

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE
METODOLOGIA ANALÍTICA PARA AVALIAÇÃO DE
ALISQUIRENO EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Micheli Wrasse Sangoi

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA PARA AVALIAÇÃO DE ALISQUIRENO EM
FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA**

por

Micheli Wrasse Sangoi

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Clarice Madalena Bueno Rolim

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA PARA AVALIAÇÃO DE ALISQUIRENO EM
FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA**

elaborada por
Micheli Wrasse Sangoi

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Clarice Madalena Bueno Rolim, Dra.
(Presidente/Orientadora)

Eliane Maria Donato, Dra. (PUC-RS)

Sérgio Luiz Dalmora, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 13 de agosto de 2010.

*“Sê forte e corajoso; não temas, nem te
espantes, porque o Senhor, teu Deus, é contigo
por onde quer que andares.”*

Josué 1.9

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida.

Ao meu esposo Maximiliano, pelo amor, carinho, incentivo, compreensão e auxílio, fundamental para a conclusão de mais esta etapa.

Aos meus pais, Darci e Rosane, ao meu irmão Tiago, pelo amor, educação, carinho e dedicação fundamentais para cada conquista que tive.

Aos meus sogros Renato e Claudeti, aos meus cunhados Renata e Pablo, pelo apoio, incentivo e por me acolherem com amor.

À Professora Dra. Clarice Rolim, pela amizade, orientação, estímulo e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Dr. Sérgio Dalmora pela oportunidade de ter iniciado minha vida profissional nesta instituição.

Aos bolsistas do Laboratório de Controle de Qualidade Microbiológico, em especial ao Leonardo, pelo auxílio e amizade. À Rosecler, Carmen e Isabel pela amizade, compreensão, motivação e auxílio.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Farmácia Industrial.

À UFSM, que possibilitou a execução deste trabalho.

Ao colega Paulo Renato de Oliveira, da Universidade Federal de Santa Catarina, pela colaboração.

Às minhas amigas da Igreja Batista Nacional, pela amizade, amor, companhia, compreensão, momentos de lazer e comunhão com Deus.

A todos que, mesmo não citados, contribuíram de alguma maneira para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA AVALIAÇÃO DE ALISQUIRENO EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA

AUTORA: MICHELI WRASSE SANGOI

ORIENTADORA: CLARICE MADALENA BUENO ROLIM

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 13 de agosto de 2010.

O alisquireno é o primeiro representante de uma nova classe de inibidores da renina, de baixo peso molecular e ativo por via oral, sendo utilizado clinicamente em um novo e eficaz tratamento para a hipertensão arterial (HA). No presente trabalho, foram desenvolvidos e validados métodos para avaliação de alisquireno em produtos farmacêuticos. Submeteram-se os produtos aos testes físico-químicos, mostrando que cumprem as especificações. As análises por cromatografia líquida em fase reversa foram realizadas utilizando coluna Waters XBridge (150 mm x 4,6 mm d. i.), mantida à 25 °C. A fase móvel foi composta de acetonitrila/ água (95:5, v/v)/ ácido fosfórico 25 mM pH 3,0 (40:60, v/v), eluída na vazão de 1 mL/min e detecção no ultravioleta a 229 nm. A separação cromatográfica foi obtida no tempo de 3,68 minutos. Paralelamente, desenvolveu-se e validou-se método por espectrofotometria no ultravioleta (UV) em 279 nm, utilizando água como diluente. Os procedimentos foram validados, avaliando-se os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e limite de detecção e quantificação, cujos resultados cumpriram os requisitos preconizados. Os métodos propostos foram aplicados na análise de produtos farmacêuticos, demonstrando correlação significativa dos resultados ($P > 0,05$). Desenvolveu-se método de dissolução do fármaco, utilizando como meio 900 mL de ácido clorídrico 0,1 M mantido a $37 \pm 0,5$ °C, aparato pá, rotação de 50 rpm e quantificação por espectrofotometria no UV. Desse modo, estabeleceram-se procedimentos que podem ser aplicados para aprimorar o controle da qualidade de medicamentos, bem como contribuir para garantir a segurança e eficácia no uso terapêutico.

Palavras-chave: alisquireno; cromatografia líquida; espectrofotometria; validação; dissolução.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHODOLOGY FOR THE EVALUATION OF ALISKIREN IN PHARMACEUTICAL FORMULATION

AUTHOR: MICHELI WRASSE SANGOI

ADVISER: CLARICE MADALENA BUENO ROLIM

Presentation date: Santa Maria, August 13th 2010.

Aliskiren is the first representative of a new class of drugs, the low molecular weight renin inhibitors, orally active and clinically used in a new effective treatment for hypertension. In the present study, the methods were developed and validated for assessment of aliskiren in pharmaceutical products. Aliskiren samples were also submitted to the physicochemical tests, meeting the specifications. The analysis by reversed-phase liquid chromatography were performed using Waters XBridge (150 mm x 4.6 mm i. d.), maintained at 25 °C. The mobile phase was consisted of acetonitrile/ water (95:5, v/v)/ 25 mM phosphoric acid pH 3.0 (40:60, v/v), run at flow rate of 1 mL/min and using UV detection at 229 nm. The chromatographic separation was obtained within 3.68 minutes. The spectrophotometric method was also developed and validated, and the aliskiren can be quantified at 279 nm, using water as diluent. The procedures were validated evaluating parameters such as the specificity, linearity, precision, accuracy, limits of detection and quantitation, and robustness, giving results within the acceptable range. The proposed methods were applied for the analysis of pharmaceutical products, showing significant correlation ($P > 0.05$) of the results. The dissolution test was developed using 900 mL of 0.1 M of chloridric acid 37 ± 0.5 °C as dissolution medium, apparatus paddle at a stirring rate of 50 rpm and quantitation by spectrophotometric method. Therefore, the procedures can be applied to improve the quality control of pharmaceutical products and to assure the safety and therapeutic efficacy of the drug.

Keywords: aliskiren; liquid chromatography; spectrophotometry; validation; dissolution.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Representação esquemática do sistema renina-angiotensina e os locais de ação do inibidor da renina, alisquireno, e de outros agentes anti-hipertensivos. BB, betabloqueadores; BRA, bloqueadores do receptor da angiotensina; ECA, enzima conversora da angiotensina; IECA, inibidores da ECA – Adaptado de Chaplin & Sever, 2008.....	20
FIGURA 2 – Estrutura química do alisquireno	25

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 4.1

FIGURE 1 – Chemical structure of aliskiren hemifumarate	34
FIGURE 2 – RP-LC chromatograms of aliskiren (100 µg/mL). (a) Aliskiren reference solution, and after: (b) neutral heated hydrolysis; (c) basic hydrolysis; (d) acidic hydrolysis; (e) oxidation; and (f) exposition to UV light. Peak 1: fumarate; 2: aliskiren; 3: degraded products. Chromatographic conditions: Waters XBridge C ₁₈ column (150 x 4.6 mm i.d., 5 µm), 25 °C; mobile phase: acetonitrile:water (95:5, v/v)/phosphoric acid (25 mM, pH 3.0) (40:60, v/v); flow rate: 1.0 mL/min; detection: 229 nm.....	41
FIGURE 3 – RP-LC chromatograms of (a) blank; (b) in-house mixture of the tablet excipients; (c) fumaric acid solution; and (d) aliskiren in pharmaceutical formulation solution (100 µg/mL). Peak 1: fumarate; 2: aliskiren. Chromatographic conditions: Waters XBridge C ₁₈ column (150 x 4.6 mm i.d., 5 µm), 25 °C; mobile phase: acetonitrile:water (95:5, v/v)/phosphoric acid (25 mM, pH 3.0) (40:60, v/v); flow rate: 1.0 mL/min; detection: 229 nm.	42

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 4.2

FIGURE 1 – Chemical structure of aliskiren (free base)	53
FIGURE 2 – UV spectra of aliskiren solutions in distilled water: (A) reference substance, (B) tablet dosage form and (C) in house mixture of the excipients.....	55
FIGURE 3 – Comparison of dissolution profiles of aliskiren tablets in different dissolution media with paddles (Apparatus 2) using the proposed UV method.....	56

LISTA DE TABELAS

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 4.1

TABLE 1 – Inter-day and between-analysts precision data of RP-LC for aliskiren in samples of tablet dosage form	43
TABLE 2 – Accuracy of RP-LC for aliskiren in samples of tablet dosage form.....	44
TABLE 3 – Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing.	45
TABLE 4 – Results of the system suitability test.....	46
TABLE 5 – Determination of aliskiren in tablet dosage forms by the RP-LC method	47

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 4.2

TABLE 1 – Intra-day and inter-day precision data of UV spectrophotometric method for aliskiren in tablet dosage form.....	55
TABLE 2 – Results from accuracy of the UV spectrophotometric method for aliskiren	56
TABLE 3 – Conditions investigated during robustness test	56
TABLE 4 – Quality control tests of commercial aliskiren tablets	56
TABLE 5 – Comparative determination of aliskiren in tablet dosage forms by UV spectrophotometric and RP-LC methods.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

Å	Angstrom
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	Áreas sob a curva da concentração plasmática versus tempo
BRA	Bloqueadores do receptor da angiotensina
CL	Cromatografia líquida
cm	Centímetro
C _{max}	Concentração plasmática máxima
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CV	Coefficiente de variação
DAD	Detector de arranjo de diodos
DRIFT	<i>Diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy</i>
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i>
EMEA	<i>European Medicines Agency</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
F. Bras.	Farmacopéia Brasileira
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Gramma
g	Força da gravidade
h	Hora
HA	Hipertensão arterial
HCl	Ácido clorídrico
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IC ₅₀	Concentração de inibição 50%
id	<i>Internal diameter</i>
IECA	Inibidores da enzima conversora da angiotensina
IR	Inibidores da renina
L	Litro
LC	<i>Liquid chromatography</i>
LC-MS/MS	<i>Liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>
LoD	<i>Limit of detection</i>
LoQ	<i>Limit of quantitation</i>
M	Molaridade
mg	Miligrama

min	Minuto
mL	Militro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mmHg	Milímetro de mercúrio
mmol	Milimolar
mol	Molar
MS	<i>Mass spectrometry</i>
m/z	Massa/carga
<i>n</i>	Número de respostas
N	Newton
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
nmol	Nanomolar
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
OVAT	<i>One-variable-at-a-time</i>
<i>P</i>	Significância estatística
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PDA	<i>Photodiode array</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Potencial de dissociação
<i>r</i>	Coefficiente de correlação
<i>r</i> ²	Coefficiente de determinação
RP-LC	<i>Reversed-phase liquid chromatography</i>
rpm	Rotações por minuto
RSD	Relative standard deviation
SRA	Sistema renina-angiotensina
<i>t</i> _{1/2}	Tempo de meia-vida
USP	Farmacopéia Americana
UV	Ultravioleta
v	Volume
°C	Grau Celsius
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO ..	13
2 OBJETIVOS ..	16
3 REVISÃO DA LITERATURA ..	18
4 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS ..	30
5 DISCUSSÃO ..	58
6 CONCLUSÕES ..	64
7 REFERÊNCIAS ..	66

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial (HA) é um grande desafio da saúde pública em todo mundo. Estima-se que em 2025, mais de 1,56 bilhões da população adulta mundial tenha pressão arterial (PA) elevada, caso não haja uma rápida mudança no estilo de vida da população (KEARNEY *et al.*, 2005). Segundo a SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO (2010), a doença acomete uma em cada quatro pessoas adultas, sendo responsável por 40% dos infartos, 80% dos acidentes vasculares cerebrais e 25% dos casos de insuficiência renal terminal.

Os agentes anti-hipertensivos podem ser classificados de acordo com seus locais ou mecanismos de ação: diuréticos, agentes simpaticolíticos, bloqueadores dos canais de cálcio (betabloqueadores), inibidores da enzima conversora de angiotensina, antagonistas do receptor de angiotensina II e vasodilatadores (BRUNTON *et al.*, 2006). O sistema renina-angiotensina é a chave reguladora da PA e do volume de fluido corporal (RAMAN *et al.*, 1995).

O primeiro representante da nova classe dos inibidores da renina é o alisquireno, com potencial para o tratamento da HA e doenças cardiovasculares relacionadas (WOOD *et al.*, 2003). Este fármaco bloqueia a atividade da enzima humana renina, o que impede a conversão do angiotensinogênio em angiotensina I no organismo, reduzindo assim os níveis de angiotensina I e angiotensina II, resultando na vasodilatação dos vasos sanguíneos (EMEA, 2008; DALLA VESTRA *et al.*, 2009).

O alisquireno foi aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em 6 de março de 2007 e pelo EMEA (*European Medicines Agency*) em 22 de agosto de 2007. Comercialmente, o alisquireno (Rasilez) está disponível no Brasil na forma de comprimidos revestidos. O alisquireno é produzido pelo laboratório Novartis e indicado para o tratamento da HA leve a moderada, podendo ser utilizado como monoterapia ou associado com outros fármacos.

Os avanços recentes na área farmacêutica viabilizaram a produção de novos fármacos de interesse terapêutico, que necessitam de métodos analíticos para sua identificação e determinação quantitativa em produtos farmacêuticos, sendo importantes para o controle da qualidade. De acordo com a legislação vigente no Brasil, os medicamentos comercializados devem cumprir com especificações que garantam segurança ao consumidor. Assim, torna-se

imprescindível o desenvolvimento e validação de métodos, para que se possa avaliar a qualidade dos produtos farmacêuticos desde a matéria-prima até o produto acabado.

Por sua vez, o teste de dissolução constitui-se em procedimento importante na área farmacêutica, pois, para que o fármaco seja absorvido atingindo a circulação sistêmica, deve estar solubilizado. Nesse sentido, os estudos de dissolução são empregados não somente para garantir a qualidade lote a lote da forma farmacêutica sólida, mas também para avaliar etapas de produção e de desenvolvimento de novas formulações (FDA, 1997; DRESSMAN *et al.*, 1998).

A validação de métodos analíticos, utilizados para avaliar a qualidade do fármaco alisquireno, garante que os mesmos atendam às exigências das aplicações analíticas e assegure a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 32, 2009), demonstrando a importância do desenvolvimento deste trabalho.

Por tratar-se de um fármaco novo, recentemente no mercado, não existe em compêndios oficiais monografia para avaliação de alisquireno em comprimidos. A literatura científica relata estudos na área clínica, não apresentando métodos para avaliar a qualidade do alisquireno em formulação farmacêutica.

Neste contexto, o presente trabalho contemplou o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos para a quantificação de alisquireno em comprimidos e a avaliação da liberação *in vitro* deste fármaco, possibilitando a aplicação destes na rotina do controle de qualidade da formulação.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Desenvolver e validar metodologia analítica para avaliação de alisquireno em formulação farmacêutica, estabelecendo procedimentos e especificações que contribuam para o controle integral da qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar as características físico-químicas dos comprimidos de alisquireno;
- Desenvolver e validar método por cromatografia líquida (CL) para determinação quantitativa de alisquireno em formulação farmacêutica;
- Desenvolver e validar método por espectrofotometria no ultravioleta (UV) para determinação quantitativa de alisquireno em formulação farmacêutica;
- Realizar estudo comparativo entre os métodos propostos;
- Desenvolver método de dissolução para comprimidos de alisquireno.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Considerações gerais

A HA é a doença cardiovascular mais comum. A prevalência de HA aumenta com o avançar da idade e aproximadamente 50% das pessoas entre 60 e 69 anos são hipertensas, sendo a prevalência ainda maior depois dos 70 anos (CHOBANIAN *et al.*, 2003).

A HA é definida como elevação sustentada da PA sistêmica. Ela é geralmente diagnosticada por três diferentes leituras elevadas de pressão arterial sistólica (PAS) maior que 120 mmHg e pressão arterial diastólica (PAD) maior que 80 mmHg. A HA pode ser do tipo primária ou secundária. A HA primária é a mais comum, também conhecida como essencial ou idiopática porque não existe causa conhecida, mas os fatores de risco incluem obesidade, uso de tabaco, uso de bebidas alcoólicas, inatividade física, dislipidemia, diabetes mellitus, idade, microalbuminúria e histórico familiar de doença cardiovascular prematura. Na HA secundária, a hemodinâmica do organismo é alterada por causas primárias e identificáveis, tais como doença renal crônica, doença renovascular, doença da tireóide ou paratireóide e também pode ser causada por medicamentos como contraceptivos orais, anti-inflamatórios não esteróides e descongestionantes nasais (HOUSTON, 2009; CRANWELL-BRUCE, 2008).

Em alguns pacientes, o bloqueio incompleto do sistema renina-angiotensina (SRA) ocasiona o controle inadequado da HA. Nesses casos, o bloqueio em um ponto no início desta cascata pode melhorar este controle. Os inibidores da renina (IR), uma nova classe de fármacos anti-hipertensivos, bloqueiam o SRA no ponto de ativação. A inibição da renina impede a produção do potente vasoconstritor angiotensina II, que é o responsável pelo aumento da PA (RAM, 2007; DOCKERY & BISOGNANO, 2008).

Especificamente, a angiotensina II é o agente principal da vasoconstrição, crescimento celular, retenção de sódio e água, e ativação simpática. A relação entre o SRA e a HA conduziu a indicações para bloquear a formação ou a atividade da angiotensina II através de uso de inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA) e bloqueadores do receptor da angiotensina (BRA) (CHOBANIAN *et al.* 2003; MANCIA *et al.*, 2007; GRADMAN & KAD, 2008). Os IR, quando usados em combinação com os IECA ou BRA, podem fornecer bloqueio mais completo do SRA, maior controle da PA e melhor proteção de órgãos-alvo (Figura 1) (FISHER *et al.*, 2008; FERRARIO, 2010).

