quanto às suas propriedades físicas e físico-químicas.
- Determinar os fatores críticos que podem eventualmente levar a alterações no perfil de dissolução das formulações ao longo da estabilidade.
- Determinar a permeabilidade do IFA prednisona em monocamadas de células Caco-2.
- Desenvolver estudos de predição de biodisponibilidade *in silico*.
- Elaborar um estudo de correlação *in vitro-in silico-in vivo* (IVISIV).
- Avaliar a possibilidade do uso do método *in silico* para previsão de biodisponibilidade durante a estabilidade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1 Comprimidos de prednisona e IFA

- Medicamento referência Meticorten® comprimidos de 20mg do laboratório Schering-Plough lote R023, produzido em setembro/2010 e válido por 2 anos;
- comprimidos de prednisona 20mg do Laboratório Químico Farmacêutico da Aeronáutica, lote P0020020910, produzido em setembro/2010 e válido por 2 anos;
- comprimidos de prednisona 20mg lote MEST01, produzido em setembro/2011;
- comprimidos de prednisona 20mg lote MEST02, produzido em setembro/2011;
- prednisona matéria-prima fabricante A (Amostra A) de origem chinesa;
- prednisona matéria-prima fabricante B (Amostra B) de origem indiana.

3.1.2 Equipamentos e acessórios

Os equipamentos e acessórios utilizados na produção e caracterização dos comprimidos de prednisona (P0020020910, MEST01 e MEST) e da substância ativa dos fabricantes A e B estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Equipamentos e acessórios utilizados na produção, formulação e caracterização dos comprimidos de prednisona e da substância ativa.

Equipamentos	Fabricante/Modelo
Balança analítica	Mettler Toledo / AG 204
Balança de infravermelho	Mettler Toledo / HB 43-S
Câmara\Sala climática	Mecalor
Compressora rotativa 25 punções	Lawes / 25 punções
Compressora rotativa 10 punções	Fette / 10 punções
DSC	DSC modelo 822 ^e Mettler Toledo
Analizador de umidade	Analyzer Halogen Moisture/HB43-S
TG	TGA/SDTA modelo 851 ^e Mettler Toledo
Desintegrador	Nova Ética / 301-AC
DRX	Difratômetro D8 / Bruker
Destilador	Millipore / Q-POD
Dissolutor	Distek Evolution / 6100
Dissolutor	Hanson / SR8-Plus
Durômetro	Pharma Teste / PTB311E
Espectrofotômetro	Perkin Elmer / LAMBDA 25
Espectrofotômetro	IR Prestige-21 / Shimadzu
Microscópio eletrônico de varredura	JEOL / 5610LV
Potenciômetro	pH Mettler Toledo
Friabilômetro	Nova Ética / 300
Espectrômetro de infravermelho	<i>Prestige FTIR 8000</i> Shimadzu
<i>Software para simulação in silico</i>	Gastroplus™ versão 8.0
Ultrassom	H Elma / Transonic 1040
Leito fluidizado	Glatt / GPCG-3
Mixer	Diosna / P1/6
Voltímetro (<i>Electrical Resistance System</i>)	Millicell / ERS-2
Banho Maria	Fanem / 1100
Incubadora	LABOVEN / L212
Fluxo laminar Vertical	Pachane / Pcr T2 ECO
Blistadeira	IMA / TR130

3.2. Métodos

3.2.1 Caracterização física do insumo farmacêutico prednisona

Para realização da caracterização do insumo prednisona foram analisadas amostras de dois fabricantes A e B; tais amostras foram colocadas em dois frascos de vidro âmbar hermeticamente fechados. Estes foram alocados em uma câmara climática com temperatura e umidade relativa de $30^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75\%\text{UR}\pm 5\%$, respectivamente, seguindo a condição de longa duração preconizada pela RE nº01/2005 da ANVISA. As análises de DSC, dissolução intrínseca, dissolução por dispersão, solubilidade e microscopia eletrônica de varredura foram realizadas apenas no tempo inicial do estudo. Todavia, com o objetivo de investigar uma possível transição na forma cristalina das referidas amostras, as análises de TG, DRX e infravermelho foram realizadas nos tempos zero e 360 dias de estudo.

3.2.1.1 Calorimetria Exploratória Diferencial

As análises foram realizadas no Laboratório de Estudos do Estado Sólido (LEES) do Complexo Tecnológico de Medicamentos (CTM) da FIOCRUZ, por meio de um calorímetro exploratório diferencial (DSC) modelo 822^e da Mettler Toledo. As amostras foram pesadas e posteriormente encapsuladas em cadinhos de alumínio com tampa de alumínio furada. As curvas de DSC foram obtidas em uma faixa de temperatura de 25°C a 300°C e utilizando nitrogênio a uma vazão de $80\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ como gás de purga. Com o objetivo de se pesquisar a presença de diferentes polimorfos entre as amostras, o experimento foi realizado a uma taxa de aquecimento de $2,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ e $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

3.2.1.2 Análise Termogravimétrica

As análises foram realizadas no Laboratório de Tecnologia Industrial Farmacêutica (LabTIF) da Faculdade de Farmácia da UFRJ por meio de um analisador termogravimétrico (TGA) modelo 851^e da Mettler Toledo. Cerca de 3,5 mg das amostras foram pesados e encapsulados em cadinhos de alumínio aberto. As curvas de TGA foram obtidas a uma taxa de aquecimento de 10°C/min, uma faixa de temperatura de 30°C a 450°C e utilizando nitrogênio a uma vazão de 80 mL.min⁻¹ como gás de purga.

3.2.1.3 Difração de raios X de Pó

As análises foram realizadas no Laboratório de Difração de Raios X do Instituto de Física da Universidade Federal Fluminense. O difratômetro de raios X trabalhou com uma diferença de potencial no tubo de 30 kV e corrente elétrica de 15 mA. A varredura foi realizada na faixa 2θ de 2° a 40°, com velocidade de goniômetro de 0,05°/seg. A radiação utilizada foi de $\text{CuK}\alpha$ com comprimento de onda no valor de $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$. Os padrões de difração obtidos para as amostras foram comparados a um padrão de difração simulado obtido a partir *software* MERCURY (MACRAE *et al.*, 2008) que foi abastecido com dados cristalográficos *Single Crystal X-Ray Powder Diffraction* (SD-XRD) da prednisona depositados no *Cambridge Structure Database* (CSD) (ALLEN, 2002).

3.2.1.4 Espectroscopia de infravermelho

As análises foram realizadas no Laboratório de Tecnologia Industrial Farmacêutica (LabTIF) da Faculdade de Farmácia da UFRJ e conduzidas em espectrômetro *Prestige FTIR 8000 Shimadzu* aplicando a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e as posições das bandas nos espectros foram apresentadas em número de ondas (ν) cuja unidade é o centímetro inverso (cm^{-1}) e as intensidades das bandas foram expressas como transmitância (T). Foram pesados aproximadamente 3 mg de cada amostra, que foi misturada com brometo de potássio previamente seco a 105°C por 3 horas, em uma proporção de 10%. Posteriormente, essa mistura foi transferida para uma prensa manual para produção de uma pastilha, a qual foi colocada no porta-amostra do espectrômetro. O mesmo procedimento foi realizado para as substâncias químicas de referência (SQR) USP e Farmacopeia Brasileira. Os espectros foram registrados de 4000 a 400 cm^{-1} .

3.2.1.5 Dissolução intrínseca

As análises foram realizadas no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) do Complexo Tecnológico de Medicamentos (CTM) da FIOCRUZ. Para determinação do perfil de dissolução intrínseca foram preparadas, pastilhas das amostras de prednisona (A e B). Para formação das pastilhas, as amostras foram submetidas a diferentes níveis de forças de compressão. Posteriormente era verificada a sua integridade física – livre de erosão - e realizada a análise por difração de raios X para avaliar uma possível transição polimórfica.

A pressão selecionada para o experimento foi de 1200 psi uma vez que nessa condição as pastilhas não apresentaram erosão e o fármaco não apresentou transição de fase. Dessa forma, foram obtidas três pastilhas de cada amostra contendo aproximadamente 120mg.

As análises foram realizadas no dissolutor *Distek Evolution 6100* e com o

auxílio do aparato 2 para dissolução intrínseca denominado de disco fixo, que é constituído de um disco de aço com um orifício central de 8 mm de diâmetro (Figura 3). Para o desenvolvimento do experimento foram pesados aproximadamente 120mg de amostra. Posteriormente a referida massa foi colocada no orifício central do aparato, disco fixo, e com o auxílio de um punção e uma mini-prensa um complexo pastilha-disco foi formado, possibilitando a exposição do compactado em uma área de 0,5 cm².

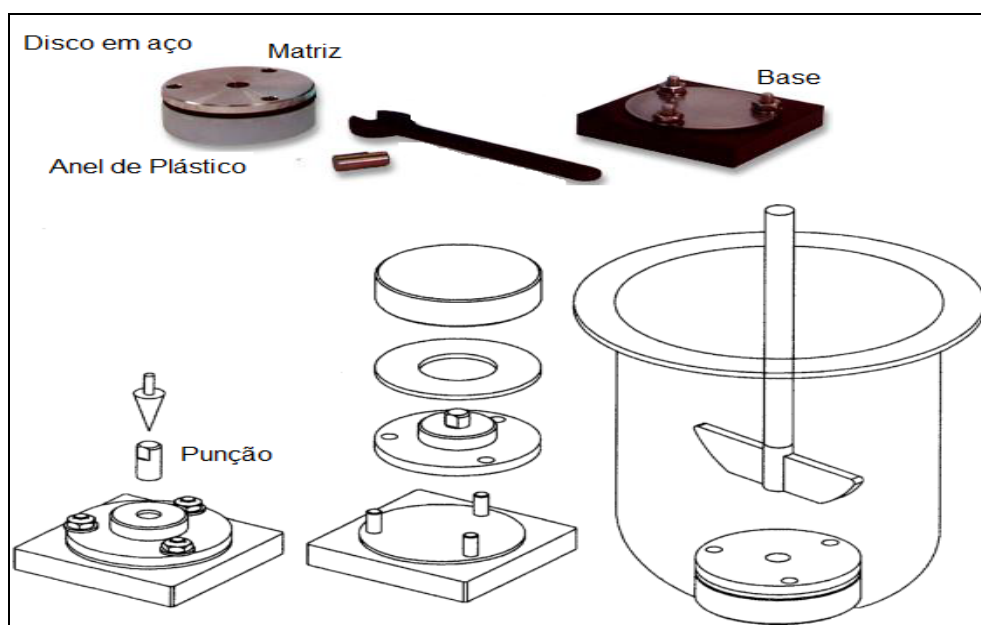


Figura 3 - Aparato para dissolução intrínseca.

Após a verificação da integridade da área superficial das pastilhas, essas foram depositadas, com auxílio de uma pinça, em uma cuba de fundo plano, contendo 900 mL de água com lauril sulfato de sódio 1,2%. Durante o experimento foram coletadas alíquotas de 10 mL, sem reposição de meio, nos tempos de 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos. Os parâmetros referentes à temperatura e velocidade de rotação em que a análise foi conduzida foram $37 \pm 0,5$ °C e 150 rpm, respectivamente. A concentração ideal do surfactante e os referidos parâmetros foram determinados no desenvolvimento prévio da metodologia.

As análises foram realizadas em triplicata e a quantidade de ativo liberado foi obtida pela leitura das absorvâncias das alíquotas em um espectrofotômetro de UV

no comprimento de onda de 242 nm. Os cálculos foram realizados com o auxílio da equação da reta obtida pela curva analítica que obteve um coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,9992. Os resultados foram expressos em taxa de dissolução intrínseca (TDI) e utilizados para a construção de um gráfico da quantidade dissolvida por área ($\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$) *versus* o tempo (minutos). O tratamento estatístico foi realizado pela análise de variância (ANOVA) de fator único ao nível de significância de 5%.

3.2.1.6 Dissolução por dispersão

Para determinar a taxa de dissolução do pó, 20 mg de cada amostra (A e B) foram adicionados à cuba de dissolução contendo 900 mL de água purificada. A análise foi realizada em triplicata e com os mesmos parâmetros utilizados para realização do teste de dissolução, descrito na Farmacopeia Brasileira (FB, 2010), com exceção dos tempos de coleta que foram de 5, 10, 15, 20, 25 e 30, minutos. Os perfis de dissolução foram comparados por meio dos fatores de semelhança (F2) e diferença (F1).

3.2.1.7 Microscopia eletrônica de varredura

As fotomicrografias foram realizadas no setor de caracterização tecnológica da coordenação de análise mineral do centro de tecnologia mineral (SCT/COAM - CETEM/UFRJ da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) por meio de um microscópio eletrônico de varredura Quanta 400 (FEI). As amostras A e B do IFA foram aderidas a um pedaço de fita adesiva dupla face de carbono apoiada sobre um suporte. As referidas amostras foram metalizadas com ouro e as análises realizadas com um aumento de 500 e 4000 vezes a temperatura ambiente e sob vácuo.

3.2.1.8 Solubilidade

Para determinar a solubilidade das amostras (A e B) do IFA prednisona, um excesso de pó das amostras A e B foi adicionado em cubas de dissolução contendo 500 mL de três diferentes meios: tampão de ácido clorídrico pH 1,2; tampão fosfato pH 6,8 e água destilada pH 5,5. As cubas com as soluções foram colocadas no ultrassom por 15 minutos (37°C) e posteriormente levadas ao aparelho dissolutor, sob uma rotação de 100 rpm e temperatura de 37°C ± 0,5°C, durante 24 horas. Após esse período foi retirada uma alíquota de 20 mL de cada cuba e essa foi transferida para tubos de ensaios. Em seguida as soluções foram filtradas através de uma membrana de porosidade 0,45 µm, diluída e posteriormente analisada por espectrofotometria UV-Vis no comprimento de onda a 242 nm (WEI & LÖBERNBERG, 2006; OKUMU *et al.*, 2009).

O valor da solubilidade foi obtido a partir da absorvância observada para cada amostra. Essa foi calculada por meio de uma equação da reta previamente preparada para cada meio. Os valores de R² para os meios água destilada, ácido clorídrico pH 1,2 e tampão fosfato pH 6,8 foram respectivamente 0,9992, 0,9996 e 0,9997. Cada experimento foi realizado em triplicata e o pH de cada amostra foi monitorado durante o experimento.

3.2.2 Avaliação do teor do insumo farmacêutico ativo de acordo com os critérios farmacopeicos

A referida avaliação foi realizada para as amostra A e B do IFA prednisona, ao longo do estudo (t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360). O doseamento das amostras A e B de prednisona foi realizado por espectrofotometria de absorção no ultravioleta de acordo com o método (A) da monografia específica para o IFA, descrita na Farmacopeia brasileira 5ª edição (FB, 2010).

3.2.3 Avaliação dos comprimidos de prednisona ao longo da estabilidade

Para avaliação dos comprimidos de prednisona 20mg, foram incluídos no estudo amostras de um lote do medicamento referência e de três lotes dos medicamentos testes, respectivamente denominados R023, P0020020910, MEST01 e MEST02.

Amostras de todos os lotes referenciados acima foram armazenadas em uma sala climática (Figura 4) com temperatura de $30^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa (UR) de $75\%\pm 5\%$. As análises para determinação de teor, dureza, tempo de desintegração, umidade e do perfil de dissolução foram realizadas nos tempos 0, 90, 180, 270 e 360 dias de estudo.



Figura 4 - Sala climática para estudo de estabilidade de longa duração. Localizada no Laboratório Químico farmacêutico da aeronáutica.

A obtenção ou produção dos lotes foi realizada da seguinte forma:

- Lote R023 Meticorten® adquirido no comércio local.
- Lote P0020020910 produzido por processo de granulação via úmida

pelo Laboratório Químico-Farmacêutico da Aeronáutica (LAQFA).

- Lote MEST01 produzido no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) do Complexo Tecnológico de medicamentos da FIOCRUZ, com o ativo do fabricante A e com a mesma formulação e processo de fabricação do lote P002020910, submetido aos estudos de equivalência farmacêutica e biodisponibilidade relativa pelo LAQFA.
- Lote MEST02 produzido no LTF com o ativo do fabricante B e com a mesma formulação e o mesmo processo de fabricação do lote P002020910.

Os excipientes utilizados na produção dos lotes testes e do medicamento referência estão discriminados de forma qualitativa na Tabela 8.

Tabela 8 - Excipientes utilizados na produção dos lotes Testes e do medicamento referência.

Excipientes	Lotes			
	R023	P0020020910	MEST01	MEST02
Amido de milho	X	X	X	X
Croscarmelose Sódica	X			
Estearato de Magnésio	X	X	X	X
Glicolato de Amido Sódico		X	X	X
Lactose monoidratada	X			
Lauril Sulfato de Sódio		X	X	X
Manitol		X	X	X
Povidona	X	X	X	X
[poli (vinil pirrolidona)]				
Silicato de Magnésio		X	X	X

3.2.3.1 Determinação de peso médio

Foram pesados, individualmente, 20 comprimidos de cada lote em estudo. De acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FB, 2010) é permitida uma variação de $\pm 7,5\%$ para os comprimidos com peso entre 80mg e 250mg e 5% para comprimidos com peso acima de 250mg.

3.2.3.2 Determinação da dureza

O teste de resistência mecânica ao esmagamento ou à ruptura foi realizado conforme preconizado no método geral 5.1.3.1 da Farmacopeia brasileira 5ª edição (FB, 2010). Os comprimidos de cada lote foram analisados de forma automatizada por meio do equipamento *Pharma Test* e a força foi medida em newtons (N) (FB, 2010).

3.2.3.3 Determinação de friabilidade

A determinação da resistência dos comprimidos à abrasão foi realizada de acordo com a metodologia geral 5.1.3.2 descrita na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FB, 2010). O ensaio foi realizado por meio de um friabilômetro utilizando 20 comprimidos de cada lote em estudo.

3.2.3.4 Determinação do tempo de desintegração

Foi realizada de acordo com a metodologia geral 5.1.4.1 descrita na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FB, 2010). A desintegração foi realizada em água

purificada mantida a 37 ± 1 °C, utilizando-se os discos conforme preconizado para comprimidos simples. Foram utilizados 6 comprimidos de cada lote em estudo.

3.2.3.5 Uniformidade de conteúdo

Foi realizada de acordo com a metodologia geral descrita na Farmacopeia Brasileira (FB, 2010). O método de quantificação foi realizado por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta.

3.2.3.6 Doseamento

Foi realizado por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta, conforme descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (método A), referente ao doseamento para comprimidos de prednisona (FB, 2010).

3.2.3.7 Determinação da umidade

Foi realizada utilizando um analisador de umidade *Halogen Moisture Analyzer* com luz de halogênio, modelo HB43-S, até peso constante. Para a determinação da umidade, os comprimidos de cada lote em estudo foram triturados em um gral de porcelana e posteriormente colocados no equipamento para análise. A determinação da umidade deu-se sob a temperatura de 100°C até que a amostra apresentasse peso constante.

3.2.3.8 Perfil de dissolução

O perfil de dissolução do medicamento referência e dos demais lotes em estudo foi determinado a partir da quantificação do ativo, prednisona, liberado nos intervalos de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. As condições utilizadas para determinação da dissolução (meio de dissolução, volume de meio nas cubas, aparato de dissolução, velocidade de agitação e comprimento de onda para leitura das absorvância das amostras) estão de acordo com a metodologia específica para prednisona, descrita no item 5.1.5, referente à dissolução, da Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FB, 2010). Tais condições estão descritas na Tabela 9.

Tabela 9 - Condições utilizadas para determinação do perfil de dissolução dos comprimidos de prednisona (FB, 2010)

Condições	Especificações
Sistema de agitação	Aparato 2 (pá)
Velocidade	50 rpm
Tempo	30 minutos
Temperatura	37°C ± 0,5°C
Meio de dissolução	Água destilada
Volume do meio	900 mL
Intervalos de coleta	5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos
Tolerância	Q ≥ 80%
Volume coletado	15 mL
Método de detecção	Espectrofotometria no ultravioleta ($\lambda=242$ nm)

Para determinação do perfil de dissolução foram utilizados seis comprimidos de cada lote em estudo. A coleta das amostras foi realizada de forma automática e sem reposição de meio pelo aparelho dissolutor modelo SR8 PLUS da marca Hanson Research (Figura 5). A cada tempo de coleta foi retirada uma alíquota de 15 mL de cada cuba.

O cálculo das concentrações de prednisona (mg/mL) nos tempos pré-definidos foi realizado por meio dos valores de absorvância obtidos por

espectrofotometria no ultravioleta e posteriormente substituídos na equação da reta obtida através da curva analítica do padrão de prednisona.



Figura 5 - Aparelho dissolutor modelo SR8 PLUS da marca Hanson Research. Localizado no Laboratório Químico Farmacêutico da Aeronáutica.

O cálculo do percentual dissolvido de ativo em cada tempo de amostragem foi realizado através da seguinte equação 1:

$$(\%) \text{ dissolvido} = \frac{C_{a(t)} \cdot V_c + \sum_{t=0}^{t-1} C_{a(t)} \cdot V_a}{D} \cdot 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde,

$C_{a(t)}$ = Concentração (mg/mL) de prednisona nas cubas no tempo t ;

V_c = Volume de meio de dissolução nas cubas;

C_a = Volume de alíquota retirada das cubas;

D = Quantidade declarada de prednisona nos comprimidos.

Para comparação dos perfis de dissolução das amostras em estudo foi empregado o método Modelo Independente Simples onde foi calculado um fator de diferença (F1) e um fator de semelhança (F2). De acordo com a legislação brasileira, os perfis de dissolução comparativos são avaliados apenas pelo cálculo do fator (R2) (BRASIL, 2010). Todavia, para fins deste estudo, os fatores F1 e F2 foram calculados para expressar matematicamente as diferenças e semelhanças entre os perfis de dissolução obtidos. O cálculo utilizado para determinar os referidos fatores está descrito nas equações 2 e 3:

$$F_1 = \left\{ \frac{\sum_{i=1}^n |R_f - T_t|}{\sum_{i=1}^n R_f} \right\} * 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

R = porcentagem de fármaco dissolvido do produto de referência em um tempo t.

T= porcentagem de fármaco dissolvido do produto teste em um tempo t.

$$F_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \times \sum_{i=1}^n (R_f - T_t)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

R = porcentagem de fármaco dissolvido do produto de referencia em um tempo t.

T= porcentagem de fármaco dissolvido do produto teste em um tempo t.

n= número de coletas.

3.3 Estudos de permeação em células Caco-2

Os ensaios de citotoxicidade e permeabilidade da prednisona em monocamadas de células Caco-2 foram conduzidas no Laboratório de Tecnologia Industrial Farmacêutica, localizado na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As análises foram realizadas para a amostra A do IFA prednisona.

3.3.1 Estudo de citotoxicidade

Em uma placa de 96 poços foram semeadas 32.000 células/poço, em um volume total de 200 microlitros/poço, utilizando Dulbecco's modified Eagle's Medium 10% (DMEM, pH 7,4) como meio de cultura. Em seguida, os substratos celulares foram levados a incubadora a temperatura de 37°C e 5% de CO₂ durante 24 horas para o crescimento celular. Durante a execução dos experimentos as células apresentavam-se na passagem 57 (KONSOULA & BARILE, 2005).

Transcorridas as 24 horas, após ter aspirado o meio de cultura dos poços, as células foram colocadas em contato com uma solução da amostra A do IFA prednisona em HBSS/etanol 5% pH = 6,8 a 31,5 µg/mL (Hank's Balanced Salt Solution). Como controle foram utilizadas soluções de HBSS pH = 6,8 e HBSS/etanol 5%.

