

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE
METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE RIMONABANTO
E ESTUDO DA SUA DISSOLUÇÃO A PARTIR DE
FORMAS FARMACÊUTICAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Felipe Kellermann Hurtado

**Santa Maria, RS, Brasil
2009**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
PARA ANÁLISE DE RIMONABANTO E ESTUDO DA SUA
DISSOLUÇÃO A PARTIR DE FORMAS FARMACÊUTICAS**

por

Felipe Kellermann Hurtado

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do 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.**

Orientador: Profa. Dra. Clarice Madalena Bueno Rolim

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**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
PARA ANÁLISE DE RIMOMABANTO E ESTUDO DA SUA
DISSOLUÇÃO A PARTIR DE FORMAS FARMACÊUTICAS**

elaborada por
Felipe Kellermann Hurtado

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Pedro Eduardo Fröhlich, Dr. (UFRGS)

Andréa Inês Horn Adams, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 15 de dezembro de 2009.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Simeon e Elsi, pelo amor, educação, dedicação e incentivo, e aos meus irmãos, pelo apoio e amizade.

À Profa. Dra. Clarice Madalena Bueno Rolim, pelo apoio, amizade, confiança, exemplo profissional, oportunidades e orientação desde a iniciação científica. Muito obrigado!

À Silvana, pelo apoio, carinho e compreensão.

Ao Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck, pelo exemplo de conduta profissional e colaboração científica.

Ao Prof. Dr. Alex Fabiani Claro Flores, pelo auxílio na interpretação dos espectros de RMN.

Ao Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora, pela realização do ensaio de citotoxicidade em cultura de células.

Aos colegas e técnicos do Laboratório de Controle Microbiológico de Medicamentos, pelos bons momentos de convivência, auxílio e amizade.

Às bolsistas Ana Isa Marcolino, Bruna Torres, Fernanda Flores e Gabriele Souto, pela dedicação e amizade.

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

À Universidade Federal de Santa Maria, que possibilitou a execução deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

A todos aqueles que, embora não citados, contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho.

RESUMO

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

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DE RIMONABANTO E ESTUDO DA SUA DISSOLUÇÃO A PARTIR DE FORMAS FARMACÊUTICAS

AUTOR: FELIPE KELLERMANN HURTADO

ORIENTADOR: CLARICE MADALENA BUENO ROLIM

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 15 de dezembro de 2009.

O rimonabanto é um fármaco pertencente à classe dos antagonistas dos receptores canabinóides tipo 1 (CB1) utilizado para o tratamento adjuvante à dieta e aos exercícios físicos de pacientes obesos ou com sobrepeso com fatores de risco associados, tais como diabetes tipo 2 ou dislipidemia. No presente trabalho desenvolveu-se e validou-se método por cromatografia líquida em fase reversa para análise quantitativa de rimonabanto em produtos farmacêuticos, bem como foi desenvolvido ensaio de dissolução para comprimidos revestidos e cápsulas do fármaco. O método cromatográfico para determinação de rimonabanto em formulações farmacêuticas empregou coluna Gemini C₁₈ (150 × 4.6 mm d.i., 5 µm), fase móvel composta de acetonitrila: água (75:25, v/v), eluída na vazão de 1 mL min⁻¹ e detecção no ultravioleta em 215 nm. Foi realizada a validação do procedimento através da avaliação dos parâmetros especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e quantificação, cujos resultados cumpriram os requisitos preconizados internacionalmente. As condições selecionadas para o ensaio de dissolução foram 900 mL de lauril sulfato de sódio 0,15% em água como meio, aparato 2 (pá), velocidade de agitação de 50 rpm e quantificação do fármaco por cromatografia líquida. Foi realizado estudo comparativo entre alguns produtos disponíveis comercialmente, entre eles o medicamento de referência (Acomplia[®]) e cápsulas manipuladas por três farmácias diferentes. Os testes físico-químicos realizados nas amostras foram peso médio, uniformidade de doses unitárias, teor e perfil de dissolução, os quais demonstraram resultados bastante distintos entre os produtos. Paralelamente, cinco formulações contendo diferentes tipos de excipientes foram preparadas para avaliar o efeito desse parâmetro na velocidade de liberação do fármaco *in vitro*.

Palavras-chave: rimonabanto; cromatografia líquida; validação; formulações farmacêuticas; dissolução

ABSTRACT

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

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODOLOGY FOR ANALYSIS OF RIMONABANT AND STUDY OF ITS DISSOLUTION FROM PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS

AUTHOR: FELIPE KELLERMANN HURTADO

ADVISER: CLARICE MADALENA BUENO ROLIM

Presentation date: Santa Maria, December 15th 2009.

Rimonabant is a selective antagonist of the cannabinoid type 1 (CB1) receptor indicated as an adjunct to diet and exercise for the treatment of obese patients ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$), or overweight patients ($\text{BMI} > 27 \text{ kg/m}^2$) with associated risk factors, such as type 2 diabetes or dyslipidaemia. In the present study, a reversed phase liquid chromatographic method was developed and validated for quantitative analysis of rimonabant in pharmaceutical products, and also a dissolution testing has been developed for coated tablets and capsules. The chromatographic method for determination of rimonabant in pharmaceutical formulations was performed on a Gemini C₁₈ (150 × 4.6 mm i.d., 5 μm) column, with a mobile phase composed of acetonitrile: water (75:25, v/v), which was pumped at a flow-rate of 1 mL min⁻¹ and ultraviolet detection at 215 nm. The analytical assay was validated by evaluating the parameters specificity, linearity, precision, accuracy, robustness, limit of detection and quantification, giving results within the acceptable range as defined by international validation guidelines. The selected conditions for the dissolution testing were 900 mL of 0.15% sodium lauryl sulfate in water as dissolution medium, USP apparatus 2 (paddle), stirring speed of 50 rpm and drug analysis by liquid chromatography. A study was assessed to compare some commercially available drug products, such as film-coated tablets (brand name Acomplia[®]) and compounded capsules from different suppliers. The physical-chemical tests applied to samples were average weight, content uniformity, active substance assay and dissolution profile, which have showed distinct results. In addition, rimonabant capsules containing different excipients were prepared for evaluation of formulation parameters on in vitro release profile of the drug.

Keywords: rimonabant; liquid chromatography; method validation; pharmaceutical formulations; dissolution

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Efeitos centrais e periféricos da inibição dos receptores CB1 pelo rimonabanto na regulação da ingestão de alimento e metabolismo (adaptado de Van Gaal et al., 2005).....	21
FIGURA 2 – Estrutura química de alguns antagonistas dos receptores CB1 do sistema endocanabinóide que tiveram sua eficácia avaliada em estudos clínicos no tratamento de pacientes obesos e com sobrepeso com fatores de risco associados	24
FIGURA 3 – Espectro de RMN de ¹ H do rimonabanto (400 MHz, CD ₃ OD).....	37
FIGURA 4 – Espectro de RMN de ¹³ C do rimonabanto (100 MHz, CD ₃ OD)	38
FIGURA 5 – Espectro de absorção no UV da SQR de rimonabanto, da amostra de comprimidos revestidos e do placebo, na concentração de 5 µg mL ⁻¹ , em diferentes diluentes	39
FIGURA 6 – Cromatogramas obtidos através da análise por LC das soluções de SQR (A) e comprimidos revestidos (B), preparadas em fase móvel, na concentração de 25 µg mL ⁻¹ . As condições cromatográficas estão descritas na Tabela 2	41
FIGURA 7 – Espectros característicos obtidos por DAD do pico do rimonabanto (7,13 min) da SQR (A) e da amostra de comprimidos (B).....	41
FIGURA 8 – Ilustração de cápsula de gelatina dura contendo 20 mg de rimonabanto e excipientes (produto C) antes e após 60 min do teste de dissolução.....	93
FIGURA 9 – Distribuição log-normal do tamanho das partículas de rimonabanto antes (A) e após (B) redução da granulometria através de moagem.....	111
FIGURA 10 – Representação gráfica da curva analítica do rimonabanto obtida pelo método por LC para quantificação em comprimidos e cápsulas	113
FIGURA 11 – Cromatogramas obtidos da estabilidade de solução de SQR de rimonabanto (10 µg mL ⁻¹) em metanol, deixada na bancada sem proteção contra a luz. (A) solução de referência; (B) amostra exposta à luz ambiente por 5 h: formação de produtos de degradação em 6,4, 7,9 e 15,4 min, com diminuição de 4,5% na área do pico do rimonabanto (7,1 min)	115

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 5.1

FIGURE 1 – LC chromatograms of rimonabant reference solution ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) submitted to stress degradation conditions. (a) reference solution; (b) after acidic hydrolysis; (c) after alkali hydrolysis; (d) under oxidative condition for 12 h: degradation products I and II; (e) after exposition to ultraviolet light for 10 min: degradation products III and IV 60

FIGURE 2 – Diode array spectrum data (190-300 nm) of rimonabant and its degraded forms 61

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 5.2

FIGURE 1 – Chemical structure of rimonabant ($\text{MW} = 463.79 \text{ g mol}^{-1}$) 69

FIGURE 2 – HPLC chromatograms of placebo (A) and reference tablet formulation (B) after 60 min of the dissolution test. The concentration of rimonabant (peak at 7.1 min) in this sample is $21 \mu\text{g mL}^{-1}$ 76

FIGURE 3 – Graphic representation of dissolution profiles of rimonabant (mean \pm SD, $n = 12$) from the reference tablet formulation (Acomplia[®]) and compounded capsules obtained from different pharmacies (products A, B and C). Dissolution medium 0.15% SLS in water (900 mL) at $37 \text{ }^\circ\text{C}$, USP apparatus 2 (paddle), stirring speed 50 rpm..... 80

FIGURE 4 – Graphic representation of in vitro release study of rimonabant ($n = 6$) after formulation modifications and particle size reduction. Were used the same conditions described in Fig. 3 81

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Resumo dos métodos analíticos por LC descritos na literatura para determinação de rimonabanto em matrizes biológicas.....	27
TABELA 2 – Composição elementar calculada de C, H, N e Cl do rimonabanto base e seu sal correspondente e resultado da análise elementar realizada com amostra de SQR	40
TABELA 3 – Condições cromatográficas utilizadas na caracterização da SQR de rimonabanto pelo método por LC.....	40
TABELA 4 – Resultados da avaliação do peso médio de comprimidos e cápsulas manipuladas de rimonabanto	89
TABELA 5 – Resultados do teste de uniformidade de conteúdo de comprimidos e cápsulas manipuladas de rimonabanto	91
TABELA 6 – Resultados da análise do teor de rimonabanto nos comprimidos e cápsulas manipuladas de 20 mg	91
TABELA 7 – Quantidade dissolvida de rimonabanto em função do tempo a partir das formas farmacêuticas sólidas orais avaliadas	92
TABELA 8 – Análise granulométrica da matéria-prima de rimonabanto.....	109
TABELA 9 – Análise granulométrica da matéria-prima de rimonabanto após redução do tamanho de partícula.....	110
TABELA 10 – Resultados da análise de regressão linear ($y = ax + b$) a partir dos dados de granulometria de cada grupo de matéria-prima, utilizando D ou log D versus os valores de frequência acumulada transformados em probitos	110
TABELA 11 – Protocolo para avaliação da exatidão pelo método da recuperação após adição de padrão à amostra	112
TABELA 12 – Resultados da curva analítica de rimonabanto para o ensaio por LC para formulações farmacêuticas, obtidos através do método dos mínimos quadrados	113
TABELA 13 – Análise de variância (ANOVA) das áreas absolutas para as curvas padrão de rimonabanto, obtidas por LC	114

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 5.1

TABLE 1 – Intra-day and inter-day precision results for rimonabant samples in pharmaceutical dosage form.....	55
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

TABLE 2 – Intra-day and inter-day accuracy data for the method applied to rimonabant pharmaceutical dosage form.....	56
TABLE 3 – Results of system suitability test	57

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 5.2

TABLE 1 – Composition of formulations prepared for in vitro release study.....	73
TABLE 2 – Calculation of the dissolution efficiency and applied mathematical models to the dissolution data of rimonabant film-coated tablets and capsules	74
TABLE 3 – Intra-day and intermediate precision results for rimonabant samples in pharmaceutical dosage forms	77
TABLE 4 – Accuracy data for the HPLC method applied to rimonabant pharmaceutical dosage forms.....	77
TABLE 5 – Observed rate constants, correlation coefficients and MSC obtained by fitting of rimonabant release from different dosage forms.....	79
TABLE 6 – Comparison of dissolution profiles of rimonabant from 20 mg solid oral dosage forms through the dissolution efficiency (DE).....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	Deslocamento químico
2-AG	2-araquidonoilglicerol
ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização química a pressão atmosférica
ATCC	American Type Culture Collection
AUC	Área sob a curva
BCS	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
C ₁₈	Octadecilsilano
CB1	Receptor canabinóide tipo 1
CB2	Receptor canabinóide tipo 2
CD ₃ OD	Metanol deuterado
C _{max}	Concentração plasmática máxima
CMC	Concentração micelar crítica
CYP3A4	Citocromo P450 3A4
D	Diâmetro
DAD	Detector de arranjo de diodos
DE	Eficiência de dissolução
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPR	Desvio padrão relativo
EMA	European Medicines Agency
ESI	Ionização por electrospray
f ₁	Fator de diferença
f ₂	Fator de semelhança
FDA	Food and Drug Administration
HCl	Ácido clorídrico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
ICH	International Conference on Harmonisation