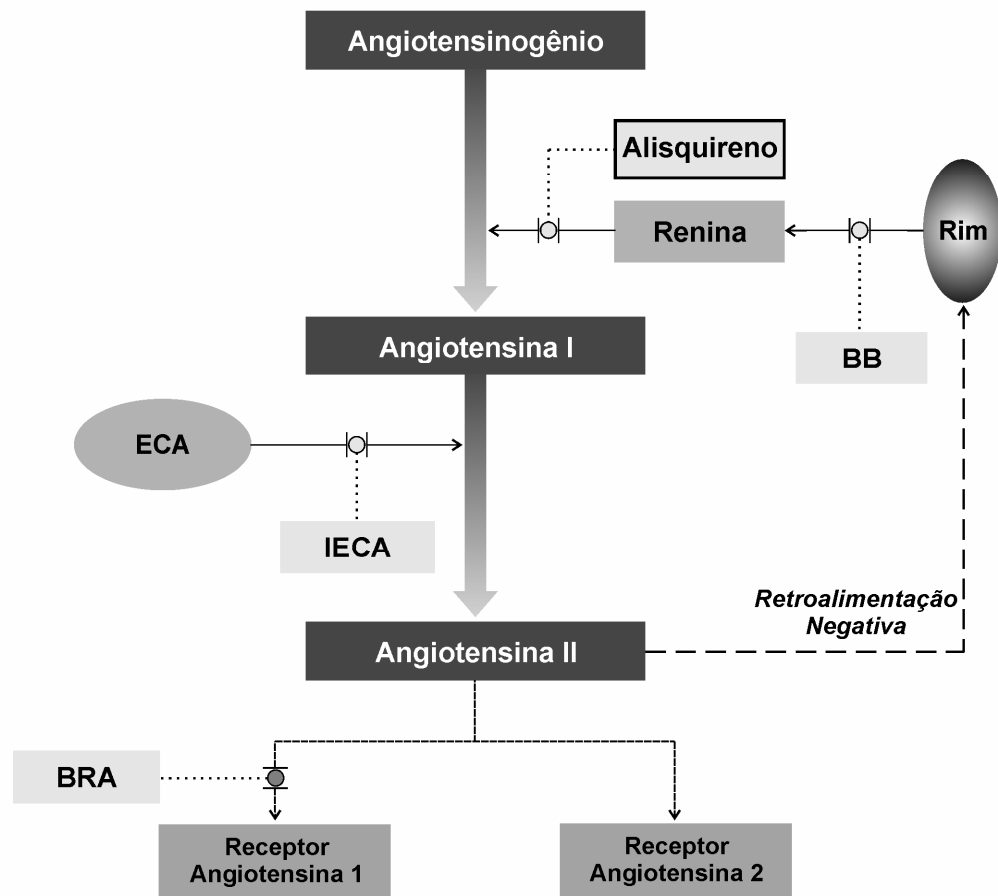


Figura 1 – Representação esquemática do sistema renina-angiotensina e os locais de ação do inibidor da renina, alisquireno, e de outros agentes anti-hipertensivos. BB, betabloqueadores; BRA, bloqueadores do receptor da angiotensina; ECA, enzima conversora da angiotensina; IECA, inibidores da ECA – Adaptado de Chaplin & Sever, 2008.

Na década de 1950 surgiram os primeiros IR sintéticos de alto peso molecular de uso parenteral. A partir de 1980, foram desenvolvidos os primeiros IR para uso oral. Destes, porém, o enalquireno, o zanquireno e o remiquireno apresentaram baixa biodisponibilidade oral (< 1%), meia-vida curta, além de serem hipotensores de baixa eficácia, e foram abandonados antes da fase III de estudos clínicos (LAMBERS-HEERSPINK *et al.*, 2009).

Em virtude da sua posição na cascata enzimática conduzindo à liberação de peptídeos vasoconstritores, a enzima renina tem sido considerada um alvo estratégico para evitar a HA (HERSHEY *et al.*, 2005; SHAFIQ *et al.*, 2008). Dessa forma, vários estudos têm sido realizados baseados em projetos de modelagem e análise cristalográfica estrutural visando obter uma ação farmacológica prolongada. Dos fármacos em desenvolvimento, o alisquireno apresentou os melhores efeitos anti-hipertensivos em testes *in vitro* e *in vivo* (RAHUEL *et al.*,

2000; WOOD *et al.*, 2003; LINDSAY & SKRYDSTRUP, 2006; COHEN, 2007; MAIBAUM *et al.*, 2007; HANESSIAN *et al.*, 2010).

Alisquireno, o primeiro fármaco da nova classe dos IR, é indicado para o tratamento da HA essencial e inibe seletivamente a renina, a primeira enzima do SRA. Na cascata, inibe a formação da angiotensina I do angiotensinogênio e reduz a produção do vasoconstritor angiotensina II e aldosterona mineralocorticóide, resultando em vasodilatação, diminuição da atividade simpática e aumento da excreção de íons sódio pelos rins, com consequente diminuição na pressão sanguínea (SIRAGY *et al.*, 2007; MÜLLER *et al.*, 2008). Outros fármacos anti-hipertensivos como os IECA e BRA exercem suas ações em fases posteriores do sistema, porém, o alisquireno é especial por que inibe o SRA em sua origem, além de diminuir a atividade da renina no plasma, apesar do aumento compensatório na concentração de renina (LUFT & WEINBERGER, 2008; DUBOIS & COHEN, 2009).

Segundo SCHMIEDER (2006), um novo agente anti-hipertensivo, como o alisquireno, além de reduzir a PA deve atender alguns critérios: ser eficaz tanto sozinho como combinado a outros fármacos; ter alta proporção de pacientes que respondam ao tratamento; controlar a PA durante 24 horas; ter eficácia constante em todos os pacientes (inclusive com comorbidades); segurança e tolerabilidade; eficácia durante o uso em longo prazo; baixos índices de efeitos colaterais; mínima interação com outros fármacos; além de efeito protetor de órgãos-alvo.

Ensaio clínico em pacientes hipertensos demonstraram que os benefícios do alisquireno na redução da PA são similares ou melhores do que as doses terapêuticas de enalapril, losartana, ibersatana e hidroclorotiazida. Este fármaco é bem tolerado, com poucos efeitos adversos relatados, mesmo em altas doses testadas (SEPEHRDAD *et al.*, 2007).

O novo fármaco é bem tolerado quando administrado sozinho ou mesmo em combinação com anlodipino, valsartana, hidroclorotiazida e ramipril (VAIDYANATHAN *et al.*, 2006a; BROWN, 2008). Quando administrado com um bloqueador do receptor de angiotensina, o alisquireno bloqueia compensatoriamente a ativação do SRA e produz uma significativa redução da PA (GRADMAN *et al.*, 2008).

Através de resultados da farmacocinética e farmacodinâmica, CHENG e colaboradores (2008) sugerem que o alisquireno é mais eficaz na inibição do SRA do que os IECA e os BRA. Em comparação com os primeiros IR avaliados, o alisquireno tem propriedades físico-químicas favoráveis, é pouco lipofílico e altamente solúvel em água, sendo mais resistente à degradação intestinal (GRADMAN *et al.*, 2005).

Após a administração oral, o pico de concentração plasmática de alisquireno é atingido após 1-3 horas e a biodisponibilidade absoluta é de 2-3%. O volume médio de distribuição é de aproximadamente 135 litros, indicando que se distribui extensamente pelo espaço extravascular. O alisquireno liga-se moderadamente às proteínas plasmáticas (47-51%), com concentração de inibição da renina 50% (IC₅₀) de 0.6 nmol/L (WOOD *et al.*, 2003). A meia-vida do fármaco é de 40 horas (34-41 horas), obtendo níveis plasmáticos estáveis após 7-8 dias de administração diária. Uma vez absorvido, o alisquireno é metabolizado principalmente através da via hepatobiliar e também, em menor parte, através do metabolismo oxidativo pelo citocromo P450 (CYP) 3A4, sendo que apenas 1,4% da dose oral total é metabolizada. Após administração oral, aproximadamente 80% do fármaco é detectado no plasma, indicando baixa presença de metabólitos. Mais de 90% do alisquireno é eliminado como composto inalterado nas fezes, menos de 2% é eliminado como metabólitos oxidados e menos de 1% é eliminado na urina (KALUS, 2006; VAIDYANATHAN *et al.*, 2006b; VAIDYANATHAN *et al.*, 2007a; WALDMEIER *et al.*, 2007; VAIDYANATHAN *et al.*, 2008; WUERZENER & AZIZI, 2008).

A eficácia clínica do alisquireno no tratamento da HA foi estudada em um grande número de testes clínicos, incluindo avaliações de diferentes dosagens, comparações com placebo e com outros anti-hipertensivos. Revisões recentes citam inúmeras publicações dentro desse contexto, destacando o amplo espectro de atividade do alisquireno e confirmando sua eficácia e tolerância clínica no tratamento dessa doença (STANTON *et al.*, 2003; FRAMPTON & CURRAN, 2007; JORDAN *et al.*, 2007; RAM, 2007; VAIDYANATHAN *et al.*, 2007b; VAN TASSELL & MUNGER, 2007; BROWN, 2008; JENSEN *et al.*, 2008).

SADAYOSHI e colaboradores (2010) estudaram a eficácia e a segurança do alisquireno em pacientes hipertensos com disfunção renal durante 12 semanas. A administração diária de alisquireno em 40 pacientes japoneses entre 20 e 80 anos demonstrou segurança e eficácia terapêutica, com níveis plasmáticos estáveis após 2-4 semanas de tratamento.

O efeito anti-hipertensivo do alisquireno na HA foi também avaliado por NUSSBERGER e colaboradores (2007). A pressão sanguínea, a atividade de renina plasmática e a concentração de renina plasmática foram avaliadas em 569 pacientes com HA leve a moderada antes e após oito semanas de administração. O tratamento foi realizado com doses orais uma vez ao dia de alisquireno 150, 300 ou 600 mg, irbesartana 150 mg ou placebo. O alisquireno reduziu a PAS e a PAD, e aumentou a concentração de renina

plasmática dose-dependente. O estudo também confirmou que o alisquireno é um potente fármaco anti-hipertensivo.

A segurança e a eficácia do alisquireno em pacientes idosos hipertensos foram avaliadas por VERDECCHIA e colaboradores (2007). Durante oito semanas, pacientes com HA essencial, com idade acima de 65 anos, foram submetidos a um estudo randomizado com administração oral uma vez ao dia de alisquireno 75 mg ($n = 91$), 150 mg ($n = 84$), 300 mg ($n = 94$), ou lisinopril 10 mg ($n = 86$) como fármaco controle. Todas as apresentações administradas apresentaram redução da PAS e PAD. Dessa forma, o alisquireno apresenta eficiente redução da PA, sem evidências de que a diferença de doses possa interferir na incidência de efeitos adversos em pacientes idosos hipertensos.

Estudos em mais de 12.000 pacientes com HA tem demonstrado que o uso do alisquireno reduziu a PA de forma efetiva, além de ser dose-dependente, com boa segurança e tolerância clínica (VAIDYANATHAN *et al.*, 2008). A análise conjunta de ensaios controlados por placebo mostrou que os tratamentos com alisquireno 150 mg e 300 mg promoveram reduções na média da PAS e também da PAD. Reduções de PA com alisquireno 75 mg não foram consistentemente maiores do que aqueles com placebo nesses estudos, enquanto a dose de 600 mg não proporcionou reduções adicionais da PA sobre a dose de 300 mg (WEIR *et al.*, 2007).

O SRA além de possuir uma importante função na regulação da PA, é considerado o fator mais importante na patogênese de muitas doenças renais, especialmente a nefropatia diabética. Os tratamentos atuais diminuem a progressão da doença, mas não a detém completamente. Estudos *in vivo* avaliaram a eficácia do alisquireno em modelos experimentais da doença renal. No entanto, novos estudos para determinar a eficácia do alisquireno em doenças renais humanas estão em andamento (FELDMAN, 2010).

O efeito da inibição da renina no diabetes tipo II ainda é incerto. O estudo elaborado por DONG e colaboradores (2010) foi realizado para examinar a eficácia do alisquireno sobre as lesões cardiovasculares, intolerância à glicose e lesões pancreáticas em um modelo animal do diabetes tipo II. Os resultados forneceram a primeira prova de que inibição direta da renina com alisquireno protege contra complicações cardiovasculares e lesão pancreática, através da atenuação do estresse oxidativo. Dessa forma, o alisquireno pode ser um promissor agente terapêutico para o diabetes tipo II.

Vários estudos de interação medicamentosa em indivíduos saudáveis e hipertensos foram realizados. A administração de fármacos como ramipril, valsartana, anlodipino, hidroclorotiazida, atenolol, metformina, pioglitazona, lovastatina, fenofibrato, isossorbida,

celecoxibe, digoxina, furosemida, ou alopurinol juntamente com o alisquireno não apresentou alteração clinicamente significativa nas concentrações plasmáticas máximas (C_{max}) e nas áreas sob a curva da concentração plasmática versus tempo (ASC) (DIETERLE *et al.*, 2005; VAIDYANATHAN *et al.*, 2006a; DIETRICH *et al.*, 2007; REYNOLDS *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2007; AYALASOMAYAJULA *et al.*, 2008; MESSERLI & BANGALORE, 2009). Uma diminuição significativa do C_{max} e ASC do alisquireno foi observada quando este foi coadministrado com irbesartana (VAIDYANATHAN *et al.*, 2007c). Por outro lado, quando administrado juntamente com atorvastatina, cetoconazol ou ciclosporina, ocorreram aumentos significativos tanto nas ASC como nas C_{max} do alisquireno (ACHIRA *et al.*, 1999; SAKAEDA *et al.*, 2006; VAIDYANATHAN *et al.*, 2007d).

O alisquireno encontra-se comercialmente na forma hemifumarato de alisquireno, comprimidos revestidos para administração oral, contendo 150 e 300 mg, sendo indicado para o tratamento da HA essencial. A dose usual recomendada é 150 mg uma vez ao dia, mas pacientes em que a PA não esteja controlada adequadamente, esta dose pode ser aumentada para 300 mg (RASILEZ, 2008). Estudos clínicos também demonstraram o uso de 600 mg como dose diária. O índice de efeitos adversos nessa concentração foi bem superior ao apresentado nas doses menores do fármaco. Dor de cabeça, diarreia, tontura, cansaço e fraqueza foram os principais efeitos adversos declarados (KALUS, 2006). Além disso, o alisquireno deve ser administrado preferencialmente com o estômago vazio, já que refeições ricas em gordura reduzem sua C_{max} em até 85% (LAM & CHOY, 2007; TEKTURN, 2008).

Em janeiro de 2009 a Comissão Européia autorizou a introdução do Rasilez HCT[®] no mercado europeu, medicamento este que contém alisquireno e hidroclorotiazida (EMEA, 2009). Em 2008, NICKENIG e colaboradores avaliaram a eficácia de alisquireno combinado com a hidroclorotiazida em um grupo de 880 pacientes hipertensos e verificaram uma significativa redução da PA se comparada à monoterapia com alisquireno, assim como confirmado por SURESHKUMAR (2008).

Em termos de custo, o alisquireno é mais caro que os outros agentes anti-hipertensivos, assim não sendo o medicamento de primeira escolha, exceto quando outros fármacos não são bem tolerados (CHENG *et al.*, 2008).

3.2 Características físico-químicas

O alisquireno é um potente inibidor da renina, o primeiro de uma nova classe de fármacos que atuam na primeira etapa do sistema renina-angiotensina, quimicamente descrito como (2(S),4(S),5(S),7(S)-N-(2-carbamoil-2-metilpropil)-5-amino-4-hidroxi-2,7-diisopropil-8-[4-metoxi-3-(3-metoxi-propoxi)fenil]-octanamida) (Figura 2). Apresenta-se como um pó branco, cristalino, solúvel em tampão fosfato, muito solúvel em água e acetonitrila. Sua fórmula molecular é $C_{30}H_{53}N_3O_6$, com massa molecular de 551,8 g/mol, e pKa de 9,49 (WOOD *et al.*, 2003; TEKTURNA, 2008; VAIDYANATHAN *et al.*, 2008).

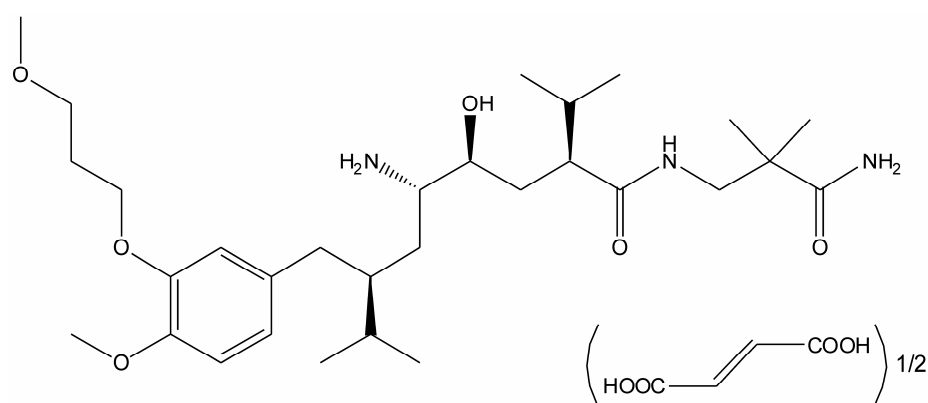


Figura 2 – Estrutura química do hemifumarato de alisquireno.

3.3 Métodos de análise

O alisquireno por ser um medicamento de lançamento recente no mercado farmacêutico dispõe de poucos métodos na literatura científica que relatam sua determinação em fluidos biológicos. Além disso, não há na literatura método para determinação de alisquireno em formulações farmacêuticas.

LEFÈVRE *et al.* (2000) desenvolveram um método por radioimunoensaio direto para determinação de CGP 60536 (alisquireno) em plasma. O procedimento de extração do fármaco é simples e foi desenvolvido sem a utilização de solventes orgânicos, utilizando apenas 25 μ L de plasma para cada amostra. O método apresentou boa reprodutibilidade em baixas concentrações plasmáticas, apresentando limite de quantificação de 0,15 ng/mL, e foi aplicado para estudos farmacocinéticos em animais e humanos.

LEFÈVRE & GAURON (2000) desenvolveram e validaram método para análise de CGP 60536 por CL em urina e plasma animal e humano. O método descrito foi desenvolvido

utilizando coluna C₈ (25 cm) e detecção por fluorescência com comprimentos de onda de excitação e emissão de 280 e 330 nm, respectivamente. A fase móvel foi constituída por acetonitrila e fosfato de potássio monobásico 0,01 M (65:35, v/v) na vazão de 0,8 mL/min. O método apresentou limite de quantificação de 4,5 ng/mL em plasma e 9 ng/mL em urina e foi aplicado para investigação da farmacocinética do alisquireno.