A amostra foi mantida em contato com as células por 3 horas e em seguida aspiradas. Assim, as células foram tratadas com o reagente brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) a uma concentração de 2,5 mg/mL, adicionando-se 100 µL de HBSS pH = 6,8 e 25 µL de solução de MTT por poço. A placa contendo as células com MTT foi incubada por mais 3 horas a 37°C e 5% de CO₂. Transcorrido o tempo de incubação, a solução de MTT foi aspirada e as células foram lavadas com solução tampão fosfato (pH = 7,4), o qual foi aspirado e então foram adicionados 100 µL/poço de dimetilsulfóxido (DMSO), com a finalidade de

romper a membrana celular, permitindo a liberação dos cristais de formazan formados, gerando uma coloração violeta mais ou menos intensa de acordo com o grau de viabilidade celular. As leituras de absorvância dos poços foram realizadas em *Microplate Absorbance Reader* iMARK™, a 570 nm com referência a 690 nm, após agitação vigorosa durante 60 segundos (SANDRI *et al.*, 2007; SANDRI *et al.*, 2010).

3.3.2 Ensaio de permeabilidade em monocamada de células Caco-2

Para realização dos estudos de permeação a análise foi conduzida da seguinte forma.

- Preparo do meio

O meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, pH 7,40) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 1% de benzilpenicilina (160 UI/mL) - sulfato de estreptomicina (100 µg/mL) e 1% de aminoácidos não-essenciais, foi utilizado como meio de cultura. As culturas celulares foram mantidas a 37°C, atmosfera de 95% de ar, 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa (ANNAERT *et al.*, 1998; DA SILVA *et al.*, 2012).

- Cultivo das células para o ensaio de permeabilidade

As amostras foram submetidas aos testes de permeabilidade através de monocamada de células Caco-2 durante passagem 57. As células foram semeadas sobre filtros de policarbonato (área de 0,33 cm², diâmetro interno de 6,5 mm e poros de 0,4 µm) em placas de 24 poços, a uma densidade de 2,5 x 10⁵ células/cm².

Os filtros contendo as células foram mantidos, com trocas de meio de cultura, durante 21 dias após a semeadura, e usados para as medidas de resistência elétrica transepitelial e experimentos de transporte (SANDRI *et al.*, 2007; SANDRI *et al.*, 2010; DA SILVA *et al.*, 2012).

- Preparo do meio de transporte

O meio utilizado para a diluição do IFA foi HBSS/etanol 5% pH = 6,8. Essa solução foi utilizada no compartimento apical (doador). No compartimento basolateral (receptor), foi utilizado HBSS pH 7.4 mimetizando assim o microambiente abaixo do epitélio intestinal.

- Condições para análise

Foi preparada uma solução contendo a amostra A de prednisona a 31,5 µg/mL em HBSS/etanol 5% pH = 6,8. Duzentos microlitros dessa solução foram acondicionados no compartimento apical da monocamada de células.

Em tempos fixos de 30; 60; 120 e 180 minutos, cada filtro e seu compartimento apical foram reposicionados sobre um novo poço contendo seiscentos microlitros de meio basolateral fresco. Todas as soluções receptoras foram coletadas e analisadas de forma direta (sem diluição) por meio de um espectrofotômetro de UV no comprimento de onda de 239 nm.

O coeficiente de permeabilidade aparente (P_{app}) foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$P_{app} = dQ/dt / (A \cdot 60 \cdot C_0) \quad (\text{Equação 4})$$

Onde dQ/dt é a taxa de permeabilidade (quantidade de prednisona permeada por minuto), A é a área de difusão da monocamada de células, C_0 é a concentração inicial de prednisona no compartimento apical (YOUUDIM, AVDEEF & ABBOTT, 2003; SANDRI *et al.*, 2007; SANDRI *et al.*, 2010). A divisão por 60 significa a transformação da unidade de tempo de minutos para segundos nos experimentos de permeação.

Durante o experimento a integridade da monocamada foi avaliada através da resistência elétrica transepitelial – *Transephitelial Electric Resistance* (TEER), em intervalos fixos (juntamente com os tempos de coleta), utilizando Millicell ERS-meter

(SANDRI *et al.*, 2007; SANDRI *et al.*, 2010). As células foram consideradas íntegras, quando apresentaram voltagem acima de $350 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (ANNAERT *et al.*, 1998).

3.4 Estudo de bioequivalência

O estudo de bioequivalência entre a formulação de comprimidos de prednisona de 20mg produzidos pelo LAQFA e a formulação referência produzida pelo Laboratório Farmacêutico Mantercorp foi de responsabilidade do Núcleo de Bioequivalência e Ensaios Clínicos (NuBEC) da Universidade Federal de São Paulo.

O referido estudo foi aberto, aleatorizado, cruzado, com dois tratamentos, duas sequências e dois períodos, nos quais os voluntários receberam, em cada período, a formulação teste ou referência. Os testes foram realizados com 26 voluntários sadios, homens e mulheres com idade entre 18 e 50 anos e índice de massa corpórea ≥ 19 e $\leq 28,5 \text{ Kg.m}^{-2}$. A dose administrada aos voluntários em cada período foi de um comprimido contendo 20 mg de prednisona em jejum, por via oral, de forma única e com 200 mL de água mineral sem gás. O período de confinamento foi de 24 horas (NuBEC, 2011).

3.5 Simulação *in silico*

Os estudos *in silico* para prednisona foram conduzidos no Laboratório de Modelagem Molecular, localizado na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

3.5.1 Simulação da Biodisponibilidade

Com o objetivo de prever a biodisponibilidade da amostra A do IFA prednisona, utilizada na fabricação do biolote, simulações foram realizadas por meio do *software* Gastroplus™ (versão 8.0, Simulation Plus Inc., Lancaster, California, USA).

O referido *software* possui três principais módulos de entrada de dados: composto, fisiologia e farmacocinética. No módulo composto (Figura 6) são introduzidos dados referentes às propriedades físico-químicas e da permeabilidade intestinal do IFA.

O módulo fisiologia (Figura 7) foi utilizado para estimar as mudanças de permeabilidade ao longo do trato gastrointestinal. Os parâmetros utilizados nesse módulo foram fixados em valores padrões que representam a fisiologia de um indivíduo em jejum (WEI & LOBENBERG, 2006).

Selected Compound: Prednisolone 0

Current: 1, Total: 5

Molecular Formula: C₂₁H₃₀O₅

Molecular Weight (g/mol): 358.43

log^p (neutral): 1.46 @pH: -1

pKa Table

Enzyme Table

Transporter Table

SI Trans Time (h) = 0.0002 Mean Abs Time (h) = 0.344

Longest Diss. Time (h) @ pH 6.8 = 0.013 hours

Max Abs Dose (S) = 7.748E+4 mg Max Abs Dose (R) = 5.859E+4 mg

Support Files: Prednisolone 0.dsd, Prednisolone 0.opd

Dose Form: IR Tablet

Initial Dose (mg): 20

Subsequent Doses (mg): 0

Dosing Interval (h): 0

Dose Volume (mL): 200

pH for Reference Solubility: 7

Solubility (mg/mL @pH=7): 0.21

Mean Precipitation time (sec): 900

Diff. Coeff. (cm²/s x 10¹⁵): 0.6381

Drug Particle Density (g/mL): 1.2

Particle Size: R=15.00, D=30.00

Effective Permeability

Source: ABCSa

Caco-2 Papp (cm/s x 10⁵): 3.6949

Sim Peff x 10⁴ (Human): 4.5822

Convert from User Data

Bioequivalent Solubilities

Dose No. = 0.8221

Absorption No. = 9.276

Dissolution No. = 2.471E+2

Notes

Model Sol: 6.1 | logP: Emp:6.1 | Diss Model: Johnson | PartSize: Sol: OFF | BileSalt: Sol: OFF | DMR: OFF | EHC: OFF | ConstRad: ON | Ppmax: OFF

Figura 6 - Tela do Módulo “*compound*” do programa GastroPlus™.

Compartmental Parameters

Reset All Values

Excrete all un-absorbed drug at the end of gut transit time

Zero-order gastric emptying

Compartment	Perit	ASF	pH	Transit Time (h)	Volume (mL)	Length (cm)	Radius (cm)	SEF	Bile Salt (mM)	Pore R (Å)	PoreSize (cm ⁻¹)	Comp. Type
Stomach	0	0.0	1.30	0.25	46.56	28.29	0.67	1.000	0.0	2.200	2.500	Stomach
Duodenum	0	2.795	6.80	0.26	41.96	14.13	1.53	4.226	2.800	10.41	48.64	Intestinal
Jejunum 1	0	2.767	6.20	0.93	154.2	50.40	1.45	3.949	2.330	6.640	36.90	Intestinal
Jejunum 2	0	2.729	6.40	0.74	122.3	50.40	1.29	3.489	2.030	6.400	26.09	Intestinal
Ileum 1	0	2.690	6.60	0.98	94.29	50.40	1.13	3.029	1.410	7.160	16.46	Intestinal
Ileum 2	0	2.646	6.30	0.42	70.53	50.40	0.96	2.963	1.160	6.920	9.540	Intestinal
Ileum 3	0	2.594	7.40	0.29	49.60	50.40	0.82	2.109	0.140	4.880	4.896	Intestinal
Caecum	0	0.616	6.40	4.19	47.49	13.19	3.39	1.790	0.0	3.920	2.915	Colon
Asc Colon	0	1.200	6.80	12.57	98.33	27.85	2.41	2.480	0.0	3.900	3.220	Colon

Properties of individual gut compartments

C1-C6: 0.8694 | 0.4302 | 0.12147 | 0.48632

Physiology: Human - Physiological - Fasted

ASF Model: Opt logP Model SA/N/E.1

Qh (L/min): 1.5

Percent Fluid in St: 40

Colon: 70

Notes

Model Sol: 6.1 | logP: Emp:6.1 | Diss Model: Johnson | PartSize: Sol: OFF | BileSalt: Sol: OFF | DMR: OFF | EHC: OFF | ConstRad: ON | Ppmax: OFF

Figura 7 - Tela do módulo “*physiology*” do programa GastroPlus™.

O último módulo, farmacocinética (Figura 8), foi abastecido com os dados obtidos nos testes realizados no estudo de biodisponibilidade relativa do biolote P0020020910 de comprimidos simples de prednisona contendo 20mg (NuBEC, 2011).

Figura 8 - Tela do módulo “*pharmacokinetics*” do programa GastroPlus™.

Com todos os dados inseridos em seus respectivos módulos, o *software* promoveu a simulação dos parâmetros farmacocinéticos, $ASC_{0-t}(ng.h/mL)$, $ASC_{0-inf}(ng.h/mL)$, $C_{Max}(ng/mL)(h)$ e $T_{Max}(h)$ e a predição da biodisponibilidade da amostra A do IFA prednisona (Figura 9 e Figura 10).

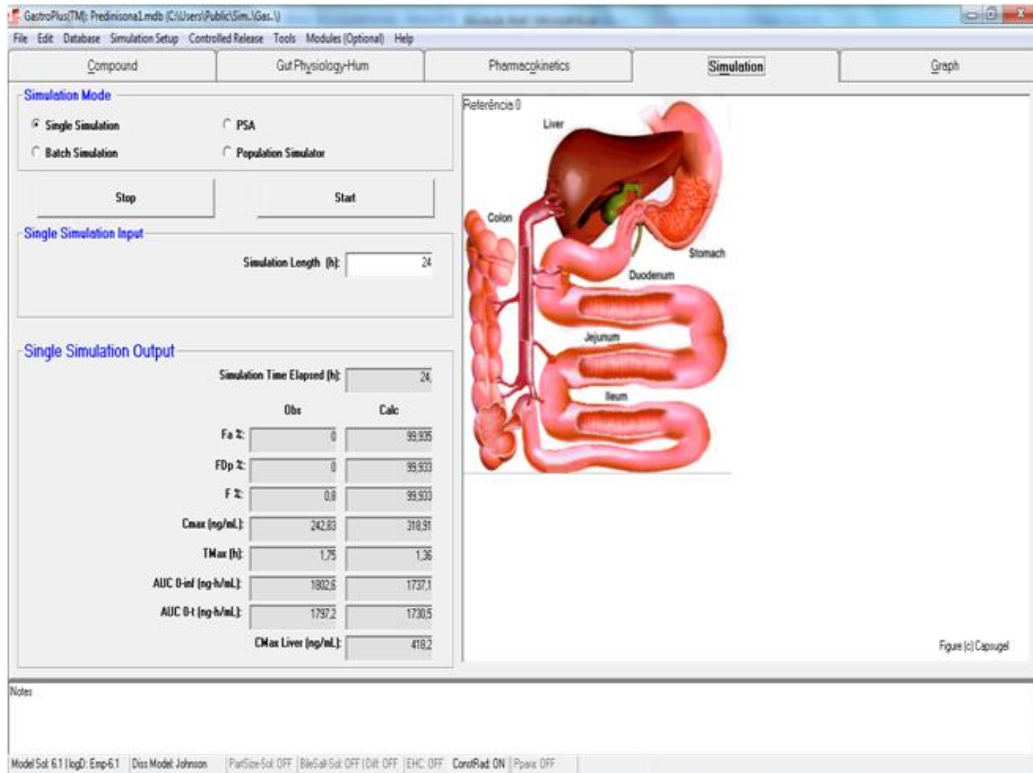


Figura 9 - Tela do módulo “simulation” do programa GastroPlus™.

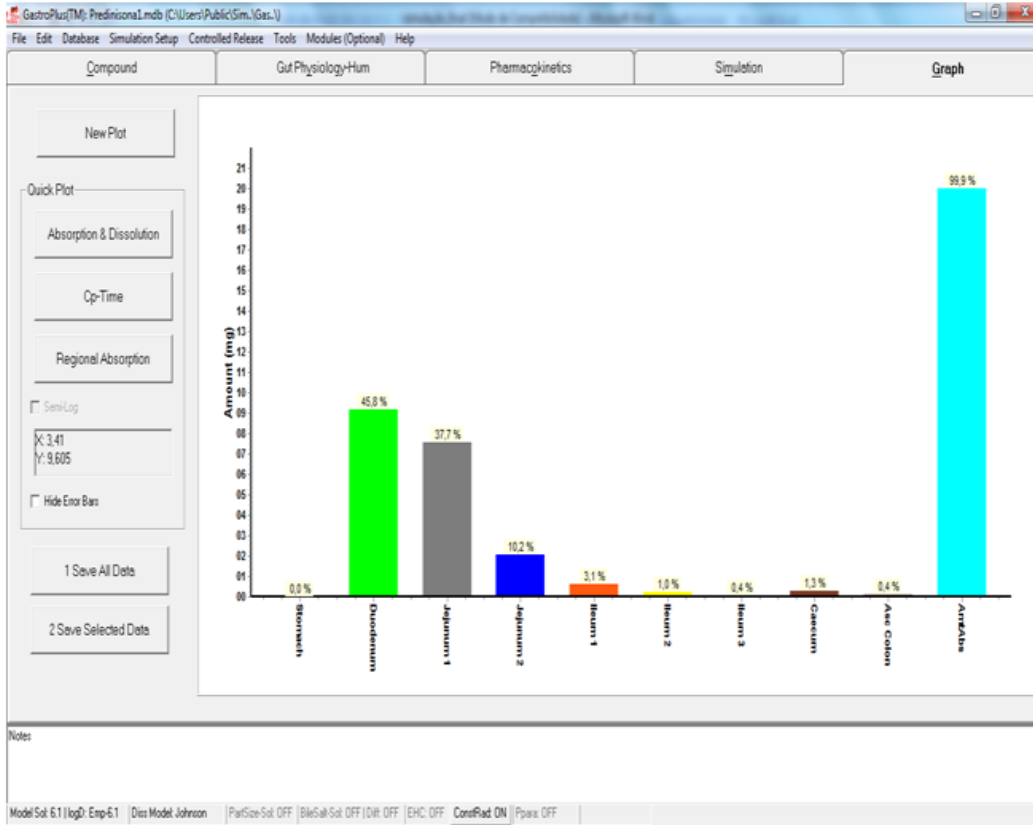


Figura 10 - Tela do módulo “graph” do programa GastroPlus™.

3.5.2 Correlação *in vitro-in vivo*

A correlação foi realizada nos tempos $t=0$, $t=90$, $t=180$, $t=270$ e $t=360$ dias de estudo. Os lotes MEST01, MEST02, P0020020910 e R023 foram avaliados por meio do módulo *IVIVCPlus* do programa *GastroPlus*TM. O referido módulo possui quatro campos principais de inserção de dados: o primeiro campo (*In vitro Data*) está relacionado com os dados do perfil de dissolução *in vitro* dos comprimidos do biolote (Figura 11).

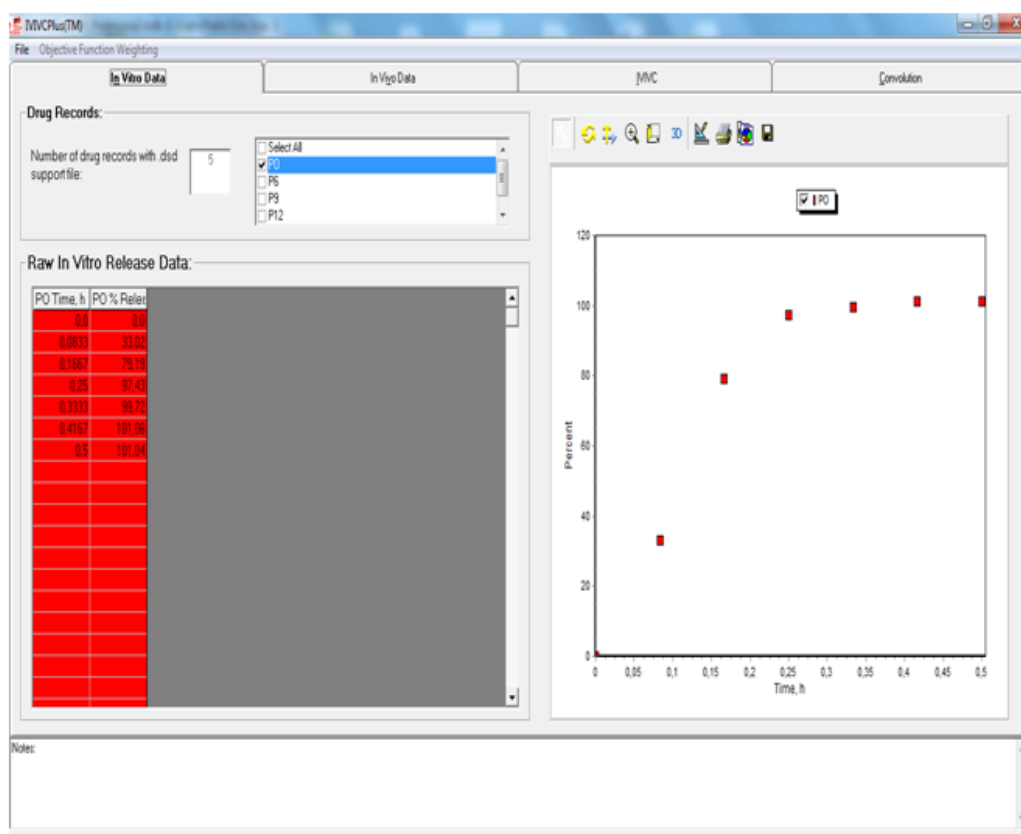


Figura 11 – Tela do módulo *IVIVCPlus*TM com a opção “*In Vitro Data*” habilitada.

O segundo campo (*In vivo Data*) está relacionado aos dados obtidos no estudo de biodisponibilidade do biolote. Nesse campo são alocados os dados referentes aos valores da curva de concentração plasmática *versus* tempo (Figura 12).

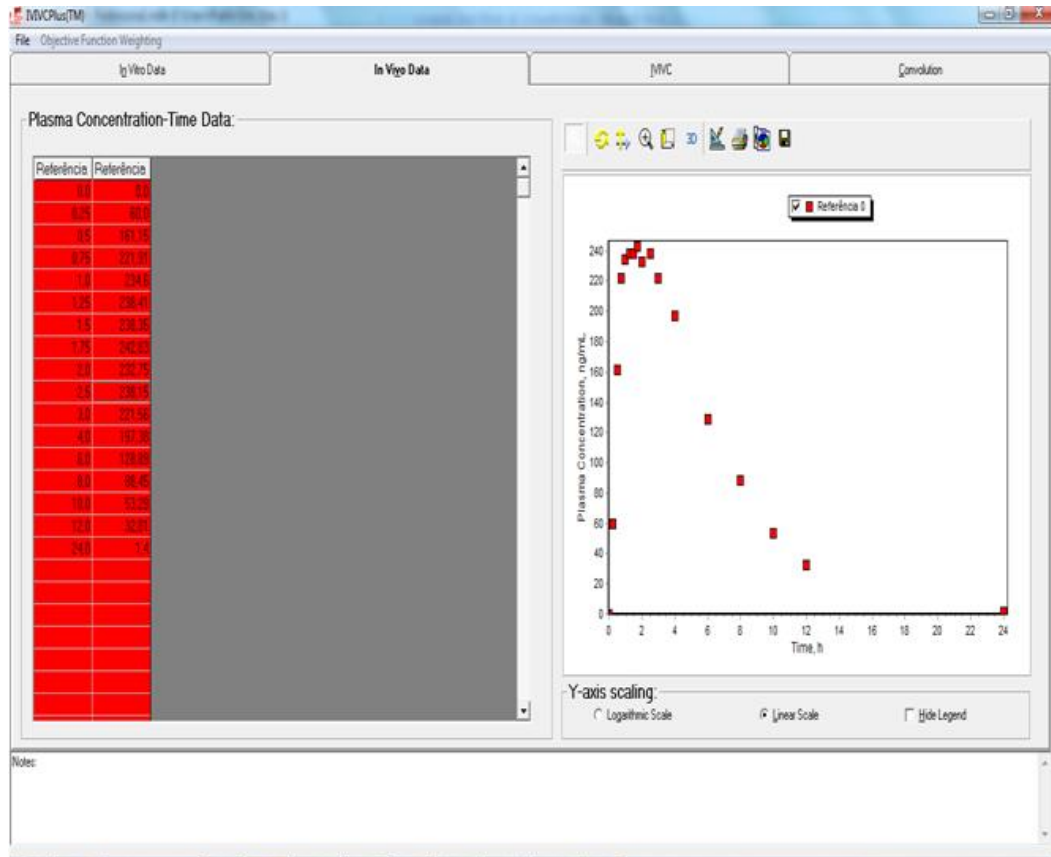


Figura 12 – Tela do módulo IVIVCPlus™ com a opção “*In Vivo Data*” habilitada.

O terceiro campo corresponde à IVIVC em que o método mais adequado para convolução é selecionado; no presente trabalho o método de escolha foi aquele baseado na equação segundo Wagner–Nelson, ou seja, um modelo monocompartimental (Figura 13). O modelo estabelecido por Wagner-Nelson foi escolhido de forma automática pelo programa GastroPlus™, uma vez que dados quanto a administração intravenosa não são requisitos necessários para a estimativa da absorção (EMAMI, 2006; WAGNER, 1974).