IMC	Índice de massa corporal
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LC	Cromatografia líquida
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LLE	Extração líquido-líquido
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MeOH	Metanol
MK-0364	Taranabant
MS	Espectrometria de massas
MSC	Critério de seleção do modelo
MW	Massa molecular
NHLBI	National Heart, Lung, and Blood Institute
NIH	National Institutes of Health
PBS	Tampão fosfato-salino
<i>r</i>	Coefficiente de correlação
<i>r</i> ²	Coefficiente de determinação
RIO	Rimonabant in Obesity
RMN	Ressonância magnética nuclear
RP-LC	Cromatografia líquida em fase reversa
rpm	Rotações por minuto
RSD	Desvio padrão relativo
SD	Desvio padrão
SLS	Lauril sulfato de sódio
SPE	Extração em fase sólida
SQR	Substância química de referência
SR141716	Rimonabanto
SR147778	Surinabant
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta
WHO	Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1 Considerações gerais	18
3.2 Descrição do rimonabanto	24
3.3 Mecanismo de ação	24
3.4 Características farmacocinéticas	25
3.5 Metodologias para análise quantitativa	26
3.6 Estabilidade	28
3.7 Validação de métodos analíticos	28
3.8 Dissolução de fármacos	31
3.8.1 Considerações gerais	31
3.8.2 Ensaio de dissolução.....	32
3.8.3 Comparação de perfis de dissolução	34
3.8.4 Modelagem matemática de perfis de dissolução	35
4 CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA	36
4.1 Introdução	36
4.2 Ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C	36
4.3 Espectrofotometria na região do ultravioleta	38
4.4 Análise elementar	39
4.5 Cromatografia líquida	40
4.6 Conclusão	41
5 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS	42
5.1 HURTADO, F. K.; RAVANELLO, A.; AREND, M. Z.; WRASSE, M.; DALMORA, S. L.; ROLIM, C. M. B. Validated stability-indicating RP-LC method for the determination of rimonabant in pharmaceutical dosage forms	42
5.2 HURTADO, F. K.; RAVANELLO, A.; TORRES, B. G. S.; SOUTO, G. D.; BECK, R. C. R.; ROLIM, C. M. B. Dissolution testing and in vitro release profile of a poorly water soluble drug from different commercially available dosage forms	65

6 CONTROLE DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICO DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS CONTENDO RIMONABANTO	87
6.1 Introdução.....	87
6.2 Peso médio.....	87
6.3 Uniformidade de doses unitárias	90
6.4 Teor de princípio ativo	90
6.5 Perfil de dissolução.....	92
6.6 Conclusão	93
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
8 CONCLUSÕES	99
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
10 ANEXOS	109

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é um problema crescente de saúde pública que se caracteriza pelo acúmulo anormal e excessivo de gordura corporal, e que geralmente está associada a outras doenças, trazendo risco a saúde. A prevalência da obesidade e do sobrepeso é comumente avaliada pelo índice de massa corporal (IMC), definido como o peso em quilogramas dividido pelo quadrado da altura em metros. Um IMC maior ou igual a 25 kg/m^2 é definido como sobrepeso, e um IMC maior ou igual a 30 kg/m^2 como obesidade. Outro componente importante para a definição de obesidade inclui o padrão de distribuição de gordura, que é avaliado pela circunferência da cintura. A obesidade atingiu proporções epidêmicas tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. Estima-se que existam mais de 1 bilhão de adultos com excesso de peso em todo o mundo, sendo que, destes, 300 milhões são classificados como obesos. A obesidade e o sobrepeso são fatores de risco importantes para o surgimento de outras doenças crônicas, entre elas hipertensão, dislipidemia, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e algumas formas de câncer (ABATE, 2000; NIH-NHLBI, 2000; WHO, 2006).

A obesidade freqüentemente está associada a outras doenças, como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e síndrome metabólica. A síndrome metabólica está associada ao acúmulo de gordura abdominal e se caracteriza por um grupo de anormalidades metabólicas, tais como hipertrigliceridemia, HDL-colesterol baixo, hipertensão e glicose de jejum elevada. Juntas, a obesidade abdominal e a síndrome metabólica aumentam significativamente o risco de doença cardiovascular e diabetes mellitus (NISOLI & CARRUBA, 2004; RITCHIE & CONNELL, 2007).

Uma combinação de hábitos saudáveis, como restrição na dieta e aumento de atividade física, aliados a mudanças no estilo de vida do paciente, pode ser efetiva no tratamento da obesidade. Além disso, a terapia farmacológica pode ser um complemento útil no tratamento da obesidade em alguns pacientes, especialmente aqueles de alto risco. A terapia através de medicamentos é atualmente limitada a pacientes que têm um $\text{IMC} \geq 30$, ou aqueles com $\text{IMC} \geq 27$ que possuem fatores de risco relacionados à obesidade ou outras doenças. Além das terapias anteriormente citadas, a cirurgia de redução de peso é uma opção para pacientes com obesidade severa ($\text{IMC} \geq 40$), principalmente quando esta é associada a comorbidades graves (NIH-NHLBI, 2000; CANNON & KUMAR, 2009).

Os medicamentos para o tratamento da obesidade disponíveis atualmente surgiram como formas alternativas de tratamento, sendo usados como adjuntos na redução e controle do peso desses pacientes, juntamente com o aumento do consumo de energia pelo exercício e diminuição da ingestão de calorias. No entanto, são poucas as opções de fármacos disponíveis e aprovados para uso prolongado no tratamento da obesidade, sendo necessário o desenvolvimento de novas moléculas eficazes e seguras para combater esse problema crescente de saúde pública global (BRAY & RYAN, 2007; RÖSSNER et al., 2008).

O rimonabanto é o primeiro representante de uma nova classe de antagonistas seletivos do receptor canabinóide-1 (CB1) e mostrou resultados promissores para o tratamento da obesidade e fatores de risco metabólico associados. O rimonabanto provocou redução de peso e de gordura abdominal, diminuiu os níveis plasmáticos de triglicerídios, LDL-colesterol e proteína C-reativa, e aumentou as concentrações de HDL-colesterol e adiponectina em pacientes obesos e com sobrepeso com ou sem diabetes associada (COX, 2005; SCHEEN & PAQUOT, 2009). Entretanto, durante o desenvolvimento do presente trabalho, a EMEA determinou sua retirada do mercado mundial em novembro de 2008. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) suspendeu a comercialização do medicamento, baseada na ocorrência de efeitos adversos psiquiátricos.

Até o momento, o rimonabanto foi o primeiro e único antagonista seletivo dos receptores CB1 que chegou a ser utilizado na prática clínica. Com o desenvolvimento do rimonabanto, novos ligantes específicos do receptor CB1 mais seguros e com propriedades farmacológicas similares ou melhores têm sido estudados para o tratamento da obesidade e de suas desordens metabólicas associadas. Pesquisas continuam sendo feitas na síntese e desenvolvimento de novos antagonistas CB1 para aperfeiçoar suas propriedades físicas, afinidade intrínseca pelo receptor, biodisponibilidade oral, farmacocinética e segurança, incluindo moléculas que não atingem o sistema nervoso central e que seriam, portanto, desprovidas de efeitos adversos psiquiátricos (DI MARZO, 2008; JONES, 2008; VEMURI et al., 2008; AKBAS et al., 2009; LE FOLL et al., 2009).

Assim, apesar das descobertas que levaram à interrupção da sua comercialização, optou-se por continuar os estudos com o fármaco, tendo em vista que novos inibidores seletivos dos receptores CB1 estão sendo testados em humanos com a perspectiva de novas indicações contra várias doenças, tais como no tratamento da dependência de nicotina, mal de Alzheimer e esquizofrenia (DI MARZO, 2008).

Os avanços recentes na área farmacêutica viabilizaram a produção de novas substâncias de interesse terapêutico, que necessitam de métodos analíticos para sua

determinação quantitativa em produtos farmacêuticos, ensaios de dissolução e estudos de estabilidade, e que são importantes para o controle da qualidade e avaliação de insumos e medicamentos. A etapa inicial de desenvolvimento da metodologia analítica envolve a avaliação e otimização das condições do ensaio, incluindo a etapa de extração do analito do produto farmacêutico, separação cromatográfica dos componentes da amostra, detecção e quantificação do fármaco de interesse. A etapa posterior, a validação, é necessária para demonstrar, através de testes experimentais, que o método atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando a reprodutibilidade e a confiabilidade dos resultados obtidos (ICH, 2005).

Selecionou-se a cromatografia líquida, que atualmente se destaca entre os métodos modernos de análise quantitativa de fármacos nos mais diversos tipos de amostras, incluindo formulações farmacêuticas, matéria-prima e matrizes biológicas. Através do desenvolvimento adequado do método analítico, que envolve a seleção e otimização das condições cromatográficas empregadas, tais como tipo de coluna e composição da fase móvel, entre outras, e a escolha do detector mais apropriado, a técnica possibilita a separação do analito de interesse dos outros componentes presentes na amostra e sua quantificação com precisão e exatidão significativas.

Por sua vez, a etapa de liberação e dissolução do fármaco do produto farmacêutico constitui-se em uma das principais propriedades biofarmacêuticas de medicamentos, pois para que o fármaco seja absorvido e atinja a circulação sistêmica, deve estar previamente solubilizado no trato gastrointestinal. Nesse sentido, estudos de dissolução são empregados não somente para garantir a qualidade lote-a-lote da forma farmacêutica sólida, mas também para avaliar as etapas de produção e de desenvolvimento de novas formulações, e, em algumas situações, prever a eficiência do produto *in vivo*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar metodologia físico-química para determinação quantitativa de rimonabanto em produtos farmacêuticos, bem como desenvolver teste para avaliação da dissolução do fármaco a partir de formas farmacêuticas sólidas orais, estabelecendo, assim, procedimentos e especificações que contribuam para a segurança e eficácia terapêutica do medicamento.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a caracterização da substância química de referência, através de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , análise elementar, espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e cromatografia líquida (LC);
- Desenvolver e validar metodologia para análise quantitativa de rimonabanto nas formas farmacêuticas comprimido revestido e cápsula, através de cromatografia líquida;
- Realizar estudo de degradação forçada do fármaco sob condições de estresse, tais como temperatura, hidrólise ácida e básica, oxidação química e fotólise, a fim de verificar os fatores que afetam sua estabilidade;
- Desenvolver teste de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de rimonabanto e estudar a influência dos excipientes e tamanho de partícula do fármaco na sua velocidade de liberação *in vitro*;
- Realizar ensaios físico-químicos de controle de qualidade (peso médio, teor, uniformidade de doses unitárias e perfil de dissolução) em amostras de comprimidos e cápsulas manipuladas de rimonabanto.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Considerações gerais

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, obesidade ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) e sobrepeso ($\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$) são definidos como o acúmulo anormal e excessivo de gordura corporal, que provoca conseqüências nocivas a saúde. Essas duas condições são fatores de risco importantes para o surgimento de algumas doenças crônicas, incluindo diabetes, doenças cardiovasculares e câncer (WHO, 2003). Estudos epidemiológicos têm demonstrado um aumento alarmante na prevalência da obesidade e de distúrbios alimentares, indicando a necessidade de combater essa tendência mundial. A obesidade é reconhecida como uma doença crônica, multifatorial, e que já atingiu proporções epidêmicas, afetando milhões de pessoas em todo o mundo. É uma condição complexa com sérias dimensões sociais e psicológicas, atingindo praticamente todas as idades e grupos sócio-econômicos (COTA et al., 2003; WHO, 2003; MANCINI & HALPERN, 2006). Nos Estados Unidos, entre as pessoas de 40 a 59 anos, mais de 70% têm excesso de peso ou são obesas (HAMPP et al., 2008). A prevalência da obesidade continua aumentando, com mais de 50% dos europeus sendo classificados como acima do peso e mais de 30% como obesos (VAN GAAL et al., 2005). Pesquisa recente realizada pelo Ministério da Saúde mostra que 13% dos brasileiros adultos são obesos e que 43% possuem excesso de peso (BRASIL, 2009).

O aumento da incidência da obesidade no mundo é atribuído principalmente a fatores ambientais, relacionados ao consumo exagerado de alimentos altamente calóricos e ricos em gordura, e o aumento do sedentarismo, que está relacionado à prática reduzida de atividade física (CANNON & KUMAR, 2009). Esse desequilíbrio entre a ingestão e o gasto energia leva ao acúmulo de tecido adiposo com conseqüente aumento da massa corporal. A chance de um indivíduo desenvolver obesidade, o período em que ela ocorre e sua gravidade, depende de uma complexa interação de influências genéticas e ambientais. Em geral, obesidade severa adquirida na idade jovem é mais provável que tenha tido a influência de genes importantes na regulação do balanço de energia, enquanto que a obesidade com início tardio é mais provável que tenha um forte componente ambiental, mas com alguma influência de genes menos importantes. A obesidade tem origem predominantemente genética no caso de algumas síndromes e deficiências. Algumas doenças endócrinas e determinados medicamentos estão associados ao ganho de peso (WILDING, 2003).

