

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Valéria Sant'Anna Dantas Esteves

**BIOISENÇÃO COM BASE NO SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO
BIOFARMACÊUTICA (SCB) NO CENÁRIO REGULATÓRIO BRASILEIRO E
MUNDIAL: UMA ANÁLISE A PARTIR DO ESTUDO DE BIOISENÇÃO DA
DIPIRONA SÓDICA COMPRIMIDO SIMPLES DE 500 MG**

Rio de Janeiro

2019

Valéria Sant'Anna Dantas Esteves

BIOISENÇÃO COM BASE NO SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO
BIOFARMACÊUTICA (SCB) NO CENÁRIO REGULATÓRIO BRASILEIRO E
MUNDIAL: UMA ANÁLISE A PARTIR DO ESTUDO DA DIPIRONA SÓDICA
COMPRIMIDO SIMPLES DE 500 MG

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr^a Kátia Christina Leandro

Co-orientador: Dr^a Laís Bastos da Fonseca

Rio de Janeiro

2019

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Esteves, Valéria Sant'Anna Dantas

Bioisenção com base no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) no cenário regulatório brasileiro e mundial: uma análise a partir do estudo da Dipirona sódica comprimido simples de 500 mg. / Valéria Sant'Anna Dantas Esteves. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2019.

144 f. : fig. ; tab.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

Orientadora: Kátia Christina Leandro.

Co-orientadora: Laís Bastos da Fonseca.

1. Farmacologia. 2. Ensaio de Equivalência. 3. Solubilidade. 4. Dipirona. 5. Biofarmácia. 6. Classificação. 7. Vigilância Sanitária. I. Título.

Biowaiver based on the Biopharmaceutical Classification System (BCS) in the Brazilian and world scenario: an analysis from the biowaiver study of sodium dipyrone 500 mg tablets.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Valéria Sant'Anna Dantas Esteves

**BIOISENÇÃO COM BASE NO SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO
BIOFARMACÊUTICA (SCB) NO CENÁRIO REGULATÓRIO BRASILEIRO E
MUNDIAL: UMA ANÁLISE A PARTIR DO ESTUDO DA DIPIRONA SÓDICA
COMPRIMIDO SIMPLES DE 500 MG**

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Bernardete Ferraz Spisso (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Tailane Sant'Anna Moreira (Doutor)
Faculdade de Farmácia / Universidade Federal do Rio de Janeiro

Heliana Martins Pereira (Doutor)
Serviço de Equivalência e Farmacocinética / VPPIS / Fundação Oswaldo Cruz

ORIENTADORES

Kátia Christina Leandro (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Laís Bastos da Fonseca (Doutor)
Serviço de Equivalência e Farmacocinética / VPPIS / Fundação Oswaldo Cruz

A vocês, razões de meu viver:
Marcelo, Gabriel e Daniela.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rubem e Magdalena, que mesmo distantes, contribuíram para o que sou.

Aos meus filhos, Gabriel e Daniela, que nasceram ao longo da gestação deste trabalho, e me dão motivação diária para viver.

Ao meu esposo, Marcelo, por tudo e por nada... Por simplesmente existir!

À Laís, pela sua compreensão e olhar crítico de amiga, chefe e orientadora, que muitas vezes me fez sorrir e outras tantas me fez chorar.

À Heliana, pela paciência e incentivo, minha eterna gratidão.

Ao Douglas, que, do seu jeito, torceu por mim e me ajudou, mesmo sem saber.

Às “Quality Girls” – Tatiane, Layza e Carine –, que mesmo assoberbadas de afazeres, deixaram-me livre para fazer este trabalho.

À Katia, que mesmo sem me conhecer aceitou o desafio de me orientar.

À Valéria Gadelha, cujo tempo e trabalho foram inestimáveis para consecução desta tese.

A todos os colegas do Sefar (EQF e BQV), que participaram em alguma extensão deste trabalho.

Muito obrigada por cada um de vocês existir!!!

Sábio é aquele que conhece os
limites da própria ignorância.

Sócrates

RESUMO

No Brasil, ao longo dos últimos 40 anos, o Governo Federal tem buscado incentivar o desenvolvimento da indústria nacional, especialmente a de fármacos e medicamentos. Em 2011, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a Resolução-RDC nº 37 que introduziu a bioisenção baseada no Sistema de Classificação Biofarmacêutica, no intuito de dar agilidade ao processo de registro de medicamentos destinados aos programas assistenciais do Ministério da Saúde. A dipirona sódica é um dos 21 fármacos candidatos à bioisenção no Brasil, e ela é um pró-fármaco, sendo seu metabólito ativo (o 4-MAA) o responsável pela sua atividade biológica. Assim, o objetivo geral deste trabalho foi analisar o cenário regulatório da bioisenção com base no SCB no Brasil e no mundo, a partir do estudo de bioisenção do medicamento dipirona sódica, comprimido simples de 500 mg, avaliando possíveis entraves à sua aplicabilidade em função da realidade brasileira vigente. O método analítico empregado no estudo de solubilidade foi desenvolvido e validado para determinação de teor do insumo farmacêutico ativo dipirona, e se baseou na técnica de cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE), a partir de um método descrito no *USP Compendium*. No estudo de bioisenção com base no SCB concluiu-se que (1) no estudo de solubilidade do IFA as amostras mostraram-se instáveis no ensaio de estabilidade em cada uma das soluções tampão dentro da faixa de pH fisiológico (de 1,2 a 6,8) em temperatura de $(37,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$; (2) no estudo de perfil de dissolução comparativo nos meios de pH fisiológico, os medicamentos apresentaram cinética de dissolução muito rápida, com a perda do poder discriminativo do fator f_2 ; e (3) os medicamentos foram considerados equivalentes farmacêuticos. Analisou-se os critérios para que um medicamento seja bioisento com base no SCB estabelecidos pelos organismos internacionais mais relevantes (*EMA, FDA, Health Canada, ICH e OMS*) frente aos requisitos da Anvisa, bem como foram apontados os principais entraves à aplicabilidade desta abordagem. Este trabalho abre um espaço para reflexão, no cenário brasileiro, dos critérios da bioisenção baseada no SCB, de forma a ter uma legislação aberta aos fármacos de classe I e III, mas com responsabilidade dividida entre a indústria farmacêutica e farmoquímica, os centros de equivalência farmacêutica e bioequivalência, e a área de pesquisa em demonstrar que tais fármacos atendem aos requisitos internacionais de bioisenção. É essencial para que esta abordagem regulatória seja bem-sucedida, e consiga efetivamente produzir

resultados palpáveis, em especial na área de saúde pública e vigilância sanitária, que a Anvisa esteja aberta ao diálogo com o setor regulado, com os olhos e ouvidos voltados para as inovações e orientação da academia, e sem perder o foco na sua missão institucional: “promover a proteção da saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e consumo de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária”.

Palavras-chave: Equivalência Farmacêutica. Perfil de Dissolução Comparativo. Solubilidade. Dipirona. Sistema de Classificação Biofarmacêutica. Vigilância Sanitária.

ABSTRACT

In Brazil, over the last 40 years, the Federal Government has sought to encourage the development of the domestic industry, especially pharmaceuticals and medicines. In 2011, the National Agency for Sanitary Surveillance (ANVISA) published Resolution RDC nº 37, which introduced the Biopharmaceutical Classification System based biowaiver, in order to speed up the registration process for medicines destined for the Health Ministry's assistance programs. Sodium dipyrone is one of the 21 drugs candidates for BCS-based biowaiver in Brazil, and it is a pro-drug, and its active metabolite (4-MAA) is responsible for its biological activity. Thus, the overall objective of this study was to analyze the regulatory scenario of BCS-based biowaiver in Brazil and in the world, based on a study of the sodium dipyrone, tablet 500 mg, evaluating possible barriers to its applicability due to the current Brazilian reality. The analytical method used in the solubility study was developed and validated for the determination of content of the pharmaceutical active ingredient dipyrone, and based on the technique of high performance liquid chromatography (HPLC), using a method described in the *USP Compendium*. In the BCS-based biowaiver study it was concluded that (1) in the IFA solubility study the samples were unstable in the stability assay in each of the buffer solutions within the range of physiological pH (from 1.2 to 6.8) at a temperature of $(37.0 \pm 1.0) ^\circ\text{C}$; (2) in the study of the comparative dissolution profile in the physiological pH media, the drugs showed very fast dissolution kinetics, with the loss of discriminative power of factor f_2 ; and (3) the drugs were considered as pharmaceutical equivalents. The criteria for a drug to be BCS-based biowaiver established by the most relevant international organizations (EMA, FDA, Health Canada, ICH and WHO) against the requirements of Anvisa were analyzed, as well as the main impediments to the applicability of this approach. This work opens a space for reflection, in the Brazilian scenario, on the criteria of BCS-based biowaiver, in order to have an open legislation for class I and III drugs, but with responsibility divided between the pharmaceutical and pharmochemical industry, pharmaceutical equivalence and bioequivalence centers, and the research area in demonstrating that such drugs meet the international requirements for BCS-based biowaiver. It is essential for this regulatory approach to be successful, and to effectively produce tangible results, especially in the area of public health and health surveillance, for Anvisa to be open to dialogue with the regulated sector, with eyes and ears focused

on innovations and orientation of the academy, and without losing sight of its institutional mission: "to promote the protection of the population's health through sanitary control of the production and consumption of products and services subject to sanitary surveillance."

Key-words: Pharmaceutical equivalence. Comparative dissolution profile. Solubility. Dipyrrone. Biopharmaceutical Classification System. Health Surveillance

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fases da ação de fármacos.	20
Figura 2 - Sistema de Classificação Biofarmacêutica.	21
Figura 3 – Estrutura química da dipirona sódica.	35
Figura 4 – Metabólitos da dipirona.	37
Figura 5 - Cromatograma obtido com o método inicial de doseamento descrito no USP <i>Compendium</i> para o IFA dipirona sódica.	56
Figura 6 - Cromatograma obtido com o método desenvolvido (isocrático) de doseamento para o IFA dipirona.	57
Figura 7 – Avaliação da estabilidade do fármaco no início (0 h) e no fim (24 h) nos três pH avaliados (1,2; 4,5 e 6,8).	61
Figura 8 - Gráfico dos perfis de dissolução comparativo em pH 1,2 para dipirona sódica comprimido simples de 500 mg - medicamento teste (Dipirona) e de referência (Novalgina®).	68
Figura 9 - Gráfico dos perfis de dissolução comparativo em pH 4,5 para dipirona sódica comprimido simples de 500 mg - medicamento teste (Dipirona) e de referência (Novalgina®).	69
Figura 10 - Gráfico dos perfis de dissolução comparativo em pH 6,8 para dipirona sódica comprimido simples de 500 mg- medicamento teste (Dipirona) e de referência (Novalgina®).	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Expectativa de estabelecer uma CIVIV para formas farmacêuticas de liberação imediata com base no SCB.	22
Tabela 2 – Dados do insumo farmacêutico ativo dipirona sódica.....	41
Tabela 3 – Dados da substância química de referência (SQR) dipirona sódica.....	41
Tabela 4 – Dados dos medicamentos teste e de referência utilizados nos estudos de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução comparativo nos três meios de pH fisiológico.....	42
Tabela 5 – Equipamentos e instrumentos utilizados no desenvolvimento do método de teor.	43
Tabela 6 – Equipamentos e instrumentos utilizados na validação do método de teor do IFA dipirona.	44
Tabela 7 – Parâmetros avaliados na validação do método de teor.....	45
Tabela 8 – Equipamentos e instrumentos utilizados no ensaio de solubilidade da dipirona sódica.	46
Tabela 9 - Equipamentos e instrumentos utilizados no ensaio de perfil de dissolução comparativo.....	50
Tabela 10 - Ensaios físico-químicos realizados para os medicamentos teste e referência.	53
Tabela 11 - Resultados de desempenho do sistema para o método inicial de doseamento descrito no USP <i>Compendium</i> para o IFA dipirona sódica.....	56
Tabela 12 - Resumo dos resultados obtidos na validação do método de teor para o IFA dipirona.....	59
Tabela 13 - Resultados do ensaio de estabilidade das soluções, nos pH 1,2, 4,5 e 6,8, no estudo de solubilidade do IFA dipirona sódica.	60
Tabela 14 - Verificação do pH no estudo de solubilidade do IFA dipirona nos meios pH 1,2, 4,5 e 6,8.	64
Tabela 15 - Resultados de solubilidade para o IFA dipirona em diferentes meios de pH fisiológico (1,2, 4,5 e 6,8).	65
Tabela 16 – Resultados do perfil de dissolução comparativo em pH 1,2 para dipirona sódica comprimido simples de 500 mg- medicamento teste (Dipirona) e de referência (Novalgina®).	68

Tabela 17 - Resultados do perfil de dissolução comparativo em pH 4,5 para dipirona sódica comprimido simples de 500 mg - medicamento teste (Dipirona) e de referência (Novalgina®).	69
Tabela 18 - Resultados do perfil de dissolução comparativo em pH 6,8 para dipirona sódica comprimido simples de 500 mg - medicamento teste (Dipirona) e de referência (Novalgina®).	70
Tabela 19 - Avaliação do pH antes e depois da execução do perfil de dissolução comparativo em pH 1,2, 4,5 e 6,8 para dipirona sódica comprimido simples de 500 mg- medicamento teste (Dipirona) e de referência (Novalgina®).....	71
Tabela 20 - Resultados dos ensaios físico-químicos realizados na estudo de equivalência farmacêutica para a dipirona sódica comprimido simples de 500 mg- medicamento teste (Dipirona) e de referência (Novalgina®).....	74
Tabela 21 - Comparativo dos critérios para a bioisenção baseada no SCB de acordo com a <i>FDA</i> , a <i>EMA</i> , o <i>HEALTH CANADA</i> , a <i>OMS</i> , o <i>ICH</i> e a <i>Anvisa</i>	78

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

4-AA	4-amino-antipirina
4-FAA	4-formil-amino-antipirina
4-MAA	4-metil-amino-antipirina
AAA	acetil-amino-antipirina
ADME	absorção, distribuição, metabolismo e excreção
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BR/BE	biodisponibilidade relativa / bioequivalência
CIVIV	correlação <i>in vitro-in vivo</i>
CLAE	cromatografia a líquido de alta eficiência
DOU	Diário Oficial da União
DPR	Desvio padrão relativo
EF	Equivalência farmacêutica
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Agência Europeia de Medicamentos)
EP	<i>European Pharmacopoeia</i> (Farmacopeia Europeia)
f1	Fator de diferença
f2	Fator de semelhança
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administração de Alimentos e Medicamentos)
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
ICH	<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i> (Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos para Uso Humano)
IFA	Insumo farmacêutico ativo
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	para análise
pH	potencial de hidrogênio
pKa	logaritmo negativo da constante de ionização do ácido
PTFE	membrana de politetrafluoretileno

<i>QbD</i>	<i>Quality by Design</i>
RC	membrana de celulose regenerada
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
SCBDF	Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Disponibilidade de Fármacos
SQR	substância química de referência
SUS	Sistema Único de Saúde
TGI	Trato gastrintestinal
t_R	Tempo de retenção
<i>USP</i>	<i>United States Pharmacopoeia</i> (Farmacopéia Americana)
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Políticas públicas e regulação sanitária	18
1.2	Biofarmácia, desenvolvimento farmacêutico e o Sistema de Classificação Biofarmacêutica	19
1.3	Bioisenção	22
1.3.1	A bioisenção baseada no SCB: cenário internacional	26
1.3.2	Solubilidade	27
1.3.3	Permeabilidade.....	28
1.3.4	Dissolução <i>in vitro</i>	29
1.3.5	Equivalência farmacêutica.....	33
1.4	Dipirona sódica	34
1.5	Justificativa	38
2	OBJETIVOS	40
2.1	Objetivo geral	40
2.2	Objetivos específicos	40
3	METODOLOGIA	41
3.1	Desenvolvimento e validação do método de determinação de teor utilizado no estudo de solubilidade do IFA dipirona sódica	42
3.1.1	Desenvolvimento do método de teor	42
3.1.2	Validação do método de teor	44
3.2	Estudo de bioisenção de dipirona sódica 500 mg comprimidos – determinação da solubilidade do IFA nos meios de pH fisiológico	45
3.2.1	Avaliação da estabilidade do fármaco	46
3.2.1.1	<i>Meios de pH fisiológico</i>	46
3.2.1.2	<i>Preparo das amostras</i>	46
3.2.1.3	<i>Preparo das soluções padrão</i>	47
3.2.1.4	<i>Análise</i>	47
3.2.2	Determinação da solubilidade	47
3.2.2.1	<i>Preparo das amostras</i>	47
3.2.3	Método quantitativo - doseamento por cromatografia a líquido de alta eficiência	48
3.2.4	Análise.....	49

3.2.5	Especificação	49
3.3	Estudo de bioisenção de dipirona sódica 500 mg comprimidos – perfil de dissolução comparativo nos meios de pH fisiológico.....	49
3.3.1	Meios de dissolução	50
3.3.2	Parâmetros de dissolução e de quantificação	51
3.3.3	Análise.....	51
3.3.3.1	<i>Curva padrão dipirona</i>	51
3.3.3.2	<i>Solução amostra</i>	52
3.3.4	Cálculo.....	52
3.4	Estudo de bioisenção de dipirona sódica 500 mg comprimidos – equivalência farmacêutica.....	52
3.5	Avaliação da bioisenção com base no Sistema de Classificação Biofarmacêutica	53
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1	Desenvolvimento e validação do método de teor.....	55
4.2	Estudo de bioisenção de dipirona sódica 500 mg comprimidos - determinação da solubilidade do IFA nos meios de pH fisiológico	60
4.2.1	Avaliação da estabilidade do fármaco	60
4.2.2	Determinação da solubilidade	63
4.2.3	Avaliação do estudo de solubilidade.....	65
4.3	Estudo de bioisenção de dipirona sódica 500 mg comprimidos - perfil de dissolução comparativo nos meios de pH fisiológico.....	67
4.4	Estudo de bioisenção de dipirona sódica 500 mg comprimidos – equivalência farmacêutica.....	72
4.5	Avaliação da bioisenção com base no sistema de classificação biofarmacêutica.....	75
4.5.1	Comparação dos requisitos gerais da bioisenção com base no SCB	83
4.5.1.1	<i>Classe do SCB aceita</i>	83
4.5.1.2	<i>Comparabilidade entre formulação teste e de referência</i>	84
4.5.1.3	<i>Solubilidade</i>	85
4.5.1.4	<i>Permeabilidade intestinal</i>	86
4.5.1.5	<i>Perfil de dissolução in vitro</i>	88
4.5.2	Bioisenção com base no SCB da dipirona sódica	89

4.5.3	Considerações gerais sobre a isenção de estudos de bioequivalência <i>in vivo</i> .	91
	
5	CONCLUSÃO	94
	REFERÊNCIAS	96
	ANEXO A - MONOGRAFIA ORIGINAL (EM INGLÊS) DO <i>USP COMPENDIUM</i>	
	PARA OS COMPRIMIDOS DE DAPIRONA SÓDICA E SEU RESPECTIVO	
	RELATÓRIO DE VALIDAÇÃO	112

1 INTRODUÇÃO

1.1 Políticas públicas e regulação sanitária

No Brasil, ao longo dos últimos 40 anos o Governo Federal tem buscado incentivar o desenvolvimento da indústria nacional, especialmente a de fármacos e medicamentos, através de políticas de incentivo, que buscam, dentre outras metas, a mudança do patamar competitivo a partir da melhoria da capacidade inovadora das empresas.

A Portaria MS/GM nº 3.916/1998, que aprova a Política Nacional de Medicamentos (BRASIL, 1998), determina que os gestores do SUS devem assegurar o acesso da população a medicamentos seguros, eficazes e de qualidade, ao menor custo possível, e que para tanto suas ações devem ser balizadas por algumas diretrizes, como: (i) regulamentação sanitária de medicamentos, (ii) desenvolvimento científico e tecnológico, com foco na área de tecnologia farmacêutica, (iii) promoção da produção de medicamentos, em especial pelos laboratórios farmacêuticos oficiais, e (iv) garantia da segurança, eficácia e qualidade dos medicamentos, respaldadas pelas ações desenvolvidas pelos laboratórios oficiais de controle de qualidade.

Em paralelo, houve flexibilização da submissão de informações relacionadas ao controle de qualidade de insumos e medicamentos, a estudos de equivalência farmacêutica (EF) e biodisponibilidade relativa/bioequivalência (BR/BE), e às boas práticas de fabricação e controle (BPF), o que exige a utilização de métodos, procedimentos e ferramentas mais consistentes, robustos e confiáveis para respaldar técnica e cientificamente os dados apresentados nos dossiês de registro e pós-registro de medicamentos.

Neste cenário, em cumprimento ao seu papel de agência reguladora, em 2002, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) publicou o primeiro “Guia para isenção e substituição de estudos de bioequivalência” (Resolução-RE nº 481/2002) (BRASIL, 2002), introduzindo o conceito de bioisenção em função da forma farmacêutica. No ano seguinte, a revogou com a publicação da Resolução-RE nº 897/2003 (BRASIL, 2003a), prevendo também a bioisenção para diferentes dosagens de um mesmo medicamento (ARAÚJO, 2010).

Por fim, em 2011, com a publicação da Resolução-RDC nº 37 (BRASIL, 2011), houve a introdução da bioisenção baseada no Sistema de Classificação

Biofarmacêutica (SCB) oficialmente no arcabouço jurídico sanitário brasileiro, no intuito de dar agilidade ao processo de registro de medicamentos destinados aos programas assistenciais do Ministério da Saúde, mas sem declinar da exigência de comprovação de eficácia, segurança e qualidade dos produtos.

1.2 Biofarmácia, desenvolvimento farmacêutico e o Sistema de Classificação Biofarmacêutica

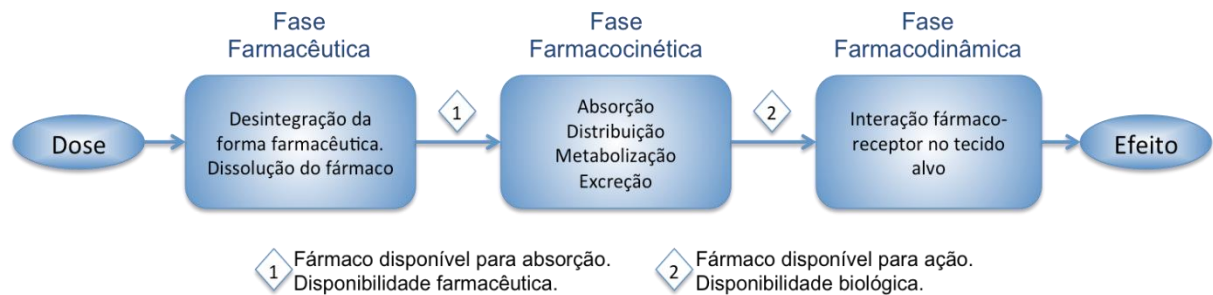
Geralmente os fármacos não são administrados como substâncias puras isoladas, mas formulados como medicamentos, cuja forma farmacêutica pode variar desde soluções simples a sistemas de liberação complexos.

O desenvolvimento farmacotécnico busca obter uma formulação compatível com a produção em larga escala, de qualidade reprodutível, e que otimize a disponibilidade do insumo farmacêutico ativo (IFA) no sítio de ação a partir de uma dada via de administração, e com isso permita alcançar uma dada resposta terapêutica (LENNERNAS; ABRAHAMSSON, 2005; TAO, 2005).

A biofarmácia consiste no estudo do modo como as propriedades físico-químicas do IFA, a forma farmacêutica e a via de administração afetam a velocidade e o grau de absorção dos fármacos (TAYLOR, 2007). Neste sentido, a formulação de um medicamento é fundamental para o perfil biofarmacêutico, uma vez que a composição, a forma farmacêutica, o processo de fabricação e a via de administração estão intimamente ligadas aos resultados farmacocinéticos (CHILUKURI, 2007; STORPIRTIS, 2008).

A via de administração oral é a preferencial na área de tecnologia farmacêutica, mas está sujeita a limitações para a absorção, e, conseqüentemente para a biodisponibilidade dos fármacos. Após a administração, um medicamento passa por três fases até sua ação final: a farmacêutica, a farmacocinética e a farmacodinâmica (Figura 1) (PEREIRA, 2007).

Figura 1 – Fases da ação de fármacos.



Fonte: (Da autora, 2013).

Na primeira fase ocorre a desintegração da forma farmacêutica, seguida da dissolução da substância ativa. A fase farmacocinética abrange os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME). E a fase farmacodinâmica está relacionada com a interação do fármaco com seu alvo (receptor, enzimas, etc.) e a consequente produção do efeito terapêutico (AULTON, 2018; PEREIRA, 2007).

As velocidades dos processos ADME determinam o curso do fármaco no organismo ao longo do tempo. A extensão e a velocidade de absorção dependem da extensão e velocidade com que o fármaco é liberado da forma farmacêutica (dissolução), de sua solubilidade nas condições do trato gastrointestinal (TGI) e da permeabilidade através das membranas celulares (AULTON, 2018; CARDOSO, 2008).

A avaliação da bioequivalência *in vivo* para formulações sólidas orais é um método aceito universalmente para avaliar a equivalência terapêutica (mesma eficácia clínica, segurança e potencial para gerar efeitos adversos) de dois produtos que são equivalentes farmacêuticos, com a vantagem de eliminar a necessidade de realização de estudos clínicos adicionais (DAHAN, 2012).

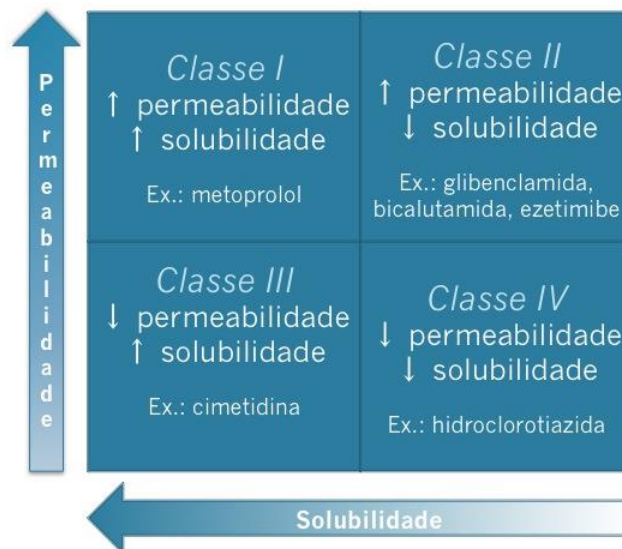
Nas últimas três décadas, estudos sobre o impacto da formulação e do processo de fabricação do medicamento sobre a absorção do fármaco, com base em suas propriedades biofarmacêuticas (BENET, 2011; BUTLER, 2010; LENNERNÄS, 2005; UNGELL, 1998) levaram as autoridades regulatórias a reconhecerem a “bioisenção”, ou seja, a aceitarem estudos *in vitro* em substituição à realização de estudos de bioequivalência *in vivo* (AULTON, 2018; LENNERNÄS, 2014).

Um dos tipos de bioisenção aceito pelas agências regulatórias ao redor do mundo é o baseado no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), cujo conceito foi introduzido em 1995 pelo Prof. Gordon Amidon (AMIDON, 1995), no qual os

fármacos podem ser divididos em quatro classes conforme dois fatores chave: sua permeabilidade intestinal e solubilidade em água (Figura 2).

O SCB leva em consideração três fatores preponderantes que governam a taxa e a extensão do fármaco a partir da forma farmacêutica de liberação imediata: dissolução, solubilidade e permeabilidade intestinal (THE UNITED STATES OF AMERICA, 2017).

Figura 2 - Sistema de Classificação Biofarmacêutica.



Fonte: (Da autora, 2013).

Em 2005 foi publicada uma proposta de versão modificada do SCB, conhecida como Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Disponibilidade de Fármacos (SCBDF), que apresenta a rota de eliminação (metabolismo, ou eliminação via renal ou biliar) como um parâmetro substituto à permeabilidade, o que permitiria a expansão do número de fármacos elegíveis para a bioisenção (BENET, 2013; WU, 2005).

Com base no SCB, ao se determinar se o fator limitante da absorção é a solubilidade ou a permeabilidade do fármaco, é factível relacionar sua classificação biofarmacêutica com a possibilidade de estabelecer uma correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV) (Tabela 1) (AMIDON, 1995).

A CIVIV é um modelo matemático preditivo que descreve a relação entre uma característica *in vitro* da forma farmacêutica e a variável resposta *in vivo*. A característica *in vitro* mais utilizada é a fração dissolvida em um determinado tempo, e a variável resposta *in vivo* é a fração absorvida no mesmo intervalo de tempo (THE UNITED STATES OF AMERICA, 1997).

Tabela 1 – Expectativa de estabelecer uma CIVIV para formas farmacêuticas de liberação imediata com base no SCB.

Classe (SCB)	Solubilidade	Permeabilidade	Expectativa de estabelece CIVIV
I	Alta	Alta	É possível estabelecer CIVIV se a dissolução é mais lenta que a velocidade de esvaziamento gástrico.
II	Baixa	Alta	É possível estabelecer CIVIV se a dissolução <i>in vitro</i> é semelhante à <i>in vivo</i> .
III	Alta	Baixa	Permeabilidade é determinante e limitada, ou não pode ser estabelecida CIVIV com a dissolução.
IV	Baixa	Baixa	CIVIV limitada ou inexistente.

Fonte: (Adaptado de AMIDON, 1995).

Neste contexto, é cada vez mais significativo o interesse da indústria, da academia e das agências regulatórias na aplicação da biofarmácia no desenvolvimento de medicamentos de uso oral, a fim de reduzir a carga regulatória com base em novas abordagens de avaliação da biodisponibilidade de fármacos, tais como: (i) novos métodos para determinação da bioequivalência, (ii) estabelecimento de correlações *in vitro-in vivo*, e (iii) implementação de sistemas, métodos e ferramentas que assegurem a qualidade através do desenho (*Quality by Design – QbD*) (DICKINSON, 2008; POLLI, 2012).

1.3 Bioisenção

Durante o desenvolvimento de um novo medicamento, os organismos regulatórios buscam evitar a exposição desnecessária de seres humanos aos fármacos e excipientes, sempre que possível. Neste sentido, os guias regulatórios de várias jurisdições mencionam a possibilidade de utilização de vários mecanismos para isentar da exigência de estudos *in vivo* (CARDOT, 2018).

Um destes estudos, a bioequivalência, consiste na demonstração de equivalência terapêutica entre dois medicamentos apresentados sob a mesma forma farmacêutica, contendo idêntica composição qualitativa e quantitativa de princípio(s)

ativo(s), e que tenham comparável biodisponibilidade, quando estudados sob um mesmo desenho experimental (ANVISA, 2018).

Por outro lado, segundo Birkett temos que:

Dois medicamentos contendo o mesmo insumo farmacêutico ativo são considerados bioequivalentes se são equivalente farmacêuticos, ou alternativas farmacêuticas, e suas biodisponibilidades (taxa e extensão) após administração na mesma dose molar encontram-se dentro de limites aceitáveis pré-definidos. (BIRKETT, 2003; EMA, 2010).

Existem classicamente três tipos clássicos de bioisenção, ou seja, de isentar e substituir estudo de biodisponibilidade relativa/bioequivalência *in vivo*, aceitos no Brasil (BRASIL, 2011):

a) Bioisenção em razão da forma farmacêutica.

Decorre de certas características das formas farmacêuticas, fazendo com que a bioequivalência não seja requerida. Geralmente a BD/BE não pode ser determinada pelo fármaco(s) já se encontrar(em) totalmente biodisponível(is) na circulação sanguínea (por exemplo, as soluções parenterais) ou por não possuírem absorção para ação sistêmica (por exemplo, medicamentos de aplicação tópica). O principal pré-requisito é que os excipientes não devem influenciar a biodisponibilidade do fármaco (JIMI, 2015).

b) Bioisenção para as demais dosagens.

Neste caso, faz-se a bioequivalência de uma dosagem, que pode ser a “de maior ou menor dosagem, dependendo da linearidade farmacocinética ou do risco à segurança do voluntário participante do estudo” (BRASIL, 2011), e bioisenta-se as demais (JIMI, 2015).

Aplica-se a:

- Medicamentos de liberação imediata, de mesma forma farmacêutica, formulações proporcionais e produzidos pelo mesmo fabricante; e
- Medicamentos de liberação retardada ou prolongada, de mesma forma farmacêutica, mesmo mecanismo de liberação, formulações proporcionais e produzidos pelo mesmo fabricante no mesmo local de fabricação (BRASIL, 2011).

Entretanto a definição de o que são formulações proporcionais não está pacificada. No Brasil são aceitas como proporcionais se “todos os componentes da

formulação estiverem exatamente na mesma proporção em todas as diferentes dosagens” (BRASIL, 2011) ou “a razão entre os excipientes e o peso total da formulação estiver dentro dos limites para alteração moderada de excipientes” (BRASIL, 2011) estabelecidos legislação.

Mas, tem-se ainda que as exceções aos critérios de proporcionalidade devem ser tecnicamente justificadas, e serão avaliadas, quanto à pertinência, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2011).

c) Bioisenção baseada no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB).

Pela legislação brasileira, um medicamento para ser isentado de estudo de bioequivalência / biodisponibilidade relativa *in vivo* deve se tratar de um medicamento oral de liberação imediata, que contenha pelo menos um dos 21 fármacos presentes na Instrução Normativa nº 10/2016 (BRASIL, 2016), formulado com excipientes que não apresentem impacto sobre a biodisponibilidade e que apresente rápida dissolução *in vitro*.

Atendidos estes critérios, deve ser aprovado integralmente em teste físicos, químicos e físico-químicos: a equivalência farmacêutica (medicamento teste *versus* referência), o perfil de dissolução comparativo do medicamento (medicamento teste *versus* referência) em três meios de pH fisiológico (pH 1,2; 4,5 e 6,8), e a solubilidade do fármaco pelo menos em três meios de pH fisiológico (pH 1,2; 4,5 e 6,8) (BRASIL, 2016).

Assim, apesar da bioisenção baseada no SCB se mostrar extremamente útil, no Brasil, a ANVISA manteve uma postura conservadora, até o momento, e como mencionado anteriormente, para um fármaco ser candidato à bioisenção com base no SCB ele deve obrigatoriamente pertencer à classe I e fazer parte da lista dos 21 fármacos candidatos publicada na Instrução Normativa nº 10/2016 (BRASIL, 2016), a qual estabelece que estes apresentem:

... fração de dose absorvida $\geq 85\%$ da dose administrada (demonstrada com base em dados provenientes de estudos em seres humanos), ampla faixa terapêutica e ausência de evidências documentadas de bioinequivalência ou problemas de biodisponibilidade não detectáveis nos estudos de perfis de dissolução previstos pelo SCB. (BRASIL, 2016).

Entretanto, em 27/09/2018 a Anvisa publicou no Diário Oficial da União (DOU) o Edital de Chamamento nº 6/2018 (BRASIL, 2018) no intuito de “recolher contribuições ao documento M9 *Biopharmaceutics Classification System-Based*

Biowaivers, do *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH)*". Tal ação vem de encontro à Consulta Regional do guia com os critérios para bioisenção pelo SCB no intuito de reduzir o número de estudos de bioequivalência *in vivo*.

A atual legislação brasileira sobre a bioisenção com base no SCB (Resolução-RDC nº 37/2011 (BRASIL, 2011) difere em muito deste documento do *ICH* colocado em consulta pública, e dos principais agentes regulatórios internacionais: *European Medicines Agency (EMA)*, *U. S. Food and Drug Administration (FDA)*, *Health Canada* e Organização Mundial da Saúde (OMS).

Cabe ressaltar a composição e a missão dos organismos regulatórios internacionais, pois estas corroboram a sua relevância na discussão do tema, e sua abrangência mundial.

A *EMA* é uma agência descentralizada da União Europeia (composta de 28 países membros, entre eles o Reino Unido) responsável pela avaliação científica, supervisão e monitoramento da segurança de medicamentos na Europa (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2018).

A *FDA* é uma agência do Departamento de Saúde e Serviços Humanos do Estados Unidos. É responsável por proteger a saúde pública, garantindo a segurança, eficácia e segurança de medicamentos humanos e veterinários, produtos biológicos e dispositivos médicos; e garantindo a segurança do suprimento nacional de alimentos, cosméticos e produtos que emitem radiação (U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2018).

O *ICH* reúne autoridades mundiais de regulação de medicamentos e da indústria farmacêutica, tendo como membros e observadores países como: Suíça, Estados Unidos, Japão, Canadá, Europa, Coreia, Singapura, China, Argentina, Índia, Cuba, Mexico, Israel, Rússia, África do Sul, Austrália (ICH, 2018).

A *Health Canada* é o departamento federal do Canadá responsável por ajudar os canadenses a manter e melhorar sua saúde, respeitando as escolhas e circunstâncias individuais (HEALTH CANADA, 2018).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) (*WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO*) é uma agência especializada em saúde, subordinada à Organização das Nações Unidas. Segundo sua constituição, tem por objetivo desenvolver ao máximo possível o nível de saúde de todos os povos. A saúde sendo definida nesse mesmo

documento como um “estado de completo bem-estar físico, mental e social e não consistindo somente da ausência de uma doença ou enfermidade” (OMS, 2018).

1.3.1 A bioisenção baseada no SCB: cenário internacional

A utilização do SCB para bioisentar um determinado medicamento se baseia em algumas premissas, a saber:

- Dois medicamentos de liberação imediata se comportam como soluções orais no TGI devido à sua alta solubilidade e rápida dissolução;
- Não ocorre precipitação no TGI uma vez que o IFA está dissolvido;
- As duas formulações de liberação imediata têm o mesmo perfil de dissolução *in vivo* sob todas as condições encontradas na luz do intestino, ou seja, apresentam a mesma taxa e extensão de absorção, e, portanto, são bioequivalentes.

