

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE (CONVÊNIO UnB/UFG/UFMS)**

**Dione Marçal Lima**

**Estudo da estabilidade e do perfil de liberação de  
comprimidos de maleato de enalapril e  
determinação da concentração plasmática em  
pacientes**

Goiânia  
Fevereiro/2008

**Dione Marçal Lima**

**Estudo da estabilidade e do perfil de liberação de comprimidos de maleato de enalapril e determinação da concentração plasmática em pacientes**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Convênio UnB/UFG/UFMS) como exigência parcial a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

***Orientadora: Profa. Dra. Eliana Martins Lima***

Goiânia  
Fevereiro/2008

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Banca Examinadora da Tese de Doutorado “Estudo da estabilidade e do perfil de liberação de comprimidos de maleato de enalapril e determinação da concentração plasmática em pacientes”, apresentada pela doutoranda Dione Marçal Lima ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (Convênio UnB/UFG/UFMS), em 15/02/2008.

---

Profa. Dra. Eliana Martins Lima – Faculdade de Farmácia-UFG

---

Profa. Dra. Silvia Storpirtis – Faculdade de Farmácia – USP

---

Prof. Dr. Paulo César Brandão Veiga Jardim – Faculdade de Medicina –UFG

---

Prof. Dr. Pedro Alves Lemos Neto – INCOR – Faculdade de Medicina - USP

---

Profa. Dra. Maria Teresa Freitas Bara – Faculdade de Farmácia – UFG

Suplente:

---

Profa.Dra. Clévia Ferreira Duarte Garrote – Faculdade de Farmácia - UFG

---

---

“Esta é vitória que vence o mundo, a nossa fé.”  
(1 Jo. 5:4)

“Mude, mas comece devagar, porque a direção é mais importante que a velocidade.”

Clarice Lispector

Dedico este trabalho aos meus filhos: Alexandre Augusto e Ana Clara,  
por serem eles parte da minha herança e por acreditar que meu envolvimento com o  
mundo científico possa servir de estímulo para o futuro profissional deles.  
E ao meu esposo Ênio Alexandre por seu amor, compreensão e respeito, componentes do  
seu caráter que transcende a nossa relação.

## **Agradecimentos**

---

Agradeço especialmente a Deus, por saber que ele é soberano e está no controle de todas as coisas;

Aos meus familiares, meus grandes parceiros não só agora mas em muitas etapas importantes da minha vida, que se alegram com minhas conquistas, especialmente minhas tias Ana, Nariene, Nelcina, Divina e tio Batista;

A minha sogra (*in memoriam*) pelo cuidado e amor dispensado a nós enquanto estive entre nós e ao meu sogro pelo exemplo de vida;

Aos amigos de sempre Anício e Stella, “mais chegados que um irmão”.

A minha orientadora, professora e colega, Dra. Eliana Martins Lima, por acreditar no meu trabalho, pela oportunidade e suporte para meu crescimento científico;

Aos meus colegas do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica pelo excelente convívio e troca de experiências. Em especial, as minhas amigas do coração Danielle e Fernanda e ao bolsista Leandro;

Sou muito grata à equipe de trabalho do ICF, sempre prestativos. Meu carinho a todos.

Ao Prof. Dr. Paulo César B. Veiga Jardim, pela parceria no desenvolvimento do estudo clínico junto a Liga de Hipertensão Arterial/HC/UFG;

Ao Laboratório Rômulo Rocha da Faculdade de Farmácia/UFG, na figura do colega Ramias e da Profa Joana D’arc Ximenes pelo apoio no desenvolvimento de parte desse trabalho;

Aos professores e colegas da Faculdade de Farmácia da UFG, pelo incentivo ao constante aperfeiçoamento científico.

## RESUMO

A estabilidade de uma formulação farmacêutica pode ser considerada um fator determinante para garantir a qualidade de um medicamento e conseqüentemente sua eficácia no tratamento. O anti-hipertensivo enalapril é um pró-fármaco que, ao ser absorvido, é hidrolisado a enalaprilato, agente que atua bloqueando a transformação de angiotensina I em angiotensina II, sendo a substância responsável pela ação farmacológica. A estabilidade das formulações contendo o maleato de enalapril pode ser afetada quando expostas a altos níveis de temperatura e umidade, sendo observada a formação de dois produtos de degradação: enalaprilato e dicetopiperazina. Neste trabalho, estudo de estabilidade pelo envelhecimento acelerado e a determinação da concentração plasmática do fármaco foram utilizados para avaliar a qualidade de diferentes especialidades farmacêuticas (Referência, Genéricos e Similares) do maleato de enalapril, na forma de comprimidos de 20 mg. A constatação de que o maleato de enalapril pode ser facilmente degradado em condições ambientais adversas foi comprovada através da verificação do teor inadequado de enalapril em cinco das nove especialidades avaliadas ao final do ensaio de estabilidade pelo envelhecimento acelerado. Além disso, na avaliação do perfil de dissolução das amostras nos diferentes tempos do ensaio de estabilidade, foram observadas diferenças no modelo de liberação do fármaco quando comparado ao produto Referência e a dissolução ao final de 30 minutos do teste mostrou-se comprometida pela degradação do princípio ativo. As alterações observadas no teor e perfil de dissolução do enalapril em alguns dos medicamentos analisados no estudo pode ser um indicativo de comprometimento da biodisponibilidade *in vivo*. No ensaio *in vivo*, concentrações plasmáticas mais baixas foram determinadas nas amostras obtidas dos pacientes tratados com o produto Genérico ou Similar, reforçando a hipótese de que o teste de bioequivalência pode não ser considerado um parâmetro definitivo na determinação da qualidade do produto para fármacos de alguns grupos farmacológicos, indicando a necessidade de que, em alguns casos, ensaios *in vivo* devam ser realizados em condições clínicas normais.

Palavras-chave: Estabilidade, enalapril, comprimidos, dissolução, equivalência.

## **ABSTRACT**

The stability of a pharmaceutical formulation can be a major factor in assuring the quality of a drug product and, as a consequence, the efficacy of the treatment. Enalapril is an anti-hypertensive pro-drug that, after being absorbed, is hydrolysed into enalaprilat, an agent responsible for blocking the conversion of angiotensin I into angiotensin II. Stability of formulations containing enalapril maleate can be affected when exposed to high levels of temperature and humidity, with the formation of two degradation products: enalaprilat and diketopiperazine. In this work, the quality of different commercially available tablets of 20mg of enalapril maleate (Reference, generic and similar products) was evaluated by both an accelerated stability study and by monitoring the plasma concentration of this drug in patients. Previous indications that enalapril can be easily decomposed under adverse environmental conditions were proven by the results of the accelerated stability studies obtained in this work, in which five out of the nine samples analyzed did not exhibit the specified amount of drug. In addition, the evaluation of the dissolution profile of the tables showed marked differences in the drug release mechanism. Also, at the end of 30 minutes of the test, the dissolution was altered by the degradation of the drug. During the clinical study, lower plasma concentrations were found in patients under treatment with generic and similar products. Changes observed in the drug concentration and dissolution profile for some of the samples in this study may be an indication of a compromised bioavailability.

Key words: Stability, enalapril, tablets, dissolution, equivalency.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPL	Boas Práticas de Laboratório
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CL-EM-EM	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas
Cmax	Concentração plasmática máxima
CQA	Controle de Qualidade Alto
CQB	Controle de Qualidade Baixo
CQM	Controle de Qualidade Médio
CV	Coeficiente de Variação
DCB	Denominação Comum Brasileira
DCI	Denominação Comum Internacional
DPR	Desvio Padrão Relativo
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ECCD	Estabilidade do Ciclo Congelamento Descongelamento
ELD	Estabilidade de Longa Duração
ESP	Estabilidade das Soluções Padrão
FC	Frequência Cardíaca
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HC	Hospital das Clínicas
HLB	<i>Hydrophilic Lipophylic Balance</i> (Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
INGOH	Instituto Goiano de Hemoterapia
JNC	<i>Joint National Committee</i>
LC-MS	<i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas)
LHA	Liga de Hipertensão Arterial
LQ	Limite de Quantificação
m/z	massa/carga
NIH	<i>National Institute of Health</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PI	Padrão Interno
PVDF	Poli Vinil Dimetil Formamida
R	Coeficiente de Correlação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RENAME	Relação Nacional dos Medicamentos Essenciais
rpm	rotações por minuto
SBH	Sociedade Brasileira de Hipertensão
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extração em fase sólida)
UFG	Universidade Federal de Goiás
UR	Umidade Relativa
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV-VIS	Ultravioleta – Visível

WHO

*World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Condições de armazenamento para realização dos ensaios de estabilidade de longa duração de acordo com a classificação das diferentes zonas climáticas.....	34
<b>Quadro 2</b> - Condições gerais preconizadas pela ANVISA para realização dos estudos de estabilidade de formas farmacêuticas sólidas no Brasil.....	35
<b>Quadro 3</b> - SCB (Sistema de Classificação Biofarmacêutica) dos fármacos.	41
<b>Quadro 4</b> - Relação dos equipamentos utilizados na realização dos experimentos.....	54
<b>Quadro 5</b> - Relação das matérias primas, reagentes e acessórios utilizados na realização dos experimentos.....	54
<b>Quadro 6</b> - Descrição dos componentes do equipamento de CLAE-UV.....	57

<b>Quadro 7</b> - Condições cromatográficas empregadas na definição do método de separação, identificação e quantificação do enalapril e seus produtos de degradação em comprimidos.....	58
<b>Quadro 8</b> - Especificações para determinação do perfil de dissolução das amostras de maleato de enalapril.....	62
<b>Quadro 9</b> – Descrição dos componentes do equipamento de CL-EM-EM....	69
<b>Quadro 10</b> - Relação das amostras biológicas utilizadas na validação do método bioanalítico.....	74
<b>Quadro 11</b> - Intervalo linear de trabalho estabelecido para detecção do enalapril e enalaprilato.....	109
<b>Quadro 12</b> - Concentrações de enalapril para o Limite de Quantificação e para os controles de qualidade.....	115
<b>Quadro 13</b> - Concentrações de enalaprilato para o Limite de Quantificação e para os controles de qualidade.....	115

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Mecanismo para hidrólise do enalapril em meio alcalino.....	37
<b>Figura 2</b> - Mecanismo para ciclização intramolecular do enalapril em meio ácido.....	38
<b>Figura 3</b> - Câmara Climática 420 CLD, Nova Ética. Localização: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica – FF/UFG.....	56
<b>Figura 4</b> - Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Varian). Localização: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica – FF/UFG.....	57
<b>Figura 5</b> - Curva de calibração do enalapril obtida através da análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Condições cromatográficas: coluna C18 a 60° C, fase móvel acetonitrila e tampão fosfato (25:75 v/v) e fluxo de 1,5 mL/min. Detecção por UV (215 nm).....	60
<b>Figura 6</b> - Dissolutor Vankel 7000 acoplado espectrofotômetro UV Cary 50 (Varian), sistema <i>total solution</i> . Localização: Laboratório de Tecnologia	

Farmacêutica – FF/UFG.....	61
<b>Figura 7</b> - Curva de Calibração do enalapril 20 mg para análise da dissolução. Sistema <i>total solution</i> , detecção UV – 215 nm.....	63
<b>Figura 8</b> - Cromatogramas representativos dos padrões de maleato de enalapril (A), enalaprilato (B) e produto de degradação dicetopiperazina (C). Condições cromatográficas: coluna C18 a 60° C, fase móvel acetonitrila e tampão fosfato (25:75 v/v), fluxo de 1,5 mL/min. Detecção por UV (215 nm).....	80
<b>Figura 9</b> - Cromatogramas obtidos na quantificação e separação do enalapril (t.r. 11.5 min.) do medicamento Referência nos diferentes tempos de análise do ensaio de estabilidade t=0 (A), t=30 (B), t=90 (C) e t=180 dias (D). (t.r. = tempo de retenção). Condições cromatográficas: coluna C18 a 60° C, fase móvel acetonitrila e tampão fosfato (25:75 v/v), fluxo de 1,5 mL/min. Detecção por UV (215 nm).....	82
<b>Figura 10</b> - Cromatogramas obtidos na quantificação e separação do enalapril (t.r. 11.5 min.) e seus produtos de degradação enalaprilato (t.r. 2.5 min.) e dicetopiperazina (t.r. 31 min) do medicamento Genérico A nos diferentes tempos de análise do ensaio de estabilidade t=0 (A), t=30 (B), t=90 (C) e t=180 dias (D). (t.r. = tempo de retenção). Condições cromatográficas: coluna C18 a 60° C, fase móvel acetonitrila e tampão fosfato (25:75 v/v) e fluxo de 1,5 mL/min. Detecção por UV (215 nm).....	83
<b>Figura 11</b> - Cromatogramas obtidos na quantificação e separação do enalapril (t.r. 11.5 min.) do medicamento Similar B nos diferentes tempos de análise do ensaio de estabilidade t=0 (A), t=30 (B), t=90 (C) e t=180 dias (D). (t.r. = tempo de retenção). Condições cromatográficas: coluna C18 a 60° C, fase móvel acetonitrila e tampão fosfato (25:75 v/v) e fluxo de 1,5 mL/min. Detecção por UV (215 nm).....	85
<b>Figura 12</b> - Demonstração da perda progressiva do teor de enalapril nas amostras incluídas no estudo ao longo do ensaio acelerado da estabilidade.....	87
<b>Figura 13</b> - Perfis de dissolução do maleato de enalapril em comprimidos de 20mg (Referência e Genéricos) no tempo zero do estudo de estabilidade. Teste de dissolução em meio tampão fosfato de potássio 50mM (pH 6,8) usando aparato 2, com agitação de 50 rpm.....	88
<b>Figura 14</b> - Perfis de dissolução do maleato de enalapril em comprimidos de 20mg (Referência e Genéricos) aos trinta dias do estudo de estabilidade. Teste de dissolução em meio tampão fosfato de potássio 50mM (pH 6,8) usando aparato 2, com agitação de 50 rpm.....	88

- Figura 15** - Perfis de dissolução do maleato de enalapril em comprimidos de 20mg (Referência e Genéricos) aos noventa dias do estudo de estabilidade. Teste de dissolução em meio tampão fosfato de potássio 50mM (pH 6,8) usando aparato 2, com agitação de 50 rpm..... 89
- Figura 16** - Perfis de dissolução do maleato de enalapril em comprimidos de 20mg (Referência e Genéricos) no tempo final (180 dias) do estudo de estabilidade. Teste de dissolução em meio tampão fosfato de potássio 50mM (pH 6,8) usando aparato 2, com agitação de 50 rpm..... 89
- Figura 17** - Perfis de dissolução do maleato de enalapril em comprimidos de 20mg (Referência e Similares) no tempo zero do estudo de estabilidade. Teste de dissolução em meio tampão fosfato de potássio 50mM (pH 6,8) usando aparato 2, com agitação de 50 rpm..... 91
- Figura 18** - Perfis de dissolução do maleato de enalapril em comprimidos de 20mg (Referência e Similares) aos trinta dias do estudo de estabilidade. Teste de dissolução em meio tampão fosfato de potássio 50mM (pH 6,8) usando aparato 2, com agitação de 50 rpm..... 91
- Figura 19** - Perfis de dissolução do maleato de enalapril em comprimidos de 20mg (Referência e Similares) aos noventa dias do estudo de estabilidade. Teste de dissolução em meio tampão fosfato de potássio 50mM (pH 6,8) usando aparato 2, com agitação de 50 rpm..... 92
- Figura 20** - Perfis de dissolução do maleato de enalapril em comprimidos de 20mg (Referência e Similares) no tempo final (180 dias) do estudo de estabilidade. Teste de dissolução em meio tampão fosfato de potássio 50mM (pH 6,8) usando aparato 2, com agitação de 50 rpm..... 92
- Figura 21** - Comparação do perfil de dissolução de comprimidos de 20mg do maleato de enalapril (Referência e Genérico B) no final (180 dias) do ensaio de estabilidade (40°C, 75%UR). Teste de dissolução em meio tampão fosfato de potássio 50mM (pH 6,8) usando aparato 2, com agitação de 50 rpm..... 96
- Figura 22** - Comparação do perfil de dissolução de comprimidos de 20mg do maleato de enalapril (Referência e Genérico C) no final (180 dias) do ensaio de estabilidade (40°C, 75%UR). Teste de dissolução em meio tampão fosfato de potássio 50mM (pH 6,8) usando aparato 2, com agitação de 50 rpm..... 97
- Figura 23** - Comparação do perfil de dissolução de comprimidos de 20mg do maleato de enalapril (Referência e Similar B) no final (180 dias) do ensaio de estabilidade (40°C, 75%UR). Teste de dissolução em meio tampão fosfato de potássio 50mM (pH 6,8) usando aparato 2, com

agitação de 50 rpm.....	97
<b>Figura 24</b> - Perfis de dissolução do produto Referência nos diferentes tempos do estudo de estabilidade (40°C, 75%UR). Teste de dissolução em meio tampão fosfato de potássio 50mM (pH 6,8) usando aparato 2, com agitação de 50 rpm.....	98
<b>Figura 25</b> - Perfis de dissolução do produto Similar F nos diferentes tempos do estudo de estabilidade (40°C, 75%UR). Teste de dissolução em meio tampão fosfato de potássio 50mM (pH 6,8) usando aparato 2, com agitação de 50 rpm.....	99
<b>Figura 26</b> - Perfis de dissolução dos comprimidos (mesmo lote) de maleato de enalapril do medicamento Genérico A durante o estudo de estabilidade (40°C, 75%UR). Teste de dissolução em meio tampão fosfato de potássio 50mM (pH 6,8) usando aparato 2, com agitação de 50 rpm.....	102
<b>Figura 27</b> - Perfis de dissolução dos comprimidos (mesmo lote) de maleato de enalapril do medicamento denominado Similar F durante o estudo de estabilidade acelerada (40°C, 75%UR). Teste de dissolução em meio tampão fosfato de potássio 50mM (pH 6,8) usando aparato 2, com agitação de 50 rpm.....	102
<b>Figura 28</b> - Cromatogramas obtidos a partir do plasma normal. Condições cromatográficas: coluna C18 a 25° C, fase móvel metanol e água acrescido de 0,1% de ácido fórmico (65:35 v/v) e fluxo de 0,6 mL/min. Detecção no EM no modo de ionização eletrospray positiva (ESI+).....	105
<b>Figura 29</b> - Cromatogramas obtidos a partir do plasma hiperlipêmico. Condições cromatográficas: coluna C18 a 25° C, fase móvel metanol e água acrescido de 0,1% de ácido fórmico (65:35 v/v) e fluxo de 0,6 mL/min. Detecção no EM no modo de ionização eletrospray positiva (ESI+)......	105
<b>Figura 30</b> - Cromatogramas obtidos a partir do plasma hemolisado. Condições cromatográficas: coluna C18 a 25° C, fase móvel metanol e água acrescido de 0,1% de ácido fórmico (65:35 v/v) e fluxo de 0,6 mL/min. Detecção no EM no modo de ionização eletrospray positiva (ESI+)......	106
<b>Figura 31</b> - Curva de calibração do enalapril (pró-fármaco) em plasma. Condições cromatográficas: coluna C18 a 25° C, fase móvel metanol e	

água acrescido de 0,1% de ácido fórmico (65:35 v/v) e fluxo de 0,6 mL/min. Detecção no EM no modo de ionização eletrospray positiva (ESI +)..... 111

**Figura 32** - Curva de calibração do enalaprilato (metabólito ativo) em plasma. Condições cromatográficas: coluna C18 a 25° C, fase móvel metanol e água acrescido de 0,1% de ácido fórmico (65:35 v/v) e fluxo de 0,6 mL/min. Detecção no EM no modo de ionização eletrospray positiva (ESI+)..... 111

**Figura 33** - Cromatograma obtido na determinação do limite de detecção do enalapril, através da relação sinal/ruído. Condições cromatográficas: coluna C18 a 25° C, fase móvel metanol e água acrescido de 0,1% de ácido fórmico (65:35 v/v) e fluxo de 0,6 mL/min..... 112

**Figura 34** - Cromatograma obtido na determinação do limite de detecção do enalaprilato, através da relação sinal/ruído. Condições cromatográficas: coluna C18 a 25° C, fase móvel metanol e água acrescido de 0,1% de ácido fórmico (65:35 v/v) e fluxo de 0,6 mL/min..... 113

**Figura 35** - Cromatogramas representativos obtidos na quantificação do enalapril (A), lisinopril (B) e enalaprilato (C) em plasma de voluntário tratado com medicamento Referência. Condições cromatográficas: coluna C18 a 25° C, fase móvel metanol e água acrescido de 0,1% de ácido fórmico (65:35 v/v) e fluxo de 0,6 mL/min. Detecção no EM no modo de ionização eletrospray positiva (ESI+)..... 130

**Figura 36** - Cromatogramas representativos obtidos na quantificação do enalapril (A), lisinopril (B) e enalaprilato (C) em plasma de voluntário tratado com medicamento Genérico. Condições cromatográficas: coluna C18 a 25° C, fase móvel metanol e água acrescido de 0,1% de ácido fórmico (65:35 v/v) e fluxo de 0,6 mL/min. Detecção no EM no modo de ionização eletrospray positiva (ESI+)..... 131

**Figura 37** - Cromatogramas representativos obtidos na quantificação do enalapril (A), lisinopril (B) e enalaprilato (C) em plasma de voluntário tratado com medicamento Similar. Condições cromatográficas: coluna C18 a 25° C, fase móvel metanol e água acrescido de 0,1% de ácido fórmico (65:35 v/v) e fluxo de 0,6 mL/min. Detecção no EM no modo de ionização

eletrospray positiva (ESI+)..... 131

**Figura 38** - Média da Pressão Arterial Sistêmica (Sistólica e Diastólica) determinada nos voluntários antes e durante o tratamento com maleato de enalapril R (Referência), G (Genérico) e S (Similar) no estudo clínico..... 136

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Classificação da pressão arterial de acordo com a medida casual no consultório (>18 anos)..... 25

**Tabela 2** - Diluições obtidas para preparação das soluções de trabalho do enalapril..... 71

**Tabela 3** - Diluições obtidas para preparação das soluções de trabalho do enalaprilato..... 72

**Tabela 4** - Tempos de retenção das substâncias que foram monitoradas através da CL-EM-EM..... 73

**Tabela 5** - Íons monitorados e condições de operação do EM-EM para quantificação das substâncias em estudo..... 73

**Tabela 6** - Teor de umidade detectado nas amostras de comprimidos de

maleato de enalapril incluídas no estudo ao final do ensaio acelerado de estabilidade (t=180 dias).....	84
<b>Tabela 7</b> - Teor de enalapril determinado nas diferentes especialidades farmacêuticas (comprimidos de 20 mg) em estudo durante o ensaio de estabilidade nos tempos 0, 30, 90 e 180 dias.....	86
<b>Tabela 8</b> - Valores das médias das concentrações de enalapril em mg dissolvida ( $\pm$ desvio padrão) em função do tempo, a partir dos produtos Referência e Genéricos no tempo zero do ensaio de estabilidade.....	90
<b>Tabela 9</b> - Valores das médias das concentrações de enalapril em mg dissolvida ( $\pm$ desvio padrão) em função do tempo, a partir dos produtos Referência e Genéricos aos trinta dias do ensaio de estabilidade.....	90
<b>Tabela 10</b> - Valores das médias das concentrações de enalapril em mg dissolvida ( $\pm$ desvio padrão) em função do tempo, a partir dos produtos Referência e Genéricos aos noventa dias do ensaio de estabilidade.....	90
<b>Tabela 11</b> - Valores das médias das concentrações de enalapril em mg dissolvida ( $\pm$ desvio padrão) em função do tempo, a partir dos produtos Referência e Genéricos no tempo final (180 dias) do ensaio de estabilidade. ....	90
<b>Tabela 12</b> - Valores das médias das concentrações de enalapril em mg dissolvida ( $\pm$ desvio padrão) em função do tempo, a partir dos produtos Referência e Similares no tempo zero do ensaio de estabilidade.....	93
<b>Tabela 13</b> - Valores das médias das concentrações de enalapril em mg dissolvida ( $\pm$ desvio padrão) em função do tempo, a partir dos produtos Referência e Similares aos trinta dias do ensaio de estabilidade.....	93
<b>Tabela 14</b> - Valores das médias das concentrações de enalapril em mg dissolvida ( $\pm$ desvio padrão) em função do tempo, a partir dos produtos Referência e Similares aos noventa dias do ensaio de estabilidade.....	93
<b>Tabela 15</b> - Valores das médias das concentrações de enalapril em mg dissolvida ( $\pm$ desvio padrão) em função do tempo, a partir dos produtos Referência e Similares no tempo final (180 dias) do ensaio de estabilidade.....	93
<b>Tabela 16</b> - Valores de $f_1$ e $f_2$ resultantes das comparações entre os perfis de dissolução das especialidades farmacêuticas (Genérico B, C e Similar C) e o produto Referência.....	98

<b>Tabela 17</b> - Resultados da recuperação do enalapril, em valores de área do pico cromatográfico obtido em cada amostra. CQB: amostra controle de qualidade baixo; CQA: amostra controle de qualidade alto.....	107
<b>Tabela 18</b> - Resultados da recuperação do enalaprilato, em valores de área do pico cromatográfico obtido em cada amostra. CQB: amostra controle de qualidade baixo; CQA: amostra controle de qualidade alto.....	107
<b>Tabela 19</b> - Resultados da recuperação do lisinopril (PI), em valores de área do pico cromatográfico obtido em cada amostra.....	108
<b>Tabela 20</b> – Desvios das concentrações nominais na curva analítica do enalapril.....	109
<b>Tabela 21</b> – Desvios das concentrações nominais na curva analítica do enalaprilato.....	110
<b>Tabela 22</b> - Desvios das concentrações nominais obtidas na determinação do LQ do enalapril.....	114
<b>Tabela 23</b> - Desvios das concentrações nominais obtidas na determinação do LQ do enalaprilato.....	114
<b>Tabela 24</b> - Resultados das análises para determinação da precisão (repetibilidade) e exatidão intra-corrída (Lote 1– Enalapril) do método de CL-EM-EM.....	116
<b>Tabela 25</b> - Resultados das análises para determinação da precisão (repetibilidade) e exatidão intra-corrída (Lote 1– Enalaprilato) do método de CL-EM-EM.....	116
<b>Tabela 26</b> - Resultados das análises para determinação da precisão (repetibilidade) e exatidão intra-corrída (Lote 2– Enalapril) do método de CL-EM-EM.....	117
<b>Tabela 27</b> - Resultados das análises para determinação da precisão (repetibilidade) e exatidão intra-corrída (Lote 2– Enalaprilato) do método de CL-EM-EM.....	117
<b>Tabela 28</b> - Resultados das análises para determinação da precisão (repetibilidade) e exatidão intra-corrída (Lote 3– Enalapril) do método de CL-EM-EM.....	118

<b>Tabela 29</b> - Resultados das análises para determinação da precisão (repetibilidade) e exatidão intra-corrída (Lote 3– Enalaprilato) do método de CL-EM-EM.....	118
<b>Tabela 30</b> - Resultados das análises usadas para determinação da precisão (repetibilidade) e exatidão inter-corrída do enalapril do método de CL-EM-EM.....	119
<b>Tabela 31</b> - Resultados das análises para determinação da precisão (repetibilidade) e exatidão inter-corrída do enalaprilato do método de CL-EM-EM.....	119
<b>Tabela 32</b> - Resultados da avaliação de diferentes variáveis para para determinação da robustez do método de quantificação do enalapril e enalaprilato.....	120
<b>Tabela 33</b> - Resultados das determinações de concentrações do enalapril nas amostras do CQB e CQA para determinação da estabilidade após ciclo de congelamento e descongelamento durante 3 dias.....	121
<b>Tabela 34</b> - Resultados das determinações de concentrações do enalaprilato nas amostras do CQB e CQA para determinação da estabilidade após ciclo de congelamento e descongelamento durante 3 dias.....	121
<b>Tabela 35</b> - Resultados das determinações de concentrações do lisinopril (PI) nas amostras do CQ para determinação da estabilidade após ciclo de congelamento e descongelamento durante 3 dias.....	122
<b>Tabela 36</b> - Resultados das concentrações de enalapril obtidas nas amostras do CQB e CQA após 8 horas de descongelamento a temperatura ambiente.....	123
<b>Tabela 37</b> - Resultados das concentrações de enalaprilato obtidas nas amostras do CQB e CQA após 8 horas de descongelamento a temperatura ambiente.....	123
<b>Tabela 38</b> - Resultados da concentração do lisinopril obtidas nas amostras do CQ após 8 horas de descongelamento a temperatura ambiente.....	124
<b>Tabela 39</b> - Resultados da avaliação da estabilidade de longa duração	125

do enalapril.....	
<b>Tabela 40</b> - Resultados da análise da estabilidade das soluções padrão de enalapril após serem mantidas 12 horas à temperatura ambiente.....	126
<b>Tabela 41</b> - Resultados da análise da estabilidade das soluções padrão de enalaprilato após serem mantidas 12 horas à temperatura ambiente....	126
<b>Tabela 42</b> - Resultados da análise da estabilidade das soluções padrão de lisinopril (PI) após serem mantidas 12 horas à temperatura ambiente...	127
<b>Tabela 43</b> - Resultados da análise da estabilidade das soluções padrão de enalapril após 7 dias de estocagem em freezer a – 20°C.....	128
<b>Tabela 44</b> - Resultados da análise da estabilidade das soluções padrão de enalaprilato após 7 dias de estocagem em freezer a – 20°C.....	128
<b>Tabela 45</b> - Resultados da análise da estabilidade das soluções padrão de lisinopril (PI) após 7 dias de estocagem em freezer a – 20°C.....	129
<b>Tabela 46</b> - Média e desvio padrão da concentração plasmática do enalapril e seu metabólito ativo (enalaprilato) determinada nas amostras dos voluntários incluídos no estudo clínico.....	132
<b>Tabela 47</b> - Resultado da aplicação do Teste de Tukey para comparação entre os grupos de tratamento, utilizando o parâmetro das médias apenas da concentração plasmática do fármaco ativo (enalaprilato).....	133
<b>Tabela 48</b> - Resultado da aplicação do Teste de Tukey para comparação entre os grupos de tratamento, utilizando o parâmetro das médias da concentração plasmática total do fármaco.....	133

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	6
<b>ABSTRACT</b> .....	7
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	8
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	10
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	11
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	16
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	24
....	
1.1. Hipertensão.....	24
1.2. Tratamento medicamentoso da hipertensão.....	26
1.3. Descrição pormenorizada do fármaco proposto para estudo.....	30
1.4. Estabilidade das formas farmacêuticas.....	33
1.5. Dissolução de formas farmacêuticas sólidas de uso oral.....	38
1.6. Métodos analíticos empregados em análise de controle de qualidade	45

de fármacos.	
1.7. Validação de método bioanalítico.....	47
Mercado Farmacêutico no Brasil.....	49
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>53</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>54</b>
<b>3.1. Ensaios <i>in vitro</i>.....</b>	<b>54</b>
3.1.1. Material e instrumentação.....	54
3.1.2. Estudo acelerado da estabilidade dos comprimidos de maleato de enalapril.....	55
3.1.3. Análise de teor nos comprimidos de maleato de enalapril.....	56
3.1.3.1. Definição dos parâmetros em CLAE-UV para determinação do teor de enalapril.....	57
3.1.3.2. Método de preparação da fase móvel.....	58
3.1.3.3. Método de preparação das soluções padrão.....	59
3.1.3.4. Método de obtenção da curva de calibração do enalapril para determinação do teor .....	60
3.1.3.5. Método de preparação das amostras de comprimidos de maleato de enalapril incluídas no estudo para determinação do teor.....	60
3.1.4. Teste de dissolução dos comprimidos de maleato de enalapril.....	61
3.1.4.1. Parâmetros utilizados no ensaio de dissolução dos comprimidos de maleato de enalapril.....	61
3.1.4.2. Método de preparação do meio de dissolução.....	62
3.1.4.3. Método de obtenção da curva de calibração do enalapril para determinação do perfil de dissolução.....	63
3.1.4.4. Métodos utilizados na avaliação dos dados obtidos no ensaio de dissolução.....	64
3.1.5. Determinação do teor de umidade nos comprimidos de maleato de enalapril.....	65
<b>3.2. Ensaio <i>in vivo</i> (determinação da concentração plasmática do</b>	

<b>enalapril)</b> .....	65
3.2.1. Protocolo clínico.....	65
3.2.2. Delineamento do estudo.....	67
3.2.3. Procedimento para coleta de sangue dos voluntários.....	68
3.2.4. Análise do fármaco no plasma.....	69
3.2.5. Método de preparação das soluções padrão.....	70
3.2.6. Método de preparação da fase móvel.....	72
3.2.7. Condições cromatográficas.....	73
3.2.8. Condições de operação do espectrômetro de massas (EM).....	73
3.2.9. Material biológico utilizado na validação do método.....	74
3.2.9. Procedimento de extração do fármaco na amostra biológica.....	74
3.2.10. Validação do método bionalítico.....	75
<b>4. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	79
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	80
<b>5.1. Resultados dos ensaios <i>in vitro</i></b> .....	80
5.1.1. Resultados da análise de teor de enalapril nas amostras incluídas no estudo.....	80
5.1.2. Resultados dos ensaios de dissolução das amostras de comprimidos de maleato de enalapril incluídas no estudo.....	87
<b>5.2. Resultados do ensaio <i>in vivo</i> (monitoramento da concentração plasmática)</b> .....	104
5.2.1. Resultados da validação do método bionalítico para determinação do enalapril e enalaprilato no plasma.....	104
5.2.2. Resultados da quantificação do enalapril e enalaprilato no plasma.....	130
5.2.3. Resultados da análise estatística dos dados obtidos na quantificação do fármaco no plasma.....	133
5.2.4. Resultado da avaliação clínica dos pacientes.....	136
<b>6. CONCLUSÕES GERAIS E RECOMENDAÇÕES</b> .....	138
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	140
<b>8. ANEXO 1</b> .....	148

## INTRODUÇÃO

---

### 1.1. Hipertensão

A hipertensão arterial sistêmica é um distúrbio comum e geralmente progressivo, caracterizado pela elevação sustentada da pressão arterial. É considerada a doença cardiovascular mais comum (BENOWITS, 2003), sendo um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento de insuficiência renal, acidente vascular cerebral e outras cardiopatias (FUCHS, 1998; RANG et al, 2004).

No Brasil, em 2003, 27,4% dos óbitos registrados foram decorrentes de doenças cardiovasculares (SBH, 2006). A mortalidade por doença cardiovascular aumenta progressivamente com a elevação da pressão arterial, a partir de 115/75 mmHg (SBH, 2006); muito embora, o risco de doença cardiovascular em pacientes com hipertensão seja determinado não apenas pelo nível da pressão arterial, mas também pela presença ou ausência de doença de órgão alvo ou outros fatores de risco, tais como tabagismo, dislipidemia e diabetes. A obesidade e a inatividade física também são preditores de risco cardiovascular (NIH, 1997; WHELTON, 2004).

A hipertensão arterial e suas complicações são também responsáveis por alta frequência de internações, representando um custo global muito alto para o governo brasileiro. Em 2005, as doenças cardiovasculares foram responsáveis por 1.180.184 internações (SBH, 2006).

A prevalência da hipertensão arterial sistêmica nos países desenvolvidos está em torno de 20% (BROWN & HAYDOCK, 2000), sendo estimado que no mundo existam cerca de 600 milhões de hipertensos, segundo a Organização Mundial de Saúde (SBH, 2006).

No Brasil, não existem relatos oficiais a respeito da doença, os estudos de prevalência são poucos e não representativos. Inquéritos de base populacional realizados em algumas cidades do país apontam para uma alta prevalência de hipertensão arterial, variando de 22,3% a 43,9%, ocorrendo um aumento da ocorrência para quase o dobro quando são consideradas as pessoas com mais de 60 anos de idade (SBH, 2006).

Medidas repetidas e reprodutíveis da pressão arterial são comprovadamente o elemento chave para estabelecer o diagnóstico de hipertensão arterial. A Tabela 1 mostra os valores que permitem classificar os indivíduos adultos maiores de 18 anos de idade, de acordo com os níveis de pressão arterial, estabelecidos pela Sociedade Brasileira de Hipertensão (SBH) nas V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (SBH, 2006).

**Tabela 1** - Classificação da pressão arterial de acordo com a medida casual no consultório (> 18 anos).

<b>Classificação</b>	<b>Pressão sistólica (mmHg)</b>	<b>Pressão diastólica (mmHg)</b>
Ótima	< 120	< 80
Normal	< 130	< 85
Limítrofe	130-139	85-89
Hipertensão estágio 1	140-159	90-99
Hipertensão estágio 2	160-179	100-109
Hipertensão estágio 3	≥ 180	≥ 110
Hipertensão sistólica isolada	≥ 140	< 90

Quando as pressões sistólica e diastólica de um paciente situam-se em categorias diferentes, a maior deve ser utilizada para a classificação da pressão arterial.

Fonte: V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (SBH, 2006).

Um conceito reafirmado pelo Joint National Committee (JNC) de Prevenção, Detecção, Avaliação e Tratamento da Hipertensão Arterial é o de que o aumento do risco cardiovascular se inicia com níveis de pressão arterial considerado normal e aumenta de forma diretamente proporcional ao aumento da pressão arterial (NIH, 1997). Diante disto o JNC no seu 7º Relatório (NIH, 2003) propôs uma classificação da pressão arterial com algumas diferenças quando

comparada à classificação proposta pela SBH na V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, sendo estabelecido pelo JNC um estado de pré-hipertensão para Pressão Arterial Sistólica (PAS) entre 120-139 mmHg e Pressão Arterial Diastólica (PAD) de 80-89 mmHg, com a finalidade de destacar o potencial preventivo da adoção de modificações do estilo de vida nessa população. Ainda assim, é importante destacar que o limite de 140/90 mmHg continua como o ponto de corte para a definição e caracterização de hipertensão em todos os documentos oficiais que tratam da hipertensão arterial (POZZAN et al, 2003).

A maioria dos casos de hipertensão arterial não apresenta causa conhecida ou identificada, sabendo-se apenas que a elevação da pressão arterial está associada a um aumento global da resistência vascular periférica e/ou aumento do débito cardíaco. Em apenas 10-15% dos pacientes, é possível estabelecer uma causa específica para o desenvolvimento da patologia (BENOWITZ, 2003).

Evidências epidemiológicas indicam que a herança genética, o estresse psicológico e fatores ambientais e dietéticos podem contribuir para o desenvolvimento da hipertensão (BENOWITZ, 2003; SBH, 2006; WHELTON, 2004).

O exposto justifica o emprego de medidas de prevenção, detecção e tratamento da hipertensão arterial sistêmica. Estudos controlados indicam claramente que o controle rigoroso da pressão arterial é capaz de reduzir a morbidade e mortalidade cardiovascular associada (FUCHS, 1998; NEAL et al, 2000).

## **1.2. Tratamento medicamentoso da hipertensão**

A hipertensão representa um problema singular na terapêutica, já que se trata de uma doença crônica, que causa poucos sintomas até o estágio avançado (BENOWITS, 2003). A terapia farmacológica anti-hipertensiva, quando necessária, é administrada muitas vezes a pacientes assintomáticos, aos quais não proporciona alívio direto de algum desconforto; mas que tem a finalidade primordial de reduzir o risco cardiovascular associado, um conceito bem

fundamentado em diversas evidências científicas (POZZAN et al, 2003). Além disso, a fraca adesão à terapia anti-hipertensiva permanece um importante desafio terapêutico, o que contribui para o não controle adequado em mais de dois terços dos pacientes com hipertensão (NIH, 1997).