A obesidade e sobrepeso ocasionam um risco maior de desenvolvimento de diabetes tipo 2 e mortes associadas a doenças cardiovasculares (ARONNE & ISOLDI, 2007; RUBIO et al., 2007; SCHEEN, 2007). A obesidade é uma doença crônica e de alta prevalência que está freqüentemente associada com outras morbidades, incluindo doença coronariana, hipertensão e certos tipos de câncer (endométrio, mama, próstata e cólon), além de causar impacto significativo sobre a qualidade de vida e produtividade (NIH-NHLBI, 2000; WHO, 2003; HAMPP et al., 2008). Ao lado da hipertensão, a obesidade é um dos principais fatores de risco para doença cardíaca coronariana (PI-SUNYER et al., 2006). A doença está relacionada ao aumento nos gastos com saúde em decorrência do seu tratamento, incluindo consultas médicas, exames diagnósticos e internações hospitalares, assim como das doenças associadas a ela, tais como hipertensão arterial, diabetes e arteriosclerose (EDITORIAL REV. ASSOC. MED. BRAS., 2001).

A síndrome metabólica é o nome de um conjunto de fatores de risco metabólicos intimamente associados ao sobrepeso e à obesidade, que aumentam as chances de surgimento de doenças cardiovasculares e diabetes mellitus, bem como levam a uma maior mortalidade por doença cardiovascular (NIH-NHLBI, 2000). O acúmulo de gordura abdominal é geralmente acompanhado por resistência à insulina ou diabetes tipo 2, hipertensão, hipertrigliceridemia e baixo HDL-colesterol, fatores esses que definem a síndrome metabólica. A terapia da obesidade envolve, além da redução de peso, o tratamento da síndrome metabólica que geralmente está associada à obesidade abdominal. É fundamental a melhora dos fatores de risco cardiovascular nesses pacientes, tais como controle da pressão arterial em obesos hipertensos, diminuição dos níveis plasmáticos de colesterol total, LDL-colesterol e triglicéridios, aumento do HDL-colesterol nos pacientes com dislipidemia e diminuição dos níveis de glicose em obesos com diabetes mellitus tipo 2 (NISOLI & CARRUBA, 2004; CANNON & KUMAR, 2009).

Embora a modificação de hábitos nutricionais (restrição calórica) e a prática de atividades físicas sejam fundamentais no tratamento da obesidade, o uso de medicamentos que melhoram o perfil de risco metabólico de pacientes obesos com alto risco de diabetes e doença cardiovascular pode ser necessário (DESPRÉS et al., 2005). Até 2007, existiam dois medicamentos disponíveis nos Estados Unidos e aprovados para uso prolongado no tratamento da obesidade: sibutramina e orlistat. O orlistat é um inibidor da lipase pancreática, enzima relacionada à hidrólise de triglicéridios, que atua localmente diminuindo em 30% a absorção de gorduras pelo intestino após a alimentação. A sibutramina é um inibidor altamente seletivo da recaptção de norepinefrina e setotonina nos terminais nervosos do

cérebro, que atua diminuindo a ingestão calórica e aumentando a saciedade, levando à redução de peso (ARONNE & ISOLDI, 2007; BRAY & RYAN, 2007, RUBIO et al., 2007). Nesse contexto, além da redução de peso e gordura abdominal, agentes capazes de controlar as desordens metabólicas associadas à obesidade tornam-se importantes na diminuição do risco cardiovascular e, conseqüentemente, mortalidade por essa doença (SCHEEN & PAQUOT, 2009).

Recentemente, um novo medicamento foi introduzido na prática médica como opção no tratamento de pacientes obesos ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$) ou com sobrepeso com fatores de risco associados. O rimonabanto é um agonista inverso seletivo do receptor canabinóide tipo 1 (CB1), sendo o primeiro membro de uma nova classe de compostos que agem sobre o sistema endocanabinóide. Existem dois tipos de receptores canabinóides, CB1 e CB2. Os receptores CB1, os principais, estão amplamente distribuídos no organismo, incluindo áreas do cérebro relacionadas ao apetite e à motivação para alimentos palatáveis (hipotálamo e núcleo accumbens, respectivamente), células adiposas e trato gastrintestinal. Foi demonstrado que esse sistema possui papel importante na regulação do peso corporal e metabolismo da glicose e lipídios. Nos tecidos periféricos, a ativação dos receptores CB1 estimula a produção de gordura nos adipócitos. No sistema nervoso central, sua ativação modula vários processos fisiológicos envolvidos no apetite e balanço de energia. Esses efeitos são regulados por agonistas endógenos derivados de fosfolipídios (endocanabinóides), sendo a anandamida e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG) os principais. A Figura 1 resume os efeitos produzidos por fármacos que bloqueiam seletivamente a ativação desses receptores no organismo. Os receptores CB1 foram primeiramente encontrados no cérebro e mais tarde em vários tecidos humanos, incluindo adipócitos. O bloqueio seletivo desses receptores pelo rimonabanto levou à redução do apetite, diminuição no consumo de alimento e alteração da atividade metabólica do tecido adiposo em animais tratados com a substância. Os receptores CB2 são expressos no sistema imune e parecem não estar relacionados ao metabolismo energético (PERTWEE, 1997; COTA et al., 2003; COX, 2005; DESPRÉS et al., 2005; PATEL & PATHAK, 2007; AKBAS et al., 2009).

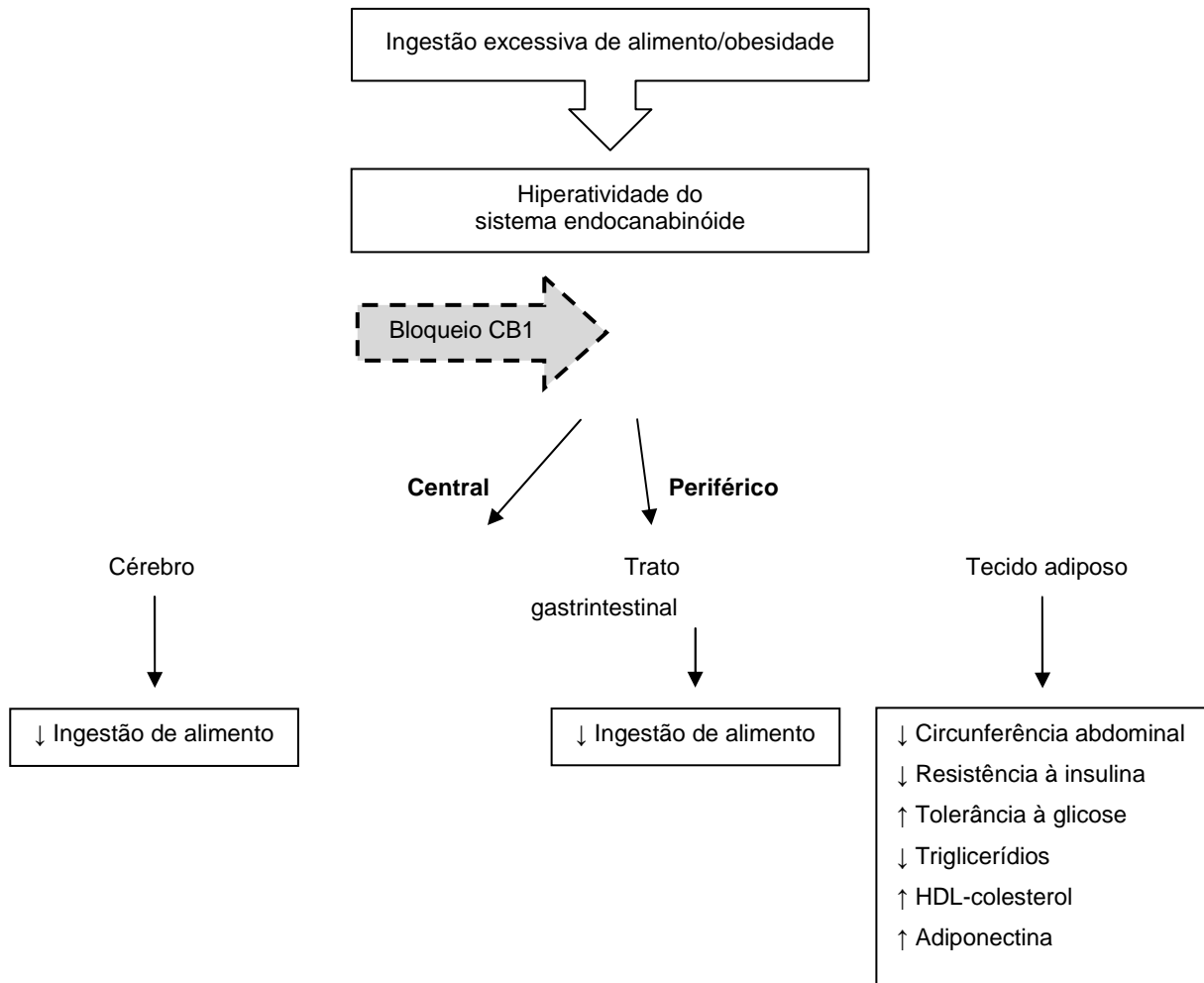


Figura 1 – Efeitos centrais e periféricos da inibição dos receptores CB1 pelo rimonabanto na regulação da ingestão de alimento e metabolismo (adaptado de Van Gaal et al., 2005)

O primeiro antagonista do receptor CB1 foi descoberto em 1994, sendo denominado SR141716 ou rimonabanto (RINALDI-CARMONA et al., 1994). Essa substância vinha sendo estudada como modulador do apetite e, principalmente, para o controle dos fatores de risco ligados à obesidade visceral (GODOY-MATOS et al., 2006; BRAY & RYAN, 2007). O rimonabanto foi descoberto e desenvolvido pelo laboratório francês Sanofi-Aventis e após vários estudos clínicos obteve autorização da EMEA para comercialização na União Européia, em junho de 2006. O medicamento foi aprovado para o tratamento da obesidade em 42 países, sob o nome comercial Acomplia[®] (MCCULLOCH et al., 2008). No Brasil, a ANVISA aprovou o registro do medicamento em abril de 2007. O rimonabanto é indicado para o tratamento adjuvante à dieta e aos exercícios físicos de pacientes obesos ou pacientes com sobrepeso com fatores de risco associados, como diabetes tipo 2 ou dislipidemia (EMEA, 2006).

A eficácia clínica do rimonabanto na redução de peso e melhora de fatores de risco cardiovasculares em pacientes obesos foi comprovada por dois grandes estudos clínicos: o RIO-Europe e o RIO-North America (VAN GAAL et al., 2005; PI-SUNYER et al., 2006). Foi realizado um estudo clínico para avaliação dos efeitos do rimonabanto nos fatores de risco metabólicos em pacientes obesos com dislipidemia, o RIO-Lipids, e outro para avaliação da eficácia e tolerabilidade do medicamento em pacientes com sobrepeso ou obesos com diabetes tipo 2, o RIO-Diabetes (DESPRÉS et al., 2005; SCHEEN et al., 2006). Por exemplo, no RIO-Europe, que envolveu mais de 1500 pacientes, após um ano de tratamento, a dose diária de 20 mg resultou em uma perda de peso média de 8,6 kg, acompanhada de significativa redução da circunferência abdominal (8,5 cm). Os níveis de HDL-colesterol aumentaram em 22,3% e os de triglicerídios diminuíram em 6,8% comparados ao placebo. Além disso, foi observada uma melhoria na resistência à insulina. O número de pacientes diagnosticados com a síndrome metabólica foi reduzido à metade. No RIO-Lipids, ocorreu redução de 52% na incidência de diabetes tipo 2 entre os pacientes tratados com rimonabanto (COX, 2005). Em resumo, os estudos clínicos concluíram que o rimonabanto na dosagem de 20 mg/dia foi efetivo na redução de peso e diminuição da gordura abdominal, além de melhorar os perfis de hemoglobina glicosilada, lipoproteínas e triglicerídios, melhorando o quadro de risco cardiovascular nesses pacientes.

Recentemente, em novembro de 2008, a EMEA suspendeu a comercialização do Acomplia[®] nos países da União Européia, concluindo que os benefícios do medicamento não mais superavam seus riscos. A retirada do mercado ocorreu após perceberam que seu uso estava associado à ocorrência de transtornos psiquiátricos e neurológicos, particularmente depressão, sendo relatados também ansiedade, agitação e distúrbios do sono. O FDA determinou, em junho de 2007, a não aprovação do rimonabanto (sob o nome comercial Zimulti[®]) para uso no tratamento da obesidade e sobrepeso nos Estados Unidos, após o laboratório Sanofi-Aventis submeter o medicamento para avaliação da agência americana em abril de 2005. O FDA questionou a segurança do uso do rimonabanto, principalmente devido aos relatos de efeitos adversos psiquiátricos em vários pacientes, tais como depressão e ideação suicida. A ANVISA suspendeu, em novembro de 2008, a manipulação do rimonabanto e comercialização do Acomplia[®] no Brasil após o laboratório Sanofi-Aventis e a agência européia reguladora de medicamentos anunciarem a suspensão do medicamento em todo o mundo.