Quando a dissolução *in vivo* é rápida ou muito rápida em relação ao esvaziamento gástrico, e o fármaco é altamente solúvel, a taxa e a extensão de absorção não são, provavelmente, dependentes da dissolução e/ou do tempo de trânsito gastrointestinal (THE UNITED STATES OF AMERICA, 2017).

Os fármacos de classe I (alta permeabilidade e solubilidade) são candidatos naturais à bioisenção, para tanto sendo suficiente provar que são altamente solúveis e permeáveis, e se dissolvem rapidamente, a partir de comprovação farmacêutica adequada (DAKSHINA, 2007).

Inicialmente foram avaliados apenas os fármacos de classe I para serem bioisentos, por possuírem alta solubilidade e permeabilidade, e praticamente não apresentarem casos de bioinequivalência. Este tipo de bioisenção apresenta peculiaridades de aceitabilidade em função da autoridade regulatória do país ou do bloco econômico que o utilize.

Neste sentido, a OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017), a FDA (THE UNITED STATES OF AMERICA, 2017), a EMA (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2010), a *Health Canada* (HEALTH CANADA, 2014), e o ICH (ICH, 2018), entre tantas outras autoridades regulatórias, aceitam fármacos candidatos à bioisenção que pertençam também à classe III, ou seja, altamente solúveis e pouco permeáveis, mas que apresentem dissolução *in vitro* rápida ou muito rápida.

Ou seja, os medicamentos pertencentes à classe III devem satisfazer alguns critérios (CARDOT, 2016; DAVIT, 2016):

- todos os excipientes no medicamento teste devem ser qualitativamente os mesmos e quantitativamente semelhantes aos dos medicamento de referência,
- devem apresentar dissolução *in vitro* muito rápida (≥ 85 % dissolvido em até 15 minutos) sob condições definidas;
- deve ser avaliada a relação risco-benefício com relação à extensão, sítio e mecanismo de absorção.

São apresentados a seguir os principais pontos a serem considerados nos três quesitos fundamentais no cenário da bioequivalência com base no SCB: a solubilidade, a permeabilidade e a dissolução *in vitro*.

1.3.2 Solubilidade

Segundo o SCB, um fármaco é considerado altamente solúvel quando sua maior dose disponível, em uma formulação de liberação imediata, na faixa de pH do trato gastrointestinal ($1,2 \leq \text{pH} \leq 6,8$), é solúvel em 250 mL ou menos de meio aquoso a $(37,0 \pm 1,0)$ °C (BOU-CHACRA, 2017; THE UNITED STATES OF AMERICA, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017), o que mimetiza a solubilização imediata quando administrado oralmente.

O volume estimado de 250 mL é derivado de protocolos típicos de estudos de bioequivalência, os quais prescrevem a administração de um medicamento a um voluntário humano em jejum com 200 mL de água (BRASIL, 2006; THE UNITED STATES OF AMERICA, 2017).

É esperado que seja estabelecida experimentalmente a solubilidade em equilíbrio do fármaco (BRASIL, 2006, 2011; THE UNITED STATES OF AMERICA, 2017):

- utilizando método *shake-flask* ou diagrama de fases;
- testando-se, no mínimo, três condições de pH fisiológico (1,2; 4,5 e 6,8);
- utilizando-se, no mínimo, três replicatas para cada condição, com coeficiente de variação (CV%) menor que 5 %;
- quantificando-se o fármaco através de um método de teor validado, indicativo de sua estabilidade, e seletivo.

Se o pKa do fármaco estiver dentro da faixa de pH fisiológico, a solubilidade neste pH também deverá ser avaliada (THE UNITED STATES OF AMERICA, 2017).

O pH para cada meio de teste deve ser medido antes da adição do fármaco e ao final do experimento, de forma a garantir que a solubilidade está sendo avaliada num determinado pH (BRASIL, 2006; THE UNITED STATES OF AMERICA, 2017).

A classificação do fármaco é feita pela menor solubilidade encontrada da faixa de pH fisiológico (1,2 a 6,8).

O método recomendado para a determinação da solubilidade dos insumos farmacêuticos ativos – e para o desenvolvimento do método de dissolução –, é o *shake-flask*, que é o método de solubilidade tradicionalmente utilizado (MARQUES, 2013). Neste método, um excesso de IFA é adicionado ao meio escolhido para a obtenção de uma solução saturada a qual deve ser mantida sob agitação, geralmente de 24 a 48 horas, em velocidade e temperatura controladas, até que a solubilidade de equilíbrio seja atingida.

1.3.3 Permeabilidade

De acordo com a Anvisa, “um fármaco de alta permeabilidade é, geralmente, aquele cuja biodisponibilidade absoluta é maior que 90 % na ausência de instabilidade no trato gastrointestinal, ou quando este parâmetro é determinado experimentalmente” (ANVISA, 2018b).

A avaliação da permeabilidade deve se basear, preferencialmente, na extensão da absorção derivada de estudos de farmacocinética em humanos preferencialmente, ou seja, biodisponibilidade absoluta ou balanço de massas.

A classe de permeabilidade de um dado IFA pode ser determinada também a partir de estudos de perfusão intestinal *in vivo* em humanos, e outros métodos não envolvendo seres humanos, que incluem perfusão intestinal *in vivo* ou *in situ* em um modelo animal apropriado (por exemplo, ratos), e permeabilidade *in vitro* usando tecido intestinal excisado, ou monocamadas de células epiteliais (HEALTH CANADA, 2014; EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2010; ICH, 2018; THE UNITED STATES OF AMERICA, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Um método é suficiente quando a biodisponibilidade absoluta é ≥ 85 %, ou quando 85 % ou mais do fármaco administrado é excretado inalterado na urina, ou quando 85 % ou mais do fármaco administrado é recuperado na urina como soma do fármaco-pai e metabólitos de fase 1 oxidativa e fase 2 conjugativa, com evidência de estabilidade no TGI (ICH, 2018).

Com relação aos metabólitos nas fezes, somente os de oxidação e conjugação podem ser considerados. Aqueles produzidos através de redução ou hidrólise não devem ser incluídos, exceto que se possa demonstrar que eles não são produzidos por ação microbiana dentro do TGI. O fármaco inalterado nas fezes não pode ser levando em consideração em face da extensão da absorção (EMA, 2010; ICH, 2018).

Dados humanos *in vivo* extraídos da literatura (por exemplo, estudos de biodisponibilidade publicados previamente) são aceitos, mas deve-se levar em conta que artigos de revisão por pares não apresentam, necessariamente, detalhes acerca do estudo que possibilitem julgar a qualidade dos resultados (ICH, 2018).

A permeabilidade pode ser avaliada através de um método *in vitro* padronizado e validado usando células Caco-2, com discussão inserida no contexto dos dados disponíveis sobre a farmacocinética em humanos.

Modelos animais *in vivo* ou *in situ* e métodos *in vitro* (cultura de monocamadas de células epiteliais animais ou humanas) são apropriadas para fármacos transportados passivamente. A baixa permeabilidade em humanos observada para alguns fármacos pode ser oriunda do efluxo via transportadores de efluxo de membrana. Assim, o uso de métodos de permeabilidade animal ou *in vitro* só é recomendada para fármacos transportados por meio de mecanismos passivos (THE UNITED STATES OF AMERICA, 2017).

Se a alta permeabilidade é inferida por meio de um sistema celular *in vitro*, a permeabilidade independente de transporte ativo deve ser provada.

Caso a alta permeabilidade não seja demonstrada, o fármaco é considerado como tendo baixa permeabilidade, e pertencendo à classe III do SCB.

1.3.4 Dissolução *in vitro*

Dissolução é o processo de liberação do insumo farmacêutico ativo de sua forma farmacêutica, tornando-o disponível para absorção pelo organismo. O ensaio de dissolução nada mais é que um teste físico-químico no qual o fármaco passa para a forma solúvel a partir da forma farmacêutica intacta, ou de seus fragmentos e partículas formadas durante o teste, no caso de cápsulas e comprimidos. É importante para demonstrar *in vitro* o desempenho de produtos que necessitam de dissolução para absorção e, conseqüente, efeito terapêutico (CHORILLI, *et al.* 2010).

O teste de dissolução possibilita determinar a quantidade de substância ativa dissolvida no meio de dissolução quando o produto é submetido à ação de aparelhagem específica, sob condições experimentais descritas. O resultado é expresso em porcentagem da quantidade declarada no rótulo do medicamento. O teste se destina a demonstrar se o produto atende às exigências constantes na monografia do medicamento em comprimidos, cápsulas e outros casos em que o teste seja requerido (BRASIL, 2019).

O ensaio de dissolução é constituído basicamente de duas etapas (ABDOU, 1989; BANAKAR, 1992):

- uma de dissolução propriamente dita, em que o fármaco é dissolvido no meio de dissolução; e

- uma quantitativa, em que se quantifica o teor de IFA dissolvido no meio.

O método analítico de dissolução deve, obrigatoriamente, ser seletivo e discriminativo, ou seja, capaz de detectar alterações de atributos farmacêuticos que possam afetar o desempenho do medicamento *in vivo* (MARQUES, 2013).

Entre os diferentes métodos de análise empregados para a dissolução, a espectrometria UV-Vis é considerado uma técnica mais “verde” que a CLAE, por ser mais rápida, usar menor volume de reagentes e produzir menor volume de rejeitos, além de ser simples e de baixo custo. Como resultado, via de regra é o método de escolha para ser empregado na etapa quantitativa da dissolução (KORANY, 2018).

Para a dipirona, tanto insumo farmacêutica ativo quanto comprimidos, o método farmacopeico de teor é por titulação aquosa (BRASIL, 2019), um método inespecífico, não seletivo e não discriminativo. Já a determinação de teor do teste de dissolução existente na Farmacopéia Brasileira (FB) 6ª ed. Para dipirona sódica comprimidos é por espectrofotometria. É mister que tanto para o doseamento quanto para identificar possíveis adulterações/falsificações de formulações comercialmente disponíveis são necessários métodos confiáveis, que são preferencialmente seletivos, rápidos e possam ser executados em equipamentos simples (ANAND, 2011; ANVISA, 2018).

As especificações de dissolução *in vitro* são estabelecidas para garantir consistência de qualidade lote a lote e para indicar problemas potenciais de biodisponibilidade. Esta especificação é pontual e utilizada também no estudo de equivalência farmacêutica.

Para medicamentos de liberação imediata é descrita a especificação de um único ponto, que corresponde a um teste de controle de qualidade de rotina (para medicamento contendo fármacos altamente solúveis) (MARCOLONGO, 2003).

Por exemplo, para o teste de dissolução da dipirona comprimidos, segundo a FB 6ª ed., é coletada uma alíquota da amostra, filtrada imediatamente e diluída em ácido clorídrico 0,1 mol/L, no ponto de 40 minutos (BRASIL, 2019).

Já o estudo de perfil de dissolução consiste de um ensaio analítico com coletas em múltiplos pontos para a avaliação da dissolução de uma determinada substância ativa (BRASIL, 2010b).

O comparativo entre perfis de dissolução é feito para avaliar o comportamento de dois medicamentos, antes de submetê-los a ensaios de biodisponibilidade/bioequivalência, para isentar dosagens menores de tais estudos, e para a realização de alterações depois que o medicamento se encontra registrado na Anvisa. Os estudos de dissolução fornecem uma base científica para a intercambialidade entre o medicamento teste e de referência (STORPIRTIS, 2004).

Segundo a Resolução-RDC nº 31/2010, o perfil de dissolução comparativo deve utilizar o mesmo método e os mesmos lotes de medicamento teste e de referência empregados na Equivalência Farmacêutica (BRASIL, 2010b).

Em linhas gerais, o que é preconizado pela maior parte das autoridades regulatórias para realização de estudos de dissolução comparativa, para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata, a fim de caracterizar o perfil de dissolução de um produto é (BRASIL, 2011; HEALTH CANADA, 2014; EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2010; ICH, 2018; THE UNITED STATES OF AMERICA, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017):

- Aparato: pá ou cesta;
- Volume de meio de dissolução: 900 mL ou menos (é recomendado que se use o mesmo volume selecionado para o teste de controle de qualidade);
- Temperatura do meio de dissolução: $(37,0 \pm 1,0)$ °C;
- Agitação: 50 rpm (pá) ou 100 rpm (cesta);
- Seja realizado com pelo menos 12 unidades farmacotécnicas de cada medicamento (teste e de referência) em cada perfil;
- Meios de dissolução: pH 1,2, pH 4,5 e pH 6,8, descritos nos compêndios oficiais. Água purificada pode ser utilizada como meio de dissolução adicional em alguns países (por exemplo, Japão);

- É vedado o uso de tensoativos e solventes orgânicos para a bioisenção;
- As amostras devem ser filtradas no momento da coleta (a fim de parar o processo de dissolução);
- O uso de enzimas é aceitável, desde que justificado, para cápsulas gelatinosas e comprimidos com revestimento de gelatina.

Para se classificar um candidato à bioisenção com base no SCB como pertencente à classe I ele deve apresentar, tanto o medicamento teste como o de referência, um perfil de dissolução muito rápido (percentual dissolvido $\geq 85\%$ em até 15 minutos) ou rápido (percentual dissolvido $\geq 85\%$ em até 30 minutos). Para a classe III deve apresentar taxa de dissolução muito rápida.

Quando um medicamento tiver dissolução muito rápida e o outro dissolução rápida, ou os dois (teste e de referência) tiverem dissolução rápida, a similaridade estatística deve ser demonstrada com base em modelos estatísticos independentes de análise, e o método universalmente aceito para tal fim é o Método Modelo Independente Simples, o qual utiliza os parâmetros independentes fator de diferença (f_1) e fator de semelhança (f_2) (BRASIL, 2010b).

No caso, a determinação regulatória é que a comparação de perfis se faça apenas utilizando o cálculo do f_2 , que é a medida de semelhança entre as porcentagens dissolvidas de ambos os perfis e é dada pela fórmula (BRASIL, 2010b):

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

Onde:

- n é o número de tempos de coleta considerados para fins de cálculo de F_2 ;
- Rt é o valor de porcentagem dissolvida no tempo t , obtido com o Medicamento de Referência ou Comparador;
- Tt é o valor de porcentagem dissolvida do Medicamento Teste ou da formulação alterada, no tempo t .

A avaliação de f_2 se baseia nas seguintes condições (ICH, 2018; THE UNITED STATES OF AMERICA, 2017):

- Um mínimo de três pontos de tempo de dissolução (o ponto zero é excluído) entram no cálculo;

- Os pontos de tempo devem ser os mesmos para os dois produtos (teste e de referência);
- Não mais do que um valor médio ≥ 85 % dissolvido para qualquer um dos produtos;
- Para se usar os dados médios, o DPR% não deve ser maior que 20% nos tempos iniciais (até 40 % dos pontos coletados ou até 10 min, dependendo da agência regulatória), e não deve ser maior que 10 % nos demais tempos.

Dois perfis de dissolução são considerados semelhantes quando o valor de f_2 é maior ou igual a 50 (entre 50 e 100) (BRASIL, 2010b). Quando tanto o medicamento teste como o de referência apresentam ≥ 85 % da quantidade declarada do fármaco dissolvida em 15 minutos, a comparação com o teste f_2 não é adequada pois há poucos graus de liberdade para o cálculo do fator, e os perfis são considerados semelhantes.

Se o ativo apresentar alta solubilidade e a formulação for de liberação imediata, apresentando dissolução muito rápida (dissolução média de no mínimo 85% da substância ativa em até 15 minutos, com $DPR \leq 10\%$ para o ponto de 15 minutos) para ambos os medicamentos, o fator f_2 perde o seu poder discriminativo e, portanto, não é necessário calculá-lo. Mas nestes casos é essencial que se comprove a dissolução muito rápida dos produtos por meio do gráfico da curva, considerando que o coeficiente de variação no ponto de 15 minutos que não pode exceder 10% (BRASIL, 2010b).

Quando o CV% é muito alto, o cálculo de f_2 não é preciso e confiável, e não pode ser obtida uma conclusão sobre a semelhança de dissolução (HEALTH CANADA, 2014; EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2010).

1.3.5 Equivalência farmacêutica

Segundo a legislação brasileira, o estudo de equivalência farmacêutica consiste no “conjunto de ensaios físico-químicos e, quando aplicáveis, microbiológicos e biológicos, que comprovam que dois medicamentos são equivalentes farmacêuticos” (BRASIL, 2011).

Por sua vez, equivalentes farmacêuticos

são medicamentos que possuem mesma forma farmacêutica, mesma via de administração e mesma quantidade da mesma substância ativa, isto é, mesmo sal ou éster da molécula terapêutica, podendo ou não conter excipientes idênticos, desde que bem estabelecidos para a função destinada. Devem cumprir com os mesmos requisitos da monografia individual da Farmacopéia Brasileira, preferencialmente, ou com os de outros compêndios oficiais, normas ou regulamentos específicos aprovados/referendados pela Anvisa ou, na ausência desses, com outros padrões de qualidade e desempenho (BRASIL, 2011).

Os medicamentos submetidos à equivalência farmacêutica devem cumprir em sua totalidade os requisitos da monografia individual, complementados com os ensaios descritos em métodos gerais da Farmacopeia Brasileira, ou outro compêndio oficial, para a forma farmacêutica em estudo. Quando não houver monografia oficial, deve ser utilizado método analítico validado pela indústria farmacêutica fabricante do medicamento teste.

Há monografia oficial para os comprimidos de dipirona sódica na FB 6ª ed., de forma que os ensaios a serem executados e os requisitos a serem cumpridos em um estudo de equivalência farmacêutica estão ali discriminados (BRASIL, 2019).

A Resolução-RDC nº 166/2017 (BRASIL, 2017) determina que “os métodos analíticos compendiais devem ter sua adequabilidade demonstrada ao uso pretendido, nas condições operacionais do laboratório, por meio da apresentação de um estudo de validação parcial”, devendo ser avaliados, no mínimo, “os parâmetros de precisão, exatidão e seletividade”.

Ou seja, há a obrigatoriedade de ser fazer uma validação parcial previamente à implementação de um método, para se comprovar “por meio de alguns parâmetros de validação, que o método analítico previamente validado tem as características necessárias para obtenção de resultados com a qualidade exigida, nas condições em que é praticado” (BRASIL, 2017).

1.4 Dipirona sódica

Neste trabalho utilizamos o estudo de bioisenção da dipirona sódica 500 mg, comprimido simples, como suporte para tratar da análise e discussão da bioisenção com base no SCB no Brasil e no mundo. Neste caso, é essencial pontuar as principais características do fármaco com vistas à proceder uma análise do cenário regulatório.

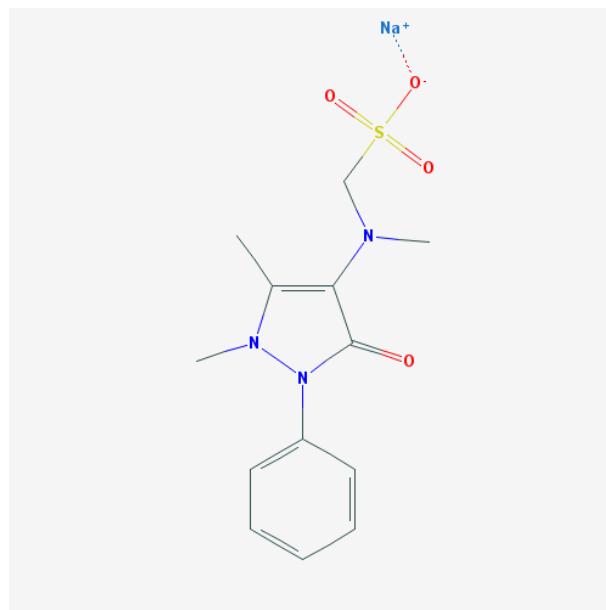
A dipirona sódica, ou metamizol sódico [N-(2,3-dimetil-5-oxo-1-fenil-3-pirazolin-4-il)-N-metilaminometanossulfonato de sódio] (Figura 3), é um derivado da pirazolona,

classificado como analgésico não opióide, introduzido na farmacologia em 1922 e utilizado como analgésico, antipirético e antiespasmódico tanto na medicina humana quanto veterinária (ANDRADE, 2005; ESCOBAR, 2012; JASIECKA *et al.*, 2014).

É indicada para o tratamento de dor severa, particularmente para dor associada com espasmos da musculatura lisa ou cólicas dos tratos gastrointestinal, biliar ou urinário. Também é útil para tratamento e controle da febre refratária a outros tratamentos (HINZ, 2007).

A sua utilização encontra-se restrita a alguns países devido ao risco de reações adversas, principalmente agranulocitose, anemia aplástica, púrpura trombocitopênica e anemia hemolítica. No Brasil, é um dos analgésicos mais populares, ao lado do ácido acetilsalicílico e do paracetamol (ALBUQUERQUE, 2003).

Figura 3 – Estrutura química da dipirona sódica.



Fonte: (www.drugbank.ca, 2016); (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY, 2016).

Embora a dipirona seja utilizada com sucesso há quase 100 anos, seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente elucidado, e provavelmente seu efeito é obtido pela combinação de sua ação bloqueadora da ciclooxigenase 3 (COX-3) e o impacto nos sistemas opioidérgico e canabinóide (MUÑOZ, J., 2010).

A dipirona é um ácido fraco com um pKa de 3,77, e que apresenta um aumento da intensidade da absorção a medida que o pH diminui (PITARELLO, A. P., 2005). Entretanto, é classificada com um caráter neutro (SALLES, 2015). Apresenta absorvância máxima nos comprimentos de onda no ultravioleta entre 207,8 e 266,7

nm, sendo que a melhor absorção é em 258 nm. Muitos estudos de referência para fármacos identificam a banda presente em 258 nm como característica da dipirona em meio ácido, entretanto há a presença de uma outra espécie presente no meio, que absorve em 240 nm (AMÉRICO, 2004).

O valor de pKa calculado para a dipirona é 3,9 (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY LABORATORY, 2016), de forma que se encontra predominantemente não ionizada no suco gástrico (pH 1,2), e quase totalmente ionizada no fluido intestinal (pH 6,8). Já o seu principal metabólito (4-MAA) é uma base fraca, com pKa = 4,76 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, 2018), estando na forma neutra em uma ampla faixa de pH (NASCIMENTO, 2006).

A dipirona é na realidade um pró-fármaco (ERGÜN, 2004), que tem a farmacocinética caracterizada pela molécula ser rapidamente hidrolisada, após a ingestão oral no fluido gástrico, ao seu metabólito ativo, o 4-metil-amino-antipirina (4-MAA). Este apresenta 85 % de biodisponibilidade após a administração do comprimido simples (via oral), e atinge a concentração máxima sistêmica em 1,2-2,0 h (LEVY, 1995; VAZ, 2013).

Em seguida, o 4-MAA é metabolizado a 4-formil-amino-antipirina (4-FAA), e a 4-amino-antipirina (AA), que é acetilado a 4-acetil-amino-antipirina (4-AAA), como explicitado na Figura 4 (LEVY, 1995).

A dipirona é rapidamente detectada no soro após 15 minutos de administração intravenosa, e não é identificada após ingestão oral. O(s) composto(s) ativo(s) responsável(eis) pelo efeito farmacológico não é identificado, exceto por sua atividade analgésica (ZYLBER-KATZ, 1992).

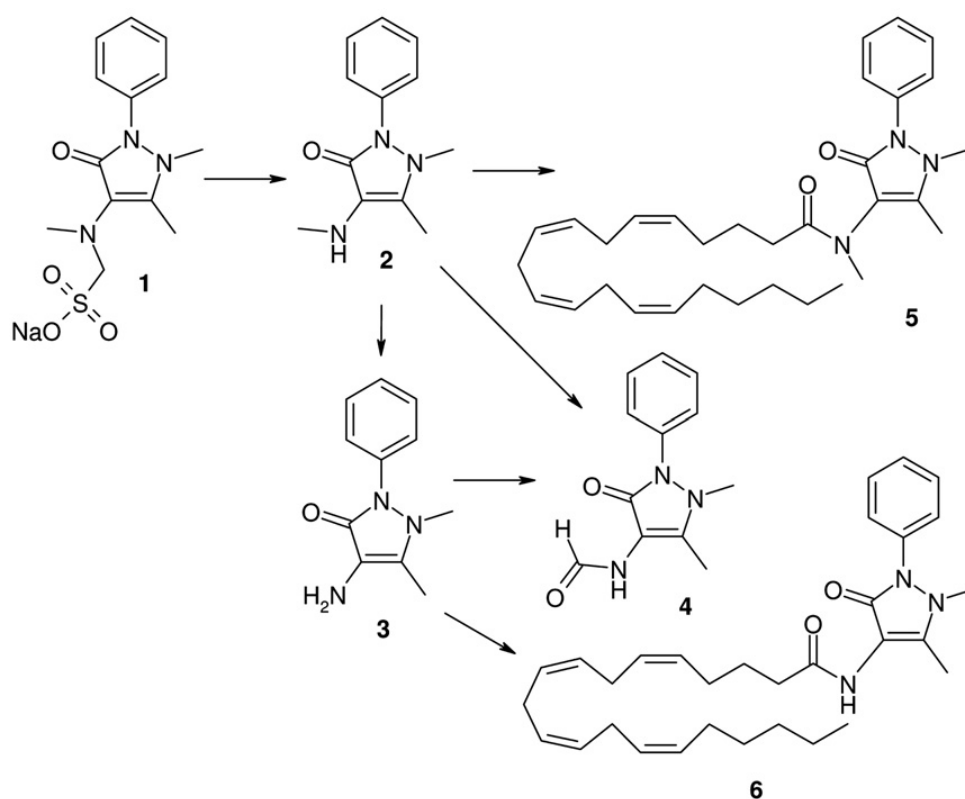
Apesar de se saber que a dipirona é um pró-fármaco não detectável no soro após uso oral – sua principal via de administração –, a maioria dos estudos *in vitro* relatam o doseamento da concentração de dipirona propriamente dita e correlacionam esta aos seus efeitos no organismo. Consequentemente, os resultados obtidos a partir da quantificação direta da pró-droga dipirona não refletem o que se observa na terapia (que é principalmente o efeito farmacológico dos seus metabólitos), mas, por outro lado, trazem confusão à comparação entre resultados *in vitro* e observações clínicas (ERGÜN, 2004).

É sabido a partir da literatura, que a extensão de hidrólise é principalmente afetada pelo pH – mais do que pela concentração ou temperatura –, sugerindo que o

mecanismo de hidrólise da dipirona é catalisada por ácido, sendo mais drástica quanto menor o pH (ERGÜN, 2004; ROGOSCH, 2012).

Assim, em pacientes com pH do fluido gástrico e temperatura corporal normal, a dipirona administrada por via oral é totalmente convertida em 4-MAA antes de atingir o duodeno (ERGÜN, 2004; JASIECKA, 2014).

Figura 4 – Metabólitos da dipirona.



(1) Dipirona

(2) 4-metil-amino-antipirina

(3) 4-amino-antipirina

(4) 4-formil-amino-antipirina

(5) Aracdonoilamida de 4-metil-amino-antipirina 1

(6) Aracdonoilamida de 4-metil-amino-antipirina 2

Fonte: (ROGOSCH, T. *et al.*, 2012).

Um grande número de métodos para a análise quantitativa de dipirona (IFA e medicamento) foram desenvolvidos e descritos na literatura especializada, incluindo titulação em meio aquoso (EL-ZEANY, 1982) e não aquoso (HASSAN, 1986), cromatografia (ASMARDI, 1983; EDDINE, 1982; FABRE, 1982; KATZ, 1984), luminescência (PEREZ-RUIZ, 1993), espectrometria (BICALHO, 2017; QURESHI, 1989; SAKIARA, 1999), absorção atômica (ZAMORA, 1993), espectrometria de infravermelho próximo (REN, 2000), espectrometria Raman (IZOLANI, 2003), amperometria (MUÑOZ, R. A. A., 2001), polarografia (BELAL, 1992) e potenciometria (ALBUQUERQUE *et al.*, 2003).

Pertencente à Classe I do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, a dipirona é um dos 21 fármacos candidatos à bioisenção no ordenamento jurídico sanitário brasileiro (BRASIL, 2016), mas salientando-se que na realidade ela é um pró-fármaco, e que seu metabolito ativo é responsável pela sua atividade biológica (MUÑOZ, J., 2010; JASIECKA, 2014).

1.5 Justificativa

Há consenso mundial, principalmente na área de vigilância sanitária, nas ações no sentido de reduzir a exposição de seres humanos às substâncias químicas desnecessárias, e outras ferramentas vão sendo desenvolvidas para reduzir o tempo de análise regulatória, mas buscando garantir que os fármacos em questão atendem aos requisitos mínimos para que suas formulações sejam tidas como eficazes, seguras e de qualidade. Mas estas ações são realmente seguras e eficazes quando dizem respeito a isentar de estudos de bioequivalência *in vivo*?

Examinou-se a legislação específica sobre bioisenção com base no Sistema de Classificação Biofarmacêutica, e fez-se uma comparação do atual estado da arte da bioisenção com base no SCB no cenário do Brasil e do mundo, bem como dos entraves à aplicação dos critérios internacionais à realidade regulatória nacional.

Tal abordagem é de extrema relevância pois descreve os principais pontos frágeis da legislação como um todo, bem como os aspectos que carecem de uma maior discussão de seu modo de implementação e de regulação.

Neste trabalho o estudo de bioisenção da Dipirona sódica 500 mg comprimido foi utilizado como exemplo e apontou algumas fragilidades da legislação vigente e na que está sendo proposta, demonstrando que faltam alguns tópicos a serem abordados. A falta de orientação no caso de pró-fármacos na legislação brasileira representa um entrave a esse grupo de medicamentos. Ainda há a questão de métodos descritos em compêndios oficiais que não são adequados a ensaios de quantificação, e neste sentido cabe ressaltar a situação da Farmacopeia Brasileira, que está na sexta edição, publicada agora em 2019, sofrendo atualizações e organizando melhor seu conteúdo, mas não uma revisão geral sistemática e minuciosa.

Nesse contexto, a bioisenção com base no SCB precisa de diálogo entre a Anvisa, a indústria farmoquímica e farmacêutica, e os centros de equivalência

farmacêutica e bioequivalência, com participação da academia. Faz-se mister ressaltar este diálogo precisará num momento posterior ser externalizado para organismos internacionais de regulação sanitária.

Espera-se que o presente trabalho se desdobre em um alerta às atuais práticas da Anvisa, em relação a bioisenção, que ainda carecem de mais atenção para garantir mais segurança ao usuário final dos medicamentos que se enquadram nessa questão.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar o cenário regulatório da bioisenção com base no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) no Brasil e no mundo, a partir do estudo de bioisenção do medicamento dipirona sódica, comprimido simples de 500 mg, avaliando possíveis entraves à sua aplicabilidade em função da legislação brasileira vigente.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar método analítico por cromatografia a líquido de alta eficiência para determinação de teor de dipirona sódica (insumo farmacêutico ativo) para o estudo de solubilidade.

- Determinar a solubilidade do insumo farmacêutico ativo dipirona sódica em diferentes condições de pH.

- Realizar o perfil de dissolução comparativo entre o medicamento teste e o medicamento de referência, em três faixas de pH fisiológico.

- Realizar o estudo de equivalência farmacêutica entre o medicamento teste e o medicamento de referência, em atendimento à Resolução-RDC nº 31/2010 (BRASIL, 2010b).

- Analisar o cenário regulatório, no Brasil e em alguns dos principais organismos regulatórios mundiais, da bioisenção com base no Sistema de Classificação Biofarmacêutica, identificando os entraves mais significativos à sua implementação.

3 METODOLOGIA

Neste trabalho, a parte experimental foi desenvolvida de modo sequencial, observando os princípios das Boas Práticas de Laboratório (BPL) e de *Quality by Design*.

Toda a parte experimental foi realizada no Serviço de Equivalência e Farmacocinética (Sefar) da Vice-Presidência de Produção e Inovação (VPPIS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

Os dados da dipirona sódica utilizada no desenvolvimento e validação do método de teor e no estudo de solubilidade encontram-se descritos na Tabela 2 (insumo farmacêutico ativo) e na Tabela 3 (substância química de referência).

Tabela 2 – Dados do insumo farmacêutico ativo dipirona sódica.

Dados da Substância	Insumo farmacêutico ativo (IFA)
Nome genérico (DCB ou DCI)	Dipirona sódica monohidratada
Fabricante	Shandong Xinhua Pharmaceutical Ltda
Número do lote	1204867
Data de fabricação	-
Data de validade	04/2016
Código da amostra	IFA-001/14

Fonte: (Da autora, 2015).

Tabela 3 – Dados da substância química de referência (SQR) dipirona sódica.

Dados da Substância	Substância Química de Referência (SQR)
Nome genérico (DCB ou DCI)	Dipirona sódica
Fabricante	EP (<i>European Pharmacopoeia</i>) (Farmacopeia Europeia)
Número do lote	4.0
Código	099E
Teor / potência	100 %
Validade	Lote corrente
Conservação	Em refrigerador (2° a 8 °C)

Fonte: (Da autora, 2015).

Os dados do medicamento teste e referência referentes utilizados nos estudos de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução comparativo nos três meios de pH fisiológico (1,2; 4,5 e 6,8) encontram-se resumidos na Tabela 4.

Tabela 4 – Dados dos medicamentos teste e de referência utilizados nos estudos de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução comparativo nos três meios de pH fisiológico.

Dados da amostra	Medicamento teste	Medicamento de referência
Nome genérico (DCB ou DCI)	Dipirona sódica monohidratada	Dipirona sódica monohidratada
Nome fantasia	Não autorizado	Novalgina®
Forma farmacêutica	Comprimidos	Comprimidos
Concentração	500 mg	500 mg
Fabricante	Não autorizado	Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda
Endereço do fabricante	Não autorizado	Rua Conde Domingos Papais, 413 – Suzano – SP
Número do lote	1311001	434429
Data de fabricação	12/2013	07/2014
Data de validade	12/2015	06/2017

Fonte: (Da autora, 2015).

3.1 Desenvolvimento e validação do método de determinação de teor utilizado no estudo de solubilidade do IFA dipirona sódica

O desenvolvimento do método de doseamento foi realizado integralmente no laboratório Serviço de Equivalência e Farmacocinética da Fundação Oswaldo Cruz (Sefar/Fiocruz), com o intuito de emprega-lo no estudo de solubilidade do IFA dipirona sódica.

3.1.1 Desenvolvimento do método de teor

O método para determinação de teor de dipirona, sob a forma de matéria-prima, se baseou na técnica de cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE), tendo por base alguns trabalhos da literatura e uma metodologia que era disponível no *USP Compendium* (THE U.S. PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2015), até 2015, para dipirona sódica comprimidos.

O método descrito no *USP Compendium* (Anexo A) foi o que apresentava melhor desempenho, entretanto muitos ajustes e correções se mostraram necessários para selecionar um método final, que consistiu de um método isocrático, cujas soluções e parâmetros são descritos a seguir.

A SQR utilizada foi a dipirona sódica, lote 4.0, fabricada e fornecida pela *European Pharmacopoeia* (EP) (Tabela 3). Os equipamentos e instrumentos utilizados estão listados na Tabela 5.

Tabela 5 – Equipamentos e instrumentos utilizados no desenvolvimento do método de teor.

Equipamentos	Marca	Modelo
Balança analítica	Sartorius	ME235S
Balança de precisão	Shimadzu	UX6200H
Cromatógrafo líquido (CLAE)	VWR-Hitachi	ELITE Lachrom L-2130
Banho de ultrassom	Branson	5510R-DTH
Banho com aquecimento	HAAKE	DC 10
Sistema purificação de água	Millipore	Integral 10
Pipeta automática 1 – 5 mL	HTL	Discovery Comfort

Fonte: (Da autora, 2015).

Soluções utilizadas:

- Solução A (formiato de amônio 0,05 mol/L): solução de formiato de amônio 50 mol/L em água purificada. Adicionar 2 mL/L de trietilamina e ajustar com ácido fórmico para pH 5,0;
- Solução B: metanol e acetonitrila (1:1);
- Fase móvel: solução A:solução B (85:15) (isocrático);
- Solução SQR: solução 0,3 mg/mL de metamizol sódico SQR em metanol;
- Amostra: solução 0,3 mg/mL de dipirona sódica IFA em metanol. A amostra foi filtrada em membrana RC ou PTFE, ambas de 0,45 µm.

Parâmetros cromatográficos:

- Coluna: Ascentis Express C18 150 x 4,6 mm e 2,7 µm;
- Detector: UV;
- Comprimento de onda: 254 nm;
- Fluxo: 1,0 mL/min;
- Temperatura do forno: 25 °C;
- Temperatura do amostrador: 6 °C;
- Volume de injeção: 5 µL.

3.1.2 Validação do método de teor

Com o método para determinação de teor desenvolvido, procedeu-se a validação deste. O protocolo de validação seguiu o “Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos” da ANVISA (Resolução-RE nº 899/2003) (BRASIL, 2003b), vigente na época de realização do estudo, de modo a assegurar que o método desenvolvido atendia às exigências das aplicações analíticas.

Os equipamentos e instrumentos utilizados estão listados na Tabela 6.

Tabela 6 – Equipamentos e instrumentos utilizados na validação do método de teor do IFA dipirona.

Equipamentos	Marca	Modelo
Balança Analítica	Sartorius	ME235S
Cromatógrafo líquido (CLAE)	VWR-Hitachi	ELITE Lachrom Bomba: L-2130; Amostrador: L-2200; Forno: L-2300; Detetor: L-2450
pHmetro	Mettler	Seven compact S220
Banho de ultrassom	Branson	5510R-DTH
Banho de aquecimento	HAAKE	DC10
Sistema purificação de água	Millipore	Integral 10
Pipetador automático 1,0 – 5 mL	Gilson	Pipetman
Pipetador automático 1,0 – 10 mL	Eppendorf	Research plus

Fonte: (Da autora, 2015).