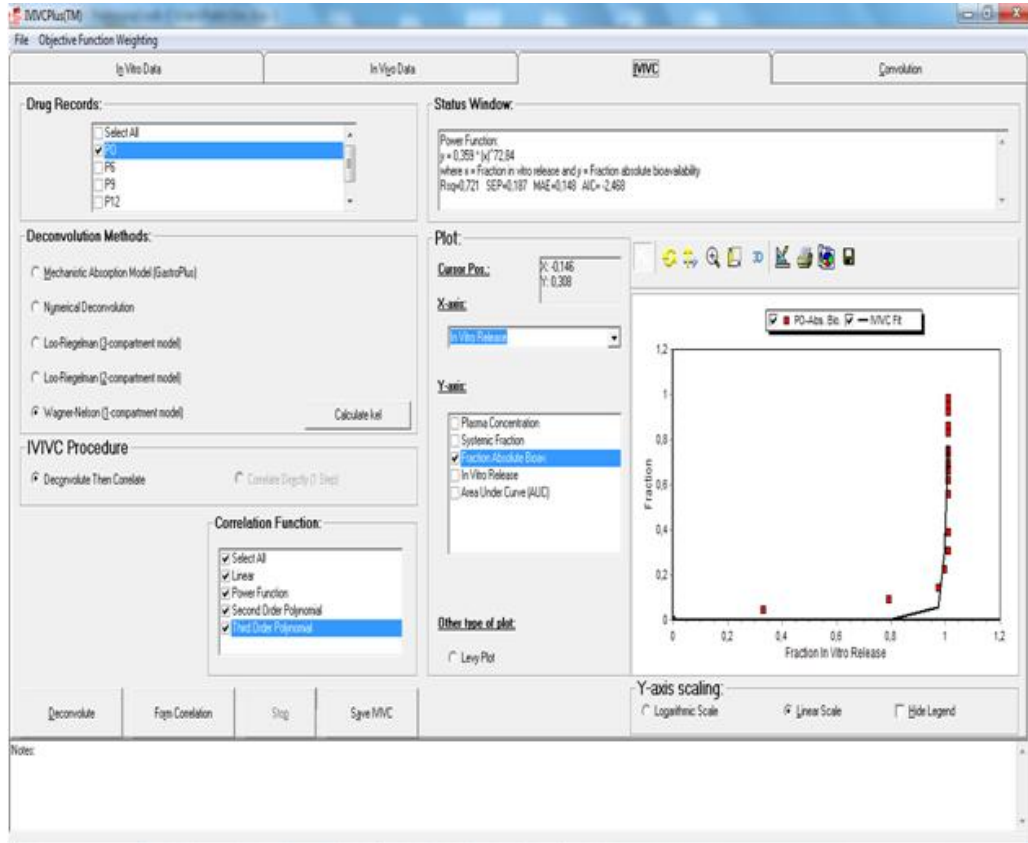


Figura 13 – Tela do módulo IVIVCPlus™ com a opção “IVIVC” habilitada.

O último campo (Figura 14) a ser habilitado é o da convolução, no qual campo todos os parâmetros farmacocinéticos são apresentados com seus erros de predição e os respectivos coeficientes de regressão (GRBIC *et al.*, 2011; SIMULATION PLUS, 2010).

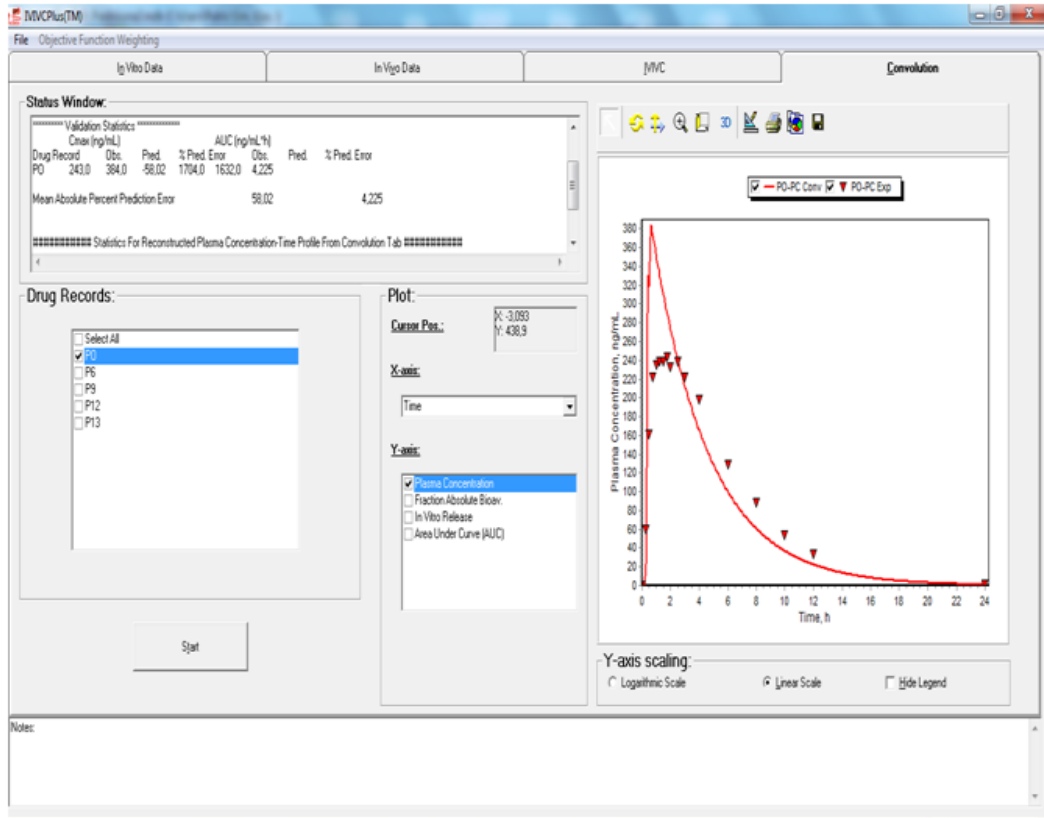


Figura 14 – Tela do módulo IVIVPlus™ com a opção “Convolution” habilitada.

Para o estabelecimento da simulação foram utilizados os dados do perfil de dissolução *in vitro* obtidos no estudo de equivalência farmacêutica entre os lotes R023 e P0020020910 (EQFAR, 2011), os dados de perfil de dissolução obtidos para cada lote em todos os tempos do estudo de estabilidade e os dados do perfil da curva de concentração plasmática *versus* tempo do lote R023 e P0020020910.

3.5.3 Análises estatísticas

A porcentagem de erro de predição (%EP) foi estimada usando a equação 5. Os valores dos coeficientes de regressão linear foram automaticamente gerados pelo GastroPlus™.

$$\%EP = \frac{EXP - PRED}{EXP} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Onde:

%EP é a porcentagem do erro de predição,

EXP é são os parâmetros farmacocinéticos experimentais e,

PRED são os parâmetros farmacocinéticos simulados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados na ordem de desenvolvimento do trabalho, partindo da caracterização do insumo ativo, passando pelo estudo de dissolução das formulações referentes ao estudo, os estudos de permeabilidade e, por fim, aos métodos de predição *in silico* de biodisponibilidade. Será apresentada uma eventual correlação entre todos os parâmetros estudados.

4.1. Caracterização física do insumo farmacêutico prednisona

Os resultados apresentados para os testes de dissolução intrínseca, dissolução por dispersão, solubilidade, microscopia eletrônica e DSC foram obtidos no tempo zero, enquanto os resultados para os testes de TG, DRX e infravermelho foram realizados nos tempos zero e 360 dias do estudo de estabilidade.

4.1.1 Análise Termogravimétrica (TGA)

Os perfis das curvas de TG (Figura 15) obtidas para as amostras A e B do IFA prednisona demonstraram que, nos tempos zero e 360 dias de estudo ambas apresentaram-se termicamente estáveis até aproximadamente 261°C. A partir dessa temperatura foi observada uma perda gradativa de massa devido à decomposição térmica do IFA. Esse resultado elimina a possibilidade das referidas amostras tratarem-se da forma monoidratada ou solvatada com clorofórmio, conforme relatado na literatura, uma vez que as amostras estudadas apresentaram nenhuma perda de massa até o início da sua decomposição térmica (MESLEY, 1965; KUHNERT *et al.*, 1971).

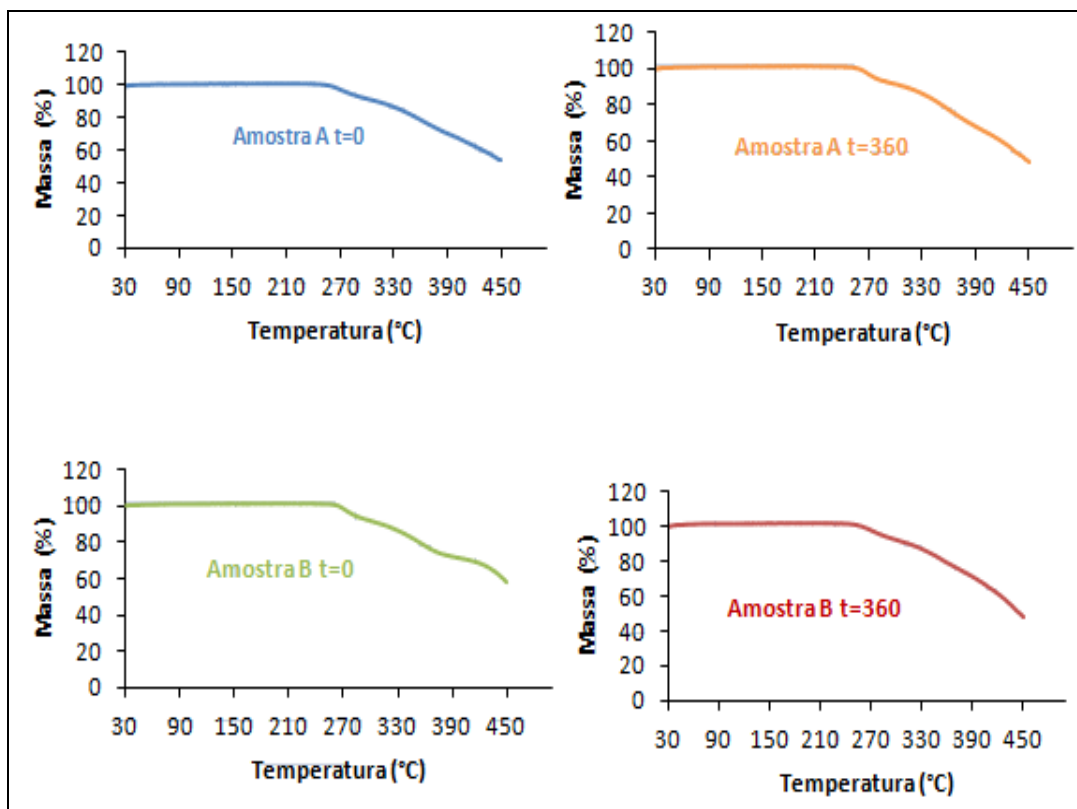


Figura 15 – Curvas de TG obtidas para as amostras A e B do IFA prednisona nos tempos zero e 360 dias de estudo.

4.1.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A DSC é uma técnica que permite medir a quantidade de energia absorvida (evento endotérmico) ou liberada (evento exotérmico) de uma substância quando essa é submetida a uma programação controlada de temperatura. Essa técnica pode fornecer dados sobre a temperatura de fusão e a cinética de transformações do estado sólido (LU & ROHANI, 2009).

As curvas de DSC para as amostras A e B foram obtidas a pressão atmosférica, com fluxo de gás nitrogênio de $80\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, faixa de aquecimento de 25°C a 300°C e razão de aquecimento de $2,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ e $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (MEDEIROS *et al.*, 2001).

Os perfis calorimétricos das amostras apresentados nas Figuras 16, 17 e 18 apontaram uma possibilidade de existência de duas formas cristalinas distintas, uma

vez que os picos de fusão das amostras apresentaram temperaturas diferentes entre si (Tabela 10).

Tabela 10 - Dados obtidos a partir das curvas de DSC a 2,5 °C.min⁻¹, 5 °C.min⁻¹ e 10 °C.min⁻¹ *Tonset* (início da fusão), *Tpeak* (final da fusão) e ΔT (*Tpeak* – *Tonset*) das amostras A e B de prednisona.

Amostra	Razão de Aquecimento								
	2,5°C/min			5°C/min			10°C/min		
	<i>Tonset</i> (°C)	<i>Tpico</i> (°C)	ΔT (°C)	<i>Tonset</i> (°C)	<i>Tpico</i> (°C)	ΔT (°C)	<i>Tonset</i> (°C)	<i>Tpico</i> (°C)	ΔT (°C)
A	233,8	237,8	4,0	236,5	241,2	4,7	243,1	245,3	2,2
B	223,9	229,5	5,6	228,7	234,3	5,6	233,7	237,8	4,1

Os resultados utilizando apenas a análise por DSC como critério indicaram, *a priori*, polimorfismo nas amostras. Estes dados, todavia, estão em contradição com os resultados obtidos por difração de raios X.

As diferenças nos perfis calorimétricos, por sua vez, podem estar relacionadas à pureza das amostras A e B, que apresentaram teores de 99,7% e 98,5%, respectivamente. A presença de pequenas quantidades de impurezas em uma substância pode diminuir o seu ponto de fusão e aumentar a sua faixa de fusão (DONNELLY *et al.*, 1990). Dados na literatura demonstram que alguns autores também utilizam a DSC para determinar o grau de pureza de uma dada substância (FERGUSON *et al.*, 2000; SCHNITZLER *et al.*, 2001). Todavia, essa técnica não deve ser utilizada para esse fim quando a substância em análise decompõe-se durante a sua fusão (DOOREN & MILLER, 1984), como é o caso da prednisona (FB, 2010). Por isso, esta abordagem calorimétrica foi preterida no presente trabalho.

Assim, como a análise de difratometria é preponderante neste caso, sendo a mesma realizada à temperatura ambiente, a presença de polimorfismo foi descartada.

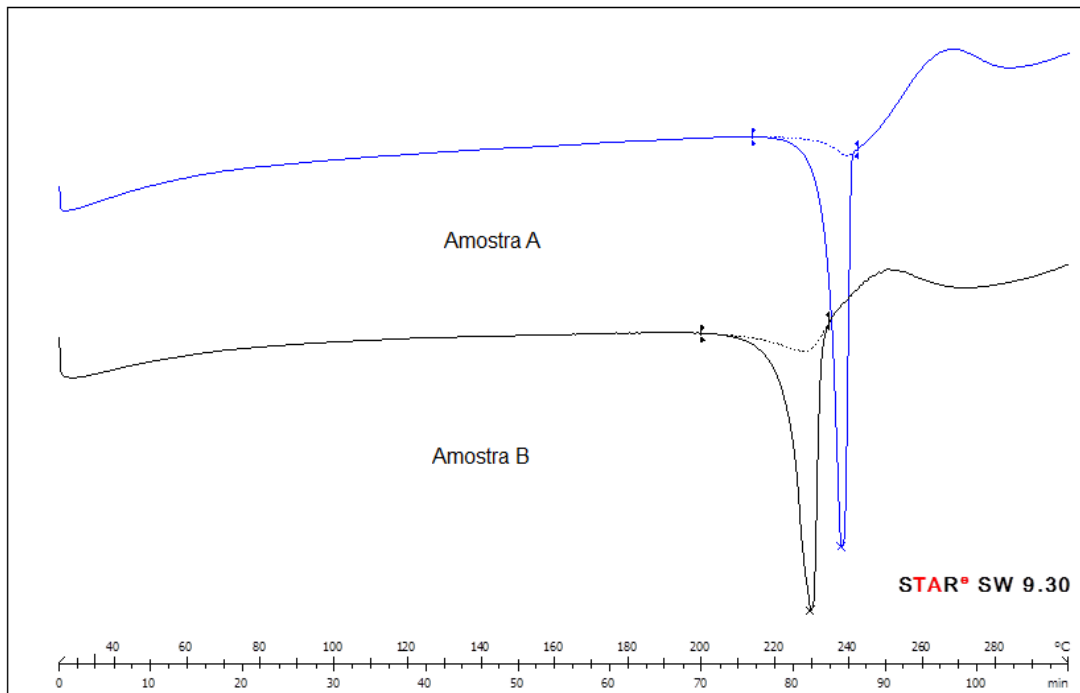


Figura 16 – Curva de DSC das amostras A e B de prednisona sob uma taxa de aquecimento de 2,5°C/min.

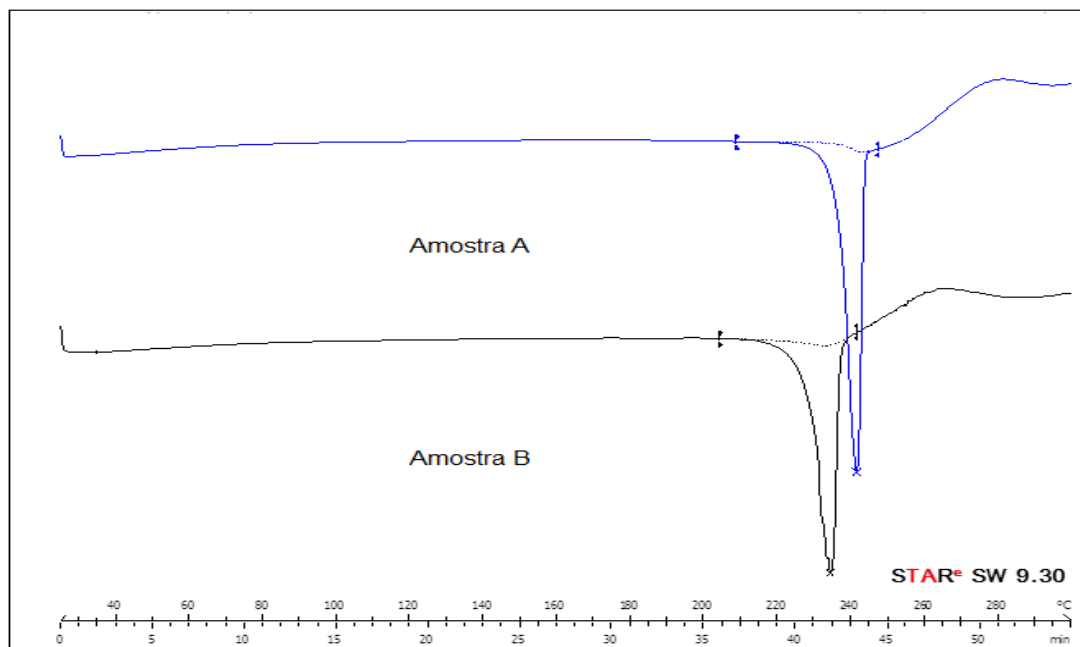


Figura 17 – Curva de DSC das amostras A e B de prednisona sob uma taxa de aquecimento de 5°C/min.

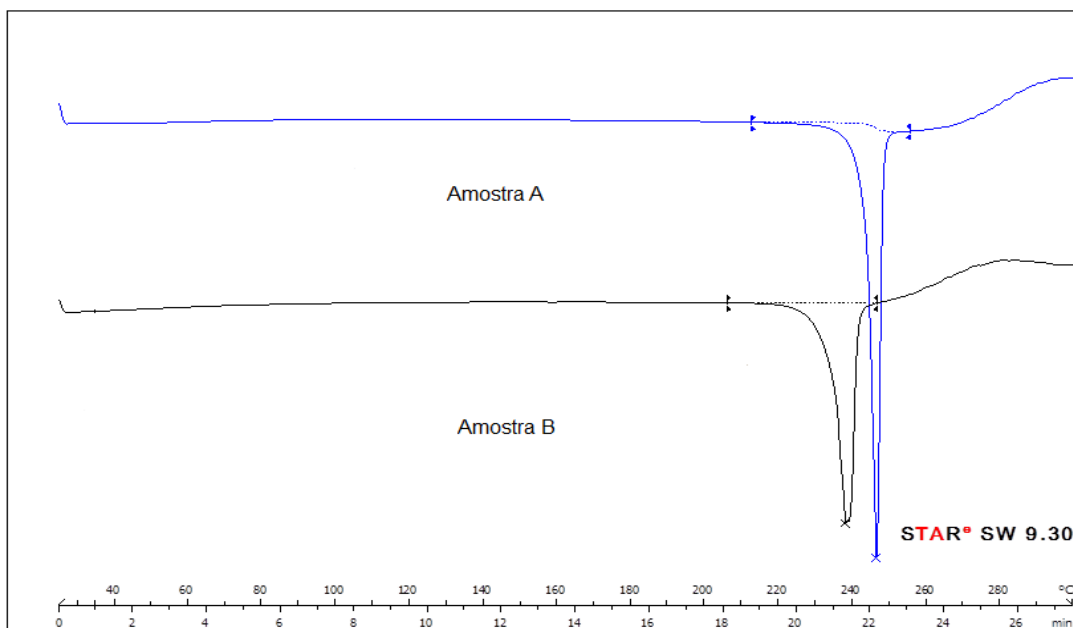


Figura 18 – Curva de DSC das amostras A e B de prednisona sob uma taxa de aquecimento de 10°C/min.

4.1.3 DRX

Apesar da dúvida levantada pelo resultado de DSC em relação à presença de polimorfismo nas amostras, a caracterização por difração de raios X (Figura 19) comprovou a presença da mesma fase cristalina nas amostras A e B do IFA prednisona. Os picos no padrão de difração são os mesmos em ambas as amostras, no tempo inicial e final do estudo de estabilidade, não havendo diferenças nas posições 2θ . O estudo comprovou também que, quando comparadas a um padrão de DRX simulado a partir de dados cristalográficos de SD-XRD depositados no CSD (ALLEN, 2002) e obtido por meio do *software* MERCURY (MACRAE *et al.*, 2008), as amostras apresentaram a mesma fase cristalina desse padrão. Dessa forma, é possível concluir que durante o período de estudo, e nas condições de temperatura e umidade relativa, adotadas para o armazenamento, não houve transição de fase cristalina nas amostras estudadas.