A suspensão da comercialização do rimonabanto pela EMEA e o anúncio da Sanofi-Aventis, em novembro de 2008, da retirada do medicamento do mercado mundial repercutiu

nas pesquisas com vários outros antagonistas CB1 que estavam sendo desenvolvidos. Após a notícia, alguns fármacos da mesma classe terapêutica ainda não aprovados para comercialização tiveram seus estudos clínicos cancelados pelos seus fabricantes, incluindo o taranabant (Merck) e otenabant (Pfizer), ambos em estudos de fase III, o ibipinabant (Solvay/Bristol-Myers Squibb) e o análogo estrutural do rimonabanto, SR147778 (surinabant) (Sanofi-Aventis) em fase II. O AVE-1625 vem sendo avaliado em estudos clínicos para tratamento da dependência de nicotina, tratamento de pacientes obesos com dislipidemia aterogênica, como auxiliar no tratamento da esquizofrenia e em pacientes com doença de Alzheimer leve a moderada (DI MARZO, 2008; JONES, 2008; HILL & GORZALKA, 2009; LE FOLL et al., 2009). A estrutura química desses fármacos é mostrada na Figura 2.

Em 2006, foi descoberto pelo laboratório Merck um novo agonista inverso do receptor CB1 para tratamento da obesidade, o MK-0364 ou taranabant (LIN et al., 2006; KIM et al., 2007). O taranabant é absorvido pelo trato gastrointestinal e apresenta rápida penetração no cérebro (VEMURI et al., 2008). Em voluntários humanos, o fármaco foi geralmente bem tolerado com doses acima de 10 mg e apresentou farmacocinética de dose-múltipla compatível com administração uma vez ao dia (ADDY et al., 2008). Estudos clínicos de fase III concluíram que o fármaco em investigação levou à significativa redução de peso comparado ao placebo em pacientes obesos quando associado a exercícios físicos e alterações na dieta. No entanto, apesar de ter se mostrado eficaz, a Merck anunciou, em outubro de 2008, o cancelamento dos estudos clínicos com o taranabant devido aos seus efeitos adversos centrais, de forma semelhante ao que ocorreu com o rimonabanto.

Existem várias outras condições patológicas em que níveis elevados de endocanabinóides atuando nos receptores CB1 podem contribuir para os sintomas e progresso dessas doenças. Em testes com animais, antagonistas CB1 inibem a dor proveniente de inflamação, previnem a perda óssea em um modelo de osteoporose em ratos, diminuem a progressão de fibrose hepática e inibem o crescimento de células de câncer de mama *in vivo*. Além disso, vários antagonistas CB2 foram desenvolvidos e vêm sendo testados atualmente em estudos pré-clínicos, sendo que três compostos em particular receberam destaque devido aos seus efeitos antiinflamatórios (DI MARZO, 2008).

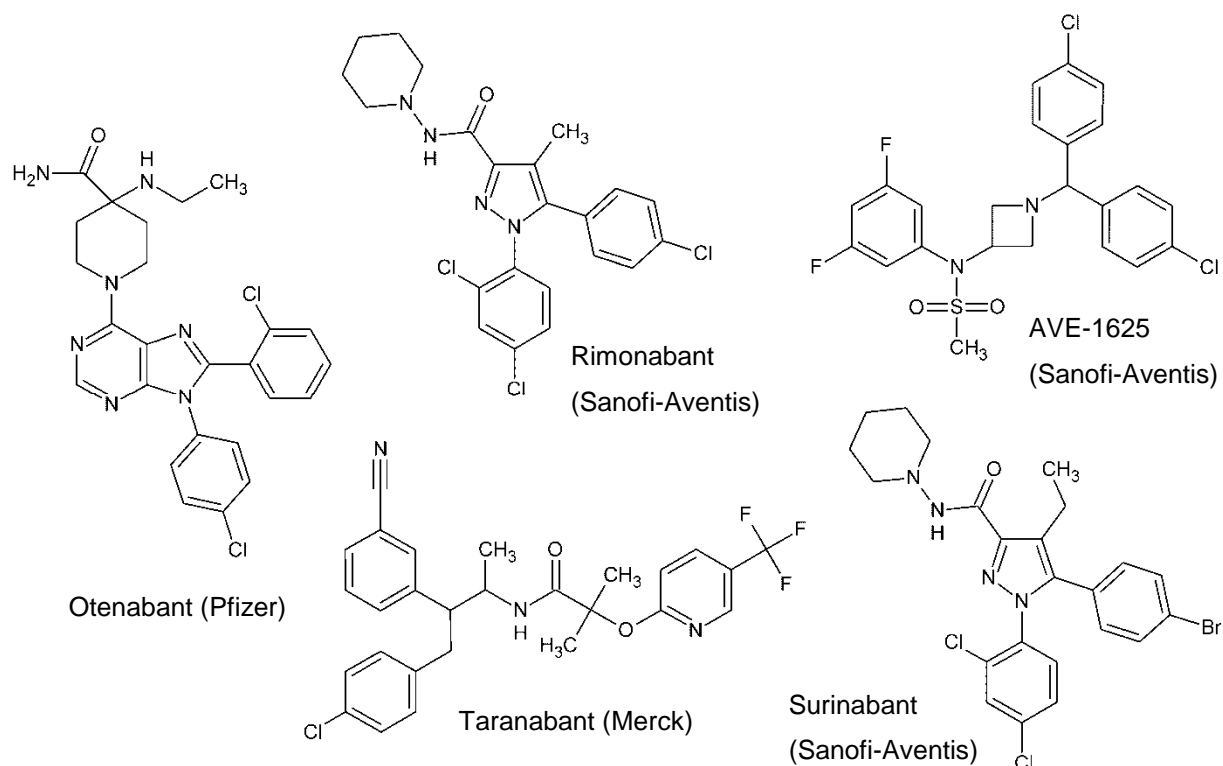


Figura 2 – Estrutura química de alguns antagonistas dos receptores CB1 do sistema endocanabinóide que tiveram sua eficácia avaliada em estudos clínicos no tratamento de pacientes obesos e com sobrepeso com fatores de risco associados

3.2 Descrição do rimonabanto

O rimonabanto (Figura 2) é denominado quimicamente 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-*N*-(piperidin-1-il)-1*H*-pirazol-3-carboxamida. É um pó cristalino branco a quase branco, livremente solúvel em metanol e praticamente insolúvel em água. A substância tem ponto de fusão entre 233 – 240 °C e apresenta caráter básico (pKa 3,6). Possui massa molecular de 463,79 g mol⁻¹ e fórmula molecular C₂₂H₂₁Cl₃N₄O. O produto farmacêutico apresenta-se na forma de comprimido revestido, branco, biconvexo, em forma de lágrima, contendo 20 mg da substância ativa, sob o nome comercial Acomplia® (EMEA, 2006; BERGSTRÖM et al., 2007).

3.3 Mecanismo de ação

O rimonabanto age inibindo a atuação do sistema endocanabinóide, responsável pela regulação fisiológica do balanço energético, ingestão de alimento e metabolismo de lipídios e

glicose através de efeitos centrais e periféricos (adipócitos e trato gastrintestinal) (VAN GAAL et al., 2005; SPOTO et al., 2006). Dentre os efeitos do bloqueio do receptor CB1 estão a diminuição da ingestão alimentar pelo efeito central e periférico, diminuição da circunferência abdominal pela ação periférica no tecido adiposo, diminuição dos triglicerídios e aumento do HDL-colesterol sanguíneos (GODOY-MATOS et al., 2006). A diminuição da ingestão de alimento ocorre tanto pela ação em regiões ligadas ao apetite no cérebro, como hipotálamo, quanto pela ação periférica sobre os receptores CB1 no trato gastrintestinal, aumentando a sensação de saciedade no tubo digestivo (AKBAS et al., 2009). Ocorre também aumento da produção de adiponectina pelos adipócitos, hormônio protéico que diminui a resistência à insulina e produção hepática de glicose. Níveis diminuídos de adiponectina no plasma estão relacionados à obesidade, diabetes tipo 2 e doença cardiovascular (RASMUSSEN et al., 2006; ANTONIADES et al., 2009). Além da ação do fármaco na modulação do apetite e na perda de peso, uma parte substancial de seus efeitos está baseada na regulação da síndrome metabólica associada à obesidade, através da ação sobre os níveis de hemoglobina glicosilada, HDL-colesterol e triglicerídios (ARONNE & ISOLDI, 2007; DESPRÉS et al., 2008, SCHEEN & PAQUOT, 2009).

3.4 Características farmacocinéticas

O rimonabanto apresenta uma rápida absorção após administração oral. Após administração de doses únicas diárias de 20 mg em indivíduos saudáveis em jejum, as concentrações plasmáticas máximas de rimonabanto são alcançadas em aproximadamente 2 horas, sendo que os níveis plasmáticos no estado de equilíbrio são atingidos em 13 dias. Sua biodisponibilidade absoluta não foi determinada. Quando administrado juntamente com alimentação ocorreu um aumento de 67% na C_{max} e de 48% na AUC. Recomenda-se que a ingestão seja feita pela manhã antes do café da manhã. O rimonabanto possui elevada ligação às proteínas plasmáticas (> 99%), principalmente à albumina. *In vitro*, apresenta metabolismo predominantemente hepático pela via do CYP3A4 e amidoidrolase, que ocorre principalmente no grupamento piperidina da molécula para formar produtos hidroxilados, *N*-desalquilados e enaminas (ALBERTS et al., 2003; SCHEEN, 2007). É eliminado principalmente por metabolismo e subsequente excreção biliar dos metabólitos. Apenas 3% da dose administrada é eliminada na urina, enquanto que aproximadamente 86% da dose é excretada nas fezes como fármaco inalterado ou metabólitos. Em pacientes obesos, sua meia-vida de eliminação é

mais longa (16 dias) do que em pacientes saudáveis (10 dias), devido ao maior volume de distribuição (EMEA, 2006; FDA, 2007).

3.5 Metodologias para análise quantitativa

Atualmente, os procedimentos mais empregados na análise quantitativa de fármacos envolvem a cromatografia líquida, eletroforese capilar, espectrofotometria e volumetria. Entre eles, a cromatografia líquida (LC) ocupa um lugar de destaque entre os métodos modernos de análise quantitativa de fármacos em matéria-prima, produto acabado e matriz biológica e atualmente vem sendo usada de modo crescente com esse propósito. É uma técnica versátil e amplamente utilizada na rotina de laboratórios de controle de qualidade de medicamentos em razão da sua resolução, precisão e exatidão significativas. A possibilidade de variação dos mecanismos de separação pela adequada escolha da coluna, fase móvel e demais condições cromatográficas, permite a utilização dessa técnica nas mais diversas fases de estudo de produtos farmacêuticos. Além disso, a LC dispõe de uma ampla variedade de métodos de detecção que podem ser usados, dependendo do tipo de análise pretendida (SWARTZ & KRULL, 1997; WATSON, 2005).

Diversas metodologias para determinação de rimonabanto em matrizes biológicas são descritas na literatura, todas elas envolvendo a LC com detecção no ultravioleta ou por espectrometria de massas. A Tabela 1 apresenta de forma resumida as condições cromatográficas utilizadas por diversos autores para análise do fármaco nessas amostras. Diferentes procedimentos de tratamento de amostra, entre eles a precipitação de proteínas e extração líquido-líquido, são empregados para quantificação de rimonabanto em matrizes biológicas, principalmente plasma. Além das condições cromatográficas e detectores utilizados, os métodos diferem na sua sensibilidade, faixa linear e aplicação.