A decisão de iniciar o tratamento farmacológico exige a consideração de vários fatores: o grau de elevação da pressão arterial, a presença de doença de órgão alvo, a presença de doença cardiovascular clínica ou a observação de outros fatores de risco. Sabe-se que medidas referentes às modificações no estilo de vida, tais como diminuição da ingestão de sal e álcool, abandono do tabagismo se for o caso, e especialmente realização de atividade física regular e redução do peso corporal, são comprovadamente eficazes no auxílio ao controle da pressão arterial alta (POZZAN et al, 2003; WHELTON, 2004). No entanto a implementação da terapia medicamentosa quase sempre é necessária.

Um estudo conduzido por Neal et al (2000) demonstrou que pacientes hipertensos em uso de diuréticos, beta-bloqueadores, inibidores da Enzima Conversora da Angiotensina (ECA) e/ou bloqueadores de canais de cálcio, apresentaram redução de 35% - 40% do risco de acidente vascular cerebral, 20% - 25% do risco de aparecimento de doença coronariana e até 50% do risco de insuficiência cardíaca.

O grupo dos agentes anti-hipertensivos denominados inibidores da ECA ou cininase II, enzima presente nas membranas das células endoteliais, células epiteliais, cérebro e dispersa no sangue e em outros fluídos corporais, são efetivos no tratamento de diversas condições clínicas relacionadas ao sistema cardiovascular (BROWN & VAUGHAN, 1998).

Esses compostos antagonizam competitivamente a ECA, afetando a formação da angiotensina II, um potente vasoconstrictor, que também estimula a secreção da aldosterona, controla a reabsorção do sódio, exercendo assim efeitos hemodinâmicos consideráveis (EDEKI et al, 1994; RIBEIRO et al, 1996). Além do efeito anti-hipertensivo obtido fundamentalmente por diminuir a resistência vascular periférica, não ocorrendo alteração significativa no débito e frequência cardíaca (BENOWITZ, 2003), os inibidores da ECA oferecem propriedades adicionais, tais como: proteção vascular e atividade anti-trombolítica, ações favoráveis no que diz respeito à morbidade cardiovascular (REMKO, 2007).

Ao contrário de outros agentes anti-hipertensivos, os inibidores da ECA não produzem ativação simpática reflexa, diminuem a proteinúria e estabilizam a função renal, sendo úteis em pacientes hipertensos portadores de cardiopatia isquêmica ou nefropatia (EDEKI et al, 1994; NIH, 1997; SBH, 2002).

O primeiro fármaco inibidor da ECA desenvolvido para uso terapêutico foi o captopril, seguido pelo enalapril, um composto que se diferencia estruturalmente do captopril pela presença do grupo carboxila ao invés do sulfidril, mas com características semelhantes em relação à atividade farmacológica (MACFADYEN et al, 1993; REMKO, 2007).

A maioria dos fármacos pertencentes a esse grupo é administrada como pró-fármaco, já que esses apresentam melhor biodisponibilidade oral quando comparados ao fármaco ativo (BROWN & VAUGHAN, 1998).

Os fármacos anti-hipertensivos pertencentes ao grupo dos Inibidores da ECA podem ser instituídos no tratamento da hipertensão como monoterapia ou em associação com fármacos de outros grupos, em especial com diuréticos ou beta-bloqueadores (HANSSON et al, 1999). A experiência clínica tem demonstrado que, em cerca de 2/3 dos casos, a monoterapia não é suficiente para atingir as reduções de pressão previstas, havendo uma tendência à introdução precoce de terapêutica combinada de anti-hipertensivos (SBH, 2006).

A eficácia terapêutica dos inibidores da ECA no tratamento da hipertensão arterial, bem como na prevenção de eventos cardiovasculares relacionados, tem sido comprovada através de relatos de estudos controlados. Um estudo randomizado executado por Hansson et al (1999) comparando a proteção da morbidade e mortalidade cardiovascular conferida pelo captopril (um inibidor da ECA) e os outros tratamentos convencionais, sugeriu que os inibidores da ECA são tão efetivos para essa finalidade quanto os demais fármacos anti-hipertensivos convencionais. Outro estudo clínico que comparou os inibidores da ECA no controle da hipertensão e prevenção de eventos cardiovasculares indesejáveis, em comparação com placebo, demonstrou redução na ocorrência de acidente vascular periférico em 30%, doença isquêmica cardíaca em 20%, outros eventos cardiovasculares maiores 21% e mortalidade total 16% (NEAL et al, 2000). O uso crônico dos inibidores da ECA favorece o aumento da eficácia desse grupo farmacológico no controle da pressão arterial (BROWN & VAUGHAN, 1998).

O maleato de enalapril, inibidor da ECA alvo desse estudo, é um pró-fármaco que não origina atividade biológica direta. Após a administração oral, o maleato de enalapril é rapidamente absorvido e a seguir, na corrente sanguínea é hidrolisado em seu metabólito ativo, o enalaprilato, um potente inibidor da enzima de conversão da angiotensina (ABOUL-ENEIN et al, 2005; MACFADYEN et al, 1993; STANISZ, 2003).

O maleato de enalapril é utilizado nas formulações sólidas de liberação imediata por apresentar uma absorção oral superior ao enalaprilato, substância responsável pela propriedade farmacológica (RIBEIRO et al, 1996; ZOPPI et al, 2005). Enquanto o enalapril apresenta após administração oral uma absorção em torno de 55 a 75%, uma preparação de enalaprilato é absorvida apenas 3 a 12% (PORTOLÉS et al, 2004).

O início da ação do maleato de enalapril é suave e gradativo; inicia-se dentro de uma hora e seus efeitos geralmente continuam por 24 horas. O controle da pressão arterial é, em geral, obtido após alguns dias de tratamento (MACFADYEN et al, 1993).

Vários estudos têm confirmado a eficácia clínica do enalapril no tratamento de todas as classes de hipertensão essencial e renovascular, por diminuir a resistência vascular periférica, bem como no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva (ABOUL-ENEIN et al, 2005; EDEKI et al, 1994; PORTOLÉS et al, 2004). Estudo controlado e randomizado, com 50 pacientes que fizeram uso do enalapril para controle dos níveis pressóricos, demonstrou que a administração desse fármaco foi eficaz em 98% dos pacientes (ESPINEL et al, 1990).

Sato et al (1992) também investigaram a eficácia clínica do enalapril em 21 pacientes com insuficiência cardíaca e a avaliação hemodinâmica demonstrou redução na resistência vascular periférica e conseqüente redução da pressão arterial.

A escolha do maleato de enalapril para este estudo foi baseada em dois critérios. O primeiro critério foi pela relevância deste fármaco no arsenal terapêutico, incluído na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) do Ministério da Saúde (BRASIL, 2002), bem como os altos índices de uso do fármaco no tratamento da hipertensão arterial. O segundo critério foi a verificação de sua susceptibilidade à degradação em condições ambientais

adversas. Estudos sobre a estabilidade das formulações contendo o maleato de enalapril foram realizados por diversos pesquisadores (AL-OMARI et al, 2001; LIN et al, 2002; QIN et al, 1995; STANISZ, 2003).

### 1.3. Descrição pormenorizada do fármaco proposto para esse estudo

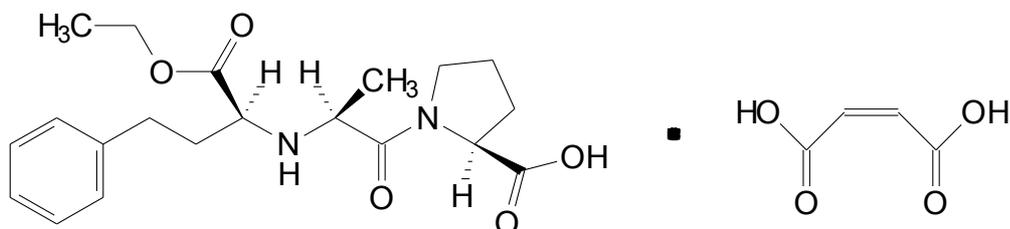
#### 1.3.1. Nome do princípio ativo:

Maleato de enalapril

#### 1.3.2. Nome químico:

N - [(1S) - 1- (Ethoxycarbonyl)-3- Phenylpropyl] - L - alanyl - L- proline (THE MERCK INDEX, 2006).

#### 1.3.3. Estrutura molecular:



(AL-OMARI et al, 2001)

#### 1.3.4. Fórmula molecular:

$C_{20}H_{28}N_2O_5$  (Enalapril)

$C_{20}H_{28}N_2O_5 \cdot C_4H_4O_4$  (Maleato de enalapril)

$C_{18}H_{24}N_2O_5, 2H_2O$  (Enalaprilato)

(THE MERCK INDEX, 2006).

**1.3.5. Massa molecular:**

492.52 (THE MERCK INDEX, 2006).

**1.3.6. Descrição:**

O maleato de enalapril apresenta-se como um pó cristalino branco ou quase branco (THE MERCK INDEX, 2006).

**1.3.7. Solubilidade:**

Ligeiramente solúvel em água; facilmente solúvel em metanol e totalmente solúvel em etanol (THE MERCK INDEX, 2006).

**1.3.8. Classificação farmacológica e mecanismo de ação:**

O **enalapril** pertence ao grupo farmacológico dos anti-hipertensivos inibidores da enzima que hidrolisa a angiotensina I em angiotensina II, agentes que afetam os vasos de capacitância e de resistência e diminuem a carga cardíaca, bem como a pressão arterial, não ocorrendo alteração significativa do débito cardíaco e da frequência cardíaca (RANG et al, 2004; RIBEIRO et al, 1996). Ao contrário de outros agentes anti-hipertensivos os inibidores da ECA não produzem ativação simpática reflexa, diminuem a proteinúria e estabilizam a função renal, sendo, portanto úteis no tratamento de pacientes hipertensos portadores de cardiopatia isquêmica e pacientes com nefropatia (EDEKI et al, 1994; NIH, 1997; SBH, 2006).

**1.3.9. Farmacocinética:**

A absorção do enalapril após administração oral é em torno de 60-70% (MACFADYEN et al, 1993). A concentração plasmática máxima do pró-fármaco ocorre 1 hora após a administração oral, enquanto a maior quantidade de enalaprilato pode ser detectada 2 a 4 horas após o uso do enalapril. O enalaprilato apresenta ligação a proteínas plasmáticas em torno de 50% e a excreção renal é sua principal via de eliminação com meia-vida entre 30-35 horas (PORTOLÉS et al, 2004). Nos indivíduos com função renal normal, o estado de equilíbrio das concentrações séricas de

enalaprilato pode ser alcançado após quatro dias de tratamento (ABOUL-ENEIN et al, 2005; RIBEIRO et al, 1996). As doses usuais do enalapril são de 10 a 20 mg, uma ou duas vezes ao dia (BENOWITZ, 2003).

#### **1.3.10. Efeitos adversos:**

Os efeitos adversos que ocorrem com a terapia do enalapril são usualmente poucos e transitórios, descritos em menos de 10% dos pacientes. O uso do enalapril pode promover hipotensão, particularmente após a primeira dose e, sobretudo em pacientes com insuficiência cardíaca que foram tratados com diuréticos de alça, nos quais o sistema renina-angiotensina encontra-se altamente ativado. Outro efeito que representa uma exceção e que pode ocorrer em pacientes com estenose da artéria renal, é a diminuição da taxa de filtração glomerular, sendo, portanto, contra-indicado nestes casos. Mas o efeito adverso persistente mais comum relatado com uso dos inibidores da ECA consiste em tosse seca, possivelmente em decorrência do acúmulo de bradicinina na mucosa brônquica. Outros efeitos de menor toxicidade mais tipicamente observados consistem em alteração do paladar, erupções cutâneas alérgicas e febre medicamentosa. Seu uso é contra-indicado na gravidez (BENOWITZ, 2003; PORTOLÉS et al, 2004; RANG et al, 2004).

#### **1.3.11. Interações com outros fármacos:**

As interações farmacológicas importantes resultantes do uso do enalapril concomitante a outros fármacos incluem aquelas com suplementos de potássio ou diuréticos poupadores de potássio, que podem resultar em hipercalemia. Os antiinflamatórios não esteróides podem comprometer os efeitos hipotensores dos inibidores da ECA ao bloquear a vasodilatação mediada pela bradicinina que, em parte, é mediada pelas prostaglandinas (BENOWITZ, 2003; BROWN & VAUGHAN, 1998).

### **1.3.12. Indicações:**

O enalapril é utilizado no controle da pressão arterial, no tratamento de pacientes hipertensos, pacientes com insuficiência cardíaca congestiva e em pacientes que apresentaram episódio de infarto agudo do miocárdio (EDEKI et al, 1994; LIN et al, 2002). Pode ser particularmente útil no tratamento de pacientes com nefropatia diabética, visto que quando administrados a longo prazo, os inibidores da ECA retardam o declínio da função renal (exceto nos casos já citados de pacientes com estenose crítica de artéria renal) (BENOWITZ, 2003).

## **1.4. Estabilidade das formas farmacêuticas**

As informações referentes à estabilidade de um fármaco são parte integrante do protocolo sistemático para desenvolvimento, avaliação e registro de um produto farmacêutico (BRASIL, 2005).

A estabilidade é a extensão na qual um produto retém, dentro dos limites especificados e por todo o seu período de armazenamento e uso, as mesmas propriedades e características que possuía no momento de sua fabricação (ALLEN Jr et al, 2007).

Um dos objetivos de se avaliar a estabilidade é a determinação do prazo de validade do produto, já que por meio da ordem cinética da reação de decomposição de substâncias químicas, em função da temperatura e outros parâmetros ambientais capazes de promover alteração no produto, pode-se calcular o tempo necessário para que ocorra uma redução de 10% do teor do princípio ativo, estimado como tempo de vida útil para o produto (ALLEN Jr et al, 2007; MORETTO, 2004).

A fim de constatar o período de tempo em que um medicamento pode manter suas propriedades terapêuticas íntegras frente às variações climáticas ambientais usuais nas localidades onde o produto será comercializado, os testes de estabilidade são exigidos como requisitos para registro e comercialização do

produto (BRASIL, 2005). A indústria fabricante do produto, detentora do seu registro para comercialização junto ao órgão regulador competente tem a responsabilidade legal e ética de garantir a qualidade de seu produto antes, durante e depois da produção do medicamento (MORETTO, 2004).

De acordo com Risha et al (2003), a influência das condições climáticas na manutenção da qualidade dos fármacos tem sido discutida pela Organização Mundial de Saúde (OMS). A OMS tem recomendado a realização dos estudos de estabilidade de medicamentos durante a distribuição e estocagem, especialmente em localidades de clima tropical (zona IV), onde as altas temperaturas combinadas com a alta umidade podem afetar adversamente as propriedades biofarmacêuticas dos medicamentos. Contudo, os fabricantes não são obrigados a seguir essas recomendações.

A definição dos parâmetros para se estabelecer um protocolo de avaliação da estabilidade depende das características individuais do produto envolvido e das condições climáticas da região onde será comercializado. Na condução desses testes, as diferenças das zonas climáticas nacionais e internacionais às quais o produto está sujeito devem ser levadas em conta (ALLEN Jr et al, 2007; BAKSHI & SINGH, 2002; ICH Q1A(R2), 2003). Para fins de estudos internacionais, são reconhecidas quatro zonas climáticas, como pode ser observado no Quadro 1.

**Quadro 1** – Condições de armazenamento para realização dos ensaios de estabilidade de longa duração de acordo com a classificação das diferentes zonas climáticas.

<b>Zona climática</b>	<b>Definição</b>	<b>Condições de armazenamento</b>
I	Temperada	21°C – 45% UR
II	Subtropical com possível umidade elevada	25°C – 60% UR
III	Quente/Seca	30°C – 35% UR
IV	Quente/Úmida	30°C – 65% UR

Fonte: ICH Q1A(R2), 2003

O Brasil situa-se na zona climática tropical IV (Quente/Úmido), onde estudos de estabilidade de produtos farmacêuticos podem prever a possibilidade de degradação química e indicar comprometimento da qualidade em decorrência da temperatura e umidade.

De acordo com os critérios descritos na International Conference on Harmonization (ICH Q1A(R2), 2003), os ensaios de estabilidade de longa duração realizados nesses países devem ser conduzidos em condições de armazenamento com temperatura de 30°C e umidade relativa de 65%. A WHO (2004), fez um documento propondo uma subdivisão da zona climática IV (IVa e IVb) onde o Brasil ficaria na zona climática IVb, utilizando nos testes de estabilidade de longa duração o parâmetro da umidade em 70%, mais próximo do valor preconizado atualmente pela legislação brasileira descrito no Quadro 2.

**Quadro 2** - Condições gerais preconizadas pela ANVISA para realização dos estudos de estabilidade de formas farmacêuticas sólidas no Brasil.

<b>Tipo de estudo</b>	<b>Condições de armazenamento</b>	<b>Tempo mínimo de armazenamento</b>	<b>Frequência dos testes</b>
Longa-duração	30°C ± 2°C 75% UR ± 5% UR	24 meses	0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 meses
Acelerado	40°C ± 2°C 75% UR ± 5% UR	6 meses	0, 3, 6 meses

Fonte: Resolução RDC N° 1 (Brasil, 2005).

A legislação brasileira prevê três tipos de testes de estabilidade diferentes de acordo com a sua finalidade:

- ❖ Estudo de estabilidade acelerado;
- ❖ Estudo de estabilidade de acompanhamento e
- ❖ Estudo de estabilidade de longa duração.

O estudo de estabilidade acelerado prevê a avaliação da degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições “forçadas” de armazenamento, podendo assim avaliar o impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas no rótulo do produto, que podem ocorrer, por exemplo, durante o transporte ou quando o produto é armazenado de forma inadequada e ainda prevê o prazo de validade do produto (BRASIL, 2005).

O estudo de estabilidade de longa duração é destinado a avaliar e monitorar a degradação e/ou alterações físicas, químicas e microbiológicas de um produto farmacêutico, usando as condições esperadas de armazenamento no

mercado ao qual o produto é destinado; devendo com esse teste, estabelecer ou confirmar o prazo de validade adequado para o produto, que é a data limite para utilização de um produto farmacêutico definida pelo fabricante, com base nos seus respectivos testes de estabilidade (BRASIL, 2005). Já o estudo de estabilidade de acompanhamento é realizado com a finalidade de verificar se o produto farmacêutico mantém suas características físicas, químicas e microbiológicas conforme os resultados obtidos nos estudos de estabilidade de longa duração (BRASIL, 2005).

Com o aumento e o aprimoramento na produção de produtos farmacêuticos cresceu a necessidade da criação de parâmetros de uniformidade para garantir a qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos. Sendo assim, os ensaios para avaliar a estabilidade de uma formulação farmacêutica passaram além de prover evidências sobre a influência dos fatores ambientais: temperatura, umidade e quando necessário, oxigênio e luz; também avaliar possíveis reações entre o princípio ativo e os demais componentes da formulação ou interações desse com sua embalagem, podendo assim resguardar melhor a estabilidade do produto farmacêutico e recomendar com mais segurança as condições de acondicionamento e estocagem do produto (ICH Q1A(R2), 2003; LUSINA et al, 2005).

Os excipientes utilizados em uma formulação, tradicionalmente são considerados substâncias inertes, utilizados para facilitar o processo de fabricação, por razões estéticas do produto e até mesmo para aumentar a estabilidade da formulação (ALLEN Jr et al, 2007). No entanto quando utilizados inadequadamente podem interagir com a substância ativa e causar um impacto considerável na atividade farmacológica (JACKSON et al, 2000).

Resultados de estudos anteriores revelam dados preocupantes em relação à decomposição química de fármacos, mostrando que diferentes ingredientes da formulação podem reagir frente ao aumento da temperatura e/ou umidade reduzindo a dissolução *in vitro*, que é um importante atributo da qualidade de formas farmacêuticas sólidas de uso oral (OLIVEIRA, 2006; RISHA et al, 2003).

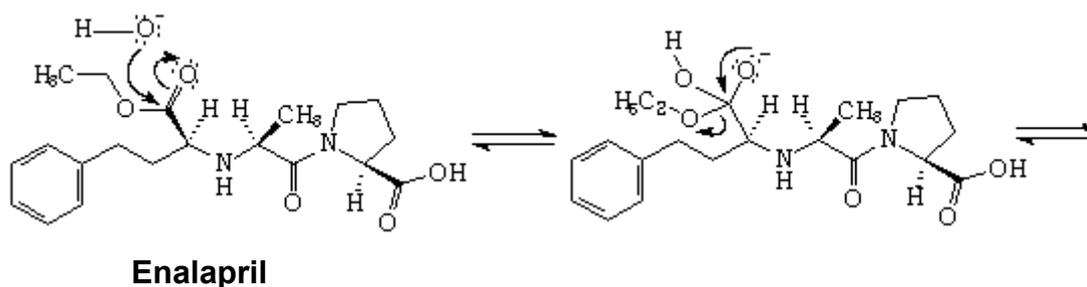
A embalagem desempenha um papel primordial na qualidade do medicamento, servindo como barreira ao contato da forma farmacêutica com efeitos externos como luz, oxigênio e umidade, que podem induzir a ocorrência

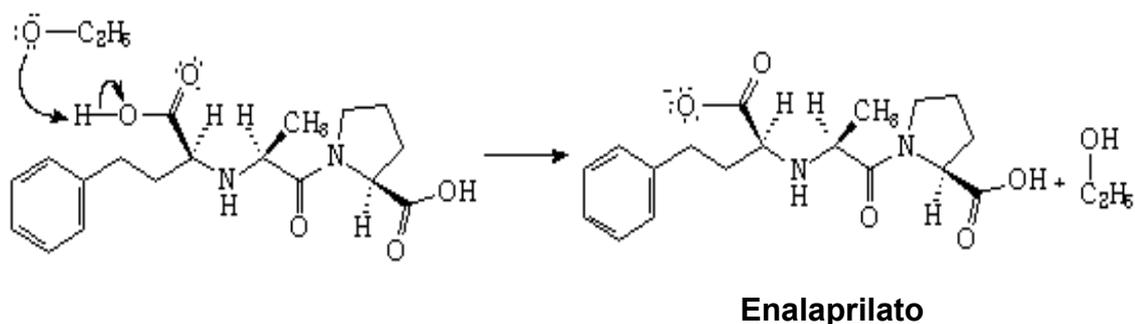
de reações físico-químicas que desestabilizam a formulação, podendo comprometer o produto (MURTHY & GHEBRE-SELLASSIE, 1993; LUSINA et al, 2005). Por longo tempo a escolha da embalagem foi considerada sem prioridade durante o planejamento e desenvolvimento de um medicamento, no entanto, estudos de estabilidade puderam comprovar que o controle da embalagem adequada, levando em considerações todas as propriedades físico-químicas das substâncias utilizadas na formulação é elemento chave para garantir a manutenção dos parâmetros de qualidade do produto durante todo o seu prazo de validade (LACHMAN et al, 2001; MURTHY & GHEBRE-SELLASSIE, 1993).

Parâmetros físico-químicos importantes na caracterização da qualidade da preparação e que são susceptíveis a alteração durante o armazenamento incluem aparência, odor, aparecimento de produtos de degradação, friabilidade, tempo de desintegração, teor de umidade e de dissolução do fármaco (MURTHY & GHEBRE-SELLASSIE, 1993).

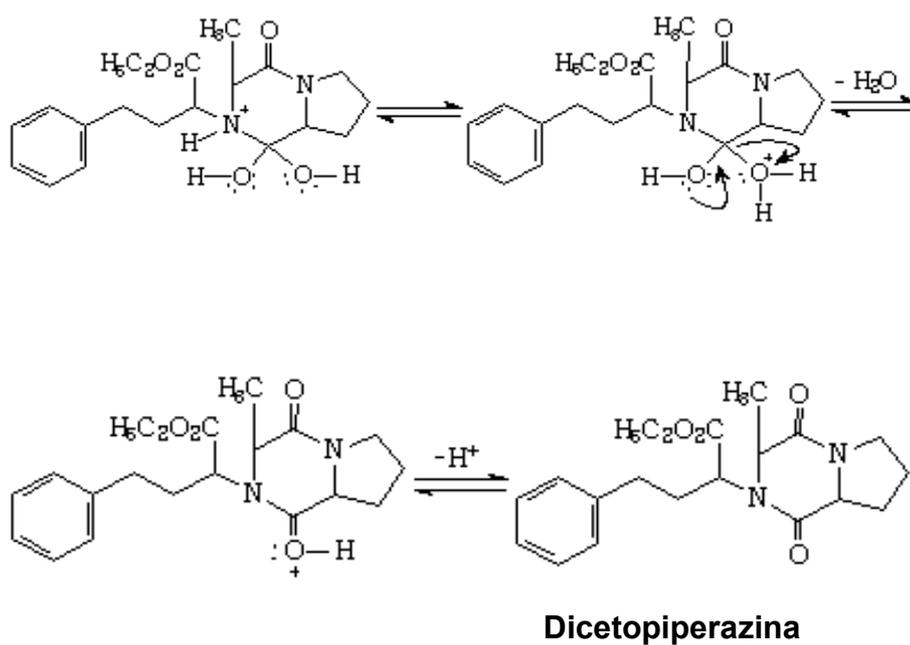
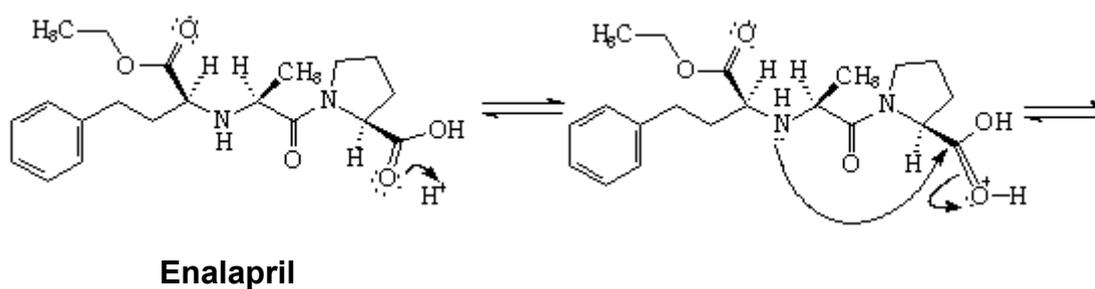
Alguns estudos indicam que a estabilidade dos comprimidos de maleato de enalapril pode ser afetada quando são expostos a altas temperaturas e umidade, sendo observada a formação de dois produtos de degradação: enalaprilato, por hidrólise e dicetopiperazina, por ciclização intramolecular (AL-OMARI et al, 2001; QIN et al, 1995; STANISZ, 2003).

As Figuras 1 e 2 mostram um possível mecanismo de degradação do enalapril descrito por Oliveira (2006).





**Figura 1** - Mecanismo para a hidrólise do enalapril em meio alcalino.



**Figura 2**- Mecanismo para a ciclização intramolecular do enalapril em meio ácido.

## 1.5. Dissolução de formas farmacêuticas sólidas de uso oral

A via de administração oral para uso de medicamentos se mantém como a mais usual e preferida, tanto pela conveniência oferecida ao paciente, quanto pelo fácil manuseio e comumente maior segurança na utilização (ALLEN Jr et al, 2007), o que favorece a maior adesão do paciente ao tratamento medicamentoso, fato que deve ser considerado no momento da escolha da forma farmacêutica, em especial aos pacientes que fazem seu tratamento fora do ambiente hospitalar (STORPIRTIS et al, 1999).

Dentre as formas farmacêuticas disponíveis para administração oral, os comprimidos representam mais de 80% das distintas formas produzidas pela indústria farmacêutica (JIVRAJ et al, 2000). As principais razões para essa popularidade incluem as vantagens observadas na agilidade do processo de fabricação, a conveniência da dosagem e a melhor estabilidade dos produtos nessa forma farmacêutica comparada a apresentações líquidas ou semi-sólidas (JIVRAJ et al, 2000).

Entretanto, a absorção de fármacos a partir de formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral depende de sua liberação, ou seja, dos processos de dissolução ou solubilização do fármaco e de sua permeabilidade através das membranas biológicas presentes no trato gastrointestinal. O fármaco deve estar disponível em quantidades adequadas para ser absorvido e alcançar a circulação sanguínea (BRASIL, 2003d; FDA, 1997; JACKSON et al, 2000). Sendo assim, para produtos farmacêuticos sólidos, a dissolução é considerada um dos parâmetros críticos na determinação da estabilidade do produto (MURTHY & GHEBRE-SELLASSIE, 1993). Qualquer alteração em relação ao perfil de liberação do fármaco pode resultar em impacto na proporção e na quantidade de fármaco disponível para absorção. A liberação do fármaco de uma forma farmacêutica sólida pode envolver três etapas: desintegração, desagregação e dissolução, podendo esses processos ocorrer simultaneamente. A velocidade pela qual ocorre o processo de dissolução determinará a liberação do fármaco e conseqüentemente sua absorção, podendo comprometer a eficiência do produto (ALLEN Jr et al, 2007; STORPIRTIS et al, 1999).

Com base nessas considerações, os ensaios de dissolução *in vitro* são considerados fundamentais para avaliar os efeitos combinados de diferentes

fatores da formulação, como propriedades físico-químicas da substância ativa, propriedades de diferentes excipientes e possíveis interações entre excipientes e princípio ativo (JACKSON et al, 2000).

O teste de dissolução é fundamental para avaliação do desenvolvimento da formulação de um produto farmacêutico e de seu processo de fabricação, e também é o teste analítico mais comumente utilizado no controle de qualidade *in vitro*, que permite avaliar as características de liberação do fármaco (BRASIL, 2003d; QURESHI & SHABNAM, 2003).

O teste de dissolução também fornece informações sobre os vários estágios de desenvolvimento de um produto, possibilitando avaliar as diferentes etapas do processo de fabricação, durante as quais a qualidade e a uniformidade das formas farmacêuticas sólidas de uso oral devem ser garantidas (BRASIL, 2003d; DRESSMAN et al, 1998; GRAFFNER, 2006; FDA, 1997; SERRA & STORPIRTIS, 2007).

Além disso, a complexidade das formas farmacêuticas sólidas mais recentemente desenvolvidas e as variações do ambiente gastrointestinal passaram a ser fatores que representam limitações importantes em termos de otimização da absorção e biodisponibilidade dos fármacos administrados pela via oral (OLIVEIRA, 2006).

Os dados obtidos pelos ensaios *in vitro* relativos à qualidade biofarmacêutica, como o teste de dissolução, têm sido o fundamento de importantes diretrizes regulamentadoras no intuito de diminuir o número e o tamanho dos ensaios clínicos, especialmente para os fármacos hidrofóbicos, que apresentam características biofarmacêuticas de baixa solubilidade onde a correlação *in vitro/in vivo* pode ser considerada com maior segurança (DRESSMAN et al, 1998; QURESHI & SHABNAM, 2003; STORPIRTIS et al, 1999).

Acredita-se que uma substância seja bem absorvida quando apresenta as seguintes características: adequada lipossolubilidade, além de relativa hidrossolubilidade e baixa massa molecular. A solubilidade do fármaco é considerada o fator mais relevante, uma vez que a velocidade de dissolução é diretamente proporcional à solubilidade do fármaco (STORPIRTIS et al, 1999).

Com base na solubilidade e na habilidade do fármaco para penetrar na mucosa do trato gastrointestinal foi proposto o sistema de classificação biofarmacêutica (FDA, 1997), conforme demonstrado no Quadro 3.

**Quadro 3** – SCB (Sistema de Classificação Biofarmacêutica) dos fármacos:

<p><b>Classe 1:</b></p> <p>Alta solubilidade</p> <p>Alta permeabilidade</p>	<p><b>Classe 2:</b></p> <p>Baixa solubilidade</p> <p>Alta permeabilidade</p>
<p><b>Classe 3:</b></p> <p>Alta solubilidade</p> <p>Baixa permeabilidade</p>	<p><b>Classe 4:</b></p> <p>Baixa solubilidade</p> <p>Baixa permeabilidade</p>

Fonte: FDA (1997); Brasil (2003d).

A classificação biofarmacêutica dos fármacos foi primariamente desenvolvida para uma melhor compreensão da relação entre a liberação do fármaco *in vivo* com o processo de absorção do produto (BLUME & SCHUG, 1999). Assim, de acordo com a classificação do fármaco podem ser determinadas as especificações da dissolução *in vitro* e servir como base para prever o sucesso da correlação *in vitro/in vivo* (IVIVC) (BRASIL, 2003d; FDA, 1997). A solubilidade de um fármaco é determinada pela dissolução da dosagem mais alta do medicamento em 250 mL de uma solução tampão de pH entre 1,0 e 8,0. Um fármaco é considerado altamente solúvel quando o resultado, em volume, da relação dose/solubilidade for menor ou igual a 250 mL. Já a avaliação da permeabilidade é feita com base na biodisponibilidade absoluta do fármaco. Um fármaco altamente permeável é aquele que apresenta biodisponibilidade absoluta superior a 90% na ausência de instabilidade no trato gastrointestinal (BRASIL, 2003d; FDA, 1997).

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica sugere que, para os fármacos enquadrados na classe 1 (alta solubilidade e alta permeabilidade) e 3 (alta solubilidade e baixa permeabilidade) a dissolução não se apresenta como o fator limitante para garantir a biodisponibilidade e nesses casos a velocidade de

absorção do fármaco é determinada pelo esvaziamento gástrico, o que se relaciona com a permeabilidade do fármaco (BRASIL, 2003d; FDA, 1997).

Para os fármacos que apresentam baixa solubilidade e alta permeabilidade (Classe 2), a correlação *in vitro/in vivo* pode ser esperada, uma vez que a velocidade de dissolução pode ser o passo limitante da absorção. Os fármacos que se classificam pela característica de baixa solubilidade e baixa permeabilidade (Classe 4) normalmente apresentam problemas significativos em relação à liberação do fármaco de sua forma farmacêutica (BRASIL, 200d; FDA, 1997).

Como pode ser observada, essa classificação exprime que a dissolução depende consideravelmente da solubilidade do ingrediente ativo e que a absorção no trato gastrointestinal depende de suas propriedades de permeabilidade. Contudo, a dissolução também pode ser afetada pelas características da formulação, envolvendo as diferenças que podem resultar do emprego dos excipientes acrescentados no desenvolvimento do produto (BLUME & SCHUG, 1999).

Pelo menos 3 tipos de especificações para realização de ensaios de dissolução podem ser estabelecidos:

a) Teste de um único ponto: Comumente utilizado para controle de qualidade de rotina, especialmente para fármacos altamente solúveis.

b) Teste de dois pontos: Para caracterizar a qualidade do medicamento, nos casos dos fármacos que se dissolvem lentamente, por apresentarem baixa solubilidade.

c) Teste com elaboração do perfil de dissolução: Que permite uma análise mais conclusiva pela avaliação do modelo de liberação do fármaco ao longo do tempo, o que pode facilitar a comparação entre dois produtos. O perfil de dissolução poderia então ser utilizado para se evitar a realização de estudos de bioequivalência das formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata de apresentações que apresentam a mesma formulação e dosagem menor (BRASIL, 2003d).

O teste de dissolução começou a ser utilizado oficialmente a partir da década de 1970, sendo introduzido inicialmente em seis monografias de medicamentos da United States Pharmacopeia (USP). Na Farmacopéia Brasileira só foi descrito pela primeira vez em 1988, na sua 4ª Edição. Outros

testes, como o de desintegração, já eram propostos anteriormente para oferecer algum parâmetro *in vitro* que se correlacionasse com o desempenho do fármaco *in vivo*. No entanto, apesar do teste de desintegração encontrar-se descrito na USP desde 1950, ele se apresenta como um fraco indicador de biodisponibilidade, devido à falta de correlação com a liberação do ingrediente ativo propriamente dito (MARCOLONGO, 2003).

Diversos fatores do processo de fabricação de produtos farmacêuticos sólidos podem influenciar o grau de dissolução do fármaco, tais como tempo e velocidade de agitação, o método de granulação, temperatura de secagem, a força de compressão empregada no processo, o tipo e a quantidade relativa de cada um dos componentes incorporados à formulação (MURTHY & GHEBRE-SELLASSIE, 1993; STORPIRTIS et al, 1999).

O teste de dissolução *in vitro*, quando executado sob condições padronizadas, fornece informações essenciais durante estudo de pré-formulação e desenvolvimento de um produto farmacêutico, podendo direcionar a escolha dos excipientes mais apropriados para compor a formulação, garantir a bioequivalência entre os lotes e ainda fornecer dados que permitem prever o perfil de disponibilidade *in vivo* (BRASIL, 2003d; DRESSMAN et al, 1998).

A utilização de alguns excipientes, em especial dos diluentes, desintegrantes e lubrificantes e/ou as quantidades de cada um deles na formulação podem contribuir para diferenças na liberação do princípio ativo, no processo de absorção e biodisponibilidade do fármaco (ALLEN Jr et al, 2007; JACKSON et al, 2000). Os excipientes são tradicionalmente classificados de acordo com a função que exercem na formulação, contudo alguns excipientes podem exercer múltiplas funções, o que pode ocorrer de acordo com a concentração em que foram empregados (JACKSON et al, 2000).

Os diluentes na formulação são usualmente vistos como excipientes inertes e que não interagem com os ingredientes ativos ou outros componentes da formulação, com função apenas de diluir as matérias-primas e aumentar o volume das unidades posológicas que apresentam doses muito pequenas (JIVRAL et al, 2000). No entanto, alguns diluentes por possuírem natureza higroscópica, podem fornecer condições de umidade suficientes para provocar reações químicas e físicas alterando o produto farmacêutico. Interações específicas entre a substância ativa e um componente da formulação têm sido

relacionadas ao retardo ou aceleração no processo de dissolução durante o armazenamento (MURTHY & GHEBRE-SELLASSIE, 1993).

A incorporação de desintegrantes na formulação de comprimidos tem como finalidade facilitar a ruptura do comprimido, promovendo o aumento da superfície de contato para a dissolução. O efeito comprometedor de um desintegrante nas propriedades de dissolução de um produto farmacêutico vai depender da natureza e da quantidade de desintegrante acrescentado à formulação, bem como das condições de estocagem do produto acabado (JACKSON et al, 2000). Naturalmente, se utilizados em altas concentrações, os desintegrantes podem promover a aceleração da dissolução. Além disso, a velocidade de desintegração de um comprimido depende de outras variáveis como: força de compressão ou tipo de granulação empregada no processo de fabricação (OLIVEIRA, 2006).

Os agentes lubrificantes promovem a redução no atrito entre o pó/granulado e os equipamentos utilizados no processo de fabricação dos comprimidos, podendo diminuir ou aumentar a área interfacial efetiva entre fármaco e solvente por alterarem as características da superfície dos comprimidos. Sendo assim, estes excipientes também podem alterar o tempo de desintegração e conseqüente a dissolução (ALLEN Jr et al, 2007; OLIVEIRA, 2006). Murthy & Ghebre-Sellassie (1993) relatam um estudo que demonstrou retardo significativo na dissolução de comprimidos de fenilbutazona preparados por compressão direta, utilizando a lactose e celulose microcristalina como agentes diluentes. Estes autores atribuíram à reação entre a lactose e a substância ativa, a responsabilidade das alterações observadas no perfil de dissolução.