VAIDYANATHAN *et al.* (2007b) compararam a farmacocinética e segurança do alisquireno em adultos e idosos após simples administração de 300 mg de alisquireno. O fármaco foi quantificado em plasma utilizando extração em fase sólida em cartuchos C₁₈ e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com ionização no modo electrospray positivo. A detecção foi realizada utilizando a transição do íon precursor de m/z 552 para o íon produto de m/z 436. O método apresentou limite de quantificação de 0,5 ng/mL em plasma e 5 ng/mL quando aplicado em urina, utilizando como fase móvel um gradiente composto por acetato de amônio 0,01 M e acetonitrila (75:25 a 40:60, v/v). O padrão interno utilizado foi o [gem dimetil-d₆] alisquireno, um derivado do alisquireno.

3.4 Validação de métodos analíticos

Segundo o ICH (2005) validar procedimentos analíticos tem como objetivo demonstrar que estes sejam adequados para as análises em questão. O processo de validação deve garantir, através de estudos experimentais, que a metodologia proposta atenda às exigências de suas aplicações, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos.

A validação de métodos analíticos é um processo dinâmico e constante que inicia nas fases de seleção, desenvolvimento e otimização das metodologias, qualificação dos instrumentos, materiais e pessoal (RIBANI *et al.*, 2004; SHABIR *et al.*, 2007). Um processo de validação bem definido e documentado fornece evidências objetivas de que o método atende às exigências das aplicações analíticas, sendo adequado para o uso pretendido. Os parâmetros fundamentais avaliados na validação de um método são: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, teste de adequabilidade do sistema, limite de detecção e limite de quantificação (BRASIL, 2003; ERMER & MILLER, 2005; ICH, 2005; ROZET *et al.*, 2007). A capacidade de um método analítico de separar, detectar e quantificar impurezas ou produtos de degradação também é parâmetro que deverá ser avaliado durante a validação (RAO & NAGARAJU, 2003; ICH, 2006).

Métodos indicadores de estabilidade são requeridos para monitorar possíveis produtos de degradação que possam surgir devido a interações da substância ativa com os excipientes, processo de produção, embalagens e/ou armazenamento inadequado. Eventualmente, o método indicador de estabilidade necessita ser validado e ser incluído na investigação e aplicação de novos fármacos. Estes métodos devem ser robustos e reunir todos os parâmetros de validação requeridos em cada estágio do desenvolvimento do fármaco e na análise do produto final (ICH, 2003; ICH, 2006; KAZAKEVICH & LOBRUTTO, 2007).

Quanto à definição e execução dos parâmetros analíticos de validação, tanto o ICH (2005) como a Farmacopéia Americana (USP 32, 2009) reconhecem que não há necessidade de serem avaliados todos os parâmetros. Sendo assim, fica sob a responsabilidade do analista definir quais os parâmetros que serão avaliados, visto que, o tipo de método e o seu propósito é que irão determinar o desenvolvimento do processo (SWARTZ & KRULL, 1998; ERMER, 2001; ERMER & MILLER, 2005).

A escolha de um método depende de fatores como a natureza do fármaco, da complexidade da amostra e também do propósito do método. Além disso, a disponibilidade de equipamentos e reagentes também deve ser considerada (METHA, 1997).

Dentre os métodos analíticos, a CL constitui-se em um procedimento bastante utilizado em razão da sua versatilidade. A possibilidade de variação dos mecanismos de separação pela adequada escolha da coluna, fase móvel e método de detecção, permite a utilização desta técnica nas mais diversas fases de estudo de produtos farmacêuticos (COLLINS *et al.*, 2006; SHABIR *et al.*, 2007). Atualmente, apesar da análise de controle da qualidade de medicamentos ser realizada predominantemente utilizando a CL, a espectrofotometria no UV encontra-se bem estabelecida como técnica analítica, não só por ser considerada uma alternativa à CL, mas também por apresentar vantagens como simplicidade operacional, baixo consumo de amostras e solventes, além do tempo de análise reduzido (FRIEDRICH *et al.*, 2009).

3.5 Ensaio de dissolução

A absorção de fármacos após administração oral, a partir de formas farmacêuticas sólidas, depende da liberação do mesmo da sua forma farmacêutica, da sua dissolução ou solubilização sob condições fisiológicas e de sua permeabilidade através do trato gastrointestinal (ANSARI *et al.*, 2004). Fatores relacionados ao paciente, tais como fisiologia

da membrana, fluxo sanguíneo e pH do trato gastrointestinal, bem como fatores relacionados ao fármaco e formulação, como solubilidade e natureza química do fármaco, polimorfismo, coeficiente de partição, quiralidade, tamanho de partículas, entre outros, tornam o processo de absorção complexo e variável. Qualquer fator que afete a desagregação ou a dissolução pode afetar a biodisponibilidade do fármaco (STORPIRTIS, 1999; LAGACE *et al.*, 2004; SHARGEL *et al.*, 2005).

O ensaio de dissolução é importante para avaliar a liberação do fármaco da forma farmacêutica sólida, tornando-se disponível para ser absorvido pelo organismo. Atualmente, o teste de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais constitui-se em procedimento importante para a pesquisa, desenvolvimento, produção, controle e garantia da qualidade de formulações. Além disso, diferentes dosagens de um mesmo produto que apresentam perfis de dissolução semelhante, se existir estudo de bioequivalência que comprove a relação *in vitro/in vivo* de uma das dosagens, geralmente a mais alta, com produto de referência; as demais podem ser registradas sem a necessidade de novos estudos *in vivo*, apresentando assim, vantagens do ponto de vista ético, econômico e técnico (SHAH *et al.*, 1995; QURESHI & MCGILVERAY, 1999; FURLANETTO *et al.*, 2003; MARCOLONGO, 2003).

O método de dissolução é requisito fundamental na indústria farmacêutica para assegurar a qualidade lote a lote do produto farmacêutico, desenvolvimento de novas formulações e garantir a qualidade após mudanças na formulação e no processo de produção, avaliar a qualidade da formulação em função do tempo e condições de armazenamento durante o período de validade do produto (FDA, 1997; MARQUES & BROWN, 2002). Devido a isso, o método de dissolução é exigido pelo FDA para todos os produtos apresentados como formas farmacêuticas sólidas de uso oral (SHARGEL *et al.*, 2005).

O teste de dissolução avalia a quantidade de fármaco dissolvido, em um determinado volume de meio, mantido à temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, após determinado período de tempo, utilizando-se equipamento com dispositivo para promover agitação do meio, a uma dada velocidade de agitação (F. Brasil., 1988; USP 32, 2009). Para formulações de liberação imediata a porcentagem dissolvida de fármaco é determinada, normalmente, após um único tempo de coleta. A avaliação da porcentagem dissolvida em vários tempos de coleta (perfil de dissolução) é, no entanto, mais conclusiva em relação à coleta em um único ponto (ADAMS *et al.*, 2001).

Muitos fármacos não possuem monografia oficial, e são ainda escassos na literatura estudos de desenvolvimento de métodos de dissolução. Para esses fármacos, existe a necessidade de desenvolver ensaios de dissolução que possam prever o comportamento *in*

vivo dos mesmos (MANADAS *et al.*, 2002). A avaliação do perfil de dissolução, em três diferentes meios, na faixa de pH fisiológico (pH de 1,5 a 7,5) é recomendada como suporte no desenvolvimento e otimização do método de dissolução, bem como no estabelecimento de correlações *in vivo/in vitro* (MOORE & FLANNER, 1996; FDA, 1997; ADAMS *et al.*, 2001). Os meios de escolha mais usuais para o desenvolvimento do método de dissolução são ácido clorídrico diluído, soluções tampões na faixa de pH fisiológico, fluido gástrico simulado, água e tensoativos (FDA, 1997; USP 32, 2009).

A seleção criteriosa das condições de ensaio deve ser orientada no sentido de obter o máximo poder discriminativo, resultar na capacidade de detecção de eventuais desvios dos padrões de qualidade inicialmente propostos e distinguir mudanças significativas na composição ou no processo de produção (MANADAS *et al.*, 2002; USP 32, 2009). Um perfil de dissolução adequado apresenta 100% de liberação do fármaco entre 45 e 60 minutos, ou seja, perfis com liberação do fármaco muito rápida não demonstram poder discriminativo (FORTUNATO, 2005). Além disso, o conhecimento das propriedades físico-químicas do fármaco, como pKa, solubilidade, função da relação pH/tensoativo e estabilidade em função do pH são de suma importância (SKOUG *et al.*, 1997).

Estudos de dissolução *in vitro* para comprimidos de alisquireno não foram encontrados na literatura, o que justifica um dos objetivos do presente trabalho.

4 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

4 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

4.1 – WRASSE-SANGOI, M.; SANGOI, M. S.; OLIVEIRA, P. R.; SECRETTI, L. T.; ROLIM, C. M. B.; Determination of aliskiren in tablet dosage forms by a validated stability-indicating RP-LC method. **Journal of Chromatographic Science**, *in press*.

Submetido: 17/09/2009

Revisado: 16/02/2010

Aceito: 10/05/2010

Determination of Aliskiren in Tablet Dosage Forms by a Validated Stability-indicating RP-LC Method

M. Wrasse-Sangoi^{1,*}, M.S. Sangoi², P.R. Oliveira³, L.T. Secretti¹, and C.M.B. Rolim¹

¹*Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria-RS, Brazil.*

²*Laboratory of Research in Pharmaceutical Quality Control, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, 90610-000 Porto Alegre-RS, Brazil.*

³*Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis-SC, Brazil.*

* Author to whom correspondence should be addressed: e-mail micheliw@yahoo.com.br

Abstract

A reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) method is validated for the determination of aliskiren in tablet dosage form. The LC method is carried out on a Waters XBridge C₁₈ column (150 x 4.6 mm i.d.), maintained at 25 °C. The mobile phase consisted of acetonitrile:water (95:5, v/v)/phosphoric acid (25 mM, pH 3.0) (40:60, v/v), run at a flow rate of 1.0 mL/min, with photodiode array detector set at 229 nm. The chromatographic separation is obtained with aliskiren retention time of 3.68 min, and it is linear in the range of 10-300 µg/mL ($r = 0.9999$). The limits of detection and quantitation are 2.38 and 7.93 µg/mL, respectively. The specificity and stability-indicating capability of the method are proven through degradation studies, which also showed that there is no interference of the formulation excipients, showing that peak is free from any coeluting peak. The method showed adequate precision, with a relative standard deviation (RSD) values lower than 0.92%. Good values of accuracy were also obtained, with a mean value of 99.55%. Experimental design is used during validation to calculate method robustness. The proposed method is applied for the analysis of the tablet dosage forms, contributing to improve the quality control and to assure the therapeutic efficacy.

Keywords: Aliskiren, Experimental design, Reversed-phase liquid chromatography, Pharmaceutical formulation, Stability-indicating method, Validation.

Introduction

Hypertension is one of the most common and powerful risk factors for cardiovascular diseases. The control of the hypertension and also serum cholesterol and smoking has been widely promoted in order to reduce the risk of cardiovascular diseases and their complications (1,2). Overall, heart failure in either form is a major global health problem contributing to a significant morbidity and mortality and requiring a significant portion of health care spending (3).

The renin angiotensin system plays an important role in the regulation of cardiovascular and renal function and in maintaining the electrolyte balance of the body and has long been recognized as a desirable target for antihypertensive therapy (4-9). More recent research has led to the discovery of several classes of nonpeptidic renin inhibitors. Aliskiren (2(*S*),4(*S*),5(*S*),7(*S*)-*N*- (2-carbamoyl-2-methylpropyl)-5-amino-4-hydroxy-2,7-diisopropyl-8-[4-methoxy-3-(3-methoxypropoxy)phenyl]-octanamide hemifumarate) (Fig. 1), is the first representative of a new class of nonpeptide, low molecular weight, orally active transition-state renin inhibitors (10-13). Its high potency against human renin compensates for its relatively low absolute bioavailability (2-3%). Its long half-life ($t_{1/2}$ 30-40 h) makes it suitable for once daily administration and the plasma steady-state levels are achieved after 5-8 days of treatment (14-16). Therefore, aliskiren is used as a new effective treatment for hypertension (8,17).

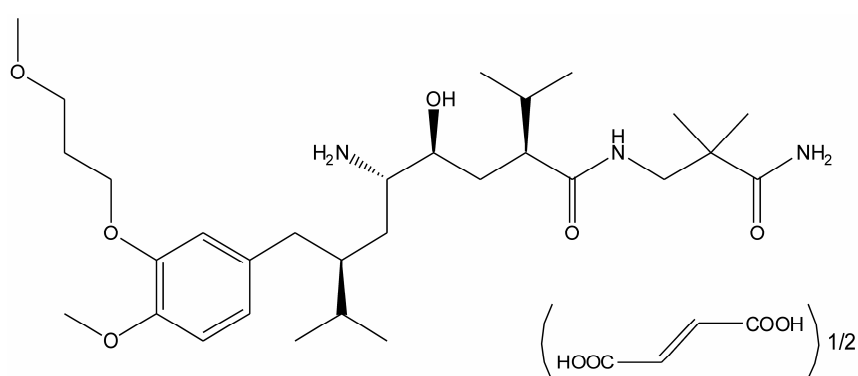


Figure 1. Chemical structure of aliskiren hemifumarate.

An automated reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) method with fluorescence detection for the determination of the renin inhibitor CGP 60536 (aliskiren) in animal and human plasma and urine has been developed and validated (18). A validated

liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method employing positive ion electrospray ionization (ESI+) was applied for the evaluation of the pharmacokinetic profile of aliskiren in healthy volunteers and patients with hepatic impairment (16,19).

The aliskiren pharmaceutical product is commercially available, but at the moment, there is no published method validated for the quantitative analysis of the drug in pharmaceutical formulations. Therefore, the aim of the present article was to develop and validate a RP-LC method for the quantitative analysis of aliskiren in tablet dosage forms, contributing to improve the quality control and assuring the therapeutic efficacy.

Experimental

Extraction Procedure of Aliskiren Reference Substance

Due to the lack of aliskiren reference substance, the active pharmaceutical ingredient was extracted from commercial tablets (Rasilez[®] 300 mg). Twenty tablets were reduced to a fine powder and the aliskiren was extracted with ultrapurified water (pH 7), filtered and then submitted to a SpeedVac concentrator (Model SPD 1010, Thermo Electron Corporation, Milford, MA, USA) until dryness. The obtained powder was analyzed for purity by the proposed RP-LC method, mass spectrometry (MS), differential scanning calorimetry (DSC), and by melting point. To confirm the identity, additional techniques such as diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFT) and nuclear magnetic resonance (NMR) were carried out (data not shown). Nonaqueous titration of weak bases was also performed to determine the degree of purity of the drug (20).

Chemical and Reagents

A total of six batches of Rasilez[®] (Novartis, São Paulo, SP, Brazil) tablets, containing 150 and 300 mg of aliskiren base were obtained from commercial sources, and were identified by arabic numbers from 1 to 6. LC-grade acetonitrile and phosphoric acid were purchased from Tedia (Fairfield, OH, USA). For all of the analyses, ultrapure water was used (Labconco, Kansas City, MO, USA). Aliskiren dosage form was labeled to contain the following excipients: magnesium stearate, macrogol, crospovidone, povidone, microcrystalline cellulose, talc, hypromellose, anhydrous colloidal silica, E171 titanium dioxide, E172 red iron oxide, E172 black iron oxide.

Apparatus and Analytical Conditions

The RP-LC method was performed on a Shimadzu LC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with an SCL-10AVP system controller, a LC-10 ADVP pump, a DGU-14A degasser, a SIL-10ADVP autosampler and an SPD-M10AVP photodiode array (PDA) detector. The peak areas were integrated automatically by computer using a Shimadzu Class VP (V 6.14) software program. The experiments were performed on a reversed phase Waters (Milford, MA, USA) XBridge C18 column (150 × 4.6 mm i.d., with a particle size of 5 μm, 135 Å). A guard column was used to protect the analytical column. The Shimadzu LC system was operated isocratically at ambient controlled temperature (25 °C) using a mobile phase of acetonitrile:water (95:5, v/v)/phosphoric acid (25 mM, pH 3.0) (40:60, v/v), run at a flow rate of 1.0 mL/min, and using PDA detection at 229 nm. The injection volume was 30 μL. Other columns tested: Waters (Dublin, Ireland) XTerra MS C18 (150 mm × 3.9 mm i.d., 5 μm, 132 Å); Phenomenex (Torrance, USA) Synergi Fusion C18 (150 mm × 4.6 mm i.d., 4 μm, 80 Å); Phenomenex Luna C18 (150 × 4.6 mm i.d., 5 μm, 100 Å); Phenomenex Gemini C18 (250 × 4.6 mm i.d., 5 μm, 110 Å); Phenomenex Synergi Max-RP C12 (150 × 4.6 mm i.d., 4 μm, 80 Å); Shimadzu (Kyoto, Japan) Shim-pack CLC-ODS C18 (150 × 4.6 mm i.d., 4 μm, 100 Å).

Preparation of Aliskiren Reference Solution

The stock reference solution was prepared by weighing accurately, 11.23 mg of aliskiren hemifumarate (purity: 98.32%), transferred to 10 mL volumetric flask and diluted to volume with methanol, obtaining a concentration of 1 mg/mL of aliskiren base. The stock solution was stored at 2-8 °C, protected from light and daily diluted to an appropriate concentration in water.

Preparation of Sample Solutions

To prepare the sample solutions, tablets containing 150 and 300 mg of aliskiren were accurately weighed and crushed to a fine powder. An appropriated amount was transferred into an individual 50 mL volumetric flask. After addition of 30 mL water, the flasks were vortex mixed for 1 min. Then the samples were made up to volume with water, transferred to appropriate tubes and centrifuged at 2000 × g for 10 min. Aliquots of the clear supernatant liquid at final concentration of 100 μg/mL of the aliskiren base were stored at 2-8 °C, protected from light, and daily filtered through a 0.45 μm membrane filter (Millipore).