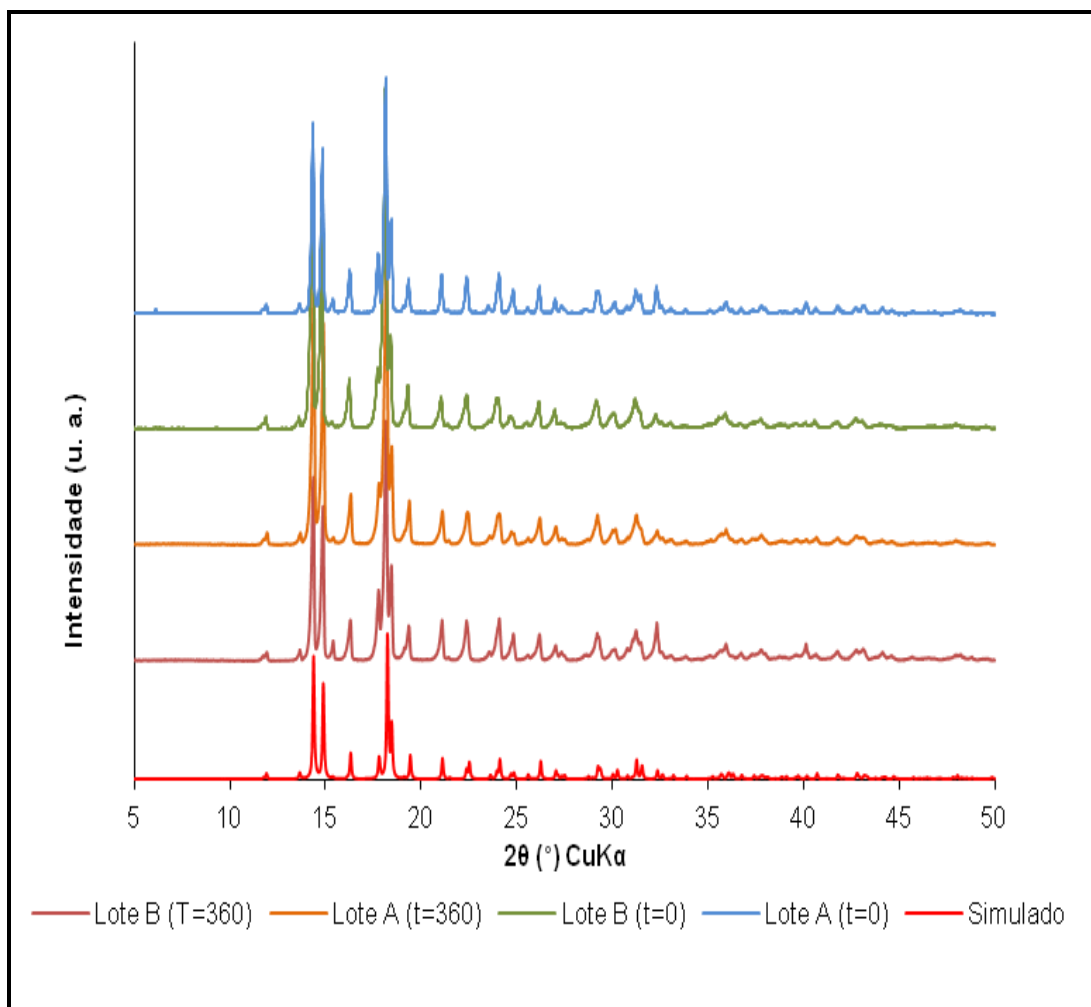


Figura 19 – Padrões de difração das amostras A e B de prednisona nos tempos zero e 360 dias de estudo de estabilidade e do padrão simulado.

4.1.4 Espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho é uma técnica muito utilizada na identificação química e cristalográfica de substâncias orgânicas (BUGAY, 2001). Essa técnica é baseada na exposição da substância a uma radiação eletromagnética de comprimento de onda na região do infravermelho. Assim, a absorção da referida radiação resulta de modificações na energia vibracional da molécula em um determinado momento dipolar (CHALMERS & DENT, 2006)

A partir dos resultados obtidos no espectro de absorção no infravermelho, foi possível observar que no tempo zero de estudo, as amostras A e B do IFA

prednisona apresentaram máximos de absorção somente nos mesmos comprimentos de onda e com as mesmas intensidades relativas observadas no espectro das amostras dos padrões USP e Farmacopeia Brasileira (Figura 20). Foi possível observar também que ao término do estudo (t=360) o espectro das amostras A e B, quando comparados aos respectivos resultados no tempo zero, não apresentaram um deslocamento significativo nas posições dos picos e das bandas referentes aos principais grupos funcionais, fato que sugere que não houve transição de fase cristalina nas amostras estudadas (Tabela 11).

Tabela 11 – Principais grupos e frequências selecionadas de FTIR das amostras A e B de prednisona e dos padrões USP (Pd USP) e Farmacopeia Brasileira (Pd FB) nos tempos t=0 e t=360.

Grupo	Amostras					
	A t=0	B t=0	A t=360	B t=360	Pd USP	Pd FB
	Frequência FTIR (cm ⁻¹)					
- OH	3358	3364	3356	3362	3369	3367
=C anel	3302	3312	3304	3309	3307	3316
CH, CH ₂ -CH ₃	2956, 2870	2964, 2873	2954, 2871	2963, 2870	2958, 2978	2963, 2868
C=O	1711, 1667	1720, 1658	1709, 1668	1715, 1658	1702, 1670	1724, 1655
C=C	1620	1625	1623	1622	1615	1629
CH ₃	1393	1387	1395	1385	1397	1386
-OH	1103	1107	1101	1105	1112	1105
-OH	1045	1051	1043	1047	1054	1049

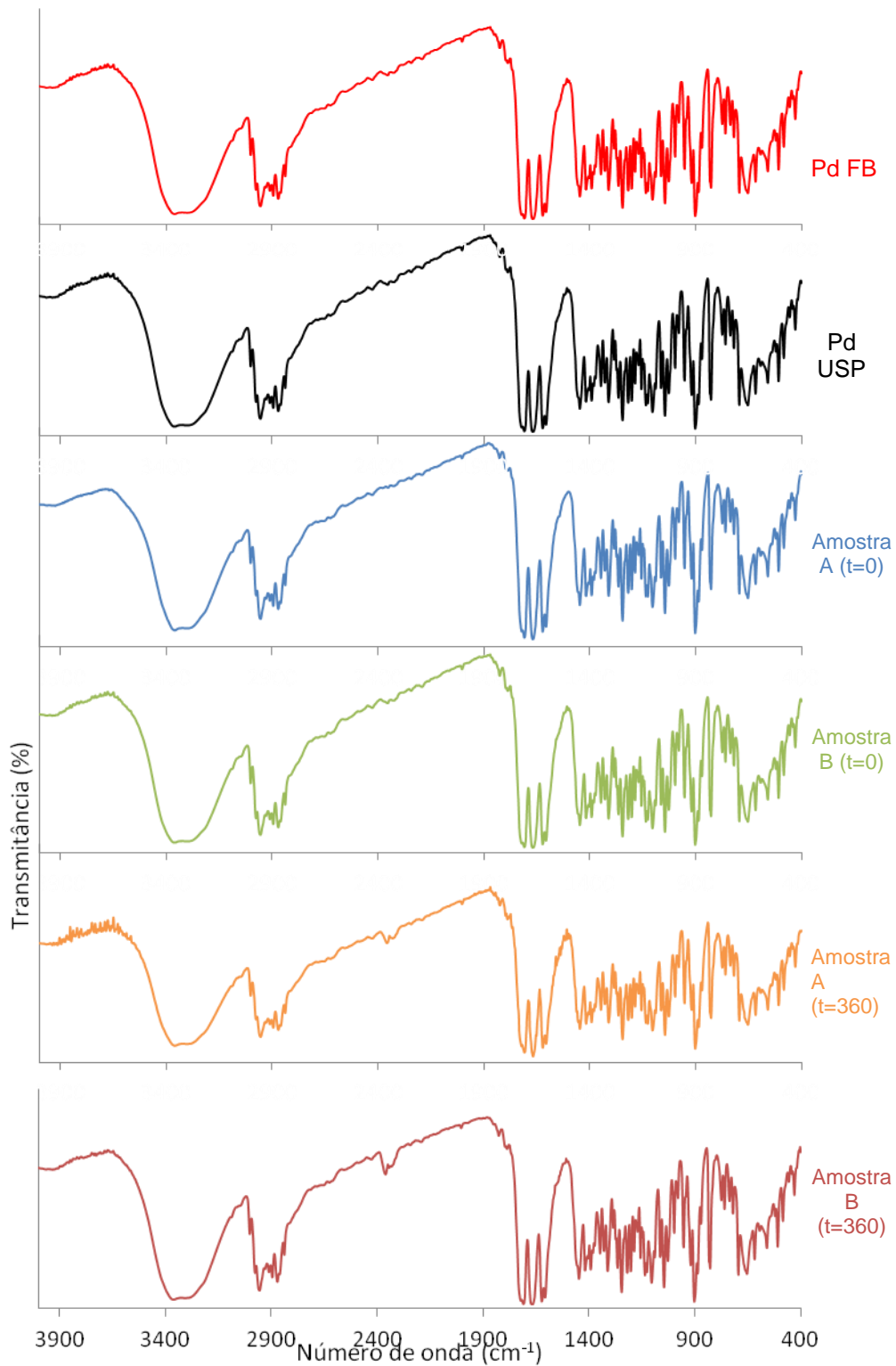


Figura 20 – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das amostras A e B de prednisona nos tempos zero e 360 dias de estudo de estabilidade e dos padrões de referencia USP (Pd USP) e Farmacopeia Brasileira (Pd FB).

4.1.5 Dissolução Intrínseca

A taxa de dissolução intrínseca (TDI) é uma importante ferramenta para avaliar a diferença de solubilidade entre polimorfos e solvatos, principalmente quando se tem disponível uma pequena quantidade de amostra (QIU *et al.*, 2009). Essa forma de dissolução avalia a solubilidade do IFA de forma isolada, ou seja, sem a presença de excipientes (GIBSON, 2009; ISSA & FERRAZ, 2011). A TDI de um fármaco é expressa em $\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ e o seu valor é obtido pela divisão do coeficiente angular, obtido da equação da reta de dissolução, pela área superficial da pastilha formada pelo fármaco.

Os resultados obtidos para as amostras A e B estão apresentadas na Figura 21 e na Tabela 12.

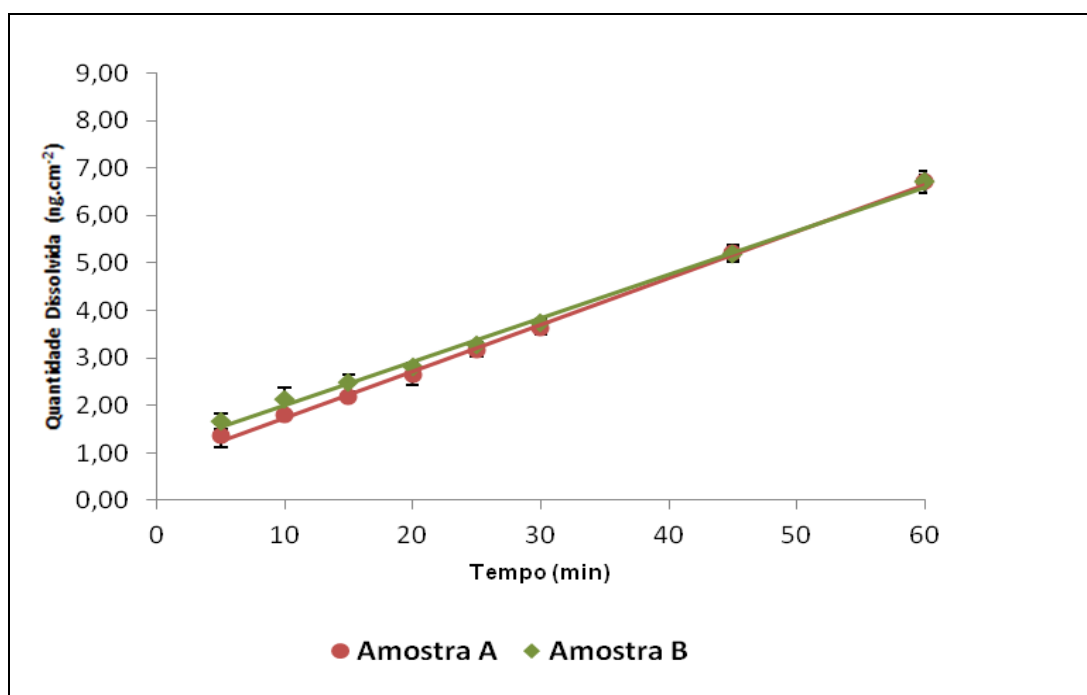


Figura 21 – Dissolução intrínseca das amostras A e B de prednisona em 900 mL de água contendo 1,2% de laurilsulfato de sódio usando aparato 2 a 150 rpm.

Tabela 12 - Resultados da taxa de dissolução intrínseca (TDI) em $\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ das amostras A e B de prednisona.

Amostras	A (60 min)	B (60 min)
TDI Média	6,71	6,73
Coeficiente de determinação (r^2)	0,9997	0,9963

Conforme os resultados obtidos e apresentados na Tabela 12 e Figura 21, os perfis de dissolução intrínseca tiveram um comportamento linear, evidenciado uma vez que ambas as amostras apresentaram um coeficiente de determinação maior que 0,99. Essa linearidade permite concluir que durante a análise não houve transição de fases e a condição *sink* foi mantida.

As amostras A e B apresentaram um perfil de dissolução e uma TDI semelhantes; esse resultado corrobora com os resultados de DRX e de infravermelho, onde se concluiu que ambas as amostras apresentam a mesma forma cristalina.

Da mesma forma que os resultados obtidos no teste de solubilidade permitem classificar as amostras analisadas como de alta solubilidade, segundo o SCB, um estudo correlacionando a TDI com a solubilidade de quinze fármacos, realizado por YU *et al.* (2004), considera que uma TDI maior que $0,1 \text{ mg}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ representa uma alta solubilidade, e fármacos com valores menores ao mencionado, uma solubilidade baixa. Assim, de acordo com o referido estudo, ambas as amostras podem ser classificadas como de alta solubilidade.

4.1.6 Dissolução por dispersão

A dissolução por dispersão das amostras A e B do fármaco prednisona foi obtida por meio da adição de aproximadamente 20mg de cada amostra em uma cuba de dissolução contendo 900 mL de água, à temperatura de $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$ e sob agitação de 50 rpm. Os resultados do perfil de dissolução para ambas as amostras estão representados na Tabela 13 e na Figura 22.

Tabela 13 – Quantidade de prednisona em (%) dissolvida das amostras A e B nos tempos t=5, t=10, t=15, t=20, t=25 e t=30 minutos.

Tempo (min)	Média da Quantidade Dissolvida (%) e DPR (%)			
	Amostra A	DPR (%)	Amostra B	DPR (%)
5	7,97	12,4	8,11	13,1
10	34,92	5,6	31,34	6,0
15	50,87	7,8	44,85	7,2
20	67,90	2,5	55,46	2,1
25	68,66	11,9	61,53	13,3
30	87,7	9,8	85,1	10,0

As amostras A e B apresentaram, respectivamente, uma média de dissolução de 87,7% e 85,1% em 30 minutos. Esse valor é muito menor do que os obtidos para todos os comprimidos de prednisona 20 mg que obtiveram taxas dissolução média do ativo de 98% em 30 minutos. Essa discrepância nos resultados pode ter ocorrido, pois durante a análise foi observado que parte do ativo ficou flutuando na superfície do meio e/ou aderida ao aparato (pá), formando um aglomerado. Dessa forma, uma parte da massa de ativo adicionada não entrou em contato com o meio e, conseqüentemente, não passou pelo processo de dissolução.

É importante ressaltar que além de ser um fármaco hidrofóbico, as amostras de prednisona analisadas apresentam um tamanho de partícula muito reduzido (99% < 30 μm), o que leva a uma agregação das partículas, dificultando a dispersão e reduzindo a taxa de dissolução.

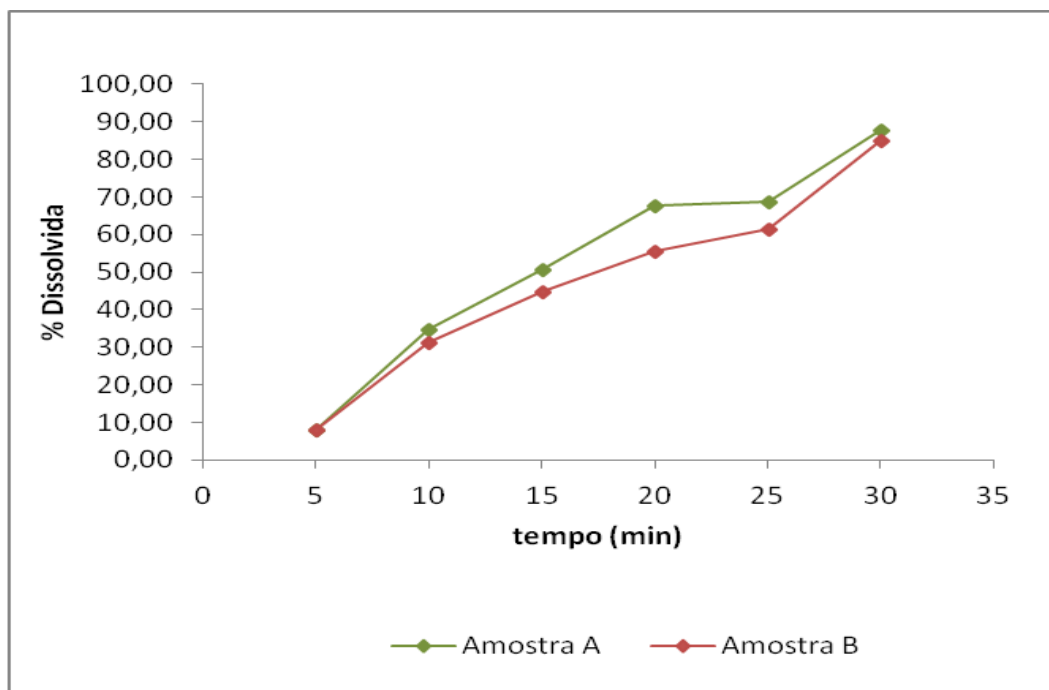


Figura 22 – Comparação entre os perfis de dissolução intrínseca das amostras A e B de prednisona.

Com o objetivo de possibilitar a comparação numérica dos perfis de dissolução obtidos para as amostras A e B do IFA, os fatores de diferença (F1) e de semelhança (F2) foram determinados e os resultados foram 10,03 e 58,77 respectivamente. Esses valores apontam que os perfis de dissolução das amostras são semelhantes.

4.1.7 Solubilidade

A solubilidade é um parâmetro estático que expressa um estado de equilíbrio termodinâmico entre o solvente e o soluto. Esse equilíbrio é dependente de algumas condições experimentais como a temperatura (QIU *et al.*, 2009). Segundo a literatura, a prednisona é um fármaco praticamente insolúvel em água e apresenta uma solubilidade de $0,133 \text{ mg.mL}^{-1}$ a 25°C (VOGT *et al.*, 2007).

O conhecimento da solubilidade de um IFA é de fundamental importância

para determinação da sua classificação biofarmacêutica e de acordo com o SCB essa deve ser determinada a 37° C e em meio aquoso com diferentes valores de pH. A Tabela 14 apresenta os valores de solubilidade, segundo o SCB, obtidos experimentalmente para as amostras A e B de prednisona em estudo.

Tabela 14 - Valores de solubilidade, segundo o SCB, obtidos experimentalmente para as amostras A e B de prednisona em estudo.

Meios	Média da Solubilidade (mg.mL ⁻¹) a 37° C		Volume (mL) de meio necessário para solubilizar 50 mg de prednisona	
	Amostra A	Amostra B	Amostra A	Amostra B
Tampão HCL pH 1,2	4,48	4,51	11,03	11,08
Água pH 5.5	4,53	4,54	11,04	11,01
Tampão Fosfato pH 6.8	4,55	4,57	10,98	10,94

Conforme os resultados obtidos experimentalmente, as amostras A e B apresentaram uma solubilidade de aproximadamente 4,5 mg.mL⁻¹ a 37°C , para todas as faixas de pH testados. Esse resultado condiz com a informação obtida na literatura que classifica a prednisona como uma molécula neutra e, dessa forma, alterações no pH não alteram a sua solubilidade (VOGT *et al.*, 2007).

Baseado nos resultados apresentados, ambas as amostras podem ser classificadas como de alta solubilidade, visto que o volume de meio necessário para dissolver 50 mg de prednisona (maior dose posológica disponível no mercado nacional) foi de aproximadamente 11mL em todos os valores de pH testados, valor muito abaixo dos 250 mL preconizado pelo SCB.

A discordância entre os dados de solubilidade obtidos experimentalmente e na literatura (0,133 mg.mL⁻¹) pode estar relacionada à diferença de temperatura na qual essa foi determinada, uma vez que a prednisona apresenta um comportamento endotérmico, ou seja, sua solubilidade aumenta com o aumento da temperatura

(VOGT *et al.*, 2007).

4.1.8 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica que fornece informações sobre algumas características das partículas como a sua morfologia, seu tamanho e coloração. Dessa forma, é uma técnica importante, pois variações nessas características podem ser indicação de polimorfismo (BRITAIN, 1999; BERNSTEIN, 2002).

Conforme as fotomicrografias obtidas para as amostras A e B (Figura 23) do IFA prednisona ambas as amostras apresentam-se na forma de partículas irregulares e pequenas, em sua maioria menores que 30 μ m.

Vale ressaltar que esse dado vai ou encontro dos resultados (99% \leq 30 μ m) obtidos por difração de *LASER*, fornecidos nos laudos analíticos da amostra A e B de prednisona, pelos próprios fabricantes.

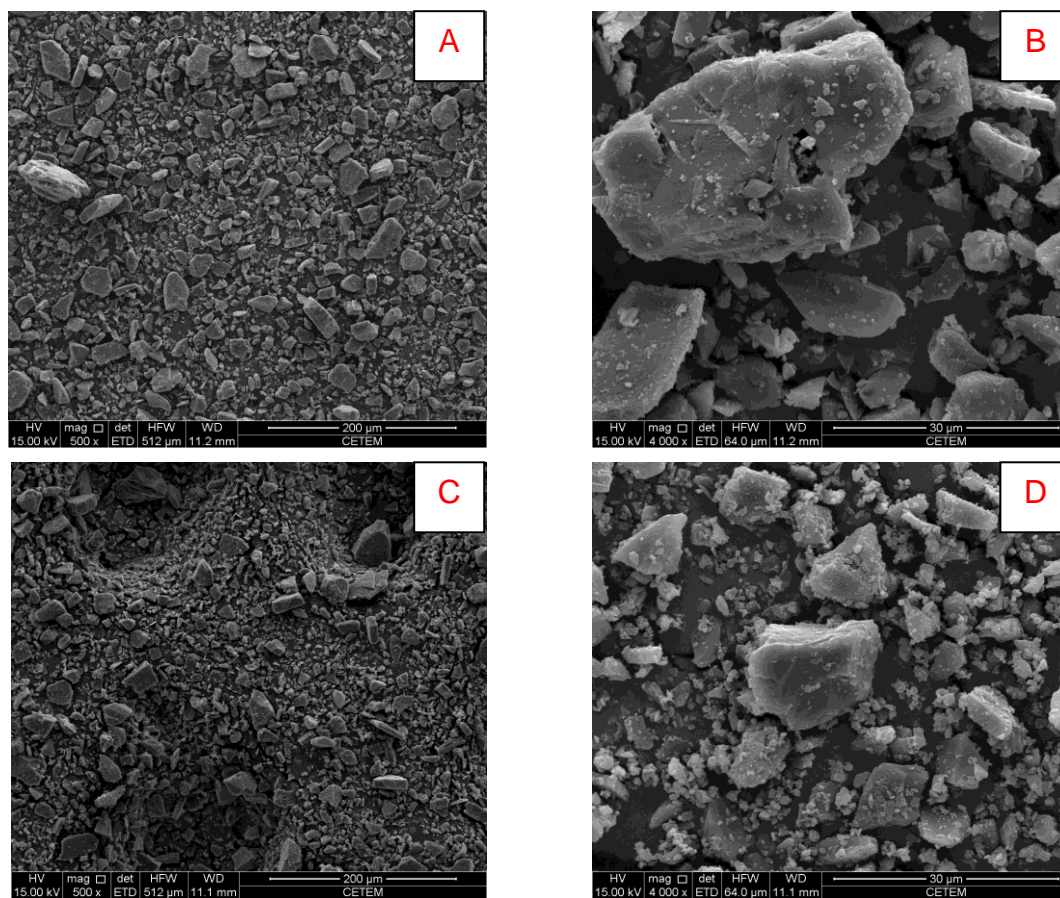


Figura 23 – Fotomicrografias do MEV amostra A (A e B); amostra B (C e D).

