

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**Faculdade de Farmácia**  
**Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO PARA  
COMPRIMIDOS DE APIXABANA**

Natália Olegário dos Santos

Porto Alegre, Dezembro de 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
Faculdade de Farmácia

Natália Olegário dos Santos

Desenvolvimento e Validação de Método de Dissolução para Comprimidos de Apixabana

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em farmácia.

**Orientador:** Prof. Dr. Martin Steppe

**Co-Orientadora:** Dra. Nathalie Wingert

Porto Alegre, Dezembro de 2018.

## AGRADECIMENTOS

A todos os professores e integrantes do Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico pelo auxílio, troca de experiências e motivação, não somente ao longo deste trabalho, mas também durante os anos de iniciação científica. Em especial, ao professor orientador, Martin Steppe, por servir como exemplo de profissional, pelo incentivo, confiança, tranquilidade e suporte fornecidos. À co-orientadora, Nathalie Wingert, por topar esse desafio, pelo apoio, parceria, paciência e disponibilidade proporcionada.

A todos os professores, os quais eu levo de exemplo, pelos ensinamentos, ajuda, por dividir experiências e pela capacidade de aumentar a paixão e o orgulho por ter escolhido esta profissão.

Aos amigos que dividiram a vida acadêmica comigo, conseguindo tornar essa trajetória menos complicada e mais agradável. Aos amigos que, de longe ou perto, se fizeram sempre presentes durante esses anos, torcendo por mim, servindo de conforto, e sempre prontos pra dividir momentos e risadas.

À minha família, por serem minha base, respeitarem minhas escolhas, entenderem minhas ausências, pelo apoio e amor incondicional. Aos meus pais, Airton e Márcia, pelo incentivo a educação, por nunca medirem esforços, e pelo constante amparo. Aos meus irmãos, Leandro e Gabriel, pelo exemplo, parceria, e por sempre conseguirem tornar todos os momentos mais leves.

A todos vocês, o meu MUITO OBRIGADO!

## RESUMO

A apixabana é um fármaco anticoagulante que age inibindo diretamente o fator de coagulação X ativado, disponível no mercado brasileiro na forma de comprimidos revestidos nas dosagens de 2,5 e 5,0 mg e comercializado apenas por um laboratório. A formulação ainda não possui monografia na Farmacopeia Brasileira, bem como farmacopeias internacionais. Neste sentido, esse trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método de dissolução para apixabana na forma de comprimidos revestidos. O ensaio de dissolução é uma importante ferramenta na avaliação da qualidade de formulações farmacêuticas, desde o desenvolvimento até o controle de qualidade. Ao longo deste estudo, foram testadas diversas condições até chegar a mais adequada, a qual apresenta os seguintes parâmetros: meio de dissolução HCl 0,01M com volume de 500 mL, aparato pá, na velocidade de 75 rpm, temperatura de 37 °C, com sete pontos de coleta e tempo total de ensaio de 90 minutos. A análise quantitativa foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando um método previamente validado. O método de dissolução foi validado em conformidade com as guias oficiais, demonstrando especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. Por meio deste estudo, foi possível elaborar um método adequado, simples, confiável, e que representa contribuição para o desenvolvimento de novos produtos e controle de qualidade de preparações contendo esse fármaco.

**Palavras-chave:** apixabana, dissolução, validação, controle de qualidade.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da Apixabana .....	6
Figura 2. Mecanismo de ação dos anticoagulantes.....	7
Figura 3. Perfis de dissolução de APX nos meios testados .....	17
Figura 4. Perfis de dissolução de APX nas velocidades de 50 e 75 rpm.....	17
Figura 5. Cromatograma da APX SQR x análise do placebo.....	18
Figura 6. Curva padrão de APX obtida .....	19
Figura 7. Gráfico da análise de resíduos.....	19
Figura 8. Perfil de dissolução da APX na precisão inter-dia.....	20
Figura 9. Perfis de dissolução da APX no teste robustez .....	21

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições utilizadas no ensaio de dissolução. ....	12
Tabela 2. Condições cromatográficas utilizadas. ....	13
Tabela 3. Comparação entre os meios de dissolução testados.....	17
Tabela 4. Resultados da precisão intra-dia e inter-dias. ....	20
Tabela 5. Resultados do teste de recuperação para exatidão.....	20
Tabela 6. Resultados da robustez.....	21

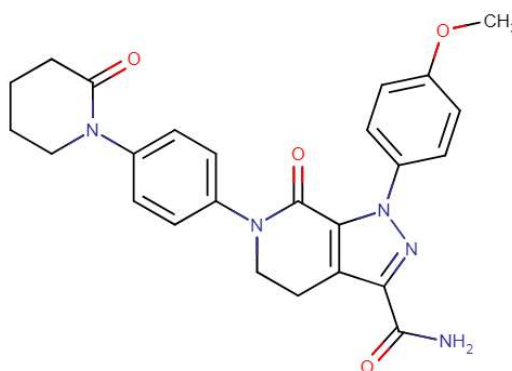
## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	<b>6</b>
<b>2.OBJETIVOS</b> .....	<b>10</b>
2.1.Objetivo Geral .....	10
2.2.Objetivos Específicos .....	10
<b>3.MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>11</b>
3.1.Substância Química de Referência e Medicamento .....	11
3.2. Preparo das Soluções Estoque Amostra e Padrão .....	11
3.3.Placebo .....	11
3.4.Doseamento .....	11
3.5.Solubilidade .....	12
3.6.Escolha do Meio de Dissolução .....	12
3.7.Ensaio de Dissolução .....	12
3.8.Cromatografia Líquida de Alta Eficiência .....	13
3.9.Validação do Método Analítico Aplicado à Dissolução .....	13
3.9.1.Especificidade .....	13
3.9.2.Linearidade .....	13
3.9.3.Precisão .....	13
3.9.4.Exatidão .....	14
3.9.5.Robustez .....	14
<b>4.RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>15</b>
4.1.Peso Médio e Doseamento .....	15
4.2.Solubilidade .....	15
4.3.Definição do Meio e Condições de Dissolução .....	16
4.4.Validação do Método Analítico Aplicado à Dissolução .....	18
4.4.1.Especificidade .....	18
4.4.2.Linearidade .....	18
4.4.3.Precisão .....	19
4.4.4.Exatidão .....	20
4.4.5.Robustez .....	20
<b>5.CONCLUSÕES</b> .....	<b>22</b>
<b>6.REFERÊNCIAS</b> .....	<b>23</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A Apixabana (APX) é um inibidor direto, altamente seletivo e reversível do fator de coagulação X ativado (FXa), cuja atividade não depende da antitrombina para a ação antitrombótica. O fármaco atua inibindo o FXa (livre e ligado) ao coágulo, e também a atividade da protrombinase, impedindo a geração de trombina e a formação do trombo (Kubisz et al., 2017). A APX (Figura 1) é indicada para prevenção de tromboembolismo venoso após artroplastia eletiva de quadril ou joelho, redução do risco de embolia sistêmica e acidente vascular cerebral (AVC) em pacientes com fibrilação atrial não-valvular, tratamento de trombose venosa profunda e prevenção de recorrência de tromboembolismo venoso após a ocorrência de um evento tromboembólico (Song et al., 2016). Foi aprovada pelo *European Medicines Agency* (EMA) e pela Anvisa em 2011, e pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e *Health Canada* em 2012 (EMA, 2011; BRASIL, 2011; FDA, 2012; Health Canada, 2012). Atualmente é vendida com o nome comercial de Eliquis®, na forma de comprimidos revestidos nas dosagens de 2,5 e 5 mg, fabricado por Bristol-Myers Squibb Manufacturing Company, sendo registrado e importado pelos Laboratórios Pfizer Ltda.