Validation of the RP-LC Method

Analytical method development and validation play a major role in the discovery, development, and manufacture of pharmaceuticals (21). The International Conference on Harmonization (ICH) (22) requires the stress testing to be carried out to elucidate the inherent stability characteristics of the active substance. A stability-indicating method is the one that quantifies the drug and also resolves its degradation products (23-26). The present method was validated using samples of tablet dosage forms with the label claim of 300 mg by determination of the following parameters: specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection (LoD), limit of quantitation (LoQ), robustness, and system suitability test.

Specificity and Forced Degradation Studies

In order to determine the specificity of the method, a placebo solution (in-house mixture of all the tablet excipients) was prepared in accordance with the Handbook of Pharmaceutical Excipients (27) and was analyzed to evaluate the absence of interference from the formulation excipients on the aliskiren peak. Moreover, the stability-indicating capability of the method was determined by subjecting a reference sample solution (200 µg/mL) to accelerated degradation by acidic, basic, neutral, oxidative, and photolytic conditions to evaluate the interference in the quantitation of aliskiren. A sample solution prepared in 2 M hydrochloric acid was used for the acidic hydrolysis, and a sample solution in 2 M sodium hydroxide for the basic hydrolysis evaluation. Both solutions were maintained at ambient temperature for 5 h and neutralized with acid or base, as necessary. For study in neutral condition, drug dissolved in water was heated at 50 °C for 96 h. The oxidative degradation was induced by storing the samples solutions in 10% hydrogen peroxide, at ambient temperature for 30 h, protected from light. Photodegradation was induced by exposing the sample in quartz cuvette to 200 watt hours/square meter of near ultraviolet light (UV-C) at 25 cm of distance for 1 h. After the procedures, the samples were diluted in water to a final concentration of 100 µg/mL. Then, the specificity and the stability-indicating capability of the method were established by determining the peak purity of the samples using a PDA detector (22).

Linearity and Range

The linearity was determined by constructing three independent analytical curves, each one with six concentrations of reference solution, in the range of 10-300 $\mu\text{g/mL}$ (10; 30; 50; 100; 200; 300 $\mu\text{g/mL}$), prepared in water. Before injection of the solutions, the column was equilibrated for at least 20 min with the mobile phase flowing through the system. Three replicate of 30 μL injections of the reference solutions were made to verify the repeatability of the detector response. The peak areas of the chromatograms were plotted against the respective concentrations of aliskiren to obtain the analytical curve.

Precision and Accuracy

The precision of the method was determined by the repeatability and the intermediate precision. Repeatability was examined by nine evaluations of the same concentration sample of aliskiren, on the same day, and under the same experimental conditions. The intermediate precision of the method was assessed by carrying out the analysis on three different days (inter-days), and also by other analysts performing the analysis in the same laboratory (between-analysts). The accuracy was evaluated by applying the proposed method to the analysis of an in-house mixture of the excipients with known amounts of the drug, to obtain solutions at concentrations of 80, 100 and 120 $\mu\text{g/mL}$, equivalent to 80, 100 and 120% of the nominal analytical concentration, respectively. The accuracy was calculated as the percentage of the drug recovered from the formulation matrix.

LoD and LoQ

The LoQ was taken as the lowest concentration of analyte in a sample that can be determined with acceptable precision and accuracy, and the LoD was taken as the lowest absolute concentration of analyte in a sample that can be detected but not necessarily quantified. The LoD and LoQ were calculated from the slope and the standard deviation of the intercept of the mean of three calibration curves, determined by a linear regression model, as defined by ICH guideline (22).

Robustness

The robustness was determined by analyzing the same samples under a variety of conditions of the method parameters, such as: flow rate, column temperature, changing the mobile phase composition, and pH. The response surface method design was applied to

evaluate the relationships between one or more measured responses using Design-Expert software v. 7.1 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA). Besides, the D-optimal criteria was used to select design points to minimize the variance associated to the estimates of specified model coefficients, with a low number of experiments. Moreover, the stability of sample solutions in mobile phase was assessed after the storage of the samples for 48 h at 2-8 °C, and also placed into the autosampler, at room temperature for 15 h.

System Suitability Test

The system suitability test was also carried out to evaluate the resolution and reproducibility of the system for the analysis to be performed, using five replicates injections of a reference solution containing 100 µg/mL of aliskiren. The parameters measured were peak area, retention time, theoretical plates, and tailing factor (peak symmetry).

Analysis of Aliskiren in Pharmaceutical Formulations

For the quantitation of aliskiren in the tablet dosage forms, the respective stock solutions were diluted to appropriate concentration (100 µg/mL) with water, filtered, injected in triplicate and the percentage recoveries of the drug calculated against the reference substance.

Results and Discussion

Optimization of the Chromatographic Conditions

To obtain the best chromatographic conditions, the mobile phase was optimized to provide sufficient selectivity and sensitivity in a short separation time of aliskiren base ($pK_a = 9.49$). The retention factor observed in all analysis was higher than 1, in accordance to Thompson and LoBrutto (2007) (28). Phosphoric acid, ammonium acetate and phosphate solutions were evaluated using the pH range of 3 and 7. The suitable mobile-phase should control the selectivity and to achieve reproducible separations with acceptable peak shape. Thus, the precise pH control is essential as well as the high buffer capacity. The buffer capacity of the mobile-phase was suitable and the aliskiren molecule was fully protonated and properly eluted in the column. Phosphoric acid has a pK_a of 2.1 and its buffer range ($pK_a \pm 1$

unit) is 1.1 and 3.1. Therefore, the pH value of 3.0 was chosen due to better peak symmetry and high sensitivity, and phosphoric acid solution had adequate buffering capacity to maintain the chosen pH. The use of acetonitrile resulted in better sensitivity, short analysis time, improving the peak symmetry (about 1.15). Columns from different sources were evaluated, and the Waters XBridge C₁₈ analytical column was selected as it provides the best chromatographic performance and acceptable peak characteristics, including tailing factor and number of theoretical plates. Moreover, the best chromatographic separation of degradation products was achieved on the column used. The optimized conditions of the RP-LC method were validated for the analysis of aliskiren in tablet dosage forms, and a typical chromatogram obtained by the proposed method, demonstrating the resolution of the symmetrical peak corresponding to aliskiren, is shown in Fig. 2a. The retention time observed (3.68 min) allows a fast determination of the drug, which is suitable for the quality control laboratories.

Method Validation

Specificity and Forced Degradation Studies

A stability-indicating method is defined as an analytical method that accurately quantifies the active ingredients without interference from degradation products, process impurities, excipients, or other potential impurities (23,29). Forced degradation studies should be the first step in method development. The presence of degradants and impurities in pharmaceutical formulations can result in changes in their chemical, pharmacological and toxicological properties affecting their efficacy and safety. Therefore, the adoption of stability-indicating methods is always required to control the quality of pharmaceuticals during and after the production. This greatly contributes to the possibility of improving drug safety (24,30,31).

During the forced degradations, the neutral heated hydrolysis resulted in significant decrease of the area without any additional peak, indicating that the probable degradation products were not detected by UV. Under the acidic hydrolysis, aliskiren content exhibited a decrease of the area (7.94%) at 5 h in 2 M hydrochloric acid solution and one additional peak detected at 8.21 min. Just one additional peak was also detected in the oxidative condition at 5.05 min with significant decrease of aliskiren peak. Under the basic hydrolysis, nearly 69% of the aliskiren was degraded in 2 M sodium hydroxide solution for 5 h, and three additional peaks were identified at 5.05, 6.15 and 7.87 min. For the photolytic condition, 59.76% of the

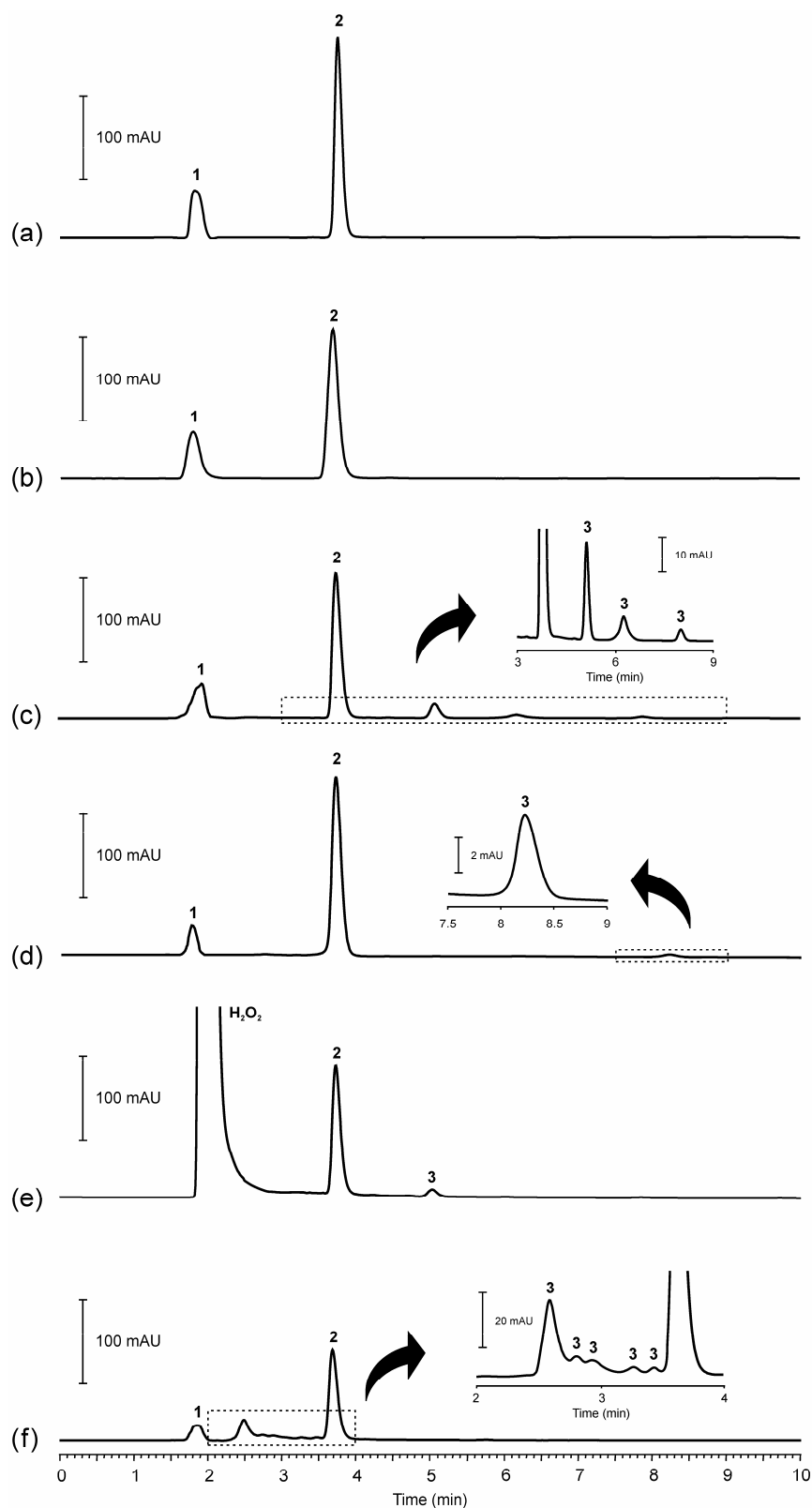


Figure 2. RP-LC chromatograms of aliskiren (100 µg/mL). (a) Aliskiren reference solution, and after: (b) neutral heated hydrolysis; (c) basic hydrolysis; (d) acidic hydrolysis; (e) oxidation; and (f) exposition to UV light. Peak 1: fumarate; 2: aliskiren; 3: degraded products. Chromatographic conditions: Waters XBridge C₁₈ column (150 x 4.6 mm i.d., 5 µm), 25 °C; mobile phase: acetonitrile:water (95:5, v/v)/phosphoric acid (25 mM, pH 3.0) (40:60, v/v); flow rate: 1.0 mL/min; detection: 229 nm.

aliskiren was degraded at 1 h, and five additional peaks were detected between 2.5 and 3.5 min, but these peaks did not interfere in the aliskiren peak purity. The chromatograms of the forced degradation studies are shown in Fig. 2. No interference from formulation excipients and fumaric acid solution was found, as showing that the peak was free from any coeluting peak. Typical chromatograms of the blank, excipients and fumaric acid solution obtained by the proposed RP-LC method are shown in Fig. 3. The studies with the PDA detector showed that the aliskiren peak was free from any coeluting peak, with values of peak purity index higher than 0.9999, thus demonstrating that the proposed method is specific for the analysis of aliskiren.

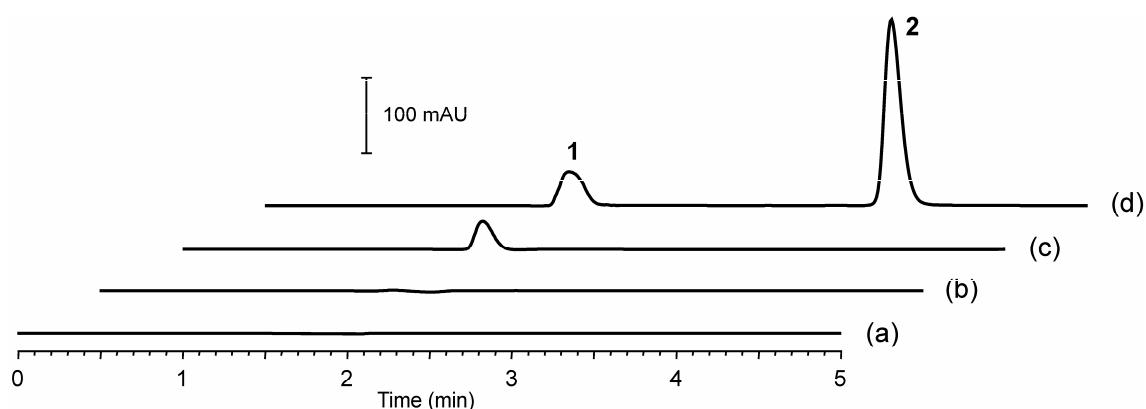


Figure 3. RP-LC chromatograms of (a) blank; (b) in-house mixture of the tablet excipients; (c) fumaric acid solution; and (d) aliskiren in pharmaceutical formulation solution (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Peak 1: fumarate; 2: aliskiren. Chromatographic conditions: Waters XBridge C_{18} column (150 x 4.6 mm i.d., 5 μm), 25 $^{\circ}\text{C}$; mobile phase: acetonitrile:water (95:5, v/v)/phosphoric acid (25 mM, pH 3.0) (40:60, v/v); flow rate: 1.0 mL/min; detection: 229 nm.

Linearity

The analytical curves constructed for aliskiren were found to be linear in the 10-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ range. The value of the correlation coefficient calculated ($r = 0.9999$, $y = (21312.18 \pm 222.20) x - (47960.33 \pm 16906.58)$, where, x is concentration and y is the peak absolute area) indicated the linearity of the analytical curve for the method. The validity of the assay was also verified by means of ANOVA, which demonstrated significant linear regression and nonsignificant linearity deviation ($P < 0.05$).

Precision

The precision evaluated as the repeatability resulted in a relative standard deviation (RSD) value of 0.92% ($n = 9$). The intermediate precision was assessed by analyzing two samples of the pharmaceutical formulation on three different days (inter-day); the mean values obtained were 100.29 and 101.36% with RSD 0.47 and 0.37%, respectively. The between analysts precision was determined by calculating the mean values and the RSD for the analysis of two samples of the pharmaceutical formulation by three analysts; the values were found to be 100.92 and 100.53% with RSD 0.27 and 0.39%, respectively. The results are shown in Table 1.

Table 1. Inter-day and between-analysts precision data of RP-LC for aliskiren in samples of tablet dosage form

Sample	Day	Inter-day		Between-analysts		
		Percentage* (%)	RSD [†] (%)	Analysts	Percentage* (%)	RSD [†] (%)
1	1	100.03		A	101.02	
	2	100.01	0.47	B	100.61	0.27
	3	100.84		C	101.13	
2	1	101.80		A	100.89	
	2	101.18	0.37	B	100.11	0.39
	3	101.12		C	100.60	

* Mean of three replicates.

[†] RSD = Relative standard deviation.

Accuracy

The accuracy was assessed from three replicate determinations of three different solutions containing 80, 100 and 120 µg/mL. The absolute means obtained for aliskiren are shown in Table 2 with a mean value of 99.55% and RSDs lower than 1.21%, demonstrating that the method is accurate within the desired range.

Table 2. Accuracy of RP-LC for aliskiren in samples of tablet dosage form

Nominal concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Mean concentration found* ($\mu\text{g/mL}$)	RSD [†] (%)	Accuracy (%)
80	79.05	0.24	98.81
100	98.72	0.17	98.72
120	121.34	1.21	101.11

* Mean of three replicates.

[†] RSD = Relative standard deviation.

LoD and LoQ

For calculating of the LoD and LoQ, a calibration equation, $y = 21312.18x - 47960.33$, was generated by using the mean values of the three independent analytical curves. The LoD and LoQ were obtained by using the mean of the slope, 21312.18 ± 222.20 , and the standard deviation of the intercept of the independent curves, determined by a linear regression line as 16906.58. The LoD and LoQ calculated were 2.38 and 7.93 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

Robustness

Two approaches are possible to evaluate robustness, either an one-variable-at-a-time (OVAT) procedure or an experimental design procedure. The OVAT procedure varies the levels of one factor while keeping the other factors at nominal levels, to evaluate the effect of this former factor on the method response(s). When applying an experimental design, the effect of a given factor is calculated at several level combinations of the other factors. Thus, in an experimental design, a reported factor effect is an average value for the whole domain, and it represents more globally what is happening around the nominal situation (32-34).