Os parâmetros avaliados na validação estão sumarizados na Tabela 7.

Tabela 7 – Parâmetros avaliados na validação do método de teor.

Parâmetro	Especificação
Especificidade / Seletividade	A resposta analítica se deve exclusivamente ao fármaco ativo, não havendo interferência de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz. Os cromatogramas das amostras de diluente (branco) não devem apresentar picos com tempo de retenção semelhante ao do pico principal do fármaco a ser dosado.
Linearidade	$r > 0,99$
Intervalo	O intervalo especificado no método para a quantificação do fármaco (90 % a 110 %) deve apresentar exatidão, precisão e linearidade.
Exatidão	A relação entre a concentração média experimental e a concentração teórica correspondente (% recuperação) deve ser de 95 – 105 %, testada nos pontos 90 %, 100 % e 110 %.
Precisão – Repetitividade	A repetibilidade do método deve apresentar DPR ≤ 5 %, testada nos pontos 90 %, 100 % e 110 %.
Precisão Intermediária	A precisão intermediária do método deve apresentar DPR ≤ 5 %, testada nos pontos 90 %, 100 % e 110 %, entre os resultados de amostras preparadas em dia, equipamento e analista diferentes.
Robustez	A relação entre a concentração média experimental e a concentração teórica correspondente deve ser de 98 – 102 %.

Fonte: (Da autora, 2015).

3.2 Estudo de bioisenção de dipirona sódica 500 mg comprimidos – determinação da solubilidade do IFA nos meios de pH fisiológico

Com base no preconizado na Resolução-RDC nº 37/2011 (BRASIL, 2011) e na Nota Técnica nº 003/2013/CEFAR/GTFAR/GGMED/ANVISA (BRASIL, 2013^a), foi determinada a solubilidade do insumo farmacêutico ativo dipirona sódica em, no mínimo, três meios diferentes dentro da faixa de pH fisiológico (entre 1,2 e 6,8), em temperatura de $(37,0 \pm 1,0)$ °C, para tanto empregando-se o método de teor desenvolvido e validado.

Os equipamento e instrumentos utilizados estão listados na Tabela 8.

Tabela 8 – Equipamentos e instrumentos utilizados no ensaio de solubilidade da dipirona sódica.

Equipamentos	Marca	Modelo
Balança analítica	Sartorius	ME235S
Balança de precisão	Shimadzu	UX6200H
Banho de ultrassom	Branson	5510R-DTH
Medidor de pH	Mettler Toledo	Seven Compact S220
Cromatógrafo líquido (CLAE)	VWR-Hitachi	ELITE Lachrom L-2130
Incubadora com agitador orbital	Solar	SHAKER SL 222
Pipeta automática 100 – 1000 μ L	Labtex	---
Pipeta automática 1 – 10 mL	Eppendorf	Research plus

Fonte: (Da autora, 2016).

3.2.1 Avaliação da estabilidade do fármaco

3.2.1.1 Meios de pH fisiológico

Os meios pH 1,2 (ácido clorídrico 0,1 mol/L), pH 4,5 (tampão acetato) e pH 6,8 (tampão fosfato) foram preparados conforme descrito na FB 6ª ed. (BRASIL, 2019).

3.2.1.2 Preparo das amostras

Realizou-se em triplicata para cada meio descrito acima. Pesou-se 175,67 mg de dipirona sódica monohidratada IFA para balão volumétrico âmbar de 50 mL. Dissolveu-se e completou-se o volume com os respectivos meios. Homogeneizou-se e filtrou-se em membrana filtrante PTFE ou RC 0,45 μ m (concentração final: 3,51 mg/mL de dipirona sódica monohidratada).

Para as amostras no t₀, transferiu-se, em duplicata, 9 mL da amostra de cada meio para balões volumétricos âmbar de 100 mL, e completou-se o volume com metanol. Procedeu-se a análise conforme os parâmetros cromatográficos descritos no item 3.1.1.

Para as amostras no tempo de 24h (t_{24h}), transferiu-se as soluções para erlenmeyers, e deixou-se por 24 horas em incubadora a (37,0 \pm 1,0) °C, com agitação. Após esse tempo, esperou-se as soluções atingirem a temperatura ambiente. Transferiu-se, em duplicata, 9 mL da amostra de cada meio para balões volumétricos

âmbar de 100 mL, e completou-se o volume com metanol. Homogeneizou-se e filtrou-se em membrana filtrante PTFE ou RC 0,45 µm.

3.2.1.3 Preparo das soluções padrão

Preparou-se duas soluções padrão, SQR1 e SQR2.

Para cada solução, pesou-se 10 mg de metamizol sódico SQR para balão volumétrico âmbar de 10 mL, dissolveu-se e completou-se o volume com metanol. Homogeneizou-se.

Transferiu-se alíquotas de 3 mL para balão volumétrico âmbar de 10 mL, e completou-se o volume com o mesmo solvente. Homogeneizou-se e filtrou-se em membrana PTFE ou RC 0,45 µm.

Os parâmetros cromatográficos foram os mesmos utilizados para as amostras.

3.2.1.4 Análise

Injetou-se os diluentes (meios pH 1,2; 4,5 e 6,8) em duplicata.

Injetou-se 5 vezes a solução SQR1 e, em triplicata, a solução SQR2. Calculou-se o DPR entre as injeções de SQR1, e a relação entre as respostas (área/massa) das soluções SQR1 e SQR2, que deve estar entre 98 – 102 %.

Injetou-se as amostras dos tempos t₀ e t_{24h}, em duplicata.

Verificou-se o desempenho do sistema pelos parâmetros:

- DPR % da solução SQR1: máximo 2,0 %;
- Assimetria: máximo 2,0.

3.2.2 Determinação da solubilidade

Os meios pH 1,2 (ácido clorídrico 0,1 mol/L), pH 4,5 (tampão acetato) e pH 6,8 (tampão fosfato) foram preparados conforme descrito na FB 6^a ed. (BRASIL, 2019).

3.2.2.1 Preparo das amostras

Realizou-se o teste em triplicata para cada meio especificado. Registrou-se o pH inicial de cada meio antes da adição do IFA;

Transferiu-se 30 mL de cada meio para respectivos erlenmeyers com 50 mL de capacidade e acondicionou-se na incubadora, ajustada previamente a $(37,0 \pm 1,0)$ °C. Deixou-se as soluções sob agitação por 15 minutos.

Adicionou-se, gradativamente, quantidades de dipirona sódica monohidratada (IFA), até sua saturação nos meios. Manteve-se sob agitação e aquecimento por 24 horas.

Terminado o tempo, retirou-se, imediatamente, alíquotas em triplicata de cada frasco: 0,2 mL de amostra para balão volumétrico âmbar de 100 mL, e completou-se o volume com metanol. Filtrou-se imediatamente as amostras em membrana PTFE ou RC 0,45 μm , para não ocorrer a precipitação do fármaco.

Ao final do ensaio, verificou-se e registrou-se o pH da solução saturada contida em cada erlenmeyer à temperatura ambiente.

3.2.3 Método quantitativo - doseamento por cromatografia a líquido de alta eficiência

Solução A: solução de formiato de amônio 0,05 mol/L em água purificada. Adicionar 2 mL/L de trietilamina e ajustar com ácido fórmico para pH 5,0.

Solução B: metanol e acetonitrila (1:1).

Fase móvel: solução A:solução B (85:15).

a) Solução amostra:

As amostras do item 3.2.2.1 foram filtradas em membrana PTFE ou RC 0,45 μm para *vial*.

b) Solução SQR:

Preparou-se duas soluções, SQR 1 e SQR 2.

Para cada solução, pesou-se 10 mg de metamizol sódico SQR para balões volumétricos âmbar de 10 mL, dissolveu-se e completou-se o volume com metanol. Homogeneizou-se.

Transferiu-se alíquota de 3 mL para balão volumétrico âmbar de 10 mL, e completou-se o volume com o mesmo solvente. Homogeneizou-se e filtrou-se em membrana PTFE ou RC 0,45 μm para *vial*.

c) Parâmetros cromatográficos:

Idem aos descritos no item 3.1.1.

3.2.4 Análise

Injetou-se os diluentes (meios pH 1,2; 4,5 e 6,8) em duplicata.

Injetou-se 5 vezes a solução SQR1 e, em triplicata, a solução SQR2. Calculou-se o DPR entre as injeções de SQR1, e a relação entre as respostas (área/massa) das soluções SQR1 e SQR2, que deve estar entre 98 - 102 %.

Injetou-se as amostras em duplicata.

Expressou-se os resultados para cada meio (pH 1,2; 4,5 e 6,8) em mg/mL.

Parâmetros para verificação do desempenho do sistema:

- DPR% da solução SQR1: máximo 2,0 %;

- Assimetria: máximo 2,0.

3.2.5 Especificação

O coeficiente de variação (CV%), ou DPR, das replicatas das amostras deve ser menor que 5 % para cada condição.

Um fármaco é considerado altamente solúvel se sua maior dose administrada, solubiliza-se completamente em até 250 mL de cada uma das soluções tampão utilizadas dentro da faixa de pH fisiológico (1,2 a 6,8) a $(37,0 \pm 1,0)$ °C.

3.3 Estudo de bioensação de dipirona sódica 500 mg comprimidos – perfil de dissolução comparativo nos meios de pH fisiológico

O perfil de dissolução comparativo para os comprimidos de dipirona sódica se baseou nos requisitos existentes na Resolução-RDC nº 31/2010 (BRASIL, 2010b), na Resolução-RDC nº 37/2011 (BRASIL, 2011), e na Nota Técnica nº 003/2013/CEFAR/GTFAR/GGMED/ANVISA (BRASIL, 2013a).

Este estudo consistiu da análise dos comprimidos de dipirona em diferentes meios de dissolução dentro da faixa de pH fisiológico (entre 1,2 e 6,8) em temperatura de $(37,0 \pm 1,0)$ °C, e, com base nos resultados, foi analisado seu comportamento por

meio do Método Modelo Independente Simples, empregando o cálculo do fator de semelhança (f_2).

Os requisitos do estudo de perfil de dissolução foram os existentes na legislação brasileira, a saber:

- foram utilizados os mesmos lotes dos medicamentos teste e de referência empregados no estudos de equivalência farmacêutica;
- foi utilizado o mesmo método de dissolução empregados no estudo de equivalência farmacêutica;
- o estudo de perfil de dissolução comparativo foi realizado simultaneamente entre medicamento teste e de referência, com lotes dentro do prazo de validade. O medicamento de referência, que já possuía registro na Anvisa, estava acondicionado em sua embalagem comercial; e o medicamento teste, que se encontrava em lote-piloto, esta acondicionado em sua embalagem primária, devidamente identificada conforme legislação vigente;
- foi realizado o registro do pH no início e no final do experimento.

Os equipamentos e instrumentos utilizados no ensaio de perfil de dissolução comparativo nos meios de pH fisiológico estão listados na Tabela 9.

Tabela 9 - Equipamentos e instrumentos utilizados no ensaio de perfil de dissolução comparativo.

Equipamentos	Marca	Modelo
Balança Analítica	Sartorius	ME235S
Dissolutor	Distek	6100 evolution
Espectrofotômetro UV-VIS	Varian	Cary 50
Sistema purificação de água	Millipore	Integral 10
Banho de ultrassom	Branson	5510R-DTH
pHmetro	Mettler	Seven compact S220
Termômetro (-10 a 110 °C)	Incoterm	126726/09
Pipetador automático 100-1000 µL	Labtec	-

Fonte: (Da autora, 2016).

3.3.1 Meios de dissolução

Os meios de dissolução pH 1,2 (ácido clorídrico 0,1 mol/L), pH 4,5 (tampão acetato) e pH 6,8 (tampão fosfato) foram preparados conforme descrito na FB 6ª ed. (BRASIL, 2019).

3.3.2 Parâmetros de dissolução e de quantificação

As condições e os parâmetros sob os quais foram realizadas as etapas de dissolução e de quantificação encontram-se descritas na FB 6^a ed. (BRASIL, 2019) e na Resolução-RDC nº 37/2011 (BRASIL, 2011), a saber:

a) Parâmetros de dissolução:

- Aparato: pá;
- Rotação: 50 rpm;
- Tempos de coleta: 5, 10, 15, 30, 45 e 90 minutos;
- Meios de dissolução: pH 1,2 (ácido clorídrico 0,1 mol/L), pH 4,5 (tampão acetato) e pH 6,8 (tampão fosfato) à $(37,0 \pm 1,0)$ °C;
- Volume de meio: 900 mL;
- Volume de coleta: não aplicável - leitura direta;

b) Parâmetros de quantificação:

- Técnica: espectrofotometria UV-Vis;
- Filtro de coleta: membrana RC;
- Caminho ótico da amostra: 0,1 cm;
- Caminho ótico do padrão: 1,0 cm;
- Comprimento de onda: 258 nm;
- Branco: meio de dissolução.

3.3.3 Análise

3.3.3.1 Curva padrão dipirona

Preparou-se duas soluções padrão, SQR1 e SQR2.

Pesou-se 10 mg de metamizol SQR para balão volumétrico de 10 mL e dissolveu-se com o meio de dissolução. Transferiu-se alíquotas de 0,12; 0,25; 0,38; 0,5 e 0,62 para balões volumétricos de 10 mL, e completou-se com o meio de dissolução. Homogeneizou-se.

Obteve-se soluções com concentrações finais de 0,012; 0,025; 0,038; 0,050; 0,062 mg/mL, respectivamente.

Para a solução padrão SQR2 100 %, transferiu-se 0,5 mL da solução padrão SQR2 estoque para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com o meio de dissolução. Homogeneizou-se.

3.3.3.2 Solução amostra

Conduziu-se o perfil de dissolução com 12 cubas para os medicamentos teste e de referência, utilizando os meios especificados acima, convenientemente desgaseificados e aquecidos. A cada uma das cubas, adicionou-se um comprimido e procedeu-se com a coleta automática, de acordo com os tempos especificados acima, utilizando filtros acoplados aos amostradores. Procedeu-se a leitura das soluções e registrou-se.

Registrou-se o pH no início e no final do experimento.

3.3.4 Cálculo

A partir da curva padrão, calculou-se a equação da reta ($y = a + bx$).

O coeficiente de correlação (r) deve ser maior que 0,99.

Com base na equação da reta, obteve-se o percentual dissolvido de dipirona sódica monohidratada em cada tempo de coleta.

3.4 Estudo de bioequivalência de dipirona sódica 500 mg comprimidos – equivalência farmacêutica

O estudo de equivalência farmacêutica consiste num “conjunto de ensaios físico-químicos e, quando aplicáveis, microbiológicos e biológicos, que comprovam que dois medicamentos são equivalentes farmacêuticos” (BRASIL, 2010b).

Para o caso analisado nesta tese, comparou-se o medicamento teste (Dipirona sódica 500 mg) e o medicamento de referência (Novalgina® 500 mg) com relação a ensaios físico-químicos e microbiológicos.

Na Tabela 10 encontram-se os testes físico-químicos realizados, com a respectiva especificação e referência.

Tabela 10 - Ensaio físico-químico realizados para os medicamentos teste e referência.

Testes	Especificação	Referência
Aspecto	Informativo	N/A
Identificação	A) Após a adição de gotas de peróxido de hidrogênio no pó dos medicamentos teste e referência, desenvolve-se uma coloração azul que desaparecerá rapidamente passando a vermelha intensa. B) Após a adição de gotas de persulfato de potássio no pó dos medicamentos teste e referência, desenvolve-se uma coloração amarela após 5 minutos de reação.	FB, 5ª ed., v.2, p. 912-913, 2010.
Peso médio	Informativo	FB, 5ª ed., v.1, p. 59-60, 2010.
Varição de peso	± 5,0 %	FB, 5ª ed., v.1, p. 59-60, 2010.
Desintegração	Máximo de 30 minutos em água com disco.	FB, 5ª ed., v.2, p. 912-913, 2010.
Dureza	Informativo	FB, 5ª ed., v.2, pág. 912-913, 2010.
Friabilidade	Máximo 1,5 %	FB, 5ª ed., v.2, p. 912-913, 2010.
Teor	95,0 – 105,0 %	FB, 5ª ed., v.2, p. 912-913, 2010.
Diferença entre teores	Máximo 5 %	Resolução-RDC 31/2010
Dissolução	Q = 70 % em 45 minutos. Critério: Todas as 6 unidades testadas devem apresentar Q ≥ 5 %, no primeiro estágio (E1). No segundo estágio (E2), a média de 12 unidades deve ser ≤ Q e nenhuma unidade menor que Q-15 %.	FB, 5ª ed., v.2, p. 912-913, 2010. FB, 5ª ed., v.1, p. 66-73, 2010.
Uniformidade de doses unitárias – Uniformidade de conteúdo	VA = Máximo de 15,0	FB, 5ª ed., v.2, p. 912-913, 2010. FB, 5ª ed., v.1, p. 73-76, 2010.

Fonte: (Da autora, 2015).

3.5 Avaliação da bioisenção com base no Sistema de Classificação Biofarmacêutica

De posse dos resultados obtidos nas etapas anteriores, e com base no referencial teórico apresentado na construção desta tese, analisou-se o cenário regulatório, no Brasil e em alguns dos principais organismos regulatórios mundiais, da bioisenção com base no Sistema de Classificação Biofarmacêutica, identificando os entraves mais significativos

O motivo preponderante para que se tenha extrapolado a discussão para o cenário mundial foi o fato da Anvisa ter sido aceita como membro efetivo do *ICH* em

novembro de 2016 e tem um prazo de 5 anos (novembro de 2021) para implementar o conjunto de guias de nível II ("*Tier 2 Guidelines*") do Conselho.

Assim, esta discussão se amplia para além do que se encontra meramente harmonizado nas principais autoridades regulatórias objeto desta tese (Anvisa, EMA, FDA, HEALTH CANADA, ICH e OMS), para tratar a questão nevrálgica de como compartilhar com a indústria a responsabilidade de demonstrar que um fármaco pode ser bioisento com base no SCB especificamente no cenário regulatório brasileiro.

Os documentos consultados são de domínio público, a saber:

- (1) Anvisa: Resolução-RDC nº 31/2010 (BRASIL, 2010b) e nº 37/2011 (BRASIL, 2011);
- (2) EMA: "Guideline on the investigation of bioequivalence" (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2010);
- (3) FDA: "*Guidance for industry: waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system*" (THE UNITED STATES OF AMERICA, 2017);
- (4) HEALTH CANADA: "*Guidance document: Biopharmaceutics Classification System based biowaiver*" (HEALTH CANADA, 2014);
- (5) ICH: "*M9: Biopharmaceutics classification system-based biowaivers (draft version)*" (INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, 2018);
- (6) OMS: "*WHO technical report series, nº 992, annex 7: Multisource (Generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability*" (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017);

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento e validação do método de teor

Após extensa busca na literatura da área por métodos para doseamento de dipirona, foi possível observar que a gama de técnicas variava muito: titulação direta com N-bromosuccimida usando alaranjado de metila como indicador em ácido acético glacial (EL-ZEANY, 1982), análise por injeção em fluxo (*Flow Injection Analysis* – FIA) com cério (PEREZRUIZ, 1993), absorção atômica indireta com coletor de injeção em fluxo (ZAMORA, 1993), cromatografia em camada delgada de alta eficiência em gel de sílica utilizando solução de metanol (ABURJAI, 2000), determinação amperométrica com célula de fluxo contendo eletrodos de ouro (MUÑOZ, R. A. A., 2001), e métodos por CLAE (AGUNDEZ, 1994; ALTUN, 2002; ASMARDI, 1983; DAMM, 1989; GEISLINGER, 1996; KATZ, 1984; GOLUBITSKII, 2006).

Entretanto, a maioria destes métodos descritos objetivava o doseamento de dipirona em associações farmacêuticas, e realizou-se testes preliminares com alguns baseados em CLAE e espectrometria, mas o método descrito no *USP Compendium* foi o que demonstrou melhores resultados e se mostrou mais promissor em se obter um método final validado.

Cabe ressaltar que o método se encontrava descrito no *USP Compendium* até 2015, e depois disto foi retirado definitivamente do acervo. Uma possível explicação para esta situação é que a dipirona sódica é proibida nos Estados Unidos para uso humano e veterinário (animais para consumo humano) (JASIECKA, 2014) devido ao potencial risco de causar agranulocitose, leucopenia e anemia aplástica (BASAK, 2010; ERGÜN, 2004), e possivelmente a monografia ficou em consulta pública por um curto período, sendo logo retirada do sítio eletrônico da Farmacopeia Americana.

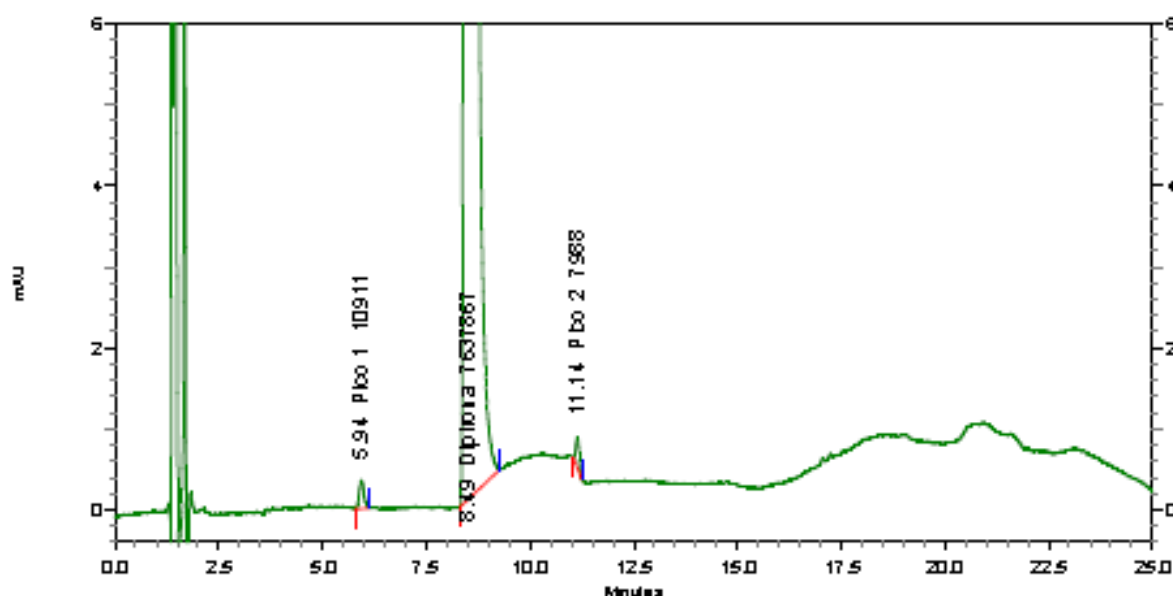
Os resultados obtidos com o método descrito no *USP Compendium* estão descritos na Tabela 11 e no cromatograma da Figura 5.

Tabela 11 - Resultados de desempenho do sistema para o método inicial de doseamento descrito no USP *Compendium* para o IFA dipirona sódica.

Pico	t_R (min)	Área	Pratos teóricos	Assimetria
1	5,94	10911	13498	1,1
Dipirona	8,49	7637867	11486	1,9
2 (4-MAA)	11,14	7988	100519	1,0

Fonte: (Da autora, 2015).

Figura 5 - Cromatograma obtido com o método inicial de doseamento descrito no USP *Compendium* para o IFA dipirona sódica.



Fonte: (Da autora, 2015).

O IFA dipirona sódica é muito solúvel em metanol, corroborando os dados da literatura (EUROPEAN PHARMACOPOEIA ONLINE, 9th edition).

O cromatograma da solução amostra apresentou dois picos desconhecidos, os quais foram denominados pico 1, com um t_R de 5,94 minutos, e pico 2 (4-MAA) com t_R de 11,14 minutos.

O pico da dipirona apresentou boa separação em relação aos picos 1 e 2, porém as integrações do pico da dipirona e do pico 2 não foram satisfatórias, pois eluíram na rampa do gradiente, o que pode levar a valores de área e altura de pico imprecisos e impossibilitar a quantificação adequado do fármaco, de acordo com a literatura (SCHELLINGER, 2006).

Inicialmente, realizou-se experimentos modificando os parâmetros cromatográficos de volume de injeção e temperatura do forno, a fim de se otimizar o

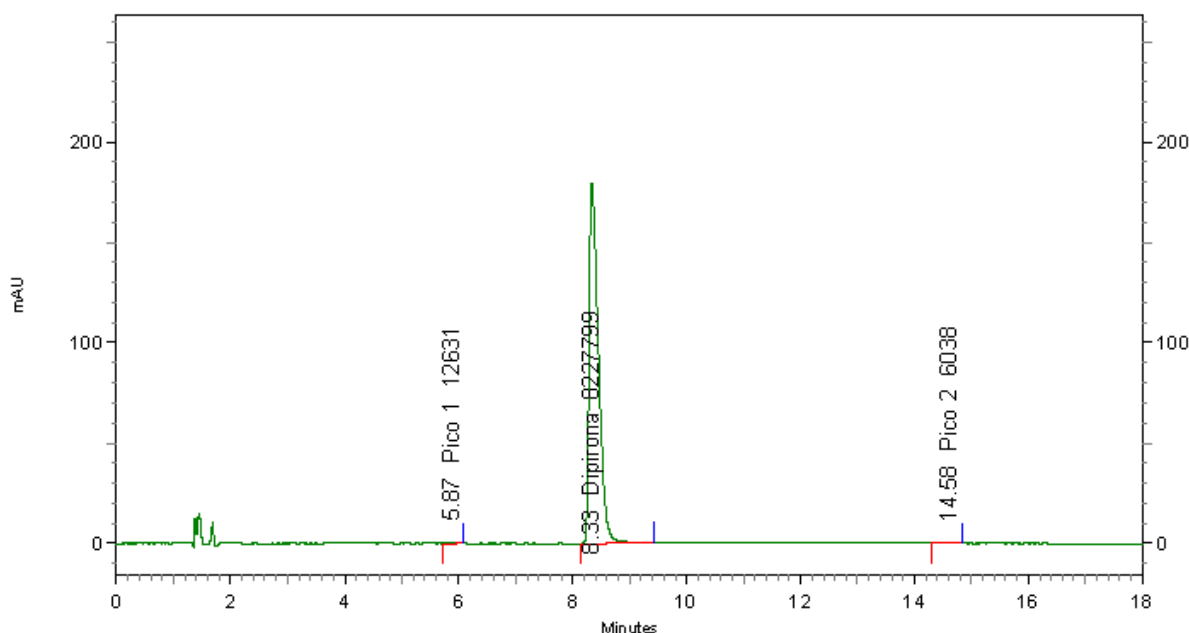
método inicial. Como estes experimentos não se mostraram satisfatórios, foram modificados outros parâmetros cromatográficos, como: gradiente da fase móvel, temperatura do amostrador, volume de injeção e tipo de membrana filtrante.

Apesar do método ter sido capaz de separar produtos de degradação sem interferir no pico principal, a fim de minimizar a variação nos tempos de retenção dos picos, optou-se por mudar o método gradiente para isocrático, pois observou-se que os picos 1 e da dipirona saíam na proporção solução A:solução B (85:15).

Esta decisão, entretanto, requereu um monitoramento mais de perto para o pico 2, pois este poderia sofrer alguma alteração em seu tempo de retenção.

No método isocrático os parâmetros de desempenho foram satisfatórios, com a resolução entre o pico da dipirona e o pico 2 (4-MAA); e tempos de retenção dos picos de 5,9 minutos para o pico 1, 8,3 minutos para o pico da dipirona, e 14,6 minutos para o pico 2 (4-MAA) (Figura 6).

Figura 6 - Cromatograma obtido com o método desenvolvido (isocrático) de doseamento para o IFA dipirona.



Fonte: (Da autora, 2015).

O tempo de análise foi reduzido de 25 minutos (método descrito no *USP Compendium*) para 18 minutos, com conseqüente redução no consumo dos solventes e materiais.

Houve uma melhoria na estabilização da linha de base em relação a existência de “vales” ocasionadas pelas mudanças ao longo do gradiente.

As amostras do IFA dipirona foram filtradas em membrana PTFE e RC, apresentando comportamento semelhante, indicando que ambas são igualmente adequadas para o estudo em questão. Observou-se que as membranas (PTFE ou RC) não sofreram quaisquer alterações devido a mudança do método de gradiente para isocrático. Isto se mostrou extremamente interessante pois teve-se a opção de se trabalhar com os dois tipos de membrana no doseamento do IFA dipirona.

Observou-se uma diminuição nas variações do tempo de retenção do pico da dipirona, que eram possivelmente ocasionadas pela formação de pequenas bolhas na agulha de injeção durante a mistura das soluções A e B.

O método isocrático, que é preferível ao método em gradiente pela facilidade de execução operacional e pelo menor consumo de solventes e insumos, atendeu aos requisitos, principalmente por ser seletivo, e foi utilizado como método de doseamento do fármaco no estudo de solubilidade, após respectiva validação.

Os resultados obtidos na validação do método desenvolvido para o doseamento do IFA dipirona sódica demonstraram que o método apresentou especificidade, seletividade, linearidade na faixa de concentração empregada, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez, os quais atendem aos critérios de especificação definidos para estes parâmetros.

Dessa forma, o mesmo pode ser aplicado ao teste de solubilidade pois atende à Resolução-RDC nº 37/2011, art. 9º, §5º, ou seja, que “o método de quantificação deverá ser capaz de diferenciar o fármaco de eventuais produtos de degradação” (BRASIL, 2011).

Cabe aqui salientar que a validação, para fins de utilização do método desenvolvido no estudo de solubilidade do IFA dipirona, no âmbito do estudo de bioensação do medicamento dipirona sódica 500 mg, foi realizada sobre a égide da Resolução-RE nº 899/2003 (BRASIL, 2003b), e que a documentação do estudo foi finalizada e entregue ao patrocinador em 2016.

Por outro lado, no decorrer do desenvolvimento desta tese, foi publicada a Resolução-RDC nº 166/2017 (BRASIL, 2017), a qual determina que, entre outros requisitos, na validação de métodos analíticos, os testes de linearidade e exatidão devem ser realizados com a SQR.

Diante da conclusão do estudo de bioisenção, poderia ter se repetido tais testes com o padrão, estritamente para fins acadêmicos. Contudo, tal iniciativa não foi levada a termo haja visto o elevado custo do padrão (U\$398.00 por 10 mg de dipirona sódica) e a quantidade necessária para se repetir os ensaios: cerca de 300 mg de padrão (cerca de U\$12,000.00, sem considerar os impostos). Este custo, para uma instituição pública, no âmbito de uma tese de doutorado sem custeio, é um valor exorbitante e economicamente inviável.

Além disto, ao se fazer uma análise dos resultados da validação (dados não mostrados), concluiu-se que se a mesma houvesse sido repetida com as exigências da Resolução-RDC nº 166/2017, não haveria mudança significativa nos resultados encontrados, e o método seria considerado validado.

Na Tabela 12 é apresentado o resumo dos resultados obtidos na validação do método de teor para o IFA dipirona sódica.

Tabela 12 - Resumo dos resultados obtidos na validação do método de teor para o IFA dipirona.

Parâmetro	Resultado
Especificidade / Seletividade	Nenhum pico interferente foi observado nas soluções de diluente e placebo.
Linearidade	r = 1,00
Exatidão	90 %: % recuperação = 99,5 % 100 %: % recuperação = 100,5 % 110 %: % recuperação = 101,1 %
Intervalo	90 % Linearidade: r = 1,00 Precisão: DPR= 0,2 % Exatidão: % recuperação = 99,5 %
	100 % Linearidade: r = 1,00 Precisão: DPR= 0,4 % Exatidão: % recuperação = 100,5 %
	110 % Linearidade: r = 1,00 Precisão: DPR= 1,0 % Exatidão: % recuperação = 101,1 %
Precisão - Repetibilidade	90 %: DPR= 0,2 % 100%: DPR= 0,4 % 110 %: DPR= 1,0 %
Precisão Intermediária	90 %: DPR= 0,4 % 100 %: DPR= 1,9 % 110 %: DPR= 1,2 %
Robustez	pH 4,8 ± 0,2: % recuperação = 100,8 % Temperatura do forno 20 °C: % recuperação = 101,2 % Temperatura do forno 25 °C: % recuperação = 96,5 %

Fonte: (Da autora, 2015).

4.2 Estudo de bioisenção de dipirona sódica 500 mg comprimidos - determinação da solubilidade do IFA nos meios de pH fisiológico

4.2.1 Avaliação da estabilidade do fármaco

Com relação à estabilidade das soluções, o fármaco dipirona sódica não mostrou estável ao longo do período de 24 horas em cada uma das soluções tampão testadas na faixa de pH fisiológico (pH 1,2, pH 4,5 e 6,8), em temperatura de $(37,0 \pm 1,0)$ °C, sendo que em pH 1,2 houve degradação total das amostras (Figura 7).

Os resultados, expressos como percentual da quantidade de IFA dipirona em solução (100 % = 3,51 mg/mL), estão especificados abaixo (Tabela 13), para cada uma das condições de pH, sendo que o critério de aceitação era que o fármaco deveria ser estável durante o período de realização do ensaio de solubilidade.

Tabela 13 - Resultados do ensaio de estabilidade das soluções, nos pH 1,2, 4,5 e 6,8, no estudo de solubilidade do IFA dipirona sódica.

Replicatas	Condição pH 1,2		Condição pH 4,5		Condição pH 6,8	
	T0 (%)	T 24h (%)	T0 (%)	T24h (%)	T0 (%)	T24h (%)
1	1,7	0,0	90,2	41,6	76,4	58,5
2	1,6	0,0	91,1	40,0	82,0	62,4
3	1,5	0,0	93,0	42,2	76,2	55,7
Média	1,6	0,0	91,4	41,3	78,2	58,9
DPR (%)	3,4	-	1,6	2,8	4,2	5,7

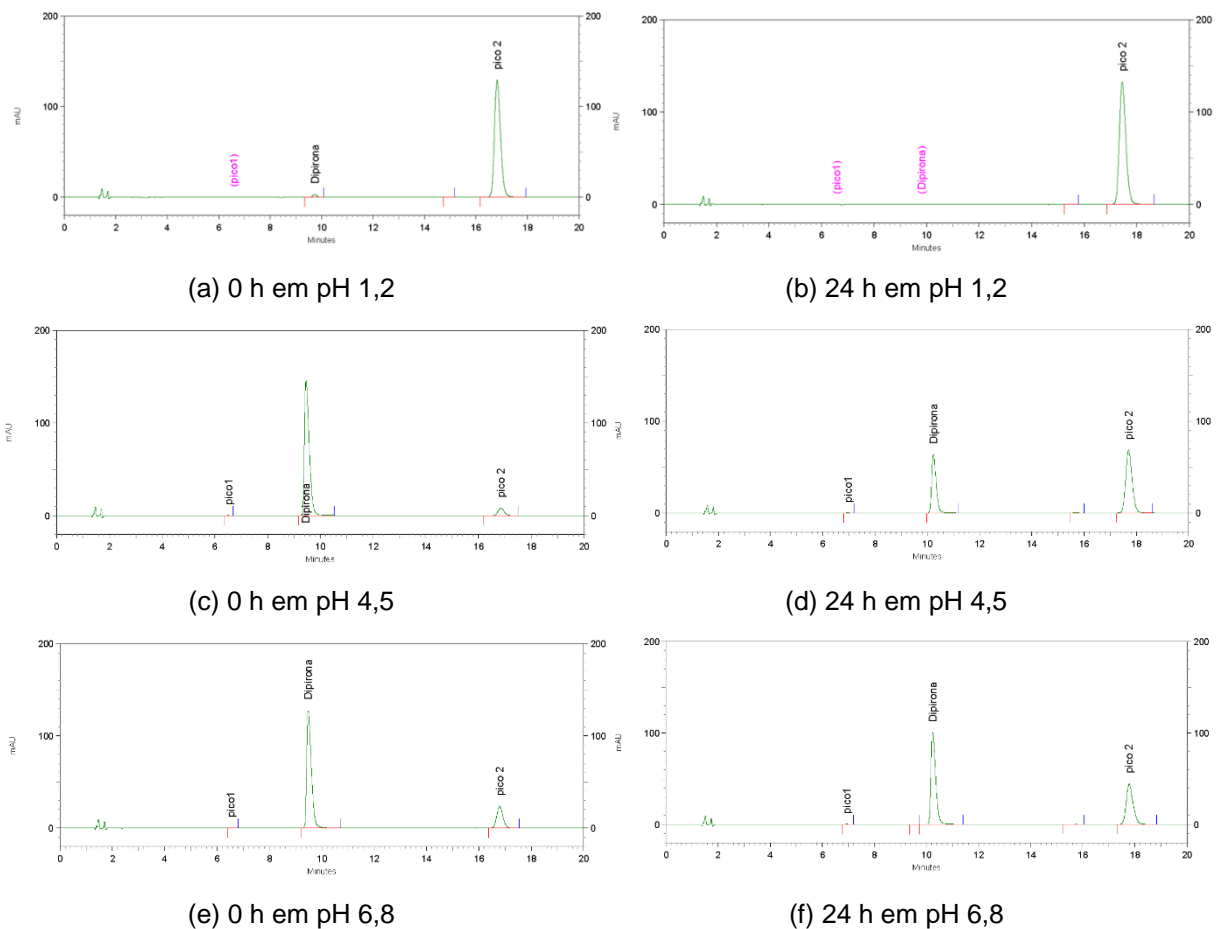
Fonte: (Da autora, 2016).

Como pode ser observado na Figura 7 (a) e (b), no meio ácido ocorre degradação da dipirona já no tempo 0 h, com degradação total do fármaco em 24 horas.