Figura 1. Estrutura química da Apixabana (DrugBank, 2018).



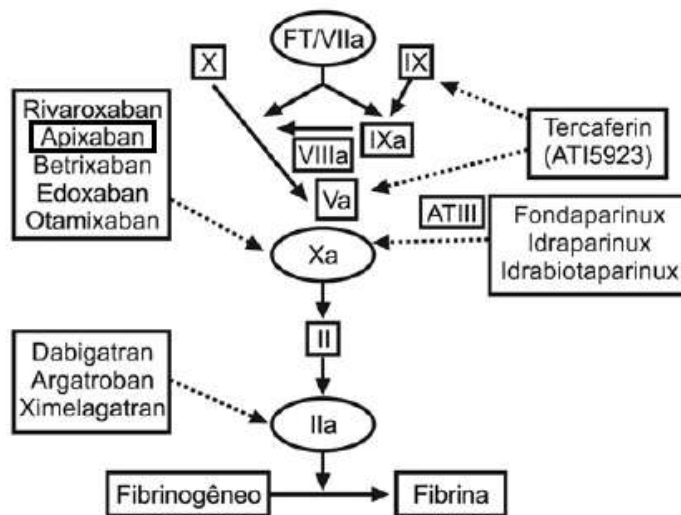
A coagulação do sangue ocorre por ativação proteolítica sequencial de zimogênios, tendo como consequência a formação de trombina que converte o fibrinogênio em sua forma ativa a fibrina. A cascata de coagulação comumente é dividida em duas vias, sendo elas intrínseca e extrínseca, as quais convergem para uma via denominada comum. A via intrínseca é constituída de componentes que usualmente já estão presentes no organismo, porém em sua forma inativa, necessitando ativação para ter atividade. Na via extrínseca encontram-se os elementos do sangue e componentes que não estão usualmente presentes no sistema. A ativação dos fatores VIIIa (sistema intrínseco) e do VIIa (sistema extrínseco)



levam à ativação do fator X em Xa, iniciando a via comum da cascata de coagulação (Ferreira et al., 2010). Os anticoagulantes clássicos como antagonistas da vitamina K e as heparinas atuam de forma indireta na cascata de coagulação. Recentemente, houve o surgimento dos novos anticoagulantes orais, que apresentam como diferencial a ação de forma direta na cascata de coagulação, inibindo o fator Xa, como é o caso da apixabana, rivaroxabana e edoxabana, ou o fator IIa, no caso da dabigatana (Figura 2). Em geral, esses novos medicamentos apresentam como vantagens uma boa biodisponibilidade oral, administração oral em doses fixas, e sem a necessidade de realização de monitoramento (Yoshida, 2016).

A APX possui pKa ácido de 13,12 e básico de -1,60, não ioniza em pH fisiológico, permanecendo em sua forma neutra (DrugBank, 2018). Segundo o sistema de classificação biofarmacêutica (Amidon et al., 1995), a APX é uma molécula de classe III, indicando alta solubilidade e baixa permeabilidade. Apresenta biodisponibilidade oral em torno de 50%, possui dissolução relativamente rápida, com um mínimo de 80% dissolvido no período de 30 minutos, e na faixa pH fisiológico (pH de 1,2 a 6,8) demonstra solubilidade aquosa de aproximadamente 0,04 mg/mL (Byon et al., 2018).

Figura 2. Mecanismo de ação dos anticoagulantes (Flato et al., 2011).



A dissolução é um processo no qual um sólido se dissolve em um solvente ao longo do tempo (Dressman e Krämer, 2009). O ensaio de dissolução visa estudar como ocorre a liberação do fármaco no organismo. Em alguns casos, tem como objetivo reproduzir da forma mais similar possível o que irá acontecer com a forma farmacêutica quando administrada. Logo, é importante levar em consideração diversos fatores que influenciam no processo para

uma escolha adequada dos parâmetros e do método em geral. Durante esse processo de liberação do sólido para o solvente, ocorre a formação de uma espécie de filme líquido denominado “camada estagnante”, ou camada de difusão, a qual tem influência na velocidade de dissolução, sendo que, quanto maior a espessura dessa camada, mais lenta será a dissolução. Ainda, fatores como temperatura e agitação também possuem importância, visto que *in vivo* a temperatura é de 37°C e que a agitação influi sobre a espessura da camada de difusão, além de representar os movimentos peristálticos do trato gastrointestinal (Shargel e Yu, 2016). Outro fator que deve ser levado em consideração é a presença de ar e/ou gases no meio de dissolução, pois esse fator pode ocasionar mudança no movimento das partículas, diminuição da superfície de contato entre o sólido e o meio pela formação de pequenas bolhas na superfície da forma farmacêutica, atuando como uma barreira, e também podem fazer com que as partículas do sólido fiquem aderidas no aparato ou nas cubas, dificultando a dissolução e tendo impacto no resultado final do teste (Marcolongo, 2003; USP, 2013). Da mesma forma, para a realização dos ensaios, deve-se levar em consideração o conceito de condição *sink*, sendo definido como três vezes o volume de saturação dentro de um intervalo de 500 a 1000 mL, uma vez que o mesmo ocorre *in vivo* (Marcolongo, 2003).