Tabela 1 – Resumo dos métodos analíticos por LC descritos na literatura para determinação de rimonabanto em matrizes biológicas

Aplicação	Extração	Coluna	Fase móvel	Detecção	Faixa linear	Referência
Plasma	Desproteinização com ACN: MeOH	HALO C ₁₈ (50 × 2,1 mm, 2,7 μm)	Gradiente de ácido fórmico 0,1%: ACN	MS	1 – 1000 ng mL ⁻¹	HSIEH et al., 2007
Plasma	SPE	Gemini C ₁₈ (150 × 4,6 mm, 5 μm)	ACN: tampão fosfato de sódio 20 mM (62:40, v/v)	UV (214 nm)	50 – 500 ng mL ⁻¹	JAVORS & MCMAHON, 2007
Plasma	LLE	Symmetry C ₈ (100 × 4,6 mm)	Ácido fórmico 0,03%: ACN (10:90, v/v)	MS	0,1 – 100 ng mL ⁻¹	NIROGI et al., 2008
Plasma e cabelo	LLE	HyPurity C ₁₈ (150 × 2,1 mm, 5 μm)	Tampão formiato de amônio 2 mM: ACN (20:80, v/v)	MS	2,5 – 1000 ng mL ⁻¹ (plasma)	DELYLE et al., 2008
Plasma	Desproteinização com ACN	YMC TM Pro C ₄ (50 × 2 mm, 3 μm)	Ácido fórmico 0,1%: ACN (50:50, v/v)	MS	5 – 1000 ng mL ⁻¹	MCCULLOCH et al., 2008
Plasma	LLE	Hypersil BDS C ₁₈ (250 × 4,6 mm, 5 μm)	Tampão fosfato 10 mM: ACN (30:70, v/v)	UV (220 nm)	20 – 400 ng mL ⁻¹	BHAUMIK et al., 2009
Plasma	LLE	Nucleosil C ₁₈ (250 × 4,6 mm, 5 μm)	Tampão acetato de amônio 50 mM: MeOH (25:75, v/v)	UV (250 nm)	13 – 1000 ng mL ⁻¹	CHIADMI et al., 2009

ACN: acetonitrila; LLE: extração líquido-líquido; MeOH: metanol; MS: espectrometria de massas; SPE: extração em fase sólida; UV: ultravioleta

Raju et al. (2009) desenvolveram e validaram método por LC para determinação quantitativa de rimonabanto e suas impurezas em matéria-prima. Os autores utilizaram coluna Gemini C₁₈ (150 × 4,6 mm d.i., 5 µm) mantida a 40 °C, fase móvel composta de tampão fosfato de potássio 10 mM pH 3,0: acetonitrila (30:70, v/v), fluxo de 1 mL min⁻¹ e detecção em 215 nm através de detector de arranjo de diodos. O método foi linear na faixa de 25 a 150 µg mL⁻¹ e apresentou precisão e exatidão adequadas. O método foi considerado indicativo de estabilidade, pois foi capaz de separar o rimonabanto de suas três impurezas principais. Através de estudos de degradação forçada, os autores descrevem que o fármaco é degradado a uma de suas impurezas quando exposto a peróxido de hidrogênio 3%. Segundo os autores, essa impureza também é a mais comumente encontrada em amostras de matéria-prima sintetizadas por eles.

3.6 Estabilidade

Duas formas polimórficas do rimonabanto foram identificadas durante o seu desenvolvimento, as quais possuem propriedades físico-químicas muito semelhantes. Estudo de estabilidade de 24 meses indicou que não há conversão entre os dois polimorfos durante o armazenamento do produto. Estudos mostram que o fármaco em estado sólido e sob condições de estresse é estável a alta temperatura e umidade, mas é levemente sensível a luz intensa. Em mistura hidroalcoólica, o rimonabanto é estável a 80 °C, porém é instável frente à luz e oxidantes (EMEA, 2006). Não foi observada degradação do rimonabanto quando exposto a condições de estresse como luz ultravioleta, aquecimento a 60 °C e hidrólise ácida e básica. Porém, verificou-se que o fármaco é instável frente à oxidação por peróxido de hidrogênio 3% (RAJU et al., 2009).

3.7 Validação de métodos analíticos

A validação de um método analítico é um processo que estabelece, através de estudos laboratoriais, que o procedimento é adequado para a aplicação pretendida. O processo de validação de métodos analíticos é realizado com base em diretrizes nacionais e internacionais descritas em guias e compêndios (IUPAC, 2002; BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP, 2008). Os principais parâmetros avaliados durante a validação de um método analítico são: especificidade/seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, robustez e testes de adequabilidade do sistema.

A especificidade do método analítico indica sua capacidade de diferenciar e quantificar o analito mesmo na presença de outros componentes da amostra que poderiam estar presentes e interferir na sua determinação, entre eles impurezas, produtos de degradação, excipientes ou outros fármacos. Para avaliar a especificidade de um método analítico para determinado fármaco, produtos de degradação podem ser formados pela exposição da substância a condições elevadas de estresse, tais como hidrólise ácida e básica, fotólise e oxidação (teste de degradação forçada). Em alguns casos, impurezas e produtos de degradação podem ser adquiridos comercialmente. Para produtos farmacêuticos, amostras contendo somente os excipientes da forma farmacêutica podem ser preparadas para verificação da especificidade do método analítico frente a esses constituintes.

Linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração da substância de interesse na amostra, em uma dada faixa de concentração. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade de um método pode ser avaliada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou então a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados.

Precisão é a avaliação do grau de concordância entre resultados de ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra homogênea, em condições definidas. É geralmente expressa como desvio padrão ou desvio padrão relativo. A precisão deve ser considerada através da repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetibilidade corresponde à concordância entre os resultados de medições sucessivas, efetuadas sob as mesmas condições, em um curto intervalo de tempo. É verificada através de, no mínimo, seis determinações da amostra a 100% da concentração teste, ou a partir de nove determinações, isto é, três concentrações diferentes (baixa, média e alta) com três réplicas cada. A precisão intermediária refere-se à dispersão dos resultados obtidos entre diferentes dias, analistas ou equipamentos. A reprodutibilidade está relacionada à precisão do procedimento analítico entre diferentes laboratórios.

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. Uma das formas de se avaliar a exatidão de um método consiste na adição de padrão da substância à amostra e posterior análise da quantidade de padrão recuperada. As amostras devem ser adicionadas do analito em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de quantificação, próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método.

O limite de detecção (LOD) é a menor quantidade de analito presente na amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. Para métodos instrumentais, esse parâmetro pode ser determinado experimentalmente por meio da análise de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até que seja estabelecido o menor nível detectável, com base na relação sinal-ruído. Nesse caso, o sinal do analito deve ser três vezes maior que o ruído da linha de base. O limite de quantificação (LOQ) corresponde à menor quantidade de analito presente na amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Esse parâmetro pode ser verificado experimentalmente por meio da análise de amostras com concentrações conhecidas e decrescentes do fármaco, até que seja estabelecida a menor concentração quantificada com precisão e exatidão apropriadas. Alternativamente, os valores do LOD e LOQ podem ser estimados pela construção de três curvas analíticas e calculados com base na relação entre o desvio padrão do intercepto e a inclinação da curva.

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Um método é robusto se for praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado. Em métodos por LC, a robustez pode ser avaliada, por exemplo, variando-se o conteúdo de solvente orgânico na fase móvel, pH da fase móvel, marca da coluna cromatográfica, entre outros. Também são incluídos neste parâmetro testes de estabilidade das soluções analíticas, que têm por objetivo determinar o período em que o fármaco ou analito permanece estável sob condições normais de manuseio e armazenamento, podendo ser utilizado nas análises sem alteração significativa na sua concentração e identidade. Algumas condições avaliadas durante esses testes são a incidência de luz ambiente sobre as amostras e o seu armazenamento a diferentes temperaturas.

Antes de realizar experimentos de validação, deve-se avaliar se o sistema utilizado para a análise é capaz de fornecer resultados aceitáveis e confiáveis. Esta avaliação é alcançada com experimentos de adequabilidade do sistema, que pode ser definida como um conjunto de testes para garantir que o equipamento utilizado está apto a gerar resultados de exatidão e precisão aceitáveis. No caso de métodos por cromatografia líquida, o teste é realizado através da análise de parâmetros como simetria do pico, fator de capacidade, número de pratos teóricos, resolução, área do pico e tempo de retenção (RIBANI et al., 2004).

O estudo de degradação forçada é realizado para obtenção de produtos de degradação do fármaco, que são formados através da sua exposição a condições extremas de temperatura, pH, umidade, luz e oxidação. A separação cromatográfica do fármaco de seus produtos de

degradação e impurezas é fundamental para que um método seja considerado específico e indicativo de estabilidade. Recomenda-se que métodos analíticos indicativos de estabilidade sejam usados em estudos de estabilidade de fármacos em matéria-prima ou produto farmacêutico (ICH, 2003; BAKSHI & SINGH, 2002).

3.8 Dissolução de fármacos

3.8.1 Considerações gerais

Dissolução pode ser definida como o processo pelo qual um fármaco é liberado de sua forma farmacêutica e se torna disponível para ser absorvido pelo organismo. A absorção de um fármaco a partir de uma forma farmacêutica sólida, um comprimido, por exemplo, após administração oral depende de uma série de etapas. A primeira delas é a liberação da substância ativa do comprimido, que consiste na desintegração da forma farmacêutica em fragmentos menores e subsequente liberação do fármaco para o meio, deixando-o em contato direto com os fluidos gastrintestinais. A segunda etapa é a dissolução ou solubilização das partículas sólidas do fármaco no local de absorção e sua passagem para o estado de solução, estando, dessa forma, disponível para ser absorvido. A terceira e última etapa, a absorção, corresponde à transferência do fármaco do trato gastrintestinal para a circulação sistêmica, que depende principalmente da sua permeabilidade através das membranas do trato gastrintestinal (PANCHAGNULA & THOMAS, 2000).

Como mencionado anteriormente, para que um fármaco seja absorvido no trato gastrintestinal, ele precisa estar presente na forma de uma solução aquosa no local de absorção. A dissolução de fármacos pode ser descrita pela equação de Noyes-Whitney. A partir da equação, os principais fatores que afetam a cinética da dissolução de fármacos podem ser identificados.

$$\frac{dC}{dt} = \frac{DA}{h} (C_s - C)$$

onde dC/dt = velocidade de dissolução das partículas do fármaco, D = coeficiente de difusão do fármaco em solução, A = área superficial das partículas de fármaco em contato com o meio, h = espessura da camada difusional ao redor da partícula de fármaco, C_s = solubilidade de saturação do fármaco na camada difusional, e C = concentração de fármaco no fluido de

dissolução. A equação de Noyes-Whitney mostra a forma como diversos fatores podem influenciar a velocidade de dissolução, tais como as características físico-químicas do fármaco e os parâmetros fisiológicos relacionados à composição do meio de dissolução. Dentre os fatores relacionados às propriedades físico-químicas inerentes a própria substância, destaca-se a superfície e tamanho de partícula, solubilidade em água, forma cristalina e a ocorrência de polimorfismo. A micronização é uma estratégia bastante utilizada para melhorar a dissolução de fármacos pouco solúveis, pois está relacionada com o aumento na área superficial do pó, que aumenta com a diminuição do tamanho de partícula. Nos fatores fisiológicos que afetam a dissolução de fármacos, incluem-se a viscosidade e composição dos fluidos digestivos, a presença de tensoativos nos sucos gástrico e biliar, a motilidade e variação do pH ao longo do trato gastrintestinal, a influência dos alimentos e o volume de fluido disponível para dissolução (DRESSMAN et al., 1998; DRESSMAN & REPPAS, 2000; PANCHAGNULA & THOMAS, 2000; HÖRTER & DRESSMAN, 2001).

Além dos fatores físico-químicos e fisiológicos, variáveis relacionadas à formulação são capazes de influenciar a velocidade e/ou a extensão da absorção de um fármaco. A incorporação de adjuvantes (diluentes, lubrificantes, tensoativos) à formulação de uma forma farmacêutica sólida oral pode acarretar efeitos significativos sobre a velocidade de dissolução dos fármacos, sobretudo daqueles que são pouco solúveis e hidrofóbicos. Os excipientes presentes no produto farmacêutico afetam a cinética de dissolução pela alteração do meio em que o fármaco está sendo dissolvido ou pela interação direta com a molécula em si (AULTON, 2005; SHARGEL et al., 2005). A biodisponibilidade de compostos pertencentes à classe 2 do Sistema de Classificação Biofarmacêutica é altamente dependente da formulação do produto. Devido ao crescente número de fármacos que possuem baixa solubilidade em água, pesquisas na área de tecnologia farmacêutica têm focado no desenvolvimento de estratégias e sistemas de formulação para melhorar a velocidade e extensão de absorção desses compostos pelo trato gastrintestinal (POUTON, 2006).

3.8.2 Ensaio de dissolução

Devido à natureza crítica da etapa liberação e solubilização do fármaco, o ensaio de dissolução é o modo mais importante de estudar, sob condições *in vitro*, a liberação do fármaco de uma forma farmacêutica sólida, representando, assim, um parâmetro importante para prever seu desempenho *in vivo*. O ensaio de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata, tais como comprimidos e cápsulas, é amplamente

utilizado para avaliar a qualidade lote-a-lote do produto farmacêutico, assegurando que ele cumpre com as especificações, orientar o desenvolvimento de novas formulações e garantir a uniformidade da qualidade e do desempenho do medicamento após determinadas alterações, tais como na formulação, no processo e local de fabricação e durante a transposição de escala do lote de produção (FDA, 1997; BRASIL, 2004).