To evaluate the robustness of an analytical method usually the OVAT approach is applied, however it is not recommended. The most important reason is that when the factors are examined in given intervals, the effects are estimated for a smaller domain around the nominal levels with the OVAT than with the experimental design approach. Moreover, the OVAT approach requires more (too many) experiments, especially when the number of examined factors becomes larger, and secondly, the importance of factor interactions cannot be taken into account (23,34). The experimental ranges of the selected variables evaluated are

given in Table 3. The analysis of variance ANOVA was performed and the model terms (variables) were not significant ($P < 0.05$). Moreover, the sample solutions were stable during 15 h into the autosampler and during 48 h when maintained at 2-8 °C, showing nonsignificant change ($< 2.0\%$) relative to freshly prepared samples, as suggested (35).

Table 3. Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing

Experimental	Factors					Responses*		
	Phosphoric acid (mM)	Aqueous (%)	Flow (mL/min)	pH	Temp (°C)	RSD [†] (%)	Assay (%)	Peak Symmetry
1	23	59	0.9	2.9	27	0.56	102.86	1.15
2	27	61	1.1	3.1	27	0.49	102.26	1.15
3	27	59	1.1	2.9	27	0.19	103.84	1.15
4	23	61	0.9	2.9	22	0.31	103.94	1.17
5	23	59	1.1	2.9	23	0.06	103.72	1.16
6	27	61	0.9	2.9	27	0.17	102.30	1.16
7	27	61	0.9	3.1	23	0.06	103.65	1.15
8	23	61	1.1	3.1	23	0.63	103.19	1.15
9	23	59	1.1	3.1	27	0.10	103.93	1.16
10	27	61	1.1	2.9	23	0.06	103.10	1.14
11	27	59	1.1	3.1	23	0.05	103.36	1.14
12	23	61	1.1	2.9	27	0.78	102.34	1.18
13	23	61	0.9	3.1	27	0.18	102.86	1.15
14	25	60	1	3	25	0.49	103.14	1.16
15	27	59	0.9	3.1	27	0.57	102.04	1.17
16	27	59	0.9	2.9	23	0.06	103.43	1.17
17	23	59	0.9	3.1	23	0.03	103.33	1.16

* Mean of three replicates.

[†] RSD = Relative standard deviation.

System Suitability Test

The RSD values calculated in the system suitability test for the parameters were tested

within the acceptable range (RSD < 2.0%), as shown in Table 4, indicating that the system is suitable for the analysis intended.

Table 4. Results of the system suitability test

Aliskiren*				
Parameter	Minimum	Maximum	RSD [†] (%)	Status
Theoretical plates	4775	4932	1.14	Passed
Retention time	3.65	3.66	0.10	Passed
Peak area	2072495	2109455	0.68	Passed
Tailing factor	1.15	1.17	0.19	Passed

* Mean of five replicates.

[†] RSD = Relative standard deviation.

Method Application

The proposed RP-LC method was applied for the determination of aliskiren in tablet dosage forms, as shown in Table 5. The results demonstrated the quality of the pharmaceutical samples and the applicability of the method for quality control analysis.

Conclusion

The results of the validation studies show that the RP-LC method is specific, stability-indicating, sensitive, accurate, and possesses significant linearity and precision characteristics without any interference from the excipients and degradation products. The advantages of the chromatographic technique are very well established for the quality control of most of the pharmaceuticals due to its efficiency, high resolution, significant precision and accuracy. Therefore, the proposed method was successfully applied and suggested for the quantitative analysis of aliskiren in tablet dosage forms, contributing to improve the quality control and to assure the therapeutic efficacy.

Table 5. Determination of aliskiren in tablet dosage forms by the RP-LC method

Theoretical amount		Experimental amount*		
Sample	mg per tablet	mg	Recovery (%)	RSD [†] (%)
1	150	153.02	102.01	0.26
2	150	153.36	102.24	0.22
3	150	153.75	102.50	0.05
4	300	304.08	101.36	0.14
5	300	297.48	99.16	0.15
6	300	307.74	102.58	0.44

* Mean of three replicates.

[†] RSD = Relative standard deviation.

Acknowledgements

The authors wish to thank CNPq for the financial support.

References

- [1] A.C. Chobanian, G.L. Bakris, H.R. Black, W.C. Cushman, L.A. Green, J.L. Izzo, D.W. Jones, B.J. Materson, S. Oparil, J.K. Wright Jr., and E.J. Roccella. The seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. The JNC 7 report. *JAMA* **289**: 2560-2572 (2003).
- [2] R.L. Antikainen, V.A. Moltchanov, C. Chukwuma, K.A. Kuulasmaa, P.M. Marques-Vidal, S. Sans, L. Wilhelmsen, and J.A. Tuomilehto. Trends in the prevalence, awareness, treatment and control of hypertension: The WHO MONICA project. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* **13**: 13-29 (2006).
- [3] K.K. Gaddam, A. Verma, M. Thompson, R. Amin, and H. Ventura. Hypertension and cardiac failure in its various forms. *Med. Clin. North Am.* **93**: 665-680 (2009).
- [4] C.M. Tice, Z. Xu, J. Yuan, R.D. Simpson, S.T. Cacatian, P.T. Flaherty, W. Zhao, J. Guo, A. Ishchenko, S.B. Singh, Z. Wua, B.B. Scott, Y. Bukhtiyarov, J. Berbaum, J. Mason, R. Panemangalore, M.G. Cappiello, D. Müller, R.K. Harrison, G.M. McGeehan, L.W. Dillard, J.J. Baldwin, and D.A. Claremon. Design and optimization of renin inhibitors: Orally bioavailable alkyl amines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**: 3541-3545 (2009).
- [5] M.A. Zaman, S. Oparil, and D.A. Calhoun. Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**: 621-636 (2002).
- [6] B.B. Scott, G. McGeehan, and R.K. Harrison. Development of inhibitors of the aspartyl protease renin for the treatment of hypertension. *Curr. Protein Pept. Sci.* **7**: 241-254 (2006).
- [7] J.A. Staessen, Y. Li, and T. Richart. Oral renin inhibitors. *Lancet* **368**: 1449-1456 (2006).
- [8] P. Verdecchia, F. Angeli, G. Mazzotta, G. Gentile, and G. Reboldi. The renin angiotensin system in the development of cardiovascular disease: role of aliskiren in risk reduction. *Vasc. Health Risk Manag.* **4(5)**: 971-981 (2008).

- [9] J. Iwanami, M. Mogi, M. Iwai, and M. Horiuchi. Inhibition of the renin-angiotensin system and target organ protection. *Hypertens. Res.* **32**: 229-237 (2009).
- [10] J. Rahuel, V. Rasetti, J. Maibaum, H. Rüeger, R. Göschke, N.-C. Cohen, S. Stutz, F. Cumin, W. Fuhrer, J.M. Wood, and M.G. Grütter. Structure-based drug design: the discovery of novel nonpeptide orally active inhibitors of human renin. *Chem. Biol.* **7**: 493-504 (2000).
- [11] J.M. Wood, J. Maibaum,; J. Rahuel, M.G. Grutter,; N.C. Cohen, V. Rasetti, H. Ruger, R. Goschke, S. Stutz, W. Fuhrer, W. Schilling, P. Rigollier, Y. Yamaguchi, F. Cumin, H.-P. Baum, C.R. Schnell, P. Herold, R. Mah, C. Jensen, E. O'Brien, A. Stanton, and M.P. Bedigian. Structure-based design of aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308**: 698-705 (2003).
- [12] H. Dong, Z.-L. Zhang, J.-H. Huang, R. Ma, S.-H. Chen, and G. Li. Practical synthesis of an orally active renin inhibitor aliskiren. *Tetrahedron Lett.* **46**: 6337-6340 (2005).
- [13] N. Andrushko, V. Andrushko, T. Thyran, G. König, and A. Börner. Synthesis of enantiopure (r)-2-(4-methoxy-3-(3-methoxypropoxy)-benzyl)-3-methylbutanoic acid - a key intermediate for the preparation of aliskiren. *Tetrahedron Lett.* **49**: 5980-5982 (2008).
- [14] S. Vaidyanathan, D. Limoges, C.-M. Yeh, and H.A. Dieterich, Aliskiren, an orally effective renin inhibitor, shows dose linear pharmacokinetics in healthy volunteers. *Clin. Pharmacol. Ther.* **79**: 64 (PIII-23) (2006).
- [15] C. Jensen, P. Herold, and H.R. Brunner. Aliskiren: The first renin inhibitor for clinical treatment. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**: 399-410 (2008).
- [16] F. Waldmeier, U. Glaenzel, B. Wirz, L. Oberer, D. Schmid, M. Seiberling, J. Valencia, G.-J. Riviere, P. End, and S. Vaidyanathan. Absorption, distribution, metabolism, and elimination of the direct renin inhibitor aliskiren in healthy volunteers. *Drug Metab. Dispos.* **35**: 1418-1428 (2007).
- [17] W. Buczko and J.M. Hermanowicz. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of aliskiren, an oral direct renin inhibitor. *Pharmacol. Rep.* **60**: 623-631 (2008).

- [18] G. Lefevre and S. Gauromb. Automated quantitative determination of the new renin inhibitor cgp 60536 by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* **738**: 129-136 (2000).
- [19] S. Vaidyanathan, V. Warren, C. Yeh, M.-N. Bizot, H.A. Dieterich, and W.P. Dole. Pharmacokinetics, safety, and tolerability of the oral renin inhibitor aliskiren in patients with hepatic impairment. *J. Clin. Pharmacol.* **47**: 192-200 (2007).
- [20] Chemical Tests and Assays, <541> Titrimetric. In *The United States Pharmacopoeia*, 31th Ed. (USP 31), United States Convention, Rockville, USA, 2008, pp.185-187.
- [21] G.A. Shabir, W.J. Lough, S.A. Arain, and T.K. Bradshaw. Evaluation and application of best practice in analytical method validation. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* **30**: 311-333 (2007).
- [22] International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*, Geneva, 2005.
- [23] K.M. Alsante, A. Ando, R. Brown, J. Ensing, T.D. Hatajik, W. Kong, and Y. Tsuda. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**: 29-37 (2007).
- [24] M. Bakshi and S. Singh. Development of validated stability-indicating assay methods-critical review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **28**: 1011-1040 (2002).
- [25] J.R. Bhinge, R.V. Kumar, and V.R. Sinha. A simple and sensitive stability-indicating RP-HPLC assay method for the determination of aceclofenac. *J. Chromatogr. Sci.* **46**: 440-444 (2008).
- [26] R.N. Rao and A.N. Raju. Development and validation of a reversed-phase HPLC method for separation and simultaneous determinations of process-related substances of mirtazapine in bulk drugs and formulations. *J. Chromatogr. Sci.* **47**: 223-230 (2009).
- [27] R.C. Rowe, P.J. Sheskey, and S.C. Owen. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 5th ed. Pharmaceutical Press, Grayslake, 2006.

- [28] R. Thompson and R. LoBrutto. "Role of HPLC in Progress Development". In *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. Y. Kazakevich and R. LoBrutto, Eds. John Wiley & Sons, New Jersey, 2007, pp. 641-677.
- [29] Z. Li. High throughput analysis in support of process chemistry and formulation research and development in the pharmaceutical industry. In *High Throughput Analysis in the Pharmaceutical Industry*. P.G. Wang, Ed. CRC Press, Boca Raton, FL, 2009, pp. 247-278.
- [30] S. Görög. Drug safety, drug quality, drug analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **48**: 247-253 (2008).
- [31] R. LoBrutto and T. Patel. Method validation. In *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. Y. Kazakevich and R. LoBrutto, Eds. John Wiley & Sons, New Jersey, 2007, pp. 455-502.
- [32] B. Dejaegher, Y.V. Heyden. Ruggedness and robustness testing. *J. Chromatogr. A* **1158**: 138-157 (2007).
- [33] M. Zeaiter, J.-M. Roger, V. Bellon-Maurel, and D.N. Rutledge. Robustness of models developed by multivariate calibration. Part I: The assessment of robustness. *Trends Anal. Chem.* **23**: 157-170 (2004).
- [34] P. Barmpalexis, F.I. Kanaze, and E. Georgarakis. Developing and optimizing a validated isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography separation of nimodipine and impurities in tablets using experimental design methodology. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **49**: 1192-1202 (2009).
- [35] G.A. Shabir. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J. Chromatogr. A* **987**: 57-66 (2003).

4 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

4.2 – WRASSE-SANGOI, M.; SECRETTI, L. T.; DIEFENBACH, I. F.; ROLIM, C. M. B.; SANGOI, M. S. Development and validation of an UV spectrophotometric method for the determination of aliskiren in tablets. **Química Nova**, v.33, n.6, p.1330-1334, 2010.

Submetido: 05/11/2009

Revisado: 19/01/2010

Aceito: 11/02/2010

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN UV SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF ALISKIREN IN TABLETS

Micheli Wrasse-Sangoi*, Leonardo Trevisan Secretti, Isabel Fração Diefenbach e Clarice Madalena Bueno Rolim

Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria - RS, Brasil

Maximiliano da Silva Sangoi

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000 Porto Alegre - RS, Brasil

Recebido em 5/11/09; aceito em 11/2/10; publicado na web em 21/5/10

For determination of aliskiren in commercial samples, an analytical UV spectrophotometric method was developed and validate according to ICH guideline. The method was linear in the range between 40 and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($r^2 = 0.9997$, $n = 7$) and exhibited suitable specificity, accuracy, precision, and robustness. It is simple, it has low cost, and it has low use polluting reagents. Therefore, the proposed method was successfully applied for the assay and dissolution studies of aliskiren in tablet dosage forms, and the results were compared to a validated RP-LC method, showing non-significant difference ($P > 0.05$).

Keywords: aliskiren; pharmaceutical formulation; UV spectrophotometry.

INTRODUCTION

Hypertension is a common chronic disease that leads to significant cardiovascular morbidity and mortality worldwide. Blood pressure control is important for the management or prevention of cardiovascular diseases and their complications.¹ New antihypertensive agents with a different mechanism of action may play an important role in the optimal management of hypertension. The key factor in the development of any new antihypertensive agent is its potential to effectively control blood pressure.²

Aliskiren, (2(S),4(S),5(S),7(S)-N-(2-carbamoyl-2-methylpropyl)-5-amino-4-hydroxy-2,7-diisopropyl-8-[4-methoxy-3-(3-methoxypropoxy)phenyl]-octanamide hemifumarate) (Figure 1), the first oral direct renin inhibitor approved for clinical use, exhibits a novel and advantageous pharmacokinetic and pharmacodynamic profile for the long-term treatment of hypertension. Aliskiren blocks the renin system at its rate-limiting step by directly inhibiting the catalytic activity of renin, thereby reducing generation of angiotensin I and angiotensin II.^{3,4}

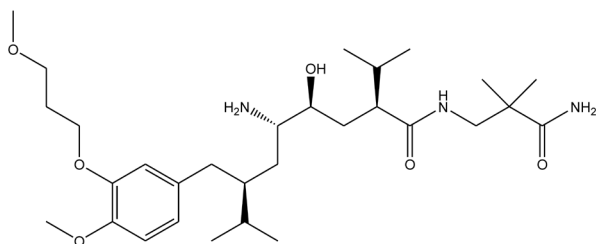


Figure 1. Chemical structure of aliskiren (free base)

The UV-Vis method is very useful in quality control of pharmaceutical products due to the potential of the great majority of the drugs to absorb energy in these wavelengths. The absorption of UV-visible radiation occurs through the excitation of electrons within the molecular structure to a higher energy state. Although the selectivity depends on the chromophore of the drug, the method presents a series of applications: quantification of drugs in formulations where there is

no interference from excipients, pKa determination, release of drugs from formulations with time in dissolution testing, monitoring of the reaction kinetics of drug degradation, and identification of drugs starting from UV spectrum.^{5,6}

Recently, a stability-indicating reversed-phase liquid chromatographic method (RP-LC) method was developed and validated for the determination of aliskiren in tablet dosage forms, using acetonitrile and phosphoric acid solution as mobile phase.⁷ In order to obtain a simpler, cheaper, faster, and less environmental toxic method for the determination of aliskiren in tablet dosage forms, an UV spectrophotometric method was fully validated in this study, employing mainly distilled water, as solvent. The validation procedure was carried out according to the International Conference on Harmonization (ICH) guideline by determination of the following parameters: specificity, linearity, range, precision, accuracy, and robustness.⁸ The validated UV method was applied to quantitative analysis of aliskiren in tablets and *in vitro* dissolution studies, comparing the results with the RP-LC method;⁷ moreover contribute to establish new alternatives with advantages for the quality control of the pharmaceutical formulations and assuring the therapeutic efficacy.

EXPERIMENTAL

Chemicals and reagents

Aliskiren was extracted from commercial tablets (Rasilez™ 300 mg) with ultrapurified water (pH 7.0), filtered and then submitted to a SpeedVac concentrator (Model SPD 1010, Thermo Electron Corporation, Milford, MA, USA) until dryness. The obtained powder was analyzed for purity by the proposed method, RP-LC and by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) methods. To confirm the identity, additional techniques such as diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFT) and nuclear magnetic resonance (NMR) were carried out (data not shown). Nonaqueous titration of weak bases was also performed to determine the degree of purity of the drug according to US Pharmacopeia (USP 32).⁹ A total of six batches of Rasilez™ (Novartis, São Paulo, SP, Brazil) tablets, containing 150 and 300 mg of aliskiren were obtained from commercial sources within their shelf-life period. For all of the analyses, the reagents and solvents used were analytical grade. Ultrapure water

*e-mail: micheliw@yahoo.com.br

was used (Labconco, Kansas City, MO, USA). Aliskiren dosage form was labeled to contain the following excipients: magnesium stearate, macrogol, crospovidone, povidone, microcrystalline cellulose, talc, hypromellose, anhydrous colloidal silica, E171 titanium dioxide, E172 red iron oxide, E172 black iron oxide.

Preparation of aliskiren reference solutions

UV method

The stock solution of aliskiren reference substance was prepared by weighing accurately, 11.23 mg of aliskiren hemifumarate (98.32%), transferred to 10 mL volumetric flask and diluted to volume with methanol, obtaining a concentration of 1 mg mL⁻¹ of aliskiren base. Three hundred and fifty microliters of stock solution was transferred to 5 mL volumetric flask and diluted to volume with water in order to obtain the work solution at concentration of 70 µg mL⁻¹.