4.2. Avaliação do insumo farmacêutico ativo de acordo com os critérios farmacopeicos

As matérias-primas A e B foram aprovadas em todos os testes farmacopeicos realizados. O teor encontrado para matéria-prima A e B nos tempos $t=0$, $t=90$, $t=180$, $t=270$ e $t=360$ dias de estudo são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 – Resultados obtidos para o teste de Teor das amostras A e B de prednisona nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 dias de estudo.

Amostras	Tempo inicial	90 dias	180 dias	270 dias	360 dias
A	99,7 %	99,8 %	99,6 %	99,8 %	99,6 %
B	98,5 %	98,8%	98,7%	98,6%	98.6%

O teor de ambas as amostras não apresentou uma variação significativa ao longo dos 360 dias de estudo.

4.3. Avaliação dos comprimidos de prednisona ao longo da estabilidade

Os resultados obtidos para a avaliação dos comprimidos de prednisona referem-se aos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 dias de estudo.

4.3.1 Determinação de peso médio

De acordo com os limites preconizados pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição para avaliar a variação de peso em comprimidos não revestidos, todas as amostras ficaram dentro do limite estabelecido (Tabela 16). Vale ressaltar que, de forma geral, todos os lotes apresentaram um pequeno aumento na média do peso e também nos valores referentes aos pesos máximo e mínimo observados. Isso pode estar relacionado a um pequeno aumento na umidade que ocorreu em todos os lotes durante o estudo de estabilidade.

Tabela 16 – Resultados obtidos no teste de peso médio nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 dias de estudo.

Lotes	Tempo inicial		90 dias		180 dias		270 dias		360 dias	
	Média (mg)	Max Min (mg)	Média (mg)	Max Min (mg)	Média (mg)	Max Min (mg)	Média (mg)	Max Min (mg)	Média (mg)	Max Min (mg)
R023	303,4	306,1 300,2	303,7	305,4 299,5	303,6	305,4 300,6	304,1	306,6 299,7	304,3	306,7 300,5
P0020020910	142,1	145,1 138,5	142,3	145,9 139,2	143,1	146,3 140,2	143,0	145,7 140,5	143,4	146,2 140,7
MEST01	143,2	145,3 140,0	143,4	145,7 139,6	143,6	146,5 138,4	143,7	146,3 138,6	144,0	146,6 139,0
MEST02	140,7	142,2 138,1	140,9	143,4 139,1	141,2	144,1 139,8	141,3	144,4 140,1	141,2	144,1 140,9

4.3.2 Desintegração

Conforme preconizado pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição, os comprimidos não revestidos devem desintegrar no máximo em 30 minutos (FB, 2010). Os resultados obtidos neste teste encontram-se na Tabela 17.

Tabela 17 – Resultados obtidos para o teste de Desintegração nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 dias de estudo.

Lotes	Tempo inicial	90 dias	180 dias	270 dias	360 dias
R023	5min 27s	5min 50s	12min 12s	12min 47s	12min 20s
P0020020910	2min 38s	2min 20s	2min 50s	2min 44s	3min 20s
MEST01	2min 16s	2min 22s	2min 58s	2min 15s	3min 05s
MEST02	2min 26s	2min 34s	2min 40s	2min 05s	3min 20s

Pode-se observar que os lotes estão aprovados segundo os critérios farmacopeicos utilizados (FB, 2010). Os lotes P0020020910, MEST01 e MEST02, que foram produzidos com a mesma formulação, apresentaram um tempo de desintegração máximo de 3 minutos e vinte segundos.

O lote R023 apresentou um tempo de desintegração inicial de aproximadamente 5 minutos. Esse tempo sofreu uma alteração a partir de $t=180$ para 12 minutos e manteve-se constante até o final do estudo. Esse aumento pode estar relacionado à presença do excipiente povidona em sua formulação, uma vez que esse polímero pode levar à formação de uma película sobre as partículas do granulado e, como consequência, ao endurecimento dos comprimidos ao longo do tempo, prejudicando dessa forma o processo de desintegração e dissolução (MURTY & GUEBRE-SELLASSIE, 1992; COLORCON, 2006; BLOK, 2007).

4.3.3 Umidade

A Farmacopeia Brasileira 5ª edição não preconiza o teste de umidade para comprimidos de prednisona, porém este parâmetro foi avaliado durante o estudo de estabilidade com objetivo de permitir uma correlação com os testes de resistência mecânica e perfil de dissolução dos comprimidos em estudo, uma vez que esse dado interfere diretamente nesses parâmetros (AULTON, 2005). Os resultados encontram-se na Tabela 18.

Tabela 18 – Resultados obtidos para o teste de umidade nos tempos $t=0$, $t=90$, $t=180$, $t=270$ e $t=360$ dias de estudo.

Lotes	Tempo inicial	90 dias	180 dias	270 dias	360 dias
R023	2,53%	2,62%	2,75%	2,68%	3,23%
P0020020910	5,71%	5,85%	6,26%	6,32%	6,25%
MEST01	4,71%	4,78%	4,65%	4,77%	5,20%
MEST02	4,67%	4,70%	4,73%	4,87%	4,96%

Pode-se observar que há, em todos os casos, um pequeno aumento de umidade dos comprimidos ao longo do tempo. Este padrão é também verificado para o medicamento referência, sendo que este ainda apresenta uma variação da umidade levemente superior ao medicamento teste. Por se tratar de uma embalagem de PVC, ou seja, permeável, é comum que ocorra este tipo de fenômeno em função de vapor d'água que pode permear pelo material. Como não há especificação para este parâmetro, ele foi apenas avaliado para acompanhamento e eventual correlação com outros dados.

4.3.4 Dureza

De acordo com Farmacopeia Brasileira 5ª edição, o teste de dureza é de caráter informativo, não existindo parâmetros de aprovação (FB, 2010). Dessa forma, esse teste é utilizado no controle em processo da indústria farmacêutica com a finalidade de monitorar e controlar internamente uma variação desse parâmetro em comprimidos do mesmo lote ou de lotes diferentes, visto que uma alteração significativa na dureza pode ser resultante de um desvio na qualidade da matéria-prima utilizada ou do processo produtivo. Todavia, a resistência mecânica dos comprimidos também pode sofrer alterações, aumentando ou diminuindo durante a armazenagem. Tais alterações podem ser causadas por inúmeros fatores, dentre eles a absorção de umidade, mudança na estrutura cristalina das partículas e deformação viscosa de partículas (AULTON, 2005).

Os resultados obtidos durante a estabilidade (Tabela 19) apontam um pequeno aumento na dureza de todos os lotes. O lote que apresentou o maior aumento desse parâmetro foi o R023, quando comparado com os demais lotes em estudo. Da mesma forma que na desintegração, o aumento na dureza pode ter sido desencadeado pela associação de fatores como o aumento da absorção da umidade e a utilização da povidona nos comprimidos (MURTY & GUEBRE-SELLASSIE, 1992; COLORCON, 2006; BLOK, 2007).

Tabela 19- Resultados obtidos no teste de dureza nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 dias de estudo.

Lotes	Tempo inicial		90 dias		180 dias		270 dias		360 dias	
	Média (N)	DPR (%)	Média (N)	DPR (%)	Média (N)	DPR (%)	Média (N)	DPR (%)	Média (N)	DPR (%)
R023	57,4	8,7	60,5	5,1	64,9	9,5	65,8	5,6	66,4	6,8
P0020020910	53,1	8,1	55,6	10,5	56,8	5,6	56,2	7,5	55,8	5,7
MEST01	21,6	6,1	23,4	10,7	23,9	5,9	25,2	7,4	25,7	5,6
MEST02	33,0	6,5	33,6	11,3	35,5	6,7	38,5	5,9	38,7	7,3

4.3.5 Friabilidade

De acordo com a Farmacopéia Brasileira 5ª edição, para o ensaio de friabilidade é permitida uma perda de peso de 1,5% (FB, 2010). Os resultados demonstram um aumento na resistência mecânica ao atrito dos comprimidos durante o estudo de estabilidade (Tabela 20). Esse aumento pode estar associado à umidade absorvida pelos comprimidos que pode ter promovido à cristalização que algum excipiente, com a subsequente formação de pontes sólidas entre as partículas aumentando a sua resistência. (AULTON, 2005). É importante ressaltar que a friabilidade para o lote R023 não foi avaliada em todos os tempos do estudo devido à indisponibilidade desse lote no mercado.

Tabela 20 – Resultados obtidos para o teste de friabilidade nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 dias de estudo.

Lotes	Tempo inicial	90 dias	180 dias	270 dias	360 dias
R023	0,42%	não avaliada	não avaliada	não avaliada	0,18%
P0020020910	0,33%	0,36%	0,29%	0,25%	0,21%
MEST01	0,72%	0,67%	0,54%	0,45%	0,20%
MEST02	0,58%	0,43%	0,49%	0,33%	0,24%

Pode-se observar que todos os resultados estão aprovados segundo os critérios farmacopéicos utilizados.

4.3.6 Uniformidade de conteúdo

A especificação geral preconizada pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição para uniformidade de conteúdo determina que o teor deve ser realizado de forma individual, devendo estar compreendido na faixa de 85% a 115% e o desvio-padrão relativo (DPR) entre os resultados deve ser inferior a 6%. Os resultados encontram-se na Tabela 21.

Tabela 21 – Resultados da uniformidade de conteúdo no tempo zero.

Medicamento	% Máximo	% Mínimo	DPR (%)
Referência 023	105,76	102,37	1,23
P0020020910	103,50	98,85	1,64
MEST01	103,55	98,87	1,49
MEST02	103,79	98,49	1,89

Pode-se observar que todos os resultados estão aprovados segundo os critérios farmacopéicos utilizados.

4.3.7 Doseamento

De acordo com a especificação preconizada pela Farmacopeia Brasileira os comprimidos de prednisona devem conter no mínimo 90,0% e no máximo 110,0% da quantidade declarada de ativo (FB, 2002). Os resultados encontram-se na Tabela 22.

Tabela 22 – Resultados obtidos para o teste de Teor nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 dias de estudo.

Lotes	Tempo inicial		90 dias		180 dias		270 dias		360 dias	
	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)
Referência 23	106,7	0,30	106,0	0,24	105,9	0,48	105,7	0,30	105,8	0,25
P0020020910	100,6	0,35	100,4	0,20	100,1	0,38	100,2	0,68	99,9	0,17
MEST01	100,4	0,35	100,0	0,89	100,7	0,20	100,3	8,4	100,1	0,68
MEST02	101,7	0,21	101,2	0,30	101,3	0,32	100,7	0,45	100,4	0,21

Pode-se observar que todos os resultados estão aprovados segundo os critérios farmacopéicos utilizados.

Há de se mencionar mais especificamente, entretanto, certa estranheza na observação dos valores de teor para o medicamento referência, os quais, apesar de estarem inseridos na faixa de aprovação, estão bem acima do valor médio, tendendo ao limite superior da faixa. Este tipo de resultado sugere, ainda que não se possa aqui afirmar categoricamente, que há adição de excesso de princípio ativo durante a fabricação, prática conhecida como *overage*, a qual é determinantemente não recomendada pelos órgãos reguladores. Frisa-se que não se faz aqui qualquer tipo de afirmação sobre o fato, apenas lança-se luz a um resultado chamativo e que pode denotar uma prática em desuso na área farmacêutica.

4.3.8 Perfil de dissolução

Os resultados individuais dos perfis de dissolução dos lotes R023, P0020020910, MEST01 e MEST02 nos tempos zero, 90, 180, 270 e 360 dias de estudo de estabilidade estão descritos nas Figuras 24–27, respectivamente. Nas Tabelas 23–26 estão contidos os dados dos perfis de dissolução dos referidos lotes de prednisona expressos em percentual dissolvido nos tempos estabelecidos para o estudo de estabilidade.

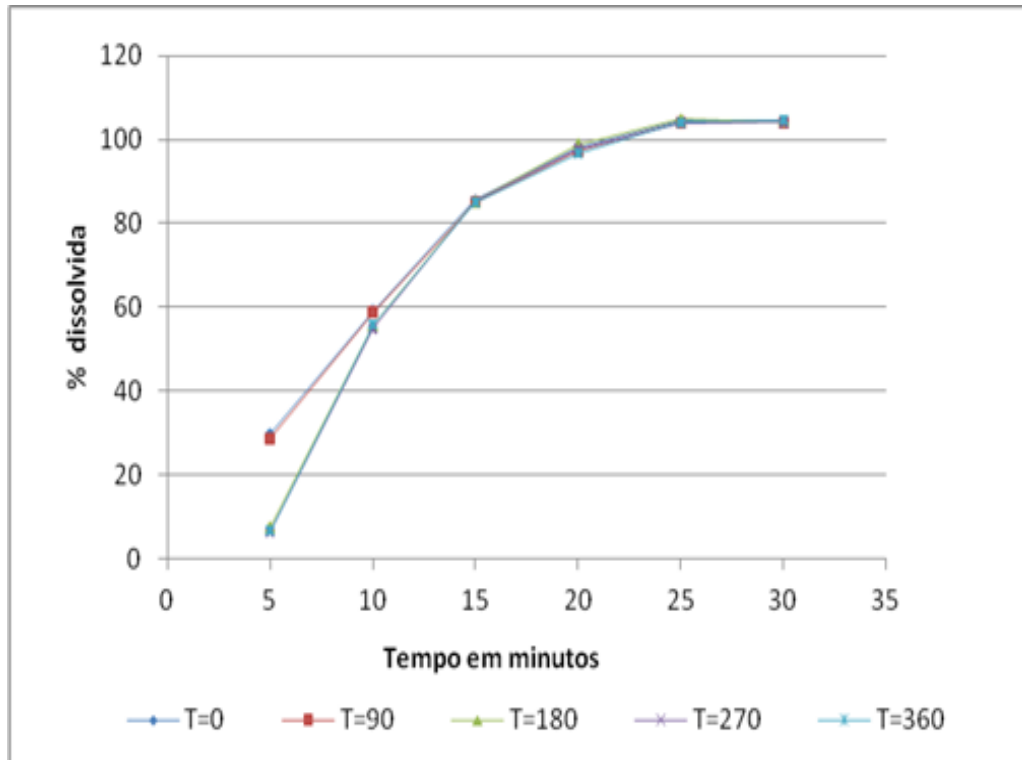


Figura 24 – Perfis de dissolução dos comprimidos de prednisona do lote R023 nos tempos $t=0$, $t=90$, $t=180$, $t=270$ e $t=360$ dias de estudo.

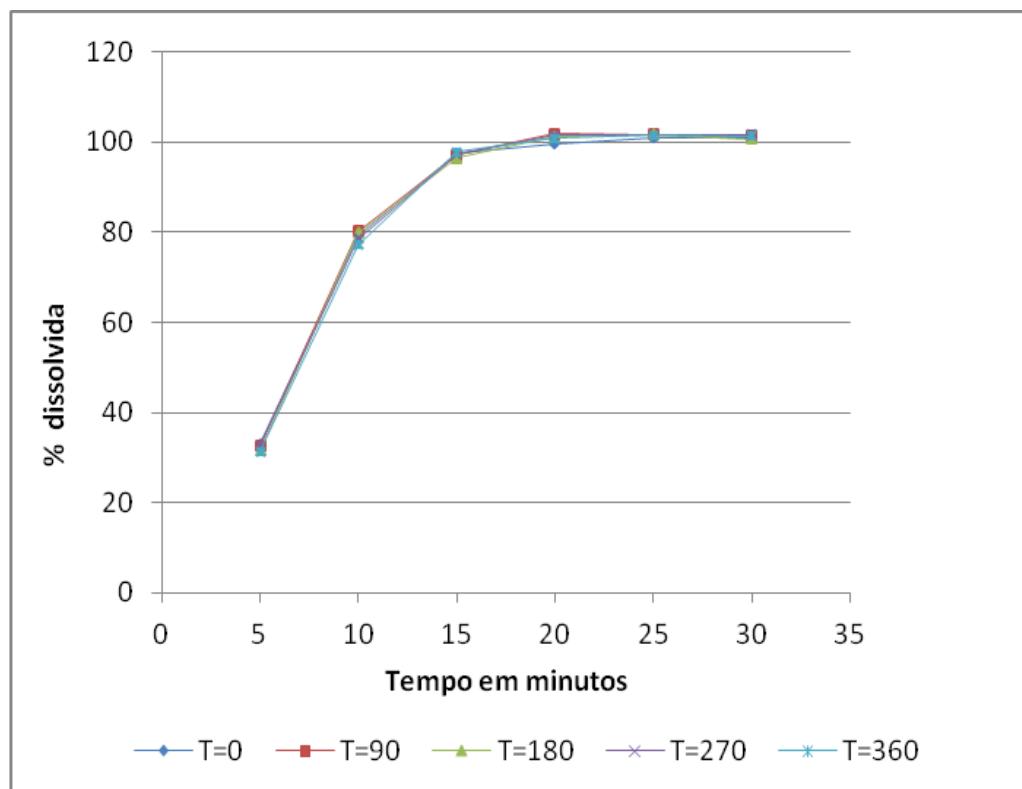


Figura 25 - Perfis de dissolução dos comprimidos de prednisona do lote P0020020910 nos tempos $t=0$, $t=90$, $t=180$, $t=270$ e $t=360$ dias de estudo.

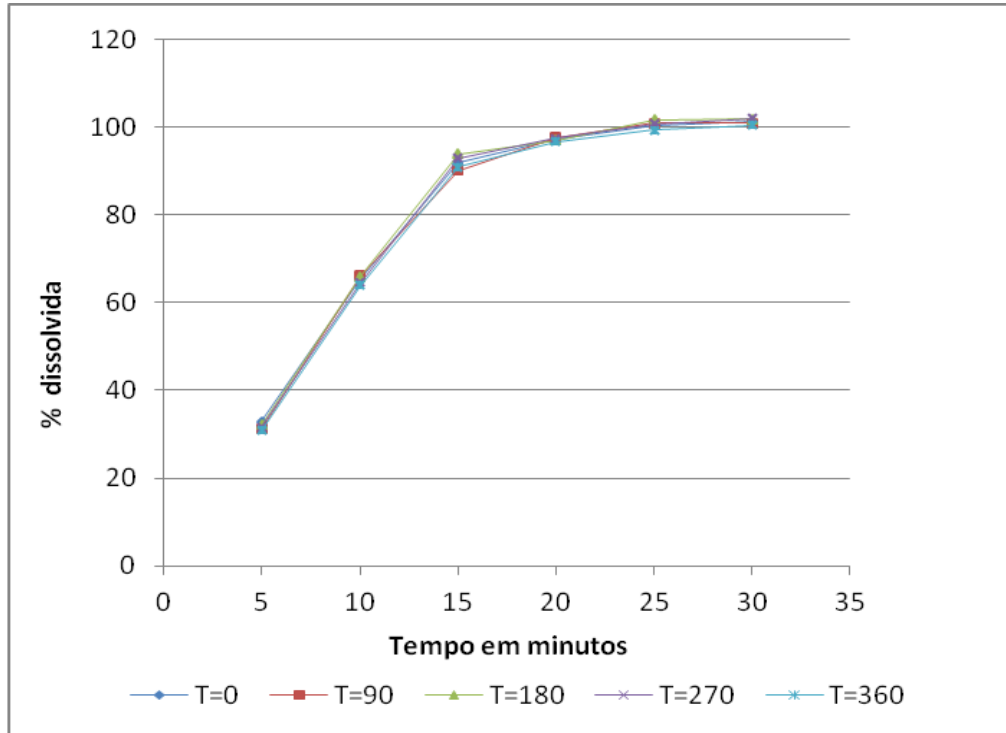


Figura 26 – Perfis de dissolução dos comprimidos de prednisona do lote MEST01 nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 dias de estudo.

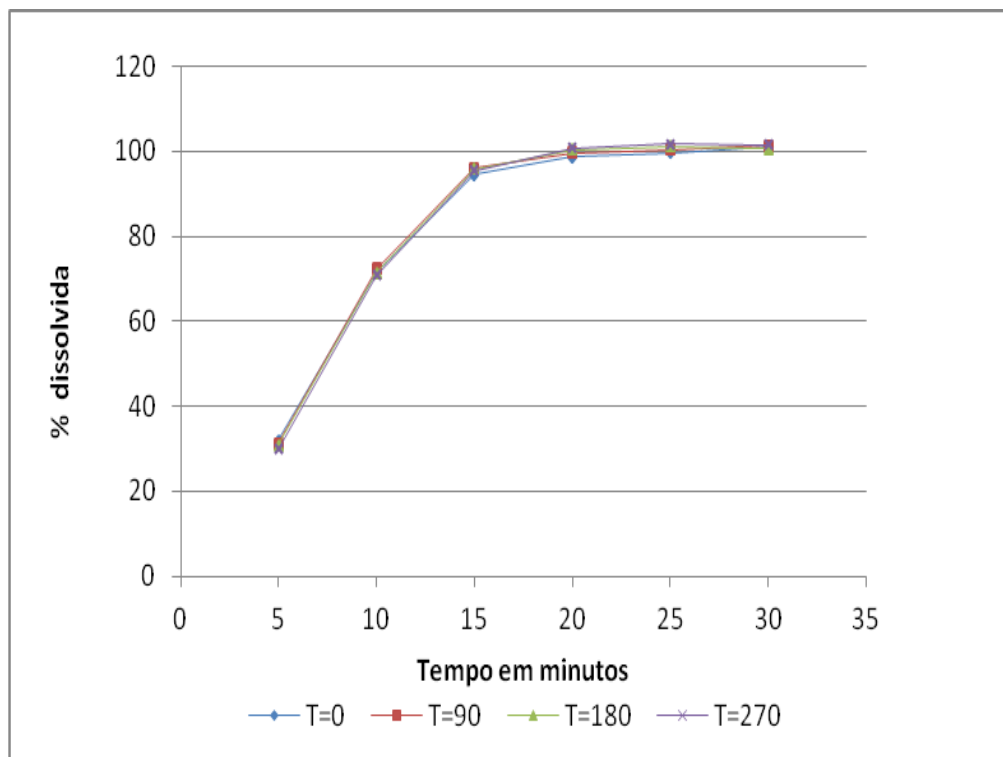


Figura 27 – Perfis de dissolução dos comprimidos de prednisona do lote MEST02 nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 dias de estudo.

Tabela 23 – Quantidade de prednisona em (%) dissolvida do lote R023 nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 dias de estudo de estabilidade. Fator de diferença (F1) e Fator de semelhança (F2) em relação ao Tempo inicial.

Tempo (min)	Tempo inicial		90 dias		180 dias		270 dias		360 dias	
	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)
5	29,9	4,4	28,8	5,9	7,5	9,3	6,6	7,2	6,7	8,8
10	59,2	1,8	58,8	9,3	55,6	10,1	54,8	9,5	55,9	7,5
15	85,5	2,7	85,1	4,1	85,2	5,9	85,1	6,4	85,0	4,5
20	98,1	2,7	97,2	6,7	98,8	8,8	97,7	6,4	96,7	9,1
25	104,5	0,7	104,1	3,7	104,8	3,0	103,9	3,7	104,2	3,7
30	104,4	2,6	104,2	2,0	104,2	3,1	104,1	3,2	104,6	3,1
	F1		0,97		5,72		6,09		6,00	
	F2		95,99		51,56		50,59		50,79	

Tabela 24 – Quantidade de prednisona em (%) dissolvida do lote P0020020910 nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 dias de estudo. Fator de diferença (F1) e Fator de semelhança (F2) em relação ao Tempo inicial.