O ensaio de dissolução é um recurso substancial, tanto no desenvolvimento e acompanhamento de formulações, quanto para o controle de qualidade e caracterização de correlações *in vitro/in vivo* nos estudos de bioequivalência (Manadas et al., 2002). Para a obtenção de resultados adequados e confiáveis, o método empregado deve ser bem caracterizado e passar por um processo de validação (Shah et al., 2000). Além disso, a validação do método traz a garantia de que o método analítico proposto é apropriado para a sua finalidade. Para isso, existem algumas diretrizes que servem de guia para a realização da validação, como, por exemplo, *United States Pharmacopeia* (USP), *International Conference on Harmonisation* (ICH) e o FDA, geralmente aferindo os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação e robustez, podendo variar dependendo do tipo de método a ser utilizado (Green, 1996). De maneira geral, a validação tem um papel importante em ajudar a garantir a eficácia e a segurança máxima dos medicamentos (Görög, 2007).

Até o presente momento, não foram encontrados na literatura estudos relacionados à avaliação do processo de dissolução de formas farmacêuticas contendo APX, bem como desenvolvimento de métodos analíticos aplicados para essa finalidade. Da mesma forma, o fármaco e as preparações farmacêuticas disponíveis no mercado ainda não dispõem de monografias em compêndios oficiais. Tendo em vista a relevância da investigação dos fatores

que influenciam no processo de liberação desta substância ativa e consequente processo de dissolução, bem como a inequívoca contribuição para o controle de qualidade das preparações contendo esse ativo farmacêutico, o presente trabalho visa à proposição de um método de dissolução adequado para avaliação deste importante parâmetro de qualidade.

Por esses motivos, justifica-se a elaboração deste trabalho.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método de dissolução para APX na forma de comprimidos revestidos.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a solubilidade do fármaco em água e no meio de dissolução proposto;
- Determinação do teor dos comprimidos em estudo;
- Desenvolvimento de um método simples e exequível;
- Validação do método, conforme as guias oficiais.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA E MEDICAMENTO**

A substância química de referência (SQR) foi adquirida do laboratório Carbosynth (Reino Unido) com grau de pureza superior a 99,00%.

O medicamento Eliquis® foi adquirido no comércio local, no formato de comprimidos revestidos de 5 mg de apixabana (APX).

#### **3.2. PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE AMOSTRA E PADRÃO**

Para avaliação do teor foram pesados comprimidos de APX e calculado o peso médio. Os comprimidos pesados foram colocados em um gral, triturados e homogeneizados com o auxílio de um pistilo, resultando em um pó homogêneo. A partir deste pó, foi preparada uma solução amostra, a qual foi dispersa em metanol, deixada no ultrassom por 15 minutos, filtrada e armazenada em frasco âmbar, resultando em uma concentração de 500 µg/mL de APX.

A mesma diluição foi realizada para o preparo da solução SQR, obtendo-se uma solução final, também, na concentração de 500 µg/mL.

#### **3.3. PLACEBO**

Foi feita uma mistura de excipientes, os quais estão contidos na formulação, segundo a bula, sendo eles: celulose microcristalina, croscarmelose sódica, lactose, laurilsulfato de sódio, estearato de magnésio, hipromelose, dióxido de titânio e óxido férrico vermelho. Para a escolha da quantidade de cada um dos adjuvantes, foram utilizados dados contidos no Handbook of Pharmaceutical Excipients (Rowe e Sheskey, 2009) e também na patente do produto (PCT, 2011), buscando obter uma proporção mais próxima da encontrada nos comprimidos. Depois da definição das quantidades, os excipientes foram pesados individualmente e homogeneizados a fim de formar o placebo.

#### **3.4. DOSEAMENTO**

A partir do homogeneizado de comprimidos preparado anteriormente, pesou-se a quantidade necessária para a preparação de seis amostras independentes cujo preparo foi o mesmo executado para a solução amostra, citada anteriormente. Obtiveram-se seis soluções com concentração de 200 µg/mL, as quais foram diluídas com fase móvel resultando em uma

concentração final de 10 µg/mL. Da mesma forma, preparou-se uma solução padrão, a partir da SQR, tendo uma concentração final de 10 µg/mL. Em seguida, foram analisadas no CLAE.

### 3.5. SOLUBILIDADE

Para a determinação da solubilidade da APX SQR foram adicionados 5 mL de meio (HCL 0,01M e água) em três tubos de rosca e acrescentado, a cada um, a quantidade suficiente para formação de precipitado. A suspensão foi mantida sob agitação por 24 horas em banho com temperatura de 37 °C. Após esse período, as amostras foram filtradas e analisadas em CLAE para determinação da concentração de saturação do fármaco.

### 3.6. ESCOLHA DO MEIO DE DISSOLUÇÃO

Testes preliminares foram realizados para a escolha do meio de dissolução. Inicialmente, selecionaram-se meios de dissolução tradicionais como acetato de amônio 50mM e 25mM, fosfato de sódio 50mM e 25mM, HCl 0,1M e 0,01M e água. Do mesmo modo, testou-se citrato de sódio 50mM. Além desses, avaliou-se a adição de tensoativo, dodecil sulfato de sódio (SDS), nas concentrações de 0,5 e 0,01%, juntamente com os meios acetato de amônio 25mM, fosfato de sódio 25mM e HCl 0,1M e 0,01M.

Foram adicionadas quantidades equivalentes a 1 mg da amostra de APX em 100 mL de diferentes meios, que foram mantidos sob agitação e aquecimento (37 °C ) durante 50 minutos e, posteriormente, analisados.

### 3.7. ENSAIO DE DISSOLUÇÃO

O ensaio de dissolução foi realizado no equipamento dissolutor Varian® VK 7010 (Vankel, Estados Unidos), nas condições apresentadas na Tabela 1, no intervalo total de 1 hora e 30 minutos, e realização de coletas nos tempos: 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 90 minutos.

**Tabela1. Condições utilizadas no ensaio de dissolução.**

<b>Meio de dissolução</b>	HCl 0,01M
<b>Aparato</b>	Pá
<b>Velocidade</b>	75 rpm
<b>Volume</b>	500 mL
<b>Filtro</b>	35 µm
<b>Temperatura</b>	37°C

Para preparação do meio de dissolução, foi utilizada água ultrapura purificada através do sistema de purificação Milli-Q® (Millipore, Estados Unidos) e ácido clorídrico (HCl) P.A. 37% da empresa Neon Comercial para obtenção de uma solução de HCl com concentração

final de 0,01 M. Antes da utilização do meio, o mesmo foi submetido a preaquecimento em microondas por 1 minuto e meio e desaerado em banho de ultrassom durante 20 minutos.