Para Ngo (2007), diferenças no perfil de dissolução são usualmente preditores de problemas clínicos para fármacos cuja dissolução é fator limitante da absorção, particularmente para as substâncias classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica. Relatos de vários pacientes que apresentaram sintomas psicóticos adversos após a troca do produto clozapina referência pela versão genérica, reforçam esta hipótese (NGO, 2007).

Atualmente são reconhecidos, de acordo com a USP XXVII (2004), dois principais métodos largamente utilizados nos testes de dissolução de formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata: um utilizando cesta rotatória

(denominado aparato 1) e outro utilizando pá rotatória (aparato 2). O conjunto que compõe o equipamento é composto por cubas (recipientes de formato, tamanho e material adequado), imersas em um banho com temperatura controlada. Nessas cubas é colocado o meio de dissolução apropriado que é descrito na monografia de cada fármaco segundo a farmacopéia. A haste giratória com a pá ou cesta que deverá ser utilizada, depois de colocada a forma farmacêutica em análise, se movimentará em velocidade adequada e durante um tempo pré-estabelecido a fim de promover a dissolução do produto. A cada tempo proposto pelo analista deve ser recolhida uma amostra para quantificação da porcentagem do princípio ativo dissolvido.

O teste de dissolução é recomendado atualmente para avaliação dos produtos farmacêuticos de uso oral sólidos de liberação imediata de todas as categorias de medicamentos disponíveis no mercado farmacêutico: Referência, Genéricos e Similares (BRASIL, 2003a; BRASIL, 2003b).

## **1.6. Métodos analíticos empregados em análises de controle de qualidade de fármacos**

A cromatografia é um método de separação físico-químico, que se baseia na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A cromatografia pode ser utilizada como metodologia para se obter a separação, a identificação, a purificação e a quantificação de compostos (DEGANI et al, 1998).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é a mais utilizada de todas as técnicas analíticas de separação, sendo considerada uma técnica de ultra-microanálise que emprega um conjunto de equipamentos especiais, que poderão diferir em características e grau de automação. A cromatografia líquida de alta eficiência promove a separação dos componentes de uma mistura de acordo com a natureza da fase móvel, tipo de fase estacionária e composição química dos componentes analisados (SKOOG et al, 2002).

O processo cromatográfico consiste na passagem da amostra, que estará dissolvida na fase móvel, através da coluna cromatográfica (recheada com um sorbente) – chamada fase estacionária, na qual cada um dos componentes da

amostra será seletivamente retido por um intervalo de tempo (CIOLA, 1998). Essa retenção se dá pela afinidade da substância com a coluna. Uma separação adequada requer um equilíbrio das forças intermoleculares entre os três participantes ativos do processo de separação: soluto, fase móvel e fase estacionária. Os compostos são eluídos através da coluna com o auxílio de uma bomba que produz um fluxo controlado da fase móvel. As fases móveis utilizadas em CLAE devem possuir alto grau de pureza, devem dissolver o soluto sem decompor seus componentes, não devem alterar a composição da fase estacionária e devem ser compatíveis com o detector que será utilizado (SKOOG et al, 2002).

A fase móvel, ao sair da coluna, passa por um sistema de detecção, onde são detectadas alterações de alguma propriedade física específica. Em cromatografia líquida a função do detector é monitorar o fluxo da fase móvel em um ponto da coluna. Qualquer variação é transformada em um sinal elétrico, que é registrado e tratado matematicamente por um processador. O gráfico obtido é denominado de “cromatograma” (CIOLA, 1998; MENDHAM et al, 2002).

O detector é o “olho” do sistema cromatográfico, capaz de medir as mudanças de concentrações dos compostos na amostra que está deixando a coluna. Existem diversos tipos de detectores comumente acoplados ao sistema de cromatografia líquida: detector de absorvância, de fluorescência, de índice de refração, de espalhamento de luz, espectrometria de massas e outros (SKOOG et al, 2002). Os detectores de absorção no ultravioleta (UV-VIS) são os mais utilizados em CLAE. Este tipo de detector mede a quantidade de luz UV/visível absorvida durante a passagem do eluente por uma pequena célula de fluxo colocada no caminho ótico do feixe de radiação (MENDHAM et al, 2002; SKOOG et al, 2002). São considerados detectores de alta sensibilidade (limite de detecção na ordem de  $1 \times 10^{-9} \text{g.mL}^{-1}$ ), para compostos de alta absorvidade (MENDHAM et al, 2002).

Para quantificação de substâncias em amostras biológicas, pode ser utilizada a técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, que pode separar misturas complexas, identificar e quantificar os componentes em uma única operação (MENDHAM et al, 2002).

A espectrometria de massas é essencialmente uma técnica de ionização e fragmentação de moléculas que são, depois, separadas em fase gás para obter

um espectro segundo a razão massa/carga ( $m/z$ ) dos fragmentos. Como a maior parte dos íons adquire carga unitária, o espectro seleciona, na prática as massas e, em teoria, permite a identificação do composto original (MENDHAM et al, 2002). A cromatografia líquida acoplada ao detector por espectrometria de massas é um método analítico de separação altamente específico e de alta sensibilidade, capaz de identificar e quantificar compostos na ordem de 1 a 10 picogramas (SKOOG et al, 2002).

## **1.7. Validação de método bioanalítico**

Para detecção da concentração de fármacos em matrizes biológicas como o plasma é necessário determinar uma metodologia capaz de quantificar essas substâncias de forma confiável. A metodologia proposta, se não descrita em compêndio oficial, deve ser validada, com objetivo de confirmar que o método desenvolvido é apropriado para o uso pretendido (RIBANI et al, 2004).

De acordo com o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003c), a validação do procedimento analítico deve garantir, através de evidências experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, o método deve ter definidos seus limites de detecção e de quantificação e apresentar precisão, exatidão, linearidade, especificidade, reprodutibilidade, estabilidade e recuperação adequada à análise.

Assim, os equipamentos e materiais devem ser devidamente calibrados e o analista qualificado. As substâncias químicas de referência devem ser certificadas por organismos oficiais, como Farmacopéia Brasileira, Farmacopéia Americana ou por outros códigos autorizados pela legislação vigente (BRASIL, 2003c).

Além da legislação brasileira, outros documentos oficiais, tais como os descritos pelo ICH Q2 (2005) descrevem os parâmetros que devem ser avaliados para validação de um método bioanalítico:

- a)** Seletividade/Especificidade – é a capacidade do método utilizado de distinguir o analito de outros componentes da matriz biológica, metabólitos, produtos de decomposição ou outros medicamentos utilizados concomitantemente (BRASIL, 2003c; ICH Q2, 2005).
- b)** Linearidade – é a capacidade do método de gerar resultados diretamente proporcionais à concentração da substância analisada. No caso de análise cromatográfica na medida em que se aumenta a concentração do analito na amostra é observado o aumento da área do cromatograma gerado, obtendo assim uma curva de calibração (BRASIL, 2003c; ICH Q2, 2005).
- c)** Intervalo de Trabalho – É a faixa linear de trabalho, com o qual o método garanta precisão, exatidão e linearidade (BRASIL, 2003c), normalmente é obtido através do estudo de linearidade.
- d)** Recuperação – mede a eficiência do procedimento de isolamento do analito da matriz na qual está presente (BRASIL, 2003c).
- e)** Limite de detecção (sensibilidade) – é a determinação da menor quantidade do analito presente na amostra que o método pode detectar, mas não consegue quantificar. No caso de métodos instrumentais (como a CLAE), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação sinal/ruído (BRASIL, 2003c; ICH Q2, 2005).
- f)** Limite de quantificação – é a menor quantidade do analito na amostra, que pode ser quantificada com precisão e exatidão (BRASIL, 2003c; ICH Q2, 2005).

**g)** Precisão – é a capacidade do método de gerar resultados com variações insignificantes quando são alternadas amostras, horários, analista e até modelos de equipamentos (BRASIL, 2003c). A precisão é um parâmetro da validação que pode ser avaliada em três níveis: a repetibilidade, também denominada precisão intra-dia; precisão intermediária ou precisão inter-dia e a reprodutibilidade, que é a precisão inter-laboratorial. Para métodos bioanalíticos a precisão pode ser obtida apenas através de ensaios de repetibilidade (LANÇAS, 2004).

**h)** Exatidão – pode ser determinada através da comparação de resultados obtidos em análises distintas da amostra estudada e uma amostra contendo a substância referência em concentração conhecida (BRASIL, 2003c; ICH Q2, 2005). Obs: A precisão e exatidão são conceitos comumente confundidos. No entanto, enquanto a precisão mede o quanto os valores obtidos se assemelham entre si, a exatidão mede o quanto os valores obtidos se assemelham ao valor tido como verdadeiro (LANÇAS, 2004).

**i)** Robustez – é a capacidade do método empregado de resistir a pequenas alterações nos parâmetros analíticos, como pH da fase móvel, fluxo, temperatura, sem que o resultado seja comprometido de forma significativa (BRASIL, 2003c; ICH Q2, 2005).

j) Estabilidade das soluções – A estabilidade das soluções analíticas é um dos fatores que devem ser considerados na avaliação da robustez de um método analítico. Todas as soluções empregadas na análise (padrões, amostras biológicas, fase móvel) devem ser capazes de se manter estáveis quando estocadas durante todo o tempo necessário para realização do estudo (BRASIL, 2003c; ICH Q2, 2005).

## 1.8. Mercado Farmacêutico no Brasil

Além do medicamento referência, que geralmente é o produto inovador, detentor da patente e assim registrado no órgão federal competente, com eficácia, segurança e qualidade comprovadas por meio de ensaios clínicos realizados antes da obtenção do registro (BRASIL, 1999), o mercado farmacêutico conta com pelo menos mais duas categorias de medicamentos industrializados de acordo com os ensaios a que foram submetidos e pelos quais foram registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Medicamento Genérico e Medicamento Similar (BRASIL, 2003a; BRASIL, 2003b).

A implantação da política de medicamentos genéricos no Brasil pelo Ministério da Saúde através da Lei 9.787/99, regulamentada pela Resolução Nº 391/99 (BRASIL, 1999), estabeleceu as bases legais para a instituição do medicamento genérico no Brasil estimulando assim sua produção e comercialização.

Medicamento genérico é um medicamento com características semelhantes ao produto referência ou inovador, que pretende ser com este intercambiável, geralmente produzido após a expiração ou renúncia da proteção patentária ou de outros direitos de exclusividade, comprovada sua equivalência terapêutica, e designado pela Denominação Comum Brasileira (DCB) ou, na sua ausência, pela Denominação Comum Internacional (DCI).

Medicamentos genéricos devem apresentar os resultados de equivalência farmacêutica em relação ao produto de referência, ou seja, conter o mesmo sal ou éster da mesma molécula terapeuticamente ativa, na mesma quantidade e forma farmacêutica, podendo ou não conter excipientes idênticos. Deve cumprir com as mesmas especificações atualizadas da Farmacopéia Brasileira e, na ausência destas, com as de outros códigos autorizados pela legislação vigente ou, ainda, com outros padrões aplicáveis de qualidade, relacionados à identidade, dosagem, pureza, potência, uniformidade de conteúdo, tempo de desintegração e velocidade de dissolução, quando for o caso (BRASIL, 2003b). Medicamento genérico e referência devem produzir comparável biodisponibilidade (quantidade de uma substância que, introduzida no organismo, atinge a circulação e torna-se disponível no seu sítio de ação para exercer a ação farmacológica) quando estudados sob o mesmo desenho

experimental (ALLEN Jr et al, 2007; BRASIL, 1999; FDA, 2003). Para que sejam considerados equivalentes terapêuticos, ou seja, medicamento referência e genérico, devem apresentar após a administração na mesma dose molar, efeitos semelhantes em relação à eficácia e segurança (PORTOLÉS et al, 2004). A equivalência terapêutica pode ser avaliada de diferentes formas:

- a) através de ensaios clínicos que comprovem eficácia e segurança;
- b) através do teste de biodisponibilidade relativa, no qual são comparadas as curvas farmacocinéticas do fármaco teste e do referência;
- c) através de testes *in vitro* que comprovem a equivalência farmacêutica, demonstrando as mesmas especificações farmacotécnicas dos produtos (RUMEL et al, 2006). De acordo com o conceito do FDA, produtos farmacêuticos podem ser considerados equivalentes terapêuticos apenas se eles demonstrarem equivalência farmacêutica e se tiverem expectativa de mesmo efeito clínico e perfil de segurança quando administrados a pacientes de acordo com as condições especificadas no rótulo (BENET, 1999).

A biodisponibilidade é uma característica do medicamento administrado a um sistema biológico intacto e indica a cinética e a concentração que o fármaco alcança a circulação geral a partir da dose contida no medicamento administrado. A partir desse conceito, observa-se que a biodisponibilidade compreende dois aspectos distintos e fundamentais: velocidade e intensidade dos processos de dissolução e absorção (STORPIRTIS et al, 2004).

A noção de disponibilidade da substância ativa a partir de um medicamento surgiu da observação de não-equivalência terapêutica entre formulações contendo o mesmo fármaco, em um mesmo teor e forma farmacêutica, até então considerados substituíveis. Vários incidentes (ineficácia) ou acidentes (toxicidade) foram às causas desta observação (DIGHE, 1999).

Para o desenvolvimento de medicamentos genéricos, o fabricante deve cumprir as mesmas especificações *in vitro* em relação ao produto referência. Entretanto, os componentes de sua formulação e o processo de fabricação podem ser diferentes, desde que a bioequivalência entre os produtos não seja comprometida (DIGHE, 1999; STORPIRTIS et al, 2004). Além disso, no desenvolvimento da versão genérica não são requeridos ensaios clínicos em

pacientes doentes e estudos de segurança usando modelos animais (DIGHE, 1999).

Na prática, a política de genéricos, tem por objetivo possibilitar que o consumidor tenha a opção de adquirir produtos farmacêuticos com um menor custo, uma vez que, aprovados nesses testes, os produtos são considerados intercambiáveis no balcão da farmácia, a menos que o prescritor explicitamente requisite a não substituição (BRASIL, 1999; RUMEL et al, 2006). Embora o uso de medicamentos genéricos represente um incremento importante na seleção de alternativas terapêuticas, é importante que a substituição possa ser realizada mantendo-se a garantia da segurança e eficácia terapêutica no tratamento, fato que ainda gera ampla discussão no País (RUMEL et al, 2006).

Além do medicamento genérico, são disponibilizados no comércio farmacêutico brasileiro os denominados “similares”, existentes desde antes da Lei dos Genéricos (RUMEL et al, 2006). Os produtos similares contêm o mesmo princípio ativo, concentração e indicação terapêutica em relação ao medicamento de referência. No ato do pedido de registro, devem ser apresentados os dados gerais sobre o produto, resultados de estudo de estabilidade e outros para assegurar as especificações do produto, mas que ainda não passaram pelo mesmo rigor de provas de qualidade que os denominados “genéricos”. No mercado farmacêutico devem ser identificados por um nome comercial ou de marca (BRASIL, 1999). A partir de maio de 2003, as exigências para todos os produtos registrados como “similares” passaram a incluir os mesmos testes solicitados aos medicamentos genéricos, no momento de renovação de seu registro, que ocorre a cada cinco anos (BRASIL, 2003a). É estimado que até outubro de 2014 todas as classes terapêuticas de uso oral de produtos denominados “similares” tenham passado pelos testes de bioequivalência (RUMEL et al, 2006).

De acordo com Sociedade Médica de Administração em Saúde (2007), o mercado farmacêutico brasileiro registrou em 2005 um crescimento de aproximadamente 30% na comercialização dos medicamentos genéricos, sendo que os agentes anti-hipertensivos estão arrolados entre os medicamentos mais vendidos. Nas primeiras semanas de funcionamento das Farmácias Populares (instituições criadas pelo Governo Federal com o objetivo de dispensar medicamentos a preço acessível), os medicamentos mais procurados foram os

destinados ao tratamento da hipertensão arterial, sendo o enalapril classificado em 4º lugar no “ranking” (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Todos estes dados revelam que a hipertensão arterial é um problema crescente e que o tratamento farmacológico seguro e adequado se torna cada vez mais necessário no sentido de garantir uma resposta clínica favorável.

Diante dessas exposições, esse estudo foi conduzido para investigar a qualidade de diferentes especialidades farmacêuticas do maleato de enalapril na forma de comprimidos de 20 mg disponibilizadas no mercado brasileiro, avaliando os parâmetros de teor, perfil de dissolução *in vitro* e o acompanhamento clínico de pacientes em tratamento com os produtos selecionados.

## OBJETIVOS

---

### ***Objetivo geral***

Avaliar a qualidade de diferentes especialidades farmacêuticas do maleato de enalapril através do estudo de estabilidade e da determinação da concentração plasmática em pacientes.

### ***Objetivos específicos***

- ❖ Realizar o estudo de estabilidade acelerado com diferentes especialidades farmacêuticas do maleato de enalapril (Referência, Genéricos e Similares);
- ❖ Determinar durante o estudo de estabilidade: o perfil de liberação *in vitro* e teor de princípio ativo nas amostras incluídas no estudo nos diferentes tempos de armazenamento;
- ❖ Determinar a concentração plasmática do enalapril e enalaprilato em pacientes hipertensos, fazendo uso de diferentes especialidades farmacêuticas do enalapril.

## MATERIAL E MÉTODOS

---

### 3.1. Ensaio *in vitro*

#### 3.1.1. Material e Instrumentação

Os equipamentos, reagentes e matérias primas utilizadas na realização das análises *in vitro* em comprimidos de maleato de enalapril estão apresentados nos Quadros 4 e 5.

**Quadro 4** – Relação dos equipamentos utilizados na realização dos experimentos.

Descrição	Fabricante
Balança Analítica AG 200	Gehaka
Balança Semi-analítica Mark 4100	Tecnal
Câmara Climática 420 CLD	Nova Ética
Dissolutor VK 7000E	Vankel
Espectrofotômetro Cary 50	Varian

pH metro digital PG 1000	Gehaka
Banho de ultrassom USC 1400	Unique
Sistema de purificação de água (Milli-Q)	Millipore
Sistema de filtração a vácuo	Sibata
Agitador de tubos AP 56 (Vortex)	Tecnal
Centrífuga	Celm
Centrífuga refrigerada	Hitachi
Pipetas volume ajustáveis (200µL, 1000µL)	Pipetador Gilson
Karl Fisher 787 KK Titrimo	Metrohm
Cromatógrafo (CL-UV-VIS)	Varian
Cromatógrafo (CL-EM-EM)	Shimadzu-Micromass

**Quadro 5** – Relação das matérias-primas, reagentes e acessórios utilizados na realização dos experimentos.

Descrição
Maleato de enalapril – padrão primário (Farmacopéia Brasileira)
Enalaprilato – padrão primário (USP)
Lisinopril – padrão primário (USP)
Água Ultra Pura (Milli-Q)
Metanol – grau HPLC JT Baker
Acetonitrila – grau HPLC (JT Baker)
Ácido fórmico P.A. 99% (Synt)
Hidróxido de sódio (Vetec)
Fosfato de sódio monobásico (Vetec)
Fosfato de potássio monobásico (Vetec)
Ácido fosfórico P.A. (Synt)
Membranas filtrantes em PVDF 0,45 µc (Millipore)
Cartuchos SPE HLB 1cc (Waters)

Para realização das análises *in vitro* em comprimidos do fármaco anti-hipertensivo enalapril, foram incluídas no estudo amostras de comprimidos contendo teor declarado de 20 mg de maleato de enalapril de 9 especialidades farmacêuticas distintas, com prazo de validade superior a 1 ano a partir da data de sua aquisição. As amostras foram adquiridas no comércio farmacêutico da cidade de Goiânia-Goiás, com recursos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da FF/UFG.

Das amostras selecionadas para avaliação da estabilidade no teste acelerado, constaram especialidades farmacêuticas das seguintes categorias: 1 produto Referência, 4 Genéricos e 4 Similares. Para manter em sigilo a identidade dos produtos e seus fabricantes, as mesmas foram designadas como: produto R (Referência), produtos Genéricos A, B, C, D e produtos Similares A, B, E, F.

### **3.1.2. Estudo acelerado da estabilidade dos comprimidos de maleato de enalapril**

O estudo acelerado de estabilidade foi realizado de acordo com o “Guideline on stability testing” ([ICH Q1A(R2)], 2003) e a RDC nº 1 da ANVISA (BRASIL, 2005).

As amostras dos medicamentos em estudo foram armazenadas em estufa climatizadora, Nova Ética, 420 CLD (Figura 3), nas seguintes condições de temperatura e umidade relativa:  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  /  $75\% \text{UR} \pm 5\%$ , em suas embalagens primárias e avaliadas quanto ao perfil de dissolução e verificação do teor de enalapril, nos tempos 0, 30, 90 e 180 dias do estudo.



**Figura 3** – Câmara Climática 420 CLD, Nova Ética. Localização: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica – FF/UFG.

### **3.1.3. Análise de teor nos comprimidos de maleato de enalapril**

O método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em fase reversa foi utilizado para separação, identificação e quantificação do enalapril e de seus produtos de degradação nos produtos comerciais de maleato de enalapril das diferentes especialidades farmacêuticas incluídas nesse estudo. A Figura 4 e Quadro 6 apresentam a imagem e a descrição do cromatógrafo utilizado nas análises.



**Figura 4** – Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Varian).  
Localização: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica - FF/UFG.

**Quadro 6** – Descrição dos componentes do Equipamento CLAE-UV.

<b>Componente</b>	<b>Modelo</b>
Auto Injetor	Pro Star 410 – Varian
Coluna Cromatográfica	ChromSpher C18 RP (250mm X 4,6 mm), 5 $\mu$ m de diâmetro – Varian
Detector UV/VIS	Pro Star 240 – Varian
Software	Star Workstation
Software	Windows NT (v 4.0)

### 3.1.3.1. Definição dos parâmetros em CLAE-UV para determinação do teor de enalapril

A definição dos parâmetros necessários para aplicação da metodologia analítica utilizando CLAE, baseou-se na descrição da monografia do maleato de enalapril segundo a USP (2004), condição 1 apresentada no Quadro 7. No entanto, durante os testes preliminares, pequenas alterações foram testadas com a finalidade de obter melhor definição dos cromatogramas. O Quadro 7 apresenta as diferentes condições cromatográficas que foram avaliadas durante o desenvolvimento do método.

**Quadro 7** - Condições cromatográficas empregadas na definição do método de separação, identificação e quantificação do enalapril e seus produtos de degradação em comprimidos.

Condições	Fase Móvel	Coluna Cromatográfica	Fluxo (mL/min.)	Temperatura do forno (°C)
1 (USP)	Acetonitrila:tampão fosfato (25:75v/v)	C18	2,0	50
2	Acetonitrila:tampão fosfato (25:75v/v)	C18	2,0	25
3	Acetonitrila:tampão fosfato (25:75v/v)	C8	2,0	50
4	Acetonitrila:tampão fosfato (30:70v/v)	C18	1,5	60
5	Acetonitrila:tampão fosfato (25:75v/v)	C18	1,5	60

A validação do método foi feita realizando-se corridas com padrões de enalapril e seus produtos de degradação conhecidos (enalaprilato e dicetopiperazina), isolados e em conjunto. As condições cromatográficas que apresentaram melhor definição para realização das análises, seguiram os parâmetros da condição 5 (Quadro 7).

**a)** Fase móvel: Acetonitrila : tampão fosfato (25:75v/v)

**b)** Coluna cromatográfica: C18

**c)** Fluxo: 1,5 mL/min

- d) Tempo de corrida: 35 min.
- e) Temperatura do forno: 60 °C
- f) Detecção no UV: 215 nm

### **3.1.3.2. Método de preparação da fase móvel**

#### a) Solução tampão de fosfato de sódio monobásico 10mM (pH 2,2)

Foram pesados 1,38 g de fosfato de sódio monobásico e transferidos para um balão volumétrico de 1000 mL, contendo 700 mL de água ultrapura. Após agitação manual e homogeneização da solução, a mesma foi degaseificada e o pH ajustado para 2,2 utilizando ácido fosfórico 10%. O volume final foi completado com água para 1000 mL.

#### b) Solução de ácido fosfórico 10%

Em um balão volumétrico de 100 mL foram adicionados 50 mL de água ultrapura e 10 mL de ácido fosfórico. Após agitação manual cuidadosa, o volume foi completado com água e a solução homogeneizada.

#### c) Acetonitrila

Foi utilizada a forma pura da acetonitrila grau HPLC.

### **3.1.3.3. Método de preparação das soluções padrão**

#### a) Solução padrão de maleato de enalapril

Foi pesado 0,1g de maleato de enalapril (Padrão Farmacopéia Brasileira) e transferido para um balão volumétrico com capacidade de 100 mL, onde o volume foi completado com a solução tampão de fosfato de sódio monobásico 10mM (pH 2,2). Esta solução foi utilizada para preparar diluições sucessivas a fim de construir a curva analítica de calibração do enalapril.

#### b) Solução padrão de enalaprilato

Foi pesado 0,4g de enalaprilato (Padrão USP) e transferido para um balão volumétrico com capacidade de 100 mL, onde o volume foi completado com a solução tampão de fosfato de sódio monobásico 10 mM (pH 2,2).

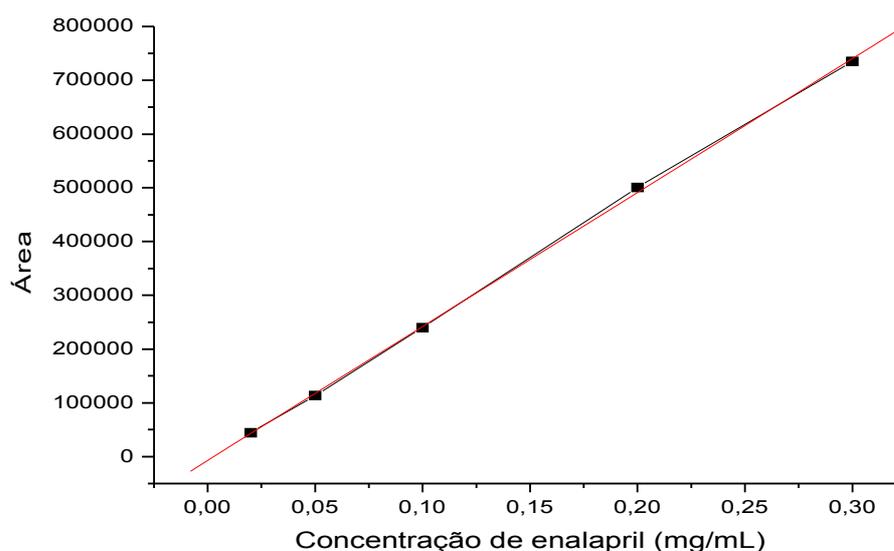
Amostra de 10 $\mu$ L da solução padrão foi injetada no cromatógrafo para monitorar o tempo de eluição do enalaprilato.

c) Solução de dicetopiperazina

Foram pesados aproximadamente 20 mg de maleato de enalapril (padrão Farmacopéia Brasileira) e transferidos para um becker com capacidade de 100 mL. Posteriormente o becker foi levado a uma mufla com a temperatura máxima por cerca de 10 minutos, após ser retirado do aquecimento, o resíduo foi resfriado e foram acrescentados 50 mL de acetonitrila. A solução obtida foi sonicada por alguns minutos e posteriormente filtrada. Alíquota de 10 $\mu$ L foi injetada no cromatógrafo a fim de monitorar o tempo de eluição da dicetopiperazina.

**3.1.3.4. Método de obtenção da curva de calibração do enalapril para determinação do teor**

A partir de diluições sucessivas da solução padrão do enalapril foi construída a curva de calibração, com concentrações que variaram de 0,02 a 0,3 mg/mL (Figura 5). Cada solução foi injetada em triplicata e a regressão linear da curva forneceu a seguinte equação:  $Y = - 7175,6058 + 2,49181E6 * X$ , ( $r = 0,99979$ ).



**Figura 5** - Curva de calibração do enalapril obtida através da análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Condições cromatográficas:

coluna C18 a 60° C, fase móvel acetonitrila e tampão fosfato (25:75 v/v) e fluxo de 1,5 mL/min. Detecção por UV (215 nm).

#### **3.1.3.5. Método de preparação das amostras de comprimidos de maleato de enalapril incluídas no estudo para determinação do teor**

Para o preparo das amostras, 10 comprimidos de cada produto comercial do maleato de enalapril incluído no estudo foram pesados e triturados finamente. Uma porção da mistura equivalente a uma unidade posológica (20 mg), foi pesada e transferida para um balão volumétrico de 100 mL acrescido de 50 mL da solução tampão fosfato de sódio 10 mM (pH 2,2). Após 10 minutos de agitação em ultrassom e total dissolução do sólido, o volume do balão foi completado para 100 mL com a solução tampão. A solução foi filtrada em membrana de PVDF (Millex) de 0,45 µm de poro, e 10 µL foram injetados no cromatógrafo. Todas as amostras obtidas nos diferentes tempos do ensaio de estabilidade foram preparadas para análise em duplicata.

#### **3.1.4. *Teste de Dissolução dos comprimidos de maleato de enalapril***

Os ensaios de dissolução foram realizados em equipamento VK 7000 (Vankel-Varian) acoplado a um Espectrofotômetro - UV Cary 50 (Varian) on Line, em sistema *total solution* (Figura 6).



**Figura 6** – Dissolutor Vankel 7000 acoplado espectrofotômetro UV Cary 50 (Varian), sistema *total solution*. Localização: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica - FF/UFG.

#### 3.1.4.1. Parâmetros utilizados no ensaio de dissolução dos comprimidos de maleato de enalapril

O perfil de dissolução foi determinado individualmente para 6 (seis) comprimidos de cada produto seguindo as condições recomendadas pela USP (2004) para realização do ensaio de dissolução de comprimidos de liberação imediata do maleato de enalapril. Os parâmetros determinados para análise estão apresentados no Quadro 8.

**Quadro 8** – Especificações para determinação do perfil de dissolução das amostras de maleato de enalapril.

Temperatura	37°C ± 0,5°C
Sistema de agitação	aparato 2 (pá)
Velocidade	50 rpm
Meio de dissolução	tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8)
Volume do meio	900 mL
Quantidade de amostras por ensaio	6 comprimidos (1 em cada cuba)
Alíquota amostrada	10 mL
Tempo de amostragem	0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos

Detecção	espectrofotometria UV (215nm)
----------	-------------------------------

#### 3.1.4.2. Método de preparação do meio de dissolução

##### a) Solução tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8)

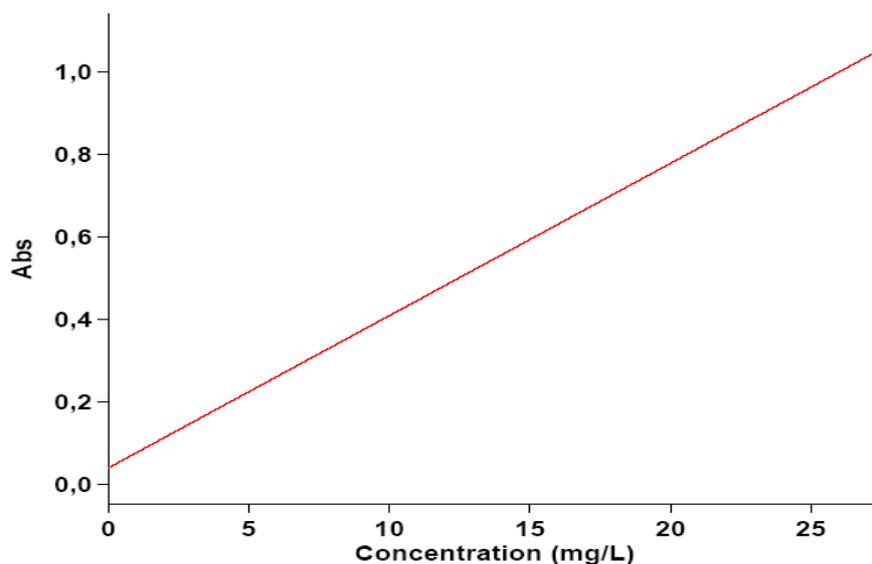
Para o preparo de aproximadamente 7 litros de tampão, foi utilizado recipiente com capacidade de 10 litros, onde inicialmente foram dissolvidos 47,64 g de fosfato de potássio monobásico em água purificada, sob agitação vigorosa a fim de obter total dissolução do sal. Posteriormente o pH foi ajustado com solução de hidróxido de sódio a 1 M e o volume final completado para 7 litros.

##### b) Solução de hidróxido de sódio 1 M

Foram pesados 40 g de hidróxido de sódio, transferidos para balão volumétrico de 1000 mL, adicionados cerca de 500 mL de água purificada e o balão levado ao ultrassom até completa dissolução do hidróxido de sódio. Posteriormente o volume final da solução foi completado até 1000 mL com água e a solução homogeneizada.

#### 3.1.4.3. Método de obtenção da curva de calibração do enalapril para determinação do perfil de dissolução

A partir de uma solução estoque do maleato de enalapril (Padrão Farmacopéia Brasileira) na concentração de 125 mg/L, diluições sucessivas possibilitaram a construção da curva de calibração (área do pico X concentração) com as seguintes concentrações: 5, 10, 15, 20 e 25 mg/L. Sendo gerada a seguinte equação da reta: **Abs = 0,03695 \* Conc + 0,03896**, com um **R<sup>2</sup> de 0,998** (Figura 7).



**Figura 7** - Curva de Calibração do enalapril 20 mg para análise da dissolução. *Sistema total solution*, detecção UV – 215 nm.

Os perfis de dissolução foram construídos a partir da quantificação do enalapril dissolvido nas cubas de dissolução, em intervalos de tempo pré-definidos (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos). As concentrações de enalapril dissolvido no meio foram determinadas através dos valores de absorbância, determinados por espectrofotometria no comprimento de onda de 215 nm.

#### **3.1.4.4. Métodos utilizados na avaliação dos dados obtidos no ensaio de dissolução**

Os perfis de dissolução obtidos a partir da análise das diferentes amostras de comprimidos de maleato de enalapril foram avaliados de acordo com os critérios de aceitação descritos na monografia do fármaco na USP (2004), onde uma porcentagem mínima de fármaco deve estar dissolvida após um intervalo de tempo específico. Para comparação dos perfis de dissolução entre produtos que apresentaram porcentagem de dissolução adequada foi avaliado o fator de similaridade, recomendado pelo FDA (1997). Foi aplicado o Método Independente de comparação através da determinação dos fatores de

diferença ( $f_1$ ) e de semelhança ( $f_2$ ) descrito pelo FDA (1997) e ANVISA (BRASIL, 2004).

Os Fatores de diferença ( $f_1$ ) e de semelhança ( $f_2$ ) podem ser calculados através das seguintes fórmulas:

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

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

Onde:  $n$  = número de tempos de coleta;  $R_t$  = valor de porcentagem dissolvida no tempo  $t$ , obtido com o medicamento Referência;  $T_t$  = valor de porcentagem dissolvida do produto teste (Genérico ou Similar), no tempo  $t$ . De acordo com os dados da literatura a semelhança ou a equivalência entre dois perfis pode ser determinada quando o valor de  $f_1$  ficar entre 0 e 15 e o valor encontrado de  $f_2$  for entre 50 e 100 (FDA, 1997; O'HARA et al, 1998; BRASIL, 2004).

### 3.1.5. **Determinação do teor de umidade nos comprimidos de maleato de enalapril**

Para determinação do teor de umidade nas amostras de comprimidos de maleato de enalapril incluídas no estudo ao final do estudo de estabilidade acelerada foi utilizado o método titulométrico de Karl Fisher descrito na Farmacopéia Brasileira IV (1988).

Foram pesados exatamente 20 mg de maleato de enalapril de cada uma das amostras de comprimidos e adicionadas separadamente ao frasco de titulação, sendo misturados a 40 mL de metanol. A mistura foi titulada com reagente padronizado de Karl Fischer até a viragem eletrométrica. Os testes

foram realizados utilizando o equipamento automático de titulação de Karl Fisher, modelo 787 KK Titrino da marca Metrohm.

### 3.2. **Ensaio *in vivo* (determinação da concentração plasmática do enalapril)**

#### **3.2.1. *Protocolo clínico***

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisas do Hospital Geral de Goiânia-Goiás (Anexo 1) e o consentimento pós-informação foi obtido de todos os participantes do ensaio clínico para monitoramento da concentração plasmática do fármaco em estudo.

A amostra foi formada por pacientes cadastrados na Liga de Hipertensão Arterial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás. Foram selecionados inicialmente através do cadastro da LHA 130 pacientes que atendiam critérios básicos estabelecidos no protocolo do estudo: paciente em uso de enalapril ou outro inibidor da ECA como monoterapia ou em combinação apenas com diurético para controle da hipertensão. Desses apenas 87 foram localizados através dos contatos disponibilizados em seu cadastro. Todos foram contactados e convidados a comparecer ao serviço da LHA do Hospital das Clínicas/UFG para realização de uma consulta prévia para esclarecimentos sobre o estudo e avaliação clínica com a finalidade de observar o atendimento aos critérios de inclusão estabelecidos no protocolo do estudo. Ao serem contactados, cerca de 40 pacientes não aceitaram participar da pesquisa por motivos diversos. A grande maioria relatou indisponibilidade de tempo para comparecer regularmente ao acompanhamento da pesquisa e alguns já estavam inseridos em outro estudo. Apenas 47 compareceram a consulta de avaliação prévia, sendo inseridos no estudo 31 pacientes de ambos os sexos que atendiam aos critérios descritos abaixo:

## **a) Critérios de inclusão:**

Os seguintes critérios deveriam ser atendidos a fim de que o voluntário pudesse participar do estudo:

1. Pacientes que atendam ao delineamento proposto;
2. Ter idade entre 18 e 60 anos;
3. Ser não fumante;
4. Ter seu peso dentro de uma variação máxima de  $\pm 15\%$  dos valores normais (Índice de Massa Corporal entre 18,5 – 25);
5. Já utilizar um dos fármacos do grupo dos inibidores da ECA para controle da pressão arterial;
6. Utilizar apenas diuréticos em associação ao inibidor da ECA para controle da pressão arterial, se for o caso;
7. Não apresentar insuficiência renal;
8. Ter sido submetido a uma avaliação clínica prévia;
9. Ter concordado livremente e assinado o termo de consentimento, após todos os elementos essenciais do protocolo ser esclarecidos, antes de qualquer procedimento.

## **b) Critérios de exclusão:**

Qualquer um dos seguintes critérios abaixo excluiria o voluntário do estudo:

- 1.** Ter apresentado no exame clínico prévio algum tipo de desvio de comportamento;
2. Ter sido internado por qualquer motivo até 4 semanas antes do início deste estudo;
3. O voluntário ter história de abuso de álcool ou drogas;
4. O voluntário ter qualquer condição que o impeça de participar do estudo pelo julgamento do investigador.

## **c) Critérios para descontinuação ou retirada de voluntários do estudo:**

Os seguintes critérios foram considerados, caso fosse necessário a retirada do voluntário do estudo:

- Ocorrência de efeitos adversos graves relacionados ao uso do fármaco em estudo;
- Aparecimento de doenças intercorrentes que necessitem de internação durante o estudo.