Em algumas situações, o teste de dissolução pode indicar a eficiência do produto sob condições *in vivo*. Nesse caso, isso requer que os dados de dissolução *in vitro* possuam correlação com a eficiência *in vivo* da forma farmacêutica, o que pode ser verificado experimentalmente através de estudos de correlação *in vivo/in vitro*. O principal objetivo de se desenvolver uma correlação *in vivo/in vitro* é permitir que o teste de dissolução *in vitro* sirva, em alguns casos, como um substituto dos estudos de biodisponibilidade em humanos, sendo que essas correlações são geralmente desenvolvidas para fármacos em que a dissolução é a etapa limitante para a absorção *in vivo* (SIRISUTH & EDDINGTON, 2002; FDA, 1997). Assim, um teste de dissolução que possui correlação *in vivo/in vitro* é capaz de prever o comportamento do produto no organismo, reduzindo a necessidade de novos ensaios em humanos, como no caso de pequenas mudanças no processo de produção, equipamento, formulação (excipientes) ou tamanho do lote, por exemplo.

Assim, embora afirmações definitivas acerca da absorção de fármacos só podem ser feitas a partir de estudos clínicos em humanos, a avaliação do perfil de dissolução representa uma técnica relativamente rápida e de baixo custo para prever o desempenho *in vivo* de um produto farmacêutico (MOORE & FLANNER, 1996).

O rimonabanto apresenta baixa solubilidade em água e alta permeabilidade *in vitro*. Portanto, o fármaco é classificado como um fármaco de classe 2 considerando suas propriedades de solubilidade e permeabilidade, de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (AMIDON et al., 1995; EMEA, 2006). Para fármacos de baixa solubilidade aquosa, como os pertencentes à classe 2, a velocidade de dissolução é geralmente a etapa mais lenta e exerce, portanto, um efeito limitante na sua absorção. Por isso, esses fármacos têm se tornado um problema crescente quanto se trata de obter uma dissolução satisfatória no trato gastrointestinal, necessária para garantir uma boa biodisponibilidade (SHARGEL et al., 2005; DRESSMAN & REPAS, 2000; VARSHOSAZ et al., 2008). Daí a importância de serem desenvolvidos procedimentos que permitem avaliar a dissolução *in vitro* desse tipo de substância, visto que, no organismo, esse processo é etapa indispensável para absorção e distribuição dos fármacos até os locais onde exercerão sua ação farmacológica.

O perfil de dissolução mede a velocidade e extensão da dissolução do fármaco a partir da forma farmacêutica em um meio aquoso pré-estabelecido, sob agitação constante e temperatura controlada. Durante o ensaio, a quantidade acumulativa do fármaco que passa para a solução é registrada em função do tempo. Para isso, são realizadas coletas do meio de dissolução em períodos determinados e posterior quantificação do fármaco nas amostras por técnica analítica adequada, geralmente espectrofotometria ou cromatografia líquida. A avaliação do perfil de dissolução é mais conclusiva que o teste de dissolução em um único ponto, pois permite avaliar todo o processo de liberação e solubilização do fármaco a partir da forma farmacêutica e comparar diferentes formulações (ADAMS, 2001).

3.8.3 Comparação de perfis de dissolução

A avaliação dos perfis de dissolução é útil para selecionar e otimizar formulações durante o processo de desenvolvimento farmacotécnico, avaliar o efeito de determinadas alterações realizadas no produto já em comercialização, como ferramenta no controle de qualidade lote-a-lote e, também, para estabelecer a equivalência farmacêutica entre um novo produto candidato a genérico e seu medicamento de referência. Entretanto, a questão em relação a essa comparação é como determinar o grau em que duas curvas são ou não semelhantes (ADAMS et al., 2001).

Uma abordagem modelo-independente simples usa um fator de diferença (f_1) e um fator de similaridade (f_2) para comparar perfis de dissolução (MOORE & FLANNER, 1996). O fator de diferença f_1 calcula a diferença percentual entre as duas curvas em cada ponto e é uma medida do erro relativo entre elas. O fator de similaridade f_2 é a medida da similaridade da percentagem de dissolução entre cada uma das curvas. A aplicação desse modelo matemático é mais adequada para comparação de perfis de dissolução quando cinco ou mais pontos de coleta estão disponíveis. Cada perfil deve ser realizado com doze unidades de cada produto. Entretanto, alguns aspectos relacionados a esse método fazem com que ele não seja aplicável a todas as situações, como a necessidade de limitar o número de amostras a serem consideradas para cálculo a apenas uma acima de 85% de dissolução, além de o desvio padrão relativo ter que ser menor que 20% nos primeiros pontos e inferior a 10% nos demais (FDA, 1997, SHAH et al., 1998).

Outra maneira para comparar perfis de dissolução baseia-se no cálculo da eficiência de dissolução (KHAN, 1975). A eficiência de dissolução (DE%) pode ser definida como a área

sob a curva de dissolução em um determinado intervalo de tempo, como mostrado na equação a seguir.

$$DE\% = \frac{AUC_{0-60}}{AUC_{TR}} \times 100$$

onde AUC_{0-60} = área sob a curva de dissolução no intervalo de 0 a 60 min, e AUC_{TR} = área total do retângulo correspondente a 100% de dissolução no mesmo intervalo. Os valores de DE% podem ser então comparados por testes estatísticos, como análise de variância ou teste t de Student, para verificar a diferença ou não entre os diferentes perfis de dissolução.

Perfis de dissolução também podem ser comparados por métodos baseados em análise de variância (ANOVA). Nesse caso, os dados brutos, e não as curvas de dissolução, são comparados estatisticamente. Por exemplo, as porcentagens dissolvidas são testadas separadamente em cada ponto de coleta para verificar se existem diferenças entre os produtos. Em seguida, procedimentos *post hoc* podem ser aplicados para mostrar onde se encontram as diferenças. Em geral, os métodos modelo-dependentes e baseados em ANOVA parecem ser mais discriminativos do que os fatores f_1 e f_2 para comparação de perfis de dissolução (POLLI et al., 1997; YUKSEL et al., 2000).

3.8.4 Modelagem matemática de perfis de dissolução

A aplicação de modelos matemáticos pode ser usada para descrever os perfis de dissolução em função do tempo através de uma equação, sendo que a escolha do modelo mais adequado baseia-se em alguns parâmetros, tais como coeficiente de correlação, critério de seleção do modelo (MSC) e ajuste gráfico da curva aos dados. Os modelos de ordem-zero, primeira-ordem, segunda-ordem e de Weibull foram aplicados aos dados de dissolução neste estudo para verificar qual deles melhor se ajusta a cada perfil. A partir da modelagem dos dados é possível determinar as velocidades de liberação do fármaco nas diferentes fases do processo de dissolução e calcular a porcentagem dissolvida em determinado tempo através da equação matemática obtida (POLLI et al. 1997).

4 CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA

4.1 Introdução

A pureza da substância de referência é de fundamental importância para a análise farmacêutica. O FDA reconhece duas categorias de padrões de referência: os compendiais, os quais são obtidos de fontes como USP e Farmacopéia Européia e que não necessitam de caracterização prévia, e os não compendiais, que são substâncias com elevado teor de pureza, mas que devem ser cuidadosamente caracterizados para garantir sua identidade, potência e pureza (SWARTZ & KRULL, 1997).

A substância química de referência (SQR) de rimonabanto (teor declarado de 99,9%) foi adquirida da empresa Sequoia Research Products (Berkshire, Inglaterra). Foi realizada a caracterização da SQR de rimonabanto por técnicas qualitativas e quantitativas antes da sua utilização como padrão de trabalho neste estudo. Esta etapa tem como objetivo verificar a identidade, pureza e qualidade da SQR que será usada nas análises. As técnicas utilizadas foram ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , espectrofotometria na região no ultravioleta (UV), análise elementar e cromatografia líquida (LC).

4.2 Ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da SQR foram obtidos em espectrômetro Bruker (400 e 100 MHz, respectivamente), utilizando metanol deuterado (CD_3OD) como solvente. A análise foi realizada no Departamento de Química da UFSM. Os dados de RMN obtidos foram então comparados aos valores previamente descritos na literatura para o rimonabanto.

O espectro de RMN de ^1H da amostra em CD_3OD é representado na Figura 3. Foram observados os seguintes sinais nos deslocamentos químicos: δ (ppm) 7,53 (1H, d, $^4J_{meta} = 2,4$ Hz, 2,4-diclorofenil H3'), 7,51 (1H, d, $^3J_{orto} = 8,4$ Hz, 2,4-diclorofenil H6'), 7,42 (1H, dd, $^3J_{orto} = 8,4$ Hz, $^4J_{meta} = 2,4$ Hz, 2,4-diclorofenil H5'), 7,31 – 7,34 (2H, m, 4-clorofenil H3' e H5'), 7,14 – 7,16 (2H, m, 4-clorofenil H2' e H6'), 3,45 (4H, m, 2,6-piperidínil), 2,27 (3H, s, 4- CH_3), 1,93 (4H, m, 3,5-piperidínil), 1,59 (2H, m, 4-piperidínil).

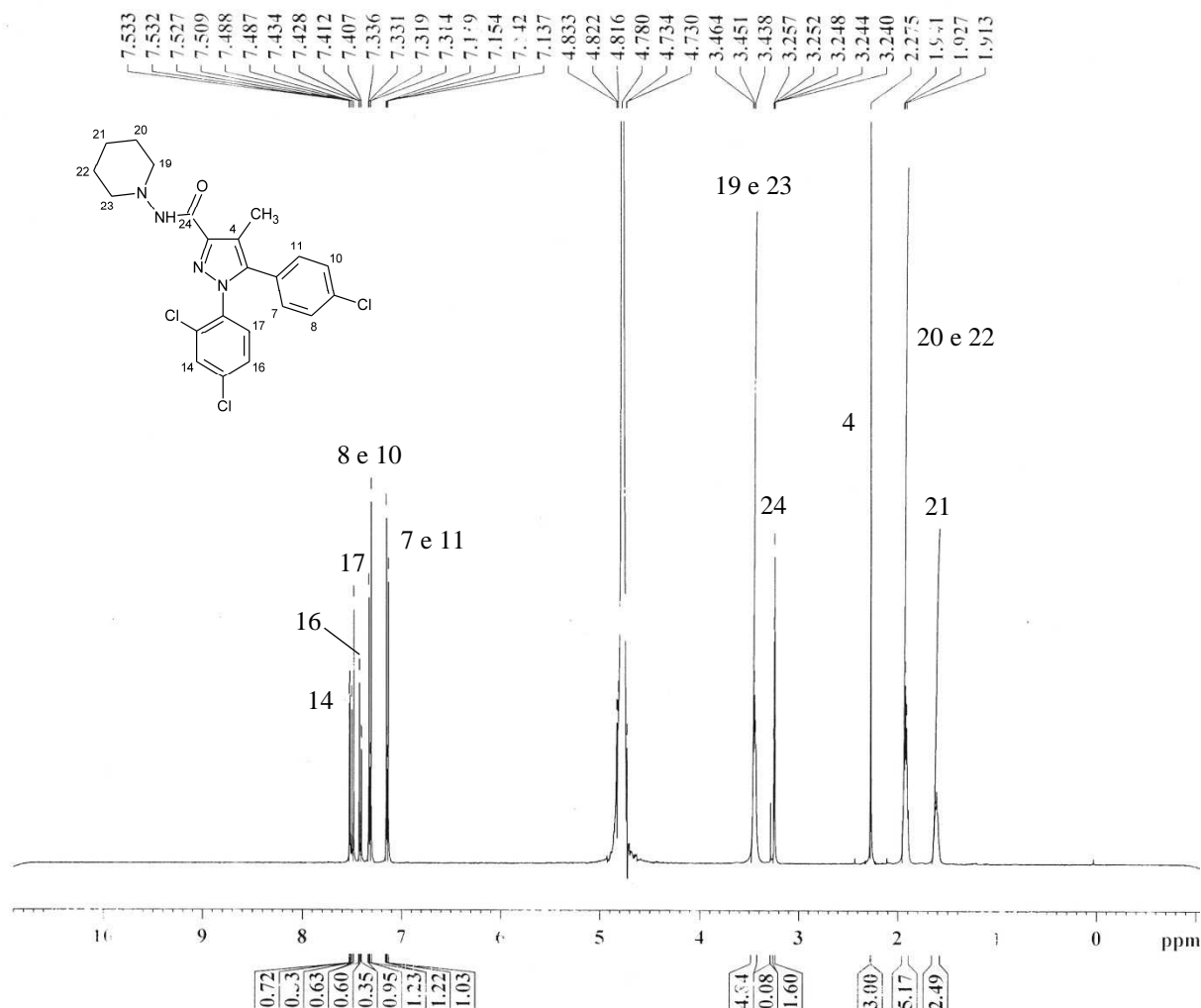


Figura 3 – Espectro de RMN de ¹H do rimonabanto (400 MHz, CD₃OD)

Foram observados na análise de RMN de ¹³C os seguintes sinais nos deslocamentos químicos: δ (ppm) 161,9, 145,0, 142,9, 137,7, 137,0, 136,5, 134,0, 132,5, 132,4, 131,1, 129,9, 129,3, 128,0, 119,9, 58,3 (2,6-piperidinil), 24,4 (3,5-piperidinil), 22,3 (4-piperidinil), 9,3 (4-CH₃). As atribuições estão indicadas na Figura 4.

A análise dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C da SQR está de acordo com a estrutura da substância 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-N-(piperidin-1-il)-1H-pirazol-3-carboxamida. Os sinais de ¹H e ¹³C estão de acordo com aqueles reportados na literatura para a mesma substância (SELTZMAN et al., 1995; DONOHUE et al., 2008).