### 3.8. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Posteriormente ao ensaio de dissolução, foi realizada a análise quantitativa das amostras, e para tal, utilizou-se a técnica de CLAE no cromatógrafo Shimadzu® LC-20A Prominence CLAE-DAD com coluna Inertsil® CN-3 (150 x 4,6 mm; 5,0 µm), com um método previamente validado (Ellwanger, 2018), e as condições utilizadas estão apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2. Condições cromatográficas utilizadas.**

<b>Fase móvel</b>	Metanol:Água (50:50)
<b>Fluxo</b>	1,0 mL/min
<b>Temperatura</b>	30°C
<b>Volume de injeção</b>	20 µL
<b>Tempo de análise</b>	5 min

### 3.9. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO APLICADO À DISSOLUÇÃO

Procedeu-se a validação do método conforme as especificações contidas nas guias oficiais e legislação vigente, abrangendo os seguintes parâmetros analíticos: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez (ICH, 2010; BRASIL, 2010).

#### 3.9.1. Especificidade

A avaliação da especificidade foi realizada a partir da adição de uma mistura dos excipientes, presentes no comprimido, a duas cubas contendo 500 mL de meio. Após 1 hora e meia de dissolução, as alíquotas foram retiradas e submetidas à determinação analítica por CLAE.

#### 3.9.2. Linearidade

A linearidade foi avaliada a partir da realização de três curvas padrão, obtidas a partir da solução estoque de SQR, em sete níveis diferentes de concentração, em intervalo compreendido entre 1,0 a 15 µg/mL.

#### 3.9.3. Precisão

A precisão foi realizada a partir de três ensaios de dissolução, contemplando seis cubas cada, durante três dias distintos. Foi avaliada a repetibilidade do perfil de dissolução em todos

os tempos de coleta, considerando as seis cubas, e também, a precisão a intermediária, considerando os três dias de ensaio, totalizando dezoito cubas.

#### **3.9.4. Exatidão**

A exatidão foi determinada através do teste de recuperação, onde foi adicionada sequencialmente às cubas, contendo meio de dissolução, a mistura de excipientes e a solução estoque SQR em três diferentes níveis: baixo (8 µg/mL), médio (10 µg/mL) e alto (12 µg/mL). Para avaliação de cada nível, foram utilizadas duas cubas de dissolução.

#### **3.9.5. Robustez**

A robustez foi estabelecida por meio de pequenas alterações no método, sendo elas: utilização de meio sem desaeração e filtro com porosidade de 70 µm. Foram utilizadas duas cubas para cada modificação, as quais foram posteriormente analisadas para verificar se iriam promover alguma alteração significativa nos resultados.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. PESO MÉDIO E DOSEAMENTO

O peso médio dos comprimidos foi de 208,56 mg, sendo 205,20 mg e 210,00 mg o menor e o maior valor encontrados, respectivamente. Segundo a Farmacopeia Brasileira 5ª Ed. (BRASIL, 2010), é aceito um limite de variação de  $\pm 7,5\%$  para comprimidos que apresentem peso médio acima de 80 mg e abaixo de 250 mg, logo, o que indica que os valores encontrados para os comprimidos de APX apresentam-se dentro do estipulado pelo guia farmacopeico. O doseamento foi realizado com o objetivo de determinar o teor de fármaco contido nos comprimidos. Obteve-se um teor de 103,33% com DPR de 1,01%, sendo considerado adequado, tendo em vista que esse fármaco não possui monografia, e que o valor obtido encontra-se dentro do intervalo usualmente estipulado pelos compêndios oficiais (90 a 110%).

### 4.2. SOLUBILIDADE

O estudo de solubilidade teve como objetivo determinar a concentração de saturação do fármaco em meio aquoso (HCL 0,01M e água ultrapura), e então, definir se estaríamos ou não trabalhando em condição *sink*. Para água, o fármaco apresentou uma solubilidade de 49,96  $\mu\text{g/mL}$ , o que condiz com o encontrado na literatura, que é de aproximadamente 40,00  $\mu\text{g/mL}$ . Quanto a solubilidade em HCl 0,01M, o valor encontrado foi de 40,66  $\mu\text{g/mL}$ . Apesar de a APX ser classificada como uma molécula de classe III no sistema de classificação biofarmacêutica, que significaria ter alta solubilidade e baixa permeabilidade, não foi observada alta solubilidade, tanto nos dados encontrados literatura, quanto nos resultados obtidos nesse estudo. Segundo a classificação dos termos descritivos de solubilidade da Farmacopeia Brasileira 5ª Ed. (BRASIL, 2010), a APX seria considerada como uma substância praticamente insolúvel. Além disso, também deve-se levar em consideração que um dos excipientes presentes na formulação é o laurilsulfato de sódio, um tensoativo, que possui como função promover um aumento na solubilidade, o que seria mais um indicativo de que a APX não possui uma solubilidade tão elevada.

Durante o ensaio de dissolução, a concentração máxima obtida nas cubas é de 10  $\mu\text{g/mL}$ , visto que é utilizado um volume de 500 mL para a dissolução de um fármaco com dose de 5 mg. Logo, podemos concluir que a concentração de saturação do fármaco no meio de dissolução é cerca de quatro vezes maior do que a concentração máxima atingida durante a

realização dos ensaios, o que, segundo a literatura, nos indica estar em condição *sink*, conforme o desejado.