### **3.2.2. Delineamento do estudo**

O estudo clínico foi randomizado. Os indivíduos incluídos no estudo foram aleatoriamente selecionados para fazerem uso de uma das especialidades farmacêuticas do enalapril que foram incluídas no estudo de estabilidade (medicamento de Referência, Genérico ou Similar). Foram constituídos 3 grupos experimentais distintos nesta fase, com n=10 por grupo. A escolha de um dos medicamentos genéricos e um dos medicamentos similares foi realizada através de sorteio, sem levar em consideração os possíveis resultados obtidos no estudo da estabilidade, uma vez que todos os produtos testados foram previamente aprovados pela autoridade regulatória e encontravam-se disponíveis no mercado.

Cada paciente foi acompanhado em consulta individual, no início do tratamento e ao menos 2 (duas) vezes durante os trinta dias de tratamento por uma equipe de médicos da Liga de Hipertensão do HC/UFG. Em cada momento foram realizadas as avaliações do estado geral do paciente, aparecimento de possíveis reações adversas, monitoramento da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) com o objetivo de aumentar a segurança para o voluntário, evitar a presença de processos patológicos durante o estudo que pudessem interferir na farmacocinética do fármaco em estudo e determinação de variáveis que pudessem ser correlacionadas com a concentração do fármaco na corrente sanguínea. A pressão arterial foi medida na posição sentada após 5 (cinco) minutos de repouso, estando o paciente com a bexiga vazia, sem a realização

prévia de exercício físico. Foram realizadas duas medidas da pressão com intervalo mínimo de 2 minutos entre elas e foi considerado para análise o valor obtido na última medida. Foi utilizado para obter a medida, aparelho de coluna de mercúrio calibrado, em uso regular na Liga de Hipertensão.

Os pacientes receberam por via oral uma dose única diária de 20 mg do maleato de enalapril (referência, genérico ou similar) durante 30 dias. Ao final do tratamento foi solicitado a cada um dos voluntários a realização de uma única coleta de amostra de sangue.

### **3.2.3. Procedimento para coleta de sangue dos voluntários**

Após a administração oral de 20 mg de maleato de enalapril orientada a ser realizada pelos pacientes no horário das 7 às 8 horas da manhã em sua residência, os pacientes foram orientados a comparecer no 30º dia do tratamento, por volta das 10 horas (tempo necessário para a  $C_{max}$ ), quando seria realizada uma coleta de aproximadamente 20 mL de sangue em tubo com heparina através de agulha introduzida em veia superficial do antebraço do voluntário.

Após a coleta, todos os tubos de ensaio foram devidamente identificados pelas iniciais do nome do voluntário e número de seu protocolo. As amostras biológicas foram transportadas para o Laboratório de Tecnologia Farmacêutica para realização da etapa analítica dos ensaios, seguindo o procedimento de Boas Práticas de Laboratório para preservar as características do material a ser analisado.

O plasma foi obtido por centrifugação a 3400 rpm durante 4 minutos das amostras de sangue tratadas com anticoagulante heparina e armazenadas em freezer com temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  em tubos devidamente identificados, até o momento da análise.

As amostras biológicas foram armazenadas de acordo com os critérios de segurança e durante a realização da análise experimental utilizando material biológico, foram adotadas as BPL (Boas Práticas de Laboratório) em todos os procedimentos. As amostras foram utilizadas unicamente para avaliar a concentração plasmática do fármaco enalapril, conforme descrito no protocolo

submetido ao Comitê de Ética. Sendo de responsabilidade do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da FF/UFG o armazenamento e o descarte adequado das amostras.

### **3.2.4. Análise do fármaco no plasma**

Foi utilizada para determinação do enalapril e enalaprilato (metabólito) em plasma humano a técnica de Cromatografia Líquida acoplada a detector de Espectrometria de Massas (CL-EM-EM), usando o fármaco lisinopril como padrão interno. A descrição do equipamento utilizado nas análises está apresentada no Quadro 9.

Enalapril, enalaprilato e o lisinopril (padrão interno), foram extraídos do plasma humano através da extração em fase sólida (SPE) utilizando metanol como solvente de extração.

Uma alíquota do extrato foi analisada por Cromatografia Líquida em fase reversa acoplada a Espectrometria de Massas (CL-EM-EM), utilizando eletron spray em modo de separação íon positivo (ESI+), sendo realizado o monitoramento de múltiplas reações (Multiple Reaction Monitoring - MRM) com seleção de íons formados na segunda fragmentação (daughter ions).

**Quadro 9** - Descrição dos componentes do equipamento CL-EM-EM.

<b>Componente</b>	<b>Modelo</b>
Bomba	LC-10AV DP – Shimadzu
Degasser	DGU-14 A
Auto Injetor	SIL – 10 AD VP
Coluna cromatográfica	Chromolith C18 (50mmx4,6 mm d.i.)
Espectrômetro de Massas (EM)	Micromass – Quattro LC
Hardware	Professional workstations AP 200 Intel III.
Software	MassLynx (v 3.4)
Software	Windows NT (v 4.0)

### **3.2.5. Método de preparação das soluções padrão**

#### ***Soluções Padrão Estoque***

As soluções estoque dos padrões utilizados durante todo o estudo de monitoramento terapêutico foram armazenadas em freezer a -20°C. As alíquotas desta solução, utilizadas para os ensaios, foram acondicionadas em tubos falcon a -20°C em volume suficiente para realização do estudo.

#### **a) Solução Padrão de Enalapril 1,0 mg/mL**

Foram pesados 25 mg de maleato de enalapril (padrão farmacopéia brasileira), transferidos para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com solução de metanol:água (50:50 v/v).

#### **b) Solução Padrão de Enalaprilato 1,0 mg/mL**

Foram pesados 25 mg de enalaprilato (padrão USP), transferidos para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com solução de metanol:água (50:50 v/v).

#### **c) Solução Padrão de Lisinopril 0,5 mg/mL**

Foram pesados 25 mg de lisinopril (padrão USP), transferidos para balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com solução de metanol:água (50:50 v/v).

#### ***Soluções Intermediárias***

#### **a) Solução Intermediária de Enalapril 100,00 µg/mL**

Para obtenção de uma solução de concentração intermediária de enalapril, 5 mL da solução padrão de 1 mg/mL de enalapril foram pipetados e transferidos para um balão volumétrico de 50 mL, tendo posteriormente seu volume final completado com metanol:água (50:50 v:v).

### b) Solução Intermediária de Enalaprilato 100,00 µg/mL

Para obtenção de uma solução de concentração intermediária de enalaprilato, 5 mL da solução padrão de 1 mg/mL de enalaprilato foram pipetados e transferidos para um balão volumétrico de 50 mL, tendo posteriormente seu volume final completado com metanol:água (50:50 v/v).

### *Soluções de Trabalho*

As soluções de trabalho de enalapril e enalaprilato foram preparadas utilizando solução de metanol:água (50:50 v/v) em um mesmo balão volumétrico nas concentrações descritas nas Tabelas 2 e 3.

**Tabela 2** – Diluições obtidas para preparação das soluções de trabalho do Enalapril.

<b>Tipo de Amostra</b>	<b>Concentração da Solução (ng/mL)</b>	<b>Volum e final (mL)</b>	<b>Solução Intermediária (µg/mL)</b>	<b>Volume a Pipetar</b>	<b>Concentração no Plasma (ng/mL)</b>
	1800	50	100,00	900 µL	300,00
<b>CQA</b>	1440	50	100,00	720 µL	240,00
<b>CQM</b>	720	50	100,00	360 µL	120,00
	300	50	100,00	150 µL	50,00
	180	50	100,00	90 µL	30,00
	90	50	1,8	2,5 mL	15,00
<b>CQB</b>	36	50	1,8	1,0 mL	6,00
<b>LQ</b>	18	50	1,8	0,5 mL	3,00

CQA: Controle de qualidade alto; CQM: Controle de qualidade médio; CQB: Controle de qualidade baixo; LQ: limite de quantificação

**Tabela 3** – Diluições obtidas para preparação das soluções de trabalho do Enalaprilato.

Tipo de Amostra	Concentração da Solução (ng/mL)	Volume final (mL)	Solução Intermediária ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volume a Pipetar	Concentração no Plasma (ng/mL)
	900	50	100,00	450 $\mu\text{L}$	150,00
<b>CQA</b>	720	50	100,00	360 $\mu\text{L}$	120,00
<b>CQM</b>	360	50	100,00	180 $\mu\text{L}$	60,00
	270	50	100,00	135 $\mu\text{L}$	45,00
	180	50	100,00	90 $\mu\text{L}$	30,00
	90	50	1,8	2,5 mL	15,00
<b>CQB</b>	36	50	1,8	1,0 mL	6,00
<b>LQ</b>	18	50	1,8	0,5 mL	3,00

CQA: Controle de qualidade alto; CQM: Controle de qualidade médio; CQB: Controle de qualidade baixo; LQ: limite de quantificação

### **Preparo das Soluções de Trabalho de Lisinopril a partir da Solução Padrão de 0,5 mg/mL**

Para obtenção de uma solução de concentração menor de lisinopril, denominada solução de trabalho, 100  $\mu\text{L}$  da solução padrão de 0,5 mg/mL de lisinopril foram pipetados e transferidos para um balão volumétrico de 50 mL, tendo posteriormente seu volume final completado com metanol:água (50:50 v/v).

#### **3.2.6. Método de preparação da fase móvel**

Em uma proveta com capacidade de 1000 mL, foram colocados 800 mL de metanol grau HPLC e acrescentado 1 mL de ácido fórmico 99%. Posteriormente o volume final da proveta foi completado com metanol e a solução filtrada utilizando filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ .

A água utilizada na fase móvel foi água ultra pura (Milli-Q), que foi misturada ao metanol na proporção (65:35 v/v), conforme proporção estabelecida no desenvolvimento do método no cromatógrafo.

### 3.2.7. Condições Cromatográficas

A análise cromatográfica foi realizada em um CLAE - SHIMADZU com coluna analítica Chromolith C18 (50 mm x 4,6 mm d.i.) Merck.

A coluna foi operada na temperatura ambiente (25°C) e a temperatura do autoinjeter foi mantida e controlada a 22°C. O volume de injeção foi de 20 µL e fluxo de 0,6 mL/min.

O tempo total de corrida foi fixado em 3,00 minutos e os tempos de retenção típicos para os padrões estão descritos na Tabela 4.

**Tabela 4** – Tempos de retenção das substâncias que foram monitoradas através da CL-EM-EM.

<b>Padrão</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>
Enalapril	1,46
Enalaprilato	1,46
Lisinopril	1,37

### 3.2.8. Condições de operação do Espectrômetro de Massas (EM)

O espectrômetro de massas Quatro CL (EM-EM) – MICROMASS foi operado no modo de ionização electrospray positiva (ESI+). Os íons monitorados (Monitoramento Múltiplo de Reação - MRM) e as condições de operação do espectrômetro de massas estão descritas na Tabela 5.

**Tabela 5** – Íons monitorados e condições de operação do EM-EM para quantificação das substâncias em estudo.

<b>Analito</b>	<b>Parent (Da)</b>	<b>Daughter (Da)</b>	<b>Dwell (s)</b>	<b>Cone (V)</b>	<b>Coll Energy (eV)</b>
Enalapril	377,10	234,20	0,5	30,00	18,00
Enalaprilato	349,10	206,00	0,5	27,00	20,00

Lisinopril      406,32      84,10      0,5      30,00      25,00

### **3.2.9. Material Biológico utilizado na validação do método**

As amostras de plasma utilizadas no processo de validação foram obtidas de doadores distintos, tendo sido fornecidas pelo Instituto Goiano de Hemoterapia – INGOH. O Quadro 10 apresenta os tipos e os números dos lotes dos plasmas utilizados.

**Quadro 10** – Relação das amostras biológicas utilizadas na validação do método bioanalítico.

<b>Características</b>	<b>Lote</b>	<b>Procedência</b>
Plasma humano normal	103793 ACGL	INGOH
Plasma humano normal	82402 ARP	INGOH
Plasma humano normal	12375 ACS	INGOH
Plasma humano normal	116792 MRS	INGOH
Plasma humano hiperlipêmico	59714 JPC	INGOH
Plasma humano hemolizado	100371 HGS	INGOH

### **3.2.10. Procedimento de extração do fármaco na amostra biológica**

O processo de extração foi aplicado não somente às amostras de plasma dos pacientes incluídos no estudo, mas também para a extração das soluções de trabalho geradas para obtenção da curva calibração e dos controles de qualidade.

Todas as amostras de plasma humano congeladas foram previamente descongeladas naturalmente à temperatura ambiente e centrifugadas a 4000 rpm por 2 minutos para precipitar os sólidos.

Para realização da extração das amostras, cartuchos de extração em fase sólida (SPE), previamente condicionados com 1 mL de metanol e 1 mL de água, foram dispostos em tubos de ensaios em uma estante em quantidade suficiente para realização das análises. Em cada cartucho foram colocados 250

$\mu\text{L}$  de uma amostra de plasma humano, acrescidos de 50  $\mu\text{L}$  do padrão interno, exceto para o branco.

Para a extração das amostras que constituíram a curva de calibração e para os padrões de controle de qualidade, foram adicionados ainda 50  $\mu\text{L}$  das soluções padrões de trabalho preparadas a partir das diluições descritas nas Tabelas 2 e 3 (enalapril e enalaprilato respectivamente) e ainda 250  $\mu\text{L}$  de água em cada cartucho.

O conjunto cartucho-tubo de ensaio foi centrifugado a 3400 rpm por 2 minutos, para eluição do plasma e retenção do fármaco no cartucho. O eluido foi desprezado e os cartuchos transferidos para novos tubos devidamente identificados. A cada um desses cartuchos foram adicionados 600  $\mu\text{L}$  de metanol, centrifugados novamente a 3400 rpm por 2 minutos, para que o extrato contendo o analito fosse eluído.

As colunas de extração foram desprezadas e o eluido obtido nos tubos de ensaio agitados e transferidos para os frascos de acondicionamento de amostra (vials) do amostrador automático do cromatógrafo, para proceder as corridas analíticas.

### **3.2.11. Validação do método bionalítico**

A validação da metodologia analítica para quantificação do enalapril e enalaprilato no plasma foi feita de acordo com os critérios para validação de métodos bionalíticos descritos na Resolução N<sup>o</sup> 899 da ANVISA (BRASIL, 2003c), sendo verificados os seguintes parâmetros:

1. Especificidade/seletividade;
2. Linearidade;
3. Precisão;
4. Exatidão;
5. Limite de Detecção;
6. Limite de Quantificação;
7. Recuperação;
8. Robustez;

## 9. Estabilidade.

1. Seletividade/Especificidade – Foi analisada a matriz biológica (plasma) obtida de seis indivíduos, sendo quatro amostras normais, uma hiperlipêmica e uma hemolisada (BRASIL, 2003c), com objetivo de verificar a interferência de possíveis constituintes do plasma na metodologia.
2. Linearidade – A linearidade foi determinada através da análise de 9 concentrações diferentes dos padrões, através da construção da curva de calibração para cada uma das substâncias monitoradas (enalapril, enalaprilato e lisinopril), utilizando-se a mesma matriz biológica proposta para o estudo. Foram estabelecidos como critérios de aceitação:
  - ❖ Desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o LQ;
  - ❖ Desvio menor ou igual a 15% em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração;
  - ❖ Coeficiente de correlação linear ( $r$ ) de no mínimo 0,98 (BRASIL, 2003c).
3. Limite de detecção – a estimativa do limite de detecção foi realizada com base na relação sinal/ruído, segundo a determinação de que o limite de detecção seja de 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base (BRASIL, 2003c).
4. Limite de quantificação – O limite de quantificação foi determinado através da análise de matriz biológica contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2003c).

5. Precisão – para determinação da precisão do método, foi verificada a repetibilidade, utilizando-se três concentrações (baixa, média e alta) com 5 determinações de cada concentração (BRASIL, 2003c). A precisão foi determinada em uma mesma corrida (intra-lote) e em corridas diferentes (inter-lotes). E o resultado avaliado na forma de desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), não sendo admitidos valores superiores a 15%, exceto para o LQ, no qual foram admitidos valores até 20% (BRASIL, 2003c).
6. Exatidão – A exatidão do método foi verificada utilizando-se três concentrações (baixa, média e alta) com 5 determinações de cada concentração. O desvio observado entre os valores encontrados não pôde exceder 15%, exceto para o L.Q., para o qual se admite valores menores ou iguais a 20% (BRASIL, 2003c). A exatidão foi determinada intra-lote (em uma mesma corrida analítica) e inter-lotes (corridas distintas), sendo a mesma expressa em percentagem através da relação entre concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica (BRASIL, 2003c).
7. Recuperação – foi determinada comparando-se resultados de amostras extraídas a partir de 3 concentrações (baixa, média e alta), com os resultados obtidos a partir de soluções padrões não extraídas. O cálculo da recuperação foi feito comparando a área do cromatograma obtido na análise do padrão extraído e não extraído (BRASIL, 2003c).
8. Robustez – foi avaliada através de pequenas alterações produzidas nos parâmetros analíticos, como pH da fase móvel, fluxo, temperatura, sem que o resultado fosse comprometido de forma significativa (BRASIL, 2003c).

9. Estabilidade – foram realizados diferentes ensaios para avaliar a estabilidade das soluções e das amostras em estudo (BRASIL, 2003c):

**a) Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento:**

A estabilidade do fármaco em matriz biológica foi testada após ciclos de congelamento e descongelamento. Foram utilizadas na avaliação da estabilidade cinco amostras de concentração baixa e alta determinadas durante a validação do método analítico. As amostras foram congeladas à temperatura indicada para o armazenamento e mantidas por 24 horas, sendo então submetidas ao descongelamento na temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, as mesmas foram novamente congeladas por 24 horas e assim sucessivamente, até completar 3 ciclos, o fármaco nas amostras foi quantificado. Os resultados obtidos na quantificação dessas amostras foram comparados com os resultados obtidos da análise de amostras recém-preparadas (BRASIL, 2003c).

**b) Estabilidade de curta duração:**

Para verificar a estabilidade de curta duração foram utilizadas cinco amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por um período de 8 horas, baseado no tempo em que as amostras necessitaram permanecer na temperatura ambiente para que as análises fossem realizadas. Depois de transcorrido este tempo, as amostras foram então analisadas e os resultados obtidos comparados com aqueles obtidos da análise de amostras recém-preparadas (BRASIL, 2003c) .

**c) Estabilidade de longa duração:**

Para realizar a estabilidade de longa duração, as amostras foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por um período que excedeu o tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra e a última análise. Foi avaliada a estabilidade de longa duração do fármaco enalapril, após armazenamento por 180 dias. Foram utilizadas cinco amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico. Os resultados desta análise

foram comparados com os obtidos da análise de amostras recém-preparadas (BRASIL, 2003c).

**d) Estabilidade das soluções-padrão:**

A estabilidade das soluções-padrão do fármaco e do padrão interno foi avaliada à temperatura ambiente por 12 horas após preparação e após armazenamento em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  por sete dias. Os resultados destas análises foram comparados com aqueles obtidos utilizando-se soluções recentemente preparadas dos padrões do fármaco e padrão interno.

Amostras analisadas no estudo de estabilidade foram consideradas estáveis quando não se observou desvio superior a 15% do valor obtido das amostras recém-preparadas, com exceção do LQ, para o qual se aceita desvio de até 20% (BRASIL, 2003c).

#### **4. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Parâmetros derivados da concentração plasmática foram analisados estatisticamente usando método paramétrico, conduzido pela análise de variância (ANOVA) das médias, para detectar possíveis diferenças entre os grupos experimentais, seguida da aplicação do Teste de Tukey para comparação entre pares de dados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

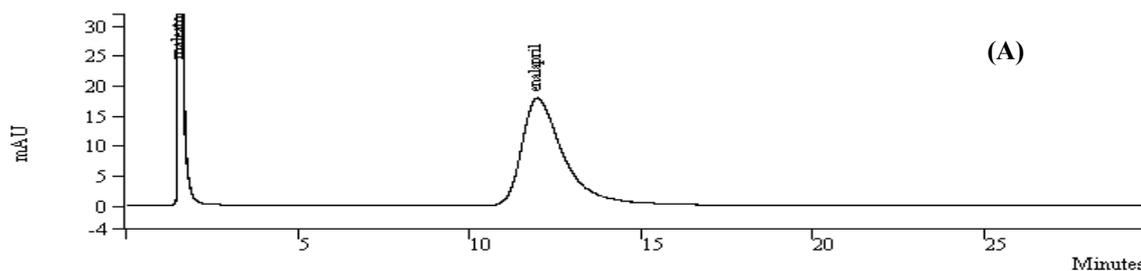
---

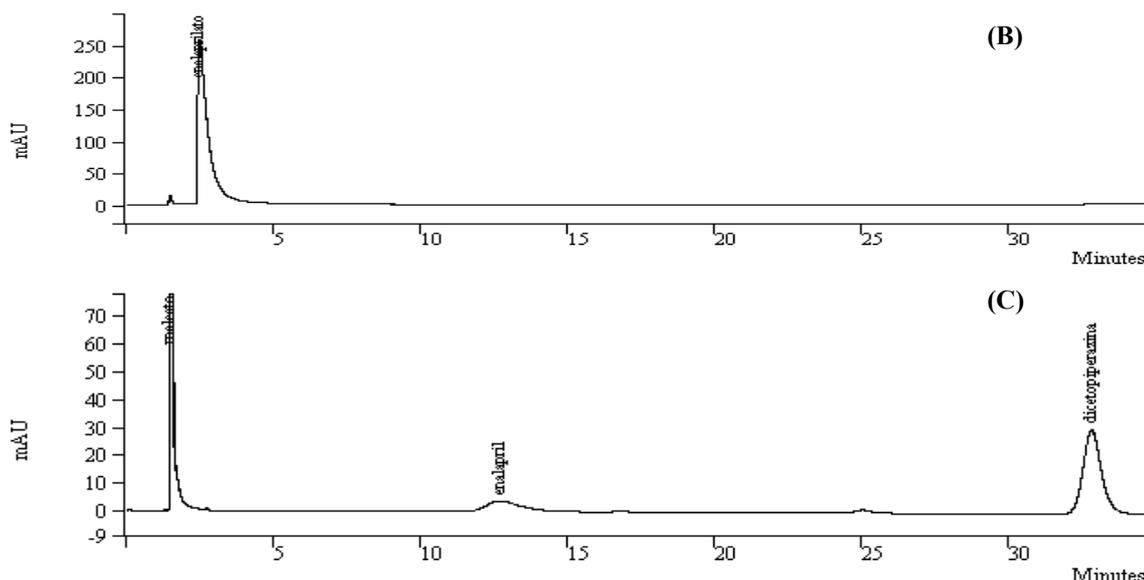
### 5.1. Resultados dos ensaios *in vitro*

#### 5.1.1. Resultados da análise de teor de enalapril nas amostras incluídas no estudo

No presente estudo a temperatura do forno foi aumentada de 50°C para 60°C, já que na análise do enalapril o aumento da temperatura favorece a diminuição do tempo de corrida e melhora o formato do pico (TRABELSI et al, 2000). E o fluxo foi reduzido de 2,0 para 1,5 mL/min., melhorando a resolução entre os picos.

Cromatogramas obtidos com amostras isoladas dos padrões de enalapril, enalaprilato e do produto de degradação dicetopiperazina estão apresentados na Figura 8.





**Figura 8** – Cromatogramas representativos dos padrões de maleato de enalapril (A), enalaprilato (B) e produto de degradação dicetopiperazina (C). Condições cromatográficas: coluna C18 a 60° C, fase móvel acetonitrila e tampão fosfato (25:75 v/v), fluxo de 1,5 mL/min. Detecção por UV (215 nm).

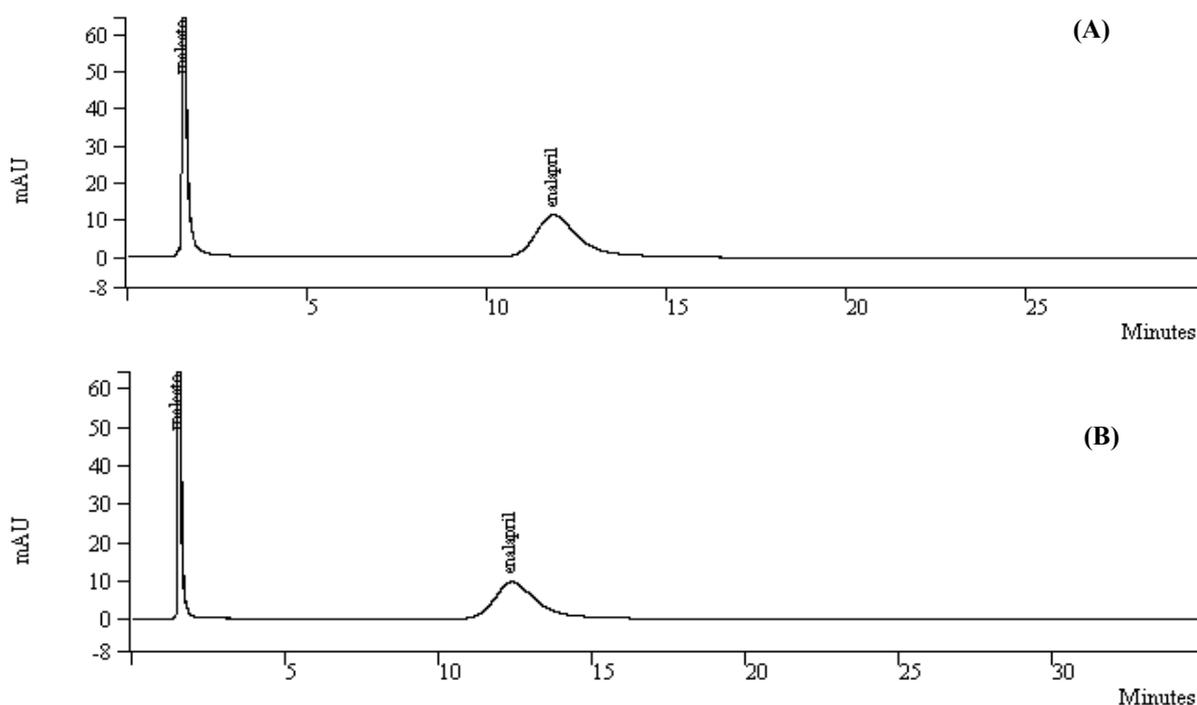
O método analítico utilizado, baseado em pequenas alterações do método descrito na USP (2004) para determinação do teor de enalapril utilizando CLAE, mostrou-se satisfatório para este estudo, sendo capaz de quantificar o princípio ativo (enalapril) e de separá-lo de seus produtos de degradação (enalaprilato e a dicetopiperazina).

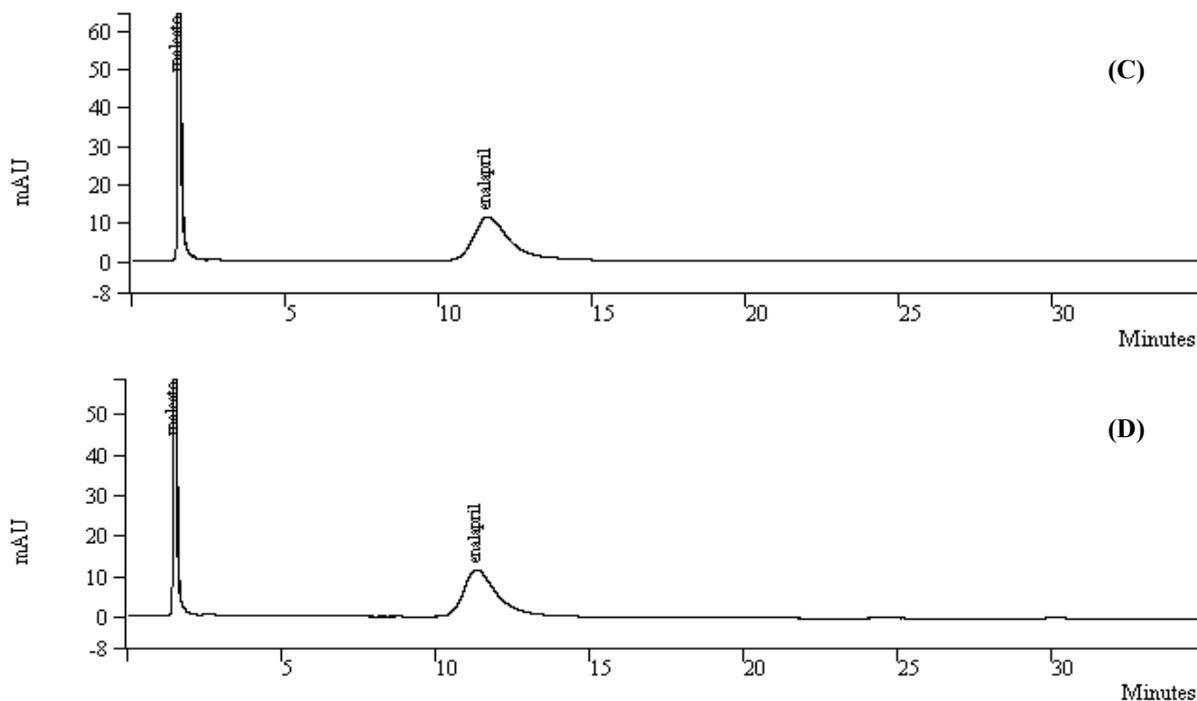
A linearidade do método foi determinada através da razão da área do pico gerado por concentrações conhecidas do padrão de maleato de enalapril preparadas para obtenção da curva de calibração, representada na Figura 5, com um coeficiente de correlação de 0,99979.

Na análise do teor de enalapril nos comprimidos das diferentes especialidades em estudo, os cromatogramas permitiram a detecção do enalapril no tempo de eluição aproximado de 11,5 minutos e nas amostras que sofreram degradação durante o ensaio de estabilidade frente à temperatura e umidade, foi detectado o enalaprilato que foi eluído no tempo aproximado de 2,5 minutos de corrida e a dicetopiperazina aos 31 minutos. Os cromatogramas apresentados na Figura 9 mostram a detecção e a quantificação do enalapril no produto Referência nos diferentes tempos do estudo de estabilidade acelerada. O resultado das análises nos mesmos tempos para os comprimidos de um dos produtos genéricos (Genérico

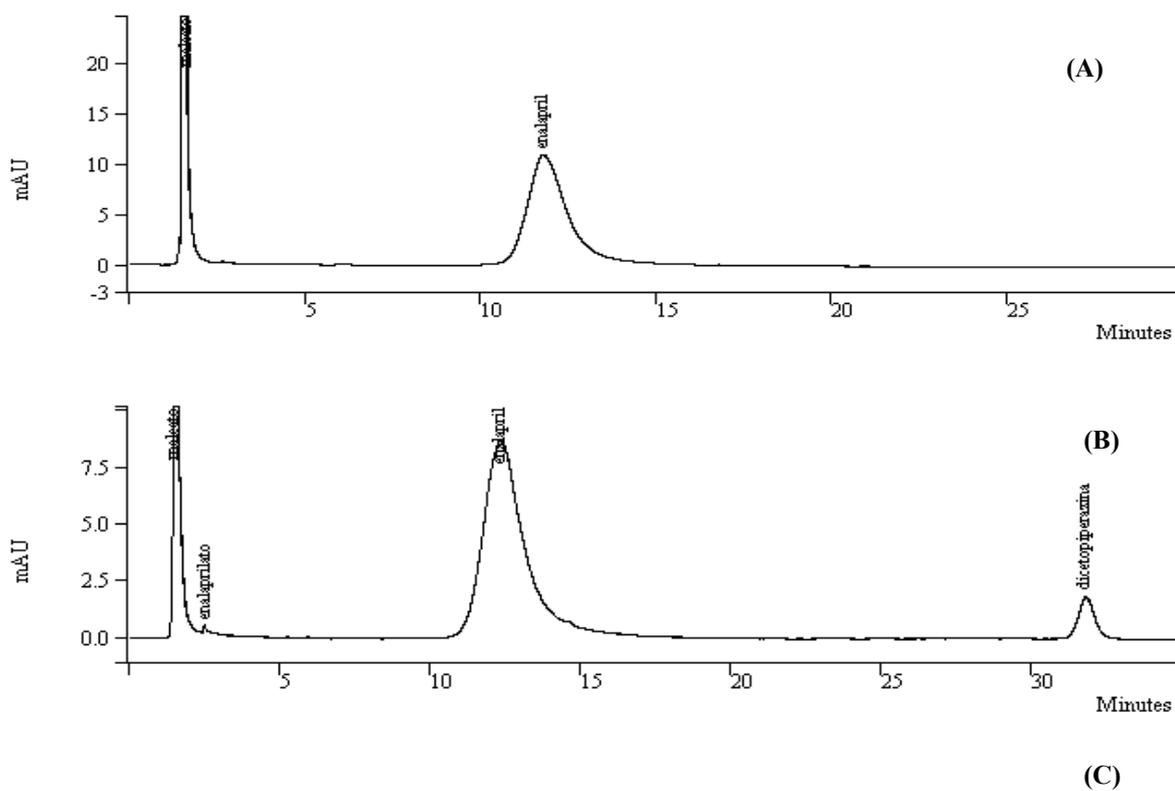
A) pode ser observado na Figura 10. Comparando os cromatogramas das Figuras 9 e 10 pode-se observar a presença dos produtos de degradação do enalapril na especialidade farmacêutica denominada Genérica A. Os cromatogramas apresentados de forma seqüencial em relação ao tempo de exposição às condições forçadas de temperatura e umidade estabelecidas no ensaio de estabilidade acelerada demonstram o aumento progressivo na proporção dos produtos de degradação (Figura 10). Pode ser observado que o principal composto de degradação encontrado neste estudo de estabilidade do maleato de enalapril foi a dicetopiperazina, que é um produto da ciclização intramolecular do enalapril, reação favorecida pelo aumento da temperatura e que ocorre principalmente em amostras no estado sólido, conforme descrito por LIN et al (2002).

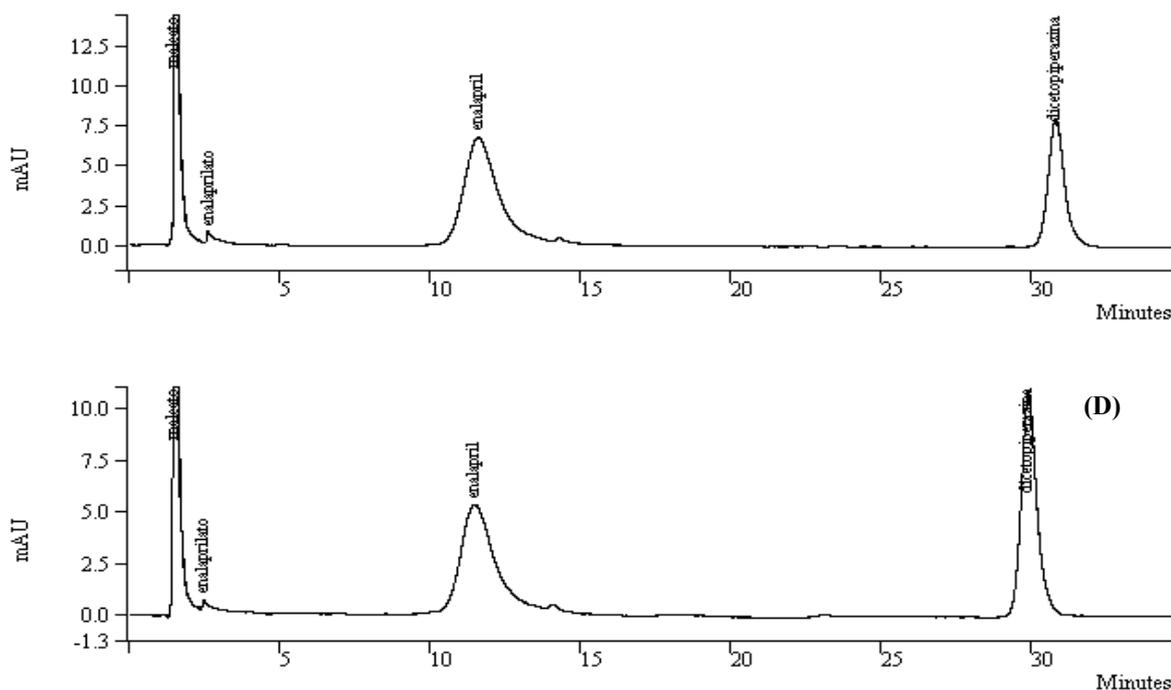
A presença de menores concentrações do enalaprilato, produto de degradação resultante da reação de hidrólise do enalapril, conforme pode ser observado nos cromatogramas da Figura 10, pode ser explicado pelos resultados obtidos na análise de teor de umidade (apresentados na Tabela 6). Mesmo após os 180 dias do ensaio de estabilidade o teor de umidade dos comprimidos permaneceu reduzido.





**Figura 9** - Cromatogramas obtidos na quantificação e separação do enalapril (t.r. 11.5 min.) do medicamento Referência nos diferentes tempos de análise do ensaio de estabilidade t=0 (A), t=30 (B), t=90 (C) e t=180 dias (D). (t.r. = tempo de retenção). Condições cromatográficas: coluna C18 a 60° C, fase móvel acetonitrila e tampão fosfato (25:75 v/v), fluxo de 1,5 mL/min. Detecção por UV (215 nm).



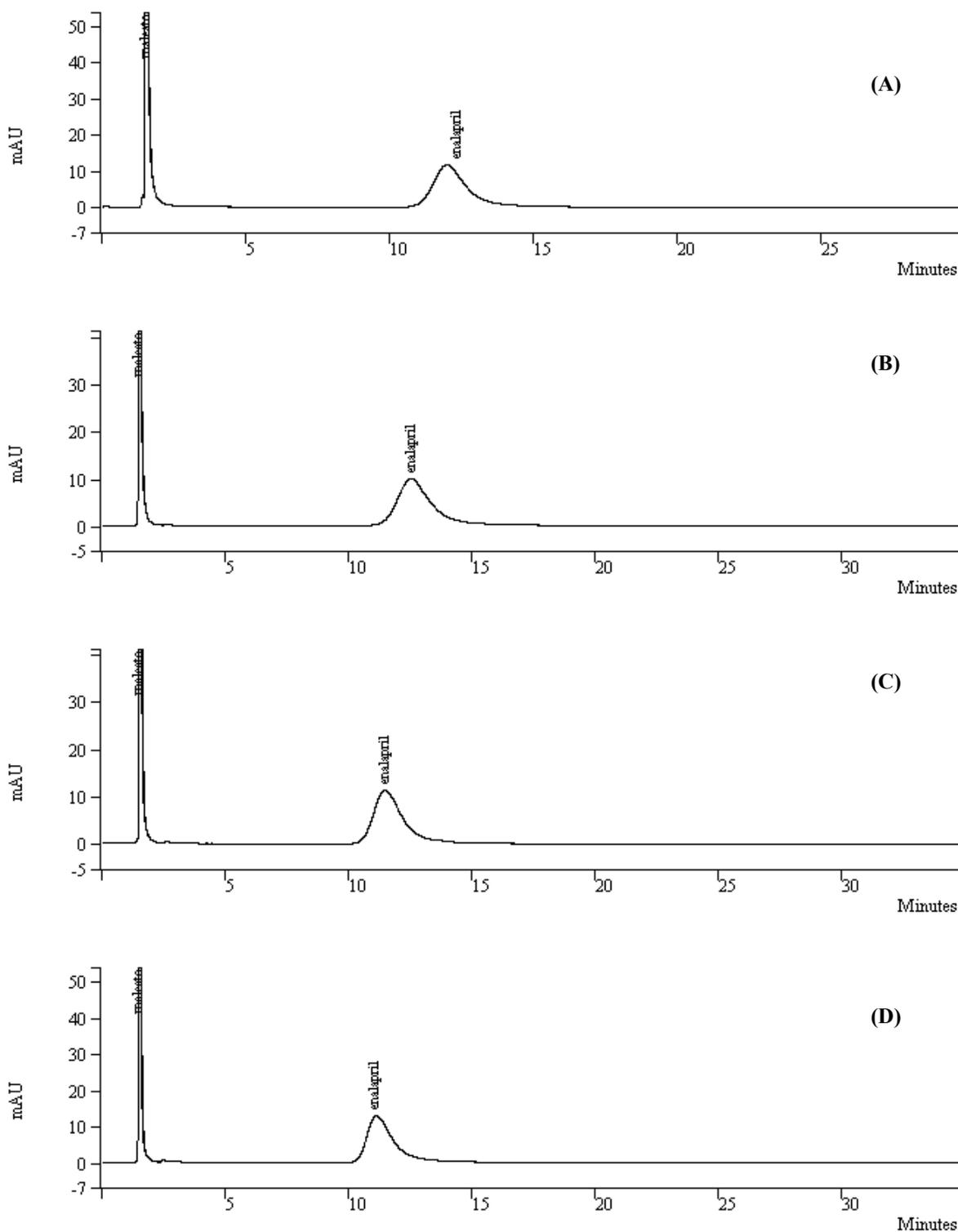


**Figura 10** - Cromatogramas obtidos na quantificação e separação do enalapril (t.r. 11.5 min.) e seus produtos de degradação enalaprilato (t.r. 2.5 min.) e dicetopiperazina (t.r. 31 min) do medicamento Genérico A nos diferentes tempos de análise do ensaio de estabilidade t=0 (A), t=30 (B), t=90 (C) e t=180 dias (D). (t.r. = tempo de retenção). Condições cromatográficas: coluna C18 a 60° C, fase móvel acetonitrila e tampão fosfato (25:75 v/v) e fluxo de 1,5 mL/min. Detecção por UV (215 nm).