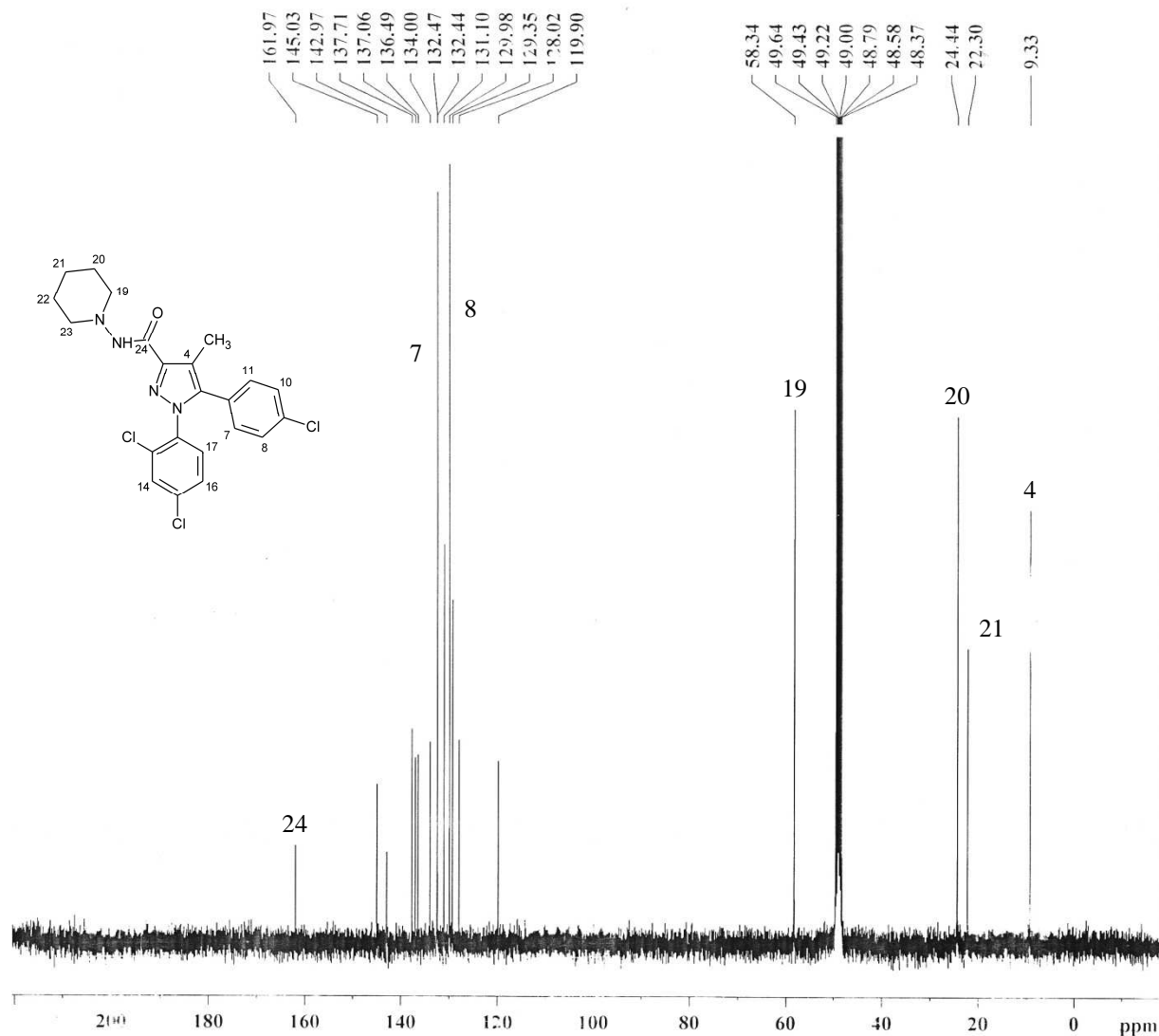


Figura 4 – Espectro de RMN de ^{13}C do rimonabanto (100 MHz, CD_3OD)

4.3 Espectrofotometria na região do ultravioleta

A espectrofotometria na região do UV foi usada para a identificação da SQR e para a determinação do comprimento de onda de máxima absorção do fármaco. Os espectros de absorção no UV do rimonabanto foram obtidos em espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu modelo UV-1601 PC, na concentração de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando metanol e HCl 0,1 M como diluentes. Efetuou-se a varredura espectrofotométrica na faixa 200 – 350 nm, empregando-se cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm. As amostras de comprimidos revestidos e de placebo (somente os excipientes) foram previamente dissolvidas em metanol, deixadas em banho ultrassônico por 5 min para facilitar a solubilização, centrifugadas por 5 min para remoção dos excipientes insolúveis e então diluídas a $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ nos solventes avaliados.

Na Figura 5 estão representados os espectros de absorção no UV da SRQ, da amostra de comprimidos revestidos e do placebo. Tanto em metanol quanto em HCl 0,1 M, o rimonabanto apresenta um único pico de máxima absorção em 202 nm. Os espectros de absorção da amostra foram compatíveis com aqueles obtidos com a SQR, nos diferentes solventes utilizados, indicando que as amostras possuem a mesma identidade. Nota-se que abaixo de 230 nm os excipientes da formulação causam interferência significativa no espectro de absorção do fármaco.

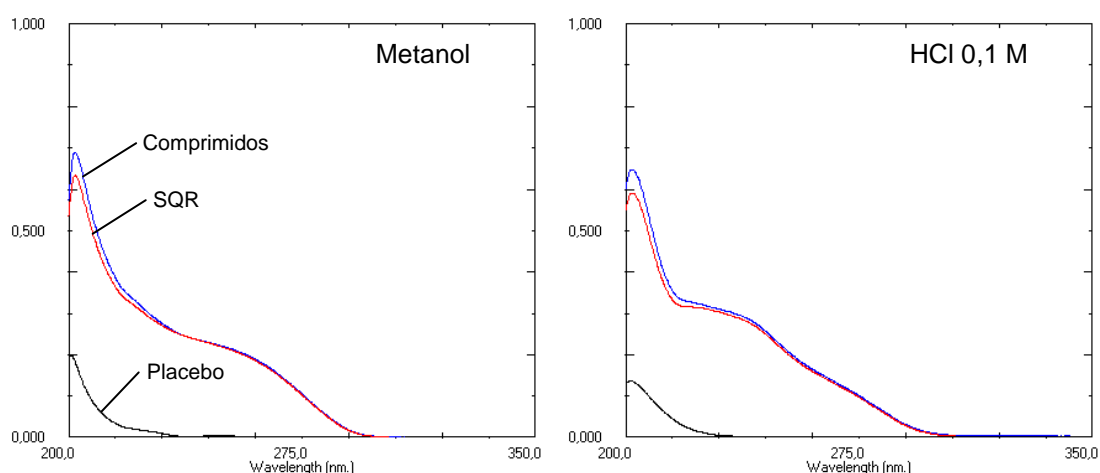


Figura 5 – Espectro de absorção no UV da SQR de rimonabanto, da amostra de comprimidos revestidos e do placebo, na concentração de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, em diferentes diluentes

4.4 Análise elementar

A percentagem de C, H, N e Cl na amostra de SQR foi determinada através de análise elementar. A análise elementar (C, H, N e Cl) da substância foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química da USP. A concentração percentual teórica de cada elemento foi calculada para o rimonabanto base ($\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}$; massa molecular: $463,79 \text{ g mol}^{-1}$) e cloridrato ($\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{Cl}_4\text{N}_4\text{O}$; massa molecular: $500,25 \text{ g mol}^{-1}$), com o objetivo de identificar a forma de apresentação da amostra, através da comparação dos valores obtidos com os teóricos. Os resultados da análise são apresentados na Tabela 2. Os resultados obtidos são compatíveis com o cloridrato de rimonabanto, logo, o fármaco apresenta-se na forma de sal.

Tabela 2 – Composição elementar calculada de C, H, N e Cl do rimonabanto base e seu sal correspondente e resultado da análise elementar realizada com amostra de SQR

Elemento	% em massa		
	Base	Cloridrato	Amostra
C	56,97	52,82	52,72
H	4,56	4,43	4,40
N	12,08	11,20	10,91
Cl	22,93	28,35	29,73

4.5 Cromatografia líquida

A análise por cromatografia líquida utilizou método previamente desenvolvido e validado para quantificação do fármaco em matéria-prima e produtos farmacêuticos. Foi realizada em cromatógrafo líquido Shimadzu, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) modelo SPD-M20A. As condições cromatográficas são mostradas na Tabela 3.

Tabela 3 – Condições cromatográficas utilizadas na caracterização da SQR de rimonabanto pelo método por LC

Coluna	Gemini C ₁₈ (150 × 4,6 mm d.i., 4 µm), Phenomenex [®]
Fase móvel	Acetonitrila: água (75:25, v/v)
Fluxo	1 mL min ⁻¹
Volume de injeção	20 µL
Deteção	215 nm

Os cromatogramas obtidos a partir da análise da SQR de rimonabanto e amostra de comprimidos revestidos, além dos respectivos espectros de absorção dos picos obtidos por DAD podem ser visualizados na Figura 6 e Figura 7, respectivamente. A análise da pureza do pico do rimonabanto obtida por DAD não detectou impureza, indicando a ausência de substâncias que apresentam o mesmo tempo de retenção do fármaco. Pode-se constatar que o tempo de retenção de 7,13 minutos da SQR e do produto comercial é o mesmo, e que os espectros de absorção na faixa de 190 – 300 nm são semelhantes, indicando que as amostras possuem a mesma identidade.

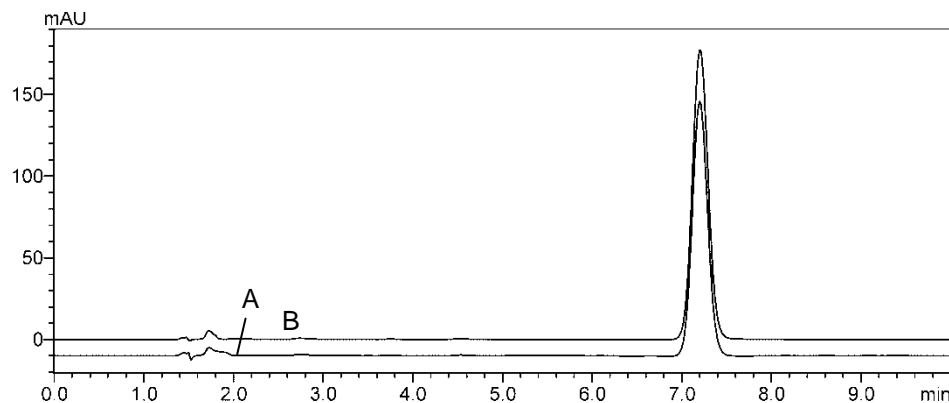


Figura 6 – Cromatogramas obtidos através da análise por LC das soluções de SQR (A) e comprimidos revestidos (B), preparadas em fase móvel, na concentração de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$. As condições cromatográficas estão descritas na Tabela 3

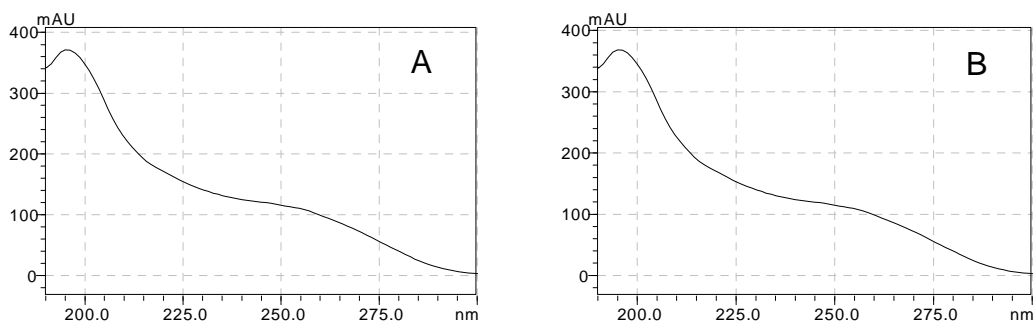


Figura 7 – Espectros característicos obtidos por DAD do pico do rimonabanto (7,13 min) da SQR (A) e da amostra de comprimidos (B)

4.6 Conclusão

Tendo em vista os resultados obtidos nas análises qualitativas da matéria-prima, conclui-se que a SQR apresenta alta pureza, qualidade adequada e composição de acordo com o laudo do fornecedor, podendo, portanto, ser utilizada como padrão de referência neste estudo.

5 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

5.1 HURTADO, F. K.; RAVANELLO, A.; AREND, M. Z.; WRASSE, M.; DALMORA, S. L.; ROLIM, C. M. B. Validated stability-indicating RP-LC method for the determination of rimonabant in pharmaceutical dosage forms. **Journal of AOAC International**, *in press*, 2009.