#### 4.3. DEFINIÇÃO DO MEIO E CONDIÇÕES DE DISSOLUÇÃO

Para escolha do meio de dissolução, foram testadas diversas alternativas disponíveis na literatura. Inicialmente, avaliou-se não só o comportamento do fármaco no meio, mas também se o meio se adequava ao método analítico a ser utilizado, ou seja, sem ocasionar interferências que prejudicassem a quantificação da APX. Em seguida, foram realizados ensaios de dissolução com os meios definidos de acordo com os resultados da primeira etapa. Os cinco meios selecionados foram: fosfato de sódio 0,025M (pH= 6,86); acetato de amônio 0,025M (pH= 6,41); fosfato de sódio 0,025M + SDS 0,01% (pH= 6,74); HCl 0,01M (pH= 2,32); H<sub>2</sub>O ultrapura (pH= 6,93). Abaixo está apresentado o gráfico (Figura 3) com o perfil de dissolução de cada um dos cinco meios. Os testes com tampão fosfato e acetato demonstraram uma variação entre cubas superior às testadas com os outros meios. No caso do tampão fosfato com SDS, o intuito da adição do tensoativo foi de aumentar a solubilidade do fármaco no meio, proporcionando uma dissolução mais rápida. Entretanto, o mesmo não apresentou diferença significativa no tempo de dissolução em comparação com os outros meios, incluindo fosfato sem o tensoativo. Na Tabela 3 pode-se observar a média do percentual de dissolução obtido em cada meio e seus respectivos DPR's. Dentre cinco meios testados, dois deles apresentaram os resultados considerados satisfatórios: HCl 0,01M e a H<sub>2</sub>O ultrapura. Ambos demonstraram taxas de dissolução mais homogêneas entre as cubas e um percentual de dissolução adequado. O meio de dissolução escolhido foi o HCl 0,01M pelo fato de que a H<sub>2</sub>O ultrapura possui uma maior variação de pH, não permitindo se ter um controle adequado sobre esse parâmetro. Outro fator preponderante na escolha do HCl 0,01M como meio de dissolução está relacionado a sua maior representatividade e similaridade às condições *in vivo* a que o medicamento é exposto, visto que o mesmo é de liberação imediata, tendo sua desintegração e dissolução no estômago.

Quanto ao aparato, para as formas farmacêuticas de comprimidos, os dois aparatos indicados são o aparato 1 (cesta) e o aparato 2 (pá), sendo o aparato 2 mais comumente utilizado e o escolhido para o método em estudo. Em relação à velocidade de dissolução, primeiramente foi testada a velocidade de 50 rpm, porém verificou-se que a mesma não gerava um percentual de fármaco dissolvido completo para um ensaio com tempo total de 90 minutos. Igualmente, foi testada a velocidade de 75 rpm, pois encontra-se dentro das velocidades preconizadas pelas guias normativas. A utilização da velocidade de agitação de

75 rpm permitiu a obtenção de percentual de dissolução próximo a 100% no intervalo total de tempo de ensaio, bem como a manutenção de um perfil de dissolução gradual, como demonstrado na Figura 4.

Figura 3. Perfis de dissolução de APX nos meios testados.

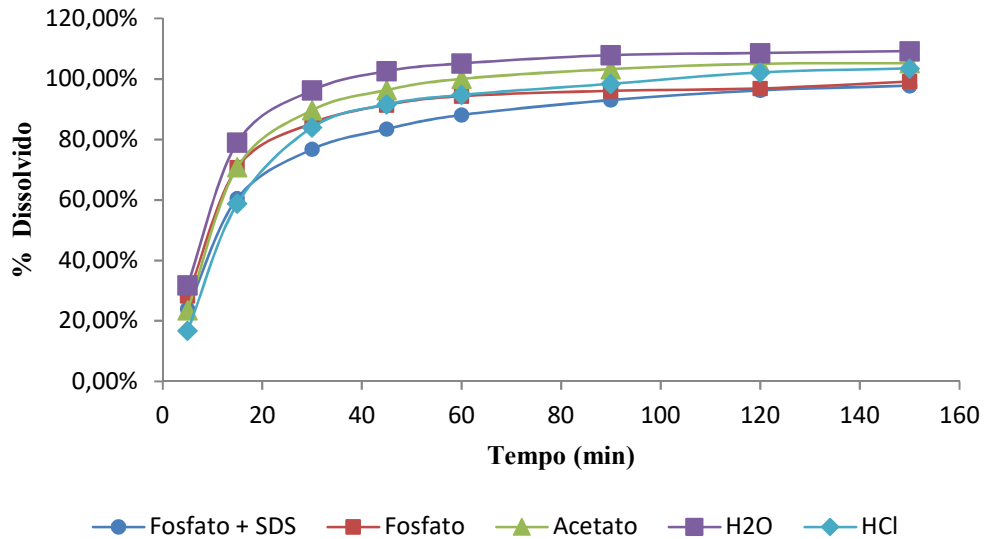
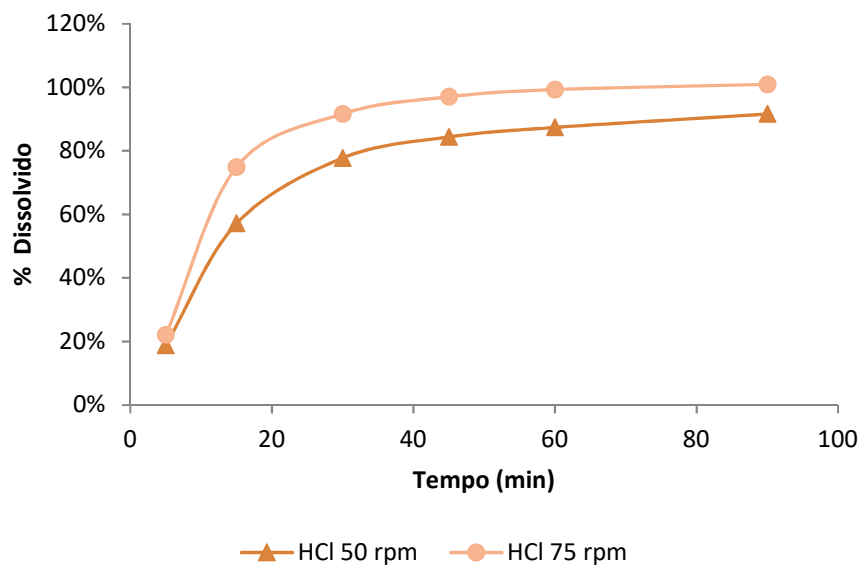


Tabela 3. Comparação entre os meios de dissolução testados.

Meio de dissolução	% Dissolvido	DPR (%)
Água ultrapura	102,59	0,77
HCl 0,01M	101,06	1,46
Acetato de amônio 25 mM	100,07	3,75
Fosfato de sódio 25 mM	99,20	3,39
Fosfato de sódio 25 mM + SDS 0,01%	97,81	1,05

Figura 4. Perfis de dissolução de APX nas velocidades de 50 e 75 rpm.