**Tabela 6** – Teor de umidade detectado nas amostras de comprimidos de maleato de enalapril incluídas no estudo ao final do ensaio acelerado de estabilidade (t=180 dias).

Amostras	Teor de Umidade em % (t=180)
Referência	5,58%
Genérico A	5,85%
Genérico B	5,61%
Genérico C	6,19%
Genérico D	5,12%
Similar A	5,67%
Similar B	5,39%
Similar E	5,12%
Similar F	5,84%

Na Figura 11 estão representados cromatogramas obtidos durante o ensaio de estabilidade com o produto Similar B. Pode ser observado que para este produto a estabilidade da formulação foi mantida durante os 180 dias de ensaio nos quais as amostras permaneceram a 40°C e 75% de UR.



**Figura 11** - Cromatogramas obtidos na quantificação e separação do enalapril (t.r. 11.5 min.) do medicamento Similar B nos diferentes tempos de análise do ensaio de estabilidade t=0 (A), t=30 (B), t=90 (C) e t=180 dias (D). (t.r. = tempo de retenção). Condições cromatográficas: coluna C18 a 60° C, fase móvel acetonitrila e tampão fosfato (25:75 v/v) e fluxo de 1,5 mL/min. Detecção por UV (215 nm).

A Tabela 7 apresenta os valores da quantificação do enalapril obtida em todas as amostras incluídas neste estudo.

Conforme pode ser observado, o teor de enalapril foi determinado em todos os tempos preconizados pela legislação brasileira para realização do estudo de estabilidade pelo envelhecimento acelerado (0, 90 e 180 dias) e ainda uma análise adicional aos 30 dias, com objetivo de assegurar o melhor acompanhamento do estudo antes de três meses.

No tempo zero do estudo, ou seja, na análise inicial dos medicamentos antes de serem submetidos às condições forçadas de temperatura e umidade, já foram observados resultados em relação ao teor do fármaco fora das especificações em alguns dos produtos. Quantidades inadequadas do enalapril foram detectadas nas amostras denominadas Genérico A e Similar A, ambos pertencentes ao mesmo fabricante.

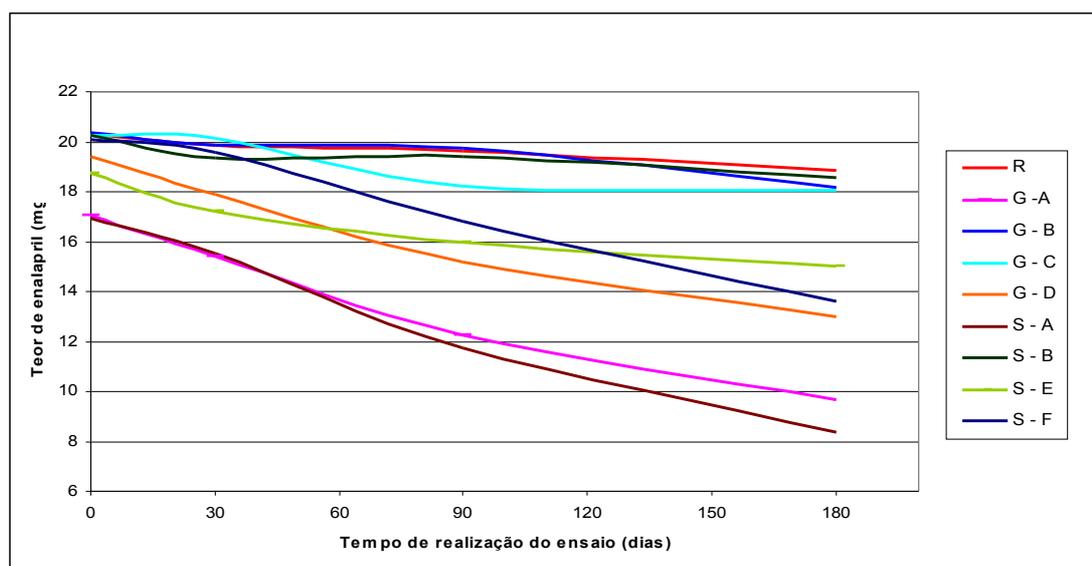
**Tabela 7** - Teor de enalapril determinado nas diferentes especialidades farmacêuticas (comprimidos de 20 mg) em estudo durante o ensaio de estabilidade nos tempos 0, 30, 90 e 180 dias.

Amostras	Teor enalapril em mg (t=0)	Teor enalapril em mg (t=30)	Teor enalapril em mg (t=90)	Teor enalapril em mg (t=180)
Referência	20,30	19,84	19,65	18,83
Genérico A	<b>17,03</b>	15,43	12,24	<b>9,65</b>
Genérico B	20,38	19,84	19,76	18,18
Genérico C	20,25	20,14	18,25	18,05
Genérico D	19,41	17,91	15,20	<b>12,97</b>
Similar A	<b>16,94</b>	15,52	11,74	<b>8,39</b>
Similar B	20,26	19,40	19,40	18,54
Similar E	18,73	17,20	15,99	<b>15,03</b>
Similar F	20,08	19,56	16,80	<b>13,58</b>

Valores calculados a partir da equação:  $Y = (-7175,6058 + 2,49181E6) * X$ , ( $r = 0,99979$ )

De acordo com USP XXVII e XXX (2004, 2007), a variação que pode ocorrer na quantidade de fármaco em relação ao teor declarado na formulação não pode exceder a  $\pm 10\%$ . Portanto, para todas as amostras analisadas (comprimidos de 20 mg), o teor mínimo aceitável seria de 18 mg por comprimido de enalapril. Ou ainda, de acordo com a legislação brasileira, a variação do teor de fármaco entre o medicamento Referência e o medicamento teste (Genérico ou Similar) não deve ser superior a 5% (BRASIL, 2004).

Os demais resultados apresentados na Tabela 7 demonstram ainda que, ao final do ensaio de estabilidade (t=180 dias), menos de 50% dos comprimidos de maleato de enalapril em estudo mantiveram a quantidade considerada ideal do fármaco. A perda progressiva e intensa do enalapril em algumas amostras também pode ser avaliada pela Figura 12.



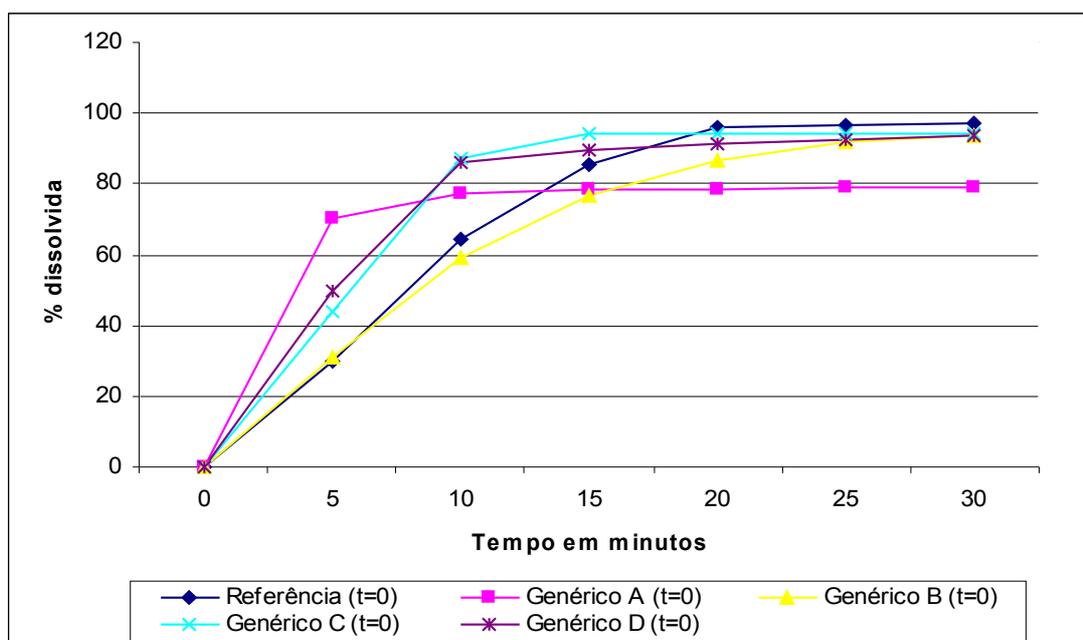
**Figura 12** – Demonstração da perda progressiva do teor de enalapril nas amostras incluídas no estudo ao longo do ensaio acelerado da estabilidade.

A degradação observada em amostras do enalapril em condições ambientais pouco adversas foi previamente descrita por AL-OMARI et al (2001) e STANISZ (2003). Os resultados obtidos nesse estudo confirmam que formulações comerciais desse fármaco são altamente susceptíveis a degradação. Como o Brasil é um país

de clima tropical – classe IV (BAKSHI & SINGH, 2002), estudos envolvendo avaliação da estabilidade para produtos susceptíveis a exposições a altas temperaturas e umidade devem ser implementados durante o desenvolvimento da formulação, bem como a determinação de orientações criteriosas no que diz respeito ao seu transporte e estocagem desses produtos.

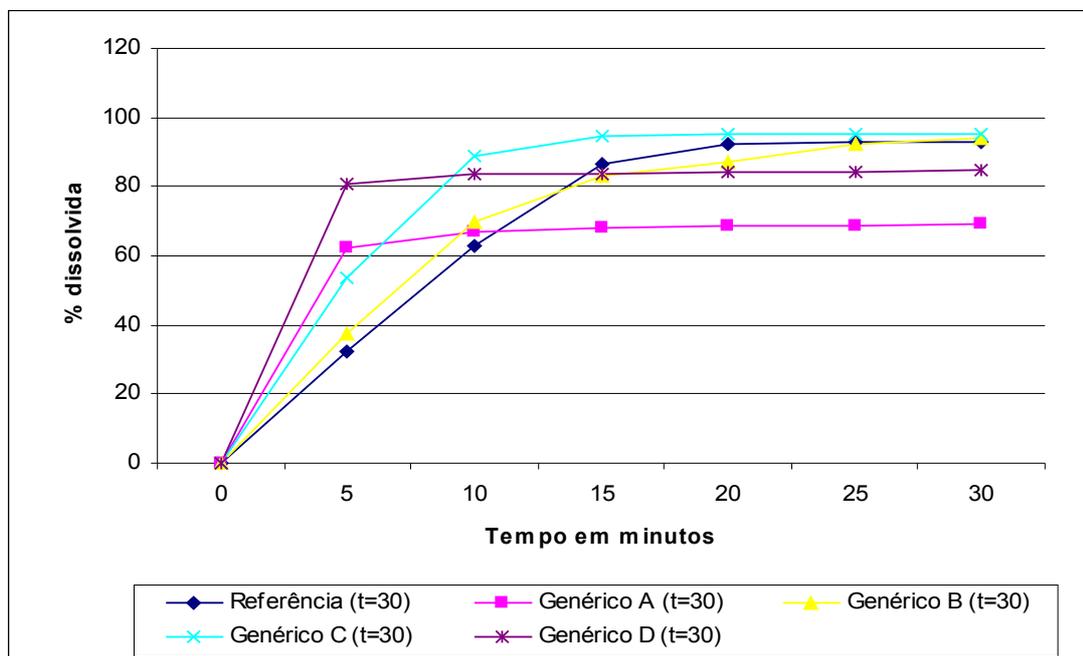
### 5.1.2. Resultados dos ensaios de dissolução das amostras de comprimidos de maleato de enalapril incluídas no estudo

O resultado dos ensaios de dissolução das diferentes especialidades analisadas nesse estudo e avaliadas nos tempos zero, trinta, noventa e cento e oitenta dias do estudo de estabilidade estão apresentados na forma de percentagem do fármaco dissolvido em cada tempo de coleta para análise e obtenção do perfil de dissolução e também como quantitativo do fármaco em mg dissolvida ao longo da análise. Nas Figuras 13, 14, 15 e 16 e Tabelas 8, 9, 10 e 11 podem ser observados os dados comparativos entre os perfis de dissolução do produto Referência e as formulações de produtos Genéricos e as Figuras 17, 18, 19 e 20 e Tabelas 12, 13, 14 e 15 apresentam os resultados comparando os perfis de dissolução do produto Referência e os produtos Similares.

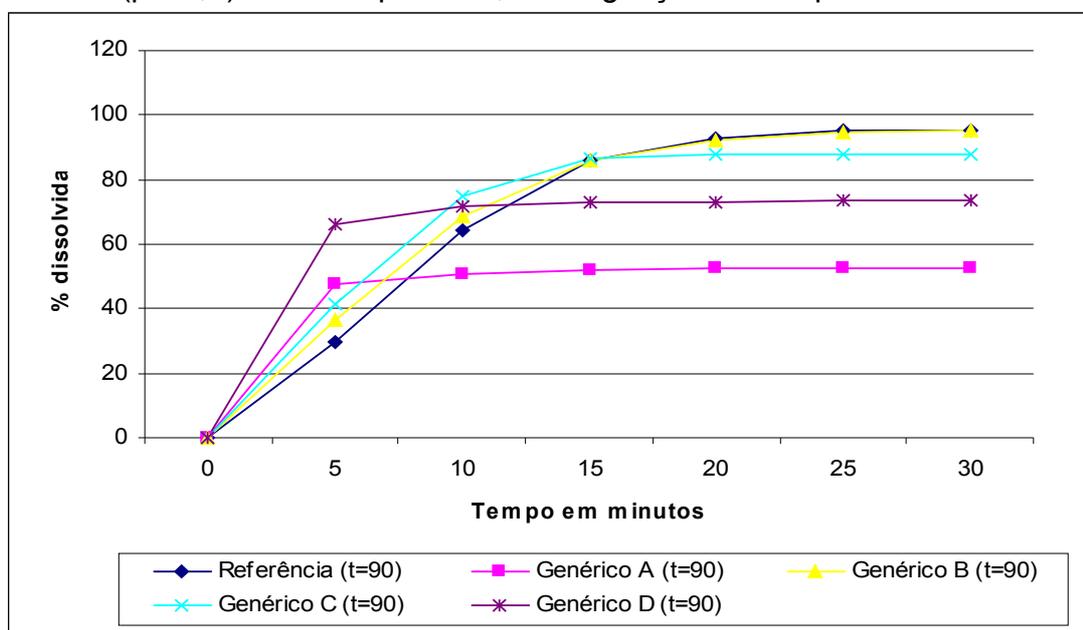


**Figura 13** – Perfis de dissolução do maleato de enalapril em comprimidos de 20mg (Referência e Genéricos) no tempo zero do estudo

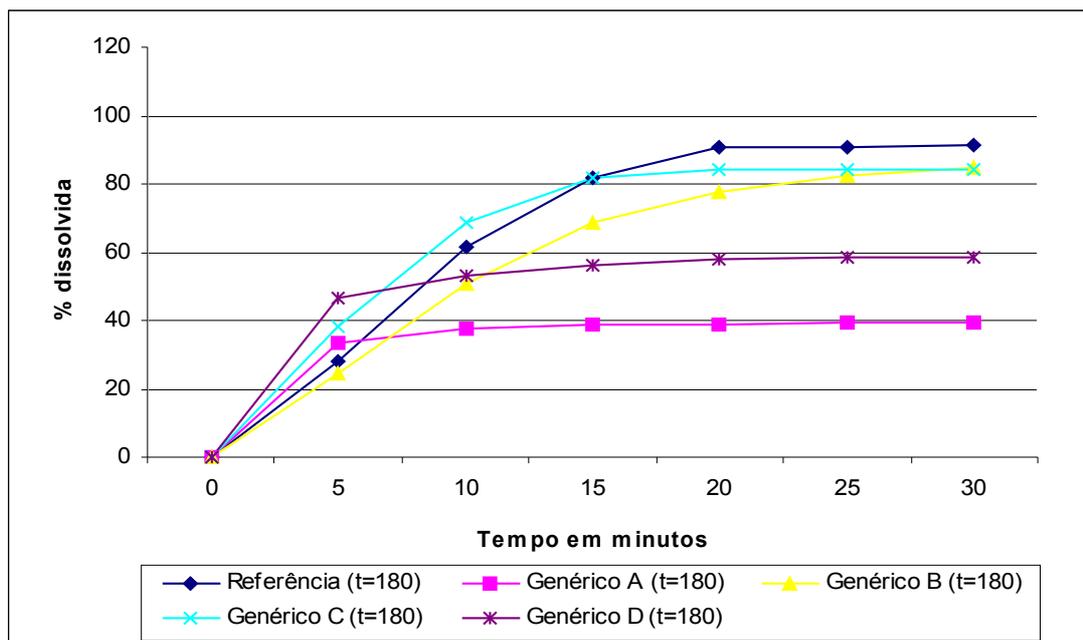
de estabilidade. Teste de dissolução em meio tampão fosfato de potássio 50mM (pH 6,8) usando aparato 2, com agitação de 50 rpm.



**Figura 14** – Perfis de dissolução do maleato de enalapril em comprimidos de 20mg (Referência e Genéricos) aos trinta dias do estudo de estabilidade. Teste de dissolução em meio tampão fosfato de potássio 50mM (pH 6,8) usando aparato 2, com agitação de 50 rpm.



**Figura 15** – Perfis de dissolução do maleato de enalapril em comprimidos de 20mg (Referência e Genéricos) aos noventa dias do estudo de estabilidade. Teste de dissolução em meio tampão fosfato de potássio 50mM (pH 6,8) usando aparato 2, com agitação de 50 rpm.



**Figura 16** – Perfis de dissolução do maleato de enalapril em comprimidos de 20mg (Referência e Genéricos) no tempo final (180 dias) do estudo de estabilidade. Teste de dissolução em meio tampão fosfato de potássio 50mM (pH 6,8) usando aparato 2, com agitação de 50 rpm.

**Tabela 8** - Valores das médias das concentrações de enalapril em mg dissolvida ( $\pm$  desvio padrão) em função do tempo, a partir dos produtos Referência e Genéricos no tempo zero do ensaio de estabilidade.

Tempo (min.)	R	G - A	G - B	G - C	G - D
5	5,9 $\pm$ 0,54	14,1 $\pm$ 0,73	6,2 $\pm$ 2,16	8,7 $\pm$ 1,48	10,9 $\pm$ 2,73
10	12,9 $\pm$ 0,66	15,5 $\pm$ 0,55	11,9 $\pm$ 3,57	17,5 $\pm$ 0,53	16,9 $\pm$ 1,04
15	17,1 $\pm$ 0,64	15,7 $\pm$ 0,48	15,4 $\pm$ 2,87	18,8 $\pm$ 0,18	17,6 $\pm$ 0,91
20	19,2 $\pm$ 0,13	15,8 $\pm$ 0,47	17,4 $\pm$ 1,95	18,8 $\pm$ 0,12	17,9 $\pm$ 0,89
25	19,4 $\pm$ 0,09	15,8 $\pm$ 0,46	18,4 $\pm$ 1,07	18,9 $\pm$ 0,09	17,9 $\pm$ 0,95
30	19,4 $\pm$ 0,09	15,8 $\pm$ 0,44	18,7 $\pm$ 0,69	18,9 $\pm$ 0,09	18,1 $\pm$ 0,77

**Tabela 9** - Valores das médias das concentrações de enalapril em mg dissolvida ( $\pm$  desvio padrão) em função do tempo, a partir dos produtos Referência e Genéricos aos trinta dias do ensaio de estabilidade.

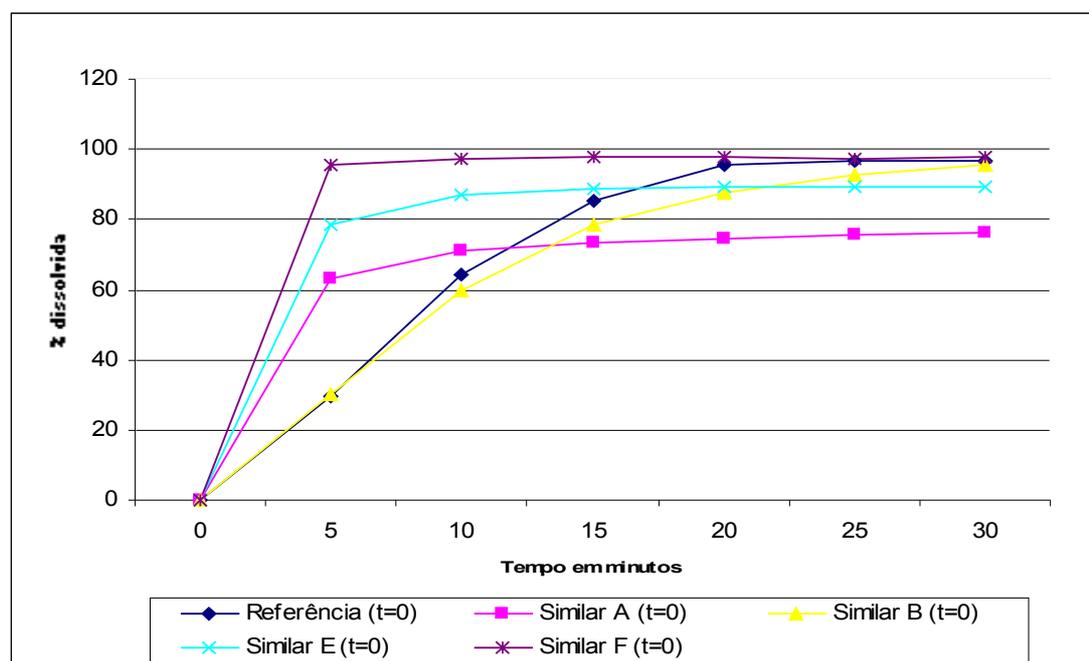
Tempo (min.)	R	G - A	G - B	G - C	G - D
5	6,4 $\pm$ 0,90	12,4 $\pm$ 0,77	7,5 $\pm$ 2,70	10,8 $\pm$ 1,26	16,2 $\pm$ 0,75
10	12,6 $\pm$ 1,51	13,3 $\pm$ 0,63	114,0 $\pm$ 4,13	17,8 $\pm$ 1,03	16,7 $\pm$ 0,58
15	17,3 $\pm$ 0,58	13,6 $\pm$ 0,58	16,7 $\pm$ 3,30	18,9 $\pm$ 0,11	16,8 $\pm$ 0,54
20	18,5 $\pm$ 0,25	13,7 $\pm$ 0,55	17,5 $\pm$ 2,24	19,0 $\pm$ 0,08	16,8 $\pm$ 0,51
25	18,6 $\pm$ 0,25	13,7 $\pm$ 0,50	18,5 $\pm$ 0,83	19,0 $\pm$ 0,08	16,9 $\pm$ 0,48
30	18,6 $\pm$ 0,24	13,8 $\pm$ 0,48	18,8 $\pm$ 0,34	19,0 $\pm$ 0,04	16,9 $\pm$ 0,41

**Tabela 10** - Valores das médias das concentrações de enalapril em mg dissolvida ( $\pm$  desvio padrão) em função do tempo, a partir dos produtos Referência e Genéricos aos noventa dias do ensaio de estabilidade.

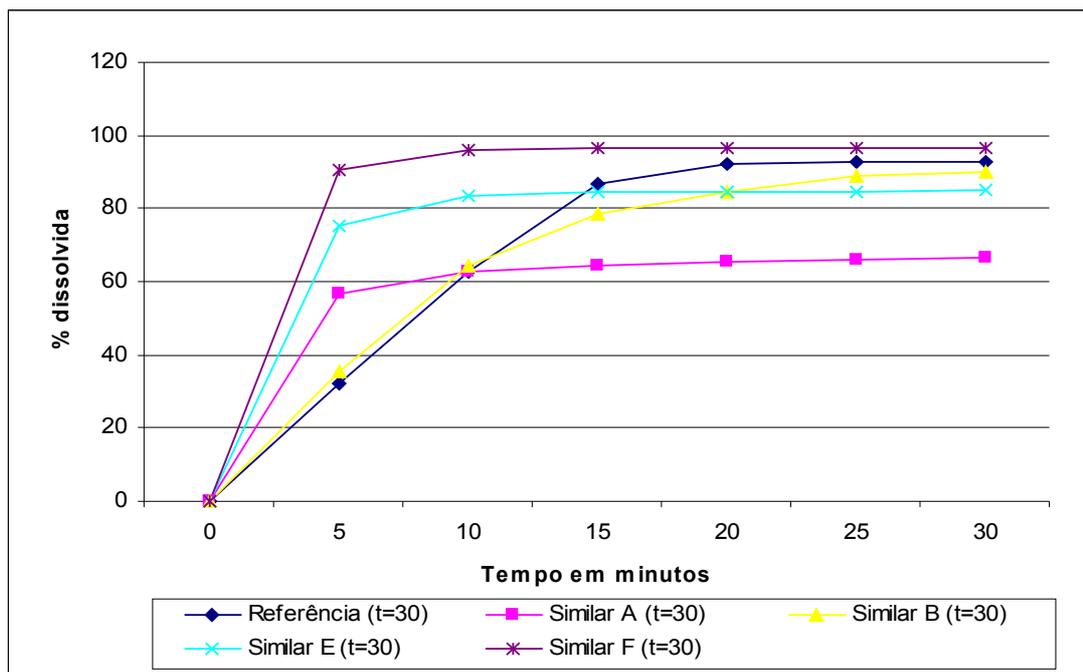
Tempo (min.)	R	G - A	G - B	G - C	G - D
5	5,9 $\pm$ 0,57	9,5 $\pm$ 0,60	7,2 $\pm$ 2,19	8,3 $\pm$ 1,31	13,2 $\pm$ 0,83
10	12,8 $\pm$ 1,08	10,2 $\pm$ 0,60	13,7 $\pm$ 3,34	15,0 $\pm$ 0,89	14,4 $\pm$ 0,31
15	17,2 $\pm$ 0,84	10,3 $\pm$ 0,56	17,1 $\pm$ 2,44	17,3 $\pm$ 0,18	14,5 $\pm$ 0,34
20	18,5 $\pm$ 0,31	10,5 $\pm$ 0,53	18,4 $\pm$ 1,37	17,5 $\pm$ 0,09	14,6 $\pm$ 0,30
25	19,1 $\pm$ 0,15	10,5 $\pm$ 0,52	18,9 $\pm$ 0,50	17,6 $\pm$ 0,11	14,7 $\pm$ 0,27
30	19,1 $\pm$ 0,17	10,5 $\pm$ 0,47	19,0 $\pm$ 0,22	17,6 $\pm$ 0,05	14,7 $\pm$ 0,27

**Tabela 11** - Valores das médias das concentrações de enalapril em mg dissolvida ( $\pm$  desvio padrão) em função do tempo, a partir dos produtos Referência e Genéricos no tempo final (180 dias) do ensaio de estabilidade.

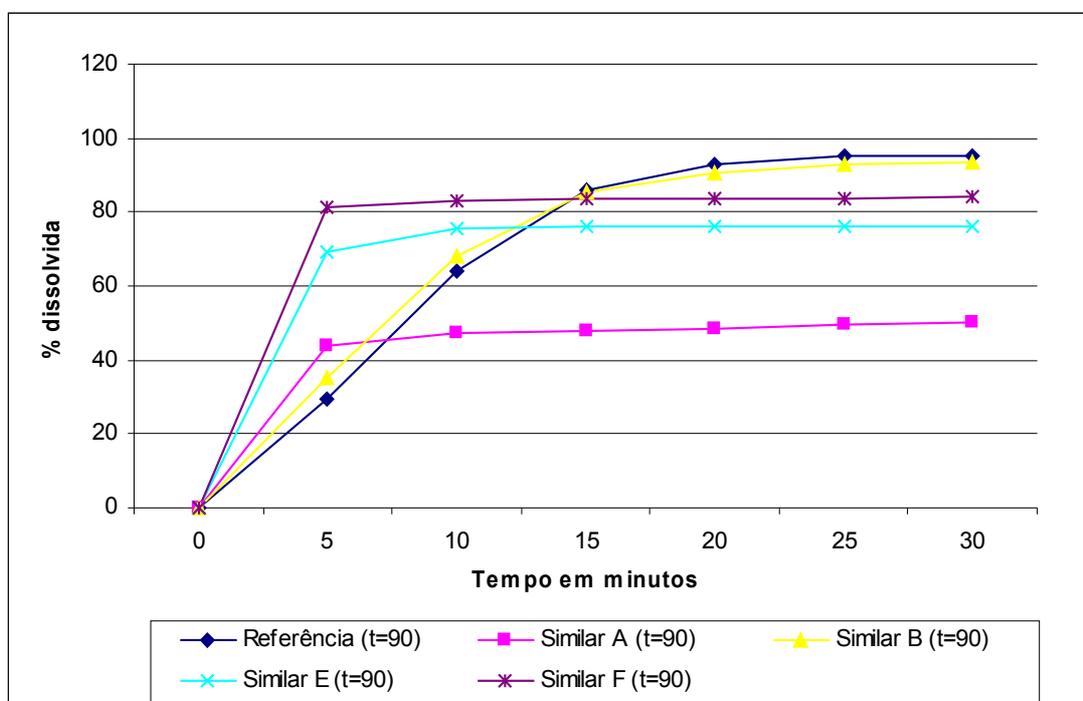
Tempo (min.)	R	G - A	G - B	G - C	G - D
5	5,6 $\pm$ 0,93	6,7 $\pm$ 0,61	4,9 $\pm$ 1,35	7,7 $\pm$ 1,67	9,3 $\pm$ 1,49
10	12,2 $\pm$ 1,21	7,5 $\pm$ 0,41	10,0 $\pm$ 2,69	13,7 $\pm$ 1,64	10,6 $\pm$ 1,49
15	16,4 $\pm$ 0,61	7,7 $\pm$ 0,36	13,7 $\pm$ 2,73	16,3 $\pm$ 0,64	11,2 $\pm$ 1,02
20	18,1 $\pm$ 0,24	7,8 $\pm$ 0,33	15,5 $\pm$ 1,73	16,8 $\pm$ 0,23	11,5 $\pm$ 0,86
25	18,2 $\pm$ 0,19	7,9 $\pm$ 0,31	16,5 $\pm$ 0,92	16,9 $\pm$ 0,15	11,7 $\pm$ 0,82
30	18,3 $\pm$ 0,19	7,9 $\pm$ 0,29	16,9 $\pm$ 0,44	16,9 $\pm$ 0,15	11,7 $\pm$ 0,80



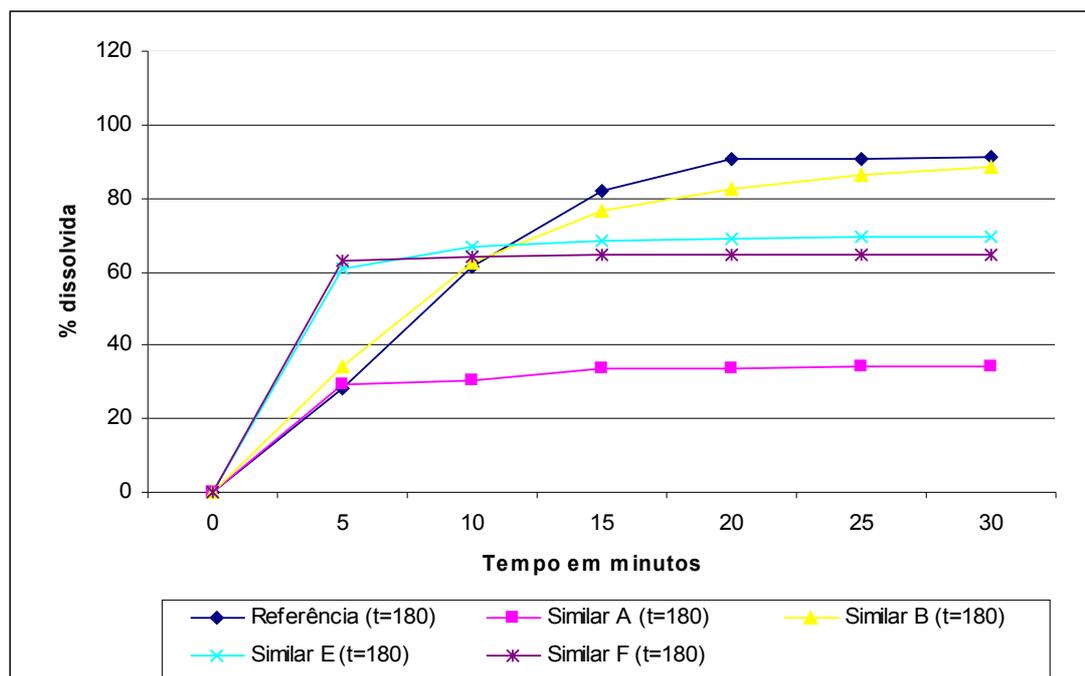
**Figura 17** – Perfis de dissolução do maleato de enalapril em comprimidos de 20mg (Referência e Similares) no tempo zero do estudo de estabilidade. Teste de dissolução em meio tampão fosfato de potássio 50mM (pH 6,8) usando aparato 2, com agitação de 50 rpm.



**Figura 18** – Perfis de dissolução do maleato de enalapril em comprimidos de 20mg (Referência e Similares) aos trinta dias do estudo de estabilidade. Teste de dissolução em meio tampão fosfato de potássio 50mM (pH 6,8) usando aparato 2, com agitação de 50 rpm.



**Figura 19** – Perfis de dissolução do maleato de enalapril em comprimidos de 20mg (Referência e Similares) aos noventa dias do estudo de estabilidade. Teste de dissolução em meio tampão fosfato de potássio 50mM (pH 6,8) usando aparato 2, com agitação de 50 rpm.



**Figura 20** – Perfis de dissolução do maleato de enalapril em comprimidos de 20mg (Referência e Similares) no tempo final (180 dias) do estudo de estabilidade. Teste de dissolução em meio tampão fosfato de potássio 50mM (pH 6,8) usando aparato 2, com agitação de 50 rpm.

**Tabela 12** - Valores das médias das concentrações de enalapril em mg dissolvida ( $\pm$  desvio padrão) em função do tempo, a partir dos produtos Referência e Similares no tempo zero do ensaio de estabilidade.

Tempo (min.)	R	S - A	S - B	S - E	S - F
5	5,9 $\pm$ 0,54	12,6 $\pm$ 0,28	5,9 $\pm$ 1,60	15,7 $\pm$ 0,55	19,2 $\pm$ 0,14
10	12,9 $\pm$ 0,66	14,1 $\pm$ 0,33	11,9 $\pm$ 3,16	17,4 $\pm$ 0,13	19,5 $\pm$ 0,10
15	17,1 $\pm$ 0,64	14,7 $\pm$ 0,34	15,7 $\pm$ 3,33	17,8 $\pm$ 0,14	19,6 $\pm$ 0,08
20	19,2 $\pm$ 0,13	14,9 $\pm$ 0,35	17,5 $\pm$ 2,14	17,9 $\pm$ 0,15	19,6 $\pm$ 0,09
25	19,4 $\pm$ 0,09	15,2 $\pm$ 0,34	18,5 $\pm$ 1,13	17,9 $\pm$ 0,18	19,6 $\pm$ 0,12
30	19,4 $\pm$ 0,09	15,2 $\pm$ 0,30	19,1 $\pm$ 0,50	17,9 $\pm$ 0,16	19,6 $\pm$ 0,08

**Tabela 13** - Valores das médias das concentrações de enalapril em mg dissolvida ( $\pm$  desvio padrão) em função do tempo, a partir dos produtos Referência e Similares aos trinta dias do ensaio de estabilidade.

Tempo (min.)	R	S - A	S - B	S - E	S - F
5	6,4 $\pm$ 0,90	11,3 $\pm$ 0,49	6,3 $\pm$ 2,39	17,1 $\pm$ 1,80	18,1 $\pm$ 0,42
10	12,6 $\pm$ 1,51	12,6 $\pm$ 0,26	11,4 $\pm$ 3,50	18,8 $\pm$ 0,15	19,2 $\pm$ 0,18
15	17,3 $\pm$ 0,58	12,9 $\pm$ 0,22	13,9 $\pm$ 2,17	19,1 $\pm$ 0,25	19,3 $\pm$ 0,16
20	18,5 $\pm$ 0,25	13,1 $\pm$ 0,19	15,1 $\pm$ 1,27	19,1 $\pm$ 0,29	19,3 $\pm$ 0,17
25	18,6 $\pm$ 0,25	13,2 $\pm$ 0,22	15,8 $\pm$ 0,45	19,1 $\pm$ 0,31	19,3 $\pm$ 0,14
30	18,6 $\pm$ 0,24	13,3 $\pm$ 0,21	15,9 $\pm$ 0,21	19,1 $\pm$ 0,28	19,4 $\pm$ 0,14

**Tabela 14** - Valores das médias das concentrações de enalapril em mg dissolvida ( $\pm$  desvio padrão) em função do tempo, a partir dos produtos Referência e Similares aos noventa dias do ensaio de estabilidade.

Tempo (min.)	R	S - A	S - B	S - E	S - F
5	5,9 $\pm$ 0,57	8,8 $\pm$ 0,61	7,0 $\pm$ 1,22	13,8 $\pm$ 0,91	16,2 $\pm$ 0,22
10	12,8 $\pm$ 1,08	9,5 $\pm$ 0,53	13,6 $\pm$ 2,36	15,1 $\pm$ 0,15	16,6 $\pm$ 0,17
15	17,2 $\pm$ 0,84	9,7 $\pm$ 0,55	17,1 $\pm$ 1,94	15,2 $\pm$ 0,15	16,7 $\pm$ 0,18
20	18,5 $\pm$ 0,31	9,7 $\pm$ 0,56	18,1 $\pm$ 0,95	15,2 $\pm$ 0,15	16,7 $\pm$ 0,18
25	19,1 $\pm$ 0,15	9,9 $\pm$ 0,41	18,5 $\pm$ 0,31	15,3 $\pm$ 0,14	16,8 $\pm$ 0,18
30	19,1 $\pm$ 0,17	9,9 $\pm$ 0,41	18,7 $\pm$ 0,31	15,3 $\pm$ 0,17	16,8 $\pm$ 0,19

**Tabela 15** - Valores das médias das concentrações de enalapril em mg dissolvida ( $\pm$  desvio padrão) em função do tempo, a partir dos produtos Referência e Similares no tempo final (180 dias) do ensaio de estabilidade.