Tempo (min)	Tempo inicial		90 dias		180 dias		270 dias		360 dias	
	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)
5	33,0	3,7	32,6	7,4	31,5	7,2	32,8	10,0	31,3	9,7
10	79,2	2,6	80,2	3,8	79,9	5,2	78,5	6,1	77,1	11,1
15	97,4	1,5	97,0	3,1	96,5	3,2	97,3	3,9	97,8	2,5
20	99,7	2,5	101,9	3,5	101,2	3,7	101,5	3,8	100,8	2,7
25	101,1	0,8	101,6	3,3	101,7	2,6	101,5	3,2	101,5	1,9
30	101,0	0,8	101,3	2,7	100,7	2,4	101,7	2,2	101,4	3,5
	F1		0,93		1,09		0,79		1,16	
	F2		92,10		92,25		93,94		90,29	

Tabela 25 – Quantidade de prednisona em (%) dissolvida do lote MEST01 nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 dias de estudo. Fator de diferença (F1) e Fator de semelhança (F2) em relação ao Tempo inicial.

Tempo (min)	Tempo inicial		90 dias		180 dias		270 dias		360 dias	
	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)
5	32,9	3,6	31,3	8,2	32,1	5,7	31,6	3,7	30,9	10,5
10	65,3	3,1	66,2	3,8	66,0	8,0	64,6	5,3	63,9	4,5
15	91,9	2,0	90,1	2,4	93,9	3,6	93,0	2,4	91,0	2,5
20	97,4	2,4	97,7	3,3	97,1	2,1	97,5	3,1	96,7	2,6
25	100,5	1,2	100,1	1,2	101,7	1,9	100,9	3,3	99,5	2,2
30	101,3	0,3	101,0	1,0	101,9	0,8	102,1	1,7	100,6	1,7
	F1		1,07		1,14		0,87		1,41	
	F2		91,58		91,80		94,40		89,87	

Tabela 26 - Quantidade de prednisona em (%) dissolvida do lote MEST02 nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 dias de estudo. Fator de diferença (F1) e Fator de semelhança (F2) em relação ao Tempo inicial.

Tempo (min)	Tempo inicial		90 dias		180 dias		270 dias		360 dias	
	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)
5	31,9	5,9	31,2	4,6	30,8	7,9	29,8	7,0	29,5	7,6
10	71,6	2,1	72,3	3,6	71,3	5,1	70,8	2,8	71,7	3,2
15	94,5	1,0	93,0	2,2	95,8	2,8	95,4	3,0	94,4	3,4
20	98,2	1,5	99,7	2,6	100,4	3,9	100,7	3,8	99,1	5,5
25	99,6	0,6	100,3	3,2	101,1	1,8	101,8	1,8	101,3	0,9
30	101,1	1,0	101,3	1,7	100,6	1,8	101,6	1,4	101,5	0,8
	F1		0,92		1,29		1,71		1,22	
	F2		94,04		90,31		86,31		88,97	

Os resultados obtidos e apresentados na Tabela 24 e na Figura 25 permitem observar que o lote P0020020910 apresentou uma taxa de liberação média do ativo superior a 85% em até 15 minutos para todos os tempos do estudo de estabilidade. Dessa forma, o referido lote pode ser classificado como de dissolução muito rápida, de acordo com a resolução RDC 31/2010 (BRASIL, 2010b). Os resultados também demonstraram que houve uma pequena variação no perfil de liberação da prednisona nos tempos $t=90$, $t=180$, $t=270$ e $t=360$ dias de estudo em relação ao $t=0$. Essa alteração foi confirmada por meio do cálculo dos valores de F1 e F2, cujos resultados estão descritos na Tabela 24.

Uma vez que o lote P0020020910 manteve uma taxa de liberação média do ativo maior que 85% em 15 minutos, e também apresentou valores abaixo de 15 para F1 e superiores a 50 para F2, pode-se concluir que esse apresentou, durante todo o estudo de estabilidade, um perfil de dissolução equivalente ao obtido no tempo zero.

Conforme os resultados dos perfis de dissolução representados na Tabela 25/Figura 26 e Tabela 26/Figura 27 para os lotes MEST01 e MEST02, respectivamente, pode-se concluir que os referidos lotes apresentaram um comportamento comparável ao do lote P0020020910, em todos os tempos do estudo de estabilidade. Dessa forma, de maneira análoga à análise anterior, conclui-se que esses lotes mantiveram os seus respectivos perfis de dissolução equivalentes ao obtido no tempo zero.

Apesar do lote R023 ter apresentado uma taxa de liberação média do ativo superior a 85% em até 15 minutos e valores abaixo de 15 para F1 e superiores a 50 para F2, em todos os tempos do estudo de estabilidade, os resultados representados na Tabela 22 e na Figura 24 mostram que esse lote sofreu uma significativa alteração no seu perfil de dissolução. Essa mudança teve início no $t=180$ e manteve-se nos $t=270$ e $t=360$, onde foi observada uma liberação de ativo, em até cinco minutos, de 7,5%, 6,6%, e 6,7%, respectivamente. Esse percentual difere das taxas de liberação observadas nos tempos $t=0$ e $t=90$, que foram respectivamente de 29,9% e 28,8%, em até cinco minutos. É possível que a redução na taxa de dissolução esteja associada ao aumento no tempo de desintegração desse lote, conforme discutido nos resultados de desintegração (item 4.3.2).

4.3.9 Comparação entre os perfis de dissolução

A comparação de perfis de dissolução vem sendo utilizada até a atualidade como uma ferramenta útil quando se deseja conhecer o comportamento de dois medicamentos antes de realizar um estudo de biodisponibilidade relativa/bioequivalência ou equivalência farmacêutica, para pleitear a isenção desses estudos ou em uma possível alteração pós-registro (BRASIL, 2010b; BRASIL, 2011). Todavia, essa comparação, quando realizada durante o estudo de estabilidade, permite avaliar se uma formulação inicialmente com perfis de dissolução equivalentes a outra mantém esse *status* ao longo da sua vida de prateleira.

É importante ressaltar que a velocidade com que um fármaco é liberado da sua forma farmacêutica pode ser um fator limitante no processo de sua absorção e, assim, uma possível variação nesse parâmetro durante o seu armazenamento pode ocasionar uma alteração no início, intensidade e duração de uma resposta terapêutica (MURTHY & GUEBRE-SELLASSIE, 1993).

O resultado comparativo dos perfis de dissolução dos lotes R023, P0020020910, MEST01 e MEST02 analisados nos tempos zero, 90, 180, 270 e 360 dias de estudo de estabilidade estão apresentados nas Tabelas 27–31, e nas Figuras 28–32, por meio de percentagem de prednisona liberada em cada tempo de coleta.

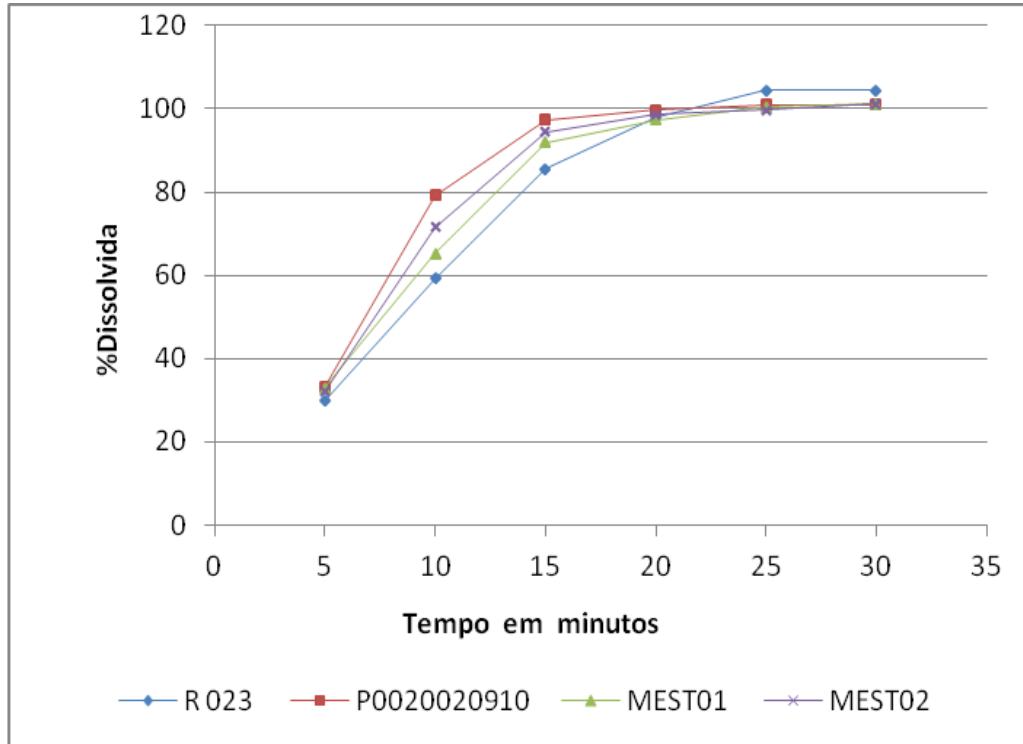


Figura 28 - Perfis de dissolução comparativos dos comprimidos de prednisona dos lotes R023, P0020020910, MEST01 e MEST02 no tempo zero do estudo de estabilidade.

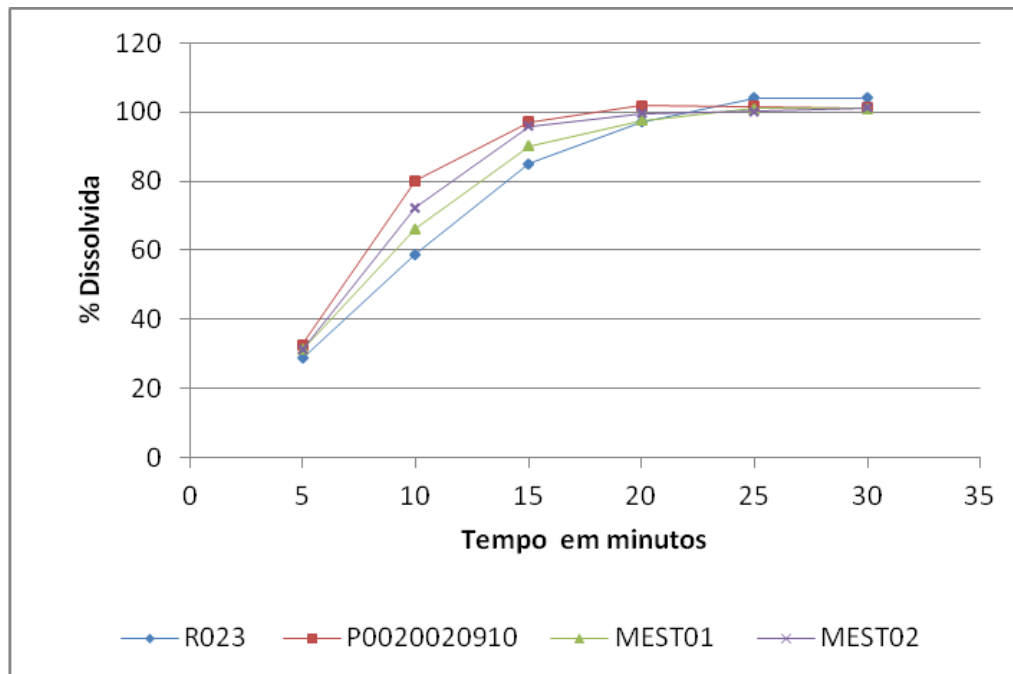


Figura 29 - Perfis de dissolução comparativos dos comprimidos de prednisona dos lotes R023, P0020020910, MEST01 e MEST02 no tempo 90 dias de estudo de estabilidade.

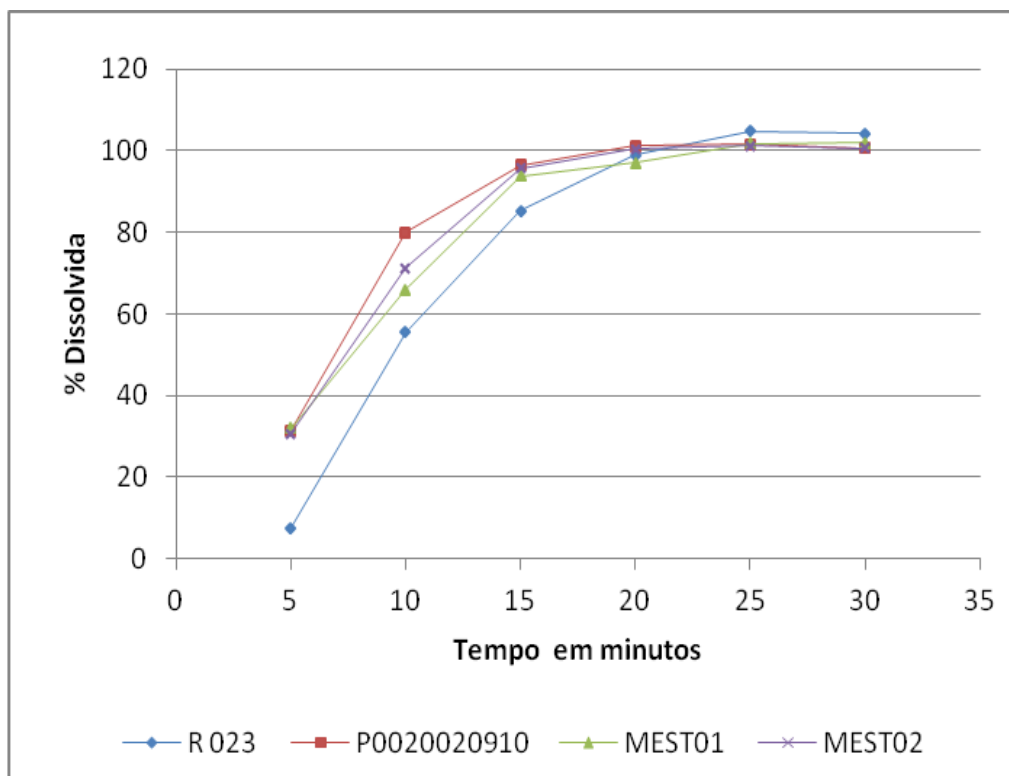


Figura 30 - Perfis de dissolução comparativos dos comprimidos de prednisona dos lotes R023, P0020020910, MEST01e MEST02 no tempo 180 dias de estudo de estabilidade.

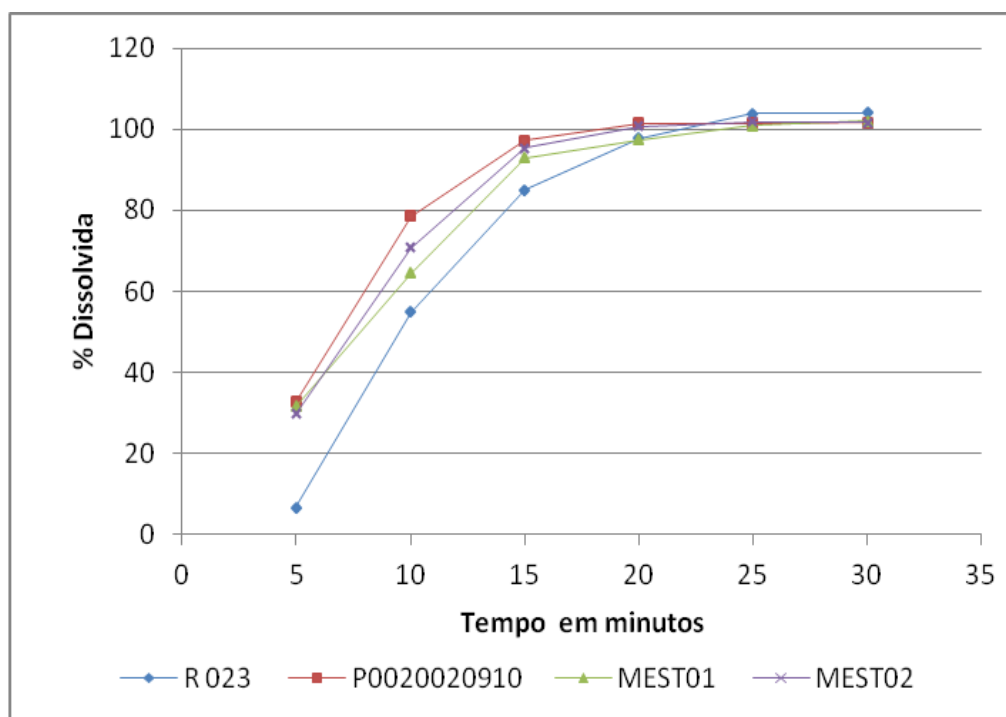


Figura 31 - Perfis de dissolução comparativos dos comprimidos de prednisona dos lotes R023, P0020020910, MEST01e MEST02 no tempo 270 dias de estudo de estabilidade.

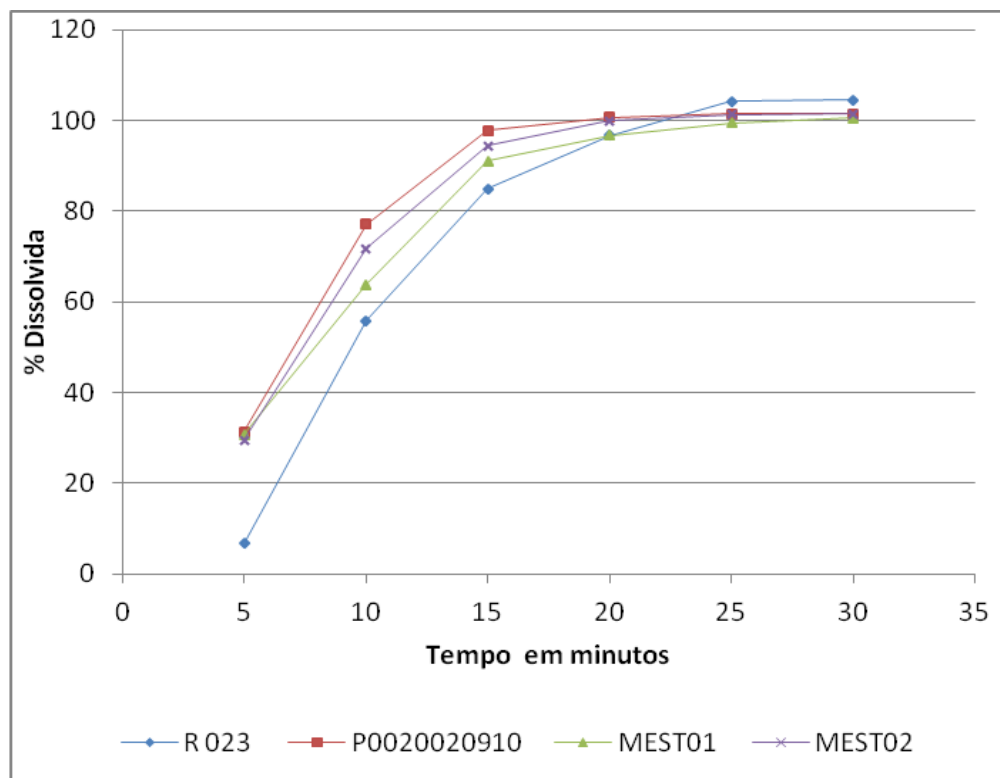


Figura 32 - Perfis de dissolução comparativos dos comprimidos de prednisona dos lotes R023, P0020020910, MEST01 e MEST02 no tempo 360 dias de estudo de estabilidade.

Tabela 27 - Quantidade de prednisona em (%) dissolvida dos lotes R023, P0020020910, MEST01 e MEST02 no tempo zero do estudo de estabilidade. Fator de diferença (F1) e Fator de semelhança (F2) em relação ao lote R023.

Tempo (min)	R023		P0020020910		MEST01		MEST02	
	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)
5	29,9	4,4	33,0	3,7	32,9	3,6	31,9	5,9
10	59,2	1,8	79,2	2,6	65,3	3,1	71,6	2,1
15	85,5	2,7	97,4	1,5	91,9	2,0	94,5	1,0
20	98,1	2,7	99,7	2,5	97,4	2,4	98,2	1,5
25	104,5	0,7	101,1	0,8	100,5	1,2	99,6	0,6
30	104,4	2,6	101,0	0,8	101,3	0,3	101,1	1,0
	F1		9,02		4,84		6,65	
	F2		50,31		67,51		58,32	

Tabela 28 - Quantidade de prednisona em (%) dissolvida dos lotes R023, P0020020910, MEST01 e MEST02 no tempo 90 dias de estudo de estabilidade. Fator de diferença (F1) e Fator de semelhança (F2) em relação ao lote R023.

Tempo (min)	R023		P0020020910		MEST01		MEST02	
	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)
5	28,8	5,9	32,6	7,4	31,3	8,2	31,2	4,6
10	58,8	9,3	80,2	3,8	66,2	3,8	72,3	3,6
15	85,1	4,1	97,0	3,1	90,1	2,4	93,0	2,2
20	97,2	6,7	101,9	3,5	97,7	3,3	99,7	2,6
25	104,1	3,7	101,6	3,3	100,1	1,2	100,3	3,2
30	104,2	2,0	101,3	2,7	101,0	1,0	101,3	1,7
	F1		9,87		4,52		7,49	
	F2		48,98		68,20		56,15	

Tabela 29 - Quantidade de prednisona em (%) dissolvida dos lotes R023, P0020020910, MEST01 e MEST02 no tempo 180 dias de estudo de estabilidade. Fator de diferença (F1) e Fator de semelhança (F2) em relação ao lote R023.

Tempo (min)	R023		P0020020910		MEST01		MEST02	
	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)
5	7,5	9,3	31,5	7,2	32,1	5,7	30,8	7,9
10	55,6	10,1	79,9	5,2	66,0	8,0	71,3	5,1
15	85,2	5,9	96,5	3,2	93,9	3,6	95,8	2,8
20	98,8	8,8	101,2	3,7	97,1	2,1	100,4	3,9
25	104,8	3,0	101,7	2,6	101,7	1,9	101,1	1,8
30	104,2	3,1	100,7	2,4	101,9	0,8	100,6	1,8
	F1		15,01		11,12		12,79	
	F2		41,41		46,76		45,21	

Tabela 30 - Quantidade de prednisona em (%) dissolvida dos lotes R023, P0020020910, MEST01 e MEST02 no tempo 270 dias de estudo de estabilidade. Fator de diferença (F1) e Fator de semelhança (F2) em relação ao lote R023.

Tempo (min)	R023		P0020020910		MEST01		MEST02	
	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)
5	6,6	7,2	32,8	10,0	31,6	3,7	29,8	7,0
10	54,8	9,5	78,5	6,1	64,6	5,3	70,8	2,8
15	85,1	6,4	97,3	3,9	93,0	2,4	95,4	3,0
20	97,7	6,4	101,5	3,8	97,5	3,1	100,7	3,8
25	103,9	3,7	101,5	3,2	100,9	3,3	101,8	1,8
30	104,1	3,2	101,7	2,2	102,1	1,7	101,6	1,4
	F1		15,58		10,57		12,60	
	F2		40,64		46,88		45,33	

Tabela 31 Quantidade de prednisona em (%) dissolvida dos lotes R023, P0020020910, MEST01 e MEST02 no tempo 360 dias de estudo de estabilidade. Fator de diferença (F1) e Fator de semelhança (F2) em relação ao lote R023.