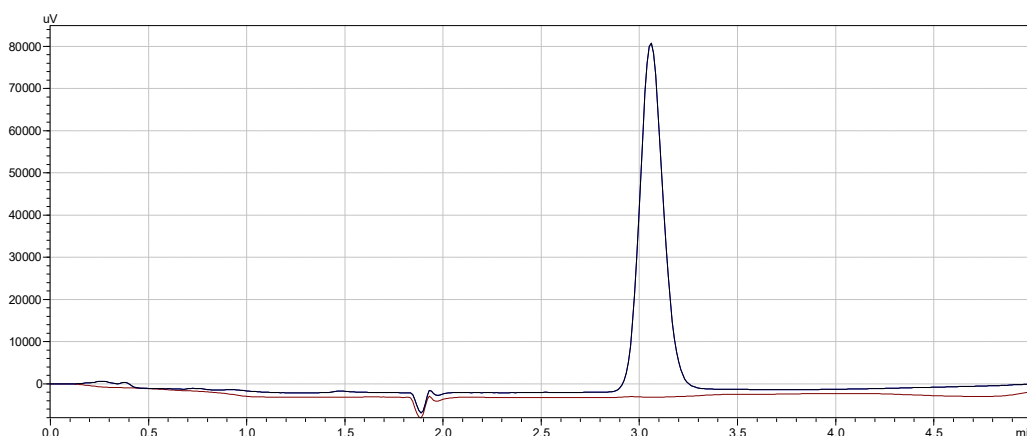


#### 4.4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO APLICADO À DISSOLUÇÃO

##### 4.4.1. Especificidade

A especificidade buscou avaliar se algum dos compostos presentes na formulação ou no meio de dissolução apresentavam algum sinal ou interferência significativa que acarretasse prejuízo à quantificação do analito. As amostras contendo apenas a mistura de excipientes foram submetidas ao ensaio de dissolução, e, após sua análise, comprovou-se que as mesmas não apresentam nenhuma interferência analítica (Figura 5).

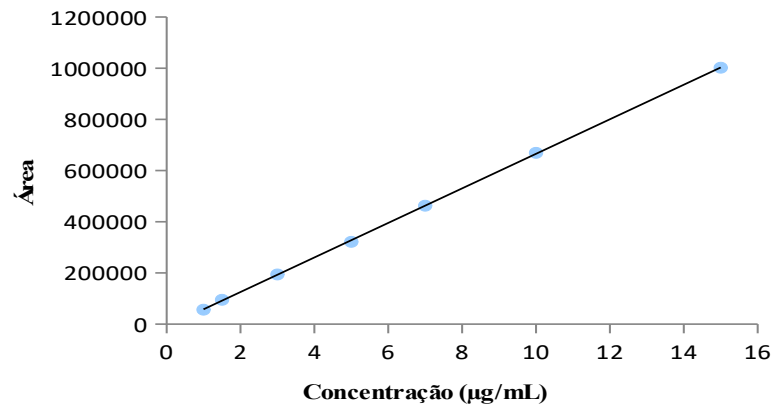
**Figura 5. Cromatograma da APX SQR x análise do placebo.**



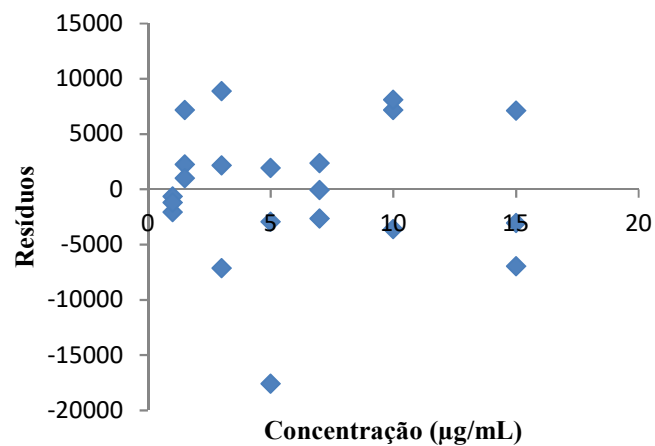
##### 4.4.2. Linearidade

Os resultados obtidos através das três curvas padrão estudadas foram plotados e obteve-se a seguinte equação de reta:  $y = 67518x - 9982$ , obtida pelo método dos mínimos quadrados. O coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,99995 e, conforme a RDC 166/2017, o coeficiente de correlação deve estar acima de 0,990. O valor de coeficiente de correlação encontrado demonstrou ser compatível com a normativa da agência regulatória nacional. A regressão linear também foi avaliada pela ANOVA, obtendo-se valor de  $F = 50034,83$ , entre as concentrações da curva padrão, confirmando que os valores obtidos correspondem a uma regressão linear ( $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ ,  $p < 0,05$ ), confirmando, por conseguinte, a linearidade do método. Além disso, também foi realizada a análise dos resíduos (Figura 6), na qual pode-se perceber a aleatoriedade dos resultados, sem nenhuma tendência, demonstrando homocedasticidade. Abaixo estão apresentados os gráficos da média das curvas padrão (Figura 7).

**Figura 6. Curva padrão de APX obtida.**



**Figura 7. Gráfico da análise de resíduos.**



#### 4.4.3. Precisão

A repetibilidade (intra-dia) e a precisão intermediária (inter-dia) foram avaliadas a partir dos valores de DPR. Segundo a RDC 31/2010, os valores de DPR nos pontos de coleta de 5 e 10 minutos devem estar abaixo de 20%, enquanto que para os demais pontos de coleta o valor de DPR deve ser inferior a 10%. Conforme observado, todos os valores encontram-se dentro da faixa estipulada (Tabela 4), demonstrando a precisão do método. Na Figura 8 está demonstrado o perfil de dissolução obtido através da precisão inter-dia.

Figura 8. Perfil de dissolução na precisão inter-dia.