RP-LC method

The stock solution of aliskiren reference substance at concentration of 1 mg mL⁻¹ (in methanol) of aliskiren base was prepared. The stock solution was stored at 2-8 °C, protected from light and daily diluted to an appropriate concentration in water.

Preparation of sample solutions

UV method

To prepare the sample solutions, twenty tablets containing 150 and 300 mg of aliskiren were accurately weighed and crushed to a fine powder to obtain the average weight, respectively. Amounts of powdered tablets equivalent to 100 mg of aliskiren was transferred to a 100 mL volumetric flask. After addition of 70 mL water, the flasks were shaken ultrasonically (5 min). The samples were made up to volume with water and centrifuged (10 min). Aliquots (equivalent to 350 µg) of the clear supernatant liquid were transferred to 5 mL volumetric flasks and diluted with water to give a final concentration of 70 µg mL⁻¹.

RP-LC method

An appropriated amount of powdered tablets was transferred into an individual 50 mL volumetric flask and diluted to volume with water. Then the mixture was vortex mixed for 1 min and centrifuged for 10 min. The final concentration of 100 µg mL⁻¹ of the aliskiren was stored at 2-8 °C, protected from light, daily filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore, Bedford, MA, USA), injected and the amount of the drug calculated against the reference solution.

Methods

UV spectrophotometry analysis

A double-beam Shimadzu UV-Vis spectrophotometer (Kyoto, Japan) model UV 1601 PC, with a fixed slit width (2 nm) using 1.0 cm quartz cells was used for all absorbance measurements. The absorbance was measured at 279 nm.

RP-LC analysis

The RP-LC method was performed on a LC system (Shimadzu) equipped with an SCL-10A_{vp} system controller, a LC-10AD_{vp} pump, a DGU-14A degasser, a SIL-10AD_{vp} autosampler, and an SPD-M10A_{vp} photodiode array (PDA) detector.⁷ The peak areas were integrated automatically by computer using a Shimadzu Class VP (v 6.14) software program. The experiments were performed on a reversed phase Waters (Milford, MA, USA) XBridge C₁₈ column (150 × 4.6 mm i.d., with a particle size of 5 µm). A security guard holder was

used to protect the analytical column. The Shimadzu LC system was operated isocratically at ambient controlled temperature (25 °C) using a mobile phase of acetonitrile:water (95:5, v/v)/phosphoric acid (25 mmol L⁻¹, pH 3) (40:60, v/v), run at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹, and using PDA detection at 229 nm. The injection volume was 30 µL.

UV spectrophotometric method validation

Analytical method development and validation play a major role in the discovery, development, and manufacture of pharmaceuticals.¹⁰ The UV spectrophotometric method was validated using samples of tablet dosage forms with the label claim of 300 mg by determination of the following parameters: specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection (LoD), limit of quantitation (LoQ), and robustness following the ICH guideline.⁸

Specificity

Specificity was evaluated by analyzing solutions containing all the components of the aliskiren tablets, excepting the drug. In house mixture of the excipients was prepared in according to the Handbook of Pharmaceutical Excipients.¹¹ The system response was examined for the presence of interference or overlaps with aliskiren responses at 279 nm.

Linearity

The analytical curves were obtained with 7 concentrations of reference solution in the range of 40-100 µg mL⁻¹ (40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100 µg mL⁻¹). Each solution was prepared in triplicate. The linearity was evaluated by linear regression analysis by the least-square regression method, which was used to calculate the correlation coefficient, y-intercept and slope of the regression line. The curves were validated by means of the analysis of variance (ANOVA).

Precision

The precision was determined by repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-day). Repeatability was evaluated assaying 6 determinations at the same concentration (70 µg mL⁻¹), during the same day, under the same experimental conditions. Intermediate precision was analyzed comparing the assays in 3 determinations at the same concentration (70 µg mL⁻¹) during 3 different days. Precision (repeatability and intermediate precision) was expressed as relative standard deviation (RSD).

Accuracy

The accuracy was evaluated applying the proposed method to the analysis of the in house mixture of the excipients with known amounts of the drug, to obtain solutions at concentrations of 56, 70, and 84 µg mL⁻¹, equivalent to 80, 100, and 120% of the nominal analytical concentration, respectively. The accuracy was calculated as the percentage of the drug recovered from the formulation matrix.

LoD and LoQ

LoD/LoQ parameters are not a requirement for drug assay; however, it is always useful to demonstrate that the analyses are being conducted in a region which is above the LoQ value. The LoD and LoQ were calculated based on the standard deviation of the response (y-intercepts of regression lines) and the slope using three independent analytical curves, as defined by ICH. LoD and LoQ were calculated as 3.3 and 10σ/S, respectively, where σ is the standard deviation of the response and S is the slope of the calibration curve.

Robustness and stability

Robustness of the proposed method was determined by the analysis of samples and standard solutions (70 µg mL⁻¹) at different waveleng-

ths (± 5 nm), at different solution temperatures (4 and 25 °C), and at different solution compositions (water; methanol; 0.1 mol L⁻¹ HCl).

To assess the stability of aliskiren, the stability study was performed maintaining the aliskiren working solution in water for 48 h at 2-8 °C, protected from light, looking for the decrease of absorbance compared with those of freshly prepared solutions.

Tablet properties

The average weight, friability, hardness, disintegration time, and content uniformity tests of the coated tablets used in the study (Rasilez™ 150 and 300 mg) were carried out according to Brazilian Pharmacopoeia.¹² Sample sizes of 20 and 10 tablets were used for determination of weight and hardness, respectively. Friability was determined by using a Pharma Test friabilator (Hainburg, Germany) using 20 tablets for 5 min (100 revolutions). The disintegration time was determined using 6 tablets in a disintegration apparatus (Nova Ética, São Paulo, Brazil) without discs at 37 °C, in water.

In vitro dissolution studies

The dissolution rate studies of aliskiren from tablets were performed on a paddle-stirrer type of apparatus by a Nova Ética dissolution test system (São Paulo, Brazil). Drug release tests were carried out according to conventional dissolution procedures recommended for single-entity products in 900 mL of different media of 0.1 mol L⁻¹ HCl (50 and 75 rpm), phosphate solution pH 4.5 (50 and 75 rpm), phosphate solution pH 6.8 (50 and 75 rpm), and distilled water (50 and 75 rpm), for 45 min.^{13,14} The temperature of the cell was maintained at 37 ± 0.5 °C by using a thermostatic bath. At each sample time interval, an exact volume of the sample was withdrawn from each flask and immediately replaced with an identical volume of fresh medium to maintain a dissolution sink condition. A correction factor was included in the calculations to account for the drug lost in the sampling. At predetermined time intervals (0, 5, 10, 15, 20, 30, and 45 min) for the development of the methodology and for the dissolution studies, the concentrations of aliskiren in the dissolution medium were determined by the proposed UV spectrophotometric method, that were diluted in according to the linearity of analytical method. The cumulative percentage of drug released was plotted against time, in order to obtain the release profile and to calculate the *in vitro* dissolution data ($n = 12$) by the linear regression equation.¹²

Analysis of aliskiren in pharmaceutical formulations

For the quantitation of aliskiren in the tablet dosage forms, the respective stock solutions were diluted to appropriate concentration, filtered, analyzed in triplicate and the percentage recoveries of the drug calculated against the reference substance for UV spectrophotometric and RP-LC methods, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

UV spectrophotometric method validation

Due to the high solubility of the drug in water, this was chosen as diluting solution. Initially, an UV spectroscopic scanning run allowed selecting the wavelength of 279 nm as the best for the detection of aliskiren in the reference solution as well as in sample solutions (Figure 2).

Specificity

In order to verify the absence of interferences of the excipients on the analysis of aliskiren in tablets, we carried out the analysis of

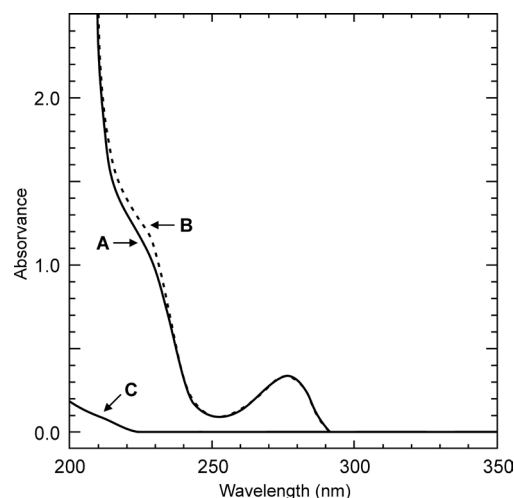


Figure 2. UV spectra of aliskiren solutions in distilled water: (A) reference substance, (B) tablet dosage form and (C) in house mixture of the excipients

a sample prepared with all the excipients present in the tablets, but without the drug (in house mixture of the excipients). Absorption spectra did not show any potential interference of the tablet excipients at 279 nm, also shown in Figure 2.

Linearity

A linear relationship was found between the absorbance and the concentration of aliskiren in the range of 40 to 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The correlation coefficient was 0.9997 indicating excellent linearity ($r^2 > 0.999$). The representative linear equation was $y = 0.0045x + 0.0163$, calculated by the least squares method. The analytical data were validated by means of ANOVA that demonstrated significant linear regression (f calculated = 1172.64 $>$ f critical = 4.6; $P = 5\%$) and no significant deviation from linearity (f calculated = 0.63 $<$ f critical = 2.96; $P = 5\%$).

Precision and accuracy

The intra-day and inter-day relative standard deviation (RSD) values obtained by the proposed method were found to be lower than 2.0%. The accuracy of the method expressed as recovery (%) was between 101.55 and 101.88%. Results are given in Tables 1 and 2, respectively.

Table 1. Intra-day and inter-day precision data of UV spectrophotometric method for aliskiren in tablet dosage form

Precision	Experimental concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recovery (%)	RSD ^a (%)
Intra-day ($n = 6$)	72.49	103.56	0.91
Inter-day			
Day 1 ($n = 3$)	73.90	105.57	0.74
Day 2 ($n = 3$)	74.11	105.87	0.90
Day 3 ($n = 3$)	72.52	103.60	0.81
Mean ($n = 9$)	73.51	105.01	1.23

^aRSD = Relative standard deviation.

LoD and LoQ

The values calculated for LoD and LoQ were 2.55 and 8.49 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively.

Robustness and stability

The reliability of the proposed method was also evaluated by means of the robustness test. The selected variables evaluated in

Table 2. Results from accuracy of the UV spectrophotometric method for aliskiren

Nominal concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Mean concentration found ^a ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RSD ^b (%)	Accuracy (%)
56	56.87	0.21	101.55
70	71.26	0.88	101.80
84	85.58	0.99	101.88
Mean recovery (%)			101.74

^aMean of three replicates. ^bRSD = Relative standard deviation.

the robustness testing are given in Table 3. No significant difference could be observed in the results found out, thus demonstrating that the method was robust. Moreover, the stability of the analytical solution was analyzed and it was found to be stable up to 48 h, showing non-significant change (< 2%) relative to freshly prepared samples.

Table 3. Conditions investigated during robustness test

Variable	Conditions investigated	Absorbance		Drug content (%)
		Reference solution ^a ($70 \mu\text{g mL}^{-1}$)	Sample solution ^a ($70 \mu\text{g mL}^{-1}$)	
Wavelength (nm)	274	0.351	0.358	101.99
	279	0.307	0.312	101.63
	284	0.312	0.314	100.64
Solution temperature (°C)	4	0.310	0.311	100.32
	25	0.311	0.313	100.64
Solution composition	water	0.314	0.311	99.04
	methanol	0.336	0.333	99.11
	0.1 mol L ⁻¹ HCl	0.309	0.312	100.97
Solution stability	24 h	0.312 ^b	0.315	100.96
	48 h	0.311 ^b	0.315	101.29

^aMean of 3 replicates. ^bFreshly prepared solutions.

Tablet properties

According to the pharmacopeial requirements, the physicochemical characteristics of the tablets were evaluated. Table 4 shows the data from average weight, hardness, friability, disintegration time, and content uniformity. A good degree of content uniformity was achieved for the tablet formulations prepared, and the percent deviation did not exceed 5%, indicating excellent content uniformity. Hardness and friability tests evaluate the resistance of tablets to crushing and to friction, respectively. According to the Brazilian Pharmacopeia,¹² tablets should have a minimal hardness of 30 N and maximum friability of 1.5%. The tablet formulations fulfilled the compendial requirement for disintegration time for coated tablets (< 30 min). Therefore, the results presented showed that the tablet dosage forms evaluated were in accordance to the official specifications, and these can be suitable for application in dissolution studies.

Table 4. Quality control tests of commercial aliskiren tablets

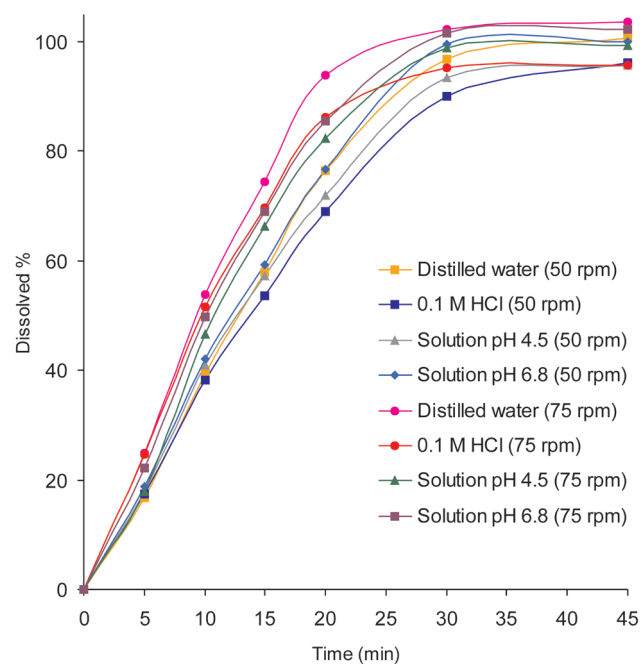
Tablet dosage form (mg)	Average weight (mg) ($n = 20$) (Weight variation)	Friability (%) ($n = 20$)	Hardness (N) ($n = 10$)	Disintegration time (min) ($n = 6$)	Content uniformity (%) ($n = 10$)		
					Lower	Higher	RSD (%)
150	355.86 (346.5 - 362.4)	0.08	121.16	13.3	96.62	97.47	0.27
300	710.10 (695.0 - 720.1)	0.08	208.31	20.0	91.94	101.14	3.33
Limits ^a	Average weight $\pm 5\%$	Max. 1.5%	Min. 30 N	Max. 30 min	85 - 115%		≤ 6.00

^aRef. 12. ^bRSD = Relative standard deviation.

In vitro dissolution studies

Dissolution testing is one of the tests most used in the characterization of drugs and in the quality control of dosage forms.¹⁵ It was introduced in the 1960s and has evolved into a test that pharmaceutical manufacturers hope will better predict the *in vivo* performance of drug products. Dissolution testing is also a requirement for regulatory approval for product marketing and is a vital component of the overall quality control program.¹⁶

The *in vitro* studies were performed using 8 different dissolution conditions. According to USP 32,⁹ dissolution medium may be water, an aqueous solution (typically pH 4.0 to 8.0) or a dilute acid solution (0.001 to 0.1 mol L⁻¹ HCl). Due to the drug is a hydrophilic molecule with high aqueous solubility,¹⁷ surfactants and electrolytes were not added. As shown in Figure 3 the best dissolution rate profile was achieved with 0.1 mol L⁻¹ HCl as the medium with a paddle rotating at 50 rpm. This medium showed better discrimination and is similar to the physiological conditions, and was chosen to carry out the dissolution tests of the batches of aliskiren containing 150 and 300 mg. The concentrations of aliskiren in the dissolution medium were evaluated using the proposed UV spectrophotometric and RP-LC methods giving non-significant difference (data not shown), and the coefficients of variation at the earlier time points, up to 15 min, were within 7.93-9.29% (acceptable < 20%) and the other time points within 0.99-6.12% (acceptable < 10%) ($n = 12$).¹⁴

**Figure 3.** Comparison of dissolution profiles of aliskiren tablets in different dissolution media with paddles (Apparatus 2) using the proposed UV method

Comparative determination of aliskiren in commercial samples by the methods

The validated UV spectrophotometric method was applied for the determination of aliskiren in tablet dosage forms and the results compared to those obtained using the validated RP-LC method giving mean values 0.28% higher, as shown in Table 5. The experimental values of the two methods were compared statistically by ANOVA showing non-significant difference ($P > 0.05$). The proposed method can be useful for the determination of aliskiren without prior separation of the excipients of the formulation, with the advantage of low use of polluting reagents and very short analysis time. This simpler analytical technique was employed without losing performance, compared to RP-LC method, which leads to an affordable method and represents an improvement for the quality control of pharmaceuticals.

Table 5. Comparative determination of aliskiren in tablet dosage forms by UV spectrophotometric and RP-LC methods

Sample	Dosage form (mg)	Experimental amount ^a					
		UV method				RP-LC method	
		(mg)	%	RSD ^b (%)	(mg)	%	RSD ^b (%)
1	150	154.32	102.88	0.26	153.31	102.21	0.15
2	150	153.09	102.06	0.27	153.26	102.17	0.21
3	300	304.53	101.51	0.27	304.05	101.35	0.24
4	300	306.72	102.24	0.41	305.34	101.78	0.29

^aMean of 3 replicates. ^bRSD = Relative standard deviation.

CONCLUSIONS

The UV spectrophotometric method validated has non-significant difference to RP-LC method and was adequately applied to the quantitative analysis of aliskiren in tablets and *in vitro* dissolution studies without any interference from the excipients, widely used in routine of quality control laboratories. The UV method is cheap, fast, and produces very low levels of dangerous residues promoting benefits to the public health and the environment.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank CNPq for the financial support.