A explicação para tal comportamento da dipirona é ela ser um pró-fármaco, que é facilmente hidrolisada, mesmo em condições de bancada, ao seu principal metabólito, o 4-MAA (ERGÜN, 2004; LEVY, 1995).

Infere-se que o pico 2 corresponde ao 4-MAA, que em pH 1,2 é o único pico que pode ser observado (Figura 7 (a) e (b)). Nos outros dois pH observa-se a conversão da dipirona no pico 2, o que ocorre desde o início do estudo, ou seja, na quantificação no tempo 0 h já ocorreu a hidrólise da dipirona em alguma extensão.

Figura 7 – Avaliação da estabilidade do fármaco no início (0 h) e no fim (24 h) nos três pH avaliados (1,2; 4,5 e 6,8).



Fonte: (Da autora, 2016).

É sabido que fatores físico-químicos afetam os compostos químicos de diferentes formas, incluindo alterações na sua estrutura e atividade, e a dipirona é um exemplo de substância que é afetada por estes fatores (ERGÜN, 2004; ROGOSCH, 2012).

Apesar do conhecimento de que a dipirona é um pró-fármaco que não é detectável no soro após ingestão oral (a via de administração mais amplamente utilizada para este fármaco), a maioria dos estudos *in vitro* mede a concentração da dipirona em si para analisar e correlacionar seus efeitos. Consequentemente, os resultados obtidos a partir da quantificação direta do pró-fármaco dipirona (em oposição à medição de seus metabólitos ativos) não refletem a realidade e, portanto, dificultam a comparação dos resultados entre diferentes tipos de estudos (por exemplo, *in vivo* e *in vitro*) (BACHMANN, 2018; JASIECKA, 2014).

Ergün e *cols.* (ERGÜN, 2004) realizaram um estudo que buscou caracterizar os efeitos dos fatores físico-químicos de concentração, temperatura e pH na hidrólise da dipirona em seu principal metabólito, o 4-MAA, e fornecer dados para futuros experimentos utilizando soluções de dipirona.

Na maioria dos estudos *in vitro*, a dipirona é usada na faixa de concentração de 1 mmol/L a 10 mol/L. Nestas condições de concentração, ela não é completamente hidrolisada a 4-MAA, e o grau de hidrólise dependerá do tempo desde a preparação da solução até à análise do composto (ERGÜN, 2004).

Devido a essa ambiguidade em torno do grau de hidrólise da solução, não é possível correlacionar um efeito detectado com a suposta concentração de dipirona. A mesma consideração vale para estudos *in vivo* em que a dipirona é aplicada localmente e seu efeito é investigado imediatamente, antes que a dipirona tenha sido hidrolisada no nível do tecido local ou absorvida na circulação sistêmica e convertida no metabólito ativo (ERGÜN, 2004).

É muito importante notar que, no uso clínico, o 4-MAA é absorvido pela circulação sistêmica e todos os supostos efeitos da dipirona estão relacionados ao 4-MAA ou a seus outros metabólitos ativos. Há apenas uma exceção: quando a dipirona é administrada por via intravenosa, ela é detectável no plasma por um curto período de tempo, mas nenhum de seus efeitos é observado dentro desse período de tempo (BACHMANN, 2018; LEVY, 2005).

Ainda no estudo de Ergün e *cols.* (ERGÜN, 2004) foi evidenciado que quanto menor o pH (mais ácido), a taxa de hidrólise aumenta dramaticamente, sugerindo que a hidrólise catalisada por ácido é o principal mecanismo para a hidrólise da dipirona, conforme observado nos resultados apresentados acima (Figura 7 (a) e (b)), e também nos resultados obtidos na validação do método analítico, sob a condição de hidrólise ácida (dados não mostrados).

Em pH 4,5 e 6,8 a extensão de hidrólise foi significativamente menor que em pH 1,2 (Tabela 13, $p < 0,0001$), sugerindo que com o aumento do pH, tanto a dipirona quanto o 4-MAA encontram-se totalmente ionizados (NASCIMENTO, 2006).

Às vezes, um pró-fármaco é usado em vez do composto ativo se há um problema com a solubilidade do metabólito ativo. No entanto, não é sabido de nenhum problema de solubilidade com o 4-MAA. Outra razão para o uso de um pró-fármaco é obter uma melhor estabilidade do que o metabólito ativo, que parece ser o caso da dipirona e do 4-MAA (ERGÜN, 2004).

Outra informação importante a ser extraída do ensaio de estabilidade é concernente ao método de doseamento em si: nos cromatogramas apresentados na Figura 7 é possível diferenciar a dipirona de seus produtos de degradação, provando que o método desenvolvido para o ensaio de solubilidade é específico e discriminativo, conforme preconizado pela Resolução-RDC nº 37/2011 (BRASIL, 2011).

Outrossim, o método de doseamento do IFA de dipirona sódica descrito na FB 6ª ed. (BRASIL, 2019) não é específico para o fármaco, pois trata-se de titulometria. Desta forma, não diferencia o IFA de seus possíveis produtos de degradação.

Neste sentido, o método de doseamento desenvolvido nesta tese se mostrou em consonância com a legislação acerca do ensaio de estabilidade, pois de acordo com o art. 9º, §5º da Resolução-RDC nº 37/2011 (BRASIL, 2011), “o método de quantificação deverá ser capaz de diferenciar o fármaco de eventuais produtos de degradação”.

Um método analítico quantitativo é dito específico e discriminativo quando é capaz de mensurar com exatidão o teor do insumo farmacêutico ativo, produtos de degradação e outros componentes de interesse, sem interferência (ANVISA, 2015).

E, segundo a Anvisa (ANVISA, 2015), a técnica de análise recomendada para desenvolvimento de métodos analíticos é a CLAE com detector de arranjo de fotodiodo (DAD). Depois de desenvolvido e validado em DAD, o método pode ser aplicado em detector UV. E o método desenvolvido no âmbito da presente tese obedeceu aos critérios indicados na legislação brasileira, e mais especificamente nas Resoluções RDC nº 53/2015 (BRASIL, 2015) e 166/2017 (BRASIL, 2017).

4.2.2 Determinação da solubilidade

A dose máxima administrada pode ser até 1 g, de acordo com a bula do medicamento de referência Novalgina® 500 mg comprimidos: “Comprimido 500 mg: adultos e adolescentes acima de 15 anos: 1 a 2 comprimidos até 4 vezes ao dia” (SANOFI-AVENTIS FARMACÊUTICA LTDA., 2016).

Critério de aceitação: a dipirona é considerada altamente solúvel se a dose máxima administrada oralmente (1 g) solubiliza-se completamente em 250 mL de cada meio em pH fisiológico (1,2; 4,5 e 6,8) a $(37,0 \pm 1,0)$ °C.

Conforme determinado pela legislação (Resolução-RDC nº 37/2011 (BRASIL, 2011) e Nota Técnica nº 003/2013/CEFAR/GTFAR/GGMED/Anvisa (BRASIL,

2013a)), o pH foi registrado no início e no final do experimento, ou seja, o pH inicial e final da solução saturada do fármaco. Os resultados são apresentados a seguir, para cada meio de pH fisiológico, a saber: meio pH 1,2, meio pH 4,5, e meio pH 6,8, respectivamente.

Os dados da verificação de pH no início e no final estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Verificação do pH no estudo de solubilidade do IFA dipirona nos meios pH 1,2, 4,5 e 6,8.

pH do meio (nominal)	pH inicial	pH final
1,2	1,18	5,11
4,5	4,51	5,92
6,8	6,82	6,56

Fonte: (Da autora, 2016).

Observou-se em pH 1,2 e 4,5, que este variou durante o experimento (de forma mais discreta em pH 4,5), confirmando a instabilidade do fármaco dipirona, e a formação em pH ácido do seu metabólito ativo, o 4-MAA. Este, por sua vez, como é uma base fraca ($pK_a = 4,76$) (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, 2018), levou o pH do meio para valores próximos ao seu pK_a (pH médio = 5,11 e 5,92, para pH 1,2 e 4,5, respectivamente), ultrapassando a capacidade de tamponamento do meio.

Este comportamento refletiu o que foi observado no ensaio de estabilidade das soluções (seção 4.2.1), em que ocorreu a degradação da dipirona, tanto no tempo 0 h como em 24 h, mais acentuadamente para o pH 1,2.

Já em pH 6,8, este não variou significativamente durante o experimento. Este comportamento não refletiu o que foi observado no ensaio de estabilidade das soluções (seção 4.3.1), mas indicou que as espécies químicas são estáveis neste pH (distante do pK_a da dipirona e do 4-MAA), possivelmente porque os compostos estão todos em sua forma desprotonada (> 98%) (NASCIMENTO, 2006), não contribuindo de forma significativa para a alteração de pH do meio.

Os resultados do estudo de estabilidade para o insumo dipirona sódica, em cada meio de pH fisiológico (1,2, 4,5 e 6,8), com o volume calculado necessário para solubilização da maior dose posológica por administração descrita em bula (1 g) são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Resultados de solubilidade para o IFA dipirona em diferentes meios de pH fisiológico (1,2, 4,5 e 6,8).

Amostras	Solubilidade média (mg/250mL)	DPR (%)	Volume necessário para solubilização (mL)
1,2	93334,7	4	2,7
4,5	114921,8	3	2,2
6,8	122158,8	5	2,0

Fonte: (Da autora, 2016).

O valor da solubilidade é dado pelo maior volume encontrado, que no caso do estudo de solubilidade da dipirona corresponde ao do meio de pH 1,2. Desta forma, o volume necessário (2,7 mL) para dissolver a dose máxima diária por administração descrita em bula (1 g) atende ao critério estabelecido, ou seja, o fármaco é altamente solúvel se sua maior dose administrada se solubiliza completamente em até 250 mL da solução tampão utilizada.

Mas, em contrapartida, o resultado foi discutível, pois o pH do meio não se manteve constante, da mesma forma que observado no ensaio de estabilidade, dando indícios de que a solubilidade determinada no teste deve ser atribuída principalmente ao 4-MAA e não somente à dipirona sódica.

4.2.3 Avaliação do estudo de solubilidade

Conforme a bula do medicamento de referência (Novalgina®) (SANOFI-AVENTIS FARMACÊUTICA LTDA., 2016), a maior dose administrada oralmente (posológica), em uma única administração, é de 1 g de dipirona sódica, o que corresponde à concentração de 4,0 mg/mL quando esta dose é solubilizada em 250 mL de meio.

Recapitulando, a dipirona sódica, fármaco ativo, apresentou os seguintes resultados, confirmando a alta solubilidade nos meios:

- em meio pH 1,2 (ácido clorídrico 0,1 mol/L), a concentração de 93.334,7 mg/250mL;
- em meio pH 4,5 (tampão acetato), a concentração de 114.921,8 mg/250mL;
- em meio pH 6,8 (tampão fosfato), a concentração de 122.158,8 mg/250mL.

O DPR de todas as replicatas para os meios pH 1,2 e pH 4,5 foi inferior a 5 %, estando de acordo com a Resolução-RDC nº 37/2011 (BRASIL, 2011). Por sua vez, o DPR das replicatas para o meio pH 6,8 foi de 5 %, não estando de acordo com a

legislação, e sendo motivo suficiente para reprovar totalmente o estudo de solubilidade.

Entretanto, por determinação do patrocinador do estudo de bioisenção da dipirona sódica comprimido simples de 500 mg, o estudo prosseguiu, sendo realizado o perfil de dissolução comparativo em três meios de pH fisiológico e a equivalência farmacêutica, cujos resultados e discussão encontram-se nas seções 4.3 e 4.4.

A alteração no pH inicial e final só foi observada no estudo de solubilidade, nos três meios de pH fisiológico, que é realizado com o insumo farmacêutico ativo puro (BRASIL, 2019). Não se pode afirmar com certeza, pois não foi feita a medição, mas o pH também deve ter se alterado no teste de estabilidade das soluções.

Ressalte-se que a variação de pH ocorre mesmo no meio que corresponde a solução tampão (pH 4,5 – tampão acetato), ultrapassando a capacidade tamponante do meio.

Isto é provável ser decorrente da mudança da entidade química: a dipirona sofre hidrólise em meio aquoso (reação retro-Mannich hidrolítica), resultado no surgimento do 4-MAA (LEVY, 1995; ZYLBER-KATZ, 1992; ROGOSCH, 2012).

A legislação brasileira diz somente que se deve medir e registrar o pH no início e no final do experimento (Resolução-RDC nº 37/2011, art. 9º, §6º) (BRASIL, 2011), mas em momento algum a Anvisa preconiza critério de aceitação para variação de pH inicial e final.

O guia M9 do *ICH* que se encontra em análise para implementação no Brasil (ICH, 2018), determina que:

- Além dos três meios de pH (1,2, 4,5 e 6,8), a solubilidade deve ser determinada também no valor do pKa do fármaco, se este estiver dentro da faixa de pH; e
- O pH do meio deve ser medido após a adição do fármaco e no final, ao se atingir o equilíbrio, a fim de assegurar que a medida da solubilidade é realizada no pH especificado, devendo o pH ser ajustado, se necessário.

Deve ser dada especial atenção a estes dois pontos preconizados pelo ICH, cuja legislação deverá ser internalizada no Brasil a partir de 2020, pois, para a dipirona a solubilidade também deveria ser determinada em pH = 3,77-3,90. Entretanto, como ela é um pró-fármaco, também haveria necessidade de se utilizar o pH = 4,76, que corresponde ao pKa do 4-MAA.

E os ajustes de pH se fazem necessários, pois em pH 1,2 e 4,5 observou grandes alterações das medições feitas após a adição do fármaco e ao final quando se atingiu o equilíbrio, ultrapassando a capacidade de tamponamento dos meios.

Contudo, abre-se uma outra discussão: para ajustar o pH do meio é necessário a adição de uma solução (geralmente, ácido clorídrico 0,1 mol/L), o que leva a uma mudança no volume de meio utilizado, e conseqüentemente altera o resultado da solubilidade encontrado.

Para a dipirona em si, esta alteração no volume de meio não impacta de forma significativa na solubilidade, pois tanto ela (dipirona) quanto seu metabólito (4-MAA) são altamente solúveis. Mas este procedimento terá um efeito significativo na solubilidade para fármacos que sejam limítrofes, podendo levar a resultados imprecisos.

4.3 Estudo de bioisenção de dipirona sódica 500 mg comprimidos - perfil de dissolução comparativo nos meios de pH fisiológico

Este teste fez parte do estudo de bioisenção da Dipirona Sódica 500 mg, comprimido simples, de uma indústria farmacêutica que não autorizou a divulgação de seu nome nem o do produto farmacêutico. Todavia, foi autorizado pela indústria a apresentação dos resultados do ensaio de perfil de dissolução comparativo nos meios de pH fisiológico nesta tese de doutorado.

De acordo com o art. 12, §2, inciso V da Resolução-RDC nº 37/2011 (BRASIL, 2011), o registro do pH no início e no final do experimento foi realizado e é apresentado em cada seção específica.

A seguir são apresentados os resultados dos perfis de dissolução comparativos nos três meios de pH fisiológico (1,2. 4,5 e 6,8). Ressalte-se que é mister a aprovação em cada uma das condições, tal como se observa, para que o medicamento seja considerado aprovado neste estudo, e cumpra parte dos requisitos para a bioisenção com base no SCB.

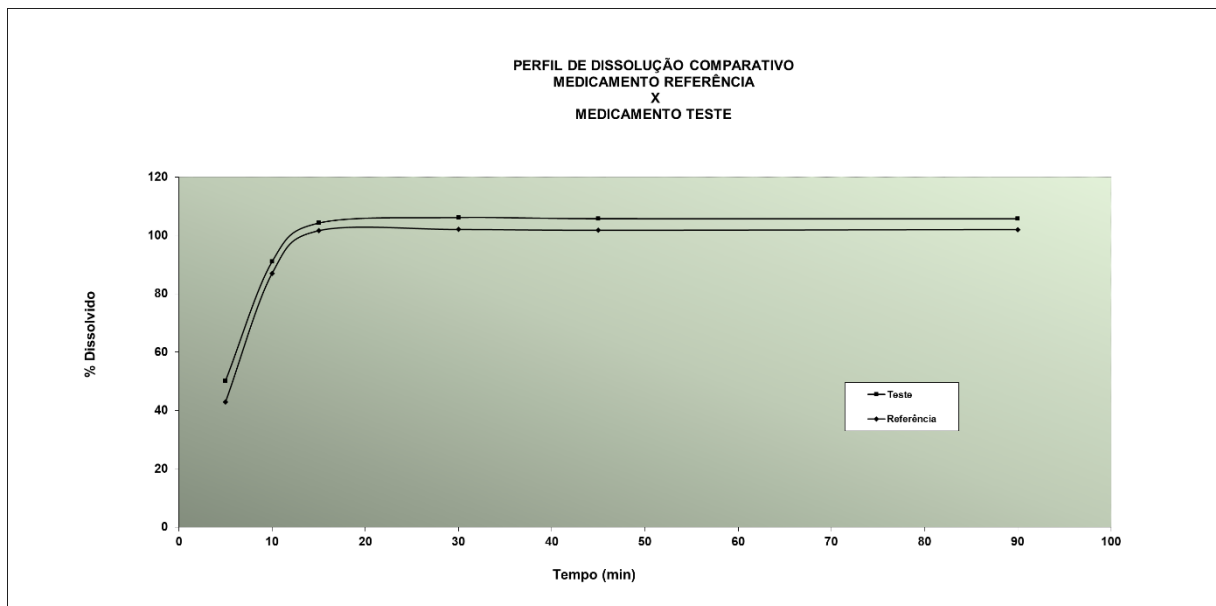
Os resultados dos perfis de dissolução em pH 1,2 dos medicamentos teste (Dipirona) e de referência (Novalgina®) (Tabela 16), e gráfico comparativo (Figura 8) são apresentados a seguir.

Tabela 16 – Resultados do perfil de dissolução comparativo em pH 1,2 para dipirona sódica comprimido simples de 500 mg- medicamento teste (Dipirona) e de referência (Novalgina®).

Medicamento Teste				Medicamento de Referência			
Tempo (min)	% diss med	dp	DPR (%)	Tempo (min)	% diss med	dp	DPR (%)
5	50,23	1,80	3,59	5	42,93	2,25	5,23
10	91,09	1,40	1,54	10	87,00	4,24	4,87
15	104,26	1,45	1,39	15	101,60	1,82	1,79
30	106,17	1,26	1,18	30	102,01	1,69	1,66
45	105,78	1,40	1,32	45	101,76	1,56	1,53
90	105,73	1,36	1,29	90	102,00	1,59	1,56

Fonte: (Da autora, 2015).

Figura 8 - Gráfico dos perfis de dissolução comparativo em pH 1,2 para dipirona sódica comprimido simples de 500 mg - medicamento teste (Dipirona) e de referência (Novalgina®).



Fonte: (Da autora, 2015).

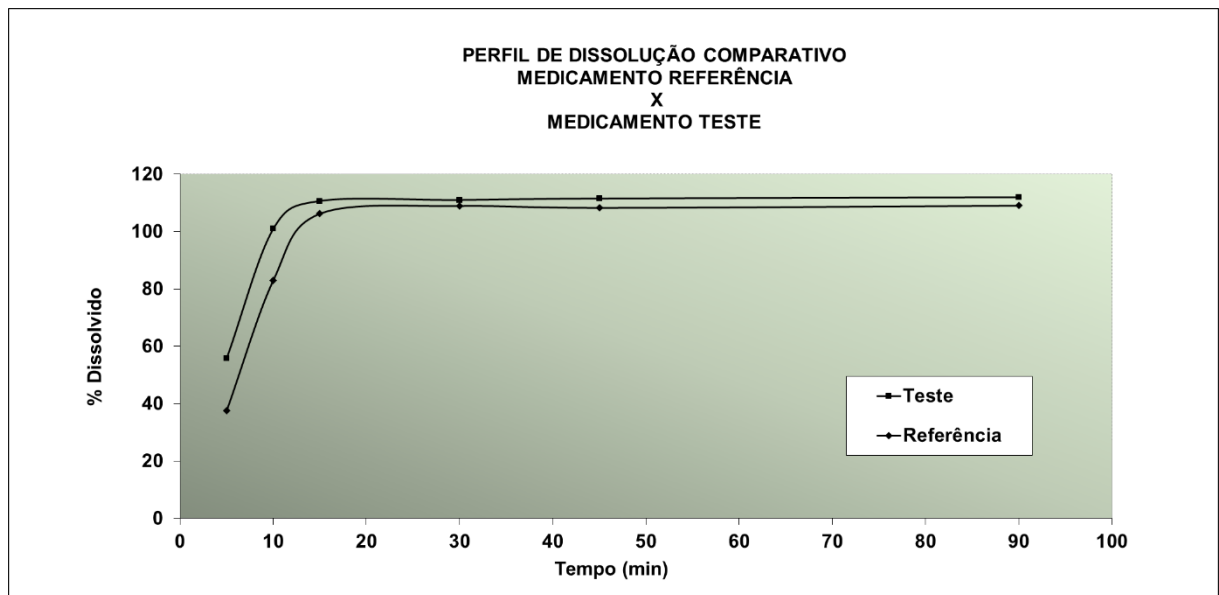
Os resultados dos perfis de dissolução em pH 4,5 dos medicamentos teste (Dipirona) e de referência (Novalgina®) (Tabela 17), e gráfico comparativo (Figura 9) são apresentados a seguir.

Tabela 17 - Resultados do perfil de dissolução comparativo em pH 4,5 para dipirona sódica comprimido simples de 500 mg - medicamento teste (Dipirona) e de referência (Novalgina®).

Medicamento Teste				Medicamento de Referência			
Tempo (min)	% diss med	dp	DPR (%)	Tempo (min)	% diss med	dp	DPR (%)
5	55,84	2,33	4,17	5	37,62	2,37	6,31
10	100,93	2,04	2,02	10	83,03	5,04	6,07
15	110,61	1,70	1,53	15	106,25	2,81	2,64
30	110,96	1,51	1,36	30	108,94	1,62	1,48
45	111,47	1,55	1,39	45	108,28	2,25	2,08
90	111,88	1,97	1,76	90	109,04	1,62	1,49

Fonte: (Da autora, 2015).

Figura 9 - Gráfico dos perfis de dissolução comparativo em pH 4,5 para dipirona sódica comprimido simples de 500 mg - medicamento teste (Dipirona) e de referência (Novalgina®).



Fonte: (Da autora, 2015).

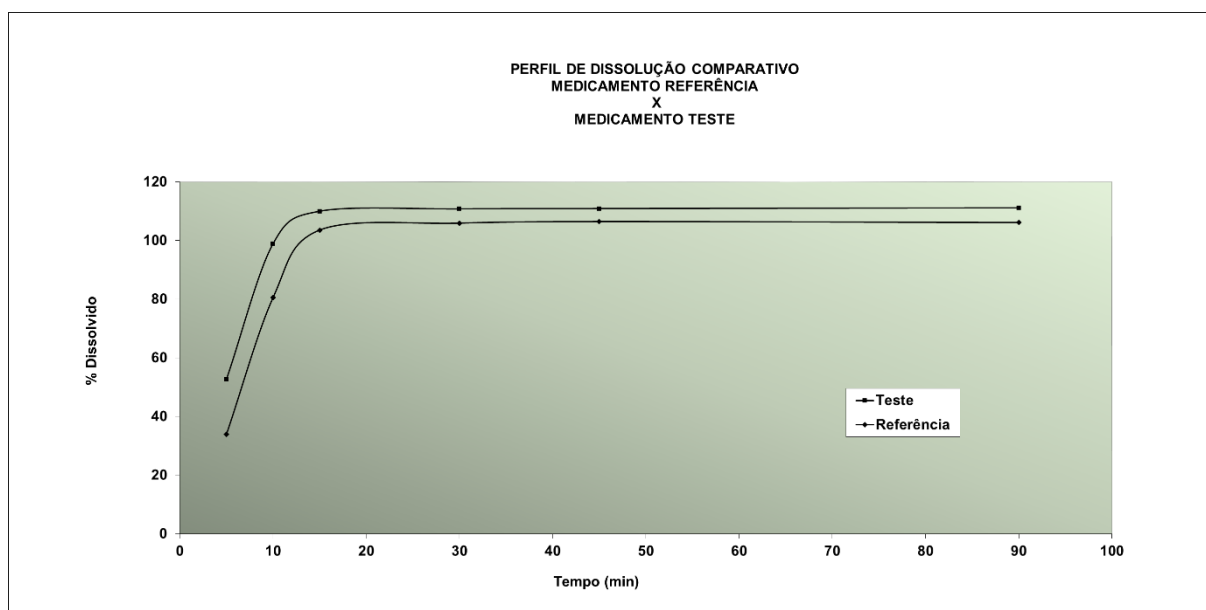
Os resultados dos perfis de dissolução em pH 6,8 dos medicamentos teste (Dipirona) e de referência (Novalgina®) (Tabela 18), e gráfico comparativo (Figura 10) são apresentados a seguir.

Tabela 18 - Resultados do perfil de dissolução comparativo em pH 6,8 para dipirona sódica comprimido simples de 500 mg - medicamento teste (Dipirona) e de referência (Novalgina®).

Medicamento Teste				Medicamento de Referência			
Tempo (min)	% diss med	dp	DPR (%)	Tempo (min)	% diss med	dp	DPR (%)
5	52,68	0,96	1,82	5	33,97	2,29	6,74
10	98,87	0,76	0,77	10	80,54	2,62	3,25
15	109,92	1,02	0,93	15	103,54	1,28	1,24
30	110,71	0,98	0,88	30	105,89	1,47	1,39
45	110,82	0,96	0,87	45	106,43	1,59	1,49
90	111,08	1,17	1,05	90	106,10	1,49	1,40

Fonte: (Da autora, 2015).

Figura 10 - Gráfico dos perfis de dissolução comparativo em pH 6,8 para dipirona sódica comprimido simples de 500 mg- medicamento teste (Dipirona) e de referência (Novalgina®).



Fonte: (Da autora, 2015).

Ambos os medicamentos alvo do estudo apresentaram uma dissolução muito rápida ($\geq 85\%$ do teor declarado em 15 minutos) nos meios de dissolução pH 1,2 (HCl 0,1 mol/L), pH 4,5 (tampão acetato) e pH 6,8 (tampão fosfato).

Entretanto, uma vez mais, tais resultados não expressam a real dissolução da dipirona sódica, pois como já visto no estudo de solubilidade, a dipirona é quase totalmente convertida em 4-MAA.

De acordo com a legislação (Resolução-RDC nº 37/2011), os medicamentos teste e de referência devem, inicialmente, ser analisados preferencialmente segundo sua monografia descrita na Farmacopéia Brasileira. Assim, o método quantitativo é o descrito para o teste de dissolução pontual descrito na monografia da dipirona na FB 6ª ed. (BRASIL, 2019), o qual consiste de técnica espectrofotométrica com leitura direta a 258 nm. Sabidamente, este comprimento de onda é o máximo de absorção da dipirona em meio ácido (AMÉRICO, 2004), mas a literatura relata a ocorrência de outra substância em pH ácido cujo máximo de absorção é a 240 nm.

Reunindo as informações sobre os resultados obtidos, infere-se que a dissolução observada a 258 nm seja um somatório da dipirona sódica e 4-MAA dissolvidos, não sendo possível por método espectrofotométrico quantificar precisamente as duas entidades químicas.

Uma forma indireta de se realizar esta quantificação, mas que continuaria não sendo precisa, seria fazer a leitura direta nos dois comprimentos de onda que correspondem aos pontos de máximo de absorção ($\lambda = 240 \text{ nm}$ e 258 nm). Contudo, mesmo assim, calculando-se o teor de dipirona e 4-MAA haveria um erro, pois as duas moléculas absorvem nos dois comprimentos de onda, não sendo possível discriminar com exatidão o grau de contribuição de cada uma.

Tabela 19 - Avaliação do pH antes e depois da execução do perfil de dissolução comparativo em pH 1,2, 4,5 e 6,8 para dipirona sódica comprimido simples de 500 mg- medicamento teste (Dipirona) e de referência (Novalgina®).

pH do meio de dissolução	Medicamento teste		Medicamento de Referência	
	pH inicial	pH final	pH inicial	pH final
pH 1,2	1,18	1,19	1,22	1,22
pH 4,5	4,57	4,59	4,55	4,57
pH 6,8	6,78	6,78	6,79	6,79

Fonte: (Da autora, 2015).

A verificação do pH do meio de dissolução antes e depois da realização do ensaio (Tabela 19) foi realizada, e a variação de pH foi inferior a 0,1 unidade de pH, não sendo significativa neste estudo em nenhum dos valores de pH avaliados.

Neste estudo não se observou uma alteração no pH tão significativa quanto no estudo de solubilidade, pois trabalhou-se com uma quantidade muito menor de dipirona: 0,56 mg/mL (comprimido de 500 mg / 900 mL de meio), contra 3,51 mg/mL

(175,67 mg do IFA dipirona / 50 mL de meio) na solubilidade, ou seja, cerca de 6 vezes menos.

Soma-se o fato deste ensaio ser realizado com o comprimido, ou seja, a dipirona não está isolada no meio de dissolução, mas contém os excipientes (cerca de 10 % do peso médio do comprimido), que segundo a bula do medicamento de referência (Novalgina®) são estearato de magnésio e macrogol 4000 (polietilenoglicol). O primeiro é praticamente insolúvel em água, e o segundo é solúvel em água, com pH entre 4,5 e 7,5, possivelmente sendo o responsável por auxiliar a manter o pH do meio.

4.4 Estudo de bioisenção de dipirona sódica 500 mg comprimidos – equivalência farmacêutica

Ao se dizer que dois medicamentos são equivalente farmacêuticos está se dizendo que o medicamento teste (Dipirona Sódica 500 mg, comprimido simples) e o medicamento de referência (Novalgina® 500 mg, comprimido simples) possuem a mesma forma farmacêutica (comprimido simples), a mesma via de administração (oral) e a mesma quantidade da mesma substância ativa (500 mg), e que podem ou não conter excipientes idênticos, desde que bem estabelecidos para a função destinada. Além disso, medicamento teste e referência devem

“(…) cumprir com os mesmos requisitos da monografia individual da Farmacopéia Brasileira, preferencialmente, ou com os de outros compêndios oficiais, normas ou regulamentos específicos aprovados/referendados pela Anvisa ou, na ausência desses, com outros padrões de qualidade e desempenho (...)” (BRASIL, 2010b).

Na Tabela 20 encontram-se os resultados dos testes físico-químicos realizados, com a respectiva especificação, para o medicamento teste e medicamento de referência.

O medicamento teste (Dipirona sódica 500 mg) e o medicamento de referência, Novalgina® 500 mg foram considerados equivalentes farmacêuticos, por ambos cumprirem integralmente com as especificações e critérios apresentados na monografia oficial da FB 6ª ed. (BRASIL, 2019) e pela Resolução-RDC nº 31/2010 (BRASIL, 2010a), no tocante ao estudo de equivalência farmacêutica.

Entretanto, cabe ressaltar que, diante dos resultados obtidos nesta tese até este ponto, apesar de serem farmacopeicos, os métodos de teor (titulação com iodo) e de doseamento da etapa quantitativa da dissolução (espectrofotometria com leitura direta) não são específicos e seletivos, ou seja, são incapazes de diferenciar a dipirona de eventuais produtos de degradação (4-MAA, por exemplo) (BRASIL, 2011), ou mesmo detectar alterações de atributos farmacêuticos que possam afetar o desempenho do medicamento *in vivo* (MARQUES, 2013).

Uma possível solução para este problema seria utilizar o método de teor desenvolvido para o estudo de solubilidade, nesta tese, para realizar o doseamento do fármaco nestes dois ensaios, após se proceder à validação do método para a forma farmacêutica comprimido.

Deve-se salientar que tal proposta não foi efetivamente levada à frente por motivos econômicos, explicitados anteriormente, ou seja: o elevado custo do padrão (inviável para a realidade acadêmica de uma instituição pública) e a quantidade necessária para se realizar uma nova validação, bem como o consumo dos demais insumos e materiais.

A documentação do estudo de equivalência farmacêutica, neste caso, seria composta pelo protocolo, todos os dados brutos, e relatório tanto da validação do método de teor quanto da equivalência propriamente dita.

Tabela 20 - Resultados dos ensaios físico-químicos realizados na estudo de equivalência farmacêutica para a dipirona sódica comprimido simples de 500 mg- medicamento teste (Dipirona) e de referência (Novalgina®).

Testes	Especificação	Medicamento teste	Medicamento referência
Aspecto	Informativo	Comprimido circular, plano, de coloração levemente amarelada, sulcado em uma das faces, e na outra face apresenta a inscrição XXX. *	Comprimido circular, plano, de coloração branca, sulcado em uma das faces. Possui a inscrição "OEP" na face sulcada.
Identificação	A) Após a adição de gotas de peróxido de hidrogênio no pó dos medicamentos teste e referência, desenvolve-se uma coloração azul que desaparecerá rapidamente passando a vermelha intensa. B) Após a adição de gotas de persulfato de potássio no pó dos medicamentos teste e referência, desenvolve-se uma coloração amarela após 5 minutos de reação.	A) Ao gotear peróxido de hidrogênio sobre os medicamentos teste e referência há o aparecimento da coloração azul mudando rapidamente para coloração vermelha. B) Ao adicionar gotas de persulfato de potássio sobre os medicamentos teste e referência há o aparecimento da coloração azul escuro que passa para coloração marrom e que após 5 minutos desenvolve coloração amarela.	A) Ao gotear peróxido de hidrogênio sobre os medicamentos teste e referência há o aparecimento da coloração azul mudando rapidamente para coloração vermelha. B) Ao adicionar gotas de persulfato de potássio sobre os medicamentos teste e referência há o aparecimento da coloração azul escuro que passa para coloração marrom e que após 5 minutos desenvolve coloração amarela.
Peso médio	Informativo	640,5 mg	529,3 mg
Variação de peso	$\pm 5,0 \%$ (Teste: 608,5 – 672,3 mg) (Ref.: 502,9 – 555,8 mg)	627,2 – 649,4 mg	517,5 – 540,8 mg
Desintegração	Máximo de 30 minutos em água com disco.	Último a desintegrar: 04 min e 09 seg	Último a desintegrar: 04 min e 23 seg
Dureza	Informativo	202 N	94 N
Friabilidade	Máximo 1,5 %	0,04 %	0,29 %
Teor	95,0 – 105,0 %	98,9 %	95,1 %
Diferença entre teores	Máximo 5 %	3,8 %	
Dissolução	Q = 70 % em 45 minutos. Critério: Todas as 6 unidades testadas devem apresentar $Q \geq 5 \%$, no primeiro estágio (E1). No segundo estágio (E2), a média de 12 unidades deve ser $\leq Q$ e nenhuma unidade menor que $Q-15 \%$.	Estágio E1 Mín.: 99 %	Estágio E1 Mín.: 96 %
Uniformidade de doses unitárias – Uniformidade de conteúdo	VA = Máximo de 15,0	Média = 98,7 % DPR = 0,9 % VA = 2,3	Média = 95,3 % DPR = 1,5 % VA = 6,7

* A indústria farmacêutica produtora do medicamento teste não autorizou a divulgação de seu nome nem o do produto farmacêutico, por esta razão o resultado do ensaio de aspecto foi descaracterizado.

Fonte: (Da autora, 2015).

4.5 Avaliação da bioisenção com base no sistema de classificação biofarmacêutica

Num mundo ideal, o acesso a medicamentos pode ser facilitado por programas globais de desenvolvimento farmacêutico, mas para tanto há necessidade de que as agências regulatórias e as indústrias farmoquímicas e farmacêuticas ao redor do mundo interajam e haja um consenso quanto às exigências para registrar e comercializar medicamentos inovadores e genéricos (HANDOO, 2012).

Contudo, uma estratégia regulatória que vá de encontro às necessidades das agências, com as peculiaridades de cada país, é o principal desafio para as indústrias que visam o mercado global.

Uma abordagem que vem ganhando peso nas últimas décadas em prol da harmonização internacional dos dossiês de registro de medicamentos é o Sistema de Classificação Biofarmacêutica, que permite a isenção de estudos de biodisponibilidade relativa / bioequivalência para medicamentos novos¹, genéricos² e similares³.

O primeiro guia regulatório que introduziu o uso do SCB para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (somente fármacos de classe I) foi a *FDA* em 2000, seguido pelo *EMA* em 2001 (COOK, 2015). Depois a *EMA* (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2010), a *Health Canada* (HEALTH CANADA, 2014) e a *OMS* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015) publicaram guias possibilitando bioisentar os fármacos de classe I e III.

1 Medicamento novo: é aquele constituído de princípio ativos sintético e semi-sintético novo no país, podendo estar o insumo farmacêutico associados ou não (ANVISA, 2018).

2 Medicamento genérico: é aquele que contém o mesmo princípio ativo, na mesma dose e forma farmacêutica, é administrado pela mesma via e com a mesma posologia e indicação terapêutica do medicamento de referência, apresentando eficácia e segurança equivalentes à do medicamento de referência podendo, com este, ser intercambiável. A intercambialidade, ou seja, a segura substituição do medicamento de referência pelo seu genérico, é assegurada por testes de equivalência terapêutica, que incluem comparação *in vitro*, através dos estudos de equivalência farmacêutica e *in vivo*, com os estudos de bioequivalência apresentados à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2018).

3 Medicamento similar: é aquele que contém o mesmo ou os mesmos princípios ativos, apresenta mesma concentração, forma farmacêutica, via de administração, posologia e indicação terapêutica, e que é equivalente ao medicamento registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária, podendo diferir somente em características relativas ao tamanho e forma do produto, prazo de validade, embalagem, rotulagem, excipientes e veículo, devendo sempre ser identificado por nome comercial ou marca (ANVISA, 2018).