Tempo (min.)	R	S - A	S - B	S - E	S - F
5	5,6 $\pm$ 0,93	5,9 $\pm$ 0,69	6,8 $\pm$ 2,52	12,2 $\pm$ 1,89	12,6 $\pm$ 0,38
10	12,2 $\pm$ 1,21	6,5 $\pm$ 0,45	12,4 $\pm$ 4,25	13,4 $\pm$ 0,64	12,8 $\pm$ 0,39
15	16,4 $\pm$ 0,61	6,7 $\pm$ 0,41	15,3 $\pm$ 2,82	13,7 $\pm$ 0,26	12,9 $\pm$ 0,36
20	18,1 $\pm$ 0,24	6,7 $\pm$ 0,37	16,5 $\pm$ 1,86	13,8 $\pm$ 0,13	12,9 $\pm$ 0,38
25	18,2 $\pm$ 0,19	6,8 $\pm$ 0,35	17,3 $\pm$ 1,00	13,9 $\pm$ 0,17	13,0 $\pm$ 0,38
30	18,3 $\pm$ 0,19	6,8 $\pm$ 0,34	17,7 $\pm$ 0,56	13,9 $\pm$ 0,19	13,0 $\pm$ 0,36

Ao final do estudo acelerado de estabilidade, apenas 4 (quatro) dos 9 (nove) produtos analisados não tiveram suas características de dissolução *in vitro* severamente influenciadas pelas condições de estocagem, cumprindo com os critérios de aceitação estabelecidos na monografia oficial do fármaco (USP, 2004, 2007), segundo a qual os comprimidos de maleato de enalapril não devem apresentar ao final de 30 minutos de ensaio, dissolução inferior a 80%.

Partindo do pressuposto que a velocidade de dissolução de um fármaco pode ser um fator limitante na extensão de sua absorção (MARCOLONGO, 2003), e que o teste de dissolução *in vitro* é considerado atualmente o método preditivo mais sensível e confiável da performance do produto farmacêutico *in vivo* (DRESSEMAN et al, 2000; MARCOLONGO, 2003), as alterações observadas no perfil de dissolução do enalapril a partir dos produtos analisados quando submetidos a pequenos aumentos da temperatura podem indicar um comprometimento da biodisponibilidade *in vivo*. Em casos assim pode ser alterado o início, intensidade e duração da resposta terapêutica (MARCOLONGO, 2003).

Dentre as especialidades farmacêuticas analisadas, 50% dos Genéricos não demonstraram alteração do seu perfil de dissolução e teor de princípio ativo durante os 180 dias do ensaio de estabilidade. Já no caso dos medicamentos Similares, apenas um dos quatro incluídos no estudo atendeu os requisitos farmacopeicos estabelecidos para essa análise, sendo este produto Similar pertencente ao mesmo fabricante de um dos Genéricos (Genérico B e Similar B). Comportamento similar, mas demonstrando não cumprimento das especificações, foi observado no teor e dissolução dos produtos Genérico A e Similar A, também produzidos e comercializados por um mesmo fabricante. Estes resultados reforçam a hipótese de que a garantia da qualidade de uma formulação passa pela responsabilidade e ética de seu fabricante, independente dos testes pelos qual o produto tenha sido submetido para obtenção de seu registro junto ao órgão competente.

A decomposição de diferentes ingredientes da formulação pode ser resultado de interações provocadas pela exposição a altas temperatura e/ou umidade, reduzindo a dissolução *in vitro*, que é um importante atributo da qualidade das formas farmacêuticas sólidas de uso oral (RISHA et al, 2003). Estudo conduzido por SAVILLE (2001) demonstrou a influência das condições de estocagem na liberação *in vitro* do ibuprofeno em comprimidos. De forma semelhante, OPOTA et al (1996) verificaram a influência da temperatura ( $\pm 40^{\circ}\text{C}$ ) sobre a desintegração e o modelo de liberação do fármaco de comprimidos de teofilina. Estes pesquisadores observaram que, de acordo com a quantidade e tipo de excipiente inserido na formulação, o processo de degradação do produto foi favorecido quando exposto a altas temperaturas.

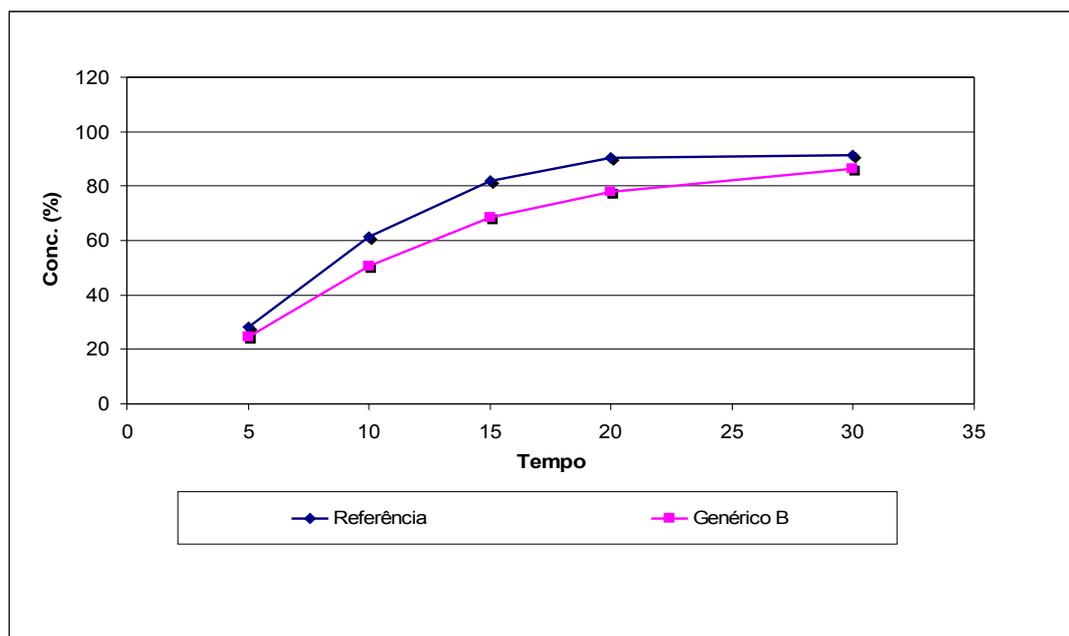
As alterações na formulação de um produto que podem oferecer maior impacto na dissolução e absorção do fármaco são mais comuns para substâncias hidrofóbicas (classe II da classificação biofarmacêutica), para as quais a dissolução do fármaco é considerada um fator limitante para sua absorção (JACKSON et al, 2000; NGO, 2007).

De acordo com estudo das propriedades moleculares de diferentes fármacos considerados essenciais pela OMS conduzido por KASIM et al (2004), o enalapril foi classificado como fármaco pouco solúvel e de baixa permeabilidade (Classe IV da SCB). Para os fármacos inseridos na classe IV, por apresentarem baixa solubilidade, baixa permeabilidade e/ou formulações com pequenas dosagens de princípio ativo, o Guia para estudos de dissolução de formas farmacêuticas sólidas de liberação

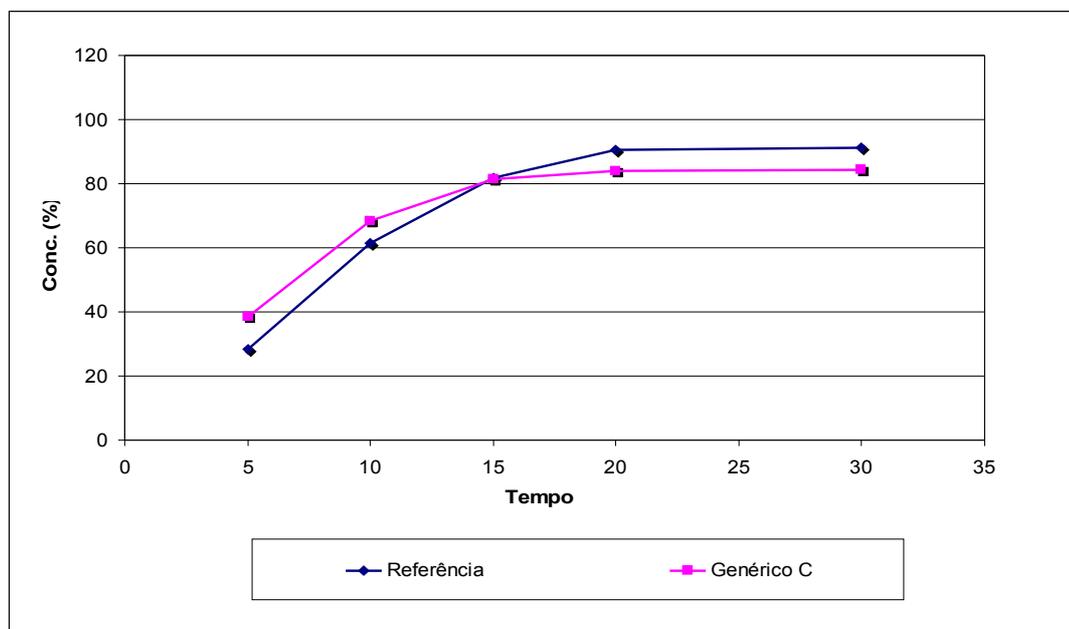
imediate do FDA (1997) os caracteriza como os de maior potencial para evidenciar problemas de bioequivalência. Como consequência, os estudos *in vivo* devem ser requisitados para quaisquer alterações na formulação do produto (BLUME & SCHUG, 1999).

Estudo com quatro formulações do antidiabético tolazamida, apresentou resultados muito distintos: uma formulação exibiu rápida dissolução e alta biodisponibilidade; outras duas formulações apresentaram dissolução intermediária, mas alta biodisponibilidade enquanto que outra apresentou disponibilidade significativamente baixa (WELLING, 1982). Esses efeitos altamente variáveis no modelo de liberação do fármaco sugerem que a dissolução poderia não ser o único fator determinante na absorção desses produtos, mas ainda assim demonstram a influência dos constituintes de uma formulação, onde excipientes tradicionalmente considerados como substâncias inertes, têm sido reportados em muitos estudos com capacidade de alterar o modelo de liberação do fármaco, com possibilidade de afetar a absorção e comprometer a biodisponibilidade (JACKSON et al, 2000).

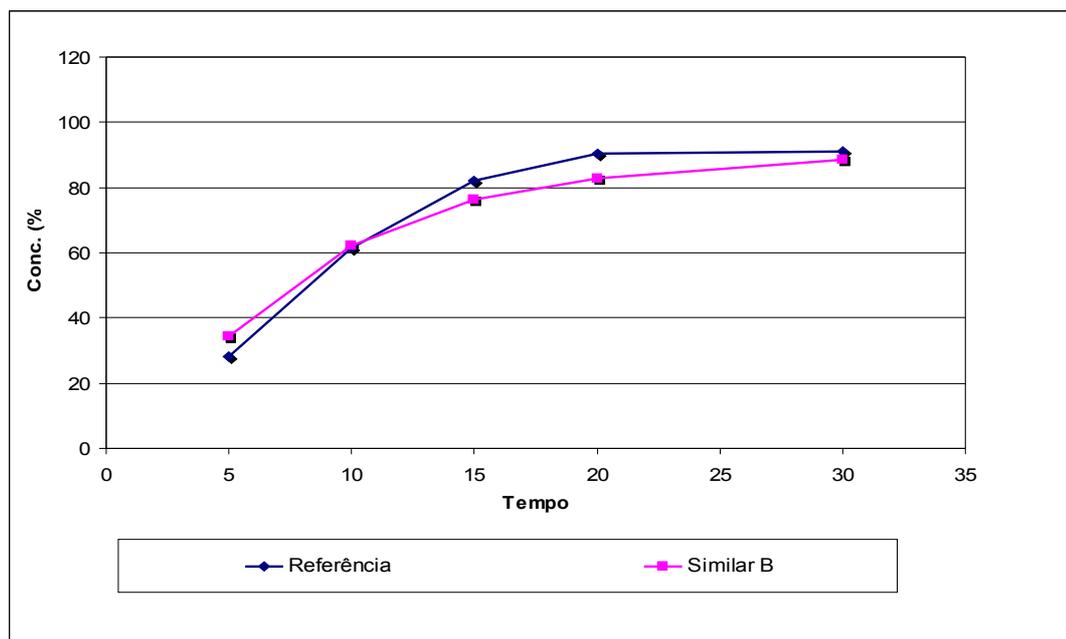
As Figuras 21, 22 e 23 mostram a comparação do perfil de dissolução do produto Referência em relação aos perfis de dissolução dos produtos (Genérico B, Genérico C e Similar B) que apresentaram a porcentagem aceitável de dissolução do fármaco ao final dos 30 minutos de ensaio. Para estes produtos foi comparada sua similaridade em relação ao produto Referência através dos cálculos dos fatores de diferença e semelhança ( $f_1$  e  $f_2$ ), respectivamente (Tabela 16). Os resultados encontrados indicaram que o perfil de dissolução do fármaco para essas formulações foi equivalente em relação ao produto Referência.



**Figura 21** – Comparação do perfil de dissolução de comprimidos de 20mg do maleato de enalapril (Referência e Genérico B) no final (180 dias) do ensaio de estabilidade (40°C, 75%UR). Teste de dissolução em meio tampão fosfato de potássio 50mM (pH 6,8) usando aparato 2, com agitação de 50 rpm.



**Figura 22** – Comparação do perfil de dissolução de comprimidos de 20mg do maleato de enalapril (Referência e Genérico C) no final (180 dias) do ensaio de estabilidade (40°C, 75%UR). Teste de dissolução em meio tampão fosfato de potássio 50mM (pH 6,8) usando aparato 2, com agitação de 50 rpm.



**Figura 23** – Comparação do perfil de dissolução de comprimidos de 20mg do maleato de enalapril (Referência e Similar B) no final (180 dias) do ensaio de estabilidade (40°C, 75%UR). Teste de dissolução em meio tampão fosfato de potássio 50mM (pH 6,8) usando aparato 2, com agitação de 50 rpm.

**Tabela 16** – Valores de  $f_1$  e  $f_2$  resultantes das comparações entre os perfis de dissolução das especialidades farmacêuticas (Genérico B, C e Similar C) e o produto Referência.

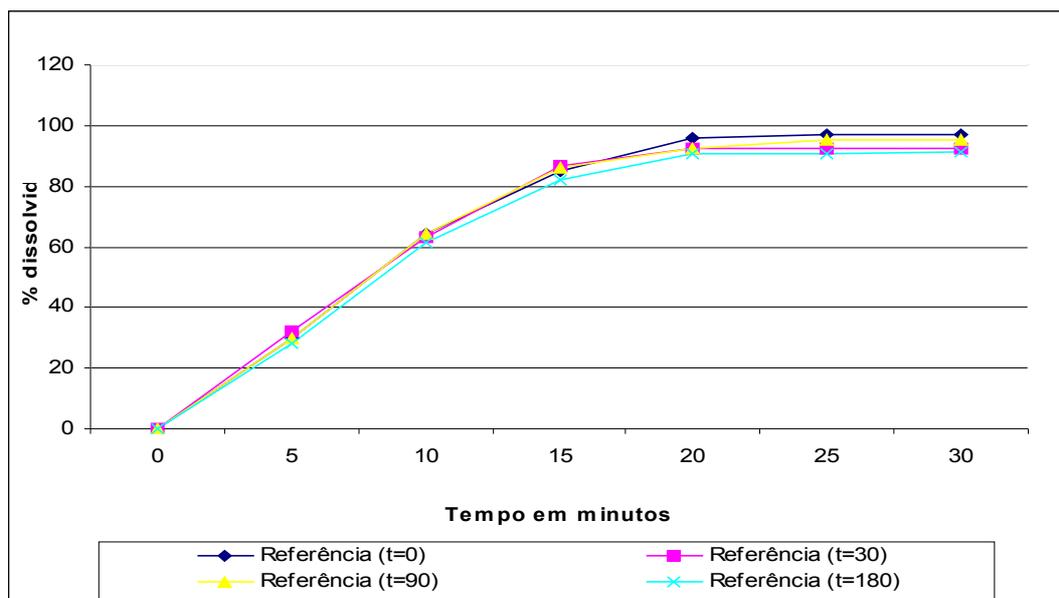
Produto	$f_1^*$	$f_2^{**}$
Genérico B	12,9	50,0
Genérico C	8,9	57,5
Similar B	6,6	63,5

\* equivalência corresponde a valores entre 0 e 15

\*\* equivalência corresponde a valores entre 50 e 100

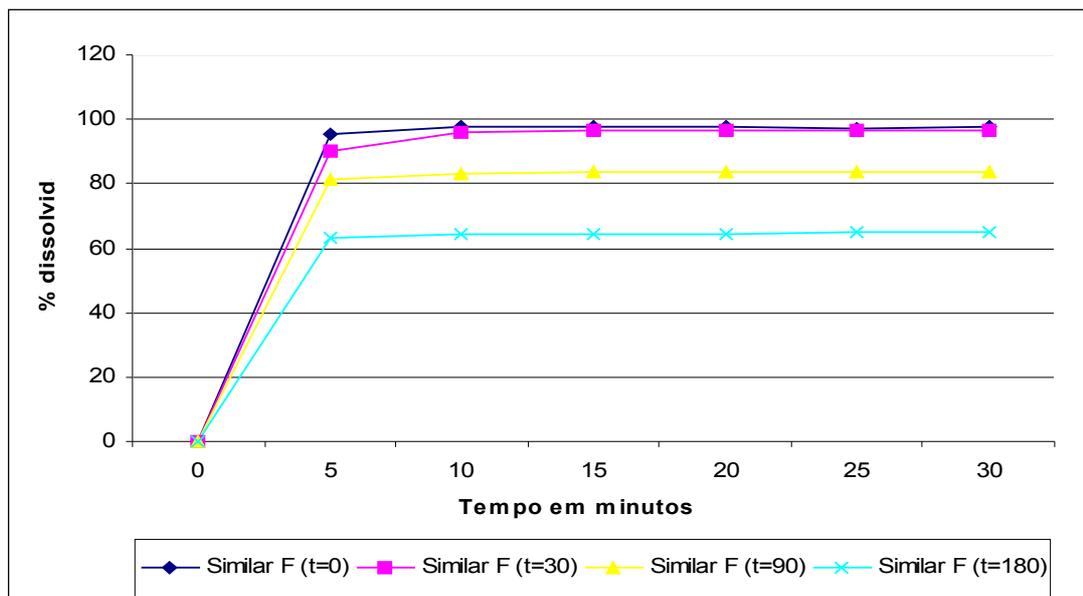
Fonte: FDA, 1997; BRASIL, 2004

A Figura 24 exibe o perfil de dissolução obtido na análise do produto Referência, em todos os tempos do estudo de estabilidade (t=0, 30, 90 e 180 dias). É possível observar que o perfil de dissolução obtido demonstra a liberação do fármaco desse produto de forma gradativa ao longo dos 30 minutos de ensaio.



**Figura 24** – Perfis de dissolução do produto Referência nos diferentes tempos do estudo de estabilidade (40°C, 75%UR). Teste de dissolução em meio tampão fosfato de potássio 50mM (pH 6,8) usando aparato 2, com agitação de 50 rpm.

Ao comparar os perfis de dissolução obtidos através da análise do produto Referência com aqueles obtidos a partir das amostras do produto denominado Similar F (Figura 25), observa-se que, embora a dissolução seja superior a 80% do fármaco durante os primeiros 90 dias do estudo de estabilidade acelerada, o modelo de liberação do fármaco desta formulação foi mais pontual e imediato. De forma que, mais de 80% do fármaco dessa formulação foram liberados nos primeiros 5 minutos do ensaio de dissolução.



**Figura 25** – Perfis de dissolução do produto Similar F nos diferentes tempos do estudo de estabilidade (40°C, 75%UR). Teste de dissolução em meio tampão fosfato de potássio 50mM (pH 6,8) usando aparato 2, com agitação de 50 rpm.

Embora a literatura oficial estabeleça como critério de aceitação apenas que os comprimidos de maleato de enalapril apresentem dissolução de mais de 80% do princípio ativo ao final dos 30 minutos de duração do teste (USP, 2004), a análise não apenas de um ponto, mas do perfil de dissolução obtido pode revelar alterações na liberação do fármaco que devem ser consideradas para garantir a qualidade e a eficiência de um produto. As diferenças observadas não apenas no resultado final do teste de dissolução, mas no perfil de dissolução de especialidades do maleato de enalapril incluídas nesse estudo podem sugerir possíveis comprometimentos na absorção e disponibilidade do princípio ativo desses produtos, ainda que eles tenham sido considerados equivalentes pelo teste de dissolução *in vitro*.

É importante destacar que a rápida liberação inicial de um fármaco do seu sistema de matriz, pode ser muitas vezes, indesejável terapêuticamente (OLIVEIRA, 2006). É necessário avaliar nessa situação se o organismo pode absorver todo o fármaco liberado prontamente no início do processo de dissolução, sem prejuízo para se manter concentrações plasmáticas ideais, de acordo com a performance terapêutica do produto.

Embora a biodisponibilidade de um fármaco seja afetada por outros fatores que não a dissolução (como dieta, ritmo circadiano, sexo, idade, etc), mudanças no

comportamento do perfil de liberação de um produto farmacêutico podem representar um impacto na disponibilidade *in vivo* e podem predizer problemas clínicos (MURTHY & GHEBRE-SELLASSIE, 1993; NGO, 2007).

Possivelmente essas diferenças detectadas no perfil de dissolução sejam resultado de diferenças na natureza ou proporção dos excipientes utilizados no processo farmacotécnico desses produtos. O desenvolvimento de formulação de medicamento Genérico ou Similar que pretenda ser intercambiável com o produto Referência requer que o mesmo apresente: mesmo princípio ativo, mesma concentração, mesma forma farmacêutica; no entanto, podem diferir em relação ao processo de fabricação utilizado e nos ingredientes inertes da formulação (BRASIL, 2003b; MEREDITH, 2003), isso devido aos diferentes equipamentos e fornecedores de matérias-primas empregados pelos fabricantes. No entanto, essas diferenças não devem comprometer a biodisponibilidade entre os produtos e a eficácia terapêutica deve ser garantida (MEREDITH, 2003).

Embora DIGHE (1999) afirme que o uso de diferentes ingredientes inativos em uma formulação que pretenda ser intercambiável a um produto inovador não requeira estudos de toxicologia para se estabelecer sua segurança, existem relatos na literatura de que dois produtos idênticos ou equivalentes do mesmo fármaco, na mesma concentração e forma farmacêutica, mas diferindo quanto às matérias-primas usadas na formulação e na tecnologia de produção, podem mostrar variações amplas em relação ao perfil de liberação do fármaco (OLIVEIRA, 2006). Níveis plasmáticos e tissulares subterapêuticos podem ser obtidos caso a velocidade de liberação do fármaco seja lenta, ou então, níveis tóxicos podem ocorrer se a velocidade de liberação for muito rápida (MURTHY & GHEBRE-SELLASSIE, 1993; MARCOLONGO, 2003).

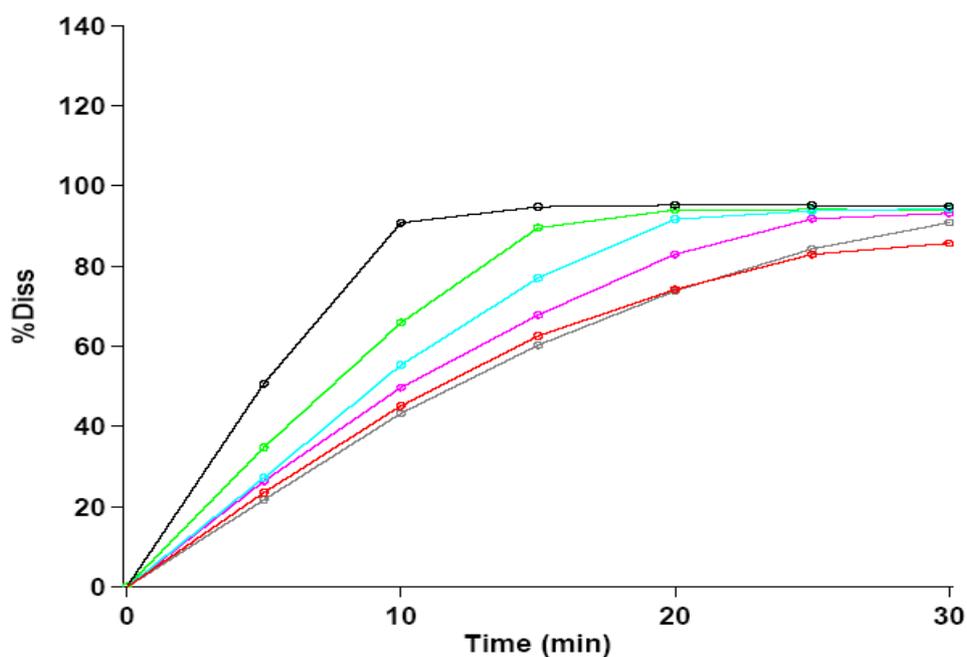
Em 1968 apareceram vários relatos a respeito de uma epidemia de intoxicação por anticonvulsivantes em pacientes australianos sob tratamento para epilepsia. Os pacientes estavam recebendo tratamento com fenitoína em formulação onde o excipiente sulfato de cálcio havia sido trocado pela lactose, o que favoreceu a maior biodisponibilidade do fármaco. Desde então, estudos no sentido de investigar a influência das características biofarmacêuticas dos fármacos na biodisponibilidade vêm sendo amplamente realizados mundialmente (SORYAL & RICHERS, 1992).

Diferentes variáveis incluindo tipo de excipientes, qualidade dos ingredientes (ativos e inertes), processo empregado na produção, podem influenciar a

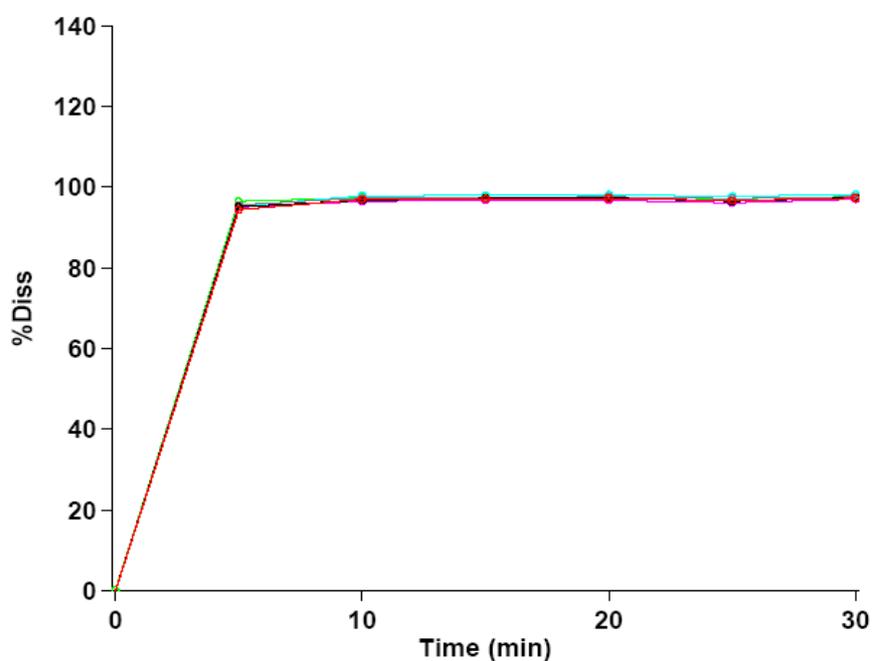
bioequivalência entre o produto Referência e o produto similar. Entretanto, alterações na dissolução de produtos Genéricos têm sido descritas em investigações prévias. O estudo conduzido por SMITH et al (2006) mostrou que na comparação das formulações Referência e Genéricos do carvediol 27% dos produtos Genéricos não apresentaram dissolução adequada. De forma semelhante, uma investigação de 85 produtos Genéricos do antiinflamatório piroxicam de 21 países distintos avaliando o modelo de dissolução e teor de princípio ativo, apresentou 17 produtos com diferenças no modelo de liberação em relação ao produto Referência e 50 produtos com comprometimento do teor adequado (BARONE, 1992).

ALBONICO et al (2007), demonstraram diferenças em relação à eficácia terapêutica entre o anti-helmíntico albendazol Referência e dois produtos Genéricos testados, reafirmando a importância do teste de dissolução como parâmetro de avaliação da biodisponibilidade de formulações farmacêuticas sólidas de uso oral.

Com a utilização de 6 unidades posológicas a cada ensaio de dissolução realizado foi possível avaliar também possíveis diferenças em relação à uniformidade de conteúdo nos comprimidos dos produtos incluídos no estudo. Os resultados obtidos puderam demonstrar que alguns produtos, como por exemplo, o produto denominado Genérico A além de sofrer degradação do fármaco durante o ensaio acelerado de estabilidade, apresentou comprimidos de uma mesmo lote de produção com distintos perfis de liberação (Figura 26). Comportamento distinto foi observado para o produto Similar F que, embora também tenha apresentado desvios da qualidade em relação à liberação do fármaco no final do estudo de estabilidade, a uniformidade de conteúdo de suas amostras de comprimidos pôde ser verificada (Figura 27).



**Figura 26** - Perfis de dissolução dos comprimidos (mesmo lote) de maleato de enalapril do medicamento Genérico B durante o estudo de estabilidade (40°C, 75%UR). Teste de dissolução em meio tampão fosfato de potássio 50mM (pH 6,8) usando aparato 2, com agitação de 50 rpm.



**Figura 27** - Perfis de dissolução dos comprimidos (mesmo lote) de maleato de enalapril do medicamento denominado Similar F durante o estudo de estabilidade acelerada (40°C, 75%UR). Teste de dissolução em meio tampão fosfato de potássio 50mM (pH 6,8) usando aparato 2, com agitação de 50 rpm.

Esses resultados revelam a ausência de uniformidade de conteúdo nos comprimidos de maleato de enalapril do produto denominado Genérico B, não atendendo os critérios de equivalência farmacêutica de acordo com o Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos (BRASIL, 2007). Deficiência nas Boas Práticas de Fabricação, tais como: uso de equipamentos sem calibração adequada, procedimentos de inspeção não devidamente executados podem ser os responsáveis por essa alteração (ALLEN Jr et al, 2007).

Embora exista uma série de incentivos e políticas governamentais em relação à promoção do uso de medicamentos Genéricos dentro da Política de Medicamentos do País, a intercambialidade entre o medicamento Referência e outros deve ser garantida pela qualidade, segurança e eficácia (BRASIL, 2007). A estabilidade de um produto farmacêutico deve ser resguardada até o término previsto do seu prazo de validade (BRASIL, 2005), independente das condições de distribuição e armazenamento do produto.

O resultado da estabilidade da dissolução de um produto farmacêutico de uso oral durante sua estocagem é diretamente relacionado à qualidade e quantidade dos componentes de sua formulação (MURTHY & GHEBRE-SELLASSIE, 1993; SMITH et al, 2006), e o comprometimento da ação terapêutica pretendida em função da degradação do princípio ativo pode representar um problema em relação ao tratamento efetivo da doença com impacto a ser considerado.

Publicações com estudo de produtos Genéricos de outras classes terapêuticas sugerem que a qualidade farmacêutica de muitos produtos Genéricos não segue o padrão definido nas Farmacopéias Internacionais ou as especificações do produto referência (SMITH, et al; 2006). Um estudo publicado no The Lancet e citado por TAYLOR et al (2001), a respeito da qualidade dos fármacos Genéricos dispensados nas farmácias da Nigéria, mostrou que 279 de 581 (48%) amostras de 27 diferentes fármacos antimicrobianos produzidos em diferentes países, não cumpriram com as especificações farmacopéicas especialmente em relação ao teor de princípio ativo, sendo levantada a hipótese de ausência da garantia da qualidade no processo de fabricação e deficiência na inspeção por parte dos órgãos competentes.

Sendo o enalapril um agente anti-hipertensivo de uso crônico e amplamente utilizado, inclusive com vistas a prevenir a ocorrência de outros episódios

cardiovasculares, a garantia da qualidade e da biodisponibilidade ideal deste medicamento passa a ser um pré-requisito ainda mais relevante.

## **4.2. Resultados do ensaio *in vivo* (monitoramento da concentração plasmática)**

Trinta e um voluntários de ambos os sexos (11 homens e 20 mulheres) com a faixa etária entre 18 e 60 anos de idade iniciaram o estudo clínico para monitoramento da concentração plasmática do enalapril.

As diferentes especialidades farmacêuticas do maleato de enalapril testadas foram bem toleradas na dose diária recomendada e houveram poucos relatos de reações adversas até o final do estudo. Freqüência cardíaca e pressão arterial se mantiveram dentro dos limites aceitáveis e alguns eventos adversos observados foram na sua grande maioria sintomas leves e possivelmente relacionados ao enalapril. Apenas um voluntário foi retirado do estudo, devido a relatos de intolerância absoluta à tosse freqüente, os demais voluntários concluíram o estudo.

As amostras de plasma obtidas dos pacientes inclusos do estudo foram coletadas e armazenadas de acordo com as BPL e foram analisadas para monitoramento da concentração do fármaco.

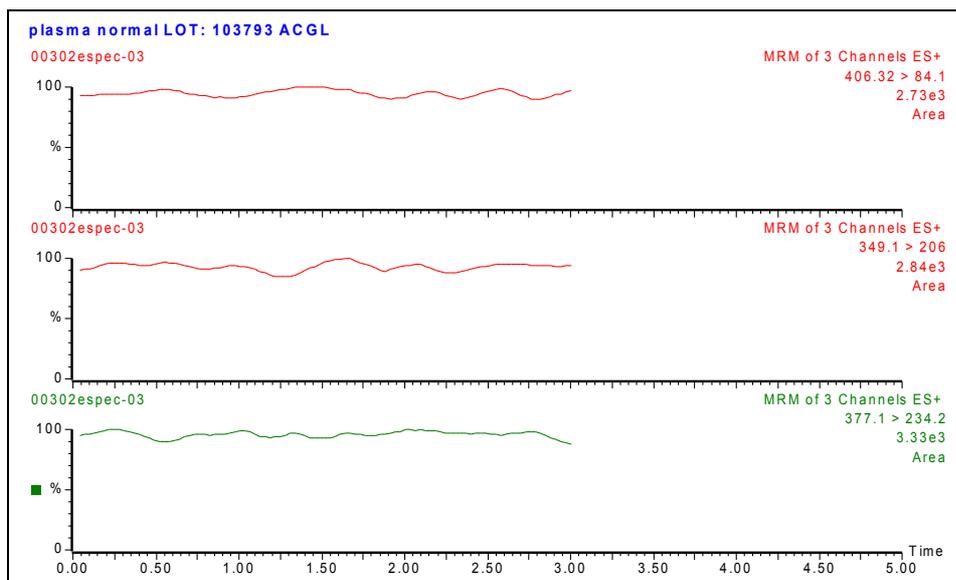
### **4.2.1. Resultados da validação do método bioanalítico para determinação do enalapril e enalaprilato no plasma**

#### **Especificidade/Seletividade**

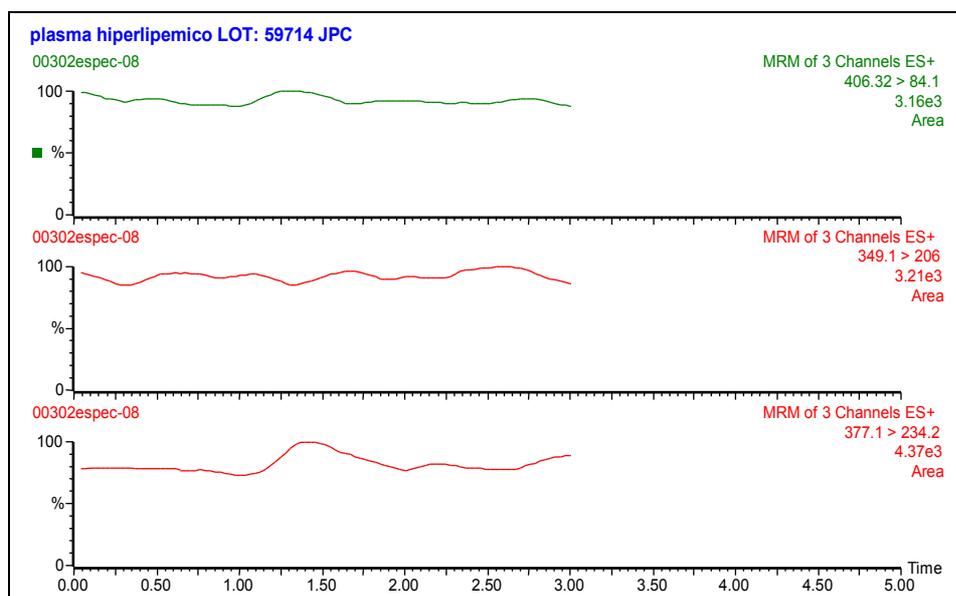
---

Foram analisadas seis amostras de plasma obtidas de seis indivíduos, sendo quatro normais, uma hiperlipêmica e uma hemolisada, sob condições controladas.

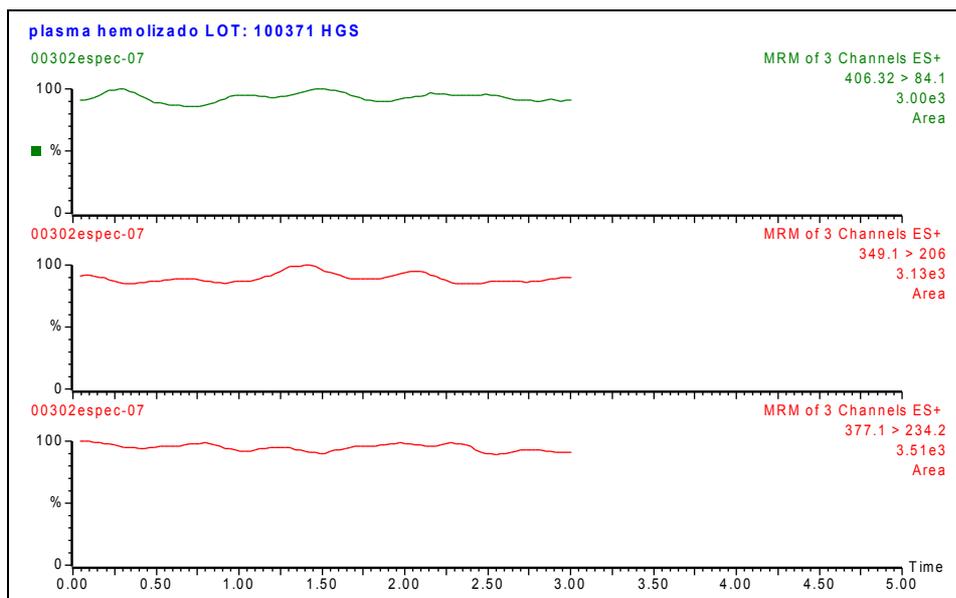
Os plasmas avaliados não apresentaram contaminação ou interferência para os respectivos lotes, garantindo a seletividade do método para análise de material biológico. Os cromatogramas representativos dos plasmas branco normal, hiperlipêmico e hemolizado estão apresentados nas Figuras 28, 29 e 30.