REFERENCES

- Lam, S.; Choy, M.; *Cardiol. Rev.* **2007**, *15*, 316.
- Schmieder, R. E.; *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* **2006**, *7*, S16.
- Daugherty, K. K.; *Am. J. Health-Syst. Pharm.* **2008**, *65*, 1323.
- Vaidyanathan, S.; Jarugula, V.; Dieterich, H. A.; Howard, D.; Dole, W. P.; *Clin. Pharmacokinet.* **2008**, *47*, 515.
- Paim, C. S.; Gonçalves, H.; Lange, A.; Miron, D.; Steppe, M.; *Anal. Lett.* **2008**, *41*, 571.
- Watson, G. D.; *Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*, 2nd ed.; Churchill Livingstone: London, 2005, p. 97-116.
- Wrasse-Sangoi, M.; Sangoi, M. S.; Oliveira, P. R.; Secretti, L. T.; Rolim, C. M. B.; *J. Chromatogr. Sci.*, in press.
- International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*, Geneva, November, 2005, p. 1-13.
- USP 32, *The United States Pharmacopeia/The National Formulary*, 32th ed.; United States Pharmacopeial Convention: Rockville, 2009.
- Shahir, G. A.; Lough, W. J.; Arain, S. A.; Bradshaw, T. K.; *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **2007**, *30*, 311.
- Rowe, R. C.; Sheskey, P. J.; Owen, S. C., eds.; *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 5th ed., Pharmaceutical Press: Grayslake, 2006.
- Farmacopéia Brasileira, 4^a ed., Atheneu, São Paulo, 1988.
- Moore, J. W.; Flanner, H. H.; *Pharm. Technol.* **1996**, *20*, 64.
- FDA; *Guidance for Industry: Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms*, U.S. Food and Drug Administration: Rockville, 1997.
- Ford, J. L.; Rajabi-Siahboomi, A. R. In *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*; Swarbrick, J.; Boylan, J. C., eds.; Marcel Dekker: New York, 2002, p. 717-728.
- Allen Jr., L. V.; Popovich, N. G.; Ansel, H. C. In *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 8th ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2005, p. 227-259.
- Luft, F. T.; Weinberger, M. H.; *Kidney Int.* **2008**, *73*, 679.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Os métodos analíticos são fundamentais para a identificação, quantificação, estudos de dissolução e análises de fármacos, produtos farmacêuticos, e amostras em matrizes biológicas. Nesse contexto, observa-se que o alisquireno é um produto farmacêutico de lançamento recente no mercado mundial, com estudos realizados principalmente na área clínica e farmacológica. Nesse sentido, o estudo de metodologias analíticas para determinar a qualidade das formulações farmacêuticas torna-se necessária.

Diversos parâmetros devem ser avaliados durante o desenvolvimento, otimização e validação de um método analítico de quantificação. Porém, também deve-se avaliar características do método como simplicidade de execução, tempo necessário para realizar as análises, geração de resíduos e custos de materiais e equipamentos necessários para seu desenvolvimento.

Observa-se que a discussão apresentada a seguir baseia-se nos dois artigos aceitos para publicação, referenciados adequadamente, no texto correspondente.

A CL possibilita a separação e quantificação de diferentes componentes de uma formulação farmacêutica através da escolha adequada dos parâmetros do sistema como colunas, fase móvel e método de detecção. Desenvolveu-se e validou-se procedimento para a determinação de alisquireno em formulações farmacêuticas, conforme demonstrado na **PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 4.1**.

Durante o desenvolvimento do método, diferentes colunas foram testadas. O método proposto empregou coluna cromatográfica C₁₈, de amplo uso em laboratórios de controle de qualidade de medicamentos, que obteve melhor desempenho cromatográfico, além de proporcionar melhor separação dos produtos de degradação. Também, foram realizados vários testes utilizando diferentes fases-móveis, como combinações dos solventes orgânicos, acetonitrila e metanol, com soluções tamponantes de acetato de amônio, fosfato de potássio e ácido fosfórico em diferentes proporções, na faixa de pH entre 3 a 7. A fase móvel constituída por solução aquosa de acetonitrila (95%) e ácido fosfórico 25 mM pH 3,0 na proporção de 40:60 (v/v), eluída na vazão de 1 mL/min, mostrou-se a mais adequada, proporcionando tempo de retenção reprodutível de, aproximadamente, 3,68 minutos, boa eficiência (pratos teóricos > 6000) e simetria (< 2%). Para avaliar a especificidade do método, a substância química de referência de alisquireno foi submetida à degradação forçada em meio ácido, alcalino, neutro, oxidativo, e fotolítico. Os cromatogramas obtidos mostram que

os picos dos produtos de degradação encontraram-se bem resolvidos em relação ao alisquireno (Figura 2). Além disso, utilizando o detector de arranjo de diodos (DAD), verificou-se que a substância química de referência permaneceu com elevada pureza em todas as determinações, demonstrando a especificidade e que o procedimento também pode ser usado para avaliação da estabilidade. A ausência de interferência dos excipientes da formulação e do ácido fumárico foram também avaliadas na especificidade do método. O método apresentou regressão linear significativa $r = 0,9999$, na faixa de concentração de 10-300 $\mu\text{g/mL}$. Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária apresentaram coeficientes de variação inferiores a 0,92% (Tabela 1), o que mostra a precisão do método proposto, destacando-se que a literatura preconiza coeficiente de variação (CV) menor ou igual a 2,0%. O valor médio experimental do teste de exatidão foi de 99,55%, conforme Tabela 2, demonstrando exatidão significativa, pois o valor percentual sugerido é de $100 \pm 2\%$ em relação ao declarado (SHABIR, 2003; SHABIR *et al.*, 2007). O método proposto foi avaliado, ainda, quanto a sua sensibilidade. Foram realizados os cálculos de limite de detecção (LoD) e limite de quantificação (LoQ). Os valores obtidos foram: LoD de 2,38 $\mu\text{g/mL}$ e LoQ de 7,93 $\mu\text{g/mL}$. Os baixos valores de LoQ e LoD indicam a boa sensibilidade do método. A robustez do método analítico foi avaliada através de uma metodologia de superfície de resposta, experimento que permite realizar a variação de um número relativamente elevado de fatores em um número relativamente pequeno de experimentos (Tabela 3). Os fatores selecionados representam aqueles mais susceptíveis a mudanças quando o método é transferido para outros laboratórios, analistas ou instrumentos e que, potencialmente, podem influenciar a resposta (HEYDEN *et al.*, 2001). A análise estatística dos dados experimentais foi realizada por análise de variância (ANOVA) que demonstrou que os fatores selecionados não foram significantes ($P < 0,05$). Os resultados obtidos na verificação da performance do sistema cromatográfico mostraram que o equipamento e condições da metodologia são adequados para assegurar a confiabilidade, exatidão e precisão dos dados analíticos ($CV < 2,0\%$). Demonstrando-se, portanto, que o método proposto cumpre os requisitos preconizados pela literatura em relação à validação, podendo ser empregado para análise de alisquireno em formulações farmacêuticas. A determinação quantitativa dos comprimidos selecionados para esse estudo forneceu resultados médios entre 99,16 e 102,58%, conforme a Tabela 5, estando em acordo com os parâmetros de qualidade preconizados entre 95 e 105% (USP 32, 2009; ICH, 2005, SHABIR, 2003). O método proposto mostrou-se adequado para determinação quantitativa de alisquireno em

comprimidos, apresentando boa sensibilidade, especificidade, linearidade, precisão e exatidão, podendo ser empregado para o controle de qualidade de alisquireno.

A espectrofotometria na região do UV/visível é um método muito utilizado no controle de qualidade de produtos farmacêuticos pelo potencial da grande maioria dos fármacos de absorver energia nessas regiões. Mesmo apresentando seletividade dependente do grupamento cromóforo presente, o método apresenta uma série de aplicações na quantificação de fármacos em produtos farmacêuticos onde não existe a interferência dos excipientes, determinação de pKa, liberação do fármaco em ensaios de dissolução, monitoramento da cinética de degradação e identificação de fármacos através do comprimento de absorção máxima em determinado solvente (CIURCZAK, 1998; WATSON, 2005). Para determinação do alisquireno em comprimidos e estudos de dissolução, desenvolveu-se e validou-se método espectrofotométrico, de acordo com as normas preconizadas pelo ICH (2005), conforme demonstrado na **PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 4.2**.

A espectrofotometria é um dos métodos de maior simplicidade em termos de execução e custo, já que os solventes e equipamentos necessários possuem um custo relativamente baixo, além da rapidez de execução das análises. Porém, métodos espectrofotométricos possuem desvantagens, como não serem específicos, no caso de substâncias com estruturas químicas semelhantes. Devido aos altos níveis de descarte de resíduos tóxicos ao meio ambiente emitidos pelos métodos cromatográficos, optou-se então pelo desenvolvimento de uma metodologia mais simples, onde o preparo da amostra fosse de fácil execução e os solventes utilizados apresentassem toxicidade mais baixa, e que pudesse ainda ser utilizada para a determinação do alisquireno em testes de dissolução. A metodologia foi validada através da avaliação dos parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação, e robustez. A especificidade do método foi avaliada através da pesquisa da possível interferência dos excipientes dos comprimidos na determinação quantitativa de alisquireno, na qual, não foi detectada no máximo de absorção de 279 nm. A linearidade foi determinada pela construção de três curvas analíticas na faixa de 40-100 µg/mL ($r^2 = 0,9997$). O LoD e o LoQ foram calculados baseados nas curvas de calibração produzidas nos diferentes dias. Os valores encontrados para os limites de detecção e quantificação foram de 2,55 e 8,49 µg/mL, respectivamente, com sensibilidade semelhante ao método por CL. Os dados obtidos durante a avaliação da precisão apresentaram CV% inferiores a 1,23% (tabela 1), estando de acordo com a literatura, que preconiza coeficiente de variação menor ou igual a 2% (SHABIR, 2003). A exatidão média foi de 101,74% com coeficiente de variação menor que 0,99%, demonstrando exatidão significativa (Tabela 2). A

robustez do método foi avaliada quanto aos seguintes parâmetros: diferentes comprimentos de ondas (± 5 nm), diferentes soluções diluentes (água, metanol, ácido clorídrico 0,1 M), e diferentes temperaturas das soluções (4 e 25 °C) (Tabela 3). Os resultados obtidos não demonstraram diferença significativa na quantificação da amostra com as alterações realizadas, demonstrando assim, ser robusto para essas pequenas variações. Dessa forma, o método foi aplicado no doseamento de alisquireno em comprimidos e os resultados avaliados foram comparados com aqueles obtidos na validação do método por CL, com valor médio 0,28% maior (Tabela 5). Os valores experimentais dos dois métodos foram comparados estatisticamente por ANOVA observando-se que não há diferenças significativas dos resultados ($P > 0,05$). Demonstrou-se, desse modo, que ambos os métodos desenvolvidos são adequados e podem ser aplicados para análise de rotina de controle de qualidade de comprimidos de alisquireno, pois são métodos rápidos, de fácil execução, e cumprem com os requisitos de validação.

As formas sólidas administradas por via oral possuem ampla prescrição clínica devido à praticidade e maior segurança proporcionada pela dosagem unitária. Os comprimidos de alisquireno foram submetidos aos testes físico-químicos e especificações preconizadas para o controle lote a lote (F. Bras., 1988). Os resultados mostram que os produtos analisados cumprem os limites de peso médio especificados com variações inferiores a 7,5% para os comprimidos na concentração de 150 mg, e de 5% para os de 300 mg. Do mesmo modo, a desagregação em partículas menores ou grânulos ocorreu em tempo inferior a 30 minutos, sendo adequada para dissolução e absorção do fármaco. O teste de friabilidade forneceu valores de 0,08%, inferiores ao limite de 1,5%. A aplicabilidade do método espectrofotométrico ao teste de uniformidade de conteúdo permitiu-nos verificar a distribuição do fármaco em cada unidade do produto. Os valores individuais encontrados variaram de 91,94% a 101,14%, com coeficiente de variação inferior a 3,33%. Os resultados demonstram que o produto analisado está dentro da faixa de 85 a 115%, com coeficiente de variação inferior a 6%, conforme preconizado pela Farmacopéia Brasileira (1988). Por sua vez, submetidos ao teste de dureza, os comprimidos apresentaram valores acima do mínimo estabelecido de 30 N (Tabela 4), demonstrando que os produtos acabados cumprem os parâmetros de qualidade.

O teste de dissolução foi desenvolvido e otimizado para estudar a liberação do alisquireno da forma farmacêutica comprimido, observando-se nesse sentido que não foram encontrados métodos na literatura. Assim, desenvolveu-se procedimento com base na alta solubilidade em água, testando diferentes condições, meios e velocidades de rotação, até

atingir a condição selecionada com melhor perfil de liberação do fármaco, conforme observado na Figura 3. Os perfis de dissolução mostraram percentagens de fármaco dissolvidas superiores a 85% em 30 minutos, valores considerados adequados conforme descrito na literatura (SHAH *et al.*, 1995; FDA, 1997). Os dados experimentais obtidos na determinação da estabilidade das soluções da substância de referência e da amostra de comprimidos no meio de dissolução encontram-se na faixa estabelecida (98-102%), demonstrando que o alisquireno é estável sob as condições estudadas.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- ✓ O método cromatográfico em fase reversa com detecção no UV desenvolvido e validado mostrou-se específico, linear, preciso, exato, sensível e robusto para análise quantitativa de alisquireno em comprimidos.
- ✓ O método espectrofotométrico no UV desenvolvido e validado mostrou-se adequado, apresentando simplicidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, além de produzir baixos níveis de resíduos tóxicos promovendo benefícios à saúde pública e ao meio ambiente, podendo ser empregado tanto para o doseamento como para a determinação de alisquireno em estudos de dissolução nesta forma farmacêutica.
- ✓ A análise comparativa entre os métodos propostos para a determinação quantitativa de alisquireno em comprimidos demonstrou não haver diferença significativa entre eles ($P > 0,05$), sugerindo sua aplicação para a área de controle da qualidade de medicamentos.
- ✓ O método validado por espectrofotometria no UV foi adotado para avaliar a percentagem dissolvida dos comprimidos de alisquireno. O uso de 900 mL de ácido clorídrico 0,1 M a $37 \pm 0,5$ °C, aparato pá, com velocidade de 50 rpm, demonstraram resultados satisfatórios para a análise da dissolução de comprimidos contendo alisquireno.
- ✓ Os testes físico-químicos demonstraram a qualidade dos lotes de comprimidos adotados para o estudo, que cumpriram com especificações farmacopéicas.
- ✓ Os métodos desenvolvidos e validados no presente trabalho constituem-se em procedimentos importantes para o controle da qualidade de formulações farmacêuticas contendo alisquireno, contribuindo para garantir a segurança e eficácia terapêutica dos produtos farmacêuticos disponíveis no País.

7 REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

ACHIRA, M. *et al.* Comparative studies to determine the selective inhibitors for P-glycoprotein and cytochrome P4503A4. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 1, n. 4, p. E18, 1999.

ADAMS, E. *et al.* Application of linear mixed models to the evaluation of dissolution profiles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 226, p. 107-125, 2001.

ALLEN JR., L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems**. 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

ALSANTE, K. M. *et al.* The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 1, p. 29-37, 2007.

ANDRUSHKO, N. *et al.* Synthesis of enantiopure (R)-2-(4-methoxy-3-(3-methoxypropoxy)-benzyl)-3-methylbutanoic acid - a key intermediate for the preparation of Aliskiren. **Tetrahedron Letters**, v. 49, n. 41, p. 5980-5982, 2008.

ANSARI, M.; KAZEMIPOUR, M.; TALEBNIA, J. The development and validation of dissolution method for clomipramine solid dosage form. **Dissolution Technologies**, v. 11, n. 3, p. 16-24, 2004.

ANTIKAINEN, R. L. *et al.*, Trends in the prevalence, awareness, treatment and control of hypertension: The WHO MONICA project. **European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation**, v. 13, p. 13-29, 2006.

AYALASOMAYAJULA, S., *et al.* A study of the pharmacokinetic interactions of the direct renin inhibitor aliskiren with allopurinol, celecoxib and cimetidine in healthy subjects. **Current Medical Research and Opinion**, v. 24, n. 3, p. 717-720, 2008.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods - critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, n. 6, p. 1011-1040, 2002.

BARMPALEXIS, P.; KANAZE, F. I.; GEORGARAKIS, E. Developing and optimizing a validated isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography separation of nimodipine and impurities in tablets using experimental design methodology. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 1192-1202, 2009.

BHINGE, J. R.; KUMAR, R. V.; SINHA V. R. A simple and sensitive stability-indicating RP-HPLC assay method for the determination of aceclofenac. **Journal of Chromatographic Science**, v. 46, p. 440-444, 2008.

BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. Brasília, Diário Oficial da União, 2003.

BROWN, M. J. Aliskiren. **Circulation**, v. 118, n. 7, p. 773-784, 2008.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman. As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006.

BUCZKO, W.; HERMANOWICZ, J. M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of aliskiren, an oral direct renin inhibitor. **Pharmacological Reports**, v. 60, n. 5, p. 623-631, 2008.

CHAPLIN, S.; SEVER, P. Aliskiren: First direct renin inhibitor for essential hypertension. **Prescriber**, v. 5, p. 48-51, 2008.

CHENG, J. W. M. *et al.* Aliskiren: Renin inhibitor for hypertension management. **Clinical Therapeutics**, v. 30, n. 1, p. 31-47, 2008.

CHOBANIAN, A. C. *et al.*, The seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. The JNC 7 report. **Journal of the American Medical Association**, v. 289, p. 2560-2572, 2003.

CIURCZAK, E. W. Validation of spectroscopic methods in pharmaceutical analyses. **Pharmaceutical Technology**, v. 22, n. 3, p. 92-100, 1998.

COHEN, N. C. Structure-based drug design and the discovery of Aliskiren (Tekturna (R)): Perseverance and creativity to overcome a R&D pipeline challenge. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 70, p. 557-565, 2007.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Ed. da UNICAMP, 2006.

CRANWELL-BRUCE, L. A. Antihypertensives. **MEDSURG Nursing**, v. 17, n. 5, p. 337-341, 2008.

DALLA VESTRA, M.; SIMIONI, N.; MASIERO, A. Aliskiren: A new inhibitor of renin-angiotensin aldosterone system activity. **Minerva Endocrinologica**, v. 34, n. 4, p. 333-338, 2009.

DAUGHERTY, K. K. Aliskiren. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 65, n. 14, p. 1323-1332, 2008.