Em maio de 2015, a *FDA* revisou seu Guia do SCB para incluir os fármacos de classe III (THE UNITED STATES OF AMERICA, 2015b), e em julho do mesmo ano a agência americana colocou em consulta pública um guia que fornecia recomendações para teste de dissolução *in vitro* e critérios de especificação para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata contendo fármacos de classe I e III (THE UNITED STATES OF AMERICA, 2015a). Em seguida, em 2015-2016, muitos países adotaram as regras próprias ou editadas pela OMS, e em 2017 a própria OMS revisou sua norma.

No âmbito nacional, em 2002, a Anvisa publicou o primeiro “Guia para isenção e substituição de estudos de bioequivalência” (Resolução-RE nº 481/2002) (BRASIL, 2002), que trouxe o conceito de bioisenção em função da forma farmacêutica. Em 2003, introduziu no arcabouço jurídico sanitário a bioisenção para diferentes dosagens de um mesmo medicamento (Resolução-RE nº 897/2003) (BRASIL, 2003a). E, em 2011, com a publicação da Resolução-RDC nº 37 (BRASIL, 2011), houve a introdução da bioisenção baseada no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), mas somente para os fármacos de classe I pertencentes à lista de fármacos candidatos à bioisenção presente na IN nº 10/2016 (BRASIL, 2016) (ARAÚJO, 2010).

Daí a se buscar uma harmonização mundial do entendimento relacionado à bioisenção com base no SCB de fármacos de classe I e III foi uma questão de sensibilidade dos principais formadores de opinião e das principais agências regulatórias ao redor do mundo.

Neste sentido, desde junho de 2018 está em consulta pública mundial o guia M9 do ICH que trata justamente da bioisenção com base no SCB (ICH, 2018).

O Brasil, através da Anvisa, participa desta consulta pública no âmbito do procedimento denominado “Consulta Regional ICH”, e o prazo para recebimento de comentários se encerrou em 28/01/2019. A previsão de que a consulta para o guia M9 do ICH seja finalizada é 2019, com emissão de sua versão final, e então temos um prazo variável em cada país membro para sua adoção e internalização. A princípio, no Brasil, o prazo para adoção do guia M9 se encerrará em 2021, conforme a Agenda Regulatória da Anvisa vigente atualmente (ANVISA, 2017).

O ponto relevante na edição do guia M9 é que ele fornece recomendações para apoiar a classificação biofarmacêutica de medicamentos, e recomendações para apoiar a dispensa de estudos de bioequivalência. Isso resultará na harmonização das diretrizes regionais atuais e apoiará o desenvolvimento global de medicamentos.

Assim, analisou-se os critérios estabelecidos por cinco organismos internacionais regulatórios (*FDA*, *EMA*, *Health Canada*, *OMS* e *ICH*) frente aos requisitos da Anvisa, buscando-se pontuar as principais diferenças e o que já se encontra pacificado, e estes dados são sumarizados na Tabela 21, a seguir, e posteriormente apresenta-se uma discussão sobre os pontos mais relevantes (seção 4.5.1).

Tabela 21 - Comparativo dos critérios para a bioisenção baseada no SCB de acordo com a *FDA*, a *EMA*, o *HEALTH CANADA*, a *OMS*, o *ICH* e a *Anvisa*

Atributo / Critério	Parâmetro	FDA (2017)	EMA (2010)	HEALTH CANADA (2014)	OMS (2017)	ICH (2018)	Anvisa (2011)
Tipo de bioisento considerado pela agência		I e III	I e III	I e III	I e III	I e III	21 fármacos da classe I
Comparação da formulação com o medicamento de referência	Tipo	<ul style="list-style-type: none"> - Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata; - Aplicável a equivalentes farmacêuticos; - Pode ser aplicável a alternativas farmacêuticas com justificativa. 	<ul style="list-style-type: none"> - Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata; - Formulações orodispersíveis sem absorção na cavidade oral; - Aplicável a equivalentes ou alternativas farmacêuticas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata; - Formulações orodispersíveis sem absorção na cavidade oral e que são administradas com água. 	<ul style="list-style-type: none"> - Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata; - Aplicável a equivalentes ou alternativas farmacêuticas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata; - Suspensões desenhadas para liberar o fármaco na circulação sistêmica; - Formulações orodispersíveis sem absorção na cavidade oral e que são administradas com água. 	<ul style="list-style-type: none"> - Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata.
	Exclusão	<ul style="list-style-type: none"> - Qualquer produto que seja absorvido na cavidade oral; - Fármacos de janela terapêutica estreita. 	<ul style="list-style-type: none"> - Formulações bucais, sublinguais e orodispersíveis absorvidas na cavidade oral; - Fármacos de janela terapêutica estreita. 	<ul style="list-style-type: none"> - Formulações bucais e sublinguais absorvidas na cavidade oral; - Fármacos de janela terapêutica estreita. 	<ul style="list-style-type: none"> - Comprimidos orodispersíveis são elegíveis se não há absorção sublingual ou bucal; - Fármacos de janela terapêutica estreita. 	<ul style="list-style-type: none"> - Fármacos com absorção bucal ou sublingual; - Comprimidos orodispersíveis são elegíveis se não há absorção sublingual ou bucal; - Fármacos de janela terapêutica estreita. 	<ul style="list-style-type: none"> - Medicamentos com absorção na cavidade oral; - medicamentos de liberação modificada.
	Excipiente aceitáveis	<p>Classe I:</p> <ul style="list-style-type: none"> - excipientes usuais em quantidade consistente com a função pretendida; - não contém nenhum excipiente que afete a taxa ou a extensão de absorção do fármaco. <p>Classe III:</p> <ul style="list-style-type: none"> - qualitativamente os mesmos e quantitativamente muito semelhantes 	<p>Classe I:</p> <ul style="list-style-type: none"> - quali e quanti os mesmos para excipiente críticos que afetam a biodisponibilidade. <p>Classe III:</p> <ul style="list-style-type: none"> - quali e quanti os mesmos para excipiente críticos que afetam a biodisponibilidade; - quali os mesmos e quantitativamente muito semelhantes para os demais excipientes. 	<p>Classe I:</p> <ul style="list-style-type: none"> - excipientes bem estabelecidos na quantidade usual; - quali os mesmos e quanti similar. <p>Classe III:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Qualitativamente os mesmos e quantitativamente muito semelhantes. 	<p>Classe I:</p> <ul style="list-style-type: none"> - excipientes bem estabelecidos na quantidade usual; - excipientes críticos não devem diferir quali ou quantitativamente. <p>Classe III:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Qualitativamente os mesmos e quantitativamente muito semelhantes. 	<p>Classe I:</p> <ul style="list-style-type: none"> - são permitidas diferenças quali e quantitativas, exceto excipientes que podem afetar a absorção; - excipientes que afetam a absorção: mesmo quali e semelhante quanti. <p>Classe III:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Quali os mesmos e quanti semelhantes. <p>Obs.: Há tabela de referência no Guia.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Excipientes bem estabelecidos, em quantidades compatíveis com a função pretendida; - Qualitativamente os mesmos, e quantitativamente compatíveis com a função.

Tabela 21 - Comparativo dos critérios para a bioisenção baseada no SCB de acordo com a *FDA*, a *EMA*, o *HEALTH CANADA*, a *OMS*, o *ICH* e a Anvisa (continuação).

Atributo / Critério	Parâmetro	FDA (2017)	EMA (2010)	HEALTH CANADA (2014)	OMS (2017)	ICH (2018)	Anvisa (2011)
Comparação da formulação com o medicamento de referência	IFA	Alternativas farmacêuticas não são aceitas para ANDA; Para pró-drogas, o sítio de conversão determina se a permeabilidade deve ser determinada para a pró-droga ou para o fármaco ativo.	Não elegível se for éster, éter, isômero, mistura de isômeros, complexo ou derivados diferentes.	Não discutido.	Não discutido.	Não aceito for éster, éter, isômero, mistura de isômeros, complexo ou derivados diferentes. Pró-drogas podem ser consideradas.	Não discutido.
	pH	Dentro da faixa de 1 a 6,8. pH = pKa; pH = pKa + 1; pH = pKa - 1; pH = 1 e 6,8	Dentro da faixa de 1 a 6,8 (preferivelmente 1,2; 4,5 e 6,8, mais 1 < pKa < 6,8)	No mínimo, pH 1,2, 4,5 e 6,8	Dentro da faixa de 1,2 a 6,8.	Dentro da faixa de 1,2 a 6,8, mais 1,2 < pKa < 6,8.	pH 1,2, 4,5 e 6,8
Condições de solubilidade	Método	<i>Shake-flask</i> ou outro justificado.	<i>Shake-flask</i> ou outro justificado.	<i>Shake-flask</i> ou outro justificado.	<i>Shake-flask</i> ou outro justificado.	<i>Shake-flask</i> ou outro justificado.	<i>Shake-flask</i> ou outro justificado.
	Volume	Solúvel em 250 mL ou menos.	Solúvel em 250 mL.	Solúvel em 250 mL ou menos.	Solúvel em 250 mL ou menos.	Solúvel em 250 mL ou menos.	Solúvel em 250 mL ou menos.
	Temperatura	(37,0 ± 1,0) °C	(37,0 ± 1,0) °C	(37,0 ± 1,0) °C	(37,0 ± 1,0) °C	(37,0 ± 1,0) °C	(37,0 ± 1,0) °C
	Dose	Maior concentração comercial	Maior dose terapêutica individual	Maior dose terapêutica individual	Maior dose terapêutica individual	Maior dose terapêutica individual	Maior dose terapêutica individual
	Medição do pH	Após a adição do fármaco	Antes e depois da adição do fármaco	Antes e depois da adição do fármaco	Não especificado	Após a adição do fármaco e no final do equilíbrio.	No início e no final.
Origem dos dados	Patrocinador	Patrocinador	Não especificado	Não especificado	Não especificado	Patrocinador ou artigos científicos indexados	

Tabela 21 - Comparativo dos critérios para a bioisenção baseada no SCB de acordo com a *FDA*, a *EMA*, o *HEALTH CANADA*, a *OMS*, o *ICH* e a Anvisa (continuação).

Atributo / Critério	Parâmetro	FDA (2017)	EMA (2010)	HEALTH CANADA (2014)	OMS (2017)	ICH (2018)	Anvisa (2011)
Como medir a permeabilidade intestinal	Primeira escolha	<ul style="list-style-type: none"> - Alta permeabilidade se F_{abs} em humanos $\geq 85\%$ de uma dose administrada; - Os dados de F_{abs} em humanos baseados em estudos de biodisponibilidade absoluta ou balanço de massas; - Estudos de perfusão intestinal <i>in vivo</i> em humanos; - Estudos de perfusão intestinal <i>in vivo</i> ou <i>in situ</i> em animais; - Estudos de permeação <i>in vitro</i> usando tecido intestinal excisado de humano ou animais; - Estudos de permeação <i>in vitro</i> através de monocamadas de células epiteliais. 	<ul style="list-style-type: none"> - Alta permeabilidade se F_{abs} em humanos $\geq 85\%$; - Os dados de F_{abs} em humanos baseados em estudos de biodisponibilidade absoluta ou balanço de massas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Alta permeabilidade se F_{abs} em humanos $\geq 85\%$; - Os dados de F_{abs} em humanos baseados em estudos de biodisponibilidade absoluta ou balanço de massas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Alta permeabilidade se F_{abs} em humanos $\geq 85\%$; - Os dados de F_{abs} em humanos baseados em estudos de biodisponibilidade absoluta ou balanço de massas; - Estudos de perfusão intestinal <i>in vivo</i> em humanos são aceitáveis; - Ausência de degradação e metabolismo no TGI deve ser assegurado se os dados de BD são derivados de estudos de balanço de massas com radioisótopos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Alta permeabilidade se F_{abs} em humanos $\geq 85\%$; - Os dados de F_{abs} em humanos baseados em estudos de biodisponibilidade absoluta ou balanço de massas; - Estudos de perfusão intestinal <i>in vivo</i> em humanos são aceitáveis; - Permeabilidade determinada em células Caco-2; - Ausência de instabilidade no TGI. 	Não discutido
	Informações de suporte	Estudos de permeabilidade <i>in vivo</i> ou <i>in vitro</i> publicados na literatura científica	<ul style="list-style-type: none"> - Investigações de permeabilidade <i>in vitro</i>; - F similar entre várias formulações dentro da mesma rota. 	<ul style="list-style-type: none"> - Investigações de permeabilidade <i>in vitro</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> - Perfusão <i>in vivo</i> ou <i>in situ</i> em modelos animais; - Permeação <i>in vitro</i> x monocamada de células epitaliais. 	<ul style="list-style-type: none"> - Demonstração de farmacocinética proporcional à dose em uma faixa que inclui a maior dose terapêutica. 	Não discutido
	Origem dos dados	Patrocinador ou rotulagem do medicamento de referência; a literatura pode ser considerada, mas sempre com um papel de suporte.	Patrocinador ou fonte confiável	Patrocinador ou literatura.	Não especificado	Não especificado	Não discutido

Tabela 21 - Comparativo dos critérios para a bioisenção baseada no SCB de acordo com a *FDA*, a *EMA*, o *HEALTH CANADA*, a *OMS*, o *ICH* e a Anvisa (continuação).

Atributo / Critério	Parâmetro	FDA (2017)	EMA (2010)	HEALTH CANADA (2014)	OMS (2017)	ICH (2018)	Anvisa (2011)
Linearidade da farmacocinética in vivo x perfil de dissolução		Linear	Linear	Linear	Linear	Linear	Não mencionado
- Critério para dissolução rápida e completa; - Comparação do perfil de dissolução	Taxa de dissolução	Rápida / muito rápida	Rápida / muito rápida	Rápida / muito rápida	Rápida / muito rápida	Rápida / muito rápida	Rápida / muito rápida
	Extensão de dissolução e tempo máximo	Classe I: ≥85% em 30 min Classe III: ≥85% em 15 min	Classe I: ≥85% em 30 min Classe III: ≥85% em 15 min	Classe I: ≥85% em 30 min Classe III: ≥85% em 15 min	Classe I: ≥85% em 30 min Classe III: ≥85% em 15 min	Classe I: ≥85% em 30 min Classe III: ≥85% em 15 min	≥85% em 30 min
	Aparato	Cesta (aparato I) a 100 rpm; Pá (aparato II) a 50 rpm, ou a 75 rpm quando apropriadamente justificado.	Geralmente cesta a 100 rpm ou pá a 50 rpm.	Cesta (aparato I) a 100 rpm; Pá (aparato II) a 50 rpm, ou a 75 rpm quando apropriadamente justificado.	Cesta a 100 rpm ou pá a 75 rpm.	Cesta a 100 rpm ou pá a 50 rpm.	Cesta a 100 rpm ou pá a 50 rpm.
	Volume	500 mL, ou 900 mL quando apropriadamente justificado	900 mL ou menos	900 mL ou menos	900 mL ou menos	900 mL ou menos	900 mL
	Meio	3 pH (HCl 0,1 mol/L ou fluido gástrico simulado sem enzima; 4,5; 6,8 ou fluido intestinal simulado). Uso de tensoativos é desencorajado. Sem solventes orgânicos.	3 pH (1,0 - 1,2 ou fluido gástrico simulado sem enzima; 4,5; 6,8 ou fluido intestinal simulado). Sem tensoativo. Sem solventes orgânicos.	3 pH (1,0 - 1,2 ou fluido gástrico simulado sem enzima; 4,5; 6,8 ou fluido intestinal simulado). Sem tensoativo.	3 pH (1,2; 4,5; 6,8) Sem tensoativo.	3 pH (1,2; 4,5; 6,8). Pode ser utilizada água purificada. Sem tensoativo. Sem solventes orgânicos.	pH 1,2 (HCl 0,1 mol/L ou fluido gástrico simulado sem enzimas), pH 4,5 e pH 6,8 (ou fluido intestinal simulado sem enzimas). Sem tensoativo.
	Enzima	Sim, em caso de cápsula gelatinosa mole	Sim, em caso de cápsula gelatinosa mole	Sim, em caso de cápsula gelatinosa mole ou comprimido com filme de gelatina	Sim, em caso de cápsula gelatinosa mole ou comprimido com filme de gelatina	Sim, em caso de cápsula gelatinosa mole ou comprimido com filme de gelatina	Sim, em caso de cápsula gelatinosa mole

Tabela 21 - Comparativo dos critérios para a bioisenção baseada no SCB de acordo com a *FDA*, a *EMA*, o *HEALTH CANADA*, a *OMS*, o *ICH* e a Anvisa (continuação).

Atributo / Critério	Parâmetro	FDA (2017)	EMA (2010)	HEALTH CANADA (2014)	OMS (2017)	ICH (2018)	Anvisa (2011)
- Critério para dissolução rápida e completa; - Comparação do perfil de dissolução	Unidade testada	Concentração (1 unidade posológica) para a qual a bioisenção é requerida	Concentração (1 unidade posológica) para a qual a bioisenção é requerida	Concentração (1 unidade posológica) para a qual a bioisenção é requerida	Concentração (1 unidade posológica) para a qual a bioisenção é requerida	Concentração (1 unidade posológica) para a qual a bioisenção é requerida	Concentração (1 unidade posológica) para a qual a bioisenção é requerida
	Número de unidades	12	12	12	12	12	12
	Tempo de amostragem	Recomendado: 5, 10, 15, 20 e 30 min	Recomendado: 10, 15, 20, 30 e 45 min	Recomendado: 5, 10, 15, 20 e 30 min	Recomendado: 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 min	Devem ser os mesmos tempos para teste e referência.	De acordo com o método de dissolução descrito na FB ou em compêndio aceito pela Anvisa.
	Se ≥85% em 15 min	Não é necessário teste estatístico	Não é necessário teste estatístico	Não é necessário teste estatístico	Não é necessário teste estatístico	Não é necessário teste estatístico	Não é necessário teste estatístico
	Se um produto é rápido e o outro é muito rápido	f2 ou outro teste estatístico	f2 ou outro teste adequado se as condições não forem cumpridas	f2	f2 ou critério estatístico equivalente	f2	f2
Bioisenta outras doses se uma atende ao critério do SCB		Não discutido	Bioisenção deve ser feita concentração a concentração.	Bioisenção deve ser feita concentração a concentração.	Não discutido	Não discutido	Não discutido

Fonte: (Da autora, 2019).

4.5.1 Comparação dos requisitos gerais da bioisenção com base no SCB

Nas subseções a seguir discutiremos os principais pontos relevantes encontrados na comparação dos critérios para a bioisenção baseada no SCB de acordo com a *FDA*, a *EMA*, o *HEALTH CANADA*, a *OMS*, o *ICH* e a Anvisa, cujos dados foram sumarizados na Tabela 21.

4.5.1.1 Classe do SCB aceita

É consenso entre as cinco autoridades regulatórias que são candidatos a bioisenção com base no SCB os medicamentos constituídos por quaisquer fármacos pertencentes às classes I e III, devendo a indústria submeter dossiê com todos os ensaios e as informações requeridas.

O SCB é uma estrutura científica para classificar fármacos com base em sua solubilidade aquosa e permeabilidade intestinal (AMIDON, 1995). Aqueles pertencentes à classe I são candidatos naturais à bioisenção, por serem altamente solúveis e altamente permeáveis, e que exibirem rápida dissolução *in vitro* (> 85% em 30 min) (BLUME, 1999; CHENG, 2004).

Já para as formas farmacêuticas sólidas orais que apresentam dissolução rápida em todas as condições de pH fisiológico para fármacos de alta solubilidade (Classe III), uma vez que podem comportar-se *in vivo* como uma solução oral, espera-se que a permeabilidade da membrana seja o passo limitante na absorção do fármaco. Portanto, a cinética de absorção do trato gastrointestinal seria governada por fatores biofarmacêuticos e fatores fisiológicos, e não por fatores de formulação, uma vez que os excipientes não têm efeitos relevantes no trânsito gastrointestinal e na permeabilidade do fármaco (YU, 2002). Diante disto, a bioisenção com base no SCB foi estendida aos medicamentos de Classe III (TSUME, 2010).

Por outro lado, a Anvisa somente aceita como candidatos à bioisenção os fármacos pertencentes à classe I do SCB e que estejam relacionados na Instrução Normativa nº 10/2016, incluindo a dipirona (BRASIL, 2016), não dando margem à apresentação de resultados de estudos de permeabilidade intestinal.

Desta forma, a Anvisa adotou uma postura extremamente protecionista e conservadora, expondo seres humanos a estudos *in vivo* desnecessários, e não deixando a cargo da indústria a comprovação da classificação do fármaco.

4.5.1.2 Comparabilidade entre formulação teste e de referência

Em geral, o SCB aplica-se a formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata. Entretanto, a OMS abrange também sólidos orais de liberação prolongada, o que traz um fator complicador para a indústria: a OMS possui o programa de pré-qualificação de produtores de medicamentos, e a bioisenção com base no SCB é aceita neste programa, mas o registro do medicamento obtido desta forma poderá não ser aceito em todos os países signatários da OMS (PAHO, 2011; TSUME, 2010; WHO, 2014).

A Health Canadá e o ICH não se posicionam sobre a aplicabilidade da bioisenção a alternativas ou equivalentes farmacêuticos, e as demais autoridades, exceto a Anvisa, orientam que este tipo de comparação é possível, desde que devidamente justificada.

Por outro lado, todas (menos a Anvisa) aceitam formulações orodispersíveis, desde que estas não apresentem absorção em nenhuma extensão na cavidade oral.

Para os fármacos de classe I, os excipientes devem ser bem estabelecidos, em quantidades compatíveis com a função pretendida (mas são permitidas diferenças quali e quanti), e os que são considerados críticos por afetarem a biodisponibilidade devem ser quali- e quantitativamente os mesmos. Para os fármacos de classe III, devem ser os mesmos, afetando ou não a biodisponibilidade (ICH, 2018; KUBBINGA, 2014; PARR, 2016).

Para o caso da dipirona, por se tratar de um fármaco pertencente à classe I, tanto os excipientes do medicamento de referência (estearato de magnésio e polietilenoglicol) como do medicamento teste (estearato de magnésio, povidona, talco e amido) não são considerados críticos, pois não afetam o perfil de absorção.

A única agência que discute a questão dos pró-fármacos é a *FDA*, estabelecendo que a permeabilidade depende do mecanismo e do local (anatômico) de conversão para fármaco. Se a conversão do pró-fármaco em fármaco ocorre predominantemente após a permeação da membrana intestinal, a permeabilidade do pró-fármaco deve ser medida. Quando esta conversão ocorre antes da permeação intestinal, a permeabilidade do fármaco deve ser determinada. A dissolução e os dados de solubilidade tanto do pró-fármaco como do fármaco são relevantes. Coloca ainda que a indústria deve consultar a *FDA* antes de aplicar a abordagem do SCB a

medicamentos de liberação imediata que contenham pró-fármacos (THE UNITED STATES OF AMERICA, 2015a).

A dipirona, como mencionado anteriormente, é um pró-fármaco, que é hidrolizado no TGI para formar o seu metabólito ativo, o 4-MAA. Os dados são de que esta conversão ocorre antes da permeação intestinal, mais precisamente no estômago (HINZ, 2007; LAHMANN, 2016), de modo que a permeabilidade *in vitro* deveria ser determinada para o 4-MAA (fármaco), mas não se eximindo, neste caso em específico, de determinar também para a dipirona (pró-fármaco).

4.5.1.3 Solubilidade

A Anvisa é a única agência que não determina que a solubilidade também seja determinada no valor de $\text{pH} = \text{pKa}$, desde que este esteja compreendido dentro da faixa de pH fisiológico (1,2 a 6,8). Todas as demais preconizam, pelo menos, os três valores de pH mais o pKa do fármaco.

No caso da dipirona, diante dos resultados experimentais obtidos, seria recomendado que se incluísse mais dois pontos de pH a serem avaliados: 3,77 e 4,76, referentes aos pKa da dipirona e do 4-MAA, respectivamente.

Uma discussão que está praticamente pacífica é em relação à dose a ser testada no ensaio de solubilidade: a FDA determina que deve ser a maior dose disponível comercialmente, enquanto as demais agências, inclusive a Anvisa, estabelecem que deve ser a maior dose terapêutica individual, ou seja, a maior dose posológica a ser tomada em administração única.

Para a dipirona, esta questão não apresenta relevância, pois sua maior dose posológica de uma única tomada (1 g) é a mesma que sua maior dose disponível comercialmente (1 g), mas deve ser levada em consideração para aqueles fármacos que apresentam uma solubilidade no limite de aceitação e que as duas abordagens de “dose” diferem significativamente na quantidade total do fármaco (CARDOT, 2016).

Com relação à medição do pH durante o ensaio, é praticamente pacífico que se deva medi-lo antes da adição do fármaco, após a adição (no tempo 0 h) quando se obtém a solução saturada, e ao final do experimento, após as 24 h. Isto é importante para se monitorar a estabilidade do fármaco em solução, e se a sua dissolução não afeta a capacidade tamponante do meio.

Caso se observe variação de pH, o fármaco não apresenta estabilidade nos valores de pH testados, e por conseguinte, não se pode determinar a solubilidade do mesmo. Um exemplo disto é a própria dipirona, que é um pró-fármaco que se hidrolisa a 4-MAA, que possui propriedades físicas e físico-químicas diversas, de modo que não se consegue manter o valor de pH no ensaio de estabilidade, e, portanto, a solubilidade medida é inverídica, pois não corresponde à dipirona, mas sim ao 4-MAA, como discutido anteriormente, na seção 4.3.

De acordo com o *ICH* (ICH, 2018), a estabilidade deve ser determinada previamente à solubilidade, e se o fármaco degrada mais de 10 % durante as 24 h do ensaio, a solubilidade não pode ser adequadamente determinada e o fármaco não pode ser classificado adequadamente, e desta forma não pode ser aplicada a bioisenção com base no SCB. Assim, deve ser utilizado na solubilidade método de doseamento validado indicativo de estabilidade, o que foi executado para o estudo da dipirona.

4.5.1.4 Permeabilidade intestinal

A medida de permeabilidade intestinal tem sido amplamente utilizada como um dos principais fatores que regem tanto a taxa e/ou extensão da absorção do fármaco (F_{abs}) em humanos após a administração oral. Extensas pesquisas científicas estabeleceram que existe uma boa correlação entre a permeabilidade jejunal humana (P_{eff}) medida por técnicas de perfusão de passagem única e a fração de dose absorvida de uma forma farmacêutica de liberação imediata e rápida dissolução (LENNERNÄS, 2007).

A melhor forma para determinar F_{abs} é a partir de estudos farmacocinéticos ou de balanço de massa em humanos, entretanto a complexidade e o custo de realizar esses estudos são muito altos, além de exporem voluntários a IFAs radiomarcados para validação da alta recuperação de fármacos e metabólitos (DAHAN, 2012).

É real a complexidade por trás e os cuidados que devem ser tomados com esta medição de permeabilidade *in vivo*. A permeabilidade intestinal humana, considerando todo o intestino humano, é mais complexa do que geralmente reconhecido, e isto pode levar a um julgamento errado em relação a F_{abs} e P_{eff} em vários contextos, inclusive no desenvolvimento e regulamentação de medicamentos (LENNERNÄS, 2007).

Determinar a extensão da absorção em humanos com base em estudos de balanço de massa usando radioatividade total na urina não leva em consideração a extensão da degradação de um fármaco no fluido GI antes da permeação da membrana intestinal.

Documentar o fato de que a perda de fármacos do trato gastrointestinal surge da permeação da membrana intestinal, em vez de um processo de degradação, ajuda a estabelecer a permeabilidade. A estabilidade no TGI pode ser documentada usando fluidos gástricos e intestinais simulados. A obtenção de líquidos gastrintestinais de seres humanos requer intubação e pode ser difícil. A estabilidade no TGI pode, portanto, ser documentada usando fluidos gástricos e intestinais simulados, ou, com justificativa adequada, outros meios biorelevantes (THE UNITED STATES OF AMERICA, 2017).

Os fluidos biorrelevantes devem ser incubados a 37°C por um período representativo do contato *in vivo* da substância com estes fluidos, ou seja, uma hora no fluido gástrico e três horas no líquido intestinal. As concentrações do fármaco devem então ser determinadas usando um método validado de análise indicadora de estabilidade. Degradação significativa (> 10 %) de um medicamento neste estudo poderia sugerir instabilidade potencial. (ICH, 2018).

A partir destas premissas, é consenso que um fármaco é considerado altamente permeável quando a F_{abs} em humanos é maior ou igual a 85 % (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2010; HEALTH CANADA, 2014; ICH, 2018; THE UNITED STATES OF AMERICA, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015), a partir de estudos de bioequivalência absoluta ou balanço de massas.

Os demais métodos (perfusão intestinal *in vivo* em humanos, perfusão intestinal *in vivo* ou *in situ* em animais, permeação *in vitro* com tecidos intestinais excisados, permeação *in vitro* com células epiteliais) são aceitos como primeira escolha ou como dados de suporte.

De acordo com o ICH (ICH, 2018), se forem usados estudos de balanço de massas ou estudos *in vitro* com células Caco-2, devem ser fornecidos dados adicionais para documentar a estabilidade do fármaco no TGI, exceto que $\geq 85\%$ da dose seja recuperada como fármaco inalterado na urina.

A Anvisa não trata da determinação deste parâmetro, pois, como dito anteriormente, ela elenca 21 fármacos candidatos à bioisenção com base no SCB, e que todos apresentam alta permeabilidade.

4.5.1.5 Perfil de dissolução *in vitro*

Em linhas gerais, as investigações relacionadas com o medicamento devem assegurar propriedades de liberação imediata e comprovar a semelhança entre os produtos sob investigação, isto é, o teste e o de referência apresentam uma dissolução *in vitro* semelhante sob condições de pH experimental fisiologicamente relevantes. No entanto, isso não estabelece uma correlação *in vitro/in vivo*.

A dissolução *in vitro* deve ser investigada, em geral, dentro do intervalo de pH 1 - 6,8 (pelo menos pH 1,2, 4,5 e 6,8). Entretanto, ensaios adicionais podem ser requeridos em valores de pH nos quais o fármaco apresenta solubilidade mínima, ou seja, no valor do pKa.

A FDA (2017), a EMA (2010) e o Health Canada (2014) mencionam que se for observada a formação de cone, usando o aparato pá, para os produtos teste e de referência, a velocidade pode ser aumentada para 75 rpm, ou 100 rpm no aparato cesta. No entanto, os resultados com a velocidade mais baixa também devem ser relatados. Já a OMS (2015) determina que se for usado pá, a velocidade deve ser 75 rpm, independente de se observar a formação de cone.

Como por definição, um fármaco classe I ou classe III é altamente solúvel, não é aceito um aumento da velocidade de rotação sem justificativa, pois o objetivo é comparar a formulação na condição mais padrão. Se as condições do teste precisarem ser modificadas para refletir melhor a rápida dissolução *in vivo* (por exemplo, uso de uma velocidade de rotação diferente), essas modificações podem ser justificadas comparando a dissolução *in vitro* com dados de absorção *in vivo* (por exemplo, um estudo de biodisponibilidade relativa usando um solução aquosa simples como produto de referência) (CARDOT, 2016). Outros problemas potenciais que podem justificar o ajuste na velocidade de agitação incluem a presença de excipientes insolúveis ou efeito cone para produtos de teste e de referência.

No estudo de perfil de dissolução comparativo (nos três meios de dissolução) e na dissolução do estudo de equivalência farmacêutica para a dipirona sódica, foi empregado o aparato pá com velocidade de rotação de 50 rpm, a qual é preconizada por todas as agências regulatórias, exceto a OMS.

Todos os desvios dos métodos de dissolução oficiais devem ser justificados, inclusive o volume do meio de dissolução usado. A FDA (THE UNITED STATES OF AMERICA, 2017) determina que o volume do meio de dissolução seja de 500 mL, o

que favorece a análise de medicamentos de baixa dosagem. A definição do volume deve levar em conta também as condições *sink*, e se tais condições forem necessariamente consideradas para determinar se um sólido oral de liberação imediata tem dissolução rápida ou muito rápida, não é apropriado limitar o volume a 500 mL para o ensaio de dissolução *in vitro* (CARDOT, 2016).

Os tempos de amostragem que constam nos guias são recomendações, indo de 5 a 60 minutos. Contudo, o ponto principal é que seja seguido o método de dissolução para a forma farmacêutica, e que os tempos de amostragem sejam rigorosamente os mesmos para medicamento teste e de referência.

O ICH (ICH, 2018) menciona que pode ser utilizada água purificada como meio de dissolução, em alguns países. Entretanto, a água purificada como meio de dissolução tem alguns inconvenientes. Por exemplo, suas características podem mudar durante o teste devido à influência do fármaco ou excipientes. Além disso, a água pode não fornecer condições *sink* para fármacos pouco solúveis. As condições *sink* são definidas como pelo menos três vezes o volume necessário para obter uma solução saturada da dose testada (BOU-CHACRA, 2017).

4.5.2 Bioisenção com base no SCB da dipirona sódica

No estudo de bioisenção com base no Sistema de Classificação Biofarmacêutica da dipirona sódica realizado no Centro de Equivalência Farmacêutica da Fundação Oswaldo Cruz (EQFAR 040 – Serviço de Equivalência e Farmacocinética) obteve-se como resultados:

- (1) O medicamento teste e o medicamento de referência foram considerados equivalentes farmacêuticos, pois ambos cumpriram com as especificações e critérios apresentados no protocolo do estudo, preconizados pela FB 6ª edição e pela Resolução-RDC nº 31/2010;
- (2) Com relação ao perfil de dissolução comparativo, ambos os medicamentos, teste e de referência, apresentaram cinética de dissolução muito rápida ($\geq 85\%$ dissolvidos em até 15 minutos) nos três meios de dissolução (pH 1,2, pH 4,5 e pH 6,8);
- (3) Para o estudo de solubilidade do insumo farmacêutica ativo, os critérios estabelecidos na Resolução-RDC nº 37/2011, art. 9, §4 (a estabilidade do fármaco deverá ser avaliada em todas as condições experimentais, observando-se a duração

total do estudo), não foram cumpridos, pois as amostras do fármaco dipirona sódica mostraram-se instáveis no ensaio de estabilidade em cada um dos meios dentro da faixa de pH fisiológico (de 1,2 a 6,8) em temperatura de $(37,0 \pm 1,0)$ °C.

Diante destes resultados, o estudo de bioisenção baseada no SCB da dipirona sódica 500 mg foi reprovado, pois não basta ao fármaco fazer parte da relação de candidatos à bioisenção (Instrução Normativa nº 10/2016) (BRASIL, 2016), mas sim ser aprovado nos três estudos (equivalência farmacêutica, perfil de dissolução comparativo e solubilidade do IFA), pois “o não atendimento integral a todos os critérios estabelecidos implicará reprovação da solicitação de bioisenção” (BRASIL, 2011).

E como o parecer final foi insatisfatório, o estudo não foi submetido à análise da Anvisa, e este fato gerou um viés regulatório, pois, segundo a Agência, para que um fármaco seja incluído na relação de candidatos à bioisenção ele deve possuir “ausência de evidências documentadas de bioinequivalência” (BRASIL, 2016), e a dipirona apresenta claramente dados de sua não estabilidade no estudo de solubilidade, o que a excluiria pacificamente do rol de candidatos à bioisenção com base no SCB.

Contudo, apesar de ser um estudo reprovado, ele foi de grande valia, pois permitiu avaliar a real capacidade da dipirona ser isentada de estudos de bioequivalência no Brasil e no mundo, e pontuar em que aspectos a legislação sanitária, em especial a brasileira, é omissa por não prever a possibilidade de se estar trabalhando com um pró-fármaco, e os desdobramentos deste fato.

Considerando as perspectivas futuras de internalização do guia M9 do ICH, e o disposto nos outros guias que serviram como referência para este trabalho, a dipirona pode ser um pró-fármaco candidato à bioisenção com base no SCB, mas não deixando de lado o seu metabólito ativo, o 4-MAA.

Uma proposta, para fins de submissão do dossiê de registro nas principais agências regulatórias mundiais, e futuramente na Anvisa, para o estudo de bioisenção com base no Sistema de Classificação Biofarmacêutica para a dipirona sódica é apresentar não somente os dados referentes ao medicamento e ao fármaco, mas também para o 4-metil-amino-antipirina, a saber:

- Ensaio de solubilidade (em pH 1,2, pH 4,5 e pH 6,8, e nos pKa da dipirona e 4-MAA – 3,9 e 4,76, respectivamente), comprovando a estabilidade em cada um dos valores de pH, para o fármaco dipirona e o 4-MAA;
- Ensaio de permeabilidade (permeação *in vitro* em células Caco-2), para a dipirona (IFA) e o 4-MAA;
- Perfil de dissolução comparativo (em pH 1,2, pH 4,5 e pH 6,8, e nos pKa da dipirona e 4-MAA – 3,9 e 4,76, respectivamente), para o medicamento dipirona; e
- Equivalência farmacêutica para a dipirona (medicamento teste *versus* de referência).

4.5.3 Considerações gerais sobre a isenção de estudos de bioequivalência *in vivo*

Quando esta tese foi iniciada, postulava-se discutir tão somente a posição das principais agências regulatórias quanto à bioisenção com base no SCB, e a dipirona sódica face aos principais requisitos.

A bioequivalência é considerada uma das principais questões no desenvolvimento e registro de medicamentos genéricos em todo o mundo. No entanto, os regulamentos e a jurisdição variam de país para país e de continente para continente.

Isso não só traz complicações ao processo de registro de medicamentos genéricos, mas também pode impedir comparações entre produtos registrados ou comercializados em diferentes partes do mundo. Como a base científica subjacente para considerar um novo medicamento genérico como sendo seguro e eficaz é a mesma, parece razoável que os requisitos e procedimentos regulatórios sejam semelhantes entre as diferentes regiões e/ou países.