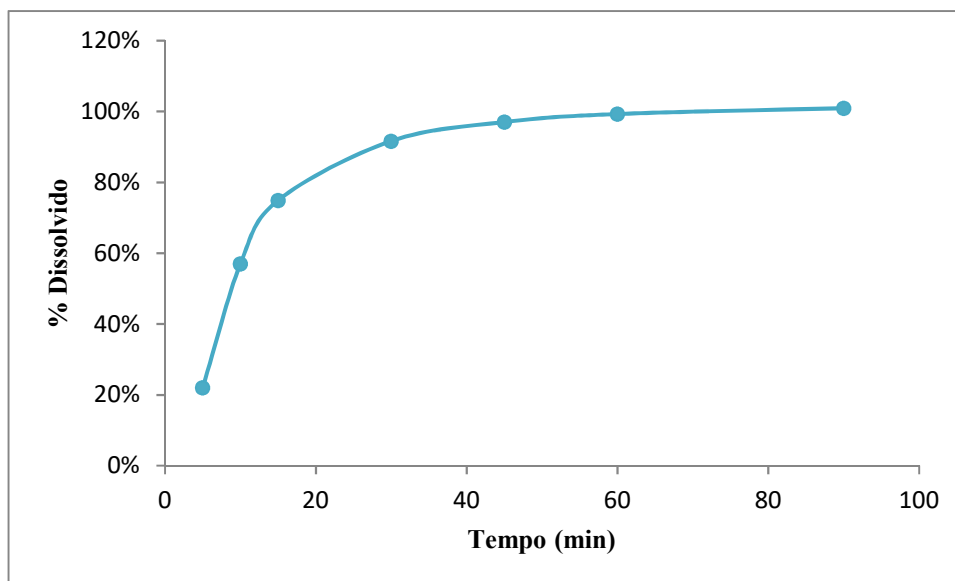


Tabela 4. Resultados da precisão intra-dia e inter-dia.

INTRA		5	10	15	30	45	60	90
DIA 1	MÉDIA (%)	21,45	56,34	75,30	92,02	97,24	99,43	101,13
	DPR (%)	12,83	7,76	2,12	0,64	0,96	1,03	1,12
DIA 2	MÉDIA (%)	23,05	58,36	75,77	92,12	97,35	99,62	101,20
	DPR (%)	14,27	6,43	2,09	1,01	1,12	1,17	1,14
DIA 3	MÉDIA (%)	21,70	56,32	73,74	90,87	96,50	98,86	100,51
	DPR (%)	9,82	5,25	2,09	0,63	0,72	0,79	0,83
INTERDIA		5	10	15	30	45	60	90
MÉDIA (%)		22,06	57,01	74,94	91,67	97,03	99,30	100,95
DPR (%)		12,22	6,40	2,30	0,97	0,98	1,01	1,03

#### 4.4.4. Exatidão

No teste de recuperação, o esperado é que os valores encontrados fiquem na faixa de 95-105% (USP, 2013). Na Tabela 5, estão apresentados os valores de recuperação para cada um dos níveis estudados, sendo que o maior e o menor valor encontrado foram 98,17 e 100,87%, respectivamente, confirmando a exatidão do método.

Tabela 5. Resultados do teste de recuperação para exatidão.

Nível	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recuperação (%)
Baixo - 8 $\mu\text{g/mL}$	7,97	99,46
Médio - 10 $\mu\text{g/mL}$	10,11	100,87
Alto - 12 $\mu\text{g/mL}$	11,80	98,17

#### 4.4.5. Robustez

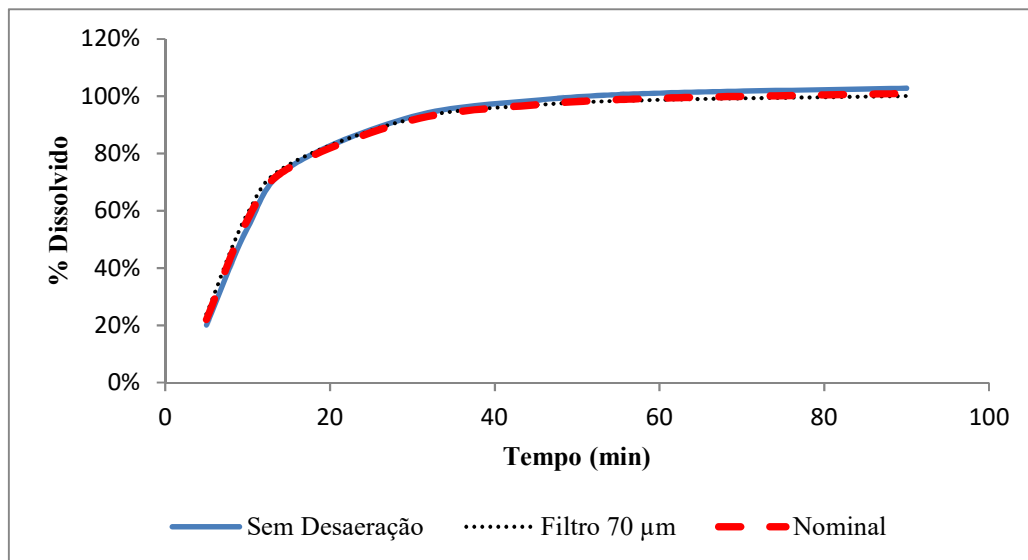
No que se refere à robustez, o esperado era que nenhuma das modificações realizadas, como a não realização do processo de desaeração e o aumento da porosidade dos filtros de 35 para 70  $\mu\text{m}$ , provocasse alteração significativa nos resultados. Os resultados obtidos para as duas modificações estão apresentados na Tabela 6. Conforme é possível perceber na Tabela 5,

a comparação entre os valores obtidos nas condições alteradas e nominal apresentam valores de média de percentual bastante próximos, indicativo de que as alterações propositalmente realizadas não afetaram o processo de dissolução. Da mesma forma, a Figura 8 corrobora com estes resultados, através da sobreposição total dos perfis de dissolução nas diferentes condições, demonstrando a ausência de efeito das alterações realizadas em relação ao percentual médio de dissolução.

**Tabela 6. Resultados da robustez.**

	<b>Média (%)</b>	<b>DPR (%)</b>
Sem Desaeração	102,79	1,33
Filtro 70 $\mu\text{m}$	100,06	1,10
Condição Nominal	100,95	1,03

**Figura 9. Perfis de dissolução da APX no teste de robustez.**



## 5. CONCLUSÕES

O presente trabalho objetivou desenvolver e validar um método de dissolução para APX na forma de comprimidos revestidos. Ao longo do trabalho, foram avaliadas diversas condições até chegar a que demonstrasse ser mais adequada para esta finalidade.

O método estabelecido apresenta as seguintes condições: meio de dissolução HCl 0,01M, com agitação de 75 rpm, temperatura de 37°C, filtros com porosidade de 35 µm, tempo total de 90 minutos de ensaio e quantificação por CLAE.

A validação foi realizada conforme o preconizado nas guias oficiais, e abrangeu os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, estando todos os resultados encontrados em conformidade com os parâmetros de validação preconizados.