DEJAEGHER, B.; HEYDEN, Y. V. Ruggedness and robustness testing. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 138-157, 2007.

DIETERLE, W. *et al.* Pharmacokinetic interactions of the oral renin inhibitor aliskiren with lovastatin, atenolol, celecoxib and cimetidine. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 43, n. 11, p. 527-535, 2005.

DIETRICH, H.-A., *et al.* Lack of pharmacokinetic interaction between the oral direct renin inhibitor aliskiren and pioglitazone or fenofibrate in healthy volunteers. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 101, sup. 1, p. 135-136, 2007.

DOCKERY, B. K.; BISOGNANO, J. D. Direct renin inhibition: An analysis of possible benefits. **Current Hypertension Reports**, v. 10, n. 4, p. 313-318, 2008.

DONG, H. *et al.* Practical synthesis of an orally active renin inhibitor aliskiren. **Tetrahedron Letters**, v. 46, n. 37, p. 6337-6340, 2005.

DONG, Y. F. *et al.* Aliskiren prevents cardiovascular complications and pancreatic injury in a mouse model of obesity and type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 53, n. 1, p. 180-191, 2010.

DRESSMAN, J. B. *et al.* Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: Immediate release dosage forms. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 1, p. 11-22, 1998.

DUBOIS, E. A.; COHEN, A. F. Aliskiren. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 68, n. 5, p. 653-654, 2009.

EMA - **European Medicines Agency**. Disponível em: <<http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/enviage/enviage.htm>>. Acesso em: 06 jun. 2008.

EMA - **European Medicines Agency**. Disponível em: <<http://www.ema.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/rasilezHCT/emea-combined-h964en.pdf>>. Acesso em: 17 mar. 2009.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part 1: An integrated approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 755-767, 2001.

ERMER, J.; MILLER, J. H. M. **Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice**. Weinheim: Wiley-VCH, 2005, p. 101-119.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4 ed. São Paulo, Atheneu, 1988.

FDA - **Food and Drug Administration**, Center for Drug Evaluation and Research, Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms, August 1997.

FELDMAN, D. L. New insights into the renoprotective actions of the rennin inhibitor aliskiren in experimental renal disease. **Hypertension Research**, v. 33, p. 279-287, 2010.

FERRARIO, C. M. Addressing the theoretical and clinical advantages of combination therapy with inhibitors of the renin-angiotensin-aldosterone system: Antihypertensive effects and benefits beyond BP control. **Life Sciences**, v. 86, n. 9-10, p. 289-299, 2010.

FISHER, N. D. L. *et al.* Renal and hormonal responses to direct renin inhibition with aliskiren in healthy humans. **Circulation**, v. 117, n. 25, p. 3199-3205, 2008.

FORTUNATO, D. Dissolution method development for immediate release solid oral dosage forms. **Dissolution Technologies**, v. 12, n. 3, p. 12-14, 2005.

FRAMPTON, J. E.; CURRAN, M. P. Aliskiren: A review of its use in the management of hypertension. **Drugs**, v. 67, n. 12, p. 1767-1792, 2007.

FRIEDRICH, R. B. *et al.* Validation of a simple and rapid UV spectrophotometric method for dexamethasone assay in tablets. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1052-1054, 2009.

FURLANETTO, S. *et al.* Optimization of dissolution test precision for ketoprofen oral extended-release product. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 159-165, 2003.

GADDAM, K. K. *et al.*, Hypertension and cardiac failure in its various forms. **Medical Clinics of North America**, v. 93, p. 665-680, 2009.

GÖRÖG, S. Drug safety, drug quality, drug analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, n. 2, p. 247-253, 2008.

GRADMAN, A. H. *et al.*, Aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor, provides dose-dependent antihypertensive efficacy and placebo-like tolerability in hypertensive patients. **Circulation**, v. 111, p. 1012-1018, 2005.

GRADMAN, A. H.; KAD, R. Renin inhibition in hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 51, n. 5, p. 519-528, 2008.

GRADMAN, A. H.; PINTO, R.; KAD, R. Current concepts: renin inhibition in the treatment of hypertension. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 8, p. 120-126, 2008.

HANESSIAN, S.; GUESNÉ, S.; CHÉNARD, E. Total Synthesis of "Aliskiren": The First Renin Inhibitor in Clinical Practice for Hypertension. **Organic Letters**, v. 12, n. 8, p. 1816-1819, 2010.

HERSHEY, J. C. *et al.*, Renin inhibitors: An antihypertensive strategy on the verge of reality. **Drug Discovery Today**, v. 2, n. 3, p. 181-185, 2005.

HEYDEN, Y. *et al.*, Guidance for robustness/ruggedness test in method validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 723-753, 2001.

HOUSTON, M. C. Handbook of Hypertension. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2009.

ICH - **International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2)**, 2003.

ICH - **International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Guideline on validation of analytical procedure: Text and Methodology Q2(R1)**, 2005.

ICH - **International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Guideline on impurities in new drug substances Q3A(R2)**, 2006.

IWANAMI, J. *et al.* Inhibition of the renin-angiotensin system and target organ protection. **Hypertension Research**, v. 32, n. 4, p. 229-237, 2009.

JENSEN, C.; HEROLD, P.; BRUNNER, H. R. Aliskiren: The first renin inhibitor for clinical treatment. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 5, p. 399-410, 2008.

JORDAN, J. *et al.*, Direct renin inhibition with aliskiren in obese patients with arterial hypertension. **Hypertension**, v. 49, p. 1047-1055, 2007.

KALUS, J. S. Aliskiren - A novel oral renin inhibitor for the treatment of hypertension. **Formulary**, v. 41, n. 12, p. 631-638, 2006.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **HPLC for Pharmaceutical Scientists**. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2007.

KEARNEY, P. M. *et al.* Global Burden of hypertension: Analysis of worldwide data. **Lancet**, v. 365, p. 217-223, 2005.

LAGACE, M. *et al.* Developing a discriminatory dissolution procedure for a dual active pharmaceutical product with unique solubility characteristics. **Dissolution Technology**, v. 11, n. 1, p. 13-17, 2004.

LAM, S.; CHOY, M. Aliskiren – An oral renin inhibitor for the treatment of hypertension. **Cardiology in Review**, v. 15, p. 316-323, 2007.

LAMBERS-HEERSPINK, H. J.; PERKOVIC, V.; DE ZEEUW, D. Renal and cardio-protective effects of direct renin inhibition: a systematic literature review. **Journal of Hypertension**, v. 27, n. 12, p. 2321-2331, 2009.

LEFÈVRE, G.; DUVAL, M.; PONCIN, A. Direct micro-radioimmunoassay of the new renin inhibitor CGP 60536. *Journal of Immunoassay*, v. 21, n. 1, p. 65-84, 2000.

LEFÈVRE, G.; GAURON, S. Automated quantitative determination of the new renin inhibitor CGP 60536 by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 738, n. 1, p. 129-136, 2000.

LINDSAY, K. B.; SKRYDSTRUP, T. Formal total synthesis of the potent renin inhibitor aliskiren: Application of a SmI₂-promoted acyl-like radical coupling. **Journal of Organic Chemistry**, v. 71, n. 13, p. 4766-4777, 2006.

LUFT, F.; WEINBERGER, M. Antihypertensive therapy with aliskiren. **Kidney International**, v. 73, n. 6, p. 679-683, 2008.

MAIBAUM, J. *et al.* Structural modification of the P2' position of 2,7-dialkyl-substituted 5(S)-Amino-4(S)-hydroxy-8-phenyl-octanecarboxamides: The discovery of aliskiren, a potent nonpeptide human renin inhibitor active after once daily dosing in marmosets. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 4832-4844, 2007.

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, p. 375-399, 2002.

MANCIA, G. *et al.* Guidelines for the management of arterial hypertension: the task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). **Journal of Hypertension**, v. 25, n. 6, p. 1105-1187, 2007.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. 2003. 117f. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MARQUES, M.; BROWN, W. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. **Revista Analytica**, v. 1, p. 48-51, 2002.

MESSERLI, F. H.; BANGALORE, S. Antihypertensive efficacy of aliskiren is hydrochlorothiazide an appropriate benchmark? **Circulation**, v. 119, p. 371-373, 2009.

METHA, A. C. Quality management in drug analysis. **Analyst**, v. 122, p. 83R-88R, 1997.

MOORE, J. W., FLANNER, H. H. Mathematical comparison of dissolution profiles. **Pharmaceutical Technology**, v. 20, n. 6, p. 64-74, 1996.

MÜLLER, D. N.; DERER, W.; DECHENG, R. Aliskiren – Mode of action and preclinical data. **Journal of Molecular Medicine**, v. 86, p. 659-662, 2008.

NICKENIG, G. Efficacy of aliskiren/hydrochlorothiazide single-pill combinations in aliskiren non-responders. **Blood Pressure**, v. 17, p. 31-40, 2008.

NUSSBERGER, J. *et al.* Plasma renin and the antihypertensive effect of the orally active renin inhibitor aliskiren in clinical hypertension. **International Journal of Clinical Practice**, v. 61, n. 9, p. 1461-1468, 2007.

PAIM, C. S. *et al.*, Validation of UV spectrophotometric method for quantitative determination of entacapone in tablets using experimental design of Plackett-Burman for robustness evaluation and comparison with HPLC. **Analytical Letters**, v. 41, p. 571-581, 2008.

QURESHI, S. A.; MCGILVERAY, I. J. Typical variability in drug dissolution testing: Study with USP and FDA calibrator tablets and marketed drug (glibenclamide) product. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 249-258, 1999.

RAHUEL, J. *et al.* Structure-based drug design: the discovery of novel nonpeptide orally active inhibitors of human renin. **Chemistry & Biology**, v. 7, n. 7, p. 493-504, 2000.

RAM, C. V. S. Direct renin inhibitors: A new approach to antihypertensive drug treatment. **The Journal of Clinical Hypertension**, v. 9, n. 8, p. 615-621, 2007.

RAMAN, V. K.; LEE, Y. A.; LINDPAINTNER, K. The cardiac rennin-angiotensin-aldosterone system and hypertensive cardiac hypertrophy. **American Journal of Cardiology**, v. 76, p. 18D-23D, 1995.

RAO, R. N.; NAGARAJU, V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, p. 335-1040, 2003.

RAO, R. N.; RAJU, A. N. Development and validation of a reversed-phase HPLC method for separation and simultaneous determinations of process-related substances of mirtazapine in bulk drugs and formulations. **Journal of Chromatographic Science**, v. 47, p. 223-230, 2009.

RASILEZ® (aliskiren). Prescribing Information. Tablets, 150 mg and 300 mg. Dorval (QC): Novartis Pharmaceutical Canada Inc., 2008. Disponível em: <http://www.novartis.ca/downloads/en/products/rasilez_scrip_e.pdf>. Acesso em: 19 jun. 2008.

REYNOLDS, C. *et al.* Assessment of pharmacokinetic interaction between aliskiren, a novel direct renin inhibitor, and metformin in double healthy volunteers. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 81, sup. 1, p. 110, 2007.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. C. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, 5th ed. Grayslake: Pharmaceutical Press, 2006.

ROZET, E. *et al.* Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 111-125, 2007.

SADAYOSHI, I. *et al.*, Efficacy and safety of aliskiren in Japanese hypertensive patients with renal dysfunction. **Hypertension Research**, v. 33, p. 62-66, 2010.

SAKAEDA, T. *et al.* Effects of acid and lactone forms of eight HMG-CoA reductase inhibitors on CYP-mediated metabolism and MDR1-mediated transport. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 3, p. 506-512, 2006.

SCHMIEDER, R. E. Aliskiren: a clinical profile. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 7, p. S16-S20, 2006.

SCOTT, B. B.; MCGEEHAN, G.; HARRISON, R. K. Development of inhibitors of the aspartyl protease renin for the treatment of hypertension. **Current Protein & Peptide Science**, v. 7, p. 241-254, 2006.

SEPEHRDAD, R. *et al.*, Direct inhibition of renin as a cardiovascular pharmacotherapy - Focus on aliskiren. **Cardiology in Review**, v. 15, n. 5, p. 242-256, 2007.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis - Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n. 1-2, p. 57-66, 2003.

SHABIR, G. A. *et al.* Evaluation and application of best practice in analytical method validation. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, p. 311-333, 2007.

SHAFIQ, M. M. Oral direct renin inhibition: Premise, promise, and potential limitations of a new antihypertensive drug. **The American Journal of Medicine**, v. 121, p. 265-271, 2008.

SHAH, V. P. *et al.* In vitro dissolution of sparingly water-soluble drug dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 125, p. 99-106, 1995.

SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A. B. C. **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**. 5 ed. New York: McGraw-Hill, 2005.

SIRAGY, H. M. *et al.* Aliskiren. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, p. 779-780, 2007.

SKOUG, J. *et al.*, Roteiro para desenvolvimento e validação do teste de dissolução em formas farmacêuticas sólidas para uso oral. **Pharmaceutical Technology**, v. 1, p. 34-43, 1997.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO. Disponível em: <<http://www.sbh.org.br/geral/hipertensao.asp>>. Acesso em: 09 mai. 2010.

STAESSEN, J. A.; LI, Y.; RICHART, T. Oral renin inhibitors. **Lancet**, v. 368, n. 9545, p. 1449-1456, 2006.

STANTON, A. *et al.* Blood pressure lowering in essential hypertension with an oral renin inhibitor, aliskiren. **Hypertension**, v. 42, p. 1137-1143, 2003.

STORPIRTIS, S. Biofarmacotécnica: Fundamentos de Biodisponibilidade, Bioequivalência, Dissolução e Intercambiabilidade de Medicamentos Genéricos. São Paulo: [s.n.], 1999. 79 p.

SURESHKUMAR, K. K. Renin inhibition with aliskiren in hypertension: Focus on aliskiren/hydrochlorothiazide combination therapy. **Vascular Health and Risk Management**, v. 4, n. 6, p. 1205-1220, 2008.

SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C. **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. New York: Marcel Dekker, 2002.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, n. 3, p. 12-20, 1998.

TEKTURNA[®] (aliskiren). Prescribing Information. Tablets, 150 mg and 300 mg. East Hanover (NJ): Novartis Pharmaceuticals Corporation, 2007. Dec. Disponível em: <http://www.tekturna.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&NovaId=1137599007196>. Acesso em: 27 mai. 2008.

TICE, C. M. *et al.* Design and optimization of renin inhibitors: Orally bioavailable alkyl amines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 13, p. 3541-3545, 2009.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, The (USP) 31 ed. Rockville, United States Convention, 2008.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, The (USP) 32 ed. Rockville, United States Convention, 2009.

VAIDYANATHAN, S. *et al.* Lack of pharmacokinetic interactions of aliskiren, a novel direct renin inhibitor for the treatment of hypertension, with the antihypertensives amlodipine, valsartan, hydrochlorothiazide (HCTZ) and ramipril in healthy volunteers. **International Journal of Clinical Practice**, v. 60, n. 11, p. 1343-1356, 2006a.

VAIDYANATHAN, S. *et al.* Aliskiren, an orally effective renin inhibitor, shows dose linear pharmacokinetics in healthy volunteers. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 79, p. 64 (PIII-23), 2006b.

VAIDYANATHAN, S. *et al.* Pharmacokinetics, safety, and tolerability of the oral renin inhibitor aliskiren in patients with hepatic impairment. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 47, p. 192-200, 2007a.

VAIDYANATHAN, S. *et al.* Pharmacokinetics, safety, and tolerability of the novel oral direct renin inhibitor aliskiren in elderly healthy subjects. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 47, p. 453-460, 2007b.

VAIDYANATHAN, S. *et al.* Pharmacokinetics of the oral direct renin inhibitor aliskiren alone and in combination with irbesartan in renal impairment. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 46, n. 8, p. 661-675, 2007c.

VAIDYANATHAN, S. *et al.* The pharmacokinetics of the oral direct renin inhibitor aliskiren alone and in combination with the P-glycoprotein modulators ketoconazole, digoxin and atorvastatin in healthy subjects. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 81, p. 109 (PIII-175), 2007d.

VAIDYANATHAN, S. *et al.* Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of Aliskiren. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 47, n. 8, p. 515-531, 2008.

VAN TASSELL, B. W.; MUNGER, M. A. Aliskiren for renin inhibition: A new class of antihypertensives. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 41, n. 3, p. 456-464, 2007.

VERDECCHIA, P. *et al.* Safety and efficacy of the oral direct renin inhibitor aliskiren in elderly patients with hypertension. **Blood Pressure**, v. 16, n. 6, p. 381-391, 2007.

VERDECCHIA, P. *et al.* The renin angiotensin system in the development of cardiovascular disease: Role of aliskiren in risk reduction. **Vascular Health and Risk Management**, v. 4. n. 5, p. 971-981, 2008.

WALDMEIER, F. *et al.* Absorption, distribution, metabolism, and elimination of the direct renin inhibitor aliskiren in healthy volunteers. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 35, p. 1418-1428, 2007.

WANG, P. G. **High Throughput Analysis in the Pharmaceutical Industry**. Boca Raton: CRC Press, FL, 2009.

WATSON, G. D. **Pharmaceutical Analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. London: Churchill Livingstone, 2005.

WEIR, M. R. *et al.* Antihypertensive efficacy, safety and tolerability of the oral direct renin inhibitor aliskiren in patients with hypertension: a pooled analysis. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 1, n. 4, p. 264-277, 2007.

WOOD, J. M. *et al.* Structure-based design of aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 308, n. 4, p. 698-705, 2003.

WUERZNER, G.; AZIZI, M. Renin inhibition with aliskiren. **Clinical and experimental Pharmacology and Physiology**, v. 35, n. 4, p. 426-430, 2008.

ZAMAN, M. A.; OPARIL, S.; CALHOUN, D. A. Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 1, p. 621-636, 2002.

ZEAITER, M. *et al.*, Robustness of models developed by multivariate calibration. Part I: The assessment of robustness. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, p. 157-170, 2004.

ZHAO, C. *et al.*, Assessment of the pharmacokinetic interaction between the oral direct renin inhibitor aliskiren and furosemide: a study in healthy volunteers. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 81, sup. 1, p. 110, 2007.