Além disso, considerações éticas devem motivar os cientistas reguladores a colaborar com a intenção de harmonizar critérios regulatórios em todo o mundo, a fim de evitar a repetição desnecessária de estudos devido a requisitos divergentes, e assim minimizar a exposição ao medicamento em seres humanos.

A harmonização ao redor do mundo pode ser alcançada através de uma melhor compreensão dos princípios científicos e expectativas de diferentes autoridades reguladoras.

Neste sentido, a Rede sobre Biodisponibilidade e Biofarmácia (BABP), no âmbito da Federação Europeia de Ciências Farmacêuticas (EUFEPS), lançou uma

Iniciativa Global de Harmonização da Bioequivalência (GBHI) há vários anos. E em março de 2015 ocorreu a primeira conferência internacional, que foi a primeira de uma série de encontros organizados pela EUFEPS/BABP, em colaboração com a Associação Americana de Cientistas Farmacêuticos (*American Association of Pharmaceutical Scientists - AAPS*) sob o GBHI (CHEN, 2018).

O encontro proporcionou um fórum para cientistas farmacêuticos da academia, indústria e agências reguladoras terem discussões abertas sobre questões selecionadas de bioequivalência, incluindo a bioisenção com base no SCB, na esperança de identificar pontos em comum e chegar a uma visão harmonizada sobre esses tópicos (CHEN, 2019).

Uma questão relevante que foi discutida neste fórum é se o fármaco ou o(s) metabólito(s) devem ser medidos para avaliação de bioequivalência (ou para a isenção de bioequivalência) quando o fármaco original é um pró-fármaco ou quando o composto sofre extração pré-sistêmica (CHEN, 2019). Neste sentido, a *FDA* orienta que um metabólito primário deve ser medido se for formado substancialmente por metabolismo pré-sistêmico (primeira passagem, parede intestinal ou metabolismo do lúmen intestinal) e contribuir significativamente para a segurança e/ou eficácia do produto (THE UNITED STATES OF AMERICA, 2013).

Há um movimento mundial, na última década, de harmonização dos guias regulatórios, seguindo o consenso científico e permitindo que fármacos classe III sejam candidatos à bioisenção. Com isto, mais de 50% dos medicamentos administrados por via oral da Lista de Medicamentos Essenciais da Organização Mundial da Saúde são atualmente elegíveis para submissão de registro por este meio. As monografias de fármacos candidatos à bioisenção (publicadas pela Federação Farmacêutica Internacional - *FIP*) (DRESSMAN, 2018), apresentam uma avaliação completa do risco-benefício para medicamentos individuais, estão disponíveis para mais de 25% desses princípios ativos, com o objetivo a longo prazo de cobrir todos os medicamentos essenciais (HOFSSÄSS, 2019).

Questões não resolvidas que surgiram de exemplos relatados de resultados falso-negativos e falso-positivos na literatura exigem mais ajustes nos requisitos regulatórios. Possíveis soluções para resolver esses problemas são o uso de modelagem e simulação e/ou testes *in vitro* biorrelevantes refinados, os quais são mais capazes de discriminar entre formas farmacêuticas com desempenho desigual

in vivo, potencialmente permitindo que fármacos da classe II do SCB selecionados sejam fármacos candidatos à bioisenção (HOFSSÄSS, 2019).

Neste sentido, tem-se o guia M9 do *ICH*, em consulta pública mundial, e que a Anvisa, após a publicação do documento final aprovado, pretende editar legislação específica sobre a bioisenção com base no SCB nos próximos 2 anos. O guia vem harmonizar os principais pontos com relação ao estudo de bioisenção, mas deixa algumas lacunas, a serem preenchidas localmente pela legislação nacional e que precisam ser avaliados pela Anvisa:

- a) Passa-se a ter como fármacos candidatos à bioisenção qualquer um classificado nas classes I e III, transferindo-se para a indústria a responsabilidade de apresentar documentos comprobatórios da condição do fármaco e do medicamento;
- b) Para a determinação da solubilidade, o pH deve ser ajustado se necessário, e a questão principal é como não afetar a concentração e o volume de meio. Não esquecendo que o fármaco tem que ser estável em todos os meios, que são pelo menos 4: pH 1,2, pH 4,5, pH 6,8, e $\text{pH}=\text{pK}_a$;
- c) Uma das formas de se determinar a permeabilidade é utilizando métodos *in vitro*, validados, com células Caco-2. Por hora, no Brasil, os centros de equivalência farmacêutica não detém este *know-how* e os centros de pesquisa não cumprem os requisitos regulatórios e de qualidade exigidos para tal. Há que se buscar uma solução para este problema, não criando obstáculos aos interesses da indústria, mas preservando-se a segurança, a eficácia e a qualidade dos medicamentos;
- d) Existem dados de permeabilidade obtidos de métodos com células Caco-2 *in vitro* ou estudo de perfusão *in situ* que conduzem a uma classificação errônea no SCB. Deverá ser avaliado como gerenciar estes casos, e o possível impacto regulatório e de saúde pública decorrente dos mesmos.

5 CONCLUSÃO

A presente tese se propôs a analisar o cenário regulatório, mundial e brasileiro, no tocante a isentar fármacos de estudos de biodisponibilidade / bioequivalência *in vivo* tendo por base o Sistema de Classificação Biofarmacêutica descrito por Amidon e colaboradores (AMIDON, 1995). Tendo como exemplo o estudo de bioisenção da dipirona sódica, comprimido simples de 500 mg, avaliou-se os entraves mais relevantes a aplicabilidade deste tipo de bioisenção em função da realidade legislativa, científica e tecnológica vigente, tanto no Brasil, quanto nas principais regiões do mundo.

O método de teor do IFA dipirona sódica, desenvolvido e validado para ser empregado no estudo de solubilidade, mostrou-se robusto e de fácil execução, além de seletivo e específico. Assim, ele pode ser extrapolado para doseamento do fármaco em formas farmacêuticas, como o comprimido simples e a solução oral, desde que previamente validado para estas formas farmacêuticas, e ser inserido na rotina tanto de órgãos fiscais como no controle de qualidade, permitindo agilidade na fiscalização e na liberação de lotes industriais, com resultados confiáveis e reprodutíveis. Além disso, um método validado dentro dos parâmetros regulatórios, enseja sua candidatura a integrar o rol de monografias oficiais da Farmacopeia Brasileira.

A dipirona é reconhecidamente um pró-fármaco, e faz-se mister que a legislação tenha um olhar diferenciado neste caso, e desta forma a parte analítica seja capaz de quantificar tanto a dipirona como seus metabólitos, em especial o 4-MAA, e identificar a contribuição das espécies para os fenômenos observados.

No estudo de solubilidade, há a degradação da dipirona e alteração do equilíbrio, do gradiente e do pH, havendo saturação do meio com o principal produto da hidrólise, o 4-MAA. O que também pode ser observado no estudo de perfil de dissolução, inferindo-se que o comportamento da dipirona e do 4-MAA influenciam os resultados, mas de uma forma não mensurável frente aos parâmetros do método farmacopeico, e considerando-se a presença dos excipientes do comprimido.

Com relação ao estudo de equivalência farmacêutica, o resultado foi satisfatório, demonstrando um desenvolvimento farmacêutico de qualidade, por parte da indústria patrocinadora, já que é um estudo comparativo entre duas formulações, sendo uma a referência nacional.

Este trabalho abre um espaço para reflexão, no cenário brasileiro, dos critérios da bioisenção baseada no SCB, de forma a ter uma legislação aberta aos fármacos de classe I e III, mas com responsabilidade dividida entre a indústria farmacêutica e farmoquímica, os centros de equivalência farmacêutica e bioequivalência, e a área de pesquisa em demonstrar que tais fármacos atendem aos requisitos internacionais de bioisenção.

É essencial para que esta abordagem regulatória seja bem-sucedida, e consiga efetivamente produzir resultados palpáveis, em especial na área de saúde pública e vigilância sanitária, que a Anvisa esteja aberta ao diálogo com o setor regulado, com os olhos e ouvidos voltados para as inovações e orientação da academia, e sem perder o foco na sua missão institucional: “promover a proteção da saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e consumo de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária” (ANVISA, 2019).

O primeiro passo rumo à harmonização da legislação brasileira de bioisenção com base no Sistema de Classificação Biofarmacêutica já foi dado com a participação efetiva da Anvisa no processo de discussão e aprovação do guia M9 do ICH. Em seguida, a Agência, junto com os demais atores do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, deverá internalizar os preceitos e critérios ali descritos através de um novo marco regulatório.

REFERÊNCIAS

ABDOU, H. M. **Dissolución, bioavalailability and bioequivalence**. Easton: Mack Printing, 1989. p. 554.

ABURJAI, T. *et al.* Second derivative ultraviolet spectrophotometry and HPTLC for the simultaneous determination of vitamin C and dipyrone. **Pharmazie**, v. 55, n. 10, p. 751-754, 2000.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Agenda regulatória 2017-2020**. Brasília: Anvisa, 2017. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/2017-2020>. Acesso em: 20 jan. 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Conceitos e definições de medicamentos**. Brasília: Anvisa. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/medicamentos/conceitos-e-definicoes>. Acesso em: 17 fev. 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Guia para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos**. Brasília: Anvisa, 2015. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2738062/Perfil+e+produtos+de+degrada%C3%A7%C3%A3o+em+medicamentos.pdf/c18a4857-9a5c-4292-a1bf-07af6cad6902?version=1.0>. Acesso em: 18 dez. 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Institucional**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/institucional>. Acesso em: 10 jun. 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Recomendações para realização de ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (FFSOLI)**. Brasília: Anvisa. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/353599/recomenda_dissolucao2.pdf/46895c55-9e66-416b-acb6-713e8addf779. Acesso em: 17 fev. 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Medicamentos - guia nº 14, versão 1. **Guia de dissolução aplicável a medicamentos genéricos, novos e similares**. Brasília: Anvisa, 2018. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3364628/Proposta+de+Guia+de+Dissolu%C3%A7%C3%A3o++06.04.2018.pdf/c15476e5-82aa-402f-aa95-24bf246dccc0>. Acesso em: 17 fev. 2018.

AGUNDEZ, J. A. *et al.* Determination of aminopyrine, dipyrone and its metabolites in urine by high-performance liquid chromatography. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 16, n. 3, p. 316-322, 1994.

ALBUQUERQUE, J. S. *et al.* Determination of dipyrone in pharmaceutical products by flow injection analysis with potentiometric detection. **Analytical Sciences**, n. 5, v. 19, p. 691-694, 2003. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/analsci/19/5/19_5_691/_pdf/-char/en. Acesso em: 17 fev. 2018.

ALTUN, M. L. HPLC method for the analysis of paracetamol, caffeine and dipyron. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 521-528, 2002.

AMÉRICO, M. A.; MOSSIN, S. A. G.; NISHIYAMA, P. Perfil de fármacos por espectrofotometria no ultravioleta. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, n. 4, p. 257-259, 2008.

AMIDON, G. L. *et al.* 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, p. 413-420, 1995. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1023/A%3A1016212804288>. Acesso em: 24 ago. 2013.

ANAND, O. *et al.* Dissolution Testing for generic drugs: an FDA perspective. **The AAPS Journal**, v. 13, n. 3, 2011.

ANDRADE, M. P. Aspectos atuais do uso da dipirona no tratamento da dor. **Prática Hospitalar**, n. 7, v. 40, p. 111-118, 2005.

ARAÚJO, L. U. *et al.* Medicamentos genéricos no Brasil: panorama histórico e legislação. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 28, p. 480-492, 2010.

ASMARDI, G.; JAMALI, F. High-performance liquid chromatography of dipyron and its active metabolite in biological fluids. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 277, p. 183-189, 1983.

AULTON, M. E.; TAYLOR, K. M. G. (org.). **Aulton's pharmaceuticals: the design and manufacture of medicines**. 5. ed. England: Elsevier Ltd., 2018.

BACHMANN, F. *et al.* N-demethylation of N-methyl-4-aminoantipyrine, the main metabolite of metamizole. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 120, p. 172-180, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.05.003>. Acesso em: 15 dez. 2018.

BANAKAR, U. V. **Pharmaceutical dissolution testing**. New York: Marcel Dekker, 1992.

BASAK, G. W.; DROZD-SOKOŁOWSKA, J.; WIKTOR-JEDRZEJCZAK, W. Update on the incidence of metamizole sodium-induced blood dyscrasias in Poland. **Journal of International Medical Research**, v. 38, n. 4, p. 1374-1380, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/147323001003800419>. Acesso em: 15 mai. 2019.

BELAL, F. Simultaneous polarographic determination of ascorbic acid and dipyron in pharmaceutical preparations. **Electroanalysis**, v. 4, n. 5, p. 589-593, 1992.

BENET, L. Z. The role of BCS (Biopharmaceutics Classification System) and BDDCS (Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System) in drug development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 1, p. 34-42, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jps.23359>. Acesso em: 15 dez. 2018.

BENET, L. Z., BROCCATELLI, F., OPREA, T. I. BDDCS applied to over 900 drugs. **The AAPS Journal**, v. 13, n. 4, p. 519–547, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1208/s12248-011-9290-9>. Acesso em: 15 jan. 2019.

BICALHO, A. B. *et al.* Análise de qualidade por doseamento espectrofotométrico ultravioleta/visível (UV/VIS) e titulação por oxirredução de dipirona sódica comprimidos 500 mg. **Revista Científica da Faminas**, v. 12, n. 2, 2017.

BIRKETT, D. J. Generics – equal or not? **Australian Prescriber**, v. 26, n. 4, p. 85-87, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.18773/austprescr.2003.063>>. Acesso em: 12 nov. 2018.

BLUME, H. H.; SCHUG, B. S. The biopharmaceutics classification system (BCS): Class III drugs — better candidates for BA/BE waiver? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 2, p. 117-121, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(99\)00076-7](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(99)00076-7). Acesso em: 24 nov. 2018.

BOU-CHACRA, N. *et al.* Evolution of choice of solubility and dissolution media after two decades of Biopharmaceutical Classification System. **The AAPS Journal**, v. 19, n. 4, p. 989-1001, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0085-5>. Acesso em: 24 nov. 2018.

BONAMICI, Denise. **Sistema de classificação biofarmacêutica e bioisenções**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Edital de Chamamento nº 6, de 24 de setembro de 2018. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 set. 2018. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=530&pagina=1&data=27/09/2018&totalArquivos=231>. Acesso em: 12 nov. 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, 6. ed. Anvisa: Brasília, DF. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 10, de 29 de setembro de 2016. Determina a publicação da “Lista de fármacos candidatos à bioisenção baseada no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB)” e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 set. 2016. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=98&data=30/09/2016>. Acesso em: 30 set. 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nota Técnica nº 003/2013/CEFAR/ GTFAR/GGMED/ANVISA**. Dispõe sobre a avaliação da solubilidade de fármacos e o desenvolvimento de métodos de dissolução para estudos de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução comparativo, e dá outras providências. Brasília, 2013. 6p. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/medicamentos/equivalencia-farmacologica/nota-tecnica-oficios>. Acesso em: 24 ago. 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 19 abr. 2010. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=19/04/2010&jornal=1&pagina=94&totalArquivos=148>. Acesso em: 24 ago. 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 22 mai. 2012. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=93&data=22/05/2012>. Acesso em: 24 ago. 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 31, de 11 de agosto de 2010. Dispõe sobre a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 ago. 2010. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=37&data=12/08/2010>. Acesso em: 24 ago. 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 37, 6 de julho de 2009. Trata da admissibilidade das Farmacopéias estrangeiras. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 8 jul. 2009. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=40&data=08/07/2009>. Acesso em: 05 jul. 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 37, 3 de agosto de 2011. Dispõe sobre o guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 5 ago. 2011. Disponível em: <http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/anvisa/109151-37.html>. Acesso em: 02 jul. 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 53, de 04 de dezembro de 2015. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 07 dez. 2015. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=48&data=07/12/2015>. Acesso em: 02 abr. 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 58, de 20 de dezembro de 2013. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 dez. 2013. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/>

imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=127&data=23/12/2013. Acesso em: 24 ago. 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 25 jul. 2017. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=87&data=25/07/2017>. Acesso em: 24 ago. 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RE nº 481, de 19 de março de 2002. Determinar a publicação do "Guia para isenção e substituição de estudos de bioequivalência. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 mar. 2002. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=116&data=20/03/2002>. Acesso em: 24 ago. 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RE nº 897, de 29 de maio de 2003. Determinar a publicação do "Guia para isenção e substituição de estudos de bioequivalência. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=54&data=02/06/2013>. Acesso em: 24 ago. 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=54&data=02/06/2013>. Acesso em: 24 ago. 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RE nº 1.170, de 19 de abril de 2006. Determina a publicação do Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 abr. 2006. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=101&data=24/04/2006>. Acesso em: 24 ago. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 3.916, de 30 de outubro de 1998. Aprova a Política Nacional de Medicamentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 nov. 1998. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998/prt3916_30_10_1998.html. Acesso em: 24 ago. 2013.

BROWN, P. R. High-performance liquid chromatography. Past developments, present status, and future trends. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 995A-1008A, 1990. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/ac00218a001>. Acesso em: 14 nov. 2018.

BROWN, P.; HARTWICK, R. A. **High performance liquid chromatography**. Estados Unidos, 1988. Disponível em: <https://www.osti.gov/biblio/5838660>. Acesso em: 14 nov. 2018.

BUTLER, J. M.; DRESSMAN, J. B. The developability classification system: application of biopharmaceutics concepts to formulation development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 12, p. 4940-4954, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jps.22217>. Acesso em: 14 nov. 2018.

CARDOT, J. M. *et al.* Implementing the Biopharmaceutics Classification System in drug development: reconciling similarities, differences, and shared challenges in the EMA and US-FDA-Recommended Approaches. **The AAPS Journal**, v. 18, n. 4, p. 1039-1046, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1208/s12248-016-9915-0>. Acesso em: 14 nov. 2018.

CARDOT, J. M. *et al.* Implementing the additional strength biowaiver for generics: EMA recommended approaches and challenges for a US-FDA submission. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, p. 399-408, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2017.10.013>. Acesso em: 18 dez. 2018.

CENTRO DE EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA EQFAR 040. **Relatório de Solubilidade nº RSB-001/15 – dipirona sódica**, 2016.

CHEN, M. L. *et al.* The Global Bioequivalence Harmonization Initiative: Summary report for EUFEPS international conference. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, p. 153-157, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.09.047>. Acesso em: 15 dez. 2018.

CHEN, M. L. *et al.* Summary report of second EUFEPS/AAPS conference on global harmonization in bioequivalence. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 127, p. 24-28, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.10.019>. Acesso em: 15 mar. 2019.

CHENG, C. L. *et al.* Biowaiver extension potential to BCS Class III high solubility-low permeability drugs: bridging evidence for metformin immediate-release tablet. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 22, n. 4, p. 297-304, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2004.03.016>. Acesso em: 15 dez. 2018.

CHILUKURI, D. M.; SUNKARA, G.; YOUNG, D. (org.). **Pharmaceutical product development**. Nova Iorque: Informa Healthcare USA, Inc., 2007.

CHORILLI, M. *et al.* 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.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (org.). **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora: Unicamp, 2006.

COOK, J. Impact of discordance among regulations for biopharmaceutics classification system based waivers of clinical bioequivalence studies. **Dissolution Technologies**, v. 22, n. 2, p. 6-10, 2015.

COUNCIL OF EUROPE. Europe Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. **European Pharmacopoeia Online**, 9. ed. Disponível em: <http://online6.edqm.eu/ep905/>. Acesso em: 24 nov. 2018.

CUSTODIO, J.; WU, C.; BENET, L. Predicting drug disposition, absorption/elimination/ transporter interplay and the role of food on drug absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 6, p.717-733, 2008. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1016/J.ADDR.2007.08.043>. Acesso em: 20 mar. 2017.

DAHAN, A.; LENNERNÄS, H; AMIDON, G. L. The fraction dose absorbed, in humans, and high jejunal human permeability relationship. **Molecular pharmaceuticals**, v. 9, n. 6, p. 1847-1851, 2012. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1021%2Fmp300140h>. Acesso em: 10 jan. 2019.

DAKSHINA, M. C.; GANGADHAR, S.; DAVID, Y. (org.). **Pharmaceutical product development: in vitro-in vivo correlation**. New York: Informa Healthcare USA, Inc., 2007.

DAMM, D. Simultaneous determination of the main metabolites of dipyrrone by high-pressure liquid chromatography. **Arzneimittel-Forschung**, v. 39, n. 11, p. 1415-1417, 1989.

DAOUSANI, C; MACHERAS, P. Scientific considerations concerning the EMA change in the definition of “dose” of the BCS-based biowaiver guideline and implications for bioequivalence. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, n. 2, p. 606-609, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.11.062>. Acesso em: 15 dez. 2018.

DAVIT, B. M. *et al.* BCS biowaivers: similarities and differences among EMA, FDA, and WHO requirements. **The AAPS Journal**, n. 3, v. 18, p. 612–618, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1208/s12248-016-9877-2>. Acesso em: 15 out. 2018.

DICKINSON, P. A. *et al.* Clinical relevance of dissolution testing in Quality by Design. **The AAPS Journal**, v. 10, n. 2, p. 380-390, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1208/s12248-008-9034-7>. Acesso em: 15 out. 2018.

DRESSMAN, J. (org.). **Biowaiver monographs 2004-2018**. Holanda: FIP, 2018.

EDDINE, N. H. *et al.* Stability indicating assay for dipyrrone. Part II. Separation and quantitative determination of dipyrrone and its degradation products by high-performance liquid chromatography. **Analytst**, v. 107, n. 1270, p. 67-70, 1982.

EL-ZEANY, B. A. *et al.* Determination of organic pharmaceuticals with N-bromosuccinimide. Part III. Some pyrazolone derivatives by direct titration.

Analyst, n. 1278, v. 107, p. 1054-1059, 1982. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/AN9820701054>. Acesso em: 15 dez. 2018.

ERGÜN, H.; FRATTARELLI, D. A. C.; ARANDA, J. V. Characterization of the role of physicochemical factors on the hydrolysis of dipyron. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, n. 3, p. 479-487, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.02.004>>. Acesso em: 15 out. 2018.

ESCOBAR W. *et al.* Metamizol, a non-opioid analgesic, acts via endocannabinoids in the PAG-RVM axis during inflammation in rats. **European Journal of Pain**, v. 16, n. 5, p. 676-689, 2012.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). **Guideline on the investigation of bioequivalence**. 2010.

Disponível em:

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf. Acesso em: 17 jul. 2016.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Who we are**. Disponível em:

<https://www.ema.europa.eu/en/about-us/who-we-are>. Acesso em: 15 dez. 2018.

EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY LABORATORY. ChEMBL. **Dipyron Sodium**. Disponível em: https://www.ebi.ac.uk/chembl/compound_report_card/CHEMBL487894/. Acesso em: 05 jul. 2016.

FABRE, H. *et al.* Stability indicating assay for dipyron. Part I. Separation and quantitative determination of dipyron and its degradation products by thin-layer chromatography. **Analyst**, v. 107, n. 1270, p. 61-66, 1982.

GEISLINGER, G.; BÖCKER, R.; LEVY, M. High-performance liquid chromatographic analysis of dipyron metabolites to study their formation in human liver microsomes. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 8, p. 1272-1275, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1016088925786>. Acesso em: 24 nov. 2018.

GOLUBITSKII, G. B.; BUDKO, E. V.; IVANOV, V. M. Quantitative analysis of pentalgin N tablets by gradient and isocratic high-performance liquid chromatography. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 61, n. 1, p. 67-71, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/S106193480601014X>. Acesso em: 24 nov. 2018.

GOVERNMENT OF CANADA. Departments and Agencies. **Health Canada**.

Disponível em: <https://www.canada.ca/en/health-canada/corporate/health-portfolio.html>. Acesso em: 24 nov. 2018.

GOVERNMENT OF CANADA. Health Canada. **Guidance document:**

Biopharmaceuticals Classification System based biowaiver, 2014. Disponível em: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/drug->

products/applications-submissions/guidance-documents/ biopharmaceutics-classification-system-based-biowaiver.html. Acesso em: 24 nov. 2018.

HANDOO, S. *et al.* A comprehensive study on regulatory requirements for development and filing of generic drugs globally. **International Journal of Pharmaceutical Investigaton**, v. 2, n. 3, p. 99-105, 2012. Disponível em: http://www.jpionline.org/temp/PharmInvestigations2399-3265395_090413.pdf. Acesso em: 24 nov. 2018.

HASSAN, S. S .M. A new liquid membrane-electrode for selective determination of ephedrine. **Arab Gulf Journal of Scientific Research**, v. 4, n. 1, p. 127-137, 1986.

HINZ B. *et al.* Dipyrone elicits substantial inhibition of peripheral cyclooxygenases in humans: new insights into the pharmacology of an old analgesic. **The Federation of American Society for Experimental Biology Journal**, v. 21, n. 10, p. 2343-2351, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1096/fj.06-8061com>. Acesso em: 24 nov. 2018.

HOFSÄSS, M. A.; DRESSMAN, J. B. The discriminatory power of the BCS-based biowaiver: a retrospective with focus on essential medicines. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 108, n. 9, p. 2824-2837, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.04.030>. Acesso em: 24 nov. 2018.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). **About ICH. Members & Observers. Current Members and Observers**. Disponível em: <https://www.ich.org/about/members-observers.html>. Acesso em: 24 nov. 2018.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). ICH Harmonised Guideline. **Biopharmaceutics Classification System-Based Biowaivers M9**, Draft version. 2018. Disponível em: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M9/M9EWG_DraftGuideline_Step2_2018_0606.pdf. Acesso em: 19 out. 2018.

IZOLANI, A. O.; DE MORAES, M. T.; TÉLLEZ S, C. A. Fourier transform Raman spectroscopy of drugs: quantitative analysis of 1-phenyl-2, 3-dimethyl-5-pyrazolone-4-methylaminomethane sodium sulfonate:(dipyrone). **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 34, n. 10, p. 837-843, 2003.

JANDERA, P.; CHURÁČEK, J. Gradient elution in liquid chromatography: I. The influence of the composition of the mobile phase on the capacity ratio (retention volume, band width, and resolution) in isocratic elution — theoretical considerations. **Journal of Chromatography A**, v. 91, p. 207-221, 1974. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)97901-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)97901-4). Acesso em: 24 nov. 2018.

JASIECKA A.; MASLANKA, T.; JAROSZEWSKI, J. J. Pharmacological characteristics of metamizole. **Polish Journal of Veterinary Science**, v. 17, n. 1,

p. 207-214, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.2478/pjvs-2014-0030>. Acesso em: 24 nov. 2018.

JIMI, P.; PRITI, M.; Vaishali, K. Comparison of global regulatory guidelines for availability of different biowaiver provisions and application requirements of Biopharmaceutics Classification System (BCS) based biowaiver. **International Journal of Drug Regulatory Affairs**; v. 3, n. 3, p. 8-20, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.22270/ijdra.v3i3.167>. Acesso em: 24 nov. 2018.

JONSSON, J. A. **Chromatographic theory and basic principles**. Nova Iorque: CRC Press, 1987. v. 38.

KATZ, E. Z. *et al.* Simultaneous determination of dipyrone metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 305, p. 477-484, 1984.

KORANY, M. A. *et al.* Chemometrics-assisted spectrophotometric green method for correcting interferences in biowaiver studies: Application to assay and dissolution profiling study of donepezil hydrochloride tablets. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 199, p. 328-339, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.03.059>. Acesso em: 24 nov. 2018.

KUBBINGA, M.; MOGHANI, L.; LANGGUTH, P. Novel insights into excipient effects on the biopharmaceutics of APIs from different BCS classes: Lactose in solid oral dosage forms. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 61, p. 27-31, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.03.008>. Acesso em: 24 nov. 2018.

LAHMANN, W. M. *et al.* **Stable oral pharmaceutical composition**. U.S. Patent Application nº 15/105,299. 3. nov. 2016.

LANÇAS, F. M. Efeitos de temperatura em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 1, p. 13-19, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4322/sc.2012.002>. Acesso em: 24 nov. 2018.

LENNERNÄS, H. Modeling gastrointestinal drug absorption requires more in vivo biopharmaceutical data: experience from in vivo dissolution and permeability studies in humans. **Current Drug Metabolism**, v. 8, n. 7, p. 645-57, 2007.

LENNERNÄS, H. Regional intestinal drug permeation: Biopharmaceutics and drug development. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57, p. 333-341, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.08.025>. Acesso em: 24 nov. 2018.

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

LEVY, M.; ZYLBER-KATZ, E.; ROSENKRANZ, B. Clinical pharmacokinetics of dipyron and its metabolites. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 28, n. 3, p. 216-235, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.2165/00003088-199528030-00004>. Acesso em: 24 nov. 2018.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos**: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica. 117 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2003.

MARQUES, M. R. C.; VIEIRA, F. P.; BARROS, A. C. S. Ensaio de dissolução e comparação de perfis de dissolução. *In*: VIEIRA, F. P.; REDIGUIERI, C. F.; REDIGUIERI, C. F. **A regulação de medicamentos no Brasil**. Porto Alegre: Artmed, 2013. 672 p., cap. 16, p. 237-272.

MUÑOZ, J. *et al.* Synergism between COX-3 inhibitors in two animal models of pain. **Inflammopharmacology**, v. 18, n. 2, p. 65-71, 2010.

MUÑOZ, R. A. A.; MATOS, R. C.; ANGNES, L. Amperometric determination of dipyron in pharmaceutical formulations with a flow cell containing gold electrodes from recordable compact discs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 12, p. 1972-1977, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jps.1148>. Acesso em: 15 dez. 2018.

NASCIMENTO, A. P. **Desenvolvimento e validação de metodologia para medicamentos contendo dipirona sódica e cloridrato de papaverina isolados e em associação**. 2006. Tese (Doutorado em Produção e Controle Farmacêuticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Compound Database**; CID=522325, 2016. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/522325>. Acesso em: 05 jul. 2016.

ONO, A.; SUGANO, K. Application of the BCS biowaiver approach to assessing bioequivalence of orally disintegrating tablets with immediate release formulations. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 64, p. 37-43, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.08.003>. Acesso em: 15 dez. 2018.

OUDTSHOORN, J. E. *et al.* A survey of the regulatory requirements for BCS-based biowaivers for solid oral dosage forms by participating regulators and organisations of the International Generic Drug Regulators Programme. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 21, p. 27-37, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.18433/J3X93K>. Acesso em: 18 set. 2018.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. PANDRH Technical Report nº 8. **Framework for implementation of equivalence requirements for pharmaceutical products**. PAHO: Washington, 2011. Disponível em: <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/31220/9789275132227-eng>.

PDF?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 18 set. 2018.

PARR, A. *et al.* The effect of excipients on the permeability of BCS Class III compounds and implications for biowaivers. **Pharmaceutical Research**, v. 33, n. 1, p. 167-176, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-015-1773-4>. Acesso em: 18 set. 2018.

PASCHOAL, J. A. R. *et al.* Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000500048>. Acesso em: 18 set. 2018.

PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 171-177, 2007. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000100029&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 22 abr. 2019.

PEREZ-RUIZ, T. *et al.* Flow-Injection Fluorometric determination of novalgin in pharmaceutical preparations. **Microchemical Journal**, v. 47, n. 3, p. 296-301, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/mchj.1993.1046>. Acesso em: 15 dez. 2018.

PITARELLO, A. P. *et al.* Estudo fotoquímico da dipirona na presença de β e γ ciclodextrina. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 27, n. 2, p. 171-175, 2005. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.4025/actascihealthsci.v27i2.1423>. Acesso em: 15 dez. 2018.

POLLI, J. *et al.* Summary workshop report: facilitating oral product development and reducing regulatory burden through novel approaches to assess bioavailability/bioequivalence. **The AAPS Journal**, v. 14, n. 3, p. 627-638, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1208/s12248-012-9376-z>. Acesso em: 24 ago. 2013.

QURESHI, S. Z.; SAEED, A.; HASAN, T. Spectrophotometric determination of novalgin in tablets by use of potassium iodate. **Talanta**, v. 36, n. 8, p. 869-871, 1989.

REN, Y. *et al.* Nondestructive quantitative analysis of analgini powder pharmaceutical by near-infrared spectroscopy and artificial neural network technique. **Analytical Letters**, v. 33, n. 1, p. 69-80, 2000.

ROGOSCH, T. *et al.* Novel bioactive metabolites of dipyron (metamizol). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 101-107, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.11.028>. Acesso em: 15 dez. 2018.

SABIR, A. M.; MOLOY, M.; BHASIN, P. S. HPLC method development and validation: a review. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 4, n. 4, p. 39-46, 2013.

SAKIARA, K. A. *et al.* Spectrophotometric determination of dipyrone in pharmaceutical preparations by using chromotropic acid. **II Farmaco**, v. 54, n. 9, p. 629-635, 1999.

SALLES, P. H. L. *et al.* Estudo teórico e experimental de fármacos por espectroscopia UV. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA*, 55., 2015, Goiânia. **Livro de resumos**. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Química, 2015.

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY. **4-Methylamino Antipyrine (CAS 519-98-2)**. Disponível em: <https://www.scbt.com/scbt/product/4-methylamino-antipyrine-519-98-2>. Acesso em: 15 dez. 2018.

SCHELLINGER, A. P.; CARR, P. W. Isocratic and gradient elution chromatography: A comparison in terms of speed, retention reproducibility and quantitation. **Journal of Chromatography A**, v. 1109, n. 2, p. 253-266, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.047>. Acesso em: 15 dez. 2018.

SCHOENMAKERS, P. J.; BILLIET, H. A. H.; DE GALAN, L. The solubility parameter as a tool in understanding liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 15, n. 3, p. 205-214, 1982. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02261542>. Acesso em: 15 dez. 2018.

SEDIQ, A. *et al.* The impact of the EMA change in definition of “dose” on the BCS dose–solubility ratio: a review of the biowaiver monographs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 1, p. 65-70, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jps.23769>>. Acesso em: 15 dez. 2018.

SHAH, V.P. *et al.* Progressively Reducing Regulatory Burden. **The AAPS Journal**, v. 16, n. 4, p. 621-624, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9601-z>. Acesso em: 15 dez. 2018.

SNYDER, L. R.; DOLAN, J. W.; GANT, J. R. Gradient elution in high-performance liquid chromatography: I. Theoretical basis for reversed-phase systems. **Journal of Chromatography A**, v. 165, n. 1, p. 3-30, 1979. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)85726-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)85726-X). Acesso em: 15 dez. 2018.

SNYDER, L. R.; GLAJCH, J. L.; KIRKLAND, J. J. **Practical HPLC method development**. 2. ed. New York: Wiley, 1997.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. **Introduction to modern liquid chromatography**. John Wiley & Sons, 2011.

STORPIRTIS, S. *et al.* A equivalência farmacêutica no contexto da intercambialidade entre medicamentos genéricos e de referência: bases técnicas e científicas. **Infarma**, v. 16, n. 9-10, p. 51-56, 2004. Disponível em: <http://revistas.cff.org.br/?journal=infarma&page=article&op=view&path%5B%5D=303&path%5B%5D=292>. Acesso em: 15 out. 2018.

STORPIRTIS, S. *et al.* **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

TAYLOR, J. B.; TRIGGLE, D. J. **Comprehensive Medicinal Chemistry II**. Amsterdam: Elsevier, 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/referenceworks/9780080450445>. Acesso em: 17 set. 2018.

TAO, S. L.; DESAI, T. A. Gastrointestinal patch systems for oral drug delivery. **Drug Discovery Today**. v. 3, p. 909-915, 2005.

TEUTENBERG, T. Potential of high temperature liquid chromatography for the improvement of separation efficiency - A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 643, n. 1-2, p. 1-12, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.04.008>. Acesso em: 15 out. 2018.

THE U.S. PHARMACOPEIAL CONVENTION. United States Pharmacopeia Medicines Compendium. **Monograph: Metamizole tablets**. Disponível em: <https://mc.usp.org/monographs/metamizole-tablets-1-0>. Acesso em: 06 mai. 2015.

THE UNITED STATES OF AMERICA, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. **What We Do: FDA Mission**. Disponível em: <https://www.fda.gov/about-fda/what-we-do>. Acesso em: 15 dez. 2018.

THE UNITED STATES OF AMERICA, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. **Draft guidance for industry: bioequivalence studies with pharmacokinetic endpoints for drugs submitted under an ANDA**. 2013. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm377465.pdf>. Acesso em: 6 jun. 2018.

THE UNITED STATES OF AMERICA, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. **Dissolution testing and specification criteria for immediate release solid oral dosage forms containing BCS class 1 and class 3 drugs**. 2015. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM456594.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2018.

THE UNITED STATES OF AMERICA, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. **Guidance for industry. Extended release oral dosage forms: development, evaluation, and application of in vitro/in vivo correlations**. 1997. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070239.pdf>. Acesso em: 17 jul. 2016.

THE UNITED STATES OF AMERICA, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. **Guidance for Industry: Waiver of *in vivo* Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System**. 2017. Disponível em:

<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070246.pdf>. Acesso em: 17 fev. 2018.

THE UNITED STATES OF AMERICA, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. **Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system**. 2015. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070246.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2018.

THE UNITED States Pharmacopeia 42. National Formulary 37: 2018. Rockville: U.S. Pharmacopeia, 2018.

TSUME, Y.; AMIDON, G. L. The biowaiver extension for BCS class III drugs: the effect of dissolution rate on the bioequivalence of BCS class III immediate-release drugs predicted by computer simulation. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, n. 4, p. 1235-1243, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1208/s12248-018-0260-3>. Acesso em: 15 dez. 2018.

TSUME, Y. *et al.* In Vivo Predictive Dissolution and Simulation Workshop Report: facilitating the development of oral drug formulation and the prediction of oral bioperformance. **The AAPS Journal**, v. 20, n. 6, p. 100, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1208/s12248-018-0260-3>. Acesso em: 15 dez. 2018.