Tempo (min)	R023		P0020020910		MEST01		MEST02	
	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)
5	6,7	8,8	31,3	9,7	30,9	10,5	29,5	7,6
10	55,9	7,5	77,1	11,1	63,9	4,5	71,7	3,2
15	85,0	4,5	97,8	2,5	91,0	2,5	94,4	3,4
20	96,7	9,1	100,8	2,7	96,7	2,6	99,1	5,5
25	104,2	3,7	101,5	1,9	99,5	2,2	101,3	0,9
30	104,6	3,1	101,4	3,5	100,6	1,7	101,5	0,8
	F1		15,13		10,35		12,61	
	F2		41,94		47,90		45,67	

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 27–31, e nas Figuras 28–32, todos os lotes dos comprimidos de prednisona 20 mg submetidos ao estudo cumpriram os critérios de aceitação estabelecidos na monografia oficial (BRASIL, 2010), na qual devem apresentar uma taxa de dissolução superior a 80% ao final de 30 minutos de ensaio.

Analisando os resultados do ponto de vista regulatório brasileiro atual, que não avalia o fator F1 e desconsidera o cálculo do Fator F2 para fármacos de alta solubilidade e formulações de dissolução muito rápida, os lotes P0020020910, MEST01 e MEST02 mantiveram seus perfis de dissolução equivalentes ao do lote R023, uma vez que esses apresentaram uma taxa de dissolução superior a 85% até os primeiros 15 minutos do teste de dissolução (BRASIL, 2010b). Todavia, durante o período de estudo, os valores de F1 e F2 calculados para os lotes P0020020910, MEST01 e MEST02 (Tabela 32) evidenciaram uma redução da similaridade e um aumento da diferença entre o perfil de dissolução desses quando comparados ao lote R023.

Deve-se ressaltar, entretanto, que tal redução esteve muito mais diretamente relacionada ao perfil diferenciado do medicamento referência do que a problemas ou divergências observadas nos lotes testados.

Na literatura, alguns trabalhos comparando o perfil de dissolução entre medicamentos genéricos e seus respectivos medicamentos referência são encontrados. Operto e colaboradores. (2008) compararam em seu estudo dez marcas de comprimidos de paracetamol produzidos na Argentina. Esses pesquisadores concluíram que, apesar dos referidos comprimidos terem cumprido todos os requisitos farmacopeicos, apresentavam uma notável diferença nos perfis de dissolução. Kohlel e colaboradores (2009), ao avaliarem o perfil de dissolução de comprimidos de dipirona 500mg genérico e similares de cinco laboratórios farmacêuticos, concluíram que nenhum apresentou perfil de dissolução equivalente ao medicamento referência.

Tabela 32 - Valores de F1 e F2 calculados para os lotes P0020020910, MEST01 e MEST02 em relação ao lote R023 nos tempos inicial, t=90, t=180, t=270 e t=360 dias de estudo.

Dias de estudo	Fator	LOTES		
		P0020020910	MEST01	MEST02
Início	F1	9,02	4,84	6,65
	F2	50,31	67,51	58,32
90	F1	9,87	4,52	7,49
	F2	48,98	68,20	56,15
180	F1	15,01	11,12	12,79
	F2	41,41	46,76	45,21
270	F1	15,58	10,57	12,60
	F2	40,64	46,88	45,33
360	F1	15,13	10,35	12,61
	F2	41,94	47,90	45,67

De forma semelhante, Brum e colaboradores. (2012), ao analisarem 8 marcas de comprimidos de paracetamol de 750mg comercializados no Brasil, também concluíram que uma das marcas de genérico não apresentou o perfil de dissolução equivalente ao do medicamento referência. Esses autores alertaram que essa inequivalência pode interferir na intercambialidade do produto com o medicamento referência.

4.4 Estudos de permeação em células Caco-2

4.4.1 Estudo de citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade foi realizada para determinar se as concentrações de 31,5 µg/mL da amostra A do IFA prednisona e do etanol no meio HBSS pH 6,8 + EtOH 5% empregadas no teste de permeabilidade em células Caco-2 seriam danosas às células. Os resultados obtidos (Figura 33) demonstraram que ambas as concentrações, não provocaram agressão às células, uma vez que a viabilidade celular ao final do experimento foi mantida.

Esse resultado está de acordo com um estudo realizado por Yamashita e colaboradores (2000) que concluíram que a utilização de etanol, em concentração de até 5% v/v, não provoca alterações significativas na permeabilidade e na resistência transepitelial (TEER) podendo assim ser utilizado na solubilização do fármaco.

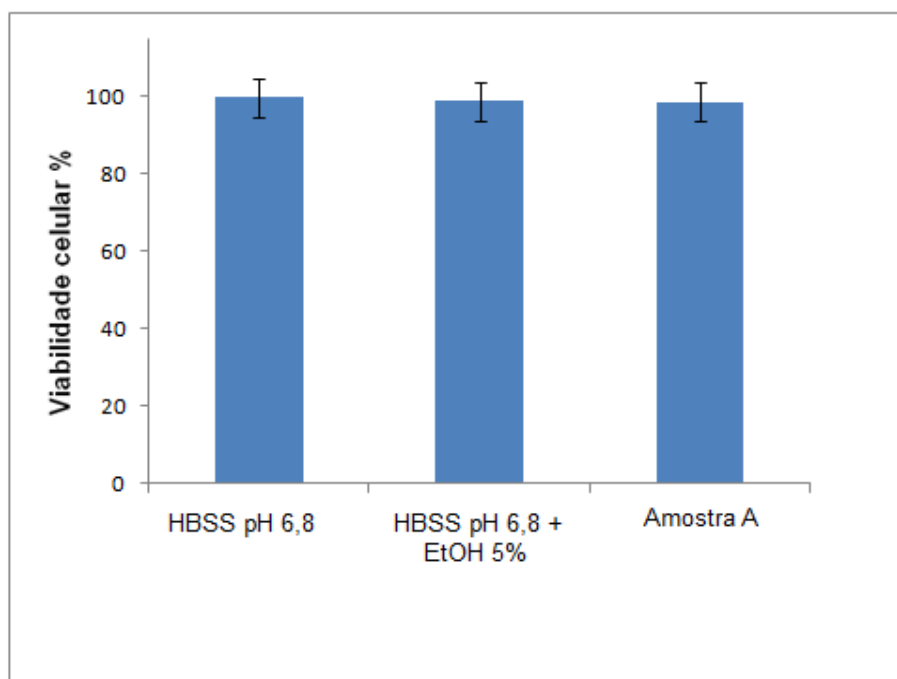


Figura 33 - Estudo de citotoxicidade para amostra A do IFA prednisona e controles HBSS pH 6,8 e HBSS pH 6,8 + EtOH 5%.

Os resultados também permitiram observar que os grupos controle HBSS pH 6.8 e HBSS pH 6,8 + EtOH 5% apresentaram o comportamento esperado, não alterando a viabilidade celular.

Após 21 dias de cultivo das células Caco-2, a média da resistência transepitelial (TEER) para as células foi de $711,2 \pm 37,05 \Omega \text{ cm}^2$. Esse resultado é compatível com os apresentados na literatura para monocamadas maduras (SANDRI *et al.*, 2010).

4.4.2 Ensaio de permeabilidade em monocamada de células Caco-2

Os dados de permeação da prednisona (percentual de massa permeada) e das médias da TEER (ohms) em função do tempo são apresentados na tabela 33.

Tabela 33 - Quantificação da prednisona no estudo de permeação em células caco-2.

Tempo (min)	Media da massa permeada (%)	Media da massa permeada acumulada (%)	Média da TEER (ohms)
30	15,35	15,36	529,6
60	14,79	30,15	505,5
120	10,98	41,13	482,5
180	24,71	65,84	429,0

De acordo com os dados obtidos é possível observar que, ao final de 180 minutos ocorreu a permeação de 65,84% da massa inicial (6,3 µg) depositada na região apical. É possível observar também que a maior fração permeada ocorreu no intervalo entre 120 e 180 minutos e que a TERR manteve-se acima de 350 ohms confirmando que as células mantiveram-se integras durante todo o experimento (ANNAERT *et al.*, 1998).

O coeficiente de permeabilidade aparente (Papp) para prednisona foi calculado a partir da média de 5 determinações do ensaio de permeabilidade e apresentou no tempo acumulado de 180 minutos um valor de $3,69 \times 10^{-5}$ cm/s. Cabe ressaltar que esse valor de Papp foi utilizado na simulação da biodisponibilidade pelo *software* GastroPlus™

De acordo com a literatura, fármacos que apresentam absorção entre 70% e 100% devem possuir Papp maior que $10,0 \times 10^{-6}$ cm/s (LAM *et al*, 2010). Bock e colaboradores (2003) em um artigo de revisão apresentaram uma correlação entre o valor Papp (cm/s) e o SCB, onde fármacos com Papp maior que $9,75 \times 10^{-6}$ cm/s apresentam uma alta permeabilidade, e com menor que $5,00 \times 10^{-6}$ cm/s uma baixa permeabilidade.

O valor de Papp determinado para prednisona no presente trabalho ($3,69 \times 10^{-5}$ cm/s) é muito próximo dos valores apresentados para fármacos de alta permeabilidade, como o propranolol ($3,4 \times 10^{-5}$ cm/s) e o metoprolol ($2,29 \times 10^{-5}$ cm/s) (BOCK *et al*, 2003). De acordo com os resultados de Papp obtidos experimentalmente, e mediante uma comparação com fármacos consagrados na pela literatura como de alta permeabilidade (propranolol, metoprolol) é possível sugerir que a prednisona seja classificada como altamente permeável.

4.5 Estudo de bioequivalência

As amostras de sangue para determinação da concentração plasmática da prednisolona foram colhidas previamente à administração e até 24 horas após, em intervalos pré-estabelecidos. A concentração plasmática da prednisolona foi determinada por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a um sistema de espectrometria de massas (NuBEC, 2011). A média da concentração plasmática da prednisolona nos voluntários que fizeram uso do biolote P0020020910 e do medicamento referência (R023) é a apresentada na Figura 34.

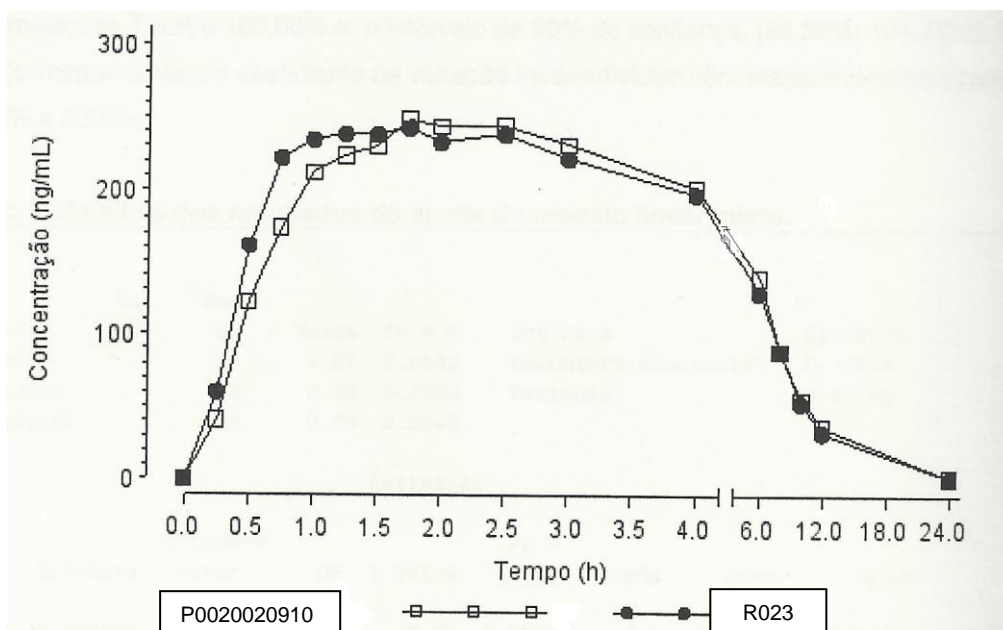


Figura 34 – Curva média da concentração plasmática da prednisolona *versus* tempo nos voluntários, após a administração de dose única dos comprimidos de prednisolona 20mg do biolote P0020020910 e R023.

Os parâmetros farmacocinéticos analisados no estudo de BE estão descritos na Tabela 34.

Tabela 34 - Parâmetros farmacocinéticos obtidos a partir da curva média de concentração plasmática *versus* tempo da prednisolona.

Parâmetros	P0020020910	R023
	Média	Média
$ASC_{0-t}(ng.h/mL)$	1.718,5	1.685,7
$ASC_{0-inf}(ng.h/mL)$	1.811,6	1.769,6
C_{Max} (mediana/amp) (h)	312,6	297,9
T_{Max} (mediana/amp) (h)	1,50	1,75
Kel (1/h)	0,24	0,24
$T_{1/2}$ (mediana/amp) (h)	2,86	2,91

Fonte: NuBEC, 2011

De acordo com a estimativa de razão entre as médias geométricas da C_{max} e da ASC 0-t para os lotes P0020020910 R023 e levando em consideração um intervalo de confiança de 90%, os resultados obtidos para esses parâmetros foram de 104,24% (99,12%; 109,62%) e 100,60% (96,59%; 104,78%), respectivamente. Considerando que os referidos resultados estão contidos no intervalo estabelecido pelo Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos (BRASIL, 2006), pode-se concluir que as formulações em estudo são bioequivalentes (NuBEC, 2011).

4.6 Simulação da biodisponibilidade *in silico*.

A simulação da biodisponibilidade ($ASC_{0-t}(ng.h/mL)$, $ASC_{0-inf}(ng.h/mL)$, $C_{Max}(ng/mL)(h)$ e $T_{Max}(h)$) pelo *software* GastroPlus™ da amostra A do IFA prednisona, foi realizada por meio da inserção de alguns parâmetros físico-químicos, fisiológicos e relativos ao estudo de BE entre os biolotes P0020020910 e R023. Esses dados foram obtidos da literatura, do estudo de BE ou de forma experimental ao longo desse trabalho (Tabela 35).

O *Guidance for Industry Extended Release Oral Dosage Forms, Development, Evaluation and Application of in Vitro/in Vivo Correlations* determina que uma boa predição deve apresentar valores para %EP menores ou iguais a 10% (UNITED STATES, 1997).

De acordo com os resultados obtidos, a %EP para todos os parâmetros farmacocinéticos simulados foram menores do que 10%, indicando que o *software* GastroPlus™ promoveu uma boa predição da biodisponibilidade com base nos estudos *in vivo*. Da mesma forma, Grbic e colaboradores (2011) demonstraram que a tecnologia de simulação utilizando o *software* GastroPlus™ foi utilizada com sucesso para prever os parâmetros farmacocinéticos de comprimidos de liberação imediata da glicazida, uma vez que os %EP obtidos foram menores que 10%.

Tabela 35 - Parâmetros empregados na simulação da biodisponibilidade da amostra A do IFA prednisona, obtidos experimentalmente (E), na literatura(L) e no estudo de bioequivalencia (BE).

Parâmetros	Valor	Fonte
Massa molar (g/mol)	358,43	L ¹
Log P	1,46	L ²
Dose (mg)	20	BE
Solubilidade em água (µg/mL)	4,53	E
Permeabilidade Caco-2 (cm/s x 10 ⁻⁵)	3,69	E
Peso corporal (kg)	66,4	BE
Volume de dose (mL)	200	BE
ASC 0-t(ng.h/mL)	1685,7	BE
ASC 0-inf(ng.h/mL)	1769,6	BE
C _{Max} (ng /mL)	297,9	BE
T _{Max} (h)	1,75	BE

Fonte: L¹ (FB, 2010), L² (VOGT *et al.*, 2007; PAIXÃO *et al.*, 2012).

A Tabela 36 apresenta a comparação entre os parâmetros farmacocinéticos obtidos no estudo de BE e os simulados pelo *software* GastroPlus™ bem como as respectivas porcentagens de erro de predição (%EP).

Tabela 36 – Parâmetros farmacocinéticos obtidos no estudo de BE e os simulados pelo *software* GastroPlus™.

Parâmetros	R023	P0020020910	Simulado	EP (%)
C _{Max} (ng /mL)	298	313	318,9	-1,97
T _{Max} (h)	1,75	1,50	1,36	9,33
ASC 0-t(ng.h/mL)	1685,7	1718,5	1730,5	-0,6
ASC 0-inf(ng.h/mL)	1769,6	1811,6	1737,1	4,11

A simulação da porcentagem de absorção da amostra A do IFA prednisona, ao longo de cada compartimento do trato gastrointestinal (Tabela 37), permite observar que a maior parte do IFA foi absorvida no duodeno e jejuno (93,7%). Esse resultado vai ao encontro dos obtidos nas determinações experimentais da solubilidade e permeabilidade, visto que, baseado nesses parâmetros, a prednisona pode ser classificada como de alta solubilidade e permeabilidade (classe I do SCB), o que permite uma rápida solubilização e, conseqüentemente, a absorção do fármaco na parte proximal do intestino.

Dessa forma, pode-se concluir que o software GastroPlus™ foi efetivo na simulação dos parâmetros farmacocinéticos avaliados, bem como na predição do perfil de absorção do fármaco ao longo do trato gastrointestinal.

Tabela 37 – Simulação da porcentagem absorvida da amostra A do IFA prednisona ao longo dos compartimentos.

Compartimentos	Amostra A (%)
Estomago	0,0
Duodeno	45,8
Jejuno 1	37,7
Jejuno 2	10,2
Íleo 1	3,1
Íleo 2	1,0
Íleo 3	0,4
Ceco	1,3
Cólon ascendente	0,4

4.7 Correlação *in vitro-in vivo*

Os parâmetros farmacocinéticos simulados e seus respectivos coeficientes de correlação (R^2) e %EP foram obtidos por meio do módulo *IV/VCPlus* do *software* GastroPlus™. O método de convolução utilizado na correlação foi estimado segundo a equação de Wagner-Nelson (modelo monocompartimental), uma vez que o *software* GastroPlus™, baseado nos dados das concentrações plasmáticas obtidas para prednisolona no estudo de BE, apontou esse modelo como o mais adequado para correlação.

Os resultados contendo os parâmetros farmacocinéticos simulados e os obtidos no estudo de BE, para os lotes R023, P0020020910, MEST01 e MEST02, são apresentados, respectivamente, nas Tabelas 38, 39, 40 e 41.

Tabela 38 - Parâmetros farmacocinéticos obtidos *in vivo* (EXP) e simulado (SIM) por meio da correlação entre os perfis de dissolução para o lote R023 obtidos nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 e a concentração plasmática da prednisolona obtida no estudo de BE.

	C_{max} (ng/mL)	C_{max} (ng/mL)	EP %	ASC_{0-t} (ng.h/mL)	ASC_{0-t} (ng.h/mL)	EP %	R^2
	EXP	SIM		EXP	SIM		
t=0	298	415	-39,26	1685	1704	-1,13	0,77
t=90	298	402	-34,90	1685	1702	-1,01	0,78
t=180	298	364	-22,15	1685	1556	7,66	0,81
t=270	298	405	-35,91	1685	1711	-1,54	0,78
t=360	298	413	-38,59	1685	1742	-3,38	0,77

Tabela 39 - Parâmetros farmacocinéticos obtidos *in vivo* (EXP) e simulado (SIM) por meio da correlação entre os perfis de dissolução para o lote P0020020910 obtidos nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 e a concentração plasmática da prednisolona obtida no estudo de BE.

	C_{max} (ng/ mL) EXP	C_{max} (ng /mL) SIM	EP %	ASC_{0-t} (ng.h/mL) EXP	ASC_{0-t} (ng.h/mL) SIM	EP %	R ²
t=0	313	384	22,68	1718	1632	-5,01	0,79
t=90	313	275	12,14	1718	1605	-6,58	0,61
t=180	313	389	24,28	1718	1620	-5,70	0,80
t=270	313	409	30,67	1718	1692	-1,51	0,77
t=360	313	368	17,57	1718	1552	-9,66	0,81

Tabela 40 - Parâmetros farmacocinéticos obtidos *in vivo* (EXP) e simulado (SIM) por meio da correlação entre os perfis de dissolução para o lote MEST01 obtidos nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 e a concentração plasmática da prednisolona obtida no estudo de BE.

	C_{max} (ng/ mL) EXP	C_{max} (ng /mL) SIM	EP %	ASC_{0-t} (ng.h/mL) EXP	ASC_{0-t} (ng.h/mL) SIM	EP %	R ²
t=0	313	434	-38,66	1718	1808	-5,24	0,75
t=90	313	423	-35,14	1718	1784	-3,84	0,76
t=180	313	422	-34,82	1718	1781	-3,67	0,76
t=270	313	438	-39,94	1718	1830	-6,52	0,75
t=360	313	478	-52,72	1718	1792	-4,31	0,72

Tabela 41 - Parâmetros farmacocinéticos obtidos *in vivo* (EXP) e simulado (SIM) por meio da correlação entre os perfis de dissolução para o lote MEST02 obtidos nos tempos t=0, t=90, t=180, t=270 e t=360 e a concentração plasmática da prednisolona obtida no estudo de BE.

	C_{max} (ng/ mL)	C_{max} (ng/ mL)	EP %	ASC_{0-t} (ng.h/mL)	ASC_{0-t} (ng.h/mL)	EP %	R^2
	EXP	SIM		EXP	SIM		
t=0	313	442	-41,21	1718	1851	-7,74	0,74
t=90	313	423	-35,14	1718	1773	-3,20	0,76
t=180	313	339	-8,31	1718	1798	-4,66	0,81
t=270	313	423	-35,14	1718	1773	-3,20	0,76
t=360	313	414	-32,27	1718	1699	1,11	0,77

Os valores de C_{max} (ng /mL) obtidos na simulação para os lotes R023, P0020020910, MEST01 e MEST02 apresentaram, em todos os tempos de estudo, um erro de predição muito superior a 10%, valor que é preconizado como limite superior pelo FDA (UNITED STATES, 1997).

Apesar dos valores simulados para ASC_{0-t} (ng.h/mL) terem indicado, *a priori*, uma boa correlação *in vitro-in vivo* (%EP inferior a 10%), o melhor coeficiente de correlação linear (R^2) obtido foi de 0,81, valor muito abaixo de 1,0 esperado para uma boa correlação.

Todavia estudos bem sucedidos de simulação utilizando GastroPlus™ são encontrados na literatura. Okumu e colaboradores (2008) em um estudo de correlação *in vitro-in vivo* realizado para o fármaco montelucaste de sódio obteve um máximo de 0,979 de correlação. Da mesma forma, Kovacevic e colaboradores (2008) em um estudo de simulação da biodisponibilidade/bioequivalência para comprimidos de liberação imediata e controlada de carbamazepina obtiveram resultados satisfatórios em relação aos %EP para os parâmetros C_{max} (2%), ASC_{0-t} (10,4 %) e ASC_{0-inf} (0,9%).

Os altos valores de %EP, bem como os baixos valores de R^2 obtidos para todas as correlações estudadas, podem ser justificados pelo fato da prednisona ter apresentado uma dissolução muito rápida (85% em até 15 minutos) e possuir alta solubilidade e permeabilidade, conforme os resultados obtidos. Segundo o SCB, uma correlação *in vitro-in vivo* deixa de ser esperada para um fármaco de classe I, com dissolução muito rápida, pois o fator limitante para a absorção passa a ser a taxa de esvaziamento gástrico e não mais a velocidade de dissolução.

De acordo com os resultados pode-se concluir que o módulo IVIVCPlus do software GastroPlus™ não foi efetivo para determinar uma boa correlação *IVIV* para a prednisona (classe I). Assim, os resultados obtidos não puderam ser utilizados para efetuar a predição da biodisponibilidade dos comprimidos durante o estudo de estabilidade.