**Figura 28** – Cromatogramas obtidos a partir do plasma normal. Condições cromatográficas: coluna C18 a 25° C, fase móvel metanol e água acrescido de 0,1% de ácido fórmico (65:35 v/v) e fluxo de 0,6 mL/min. Detecção no EM no modo de ionização eletrospray positiva (ESI+).



**Figura 29** – Cromatogramas obtidos a partir do plasma hiperlipêmico. Condições cromatográficas: coluna C18 a 25° C, fase móvel metanol e água acrescido de 0,1% de ácido fórmico (65:35 v/v) e fluxo de 0,6 mL/min. Detecção no EM no modo de ionização eletrospray positiva (ESI+).



**Figura 30** – Cromatogramas obtidos a partir do plasma hemolizado. Condições cromatográficas: coluna C18 a 25° C, fase móvel metanol e água acrescido de 0,1% de ácido fórmico (65:35 v/v) e fluxo de 0,6 mL/min. Detecção no EM no modo de ionização eletrospray positiva (ESI+).

## Recuperação

---

O resultado dos ensaios de recuperação para validação do método de extração das substâncias em estudo a serem quantificadas no plasma estão apresentados nas Tabelas 17, 18 e 19.

**Tabela 17** – Resultados da recuperação do enalapril, em valores de área do pico cromatográfico obtido em cada amostra. CQB: amostra controle de qualidade baixo; CQA: amostra controle de qualidade alto.

Amostra	Enalapril			
	CQB (área)		CQA(área)	
	Adicionado	Extraído	Adicionado	Extraído
1	8140	7363	282275	358028
2	7489	8459	302264	300774
3	10061	7578	379794	316775
4	7846	8113	319290	296715
5	9581	7496	378981	288139
Média	8623,4	7801,8	332520,8	312086,2
CV%	13,11%	5,96%	13,46%	8,88%
Exatidão	90,47%		93,85%	

**Tabela 18** – Resultados da recuperação do enalaprilato, em valores de área do pico cromatográfico obtido em cada amostra. CQB: amostra controle de qualidade baixo; CQA: amostra controle de qualidade alto.

Amostra	Enalaprilato			
	CQB (área)		CQA(área)	
	Adicionado	Extraído	Adicionado	Extraído
1	1948	2092	32511	10774
2	1837	2378	34068	35031
3	2516	1979	43675	35448
4	2138	2076	35310	33085
5	2295	1869	44161	31449
Média	2146,8	2078,8	37945	35157,4
CV%	12,63%	9,12%	14,61%	10,03%
Exatidão	96,83%		92,65%	

**Tabela 19** – Resultados da recuperação do lisinopril (PI), em valores de área do pico cromatográfico obtido em cada amostra.

<b>Lisinopril</b>	
<b>Adicionado</b>	<b>Extraído</b>
12925	12606
12458	15647
16022	12410
14270	13205
15301	12361
15394	12778
12507	15985
12646	12283
12176	14938
13930	12407
11486	14869
12072	12636
15372	12922
13053	12696
15157	13558
13651	13420
10,91%	9,54%
98,31%	

### **Linearidade do Método**

Os intervalos de linearidade do método para detecção do enalapril e do enalaprilato estão apresentados no Quadro 11.

A linearidade do método analítico foi verificada a partir da obtenção das curvas de calibração construída através da relação entre as concentrações de enalapril e enalaprilato preparadas em diluições sucessivas descritas nas Tabelas 2 e 3 e o cálculo da área gerada em cada cromatograma.

Os resultados dos desvios em relação às concentrações nominais do enalapril e enalaprilato nas concentrações estabelecidas para obtenção das curvas de

calibração estão apresentados nas Tabelas 20 e 21. As Figuras 31 e 32 mostram as curvas de calibração do enalapril e enalaprilato, as equações da reta e os coeficientes de correlação obtidos respectivamente.

**Quadro 11** – Intervalo linear de trabalho estabelecido para detecção do enalapril e enalaprilato.

Analito	Intervalo de Linearidade
Enalapril	3 a 300 ng/mL
Enalaprilato	3 a 150 ng/mL

**Tabela 20** – Desvios das concentrações nominais na curva analítica do enalapril.

Concentração Nominal (ng/mL)	Enalapril			Resultado*
	Concentração Observada (ng/mL)	Desvio (%)		
3,00	2,64	-11,97		Aprovado
3,00	3,06	1,89		Aprovado
6,00	5,68	-5,40		Aprovado
6,00	5,75	-4,23		Aprovado
15,00	15,47	3,10		Aprovado
15,00	13,48	-10,17		Aprovado
30,00	32,48	8,27		Aprovado
30,00	32,83	9,43		Aprovado
50,00	54,61	9,23		Aprovado
50,00	52,59	5,17		Aprovado
120,00	108,35	-9,71		Aprovado
120,00	127,12	5,94		Aprovado
240,00	239,02	-0,41		Aprovado
240,00	246,54	2,72		Aprovado
300,00	271,00	-9,67		Aprovado
300,00	317,40	5,80		Aprovado

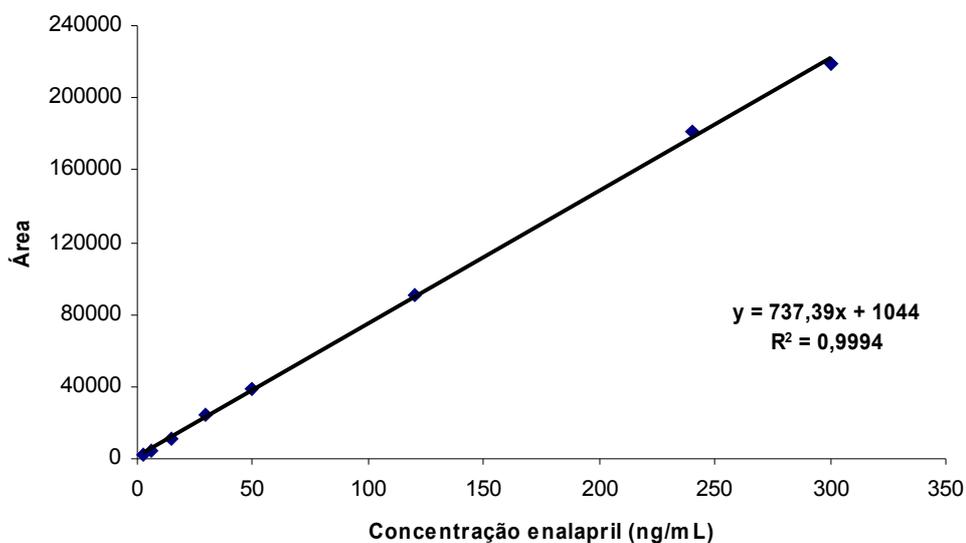
\* Desvio deve ser menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o LQ e menor ou igual a 15% para as outras concentrações da curva de calibração.

**Tabela 21** – Desvios das concentrações nominais na curva analítica do enalaprilato.

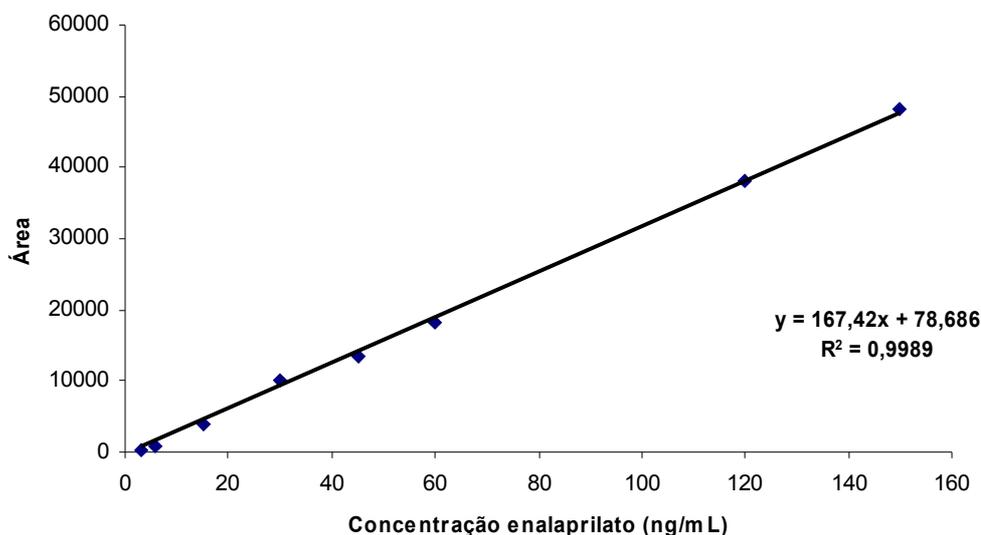
Concentração Nominal	Enalaprilato			Resultado*
	Concentração Observada	Desvio		

(ng/mL)	(ng/mL)	(%)	
3,00	2,57	-14,18	Aprovado
3,00	3,12	4,09	Aprovado
6,00	6,80	13,41	Aprovado
6,00	5,86	-2,41	Aprovado
15,00	14,63	-2,44	Aprovado
15,00	15,02	0,12	Aprovado
30,00	31,54	5,13	Aprovado
30,00	29,91	-0,29	Aprovado
45,00	45,92	2,04	Aprovado
45,00	44,16	-1,87	Aprovado
60,00	53,73	-10,45	Aprovado
60,00	64,89	8,15	Aprovado
120,00	113,55	-5,37	Aprovado
120,00	119,31	-0,57	Aprovado
150,00	121,57	-18,96	Rejeitado
150,00	156,98	4,65	Aprovado

\* Desvio deve ser menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o LQ e menor ou igual a 15% para as outras concentrações da curva de calibração.



**Figura 31** – Curva de calibração do enalapril (pró-fármaco) em plasma. Condições cromatográficas: coluna C18 a 25° C, fase móvel metanol e água acrescido de 0,1% de ácido fórmico (65:35 v/v) e fluxo de 0,6 mL/min. Detecção no EM no modo de ionização eletrospray positiva (ESI+).



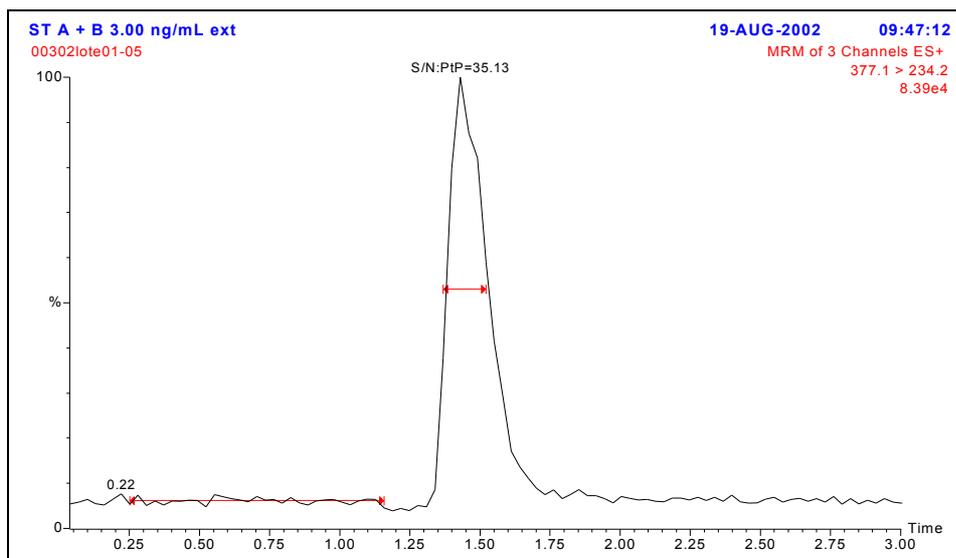
**Figura 32** – Curva de calibração do enalaprilato (metabólito ativo) em plasma. Condições cromatográficas: coluna C18 a 25° C, fase móvel metanol e água acrescido de 0,1% de ácido fórmico (65:35 v/v) e fluxo de 0,6 mL/min. Detecção no EM no modo de ionização eletrospray positiva (ESI+).

### Limite de Detecção e Quantificação

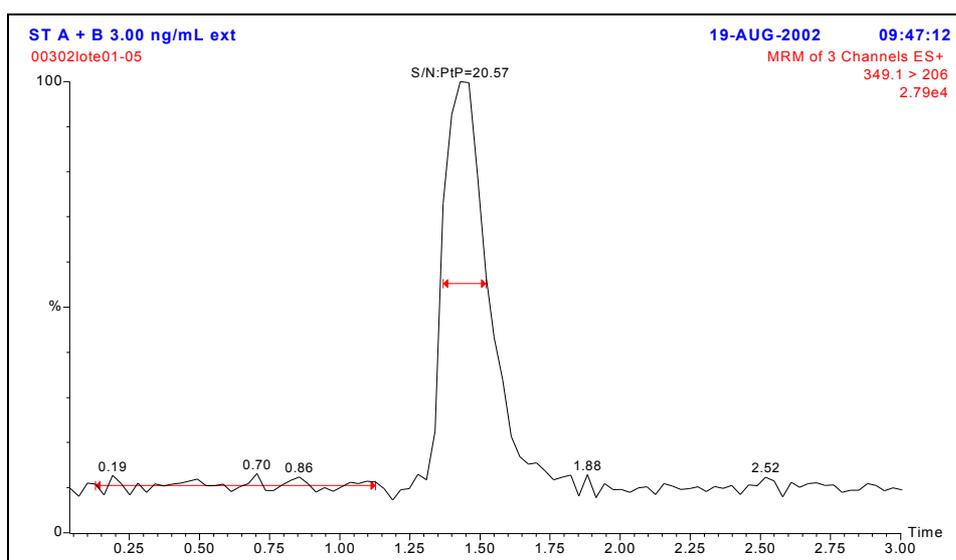
---

O valor da razão sinal/ruído obtido na determinação do limite de detecção foi de 35,13 para o enalapril e de 20,57 para o enalaprilato.

Os cromatogramas utilizados para se estabelecer o cálculo da razão sinal/ruído do enalapril e do enalaprilato estão apresentados nas Figuras 33 e 34.



**Figura 33** – Cromatograma obtido na determinação do limite de detecção do enalapril, através da relação sinal/ruído. Condições cromatográficas: coluna C18 a 25° C, fase móvel metanol e água acrescido de 0,1% de ácido fórmico (65:35 v/v) e fluxo de 0,6 mL/min.



**Figura 34** – Cromatograma obtido na determinação do limite de detecção do enalaprilato, através da relação sinal/ruído. Condições cromatográficas: coluna C18 a 25° C, fase móvel metanol e água acrescido de 0,1% de ácido fórmico (65:35 v/v) e fluxo de 0,6 mL/min.

O limite de quantificação (LQ) determinado a partir da análise dos desvios obtidos através da determinação das concentrações nominais do enalapril e enalaprilato de oito amostras de três lotes distintos, estão apresentados nas Tabelas 22 e 23. Como pode ser visto essa concentração foi quantificada com precisão e exatidão.

**Tabela 22** – Desvios das concentrações nominais obtidas na determinação do LQ do enalapril.

Amostra	Enalapril					
	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
	LQ (ng/mL)	Desvio	LQ (ng/mL)	Desvio	LQ (ng/mL)	Desvio
1	3,46	15,48 %	2,52	-15,92 %	2,52	-16,14 %
2	3,49	16,39 %	2,57	3,49 %	2,52	-15,88 %
3	3,25	8,29 %	2,63	3,25 %	2,70	-9,99 %
4	3,22	7,35 %	2,73	3,22 %	2,48	-17,19 %
5	3,37	12,33 %	2,69	3,37 %	2,69	-10,35 %
6	3,44	14,67 %	2,45	3,44 %	3,11	3,57 %
7	3,28	9,24 %	2,78	3,28 %	2,75	-8,24 %
8	3,32	10,74 %	2,65	3,32 %	2,43	-18,88 %
Média	3,35		2,63		2,65	

CV%	3,04%	4,18%	8,28%
Exatidão	111,79%	87,58%	88,33%

**Tabela 23** – Desvios das concentrações nominais obtidas na determinação do LQ do enalaprilato.

Enalaprilato						
	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
Amostra	LQ (ng/mL)	Desvio	LQ (ng/mL)	Desvio	LQ (ng/mL)	Desvio
1	3,26	8,72 %	2,89	-3,83 %	2,80	-6,83 %
2	3,46	15,35 %	2,85	-4,99 %	2,64	-12,11 %
3	3,38	12,61 %	2,98	-0,67 %	2,78	-7,39 %
4	3,33	10,96 %	2,90	-3,24 %	2,81	-6,27 %
5	2,97	-1,03 %	2,96	-1,37 %	2,77	-7,62 %
6	3,05	1,56 %	2,92	-2,63 %	3,00	0,01 %
7	3,32	10,55 %	3,12	4,05 %	3,03	0,97 %
8	3,20	6,80 %	2,95	-1,79 %	2,82	-5,85 %
Média	3,25		2,95		2,83	
CV%	5,12%		2,77%		4,48%	
Exatidão	108,21%		98,21%		94,38%	

### Controles de Qualidade

Os controles de qualidade foram estabelecidos em conformidade com a Resolução 899/2003 da ANVISA. Os valores definidos para os controles de qualidade e do limite de quantificação encontram-se descritos nos Quadros 12 e 13.

Quadro 12 – Concentrações de enalapril para o Limite de Quantificação e para os controles de qualidade.

Enalapril	
Controle	Concentração (ng/mL)
LQ	3,00
CQB	6,00
CQM	120,00
CQA	240,00

Quadro 13 – Concentrações de enalaprilato para o Limite de Quantificação e para os controles de qualidade.

Enalaprilato	
Controle	Concentração (ng/mL)
LQ	3,00
CQB	6,00
CQM	60,00
CQA	120,00

### Exatidão e Precisão

As Tabelas 24 a 31 detalham os resultados do estudo de repetibilidade (intra-lote e inter-lote) e exatidão do método de quantificação do enalapril e enalaprilato de 3 lotes distintos de amostras. Os coeficientes de variação obtidos encontravam-se dentro dos limites estabelecidos pela legislação (20% para o LQ e até 15% para os demais pontos). Os baixos valores de coeficientes de variação obtidos demonstram resultados homogêneos, determinando a precisão do método. Os resultados descritos nas tabelas, também relacionam a exatidão do método, que foi expressa em porcentagem obtida a partir da relação entre concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica de enalapril e enalaprilato.

**Tabela 24** - Resultados das análises para determinação da precisão (repetibilidade) e exatidão intra-corrída (Lote 1– enalapril) do método de CL-EM-EM.

Enalapril				
Amostra	LQ (ng/mL)	CQB (ng/mL)	CQM (ng/mL)	CQA (ng/mL)
1	3,46	6,99	125,55	267,67
2	3,49	6,38	131,07	254,14
3	3,25	6,78	132,99	244,14
4	3,22	6,47	125,43	258,06
5	3,37	6,46	123,96	263,04
6	3,44	6,90	126,07	249,64
7	3,28	6,59	126,45	267,42
8	3,32	6,63	133,29	270,60
Média	3,35	6,65	128,10	259,34
CV%	3,04%	3,32%	2,91%	3,66%

Exatidão	111,79%	110,83%	106,75%	108,06%
----------	---------	---------	---------	---------

**Tabela 25** – Resultados das análises para determinação da precisão (repetibilidade) e exatidão intra-corrida (Lote 1– enalaprilato) do método de CL-EM-EM.

Enalaprilato				
Amostra	LQ (ng/mL)	CQB (ng/mL)	CQM (ng/mL)	CQA (ng/mL)
1	3,26	6,81	64,90	124,47
2	3,46	6,40	63,96	123,73
3	3,38	6,44	68,00	120,06
4	3,33	6,33	64,92	126,80
5	2,97	6,30	64,20	129,52
6	3,05	7,10	65,42	124,97
7	3,32	6,51	63,83	122,32
8	3,20	5,78	67,95	130,01
Média	3,25	6,46	65,40	125,24
CV%	5,12%	5,98%	2,57%	2,73%
Exatidão	108,21%	107,65%	109,00%	104,36%

**Tabela 26** – Resultados das análises para determinação da precisão (repetibilidade) e exatidão intra-corrida (Lote 2– enalapril) do método de CL-EM-EM.

Enalapril				
Amostra	LQ (ng/mL)	CQB (ng/mL)	CQM (ng/mL)	CQA (ng/mL)
1	2,52	5,97	137,13	258,36
2	2,57	5,31	126,00	261,61
3	2,63	5,69	129,30	264,56
4	2,73	5,69	128,00	243,61
5	2,69	6,05	124,17	258,71
6	2,45	5,83	130,35	251,59
7	2,78	5,43	133,38	260,35
8	2,65	6,59	126,50	257,40
Média	2,63	5,82	129,35	257,02
CV%	4,18%	6,86%	3,28%	2,56%
Exatidão	87,58%	97,00%	107,79%	107,09%

**Tabela 27** – Resultados das análises para determinação da precisão (repetibilidade) e exatidão intra-corrida (Lote 2– enalaprilato) do método de CL-EM-EM.

<b>Enalaprilato</b>				
<b>Amostra</b>	<b>LQ (ng/mL)</b>	<b>CQB (ng/mL)</b>	<b>CQM (ng/mL)</b>	<b>CQA (ng/mL)</b>
1	2,89	6,57	67,31	122,76
2	2,85	6,22	64,80	128,79
3	2,98	6,07	64,79	130,76
4	2,90	6,60	65,03	122,98
5	2,96	6,15	66,51	125,84
6	2,92	6,23	66,42	123,05
7	3,12	6,05	67,14	124,51
8	2,95	7,27	61,42	128,76
Média	2,95	6,40	65,43	125,93
CV%	2,77%	6,42%	2,93%	2,49%
Exatidão	98,21%	106,58%	109,05%	104,94%

**Tabela 28** – Resultados das análises para determinação da precisão (repetibilidade) e exatidão intra-corrida (Lote 3– enalapril) do método de CL-EM-EM.

<b>Enalapril</b>				
<b>Amostra</b>	<b>LQ (ng/mL)</b>	<b>CQB (ng/mL)</b>	<b>CQM (ng/mL)</b>	<b>CQA (ng/mL)</b>
1	2,52	5,74	130,99	265,03
2	2,52	5,87	127,64	315,49
3	2,70	6,16	128,96	274,73
4	2,48	5,89	128,05	257,52
5	2,69	6,14	126,44	275,48
6	3,11	5,96	126,98	270,43
7	2,75	5,70	132,65	250,71
8	2,43	6,31	137,26	274,75
Média	2,65	5,97	129,87	273,02
CV%	8,28%	3,60%	2,80%	7,09%
Exatidão	88,33%	99,52%	108,23%	113,76%

**Tabela 29** – Resultados das análises para determinação da precisão (repetibilidade) e exatidão intra-corrída (Lote 3– enalaprilato) do método de CL-EM-EM.

<b>Enalaprilato</b>				
<b>Amostra</b>	<b>LQ (ng/mL)</b>	<b>CQB (ng/mL)</b>	<b>CQM (ng/mL)</b>	<b>CQA (ng/mL)</b>
1	2,80	6,14	64,04	128,75
2	2,64	6,61	65,49	145,83
3	2,78	6,35	65,86	130,43
4	2,81	6,32	63,06	127,12
5	2,77	6,10	65,09	128,02
6	3,00	6,47	65,78	132,97
7	3,03	6,07	65,02	122,66
8	2,82	6,97	68,16	132,35
Média	2,83	6,38	65,31	131,02
CV%	4,48%	4,76%	2,28%	5,20%
Exatidão	94,38%	106,31%	108,85%	109,18%

**Tabela 30** – Resultados das análises usadas para determinação da precisão (repetibilidade) e exatidão inter-corrída do enalapril do método de CL-EM-EM.

<b>Enalapril</b>				
<b>Amostra</b>	<b>LQ (ng/mL)</b>	<b>CQB (ng/mL)</b>	<b>CQM (ng/mL)</b>	<b>CQA (ng/mL)</b>
Lote 1	3,35	6,65	128,10	259,34
Lote 2	2,63	5,82	129,35	257,02
Lote 3	2,65	5,97	129,87	273,02
Média	2,88	6,15	129,11	263,13
CV%	14,35%	7,19%	0,70%	3,28%
Exatidão	95,90%	102,45%	107,59%	109,64%

**Tabela 31** – Resultados das análises para determinação da precisão (repetibilidade) e exatidão inter-corrída do enalaprilato do método de CL-EM-EM.

<b>Enalaprilato</b>				
<b>Amostra</b>	<b>LQ (ng/mL)</b>	<b>CQB (ng/mL)</b>	<b>CQM (ng/mL)</b>	<b>CQA (ng/mL)</b>
Lote 1	3,25	6,46	65,40	125,24
Lote 2	2,95	6,40	65,43	125,93

Lote 3	2,83	6,38	65,31	131,02
Média	3,01	6,41	65,38	127,39
CV%	7,12%	0,66%	0,09%	2,48%
Exatidão	100,26%	106,85%	108,97%	106,16%

### Robustez

Avaliou-se a robustez com o objetivo de verificar eventuais alterações nas características do método. Os valores obtidos na análise de verificação da robustez do método para quantificação do enalapril e enalaprilato usando CL-EM-EM estão apresentados no Tabela 32.

**Tabela 32** – Resultados da avaliação de diferentes variáveis para determinação da robustez do método de quantificação do enalapril e enalaprilato.

Amostra	Varição	Média (ng/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
CQB	Normal	6,00	1,87	99,94
CQA	Normal	120,00	3,37	100,00
CQB	Fluxo aumentado em 0,1 mL/min.	6,30	7,66	105,06
CQA	Fluxo aumentado em 0,1 mL/min.	129,20	8,21	107,67
CQB	Fluxo reduzido em 0,1 mL/min.	5,87	10,22	97,89
CQA	Fluxo reduzido em 0,1 mL/min.	109,45	9,44	91,21
CQB	pH da fase móvel aumentado em 0,5.	5,27	23,64	87,78
CQA	pH da fase móvel aumentado em 0,5.	100,74	7,53	83,95
CQB	pH da fase móvel reduzido em 0,5.	3,94	7,03	65,61
CQA	pH da fase móvel reduzido em 0,5.	81,72	1,34	68,10

O método apresentou um desvio maior do que o permitido para valores abaixo e acima do pH da fase móvel de trabalho, contudo o pH da fase móvel utilizada foi monitorado rigorosamente, para evitar alterações no processo analítico.

## Estabilidade

---

### Estabilidade após Ciclo de Congelamento e Descongelo (ECCD).

Os resultados do estudo de estabilidade relacionada ao ciclo de congelamento e descongelamento estão apresentados nas Tabelas 33, 34 e 35 e são comparados com resultados do Lote 3 da análise de precisão e exatidão (como amostras de preparação recente).

**Tabela 33** – Resultados das determinações de concentrações do enalapril nas amostras do CQB e CQA para determinação da estabilidade após ciclo de congelamento e descongelamento durante 3 dias.

Amostra	Enalapril	
	CQB (ng/mL)	CQA (ng/mL)
1	5,24	246,69
2	5,39	279,79
3	5,00	301,03
4	6,46	289,98
5	5,32	352,70
Média	5,48	280,43
CV%	10,33%	7,29%
Exatidão	91,37%	116,85%

**Tabela 34** – Resultados das determinações de concentrações do enalaprilato nas amostras do CQB e CQA para determinação da estabilidade após ciclo de congelamento e descongelamento durante 3 dias.

Enalaprilato		
Amostra	CQB (ng/mL)	CQA (ng/mL)
1	5,35	110,47
2	5,82	132,86
3	5,57	128,73
4	6,00	117,53
5	6,02	125,27
Média	5,75	122,97
CV%	5,01%	7,30%
Exatidão	95,87%	102,48%

**Tabela 35** – Resultados das determinações de concentrações do lisinopril (PI) nas amostras do CQ para determinação da estabilidade após ciclo de congelamento e descongelamento durante 3 dias.

Lisinopril	
Amostra	IS (ng/mL)
1	0,96
2	1,08
3	1,10
4	0,96
5	0,97
6	1,09
7	1,08
8	0,91
9	0,96
10	0,92
Média	1,00
CV%	7,34%
Exatidão	100,30%

### Estabilidade de curta duração

A Estabilidade de Curta Duração (ECD) foi realizada em um período tempo superior a 8 horas, o que representa um tempo superior ao utilizado na realização da corrida analítica de todas as amostras de plasmas do estudo. Os dados relativos à verificação da estabilidade de curta duração do método encontram-se nas Tabelas 36, 37 e 38 e são comparados com resultados do Lote 3 da análise de precisão e exatidão (como amostras de preparação recente).

**Tabela 36** – Resultados das concentrações de enalapril obtidas nas amostras do CQB e CQA após 8 horas de descongelamento a temperatura ambiente.

Enalapril		
Amostra	CQB (ng/mL)	CQA (ng/mL)
1	5,96	250,77
2	5,18	279,52
3	5,32	293,70
4	6,95	262,75
5	5,55	293,17
Média	5,79	275,98
CV%	12,28%	6,86%
Exatidão	96,53%	114,99%

**Tabela 37** – Resultados das concentrações de enalaprilato obtidas nas amostras do CQB e CQA após 8 horas de descongelamento a temperatura ambiente.

Enalaprilato		
Amostra	CQB (ng/mL)	CQA (ng/mL)

1	5,36	110,29
2	5,64	130,50
3	6,01	129,73
4	5,76	108,94
5	6,01	102,66
Média	5,76	116,42
CV%	4,75%	11,02%
Exatidão	95,93%	97,02%

**Tabela 38** – Resultados da concentração do lisinopril obtidas nas amostras do CQ após 8 horas de descongelamento a temperatura ambiente.

Lisinopril	
Amostra	IS (ng/mL)
1	0,96
2	1,08
3	1,02
4	1,08
5	1,01
6	1,11
7	1,12
8	0,96
9	1,06
10	1,11
Média	1,05
CV%	5,71%

Exatidão

105,10%

### Estabilidade de Longa Duração (ELD)

Para avaliação da estabilidade de longa duração, as amostras permaneceram congeladas a uma temperatura de -20°C por um período de 180 dias.

O resultado do estudo de estabilidade de longa duração do enalapril demonstrou que o fármaco se manteve estável para o período de avaliação a qual foi submetido. As amostras analisadas nesse estudo de estabilidade foram consideradas estáveis quando não se observou desvio superior a 15% em relação ao valor obtido das amostras recém-preparadas. Os dados dessa análise estão apresentados na Tabela 39.

**Tabela 39** – Resultados da avaliação da estabilidade de longa duração do enalapril.

Amostra	Enalapril			
	CQB (ng/mL)		CQA (ng/mL)	
	Recente	ELD	Recente	ELD
1	6,5	6,6	247,9	259,9
2	6,2	6,6	237,6	263,4
3	6,5	6,6	243,4	250,3
4	6,0	5,7	250,9	260,8
5	6,2	6,3	251,4	249,7
Média	6,3	6,4	246,2	256,8
CV%	3,81%	6,40%	2,34%	2,47%
Exatidão	104,33%	105,90%	102,60%	107,01%
Variação	1,50%		4,30%	

### Estabilidade das Soluções Padrão após 12 horas (ESP 12h)

As soluções padrão foram avaliadas após um período de 12 horas para verificação da estabilidade.

Os valores encontrados são apresentados nas Tabelas 40, 41 e 42 e são comparados com resultados do Lote 3 da análise de precisão e exatidão (como amostras de preparação recente).

**Tabela 40** – Resultados da análise da estabilidade das soluções padrão de enalapril após serem mantidas 12 horas à temperatura ambiente.

Amostra	Enalapril		
	CQB (ng/mL)	CQM (ng/mL)	CQA (ng/mL)
1	5,09	132,43	253,88
2	5,07	124,35	285,79
3	5,45	134,63	267,63
4	6,97	126,11	257,56
5	5,61	116,99	315,87
Média	5,64	126,90	276,15
CV%	13,83%	5,51%	9,21%
Exatidão	93,97%	105,75%	115,06%

**Tabela 41** – Resultados da análise da estabilidade das soluções padrão de enalaprilato após serem mantidas 12 horas à temperatura ambiente.

Enalaprilato
--------------

Amostra	CQB (ng/mL)	CQM (ng/mL)	CQA (ng/mL)
1	5,00	62,41	112,90
2	5,35	56,43	124,32
3	5,83	62,91	124,47
4	6,06	57,42	109,16
5	5,89	53,51	116,69
Média	5,63	58,54	117,51
CV%	7,79%	6,89%	5,81%
Exatidão	93,77%	97,56%	97,92%

**Tabela 42** – Resultados da análise da estabilidade das soluções padrão de lisinopril (PI) após serem mantidas 12 horas à temperatura ambiente.

Lisinopril	
Amostra	IS (ng/mL)
1	1,01
2	1,12
3	1,12
4	1,09
5	1,04
6	1,01
7	1,06
8	1,11
9	1,05
10	1,11
11	1,16
12	1,06
13	1,01
14	1,08

15	1,03
16	0,99
Média	1,07
CV%	4,11%
Exatidão	107,20%

### Estabilidade das Soluções Padrão após 7 dias (ESP 7 d).

As soluções padrão também foram avaliadas em relação a um tempo 7 dias de congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Estas soluções foram comparadas a soluções recentemente preparadas, os valores encontrados estão apresentados nas Tabelas 43, 44 e 45. As amostras analisadas nesse estudo de estabilidade foram consideradas estáveis quando não se observou desvio superior a 15% em relação ao valor obtido das amostras recém-preparadas.

**Tabela 43** – Resultados da análise da estabilidade das soluções padrão de enalapril após 7 dias de estocagem em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Amostra	Enalapril					
	CQB (ng/mL)		CQM (ng/mL)		CQA (ng/mL)	
	Recente	Após 7 dias	Recente	Após 7 dias	Recente	Após 7 dias
1	6,04	6,43	115,59	110,37	237,01	237,30
2	6,91	6,44	112,63	118,80	222,99	209,51
3	5,09	6,00	109,93	112,24	251,54	245,99
4	5,80	6,40	111,56	115,65	232,09	247,20
5	6,72	5,53	113,16	115,41	214,01	249,52
Média	6,11	6,16	112,57	114,49	231,53	237,90
Variação	0,79%		1,71%		2,75%	

**Tabela 44** – Resultados da análise da estabilidade das soluções padrão de enalaprilato após 7 dias de estocagem em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Amostra	Enalaprilato					
	CQB (ng/mL)		CQM (ng/mL)		CQA (ng/mL)	
	Recente	Após 7 dias	Recente	Após 7 dias	Recente	Após 7 dias
1	5,93	6,44	59,62	60,00	115,44	116,18
2	6,76	5,21	61,28	59,68	125,51	112,67
3	5,46	6,33	59,69	61,22	121,72	116,47
4	5,74	6,22	61,47	62,66	112,99	119,99
5	6,33	5,34	56,87	56,75	109,04	122,23
Média	6,04	5,91	59,79	60,06	116,94	117,51
Varição	2,25%		0,46%		0,49%	

**Tabela 45** – Resultados da análise da estabilidade das soluções padrão de lisinopril (PI) após 7 dias de estocagem em freezer a – 20°C.

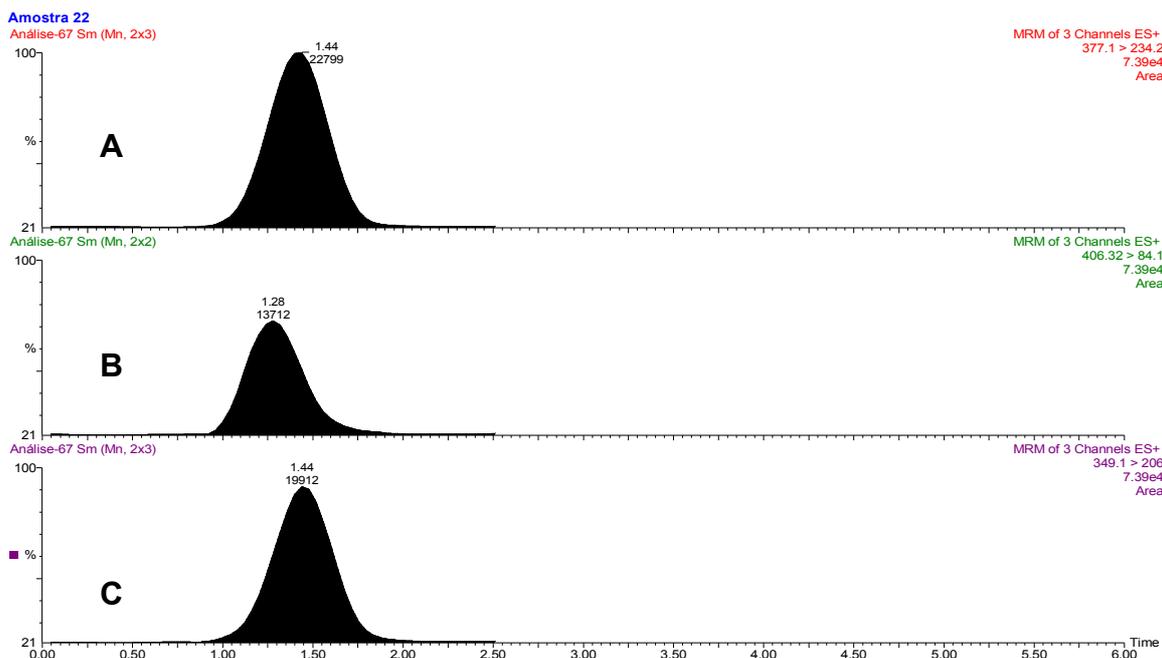
Amostra	Lisinopril	
	Recente (ng/mL)	Após 7 dias (ng/mL)
1	1,00	0,97
2	0,93	1,00
3	1,07	0,99
4	1,03	0,93
5	0,93	1,05
6	1,05	1,07
7	0,98	1,06
8	1,01	1,09
9	1,09	1,06
10	1,05	1,00
11	0,97	1,02
12	0,97	1,14
13	0,95	1,02
14	0,99	0,98
15	1,06	0,99
Média	1,01	1,02

Variação	1,92%
----------	-------

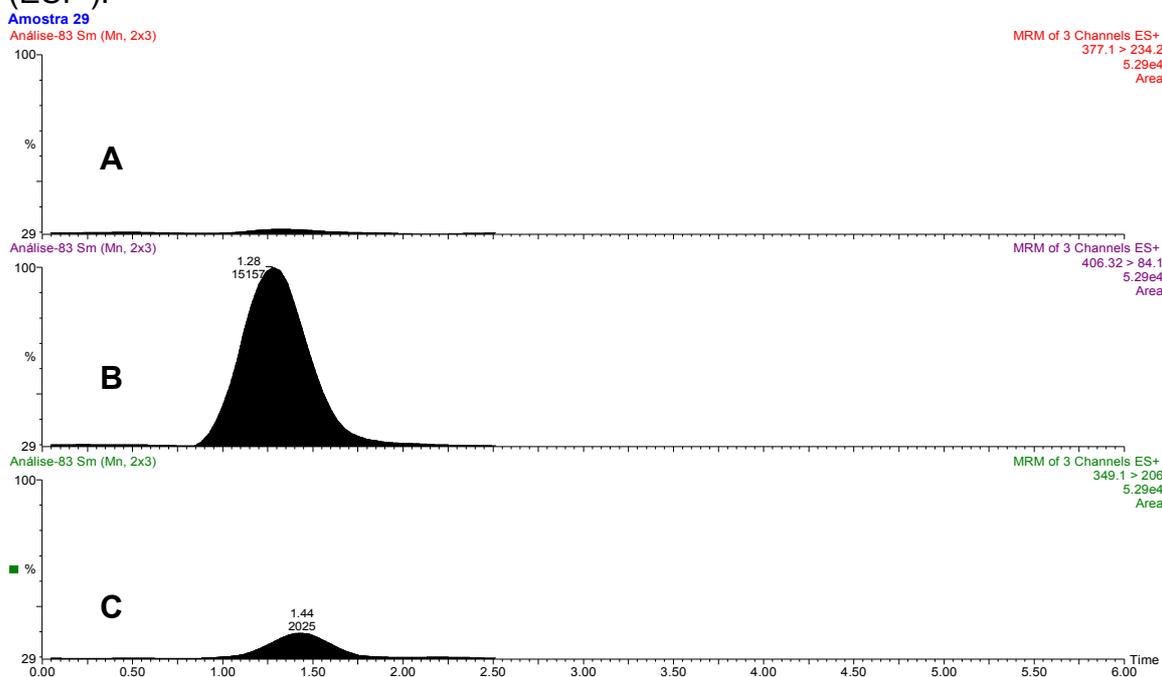
---

#### **4.2.2. Resultados da quantificação do enalapril e enalaprilato no plasma:**

O método de CL-EM-EM usado na determinação do enalapril e enalaprilato no plasma apresentou seletividade e especificidade, conforme pode ser observado nos cromatogramas obtidos a partir das análises de quantificação do enalapril, enalaprilato (metabólito ativo) e lisinopril (PI) em plasmas de pacientes que receberam tratamentos com produtos distintos (Referência, Genérico ou Similar). Cromatogramas representativos da análise de algumas amostras estão apresentados nas Figuras 35, 36 e 37.