UNGELL, L. A. *et al.* Membrane transport of drugs in different regions of the intestinal tract of the rat. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 3, p. 360-366, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/js970218s>. Acesso em: 15 out. 2018.

VAZ, A. *et al.* Synthesis of dipyrene metabolites and evaluation of their antipyretic effect. Brazilian Meeting on Organic Synthesis 2013. **Blucher Chemistry Proceedings**, v. 1, p. 12-12, 2013. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/chempro-15bm0s-BMOS2013_20139142095. Acesso em: 15 out. 2018.

VERBEECK, R. K.; MUSUAMBA, F. T. The revised EMA guideline for the investigation of bioequivalence for immediate release oral formulations with systemic action. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 3, p. 376-388, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.18433/J3VC8J>. Acesso em: 18 set. 2018.

WENCLAWIAK, B. W.; GIEGOLD, S.; TEUTENBERG, T. High-Temperature Liquid Chromatography. **Analytical Letters**, v. 41, n. 7, p. 1097-1105, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00032710802053955>. Acesso em: 18 set. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **General notes on biopharmaceutics classification system (BCS)-based biowaiver applications**. WHO: Genebra, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Home. About WHO. Who we are. Constitution.** Disponível em: <https://www.who.int/about/who-we-are/constitution>. Acesso em: 15 dez. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Multisource (Generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability.** 2015. (WHO Technical Report Series n. 992, annex 7). Disponível em: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21898en/s21898en.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability.** 2017. (WHO Technical Report Series, n. 1003, annex 6). Disponível em: http://www.gmp-compliance.org/guidemgr/files/who_trs1003_annex6.pdf. Acesso em: 17 fev. 2018.

WU, C. Y.; BENET, L. Z. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/ elimination interplay and development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 1, p. 11-23, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-004-9004-4>. Acesso em: 17 fev. 2018.

YU, L. X. *et al.* Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 7, p. 921-925, 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1016473601633>. Acesso em: 17 fev. 2018.

ZAMORA, L. L.; CALATAYUD, J. M. Immobilization of reagents by polymeric materials. Determination of metamizole. **Talanta**, v. 40, n. 7, p. 1067-1071, 1993. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(93\)80167-P](https://doi.org/10.1016/0039-9140(93)80167-P). Acesso em: 15 dez. 2018.

ZYLBER-KATZ, E.; GRANIT, L.; LEVY, M. Formation and excretion of dipyrone metabolites in man. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 42, n. 2, p. 187-191, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00278482>. Acesso em: 15 out. 2018.

ANEXO A - MONOGRAFIA ORIGINAL (EM INGLÊS) DO *USP COMPENDIUM* PARA OS COMPRIMIDOS DE DAPIRONA SÓDICA E SEU RESPECTIVO RELATÓRIO DE VALIDAÇÃO

Published on *USP Medicines Compendium* (<https://mc.usp.org>)

Metamizole Tablets

Final Authorized Version 1.0

DEFINITION

Metamizole Tablets contain an amount of Metamizole Sodium equivalent to NLT 95.0% and NMT 105.0% of the labeled amount of metamizole sodium ($C_{13}H_{16}N_3NaO_4S$).

Performance-Based Monograph

(Contains tests, procedures, and acceptance criteria for the material under test. It also includes the criteria-based procedures to demonstrate that an *Acceptable Procedure* is equivalent to the *Reference Procedures*.)

IDENTIFICATION

- **A.** The response for metamizole from the *Sample solution* corresponds to that of the *Standard solution*, as obtained in the *Assay*.

ASSAY

• PROCEDURE

Standard solution: USP Metamizole Sodium RS in an appropriate diluent

Sample solution: Dissolve a portion of Tablets in an appropriate diluent to obtain a concentration approximately the same as that of the *Standard solution*.

Analytical system: Use a procedure validated as described in *MC* general chapter *Assessing Validation Parameters for Reference and Acceptable Procedures* <10>.

System performance requirements

Precision: Meets the requirements for 98.0%–102.0%

Accuracy: Meets the requirements for 98.0%–102.0%

Specificity: Meets the requirements

Range: Meets the requirements

Analysis

Samples: *Standard solution* and *Sample solution*

Calculate the percentage of the labeled amount of metamizole sodium ($C_{13}H_{16}N_3NaO_4S$) in the *Sample solution*:

$$\text{Result} = (r_U/r_S) \times (C_S/C_U) \times 100$$

r_U = response from the *Sample solution*

r_S = response from the *Standard solution*

C_S = concentration of USP Metamizole Sodium RS in the *Standard solution*

C_U = nominal concentration of metamizole sodium in the *Sample solution*

Acceptance criteria: 95.0%–105.0%

PERFORMANCE TESTS

• DISSOLUTION <711>

Medium, Apparatus, Time, and Acceptance criteria: See *MC* general chapter *Assessing Drug Product Performance* <12>.

Standard solution: USP Metamizole Sodium RS in an appropriate diluent

Sample solution: Pass a portion of the solution under test through a suitable filter, and dilute with an appropriate diluent to obtain a concentration approximately the same as that of the *Standard solution*.

Instrumental conditions: Proceed as directed in the *Assay* or in an alternatively validated procedure.

- **UNIFORMITY OF DOSAGE UNITS <905>:** Meets the requirements

IMPURITIES

- **ELEMENTAL IMPURITIES <232>:** Proceed as directed in the chapter.
- **RESIDUAL SOLVENTS <467>:** Proceed as directed in the chapter.

• **ORGANIC IMPURITIES**

Standard solution: USP Metamizole Sodium RS and all appropriate USP Impurity RSs, at concentrations corresponding to the *Acceptance criteria* of the impurity, in an appropriate diluent

Sample solution: Metamizole Sodium in an appropriate diluent

Analytical system: Use a procedure validated as described in MC general chapter *Assessing Validation Parameters for Reference and Acceptable Procedures* <10>.

System performance requirements

Precision: Meets the requirements

Accuracy: Meets the requirements

Ruggedness: Meets the requirements

Specificity: Meets the requirements

Analysis

Samples: *Standard solution* and *Sample solution*

Calculate the percentage of each impurity in the *Sample solution*:

$$\text{Result} = (r_U/r_S) \times (C_S/C_U) \times 100$$

r_U = response of each impurity from the *Sample solution*

r_S = response of each USP Impurity RS from the *Standard solution*. [NOTE—if no USP Impurity RSs are available, use the response of metamizole.]

C_S = concentration of standard material in the *Standard solution*

C_U = nominal concentration of metamizole sodium in the *Sample solution*

Acceptance criteria

Metamizole impurity C: NMT 0.5%

Any other individual impurity: NMT 0.2%

ADDITIONAL REQUIREMENTS

• **REFERENCE STANDARDS** <11>

USP Metamizole Sodium RS

Sodium [(2,3-dihydro-1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methylamino] methanesulfonate.

USP Metamizole Impurity A RS

(5-Methyl-3-oxo-2-phenyl-1,2-dihydro-3H-pyrazol-4-yl)formamide.

USP Metamizole Impurity B RS

4-Amino-1,5-dimethyl-2-phenyl-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-one.

USP Metamizole Impurity C RS

1,5-Dimethyl-4-methylamino-2-phenyl-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-one.

USP Metamizole Impurity D RS

4-Dimethylamino-1,5-dimethyl-2-phenyl-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-one.

USP Metamizole Impurity E RS

[(1,5-Dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)amino]methanesulfonic acid.

REFERENCE PROCEDURES

(This section provides detailed descriptions of procedures that may be used for the evaluation of the material under test. These procedures have been fully validated, and the data is available on the MC website.)

ASSAY

• **PROCEDURE**

Solution A: 50 mM ammonium formate in water. Add 2 mL/L of triethylamine and adjust with formic acid to a pH of 5.0.

Solution B: Methanol and acetonitrile (1:1)

Mobile phase: See *Table 1*.

acido formico

Table 1

Time (min)	Solution A (%)	Solution B (%)
0	85	15
6	85	15
6.1	75	25
12	75	25
15	60	40
20	60	40
22	85	15
25	85	15

System suitability solution: 0.025 mg/mL each of USP Metamizole Sodium RS, USP Metamizole Impurity A RS, and USP Metamizole Impurity E RS in methanol

Standard solution: 0.3 mg/mL of USP Metamizole Sodium RS in methanol

Sample solution: Weigh and finely powder NLT 20 Tablets, dissolve an appropriate quantity of the powder in methanol, and sonicate to dissolve. Pass through an appropriate filter to obtain a final concentration of 0.3 mg/mL of metamizole sodium in methanol.

Chromatographic system

(See *Chromatography <621>*, *System Suitability*.)

Mode: LC

Detector: PDA (scan 200–700 nm). [NOTE—Calculations should be based on the chromatograms collected at 254 nm.]

[NOTE—To confirm the absence of co-eluting known and unknown impurity peaks, substitute the *Detector* from the test for *Organic Impurities* under *Reference Procedures*.]

Column: 4.6-mm × 15-cm; 2.7-μm packing L1 (similar to Supelco Ascentis Express C18)

Temperatures

Column oven: 25°

Autosampler: 10°

Flow rate: 1.0 mL/min

Injection volume: 5 μL

System suitability

Samples: *System suitability solution* and *Standard solution*

Suitability requirements

Resolution: NLT 1.5 between the metamizole and impurity E peaks, *System suitability solution*

Relative standard deviation: NMT 1.0% for the metamizole peak, *Standard solution*

Analysis

Samples: *Standard solution* and *Sample solution*

Calculate the percentage of the labeled amount of metamizole sodium (C₁₃H₁₆N₂NaO₅) in the portion of Tablets taken:

$$\text{Result} = (r_s/r_c) \times (C_s/C_u) \times 100$$

r_u = peak response of metamizole from the *Sample solution*

r_s = peak response of metamizole from the *Standard solution*

C_s = concentration of USP Metamizole Sodium RS in the *Standard solution*. [NOTE—The potency of the Reference Material is included in this term.]

C_u = nominal concentration of metamizole in the *Sample solution*

IMPURITIES

• ORGANIC IMPURITIES

Solution A, Solution B, Mobile phase, and Chromatographic system: Proceed as directed in *Reference Procedures, Assay*.

System suitability solution: Proceed as directed for the *Standard solution* in *Reference Procedures, Assay*.

Standard solution: 1.0 μg/mL each of USP Metamizole Sodium RS, USP Metamizole Impurity A RS, and USP Metamizole Impurity E RS in methanol

Sample solution: Weigh and finely powder NLT 20 Tablets, dissolve an appropriate quantity of the powder in methanol, and

sonicate to dissolve. Pass through an appropriate filter to obtain a final concentration of 1.0 mg/mL of metamizole sodium in methanol.

Chromatographic system

(See *Chromatography <621>*, *System Suitability*.)

Mode: LC

Detector: PDA and MS

PDA wavelengths: 200–700 nm. [NOTE—Calculations should be made at an isobestic point of the drug substance and impurity spectra or at 254 nm if an isobestic point is not available.]

MS source: ES scan (+ and –)

MS conditions

Nozzle voltage: 500 V

Gas flow: 7 L/min

Nebulizer: 45 psig

Desolvation temperature: 300°

System suitability

Samples: *System suitability solution and Standard solution*

Suitability requirements

Resolution: NLT 1.5 between the metamizole and impurity E peaks, *Standard solution*

Relative standard deviation: NMT 1.0% for the metamizole peak, *System suitability solution*

Analysis

Samples: *Standard solution and Sample solution*

Calculate the percentage of each impurity in the portion of Tablets taken. [NOTE—Where an impurity other than those included in the *Standard solution* is found in the *Sample solution*, the peak response of metamizole and the concentration of metamizole sodium in the *Standard solution* are used for the calculation.]

$$\text{Result} = (r_u/r_s) \times (C_s/C_u) \times 100$$

r_u = peak response of each impurity from the *Sample solution*

r_s = peak response of each impurity from the *Standard solution*

C_s = concentration of each impurity in the *Standard solution*. [NOTE—The potency of the Reference Material is included in this term.]

C_u = concentration of metamizole sodium in the *Sample solution*

Source URL (modified on 2014/01/31 - 8:59am): <https://mc.usp.org/monographs/metamizole-tablets-1-0>



Metamizole Tablets
Summary Validation Report
 December 09, 2012

1. Executive Summary

- a. Goals: The reference procedure described herein was developed for the MC monograph for Metamizole Tablets.
- b. Background
 - i. Metamizole Sodium is a powerful analgesic and antipyretic.
 - ii. The active moiety of the medicine is Metamizole, and all dosing information is based on the free base.
 - iii. The drug is also available as oral solution and solution for injection.
 - iv. Quality monographs are available in EP and BP.
- c. The Reference procedure is based upon the USP-MC procedure for Metamizole Sodium.

2. Reference Procedures

- a. Assay Procedure: LC-PDA (Both Waters (primary) and Agilent (secondary))
 - i. **Solution A:** 50 mM ammonium formate in water. Add 2mL/L of Triethylamine and adjust with formic acid to a pH of 5.0
 - ii. **Solution B:** Methanol and acetonitrile (1:1)
 - iii. **Mobile phase:** See *Table 1*

Table 1

Time (min)	Solution A (%)	Solution B (%)
0	85	15
6	85	15
6.1	75	25
12	75	25
15	60	40
20	60	40
22	85	15
25	85	15

- iv. **System suitability Solution:** 0.025 mg/mL each of USP Metamizole Sodium CRM, USP Metamizole Impurity A and USP Metamizole Impurity E RS in methanol.
- v. **Standard Solution:** 0.3 mg/mL of USP Metamizole Sodium CRM in methanol.
- vi. **Sample Solution:** Accurately weigh NLT 20 Tablets, and grind to a fine powder in a mortar and pestle. Sonicate to dissolve in methanol. Filter the supernatant through a suitable filter to obtain a final metamizole concentration of about 0.3 mg/mL.
- vii. **Chromatographic System** (See *Chromatography <621>*, *System Suitability*.)
 1. **Mode:** LC
 2. **Detector:** PDA (Scan 200-700 nm) [Note: Calculations should be based on the chromatograms collected at 254 nm]
 3. **Column:** 4.6-mm x 15-cm; 2.7- μ m L1 packing, similar to Supelco Ascentis Express C18
 4. **Flow rate:** 1 mL/min



Metamizole Tablets
Summary Validation Report
 December 09, 2012

1. Executive Summary

- a. Goals: The reference procedure described herein was developed for the MC monograph for Metamizole Tablets.
- b. Background
 - i. Metamizole Sodium is a powerful analgesic and antipyretic.
 - ii. The active moiety of the medicine is Metamizole, and all dosing information is based on the free base.
 - iii. The drug is also available as oral solution and solution for injection.
 - iv. Quality monographs are available in EP and BP.
- c. The Reference procedure is based upon the USP-MC procedure for Metamizole Sodium.

2. Reference Procedures

- a. Assay Procedure: LC-PDA (Both Waters (primary) and Agilent (secondary))
 - i. **Solution A:** 50 mM ammonium formate in water. Add 2mL/L of Triethylamine and adjust with formic acid to a pH of 5.0
 - ii. **Solution B:** Methanol and acetonitrile (1:1)
 - iii. **Mobile phase:** See *Table 1*

Table 1

Time (min)	Solution A (%)	Solution B (%)
0	85	15
6	85	15
6.1	75	25
12	75	25
15	60	40
20	60	40
22	85	15
25	85	15

- iv. **System suitability Solution:** 0.025 mg/mL each of USP Metamizole Sodium CRM, USP Metamizole Impurity A and USP Metamizole Impurity E RS in methanol.
- v. **Standard Solution:** 0.3 mg/mL of USP Metamizole Sodium CRM in methanol.
- vi. **Sample Solution:** Accurately weigh NLT 20 Tablets, and grind to a fine powder in a mortar and pestle. Sonicate to dissolve in methanol. Filter the supernatant through a suitable filter to obtain a final metamizole concentration of about 0.3 mg/mL.
- vii. **Chromatographic System** (See *Chromatography <621>*, *System Suitability*.)
 1. **Mode:** LC
 2. **Detector:** PDA (Scan 200-700 nm) [Note: Calculations should be based on the chromatograms collected at 254 nm]
 3. **Column:** 4.6-mm x 15-cm; 2.7- μ m L1 packing, similar to Supelco Ascentis Express C18
 4. **Flow rate:** 1 mL/min

5. **Column Oven Temperature:** 25°
 6. **Auto sampler Temperature:** 10°
 7. **Injection volume:** 5 µL
- b. Organic Impurities Procedure: LC-PDA (Both Waters (primary) and Agilent (secondary))
- i. **Solution A:** 50 mM ammonium formate in water. Add 2mL/L of Triethylamine and adjust with formic acid to a pH of 5.0.
 - ii. **Solution B:** Methanol and acetonitrile (1:1).
 - iii. **Mobile phase:** See Table 1

Table 1

Time (min)	Solution A (%)	Solution B (%)
0	85	15
6	85	15
6.1	75	25
12	75	25
15	60	40
20	60	40
22	85	15
25	85	15

- iv. **System suitability Solution:** 0.025 mg/mL each of USP Metamizole Sodium CRM, USP Metamizole Impurity A RS and USP Metamizole Impurity E RS in methanol.
- v. **Standard Solution:** 1.0 µg/mL each of USP Metamizole Sodium CRM, USP Metamizole Impurity A RS and USP Metamizole Impurity E RS in methanol.
- vi. **Sample Solution:** Accurately weigh NLT 20 Tablets, and grind to a fine powder in a mortar and pestle. Sonicate to dissolve in methanol. Filter the supernatant through a suitable filter to obtain a final metamizole concentration of about 1.0 mg/mL.
- vii. **Chromatographic System** (See *Chromatography <621>*, *System Suitability*.)
 1. **Mode:** LC
 2. **Detector:** PDA (Scan 200-700 nm) [Note: Calculations should be based on the chromatograms collected at 254 nm]
 3. **Column:** 4.6-mm x 15-cm; 2.7-µm L1 packing, similar to Supelco Ascentis Express C18
 4. **Flow rate:** 1 mL/min
 5. **Column Oven Temperature:** 25°
 6. **Auto sampler Temperature:** 10°
 7. **Injection volume:** 5 µL
- viii. **Chromatographic System** (See *Chromatography <621>*, *System Suitability*.)
 1. **Mode:** LC
 2. **Detector:** MS Source: ES Scan (+ and -)
 3. **MS Conditions:**
 - a. Nozzle voltage (V): 500
 - b. Gas flow (L/min): 7
 - c. Nebulizer (psig): 45
 - d. Desolvation temperature: 300°

3. Validation Results

a. Assay

i. Precision and Accuracy

1. 7 independent solutions compared to Metamizole standard.
2. Acceptable Criteria: NLT 0.95 (Probability)
3. **Calculated probability: 1.00 (Passes)**
 - a. Mean = 100.82
 - b. Standard Deviation = 0.33
 - c. % RSD = 0.33
 - d. Lower = 98.0%, Upper = 102.0%

Solution name	Weight of the sample (g)	Response Inj. 1	Response Inj. 2	Average response	% Assay
1	1.00002	1882884	1861012	1871948	101.22
2	1.00065	1866359	1871916	1869138	101.00
3	1.00096	1862313	1857333	1859823	100.47
4	1.00087	1862591	1864183	1863387	100.67
5	1.00044	1852730	1862436	1857583	100.40
6	1.00065	1879113	1866556	1872835	101.20
7	1.00031	1866764	1863074	1864919	100.81

ii. Intermediate Precision

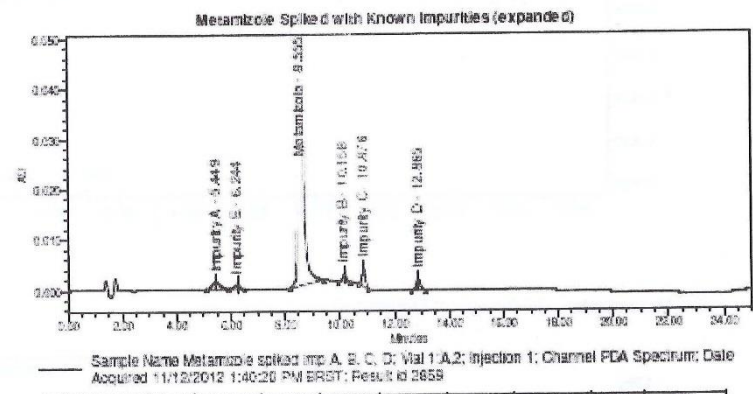
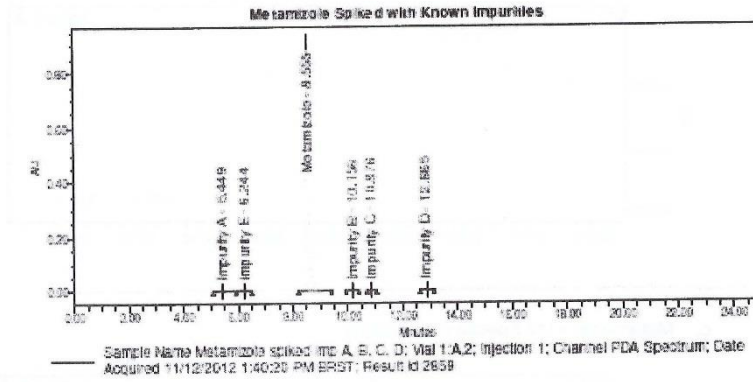
	Mean (%)	Standard deviation	% RSD	Probability
Day 1	100.51	0.74	0.74	0.98
Day 2	100.82	0.33	0.33	1.00
Day 3	100.33	0.56	0.56	1.00
Combined	100.56	0.58	0.58	0.99

1. Day 2 & 3 – Assay Intermediate Precision

Solution name	Weight of the sample (g)	Response Inj. 1	Response Inj. 2	Average response	% Assay
1	1.06068	1980727	1993054	1986891	100.03
2	1.06107	2010950	2013325	2012138	101.27
3	1.06169	1988122	1989737	1988930	100.04
4	1.06135	2003102	2010244	2006673	100.97
5	1.06198	2026799	2008192	2017496	101.45
6	1.06202	2009887	1982973	1996430	100.39
7	1.06223	1968402	1987531	1977967	99.44

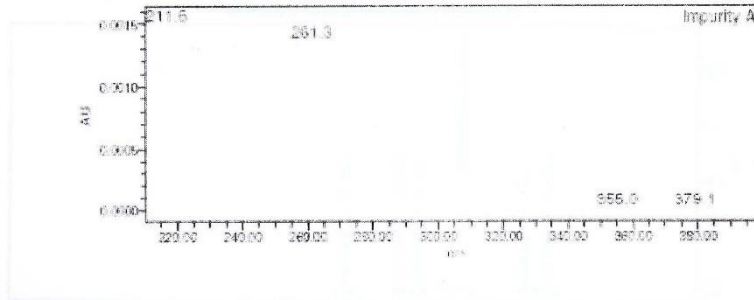
Solution name	Weight of the sample (g)	Response Inj. 1	Response Inj. 2	Average response	% Assay
1	1.06109	2036270	1996313	2016292	100.61
2	1.07688	2024721	2050646	2037684	100.19
3	1.06501	2032705	2033451	2033078	101.08
4	1.06271	2024039	2026233	2025136	100.90
5	1.06167	1998410	1992783	1995597	99.52
6	1.06185	1985373	2019476	2002425	99.85
7	1.06267	2006141	2013931	2010036	100.15

iii. Specificity
 a. Metamizole – Peak Identification Solution

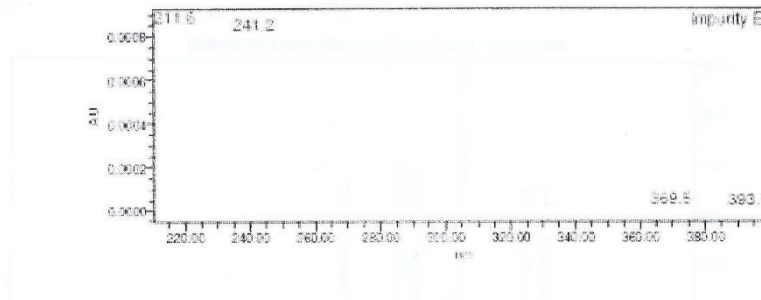


Peak Name	RT	Area	% Area	Height	RT Ratio	Purity Angle	Purity Threshold	USP Tailing	USP Resolution
1 Impurity A	5.45	26548	0.37	1284	0.64	0.89	1.37	1.1	
2 Impurity E	6.24	10482	0.15	766	0.73	1.23	1.92	0.8	1.7
3 Metamizole	8.55	7017076	96.63	623617		0.14	0.27	1.1	7.8
4 Impurity B	10.16	12295	0.17	1456	1.19	1.14	1.28	1.0	7.7
5 Impurity C	10.88	28385	0.39	3562	1.27	0.18	0.58	1.1	9.4
6 Impurity D	12.86	19985	0.28	2652	1.50	0.52	1.00	1.0	9.0

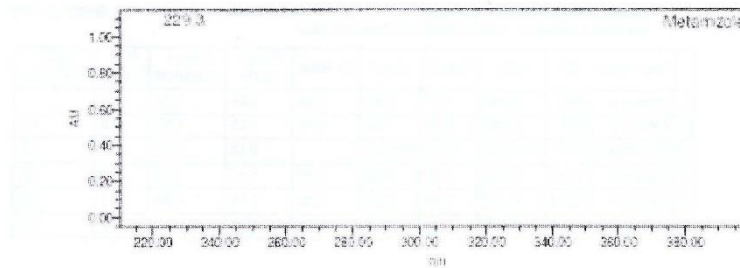
b. Metamizole – UV Spectra of Impurity A



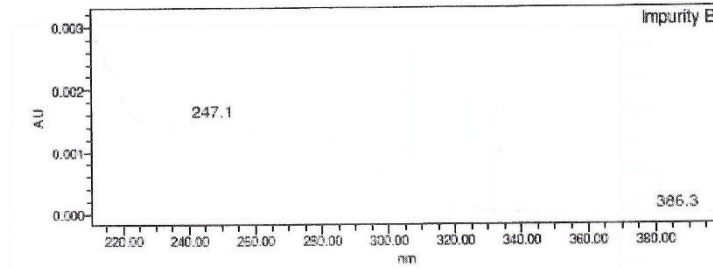
c. Metamizole – UV Spectra of Impurity E



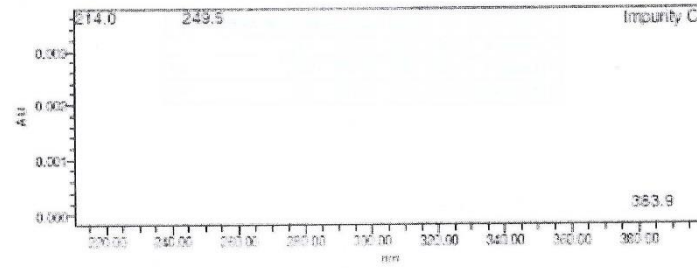
d. Metamizole – UV Spectra of Metamizole



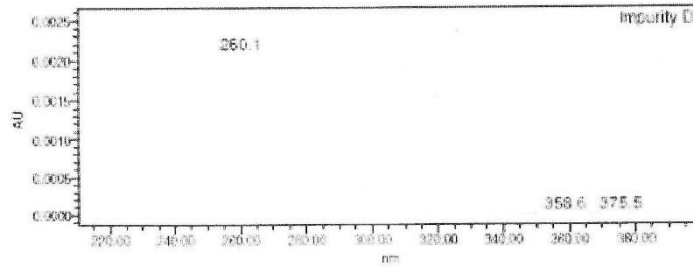
e. Metamizole – UV Spectra of Impurity B



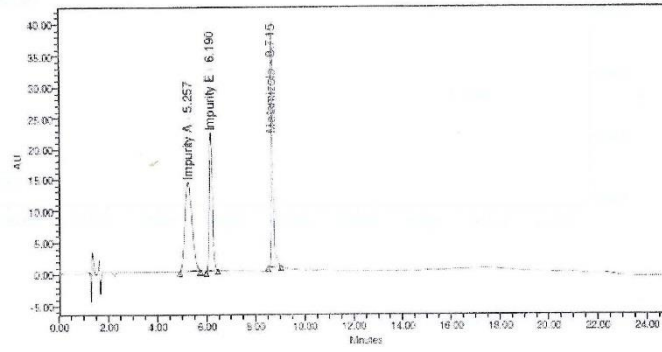
f. Metamizole – UV Spectra of Impurity C



g. Metamizole – UV Spectra of Impurity D

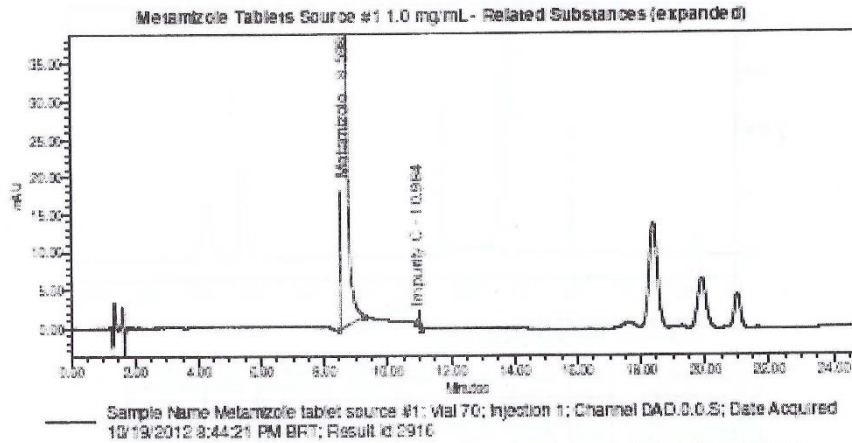
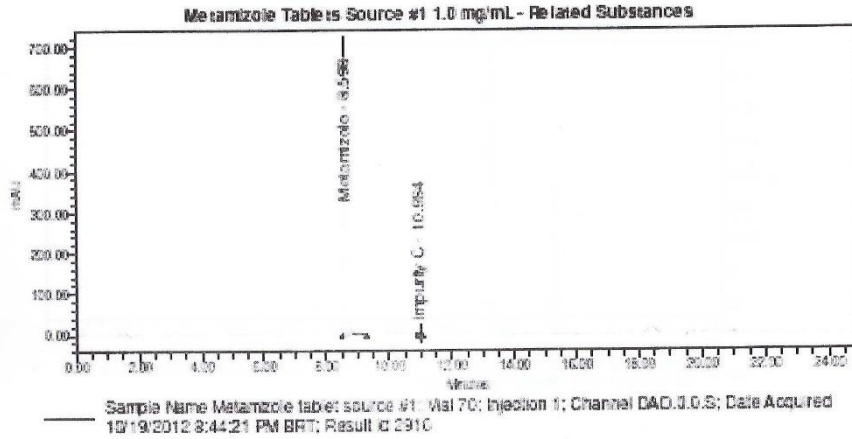


h. Metamizole - System suitability solution



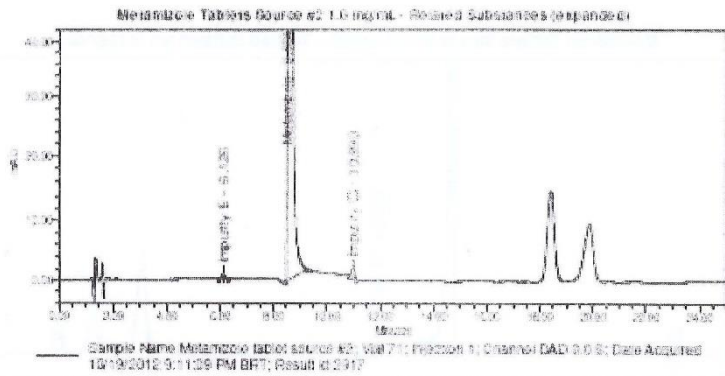
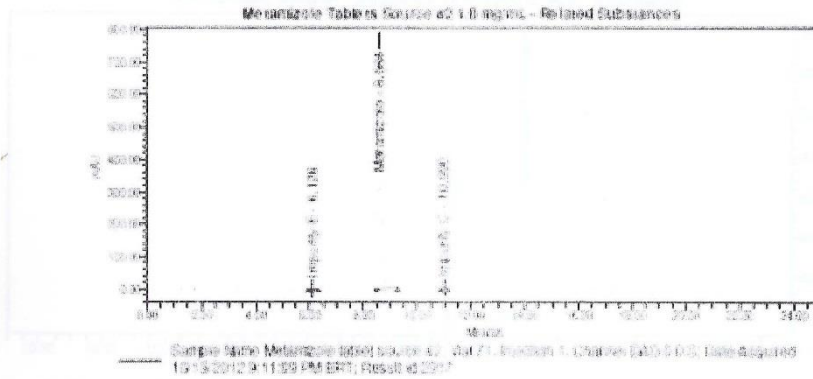
Peak Name	RT	Area	% Area	Height	USP Resolution (H/H)
1 Impurity A	5.257	280	42.57	14	
2 Impurity E	6.190	190	28.27	22	2.4
3 Metamizole	8.715	185	28.56	39	14.6

i. Metamizole – Tablets (Source I) 1.0 mg/mL



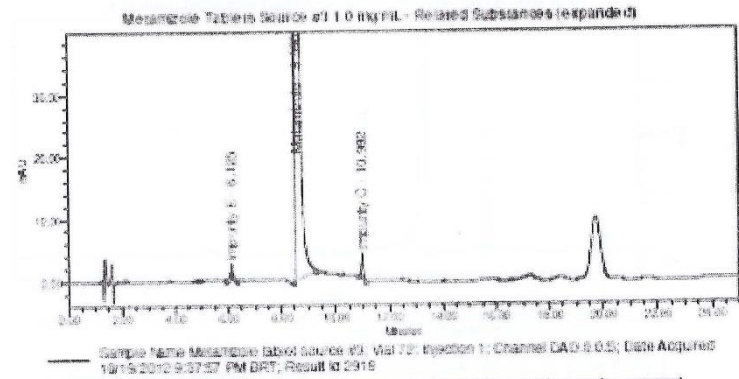
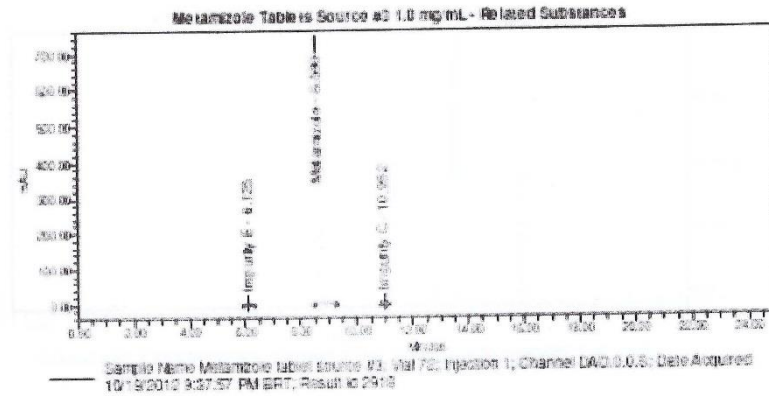
Peak Name	RT	Area	%Area	Height	RT Ratio	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	USP Tailing	USP Resolution
1 Metamizole	8.60	6141	99.92	704		0.13	0.66	1.7	
2 Impurity C	10.98	4	0.08	1	1.28	2.40	6.32	1.1	14.2

j. Metamizole – Tablets (Source II) 1.0 mg/mL



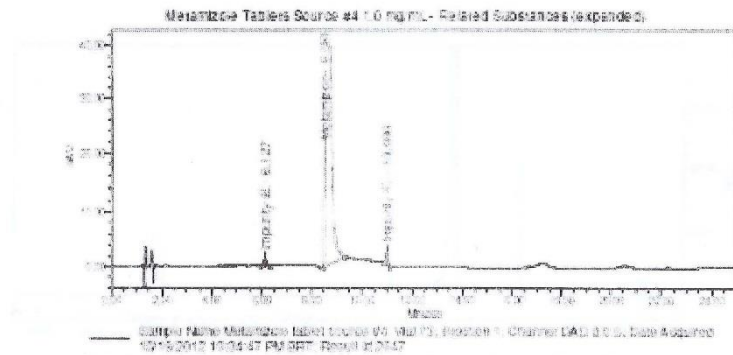
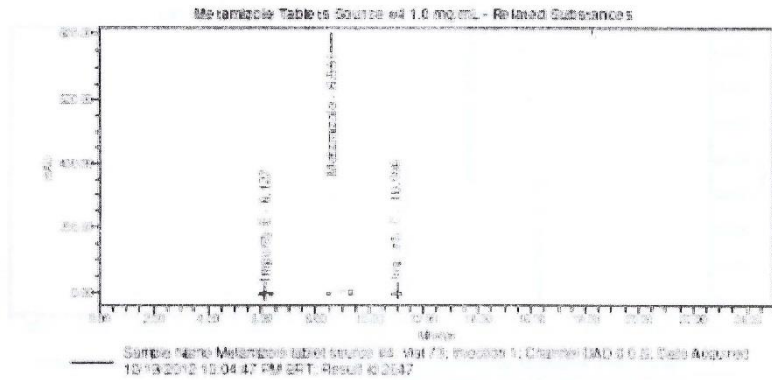
Peak Name	RT	Area	% Area	Height	RT Ratio	Purity Angle	Purity Threshold	USP Table	USP Resolution
1 Impurity E	6.13	7	0.12	1	0.71	4.24	7.79	1.0	
2 Metamizole	8.98	6112	99.75	755		6.15	6.66	1.6	11.4
3 Impurity C	10.99	9	0.15	2	1.20	1.90	4.59	1.1	13.4

k. Metamizole – Tablets (Source III) 1.0 mg/mL



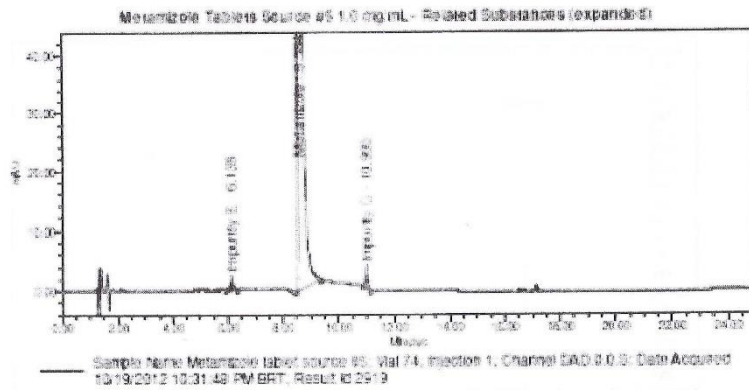
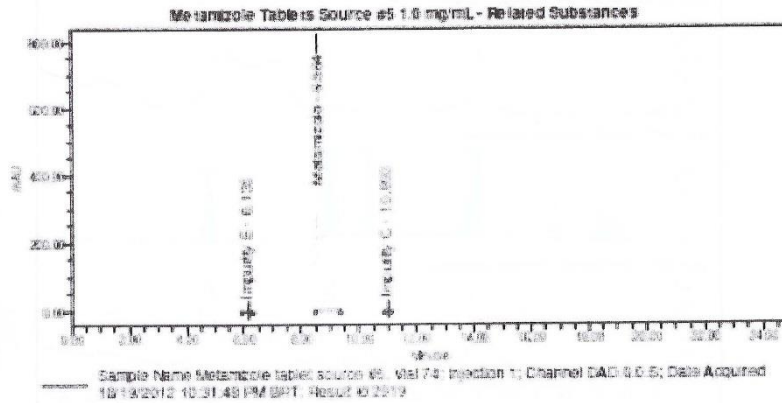
Peak Name	RT	Area	%Area	Height	RT Ratio	Purity Angle	Purity Threshold	USP Tailing	USP Resolution
1 Impurity E	6.13	10	0.22	1	0.71	2.11	3.90	1.1	
2 Metamizole	8.99	6023	99.51	724		0.13	0.66	1.8	11.5
3 Impurity C	10.99	48	0.27	3	1.29	1.29	2.54	1.1	10.7