5 CONCLUSÃO

Ao final das atividades desenvolvidas e à luz dos objetivos almejados nesse estudo, pode-se concluir que:

- Todas as técnicas utilizadas na caracterização das amostras A e B do IFA prednisona mostraram-se muito úteis, fornecendo informações que permitiram concluir que ambas as amostras tratavam-se na mesma forma cristalina e que essa não sofreu transição ao longo do estudo de estabilidade.
- Os testes de solubilidade e permeabilidade permitiram sugerir a classificação da prednisona como um fármaco de alta solubilidade e permeabilidade, de acordo com o SCB. Os resultados desses testes foram uma ferramenta fundamental para simulação da biodisponibilidade *in sílico*.
- A avaliação dos lotes de comprimidos de prednisona ao longo do estudo de estabilidade permitiu concluir que todos apresentaram uma dissolução muito rápida. Permitiu também observar que os perfis de dissolução de todos os lotes com exceção do R023, quando analisados de forma individual, apresentaram uma pequena variação; entretanto, mantiveram-se equivalentes em todos os tempos de estudo. Todavia, essa equivalência não se manteve quando se comparou os perfis de dissolução dos lotes P0020020910, MEST01 e MEST02 em relação ao lote R023, muito mais em função do desvio apresentado pelo próprio medicamento referência do que pelos medicamentos teste.
- Os resultados dos testes de dureza e desintegração realizados nos comprimidos demonstraram que estes sofreram alteração ao longo da estabilidade, principalmente em relação ao lote R023 que apresentou um aumento significativo nesses parâmetros a partir do t=180 dias de estudo. Essa alteração está relacionada diretamente com a variação no perfil de dissolução observado para o lote R023, uma vez que retardou de forma significativa a liberação do fármaco nos primeiros 5 minutos do teste de dissolução.
- A simulação da biodisponibilidade realizada para a prednisona utilizando o *software* GastroPlus™ foi bem sucedida, pois os valores dos parâmetros farmacocinéticos avaliados apresentaram um erro de predição inferior a 10% quando comparados com os dados obtidos no estudo *in vivo*.

- A CIVIV realizada pelo módulo IVIVCPlus do *software* GastroPlus™ não foi efetiva para determinar uma correlação IVIVC para a prednisona (classe I), visto que os valores de R^2 obtidos para todos os lotes estudados ficaram muito abaixo do esperado para uma boa correlação. Dessa forma, os resultados dos parâmetros farmacocinéticos simulados não puderam ser utilizados para efetuar a predição da biodisponibilidade dos comprimidos durante o estudo de estabilidade.

Por fim, é importante destacar que a abordagem seguida nesta dissertação de mestrado é inovadora no cenário brasileiro, não se encontrando relatos avaliação de perfil de dissolução durante os estudos de estabilidade, assim como a avaliação dos mesmos frente aos estudos de permeabilidade *in vitro* e predição de biodisponibilidade *in silico*.

Esta abordagem abre uma discussão em nível nacional sobre aspectos regulatórios importantes, considerando-se, por exemplo, as observações relacionadas ao medicamento referência ora analisado, o qual apresentou perfis de dissolução questionáveis durante o estudo de estabilidade. De acordo com a legislação vigente, estas observações não seriam comprovadas.

Apesar de se poder questionar o uso da prednisona como estudo de caso, uma vez tratar-se de um fármaco classe I, com baixo potencial de correlação IVIV, este medicamento foi escolhido pela disponibilidade prévia do estudo de bioequivalência. Com isso, foi possível avaliar resultados de avaliações em seres humanos, contando tanto com os resultados do medicamento teste quanto do referência, o que não é comum nas publicações disponíveis.

6 PERSPECTIVAS

Com o trabalho realizado, disponibiliza-se uma metodologia de trabalho que poderá ser aplicada a tantos outros fármacos/medicamentos, agrupando-se cada vez mais resultados no sentido de uma discussão técnico-científica em âmbito regulatório nacional, e quiçá internacional, no que se refere a estudos de estabilidade com perfil de dissolução e seu uso para previsão de biodisponibilidade ao longo do tempo.

7 REFERÊNCIAS

ABDOU, H.M. **Dissolution, bioavailability and bioequivalence**. Easton, Mark Printing, 1989. 554 p.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Lista de medicamentos de referência. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/055ef0804f5230ee8eb9ded785749fbd/Lista+A+farmacos+isolados+19.04.2013.pdf?MOD=AJPERES>, Acesso em 20 abr. 2013.

ALLEN, F. H. The Cambridge Structural Database: a quarter of million crystal structures and rising. **Acta Crystallographica Section B-Structural Science**, v. 58, n. 1, p. 380-388, 2002.

ALLEN Jr, L.V.; POPPOVICK, N.G.; ANSEL, H.C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 773 p.

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

ANNAERT, P.; GELDER, J.V.; NAESEMS, L.; DE CLERCQ, E.; MOOTER, V.; KINGET,R.; AUGUSTIJNS, P. Carrier mechanisms involved in the transepithelial transport of bis(POM)-PMEA and its metabolites across Caco-2 monolayers. **Pharmaceutical Research**. v. 15, p. 1168-1173, 1998.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. Porto Alegre, ARTMED, 2005. 677 P.

BANAKAR, U.V. **Pharmaceutical Dissolution Testing**. New York, Dekker Inc, 1992. 437p.

BERNSTEIN, J. **Polymorphism in molecular crystals**. Oxford: Oxford University Press, 2002. 410 p. (International Union of Crystallography)

BLOK, L. C. Desenvolvimento e caracterização de comprimidos de metformina 500 mg de liberação imediata: Efeito de aglutinantes. 2007. 91 p. [Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Universidade do Vale do Itajaí].

BOCK, U.; KOTTKE, T.; GINDORF, C.; HALTNER, E. Validation of the Caco-2 cell monolayer system for determining the permeability of drug substances according to

the Biopharmaceutics Classification System (BCS). Across Barriers, 2003. Disponível em http://www.acrossbarriers.eu/uploads/media/FCT02-I-0305_BCS.pdf. Acesso em: 15 nov. 2012.

BRASIL. ANVISA/MS – RE nº 482, de 19 de março de 2002. Dispõe sobre o Guia para estudos de correlação *in vitro-in vivo*. *Diário oficial [da Federativa do Brasil]*, Brasília, DF, 20 de mar. 2002.

BRASIL. ANVISA/MS – Resolução nº 1, de 29 de julho de 2005. Revoga a Resolução nº 398, de 12 de novembro de 2004, e dispõe sobre o Guia para a Realização de estudos de Estabilidade. *Diário oficial [da Republica Federativa do Brasil]*, Brasília, DF, 30 de jun. 2005.

BRASIL. ANVISA/MS – RE nº 1.170, de 19 de abril de 2006. Determina a publicação do Guia para prova de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos. *Diário oficial [da Federativa do Brasil]*, Brasília, DF, 20 de abr. 2006.

BRASIL. ANVISA/MS – RDC nº 17, de 2 de Março de 2007. Dispõe sobre o Registro de Medicamento Similar. *Diário oficial [da Republica Federativa do Brasil]*, Brasília, DF, 5 de março. 2007b.

BRASIL. ANVISA/MS – RDC nº 31, de 11 de agosto de 2010. Revoga a RE nº 310, de 1 de setembro de 2004, e dispõe sobre os requisitos para realização dos estudos de equivalência farmacêutica e de perfil de dissolução, a serem atendidos pelos centros de equivalência farmacêutica e patrocinador do estudo. *Diário oficial [da Republica Federativa do Brasil]*, Brasília, DF, 12 de ago. 2010.

BRASIL. ANVISA/MS – RDC nº 37, de 3 de Agosto de 2011. Revoga a RE nº 897, de 29 de maio de 2003, e dispõe sobre o Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. *Diário oficial [da Republica Federativa do Brasil]*, Brasília, DF, 5 de ago. 2011a.

BRASIL. ANVISA/MS – RDC nº 16, de 2 de Março de 2007. Dispõe sobre o Registro de Medicamento Genérico. *Diário oficial [da Republica Federativa do Brasil]*, Brasília, DF, 5 de ago. 2011b.

BRASIL. ANVISA/MS – IN nº 2, de 14 de março de 2013. Determina a publicação da lista de fármacos candidatos à bioisenção baseada no sistema de classificação biofarmacêutica. *Diário oficial [da Republica Federativa do Brasil]*, Brasília, DF, 4 de mar. 2013.

BRITAIN H. G. Polymorphism: Pharmaceutical Aspects: **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 2002. p. 2239-2249.

BRUM, T. F.; LAPORTA, L. V.; JUNIOR, F. R. P.; GONÇALVES, C. A.; SANTOS, M. R. Equivalência farmacêutica e estudo comparativo dos perfis de dissolução de medicamentos genéricos contendo paracetamol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. São Paulo, v. 33, n. 3, p. 373-378, 2012.

BUGAY, D. E.; Characterization of the solid-state: spectroscopic techniques. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 48, p. 43-65, 2001.

CHALMERS, J. M.; DENT, G. Vibrational Spectroscopy Methods in Pharmaceutical Solid-state Characterization. In: HILFIKER, R. **Polymorphism in the pharmaceutical industry**. Weinheim: Wiley-VCH, 2006. p. 95-138.

CHORILLI, M.; SOUZA, A.A.; CORRÊA, F.; SALGADO, H.R.N. Estudos de perfil de dissolução dos medicamentos de referência, genéricos e similares contendo cefalexina na forma farmacêutica cápsula. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada**. v.31, n.1, p. 69-73, 2010.

DA SILVA, L.; GARCIA, T.; MORI, M.; SANDRI, G.; BONFERONI, M.C.; FINOTELLI, P.V.; CINELLI, L.P.; CAMELLA, C.; CABRAL, L.M. Preparation and characterization of polysaccharide based nanoparticles with anticoagulant activity. **International Journal of Nanomedicine**. v. 7, p. 2975 – 2986, 2012.

DONNELLY, J.R.; DREWES, L.A.; JOHNSON, R.L.; MUNSLOW, W.D.; KNAPP, K.K. Purity and heat of fusion data for environmental standards as determined by differential scanning calorimetry. **Thermochimica Acta**. v.167, p.155-187, 1990.

DOOREN, A. A.; MILLER, B. W. Purity determinations of drugs with differential scanning calorimetry (DSC) -a critical review. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 20, p. 217-233, 1984.

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

EQFAR 20 – CENTRO DE EQUIVALÊNCIA. Relatório final do estudo de equivalência farmacêutica de prednisona 20 mg. Porto Alegre, Abr. 2011.

FAIÇAL, S.E.; UEHARA, H.M. Efeitos sistêmicos e síndrome de retirada em tomadores crônicos de corticosteróides. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v.44, n.1, p. 69-74, 1998.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4 ed. 2002. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/farmacopeiabrasileira/publicacoes/4_edicao/parte1/4_edicao_part1.pdf. Acesso em 10 nov. 2011.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5 ED. 2010. DISPONÍVEL EM: [HTTP://WWW.ANVISA.GOV.BR/HOTSITE/CD_FARMACOPEIA/PDF_](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf_) ACESSO EM 10 NOV. 2011.

FERGUSON, H.F.; FRURIP, D.J.; PASTOR, A.J.; PEEREY, L.M.; WHITING, L.F. A review of analytical applications of calorimetry. **Thermochimica Acta**. v. 363, p. 1-21, 2000.

FLACH, A.O.P.; DALLA, C.T. Avaliação dos critérios de isenção de estudos de bioequivalência *in vivo* para medicamentos orais em forma farmacêutica sólida de liberação imediata. **Caderno de Farmácia**. Porto alegre, v.15, n.2, p. 49-58, 1999.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. **Physicochemical Principles of Pharmacy**. 4. ed. London: Pharmaceutical Press, 2006. 513 p.

FREY, F.J.; RUEGSEGG, M.K.; FREY, B.M. The dose-dependent systemic availability of prednisone: one reason for the reduced biological effect of alternate day prednisone. [British Journal of Clinical Pharmacology](#), v.21, p. 183-189, 1986.

GIBSON, M. **Pharmaceutical Preformulation and Formulation**. 2. ed. v. 199. New York: Informa Healthcare USA, Inc., 2009, 541p.

GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10^a ed. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill, 2005. 1647 p.

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

HOCHBERG, Z.; PACAK, K.; CHROUSOS, G.P. Endocrine withdrawal syndromes. **Endocrine reviews**. v.24, n.4, p. 523-538, 2003.

HUANG, J.; GOOLCHARRAN, C.; GHOSH, K. A Quality by design approach to investigate tablet dissolution shift upon accelerated stability by multivariate methods. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.78, p. 141-150, 2011.

IACocca, R.G.; BURCHAM, C.L; HILDEN, L.R. Particle Engineering: A Strategy for Establishing Drug Substance Physical Property Specifications During Small Molecule Development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. Washington, v.99, n.1, p. 51-75, 2010.

ICH Q1A (R2) Guideline Stability Testing of New Drug Substances and Products, 2003. Disponível em:

http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002651.pdf. Acesso em: 20 Set. 2011.

ISSA, M.; FERRAZ, H.G. Intrinsic dissolution as tool for evaluating drug solubility in accordance with the biopharmaceutics classification system. **Dissolution technologies**. v. 18, n. 2, p.17-23, aug., 2011.

JABER, E. *In vitro- in vivo Correlation: From theory to Applications*. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**. v.9, n. 2, p. 31-51, 2006.

JACKSON, K.; YOUNG, D.; PANT, S.; Drug-exciptent interactions and their affect on absorption. **Pharmaceutical Science and Technology Today**. v.3, n. 10, p. 336-345, 2000.

KAISER, H.; KLEY, H.K. **Cortisontherapie: corticoide in klinik und praxis**. Google Books, 2011. Disponível em <http://books.google.com.br/books?id=KGjuJaYOqBkC&pg=PA202&dq=Kaiser+H,+Kley+HK.+2002.+Cortison+Therapie.+Corticoide&hl=pt- BR#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 10 jun. 2011.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica & clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 2003. cap. 39.

KHAN, H.; ALI, M.; AHUJA, A.; ALI, J. Stability Testing of Pharmaceutical Products - Comparison of Stability Testing Guidelines. **Current Pharmaceutical Analysis**. v.6, p. 142-150, 2010.

KOHLER, L.F.; NASCIMENTO, H.D.; SCHWENGBER, E.L.L.; BANDEIRA, Z.M.P.;PAZIN, G.Y.; MACHADO, S.R.P. Avaliação biofarmacotécnica e perfil de dissolução de comprimidos de dipirona: equivalência farmacêutica entre medicamentos de referência, genéricos e similares. **Revista Brasileira de Farmácia**. v.90, n.4, p.309-315, 2009.

KONSOULA, R.; BARILE, F.A. Correlation of in vitro cytotoxicity with paracellular permeability in Caco-2 cells. **Toxicology in vitro**. v.19, n. 5, p. 675 – 684, 2005.

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

KUHNERT-BRAMDSTÄTTER, M.; GASSER, P. Solvates and polymorphic modifications of steroid hormones. **Microchemical Journal**. v.16, n. 4, p. 590-601,

1971.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Vol. 2. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 2001.

LAM, K.W.; XU, J.; NG, K.M., Pharmaceutical salt formation guided by phase diagrams. **Ind. Chem. Res.** v. 49, p. 12503-12512, 2010.

LEMKE, T.L.; WILLIAMS, D.A. **Principles of medicinal chemistry**. 6. ed, Philadelphia: The Point, 2008. cap 33.

LU, J.; ROHANI, S. Polymorphism and Crystallization of Active Pharmaceutical Ingredients (APIs). **Current Medicinal Chemistry**. v.16, p.884-905, 2009.

MACRAE, C. F.; BRUNO, I. J.; CHISHOLM, J. A.; EDGINGTON, P. R.; MCCABE, P.; PIDCOCK, E.; RODRIGUES-MONGE, L.; TAYLOR, R.; VAN DE STREEK, J.; WOOD, P. A. New features for the visualization and investigation of crystal structures. **Journal of Applied Crystallography**. v. 41, p. 466-470, 2008.

MANADAS, R.; PINA, M.E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.38, n.4, p. 376-399, 2010.

MARQUES, M.R.C. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. **Revista Analytica**, n.1, p. 48-51, 2002.

MEDEIROS, A.C.D.; CERVANTES, N.A.B.; GOMES, A.P.B.; MACÊDO, R.O. Thermal Stability of Prednisone Drug and Tables. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v.64, p. 745-750, 2001.

MESLEY, R.J.; JOHNSON, C. A. Infrared identification of pharmaceutically important steroids with particular reference to the occurrence of polymorphism. **Microchemical Journal**. v. 16, n.4, p. 590-601, 1971.

MEYER, M.C.; STTAUGHN, A.B.; JARVI, E.J.; WOOD, G.C.; PELSOR, F.R.; SHAH, V.P. The bioinequivalence of carbamazepine tablets with a history of clinical failures. **Pharmaceutical Research**. v.9, p. 1612-1616.

MONTEIRO, L. M. Preparo e Avaliação de Sistemas Microemulsionados Biologicamente Ativos de Dapsona. 2011. 125 p. [Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Rio de Janeiro]

MURTHY, K.S; GHEBRE-SELLASSIE, I. Current Perspectives on the Dissolution Stability of Solid Oral Dosage Forms. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v 82, n.2, p.113-125, 1993.

NuBEC – NÚCLEO DE BIOEQUIVALÊNCIA E ENSAIOS CLÍNICOS. Relatório final do estudo de biodisponibilidade relativa de prednisona 20 mg. São Paulo, 2011.

OKUMU, A.; DIMASO, M.; LÖBENBERG, R. Computer simulations using GastroPlus™ to justify a biowaiver for etoricoxib solid oral drug products. **European Journal of pharmaceutical Sciences**. v.72, p. 91-98, 2009.

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

OPERTO, M. A.; CASTELLANO, P. M.; KAUFMAN, T. S.; Evaluacion y analisis de parametros de calidad de comprimidos de paracetamol. **Latino American Journal Pharmacy**. v. 27, n.4, p. 603-607, 2008.

PAIXÃO, P.; GOUVEIA, L. F.; MORAIS, J. A. G. Prediction of the human oral bioavailability by using in vitro and in silico drug related parameters in a physiologically based absorption model. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 429, p. 84– 98, 2012.

QIU, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, G.Z. **Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice**. 1. ed. London: Elsevier, 2009. 907 p.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4. ed, Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 2001. cap. 24.

ROMANHOLI, D.J.P.C.; SALGADO, L.R. Síndrome de cushing exógena e retirada de glicocorticóides. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. São Paulo, v.51, n.8, p. 1280-1292, 2007.

ROSE, J.Q.; YURCHAK, A.P.; JUSKO, W.J. Dose dependent pharmacokinetics of prednisone and prednisolone man. **Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics**. v.9, p. 389-417, 1981.

SANDRI, G.; BONFERONI, M.C.; ROSSI, S.; FERRARI, F.; GIBIN, S.; ZAMBITO, Y.; DI COLO, G.; CAMELLA, C.. Nanoparticles based on N trimethylchitosan: Evaluation of absorption properties using in vitro (Caco-2 cells) and ex vivo (excised rat jejunum) models. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. V. 65, p. 68–77, 2007.

SANDRI, G.; BONFERONI, M.C.; ROSSI, S.; FERRARI, F.; BOSELLI, C.; CAMELLA, C. Insulin-Loaded Nanoparticles Based on N-Trimethyl Chitosan: In Vitro (Caco-2 Model) and Ex Vivo (Excised Rat Jejunum, Duodenum, and Ileum) Evaluation of Penetration Enhancement Properties. **American Association of Pharmaceutical Scientists**. v.11, n. 1, p. 362 – 371, 2010.

SCHNITZLER, E.; CARVALHO-FILHO, M. A. S.; STADLER, C. C.; VOLPATO, A. M.; IONASHIRO, M. Aplicação da calorimetria exploratória diferencial (dsc) na caracterização térmica do acetato de dexametasona, excipientes e do creme de dexametasona. **Eclética Química**. v. 26, p. 1-18, 2001.

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

[SMETANOVÁ L](#), [STĚTINOVÁ V](#), [SVOBODA Z](#), [KVETINA J](#). Caco-2 cells, biopharmaceutics classification system (BCS) and biowaiver. **Hradec Kralove**. v.54, p. 3–8, 2011.

SOUZA, J.; FREITAS, Z.M.F.; STORPIRTIS, S. Modelos in vitro para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.43, n.4, p. 516-527, 2007.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. **Biofarmacotécnica**. 1. ed, Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 2009. 321 p.

TERSTAPPEN, G. C.; REGGIANI A. In silico research in drug discovery. **Pharmacological sciences**. v. 22, p. 23-26, 2001.

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO. **Relatório Analítico-Prednisona: estudo de biodisponibilidade relativa STPH 07/11**. São Paulo, 2011. 80 p.

VANDRESEN, F.; CURT, P.S.; FELIN, D.; DONADUZZI, C.M. Estudo de polimorfismo da prednisona por calorimetria exploratória diferencial. In: II Simpósio Latino-Americano de Polimorfismo e Cristalização em Fármacos e Medicamentos, 2., 2009, São Pedro. **Anais eletrônicos** São Pedro: LAPOLC, 2009. Disponível em: http://www2.fisica.ufc.br/lapolc/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=36&Itemid=55&lang=br. Acesso em: 10 nov. 2011.

VOGT, M.; DERENDORF, H.; KRÄMER, J.; JUNGINGER, H.E.; MIDHA, K.K.; SHAH, S.; DRESSMAN, J.B.; BARENDT, D.M. Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Prednisone. **Journal of pharmaceutical sciences**. Washington, v.96, n.6, p. 1480-1489, 2007.

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

WATERBEEMD, H.V.; TESTA, B. **Bioavailability: estimation of solubility, permeability, absorption and bioavailability**. 2 ed, Dusseldorf: Wiley-UCH, 2009. 629 p.

WEI, H.; LÖBENBERG, R. Biorelevant dissolution media as a predictive tool for glyburide a class II drug. **European Journal of pharmaceutical Sciences**. v.29, p. 45-52, 2006.

YAMASHITA, S.; FURUBAYASHIB, T.; KATAOKAA, M.; SAKANEA, T.; SEZAKI, H.; TOKUDA, H. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 10, p. 195-204, 2000.

YEE, S. In vitro permeability across Caco-2 cells can predict in vivo absorption in man – factor or myth. *Pharm.res*, v.6, p. 763-766, 1997.

YOKOYAMA, H.; TAKABATAKE, T.; TAKAEDA, M.; WADA T.; IKEDA, K. Up-regulated MHC-class II expression and gamma-IFN and soluble IL-2R in lupus nephritis. **Kidney international**. v.42, p. 755, 1992.

YOUJIM K.A.; AVDEEF A.; ABBOTT N.J. In vitro trans-monolayer permeability calculations: often forgotten assumptions. **Drug discovery today** v.8, p. 997–1003, 2003.

YU, L. X.; CARLIN, A. S.; AMIDON, G. L.; HUSSAIN A. S. Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. **International Journal Pharmaceutical**. v. 270, n. 1–2, p. 221–227, 2004.

ZHANG, G.G.Z.; LAW. D.; SCHMITT, E.A.; QIU, Y. Phase transformation considerations during process development and manufacture of solid oral dosage forms. **Advance Drug Delivery Reviews**. v.56, p. 371-390, 2004.