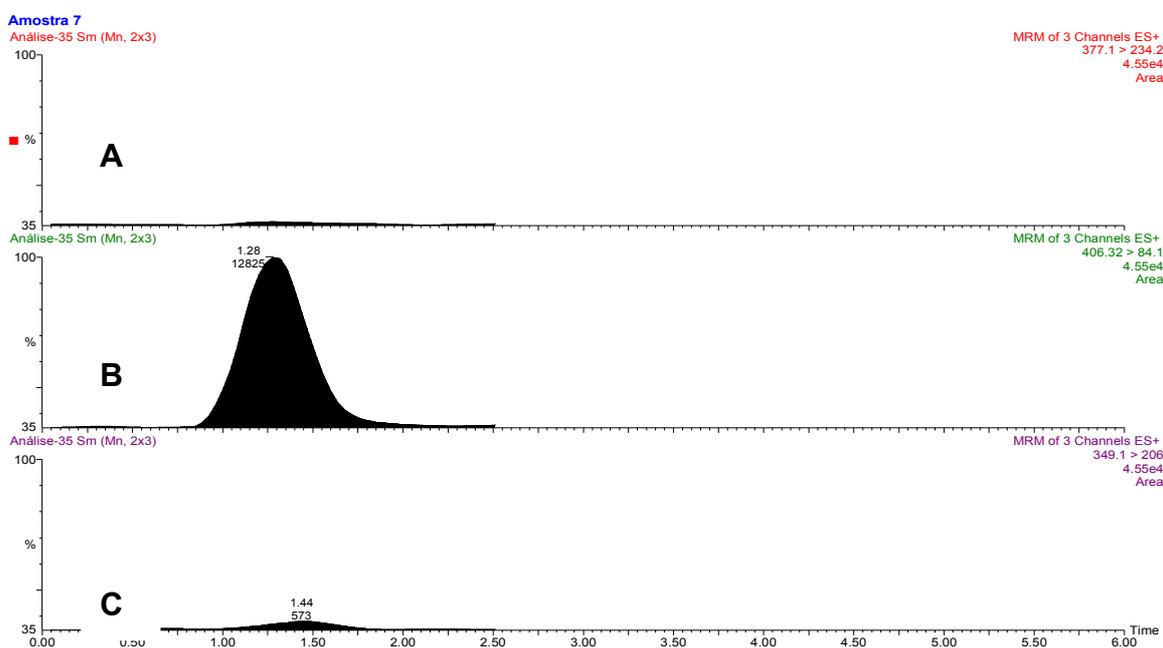


**Figura 35** - Cromatogramas representativos obtidos na quantificação do enalapril (A), lisinopril (B) e enalaprilato (C) em plasma de voluntário tratado com medicamento Referência. Condições cromatográficas: coluna C18 a 25° C, fase móvel metanol e água acrescido de 0,1% de ácido fórmico (65:35 v/v) e fluxo de 0,6 mL/min. Detecção no EM no modo de ionização eletrospray positiva (ESI+).



**Figura 36** - Cromatogramas representativos obtidos na quantificação do enalapril (A), lisinopril (B) e enalaprilato (C) em plasma de voluntário tratado com medicamento Genérico. Condições cromatográficas: coluna C18 a 25° C, fase móvel metanol e água acrescido de 0,1% de ácido fórmico (65:35 v/v) e

fluxo de 0,6 mL/min. Detecção no EM no modo de ionização eletrospray positiva (ESI+).



**Figura 37** - Cromatogramas representativos obtidos na quantificação do enalapril (A), lisinopril (B) e enalaprilato (C) em plasma de voluntário tratado com medicamento Similar. Condições cromatográficas: coluna C18 a 25° C, fase móvel metanol e água acrescido de 0,1% de ácido fórmico (65:35 v/v) e fluxo de 0,6 mL/min. Detecção no EM no modo de ionização eletrospray positiva (ESI+).

O resultado da quantificação do enalapril e enalaprilato, no plasma de pacientes tratados diariamente com 20 mg do maleto de enalapril (grupos tratados com diferentes especialidades) durante 30 dias, estão apresentados na Tabela 46.

**Tabela 46** – Média e desvio padrão da concentração plasmática do enalapril e seu metabólito ativo (enalaprilato) determinada nas amostras dos voluntários incluídos no estudo clínico.

Grupos de Tratamento	Nº de pacientes tratados	Média e DP da concentração plasmática do enalapril (ng/mL)	Média e DP da concentração plasmática do enalaprilato (ng/mL)	Média e DP da concentração plasmática total do fármaco (ng/mL)
Referência	9	16,80±13,32	136,82±41,42	153,61±43,79
Genérico	10	14,82±12,71	59,62±38,67	74,44±42,71
Similar	10	5,68±11,27	50,51±43,47	56,19±47,53

Anova : P < 0,001; Bartlett: P < 0,1080

Conforme pode ser observado o grupo Referência apresentou um número de pacientes menor, devido a uma de suas amostras ter sido eliminada em razão do não comparecimento do paciente em dia e horário definido para coleta de sangue.

Esses resultados mostram que foram detectadas quantidades menores do fármaco ativo (enalaprilato) na corrente sanguínea dos pacientes que receberam durante o estudo o produto Genérico ou Similar do maleato de enalapril quando comparados ao grupo tratado com o produto Referência. Menos de 50% da concentração plasmática do fármaco ativo obtida no grupo Referência foi detectada nos demais grupos (Tabela 46).

Como a intensidade dos efeitos terapêuticos ou tóxicos dos medicamentos depende da concentração alcançada em seu sítio de ação, é necessário garantir que o medicamento escolhido atinja, em concentrações adequadas, o órgão ou sistema suscetível ao efeito benéfico requerido.

Como o estudo foi conduzido em pacientes sob tratamento ambulatorial, o monitoramento adequado do horário de uso do medicamento e da coleta de sangue foi prejudicado. E assim os resultados obtidos apresentaram uma variação, demonstrada através do desvio padrão da concentração plasmática encontrada. Para minimizar possíveis detecções do fármaco ativo em quantidades inferiores devido às variações descritas, foi analisada a concentração plasmática também do enalapril (pró-fármaco). Ainda assim, foram determinadas quantidades inferiores da substância nos pacientes tratados com produto Genérico ou Similar (Tabela 46).

#### ***4.2.2.1.. Resultados da análise estatística dos dados obtidos na quantificação do fármaco no plasma:***

A análise estatística dos dados confirmou que existem diferenças entre os grupos de tratamento, tanto considerando a concentração obtida apenas do fármaco ativo (enalaprilato – Tabela 47), quanto considerando a concentração plasmática total (enalapril e enalaprilato – Tabela 48).

**Tabela 47** - Resultado da aplicação do Teste de Tukey para comparação entre os grupos de tratamento, utilizando o parâmetro das médias apenas da concentração plasmática do fármaco ativo (enalaprilato).

Comparação entre Grupos	Valor de P
Referência X Genérico	P = 0,002 (++)
Referência X Similar	P < 0,001 (+++)
Genérico X Similar	P = 0,869 (ns)

p < 0,05 é considerado significativo (+: grau de significância).

**Tabela 48** - Resultado da aplicação do Teste de Tukey para comparação entre os grupos de tratamento, utilizando o parâmetro das médias da concentração plasmática total do fármaco.

Comparação entre Grupos	Valor de P
Referência X Genérico	P = 0,002 (++)
Referência X Similar	P < 0,001 (+++)
Genérico X Similar	P = 0,638 (ns)

p < 0,05 é considerado significativo (+: grau de significância).

Para verificar se houve diferenças significativas provocadas pela ausência do controle das variáveis descritas anteriormente (administração do fármaco e horário da coleta do sangue), demonstrado através do desvio padrão, foi aplicado o teste estatístico de Bartlett, onde o valor de P encontrado foi de 0,9474, sugerindo que as diferenças observadas entre os grupos não é significativa. As variações apresentaram a mesma proporção de impacto para os três grupos de tratamento, não comprometendo o resultado da concentração plasmática encontrado.

Embora o estudo de MURTHY & GHEBRE-SELLASSIE (1993) ressalte que é difícil prever se alterações dos parâmetros de dissolução e teor do fármaco *in vitro*, necessariamente comprometem a biodisponibilidade do fármaco *in vivo*, as baixas concentrações plasmáticas do enalaprilato detectadas no ensaio *in vivo* deste estudo demonstram que formulações distintas podem apresentar diferentes parâmetros farmacocinéticos quando administradas a pacientes hipertensos. De acordo com STORPIRTIS et al (1999), medicamentos genéricos ou similares fabricados sob diferentes condições tecnológicas e de formulação podem apresentar desempenhos distintos no organismo, o que também pode ocorrer entre lotes sucessivos de um mesmo produto que alterou sua formulação ou origem das matérias-primas após a análise de bioequivalência.

Existe muita controvérsia em relação à confiabilidade dos estudos de bioequivalência para aprovação dos produtos Genéricos e Similares, tendo como base o fato de que o ensaio de bioequivalência é realizado comumente, utilizando um grupo homogêneo de indivíduos saudáveis (entre 18 e 24 voluntários), com idade entre 18 e 55 anos de idade, peso corporal normal, não fumante e que não estejam recebendo outra terapia medicamentosa e com dieta controlada (CRAWFORD et al, 2006; MEREDITH, 2003). Por outro lado, o produto Referência ou inovador comprova sua eficácia e tolerabilidade através da realização de ensaios clínicos de base populacional, incluindo indivíduos saudáveis e doentes, com idade e peso corporal variável, portadores de outras patologias ou não. Estas diferenças levantam a hipótese de que, nesse modelo de estudo de bioequivalência reduz-se a probabilidade de se observar alguma bioinequivalência, as propriedades farmacocinéticas do fármaco nesse tipo de paciente, podem diferir bastante das observadas em uma população com intercorrência dessas diferentes variáveis (CRAWFORD et al, 2006; MEREDITH, 2003). Sabidamente, as propriedades farmacocinéticas de um fármaco podem ser afetadas pela presença de uma patologia, diferenças no metabolismo de primeira passagem, interações com outros medicamentos em uso concomitante, dieta e fatores gastrintestinais. Admitir a partir do teste de bioequivalência que o produto tem comparável eficácia clínica e tolerabilidade, não é, contudo, um fato totalmente estabelecido, supostamente existe uma relação entre a concentração e esses parâmetros (MEREDITH, 2003). Além disso, os estudos de bioequivalência comumente envolvem o uso de uma dose única do medicamento, dificultando ainda mais o consenso a respeito da validade desse estudo, uma vez que a concentração plasmática ideal do fármaco para alcançar o “steady state” é maior que a dose administrada em um estudo de dose única, a maioria dos fármacos requer a administração de múltiplas doses para manter a concentração plasmática pretendida (CRAWFORD et al, 2006; MEREDITH, 2003).

Embora vários produtos Genéricos de diferentes classes terapêuticas possam ser considerados equivalentes terapêuticos com o produto Referência, um número significativo de fármacos tem sido identificado com características que podem gerar bioinequivalência: relativa insolubilidade em água, margem terapêutica estreita, e cinética não linear. No caso dos fármacos anticonvulsivantes, existem relatos na literatura de problemas em função da substituição do fármaco Referência pela

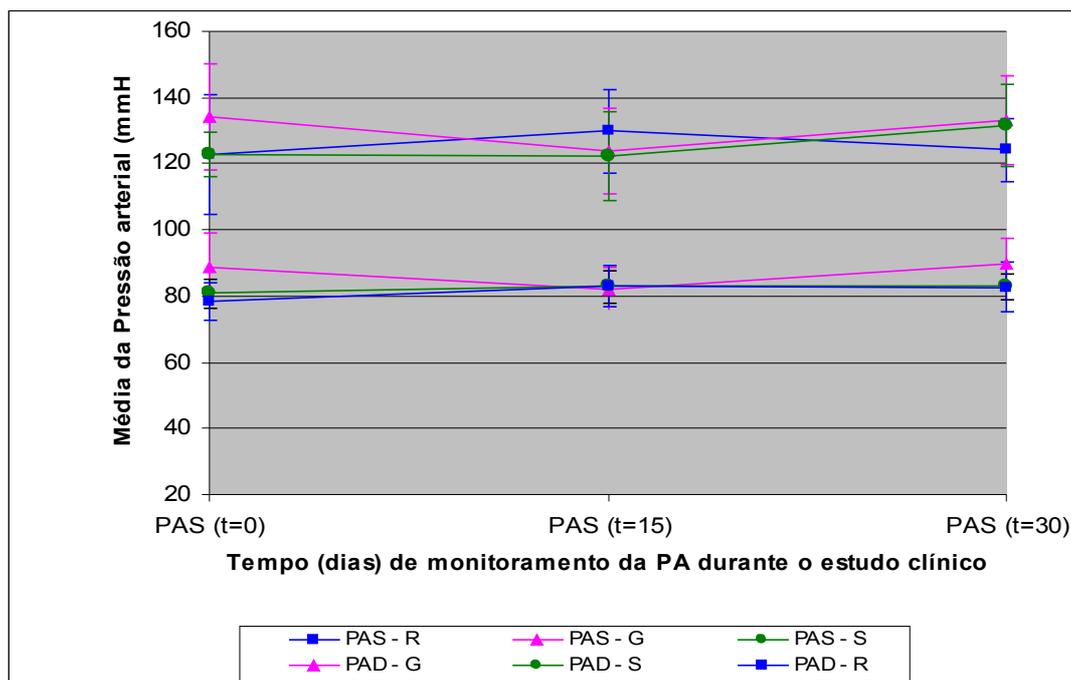
formulação Genérica (CRAWFORD et al, 2006). Possivelmente esses relatos têm ocorrido em maior escala devido às características destes fármacos que apresentam uma estreita faixa de segurança entre a dose terapêutica e a dose tóxica, além de exigirem um monitoramento da concentração plasmática individual para se estabelecer a dosagem adequada ao controle dos sintomas da doença (CRAWFORD et al, 2006; MAKUS & McCORMICK, 2007).

Na prática clínica, muitos problemas têm sido relatados com agentes anticonvulsivantes, antiinflamatórios não esteróides e algumas classes de agentes cardiovasculares (MEREDITH, 2003). Um estudo conduzido por D'ARCY (1990) demonstrou que pacientes tratados com a formulação Genérica do propranolol apresentaram aproximadamente 10% a mais de efeitos adversos em relação aos pacientes que receberam o medicamento Referência. Pouco tem sido publicado a respeito da qualidade de produtos Genéricos com atuação anti-hipertensiva.

Outro aspecto importante a ser considerado para se garantir uma terapêutica segura é o fato de que a vinculação do conceito de equivalência terapêutica ao conceito de intercambialidade não tem impacto sobre a maioria dos consumidores, que optam pelo medicamento mais barato de mesmo princípio ativo (Genérico ou Similar), ainda que não seja um equivalente terapêutico. Na hora da compra, a intercambialidade nos locais de dispensação é feita entre produtos Referência e Genéricos, mas também com Similares, influenciada pela bonificação recebida pelos balconistas e/ou proprietários das farmácias, muitas vezes em desrespeito ao prescritor e as normas regulatórias vigentes no país. Os clínicos devem estar atentos para esse fato, pois a prescrição por nome Genérico de sua confiança não garante a continuidade do tratamento com o mesmo produto (RUMEL et al, 2006).

#### **4.2.3. Resultados da avaliação clínica dos pacientes:**

A média dos valores obtidos na aferição da Pressão Arterial Sistólica (PAS) e Pressão Arterial Diastólica (PAD) durante as consultas de avaliação clínica dos pacientes estão apresentados na Figura 38.



**Figura 38** – Média da Pressão Arterial (Sistólica e Diastólica) determinada nos voluntários antes e durante o tratamento com maleato de enalapril R (Referência), G (Genérico) e S (Similar) no estudo clínico.

Embora esses resultados não revelem diferenças consideráveis nos níveis pressóricos dos pacientes tratados com diferentes especialidades do maleato de enalapril, é necessário observar que não foi realizado controle de outras possíveis variáveis capazes de auxiliar o controle da pressão, tais como acompanhamento das mudanças do estilo de vida (redução do consumo de sal, realização de atividade física, controle do peso e outras).

Fator adicional que pode ter contribuído também para estes resultados é o fato de terem sido incluídos no estudo pacientes em uso de diuréticos como terapia complementar, uma vez que não foi possível agrupar número suficiente de voluntários em monoterapia. Desta forma, uma análise exclusiva destes dados não pode ser utilizada como parâmetro de resultado da eficácia dos produtos testados nem tampouco para correlacionar com os dados obtidos na determinação da concentração plasmática.

A construção racional do arsenal terapêutico, considerando a necessidade do paciente, a disponibilidade do medicamento, o melhor custo-benefício deve pressupor o embasamento na tríade: qualidade, segurança e eficácia.

Em geral, o mercado farmacêutico brasileiro nasce de indústrias de reconhecida trajetória no âmbito nacional e internacional, supondo uma garantia de alta qualidade dos mesmos. No entanto esses resultados podem demonstrar deficiências no controle de qualidade das formulações contendo maleato de enalapril de alguns laboratórios, devendo esses resultados serem considerados como um sinal de alerta.

A intercambialidade de medicamentos é uma ação legal, definida na Lei Nº 9.787 de 1999 (BRASIL, 1999), portanto definida a lista individualizada de medicamentos, qualquer desvio da resposta terapêutica observado pelo prescritor durante o tratamento, é o resultado de desvios de qualidade do produto, cujo controle efetivo é de responsabilidade do fabricante e sua regulação está a cargo do Ministério da Saúde.

## CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

---

Embora nem todas as especialidades do maleato de enalapril disponíveis no mercado farmacêutico tenham sido analisadas neste estudo e, portanto, as observações não possam ser generalizadas, os resultados encontrados alertam para necessidade de uma avaliação periódica da qualidade dos medicamentos disponibilizados no mercado brasileiro. Evidentemente, sob o ponto de vista ético, o anonimato de todos os laboratórios que tiveram seus produtos analisados nesse estudo está resguardado.

Os métodos cromatográficos utilizados, tanto com a detecção por UV quanto por Espectrometria de Massas (EM), foram capazes de quantificar o fármaco e seus produtos de degradação (ou metabólitos) de forma eficiente, atendendo a todos os parâmetros de validação.

Os testes *in vitro* revelaram que comprimidos de maleato de enalapril armazenados em condições simuladas de clima tropical, podem apresentar

alterações em suas formulações, capazes de promover a degradação do princípio ativo e comprometer a dissolução do fármaco. Foi detectado nesse estudo que 55% dos produtos testados sofreram impacto negativo em relação à estabilidade, deixando de cumprir com as especificações ao final do ensaio.

Foi verificado que o estudo acelerado da estabilidade de diferentes amostras do maleato de enalapril, demonstrou que alguns dos medicamentos Genéricos e Similares testados sofreram degradação, apresentaram concentrações inadequadas de fármaco e alterações no perfil de liberação do fármaco, podendo assim comprometer a ação farmacológica pretendida.

Dados ainda mais preocupantes em relação à qualidade dos medicamentos disponíveis no mercado farmacêutico, foram verificados ao se detectar produtos disponibilizados no mercado farmacêutico em condições normais de estocagem que não apresentaram teor adequado de princípio ativo (um produto Genérico e um produto Similar) ambos pertencentes ao mesmo fabricante. Sugere-se que orientações criteriosas no que diz respeito ao transporte e estocagem desses produtos devem ser estabelecidas em seu rótulo.

Os resultados sugerem que estudos envolvendo avaliação da estabilidade para produtos susceptíveis a exposições a altas temperaturas e umidade devem ser implementados durante o desenvolvimento da formulação e quando for feita qualquer alteração na formulação do produto ou no seu processo de produção.

A concentração plasmática total do fármaco encontrada para os medicamentos Genéricos e Similares foi, em média, inferior a 50% da concentração obtida com o medicamento Referência, pode ser avaliada como uma confirmação do impacto de diferenças observadas no perfil de liberação dos produtos sob a biodisponibilidade.

As verificações de diferenças de concentração plasmática do fármaco obtidas com o uso de diferentes formulações, mesmo utilizando produtos que não foram submetidos às condições forçadas de temperatura e umidade, reforçam a hipótese de que o teste de bioequivalência pode não ser considerado um parâmetro definitivo na determinação da qualidade do produto, corroborando com a idéia de que, as propriedades biofarmacêuticas dos fármacos devem ser consideradas, e em alguns casos, ensaios *in vivo* devem ser realizados em condições clínicas normais.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABOUL-ENEIN, H.Y.; ABOU-BASHA, L.I.; WAHMAN, L.F.; GHARIB, H.A.; TANTWAY, W.H. Pharmacokinetic parameters and relative bioavailability of two tablet formulations of enalapril maleate. *Instrumentation Science and Technology*, v. 33, p.1-8, 2005.

ALBONICO, M.; MATHEMA, P.; MONTRESOR, A.; KHAKUREL, B.; REGGI, V.; PANDEY, S.; SAVIOLI, L. Comparative study of the quality and efficacy of originator and generic albendazole for mass treatment of soil-transmitted nematode infections in Nepal. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.101, p.454-460, 2007.

ALLEN Jr, L.V.; POPPOVICK, N.G.; ANSEL, H.C. Desenvolvimento de formas Farmacêuticas: considerações farmacêuticas e de formulação. In: *Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos*. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. Cap.4, p.111-158.

AL-OMARI, M.M.; ABDELAH, M.K.; BADWAN, A.A.; JABER, A.M. Effect of the drug-matrix on the stability of enalapril maleate in tablet formulations. *Journal Pharmaceutical Biomedical Analysis*, v.25, p.893-902, 2001.

BAKSHI, M. & SINGH, S. Development of validated stability indicating assay methods-critical review. *Journal Pharmaceutical Biomedical Analysis*, v.28, p. 1011-1040, 2002.

BARONE, J.A. Comparative potency and dissolution performance of internationally available piroxicam products. *Pharmacoeconomics*, v.1, p.49-52, 1992.

BENET, L.Z. Understanding bioequivalence testing. *Transplantation Proceedings*, v. 31, p.7S-9S, 1999.

BENOWITZ, N.L. Agentes anti-hipertensivos. In: Katzung, B.G. *Farmacologia Básica & Clínica*. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2003. Cap.11, p.137-159.

BLUME, H. & SCHUG, B. The biopharmaceutics classification system (BCS): Class III drugs – better candidates for BA/BE waiver? *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.9, p. 117-121, 1999.

BRASIL. Lei nº 9.787, de 10 de fevereiro de 1999. Altera a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe a Vigilância Sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos. *Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]*, Brasília, DF, 11 de fev. 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde – Portaria nº 1.587, de 3 de setembro de 2002, Aprova a revisão da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais – RENAME. *Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]*, Brasília, DF, 04 de set. de 2002.

BRASIL. ANVISA/MS - Resolução nº 133, de 29 de maio de 2003a. Revoga a Resolução nº 157, de 31 de maio de 2002, e Dispõe sobre o registro de Medicamento Similar. *Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]*, Brasília, DF, 02 de jun. 2003.

BRASIL. ANVISA/MS - Resolução nº 135, de 29 de maio de 2003b. Revoga a Resolução nº 84, de 19 de março de 2002, e Dispõe sobre o Regulamento Técnico para medicamentos Genéricos. Republicada no *Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]*, Brasília, DF, 02 de jun. 2003.

BRASIL. ANVISA/MS - Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003c. Revoga a Resolução nº 475, de 19 de março de 2002, e Dispõe sobre o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Republicada no *Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]*, Brasília, DF, 02 de jun. 2003.

BRASIL. ANVISA/MS - Resolução nº 901, de 29 de maio de 2003d. Revoga a Resolução nº 483, de 19 de março de 2002, e Dispõe o Guia para ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata. *Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]*, Brasília, DF, 02 de jun. 2003.

BRASIL. ANVISA/MS - Resolução nº 310, de 1º de setembro de 2004. Revoga a Resolução nº 900 e 901, de 29 de maio de 2003, e Dispõe o Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução. *Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]*, Brasília, DF, 03 de set. 2004.

BRASIL. ANVISA/MS - Resolução nº 1, de 29 de julho de 2005. Revoga a Resolução nº 398, de 12 de novembro de 2004, e Dispõe sobre o Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. *Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]*, Brasília, DF, 30 de jul. 2005.

BRASIL. ANVISA/MS - Resolução nº 16, de 02 de março de 2007. Revoga a Resolução nº 135, de 29 de maio de 2003, e Aprova o Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos. *Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]*, Brasília, DF, 05 de mar. 2007.

BROWN, M.J. & HAYDOCK, S. Pathoetiology, epidemiology and diagnosis of hypertension. *Drugs*, v.59, p.1-12, 2000.

BROWN, N.J. & VAUGHAN, D.E. Angiotensin-Converting enzyme inhibitors. *Circulation*, v.97; p.1411-1420, 1998.

CIOLA, R. *Fundamentos de cromatografia a líquido de alto desempenho – HPLC*. São Paulo: Edgard Blucher, 1998. 179p.

CRAWFORD, P.; FEELY, M.; GUBERMAN, A.; KRAMER, G. Are there potential problems with generic substitution of antiepileptic drugs? A review of issues. *Seizure*, v.15, p.165-176, 2006.

D'ARCY, P.F. Adverse reactions to excipients in pharmaceutical formulations. In: Florence, A.T.; Sacole, E.G. *Formulation factors in adverse reactions*. London: Wright, p.1-22, 1990.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.G. Cromatografia: um breve ensaio. *Química Nova na Escola*, São Paulo, n.7, p.21-24, 1998.

DIGHE, S.V. A review of the safety of generic drugs. *Transplantation Proceedings*, v. 31, p.23S-24S, 1999.

DRESSMAN, J.D.; AMIDON, G.L.; REPPAS, C.; SHAH, V.P. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. *Pharmaceutical Research*, v.15, p.11-22, 1998.

EDEKI, T.; JOHNSTON, A.; LI KAM WA, E.; TURNE, P. Enalapril pharmacokinetics and ACE inhibition, following single and chronic oral dosing. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v.32, p.142-146, 1994.

ESPINEL, C.H.; WILLIAMS, J.L.; COUGHLIN, S.S. Enalapril and lisinopril in the treatment of mild to moderate essential hypertension. *Clinical Therapeutics*, v.12, n. 2, p.181-190, 1990.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed., Parte I, São Paulo: Atheneu, 1988.

FDA - Guidance for Industry: Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms, US Center for Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration, 1997.

FD - Guidance for industry: Bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products – general considerations, US Center for Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration, 2003.

FUCHS, F.D. Fármacos anti-hipertensivos. In: Fuchs, F.D. & Wannmacher, L. *Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional*. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. Cap.44, p.431-443.

GRAFFNER, C. Regulatory aspects of drug dissolution from a European perspective. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.29, p.288-293, 2006.

HANSSON, L.; LINDHOLM, L.H.; NISKANEN, L.; et al. Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Captopril Prevention Project randomised trial. *The Lancet*, v.353, p.611-616, 1999.

ICH Q1A(R2) (International Conference on Harmonisation) *Guideline Stability Testing of New Drug Substances and Products*, 2003. Disponível em: <<http://www.ich.org>>. Acesso em: fevereiro de 2007.

ICH Q2 (International Conference on Harmonisation). Validation of analytical procedures: Text and Methodology, 2005. Disponível em: <http://www.ich.org>. Acesso em: outubro de 2006.

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

JIVRAJ, M.; MARTINI, L.G.; THOMSON, C.M. An overview of the different excipients useful for the direct compression of tablets. *Pharmaceutical Science and Technology Today*, v.3,n.2, p.58-63, 2000.

KASIM, N.A.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO, M.; LENNERNAS, H.; HUSSAIN, A.S.; JUNGINGER, H.E.; STAVCHANSKY, A.; MIDHA, K.K.; SHAB, V.P.; AMIDON, G.I. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Molecular Pharmaceutics*, v.1, n.1, p. 85-96, 2004.

LACHMAN, L.; DeLUCA, P.; AKERS, M.J. Testes de estabilidade e Fundamentos de cinética química. In: Lachman, L; Lieberman, H.A.; Kanig, J.L. *Teoria e Prática na indústria farmacêutica*. Lisboa: Calouste Gulbenkian, v.2, p.1277-1355, 2001.

LANÇAS, F. Validação de métodos cromatográficos de análise. São Paulo: Rima, 2004. 62p.

LIN, S.; WANG, S.; CHEN, T.; HU, T. Intramolecular cyclization of diketopiperazine formation in solid-state enalapril maleate studied by thermal FT-IR microscopic system. *European Journal of Pharmaceutics*, v.54, p.249-254, 2002.

LUSINA, M.; CINDRIC, T.; TOMAIC, J.; PEKO, M.; POZAIC, L.; MUSULIN, N. Stability study of losartan/hydrochlorothiazide tablets. *International journal of Pharmaceutics*, v.291, p.127-137, 2005.

MACFaADYEN, R.J.; MEREDITH, P.A.; ELLIOTT, H.L. Enalapril clinical pharmacokinetics and pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships. An overview. *Clinical Pharmacokinetic*, v.25, p.274-282, 1993.

MAKUS, K.G. & McCORMICK, J. Identification of adverse reactions that can occur on substitution of generic for branded lamotrigine in patients with epilepsy. *Clinical Therapeutics*, v.29, n.2, p.334-341, 2007.

MARCOLONGO, R. *Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica*. 2003. 127 p. [Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo].

MENDHAM, J.; DENNEY, R.C.; BARNES, J.D.; THOMAS, M.J.K. Cromatografia com fase líquida e Espectrometria de massas. In: *Análise Química Quantitativa*. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. Cap. 8 e 19, p. 144-159 e p.400-430.

MEREDITH, P. Bioequivalence and other unresolved issues in generic drug substitution. *Clinical Therapeutics*, v.25, p.2875-2890, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Medicamentos para hipertensão são os mais procurados nas farmácias populares, 2006. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br>>. Acesso em: agosto de 2007.

MORETTO, L.D. Estabilidade de fármacos e medicamentos. São Paulo: *Febrafarma – Federação Brasileira da Indústria Farmacêutica*, 2004, 54p.

MURTHY, K.S. & GHEBRE-SELLASSIE, I. Current perspectives on the dissolution stability of solid oral dosage forms. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.82, n.2, p. 113-126, 1993.

NEAL, B.; MACMAHON, S.; CHAPMAN, N. Effects of ACE inhibitors, calcium antagonists, and other blood pressure-lowering drugs. *Lancet*, v.356, p.1955-1964, 2000.

NGO, S.N.T. When do differences in dissolution profiles predict clinical problems? *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, v.32, p.111-112, 2007.

NIH (National Institutes of Health). *VI Relatório do Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure*, 1997.

NIH (National Institutes of Health). *The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure*, 2003.

O'HARA, T.; DUNNE, A.; BUTLER, J.; DEVANE, J. A review of methods used to compare dissolution profile data. *Pharmaceutical Science and Technology Today*, v. 1,n.5, p.214-233, 1998.

OLIVEIRA, R.B. *Influência de matrizes plásticas, hidrofílicas, hidrofóbicas e do revestimento com HPMC na estabilidade e dissolução de comprimidos de enalapril*. 2006. 161 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

OPOTA, O.D.; JOACHIM, J.; MAILLOLS, H.; ACQUIER, R.; DELONCA, H. Effect of temperature on characteristics of hydroxypropylcellulose tablets prepared by wet granulation methods. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.22, n.2, p. 185-188, 1996.

PORTOLÉS, A.; TERLEIRA, A.; ALMEIDA, S.; GARCÍA-ARENILLAS, M.; CATURLA, M.; FILIPE, A.; VARGAS, E. Bioequivalence study of two formulations of enalapril, at a single oral dose of 20 mg (tablets): a randomized, two-way, open-label, crossover study in healthy volunteers. *Current Therapeutic Research*, v.65, n.1, p.34-46, 2004.

POZZAN, R.; BRANDÃO, A.A.; MAGALHÃES, M.E.; FREITAS, E.V.; BRANDÃO, A.P. O controle da pressão arterial como questão central no tratamento da hipertensão arterial. *Revista Brasileira de Hipertensão*, v.10, p.253-259, 2003.

QIN, X.Z.; DeMARCO, J.; IP, D.P. Simultaneous determination of enalapril, felodipine and their degradation products in the dosage formulation by reversed-phase high-performance liquid chromatography using a Spherisorb C<sub>8</sub> column. *Journal of Chromatography A*, v.707, p.245-254, 1995.

QURESHI, SA. & SHABNAM, J. Applications of new device (spindle) for improved characterization of drug release (dissolution) Of pharmaceutical products. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.19, p.291-297, 2003.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. O Sistema Vascular. In: *Farmacologia*. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. Cap.18, p.325-348.

REMKO, M. Acidity, lipophilicity, solubility, absorption, and polar surface area of some ACE inhibitors. *Chemistry*, v.61, n.2, p.133-141, 2007.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.; COLLINS, C.; JARDIM, I.; MELO, L. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RIBEIRO, W; MUSCARÁ, M.N.; MARTINS, A.R.; MORENO Jr, H.; MENDES, G.B.; NUCCI, G. Bioequivalence study of two enalapril maleate tablet formulations in healthy male volunteers. *European Journal Clinical Pharmacology*, v.50, p.399-405, 1996.

RISHA, P.G.; VERVAET, C.; VERGOTE, G.; VAN BORTEL, L. ; REMON, J.P. Drug formulations intended for the global market should be tested for stability under tropical climatic conditions. *European Journal Clinical Pharmacology*, v.59, p. 135-141, 2003.

RUMEL, D.; NISHIOKA, S.A.; SANTOS, A.A.M. Drug interchangeability:clinical approach and consumer's point of view. *Revista Saúde Pública*, v.40, p.1-7, 2006.

SATO, T.; TAKESHI, M.; YAMAMOTO, A. Clinical studies of enalapril treatment for patients with severe congestive heart failure. *Japanese Circulation Journal*, v.56, p. 35-45, 1992.

SAVILLE, D. Influence of storage on in-vitro release of ibuprofen from sugar coated tablets. *International Journal of Phramaceutics*, v.224, p.39-49, 2001.

SBH (Sociedade Brasileira de Hipertensão). Hipertensão arterial. *IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão*, 2002.

SBH (Sociedade Brasileira de Hipertensão). Hipertensão arterial. *V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão*, 2006.

SERRA, C.H.R. & STORPIRTIS, S. Comparação de perfis de dissolução da cefalexina através de estudos de cinética e eficiência de dissolução (ED%). *Brazilian journal of Pharmaceutical Sciences*, v.43, n.1, p.79-88, 2007.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, A. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: *Princípios de Análise Instrumental*. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. Cap.28, p.641-677.

SMITH, J.C.; TAROCCO, G.; MERAZZI, F.; SALZMANN, U. Are generic formulations of carvedilol of inferior pharmaceutical quality compared with the branded formulation? *Current medical Research and Opinion*, v.22, p.709-720, 2006.

SOCIEDADE MÉDICA DE ADMINISTRAÇÃO EM SAÚDE. Genéricos garantem expansão de laboratórios brasileiros, 2007. Disponível em: <<http://www.cqh.org.br/>>. Acesso em: agosto de 2007.

SORYAL, I.; RICHERS, A. Bioavailability and dissolution of proprietary and generic formulation of phenytoin. *Journal Neurology Neurosurg Psychology*, v.55, p.688-691, 1992.

STANISZ, B. Evaluation of stability of enalapril maleate in solid phase. *Journal Pharmaceutical Biomedical Analysis*, v.31, p.375-380, 2003.

STORPIRTIS, S.; OLIVEIRA, P.G.; RODRIGUES, D.; MARANHO, D. Considerações biofarmacotécnicas relevantes na fabricação de medicamentos genéricos: fatores que afetam a dissolução e a absorção de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.35, n.1, p.1-16, 1999.

STORPIRTIS, S.; MARCOLONGO, R.; GASPAROTTO, F.S.; VILANOVA, C.M. 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.

TAYLOR, R.B.; SHAKOOR, O.; BEHRENS, R.H.; EVERARD, M.; LOW, A.S.; WANGBOONSKUL, J.; REID, R.G.; KOLAWOLE, J.A. Pharamcopeial quality of drugs supplies by Nigerian pharmacies. *The Lancet*, v.357, n.9272, p.1933-1936, 2001.

THE MERCK INDEX. 14<sup>th</sup> ed. *Merck & Co*, Whitehouse Station, USA. 2006.

TRABELSI, H.; BOUABDALLAH, S.; SABBAH, S.; RAOUAFI, F.; BOUZOUITA, K. Study of the *cis-trans* isomerization of enalapril by reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.871, p.189-199, 2000.

USP XXVII (United States Pharmacopoeia XXVII). The official compendia of standards. Rockville: *The United States Pharmacopoeial Convention*, 2004.

USP XXX (United States Pharmacopoeia XXX). The official compendia of standards, Rockville: *The United States Pharmacopoeial Convention*, 2007.

WELLING, G. Bioavailability of tolazamide from tablets: comparison of *in vitro* an *in vivo* results. *Journal Pharmaceutical Sciences*, v.71, p.1259-1263, 1982.

WHELTON, P.K. Hypertension curriculum review: epidemiology and the prevention of hypertension. *Journal of Clinical Hypertension*, v.6, p.636-642, 2004.

WHO (World Health Organization). Recommendations on stability studies in a global environment, Working document QAS/05.146, 2004.

ZOPPI, A.; LINARES, M.; LONGHI, M. Quantitative analysis of enalapril by H NMR spectroscopy in tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.37, p. 627-630, 2005.

**ANEXO 1**