I. Metamizole – Tablets (Source IV) 1.0 mg/mL



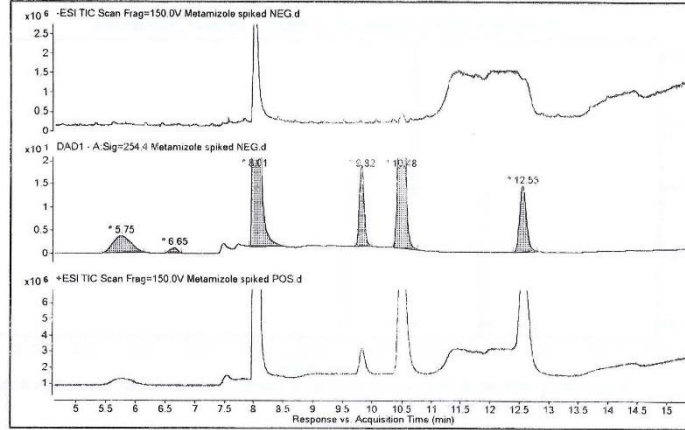
Peak Name	RT	Area	%Area	Height	RT (min)	Purity Angle	Purity Threshold	LOP	LOP Resolution
Impurity B	6.13	19	0.12	1	6.13	2.73	0.42	1.1	
Metamizole	9.62	19412	99.82	199	9.62	0.00	0.69	0.0	11.0
Impurity C	11.00	12	0.06	1	11.00	1.04	0.10	1.1	43.1

m. Metamizole – Tablets (Source V) 1.0 mg/mL

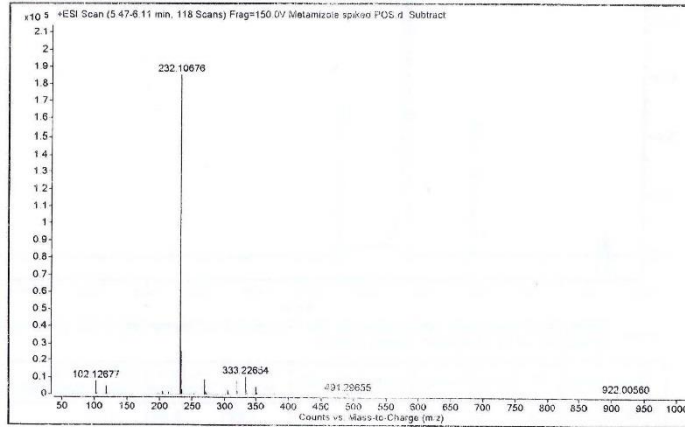


Peak Name	RT	Area	% Area	Height	RT Ratio	Purity Angle	Purity Threshold	USP Test 1	USP Resolution
1 Impurity E	6.14	9	0.14	1	0.71	2.99	5.84	1.0	
2 Metamizole	8.98	6526	99.67	797		0.10	0.00	1.0	11.1
3 Impurity C	10.99	12	0.19	2	1.28	1.43	5.36	1.1	13.1

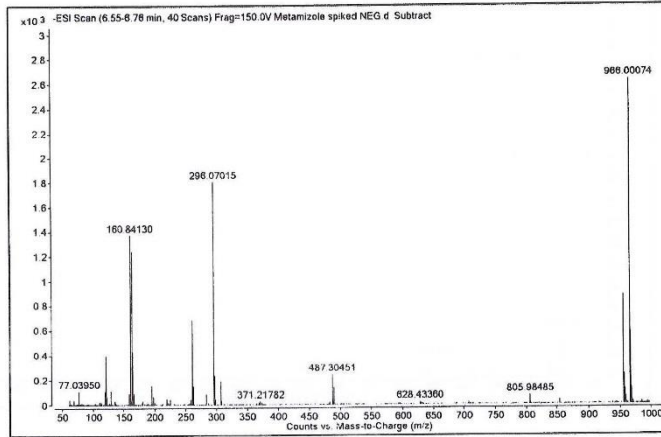
n. Metamizole – Spiked solution Total Ion Count



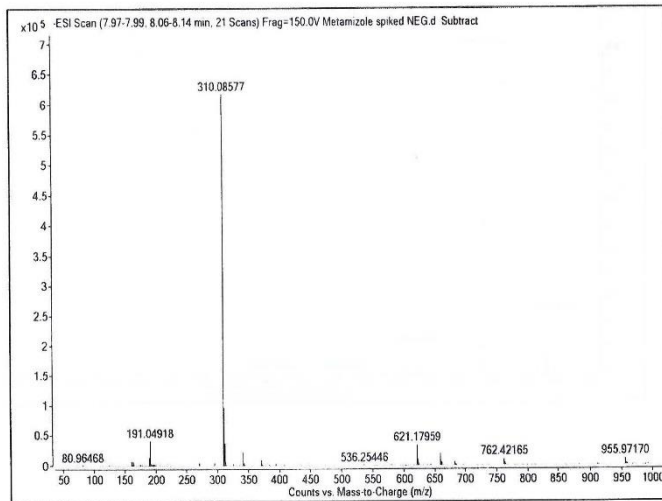
o. Metamizole – Spiked solution MS Spectra - Impurity A



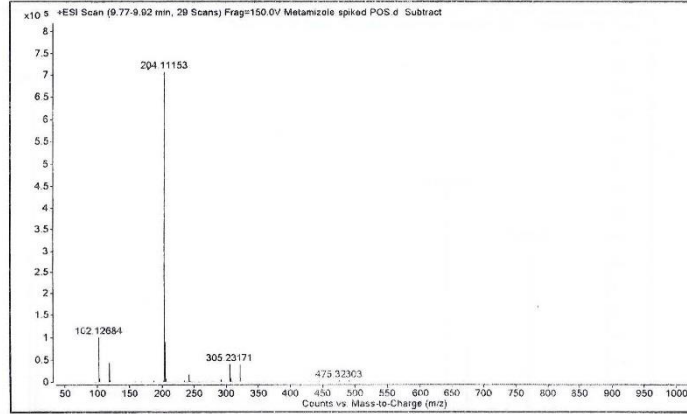
p. Metamizole – Spiked solution MS Spectra - Impurity E



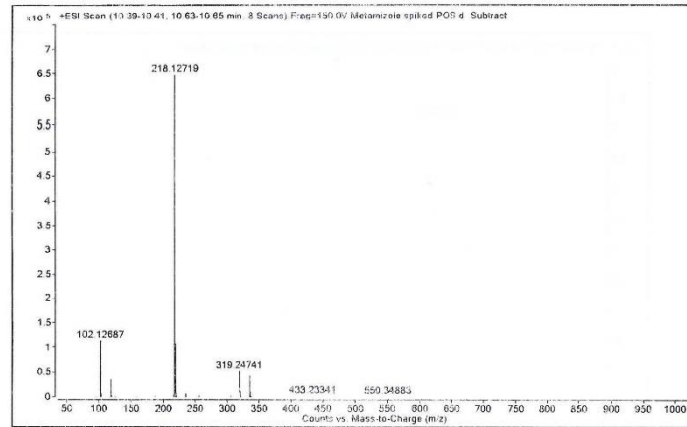
q. Metamizole – Spiked solution MS Spectra - Metamizole



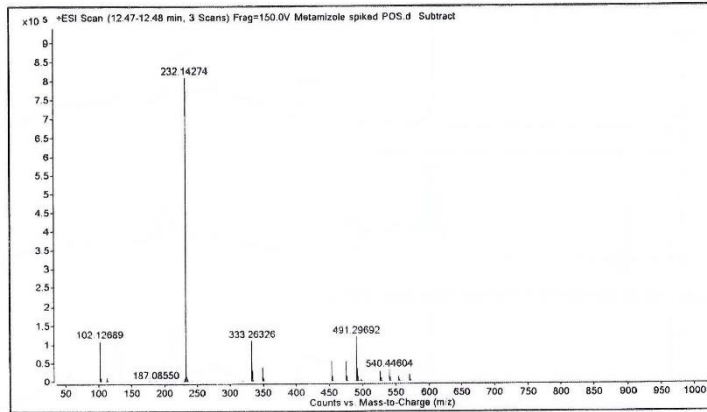
r. Metamizole -- Spiked solution MS Spectra - Impurity B



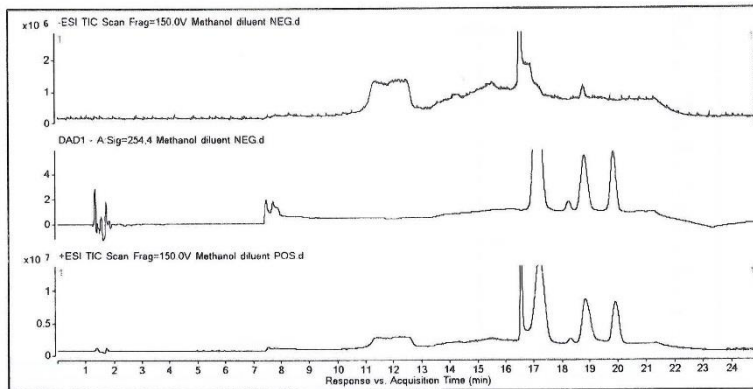
s. Metamizole -- Spiked solution MS Spectra - Impurity C



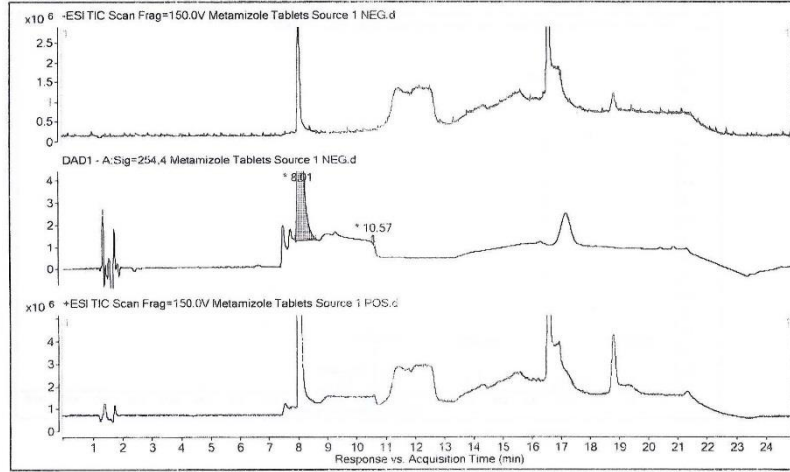
t. Metamizole – Spiked solution MS Spectra - Impurity D



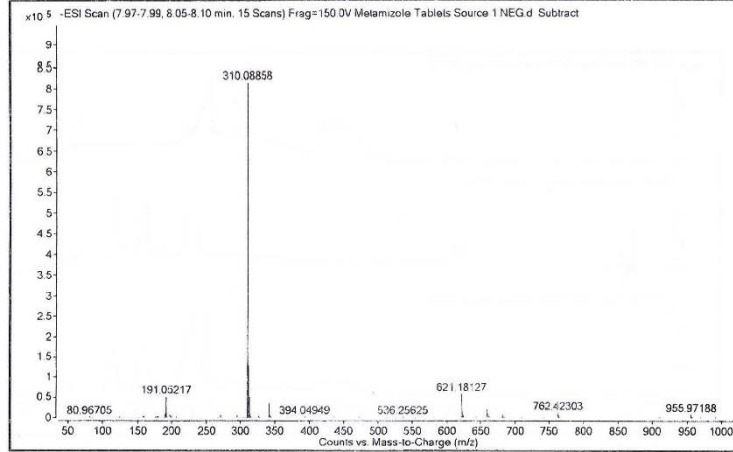
u. Metamizole Tablets – Diluent (Methanol)



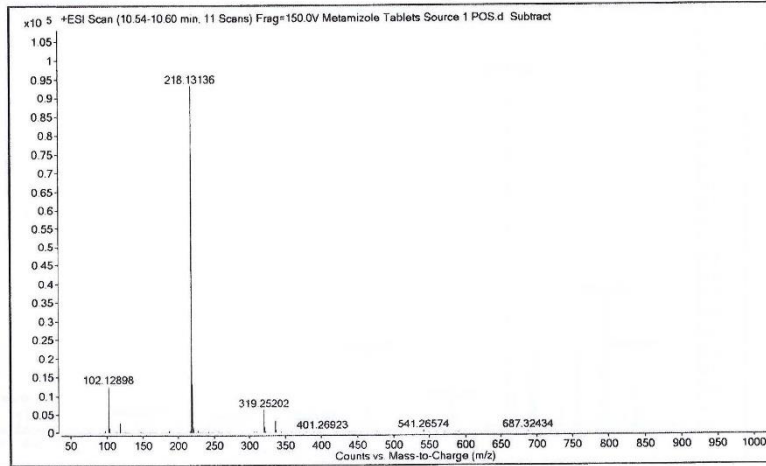
v. Metamizole Tablets (1mg/mL) – Total Ion Count – Source I



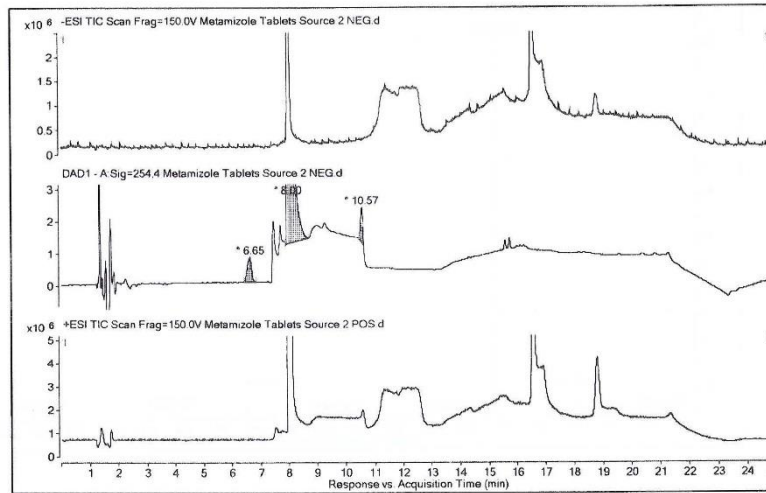
w. Metamizole Tablets – MS Spectra of Metamizole – Source I



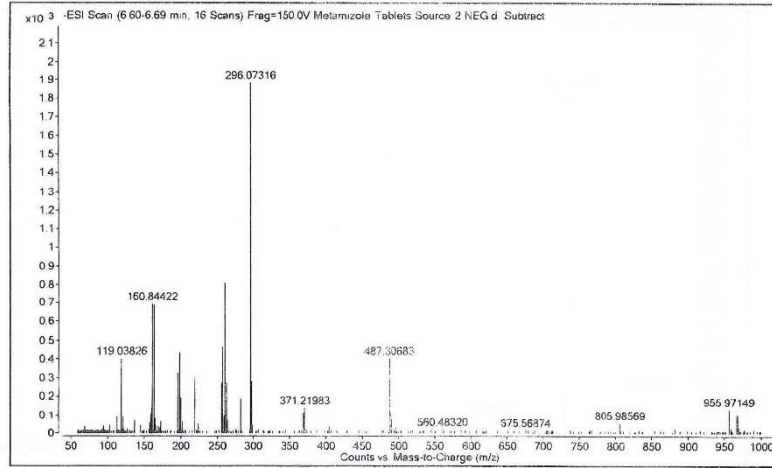
x. Metamizole Tablets – MS Spectra of Impurity C – Source I



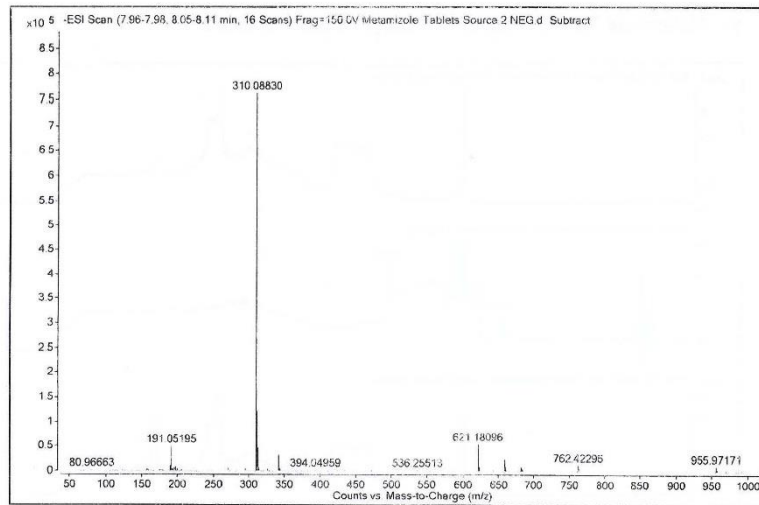
y. Metamizole Tablets (1mg/mL) – Total Ion Count – Source II



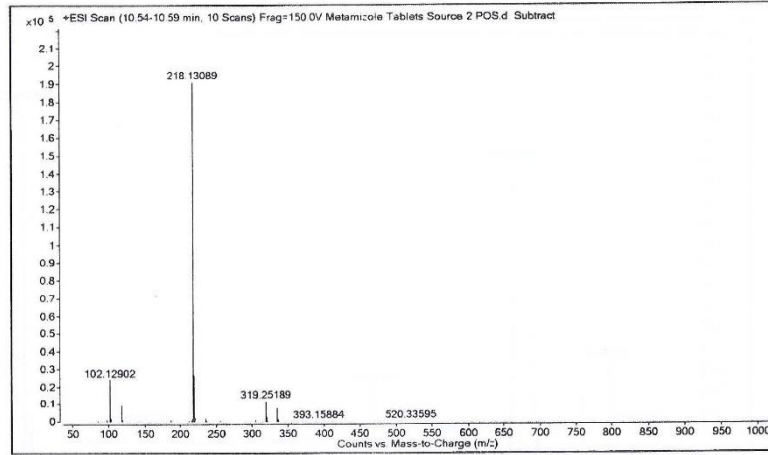
z. Metamizole Tablets – MS Spectra of Impurity E – Source II



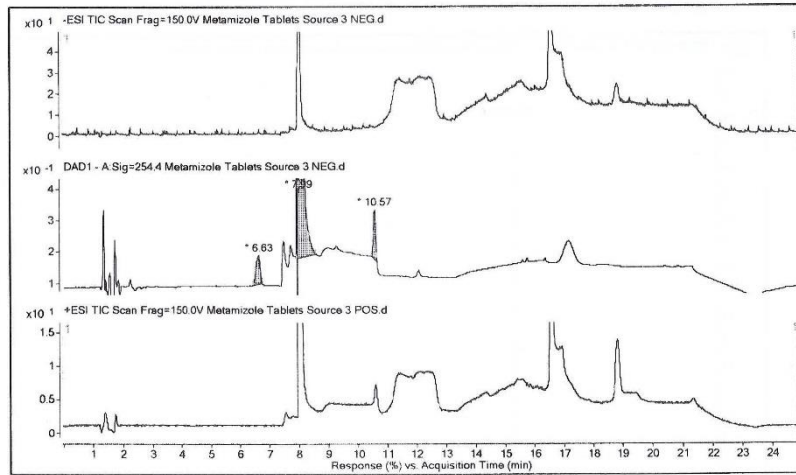
aa. Metamizole Tablets – MS Spectra of Metamizole – Source II



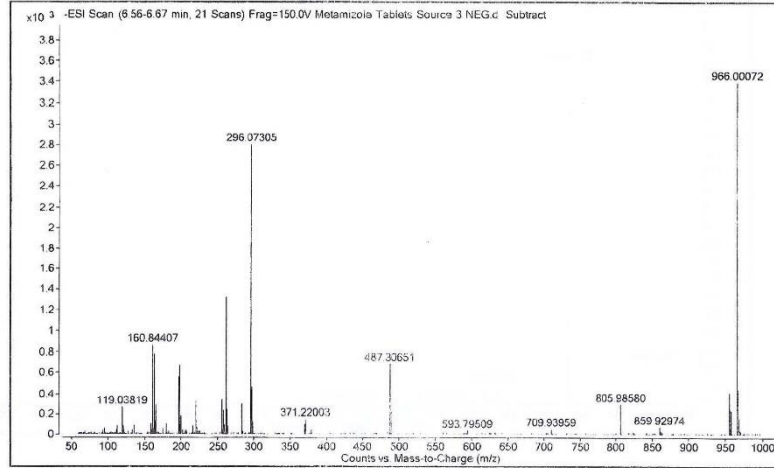
bb. Metamizole Tablets – MS Spectra of Impurity C – Source II



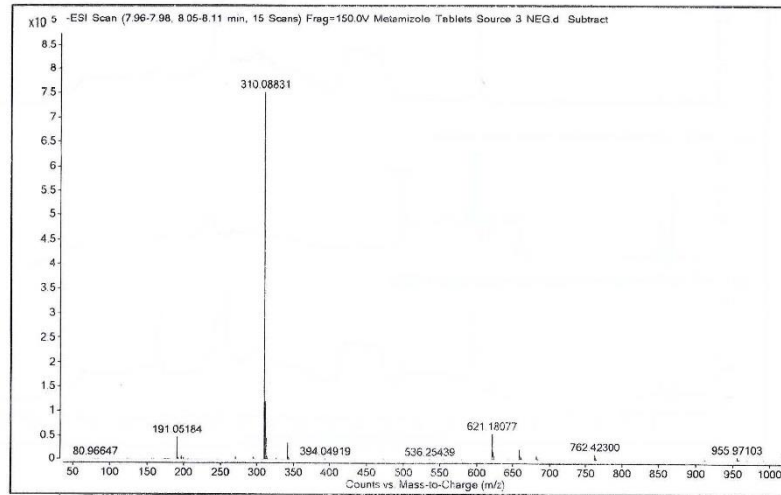
cc. Metamizole Tablets (1mg/mL) – Total Ion Count – Source III



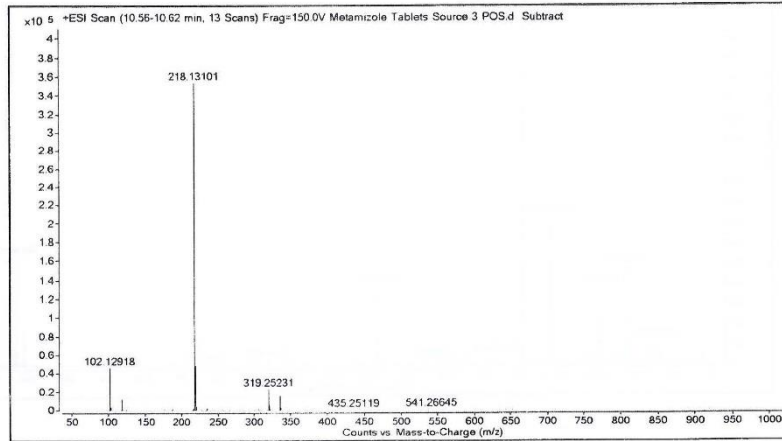
dd. Metamizole Tablets – MS Spectra of Impurity E – Source III



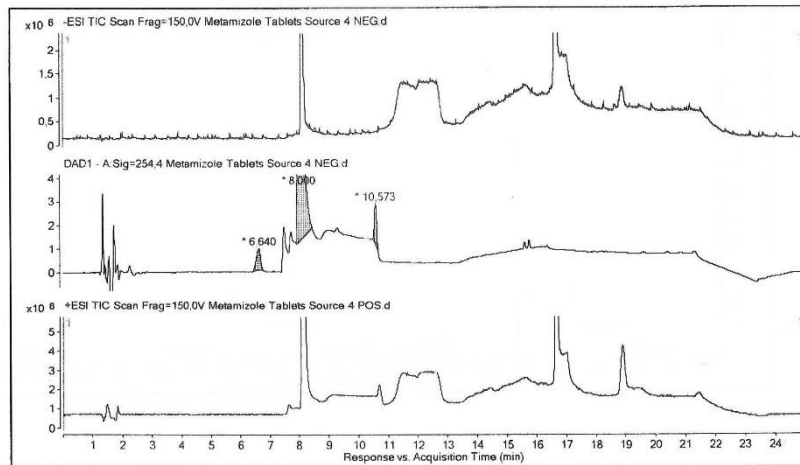
ee. Metamizole Tablets – MS Spectra of Metamizole – Source III



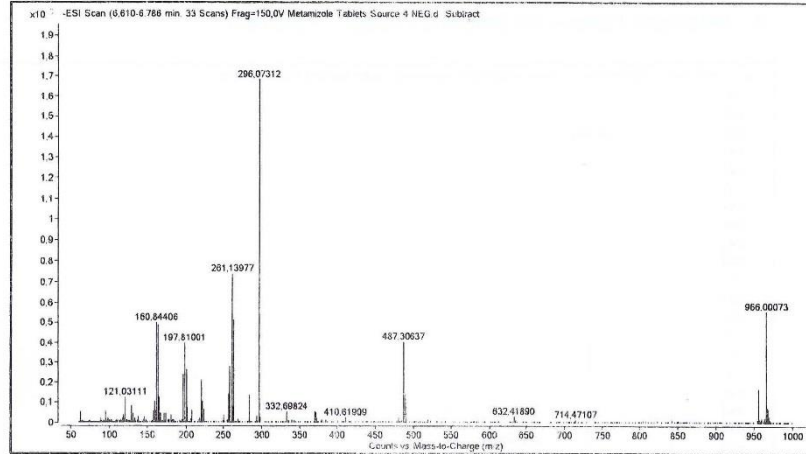
ff. Metamizole Tablets – MS Spectra of Impurity C – Source III



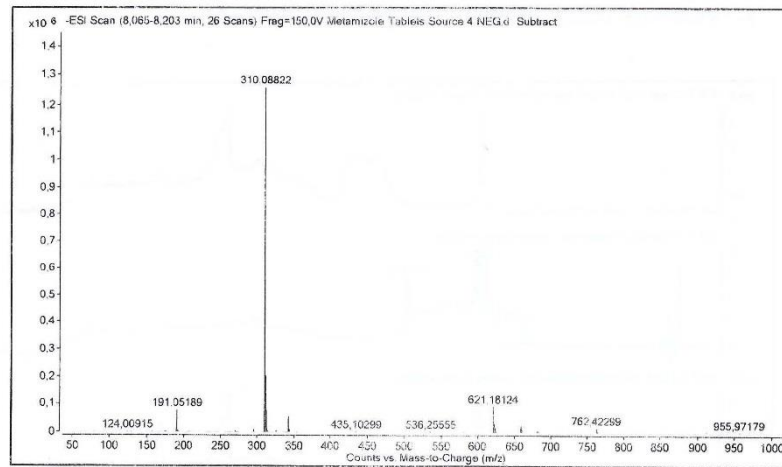
y. Metamizole Tablets (1mg/mL) – Total Ion Count – Source IV



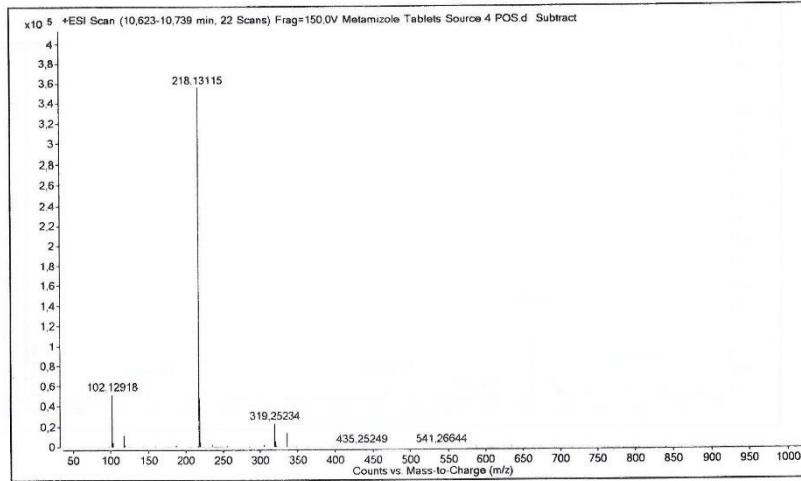
z. Metamizole Tablets – MS Spectra of Impurity E – Source IV



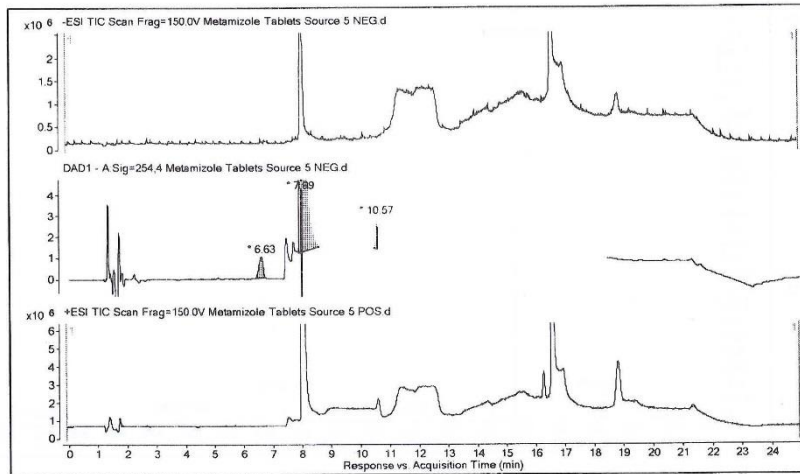
aa. Metamizole Tablets – MS Spectra of Metamizole – Source IV



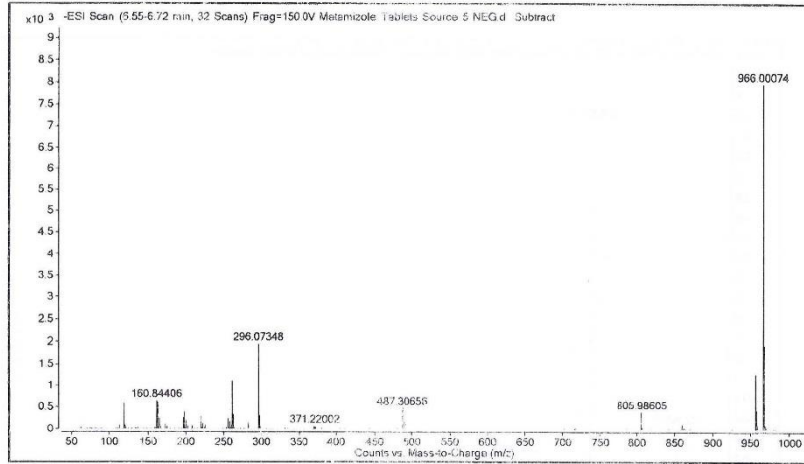
bb. Metamizole Tablets – MS Spectra of Impurity C – Source IV



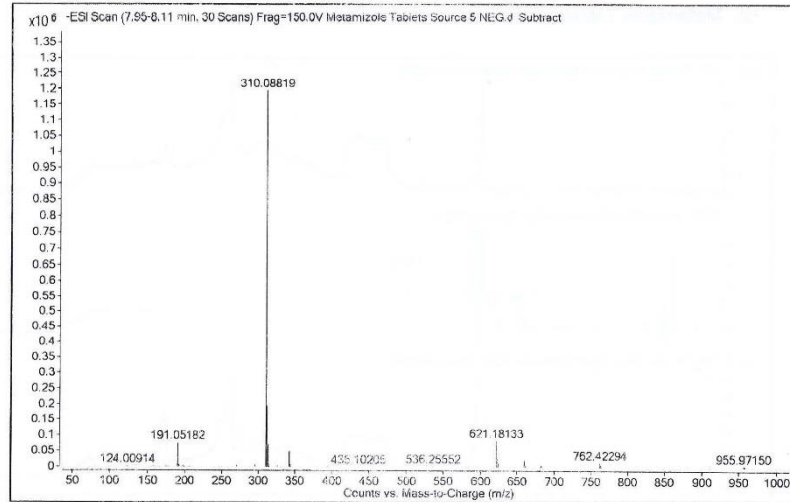
cc. Metamizole Tablets (1mg/mL) – Total Ion Count – Source V



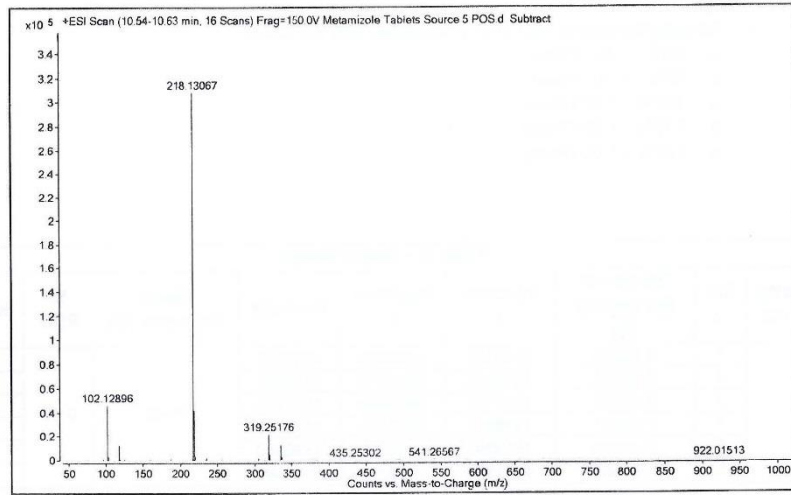
dd. Metamizole Tablets – MS Spectra of Impurity E – Source V



ee. Metamizole Tablets – MS Spectra of Metamizole – Source V



ff. Metamizole Tablets – MS Spectra of Impurity C – Source V



iv. Range

1. Acceptable criteria: NLT 0.95 (Probability over 80-120%)
 - a. 80% - 1.00 (Pass)
 - b. 90% - 1.00 (Pass)
 - c. 100% - 1.00 (Pass)
 - d. 110% - 1.00 (Pass)
 - e. 120% - 1.00 (Pass)

Linearity level (%)	Sol 'n	Weight of the sample (g)	Injection 1	Injection 2	Average	Mean Recovery (%)	% RSD	% Assay
80	1	0.80020	1546122	1524969	1535546	99.66	0.60	78.19
	2	0.80014	1516902	1542275	1529589			77.90
	3	0.80009	1547162	1531086	1539124			78.39
	4	0.80011	1556042	1503405	1529724			77.91
	5	0.80092	1513391	1548372	1530882			77.89
	6	0.80051	1521151	1510216	1515684			77.15
90	1	0.90045	1696011	1698819	1697315	100.72	0.74	86.41
	2	0.90070	1717814	1711286	1714550			87.26
	3	0.90059	1702411	1734057	1718234			87.45
	4	0.90017	1730837	1729355	1730096			88.11
	5	0.90005	1691668	1744675	1718172			87.51
	6	0.90077	1744031	1710186	1727109			87.90
100	1	1.00002	1882884	1861012	1871948	99.28	0.39	95.35
	2	1.00055	1866359	1871916	1869138			95.14
	3	1.00096	1862313	1857333	1859823			94.64
	4	1.00037	1862591	1864180	1863387			94.83
	5	1.00044	1852730	1862436	1857583			94.57
	6	1.00055	1879113	1866556	1872835			95.33
110	1	1.10003	2073543	2031173	2052358	100.53	0.75	104.53
	2	1.10016	2090028	2066695	2078362			105.85
	3	1.10066	2073361	2078350	2075856			105.67
	4	1.10069	2045818	2046167	2045993			104.15
	5	1.10062	2048714	2046814	2047764			104.24
	6	1.10059	2051312	2061708	2056510			104.65
120	1	1.20011	2225487	2209014	2217251	99.81	0.73	112.93
	2	1.20052	2207030	2213003	2210017			112.52
	3	1.20023	2223211	2206761	2215986			112.85
	4	1.20090	2178684	2214413	2196549			111.80
	5	1.20038	2197577	2241685	2219631			113.02
	6	1.20082	2252236	2232884	2242560			114.15