Pode-se concluir que os objetivos apresentados foram alcançados, pois o método proposto demonstrou ser adequado, exequível, confiável, apresentando um perfil de dissolução gradual que favoreceria a detecção de potenciais problemas formulativos e de processo produtivo no desempenho de dissolução do produto, constituindo contribuição relevante para futura monografia do fármaco em sua especialidade farmacêutica e para controle de qualidade e desenvolvimento de novos produtos contendo este fármaco.



## 6. REFERÊNCIAS

AMIDON, GL; LENNERNÄS, H; SHAH, VP; CRISON, JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution an in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, Vol 12, n 3, 1995.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Registro Eliquis (2011). Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/q/?nomeProduto=eliquis>>. Acessado em: 22 de novembro de 2018.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Guia de dissolução aplicável a medicamentos genéricos, novos e similares (2018). Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3364628/Proposta+de+Guia+de+Dissolu%C3%A7%C3%A3o+-+06.04.2018.pdf/c15476e5-82aa-402f-aa95-24bf246dccc0?version=1.0>>. Acessado em: 11 de outubro de 2018.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Farmacopéia Brasileira. 5ª ed. Brasília, 2010.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. RDC 166/2017 de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC\\_166\\_2017\\_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401)>. Acessado em: 20 de outubro de 2018.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. RDC 31/2010 de 11 de agosto de 2010. Dispõe sobre a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0031\\_11\\_08\\_2010.pdf/5e157d15-d3d5-4bb9-98db-5667e4d9e0c8](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0031_11_08_2010.pdf/5e157d15-d3d5-4bb9-98db-5667e4d9e0c8)>. Acessado em: 24 de outubro de 2018.

BYON, W.; NEPAL, S.; SCHUSTER, A.E.; SHENKER, A.; FROST, C.E. Regional Gastrointestinal Absorption of Apixaban in Healthy Subjects. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v.58, n.7, 2018, p.965–971.

DRESSMAN, J.; KRÄMER, J. Historical Development of Dissolution Testing. In: KRÄMER, J; GRADY, T.; GAJENDRAN, J.(Ed). **Pharmaceutical Dissolution Testing**. New York: Informa Healthcare, 2009. p.1.

DRUGBANK - Apixaban Structure. Disponível em: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB06605>>. Acessado em: 15 de novembro de 2018.

ELLWANGER, J.B. **Desenvolvimento de metodologia analítica para avaliação de apixabana e suas impurezas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

EMEA - **European Medicines Agency**. Science Medicines Health. Apixaban (2011). Disponível em: <[https://www.ema.europa.eu/documents/overview/eliquis-epar-summary-public\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/overview/eliquis-epar-summary-public_en.pdf)>. Acesso em: 20 de novembro de 2018.

FDA – **Food and Drug Administration**. FDA Approved Drug Products – Apixaban (2012) Disponível em: <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm>>. Acessado em: 20 de novembro de 2018.

FDA – **Food and Drug Administration**. Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms (1997). Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070237.pdf>>. Acessado em: 18 de outubro de 2018.

FERREIRA, C.N.; SOUSA, M.O.; DUSSE, L.M.S.; CARVALHO, M.G. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.32, n.5, p.416–421, 2010.

FLATO, U. A. P.; BUHATEM, T.; MERLUZZI, T.; BIANCO, A.C.M. Novos anticoagulantes em cuidados intensivos. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.23, n.1, p.68–77, 2011.

GÖRÖG, S. The changing face of pharmaceutical analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.26,n.1, p. 12-17, 2007.

GREEN, J.M. Peer Reviewed: A Practical Guide to Analytical Method Validation. **Analytical Chemistry**, v.68, n.9, p. 305A-309A, 1996.

ICH. **International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**. ICH Q4B Annex 7R2 Evaluation and recommendation of pharmacopoeial texts for use in the ICH regions on dissolution test general chapter, 2010.

HEALTH CANADA - Summary Basis of Decision Eliquis (2012). Disponível em: <[http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt\\_formats/pdf/prodpharma/sbd-smd/drug-med/sbd\\_smd\\_2012\\_eliquis\\_141873-eng.pdf](http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt_formats/pdf/prodpharma/sbd-smd/drug-med/sbd_smd_2012_eliquis_141873-eng.pdf)>. Acesso em: 22 de novembro de 2018.

KUBISZ, P.; STANCIAKOVA, L.; DOBROTOVA, M.; SAMOS, M.; MOKAN, M.; SATASKO, J. Apixaban - Metabolism, Pharmacologic Properties and Drug Interactions. **Current Drug Metabolism**, v. 18, n.7, p.609-621, 2017.

MANADAS, R.; PINA, M.E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.4, p. 375-399, 2002.

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

PCT. **International Application Published Under the Patent Cooperation Treaty**. Apixaban, 2011. Disponível em: <<https://patentimages.storage.googleapis.com/e4/b2/f3/b1f8921710fa6a/WO2011106478A2.pdf>> Acessado em: 14 de outubro de 2018.

PFIZER – Bula Eliquis. Disponível em:  
<[https://www.pfizer.com.br/sites/g/files/g10044511/f/product\\_attachments/Eliquis.pdf](https://www.pfizer.com.br/sites/g/files/g10044511/f/product_attachments/Eliquis.pdf)>.  
Acessado em: 2 de novembro de 2018.

ROWE, R. C., SHESKEY, P. J., Quinn, M. E., **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, 6<sup>th</sup> ed Pharmaceutical Press, Berlin, Germany, 2009.

SHAH, V.P.; MIDHA, K.K.; FINDLAY J.W.A.; HILL, H.M.; HULSE, J.D.; MCGILVERAY, I.J. et al. Bioanalytical Method Validation – A Revisit with a Decade of Progress. **Pharmaceutical Research**, v.17, n.12, p.1551-1557, 2000.

SHARGEL, L.; YU, A.B.C. **Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics**.7 ed. Mc Graw-Hill, 2016.

SONG, Y.; CHANG, M.; SUZUKI, A.; FROST, R. J. A.; KELLY, A.; LACRETA, F.; FROST, C. Evaluation of Crushed Tablet for Oral Administration and the Effect of Food on Apixaban Pharmacokinetics in Healthy Adults. **Clinical Therapeutics**, v.38, n.7, p.1674–1685, 2016.

USP 36. **The United States Pharmacopeia**. 36 Ed. Rockville: United States Pharmacopeia Convention, 2013.

YOSHIDA, B.W. Anticoagulantes orais diretos no tratamento do tromboembolismo venoso em pacientes com câncer. **Jornal Vascular Brasileiro**, v.15, n.4, p.263-264, 2016.