Validated stability-indicating RP-LC method for the determination of rimonabant in pharmaceutical dosage forms

Felipe K. Hurtado^{a*}, Aline Ravanello^a, Marcela Z. Arend^a, Micheli Wrasse^a, Sergio L. Dalmora^a and Clarice M.B. Rolim^a

^a Departamento de Farmácia Industrial and Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

* Corresponding author:

Felipe Kellermann Hurtado

Phone: +55 55 3220-8806; Fax: +55 55 3220-8248

E-mail adress: felipekellermann@yahoo.com.br

Abstract

A simple reversed-phase liquid chromatographic (RP-LC) method was developed and validated for the determination of rimonabant in pharmaceutical dosage forms. The separation was performed on a C₁₈ column (150 × 4.6 mm i.d., 5 μm) with acetonitrile: water (75:25, v/v) as mobile phase. The detection was achieved with a diode array detector at 215 nm. The method was linear in the concentration range of 0.5-50 μg mL⁻¹ ($r = 1$) with a limit of quantification (LOQ) of 0.24 μg mL⁻¹. The specificity and stability-indicating capability of the method were proved through forced degradation studies, and showing also that there was no increase of the cytotoxicity. Rimonabant was exposed to hydrolytic, oxidative and photolytic stress conditions and the samples were analyzed by the proposed method. Under optimized conditions, rimonabant was successfully separated from its degradation products within 10 min, and the resolution was found to be greater than 2. The relative standard deviation values for intra-day and inter-day precision were always less than 2%. Inter-day accuracy ranged from 98.1 to 101.7% (RSD = 1.0%). Moreover, method validation demonstrated acceptable results for sensitivity and robustness. The method was applied for the quantitative analysis of rimonabant in tablet dosage forms improving the quality control of pharmaceuticals containing this drug.

Keywords: rimonabant, reversed-phase liquid chromatography, pharmaceutical dosage forms, drug stability, cytotoxicity assay

1 Introduction

Overweight and obesity are defined as abnormal or excessive fat accumulation that presents a risk to health. Obesity has reached epidemic proportions globally in both developed and developing countries. In the United States, among 40-59 years old people, more than two thirds are either overweight or obese. In Europe, the prevalence of obesity continues to increase, with more than 50% of the people currently classified as overweight and up to 30% as clinically obese. Obesity and overweight pose a major risk for serious diet-related chronic diseases, including type 2 diabetes, cardiovascular disease, hypertension and stroke, and certain types of cancer. Moreover, even in the absence of comorbidities, obesity significantly impacts health-related quality of life (1-4). Pharmacotherapy focusing on improvement of the metabolic risk profile in abdominally obese patients who are at a high risk of diabetes and cardiovascular disease may be required. For obese patients combined with certain risk factors, pharmacologic treatment can increase weight loss when added to dietary interventions. Besides weight loss, obesity management should target reduction in the cardiometabolic risk factors of atherogenic dyslipidemia, excess abdominal obesity, and elevated glucose (5, 6).

Rimonabant [5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-*N*-1-piperidinyl-1*H*-pyrazole-3-carboxamide] also known as SR141716A is a novel selective cannabinoid-1 receptor antagonist for treatment of obesity. Selective blockade of this receptor has been shown leading to decreased appetite and food intake in animal models. Clinical studies have shown that rimonabant 20 mg once a day produces significant decreases in weight and waist circumference in human obese subjects and improves the lipid profile and glucose control (7, 8). SR141716A has been approved in the European Union since June 2006 to treat obesity and overweight patients who have associated cardiovascular risk factors, such as type 2 diabetes or dyslipidemia. Rimonabant is currently under consideration for approval at the FDA. The drug substance is practically insoluble in water and its *in vitro* permeability was

found to be high. Rimonabant is therefore classified as a Class 2 substance considering solubility and permeability properties, according to the Biopharmaceutics Classification System. Pharmacokinetic studies demonstrated that rimonabant was rapidly absorbed upon oral administration. The absorption rate was dose dependent and decreased with increased dose. Peak plasma concentrations (C_{max}) was reached about 2 hours after administration of a 20 mg dose. The absolute bioavailability was not determined (9).

Most of the published analytical methods for the determination of rimonabant in plasma involve LC-ESI-MS-MS techniques (10-12). The use of fused-core silica column with LC-APCI-MS-MS is described for the determination of rimonabant in mouse plasma (13). Rimonabant was also determined in plasma (14, 15) and bulk drug (16) using LC with UV detection. To date, there is no validated analytical method published for the quantitative analysis of rimonabant as active substance in pharmaceutical dosage form. The safety and efficacy of drug therapy can be ensured using a compendial or validated procedure to assess the quality of pharmaceutical products. The quality of formulations can be evaluated since analytical methods have been considered suitable for their intended purpose, such as quantification of active ingredients, and determination of performance characteristics (e.g., dissolution, drug release) (17). The purpose of the procedure (e.g., identification, test for impurities, quantification) is an important aspect that determines which parameters must be evaluated during method validation. Specificity, precision, accuracy, and linearity are some characteristics that must be assessed in procedures for the quantification of drug substance in formulations.

This work describes the development and validation of a stability-indicating RP-LC method for the determination of rimonabant in pharmaceutical dosage forms. The drug and its degradation products were separated using an isocratic mobile phase on a C_{18} column and

detected by DAD at 215 nm. The method has been applied for the quantitative analysis of rimonabant in tablet dosage form.

2 Experimental

2.1 Chemicals

Rimonabant was purchased from Sequoia Research Products (Oxford, UK). Acomplia[®] (Sanofi-Aventis, France) film-coated tablets containing 20 mg of rimonabant were obtained from commercial sources within their shelf life period. Gradient-grade LiChrosolv acetonitrile and methanol were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Hydrochloric acid, sodium hydroxide and hydrogen peroxide were also obtained from Merck. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was purchased from Vetec (Brazil). Water was purified with WaterPro[™] PS, Labconco system (MO, USA).

2.2 Instrumentation and analytical conditions

The method was performed on a Shimadzu LC system (Kyoto, Japan) equipped with a CBM-20A system controller, LC-20AT pump, DGU-20A₅ degasser, SIL-20A auto-sampler and SPD-M20A diode array detector (DAD). Analytical separation was performed on a RP Phenomenex (Torrance, USA) Gemini C₁₈ column (150 × 4.6 mm i.d., 5 μm particle size) coupled to a C₁₈ guard column (4.0 × 3.0 mm i.d., 4 μm). The isocratic mobile phase was a mixture of acetonitrile: water (75:25, v/v) without pH adjustment, which was pumped at a flow-rate of 1.0 mL min⁻¹. This was filtered through a 0.45 μm nylon membrane filter (Sartorius, Germany). The injection volume was 20 μL for both standard and samples. The detection was achieved with a DAD at 215 nm.

2.3 Preparation of reference solution

A stock solution of rimonabant was prepared by weighing 10 mg of reference substance into a 100 mL volumetric flask and diluting to volume with methanol, obtaining a concentration of $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. The stock solution was stored at $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ protected from light in amber glass flasks when not in use.

2.4 Preparation of sample solution

Twenty tablets containing 20 mg of rimonabant were accurately weighed and crushed to fine powder. An amount equivalent to 10 mg of rimonabant was transferred to a 50 mL volumetric flask with 30 mL of methanol and sonicated for 15 min, followed by adding the same solvent to make up to volume. This solution was stored at $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ protected from light in amber glass flasks when not in use. The solution obtained from the tablets was centrifuged at 12,000 rpm for 5 min, diluted with mobile phase and filtered on $0.45 \mu\text{m}$ nylon membrane filter (Sartorius, Germany) before LC analysis.

2.5 Method validation

The method was validated by the evaluation of the following parameters: specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), robustness and stability studies, according to the ICH guidelines for validation of analytical procedures (18). System suitability test was also carried out to evaluate the reproducibility of the analytical system, using five replicate injections of a reference solution. The parameters measured were injection repeatability, retention time, theoretical plates, peak symmetry and capacity factor.

2.5.1 Specificity

The specificity of the analytical method was determined by assaying the analyte in the presence of its degradation products, which were formed during exposure of rimonabant to accelerated degradation conditions, and by preparing samples of placebo. The placebo consisted of all the excipients (starch, lactose monohydrate, povidone K 30, croscarmellose sodium, sodium lauryl sulfate, microcrystalline cellulose, magnesium stearate, hypromellose 15 mPa.s, titanium dioxide, macrogol 3000 and carnauba wax) without the active ingredient. Forced degradation studies were performed to evaluate the stability-indicating capability of the proposed method.

2.5.2 Linearity

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. Three analytical curves were constructed by plotting peak areas against the respective concentrations. From the stock reference solution of rimonabant, six concentrations were prepared in mobile phase in the range of 0.5-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

2.5.3 Precision and accuracy

The precision of the procedure was determined by repeatability and intermediate precision. Repeatability was evaluated assaying six determinations at the same concentration, during the same day, under the same experimental conditions. Intermediate precision was analyzed comparing the assays on three different days and using different analysts. Accuracy was evaluated assaying three concentrations (20, 25 and 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$) in triplicate and in three different days. The precision and accuracy were calculated as the percentage of the drug

recovered from the formulation and also expressed as the relative standard deviation (RSD) between the measurements.

2.5.4 Limit of detection and limit of quantification

The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated based on the standard deviation of the response and the slope using three independent analytical curves, as defined by ICH (18).

2.5.5 Robustness and solution stability

The robustness was determined by the analysis of the samples under a variety of conditions of the method parameters, such as: different columns (Synergi Fusion-RP 80 C₁₈, 150 × 4.6 mm i.d., 4 μm particle size), percentage of acetonitrile in the mobile phase composition (73 and 77%), flow-rate (0.9 and 1.1 mL min⁻¹) and injection volume (10 and 30 μL). The stability of stock solutions was carried out by leaving the methanolic reference solution (100 μg mL⁻¹) in an amber glass flask at room temperature and at 4 °C. The stability of working solutions in the mobile phase was also evaluated by leaving them into the auto-sampler, at room temperature, for 8 h. Photostability of stock solutions was carried out on methanolic solution which was exposed to natural daylight for 5 h without sample protection, in order to evaluate the effect of light exposure in the stability of the drug substance. The stability of these solutions was studied performing the experiment and observing a decrease on peak area of rimonabant and/or formation of degradants, compared with freshly prepared solutions.

2.6 Stress degradation studies

With the purpose of evaluating the stability-indicating capability of the analytical method, some reference solutions at $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ were submitted to accelerated degradation to conduct the formation of rimonabant degraded forms. For hydrolytic conditions, rimonabant was dissolved initially in methanol (50%, v/v) and later diluted in either 1 N hydrochloric acid (acid hydrolysis), or 1 N sodium hydroxide (basic hydrolysis), to achieve a concentration of $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Both solutions were refluxed at $80 \text{ }^\circ\text{C}$ for 6 h, cooled and neutralized with acid or base, as necessary. The oxidative degradation was performed by dissolving rimonabant in methanol (50%, v/v) and later diluted with 30% hydrogen peroxide. This solution was stored at room temperature for 24 h, protected from light. Photodegradation was induced by exposing samples prepared in methanol close to ultraviolet light (254 nm) for 4 h. For this, samples were kept into an irradiation chamber equipped with a 30 W UV-C lamp (Philips, Holland). After the procedures, the samples were diluted in mobile phase to a final concentration of $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Peak purity test was performed by DAD to show that the analyte chromatographic peak is not attributable to more than one component.

2.7 In vitro cytotoxicity assay

The cytotoxicity assay was carried out with the exposure of NCTC clone 929 cells (mouse fibroblasts, ATCC number CCL-1) to the degraded samples of rimonabant aqueous solution ($80 \mu\text{g mL}^{-1}$), which stayed in contact for 24 h with culture medium MEM (minimum Eagles's medium, Sigma Co., São Paulo, Brazil) at $37 \text{ }^\circ\text{C}$. The cytotoxic effect was evaluated using neutral red uptake. The cells were maintained in MEM containing 10% fetal calf serum and 1% non-essential amino acids (MEM-FCS) in a humidified incubator with 5% CO_2 at $37 \text{ }^\circ\text{C}$. The cells were detached by 0.2% trypsin (Difco, São Paulo, Brazil) and 0.2 mL of the cell suspension, about $2.5 \times 10^5 \text{ cell mL}^{-1}$, were dispensed in 96-well plates. The plates were

incubated for 24 h at 37 °C in a CO₂ humidified incubator. After this period, the medium was discarded and replaced with 0.2 mL of serially diluted solution of each sample (40, 20, 10, and 5 µg mL⁻¹). Controls with cell culture and rimonabant standard were included. In the same assay with samples, a positive control (0.02% phenol solution) was run. The plates were incubated again for 24 h under the same conditions. After the incubation period, the medium and samples were discarded and replaced with 0.2 mL of neutral red solution. After incubation at 37 °C for 3 h, the dye medium was discarded and the microplate was washed twice with PBS. The cells were washed with a solution of 1% CaCl₂ in 0.5% formaldehyde. The rupture of cells and neutral red release was obtained by addition of 0.2 mL of extractant solution containing 50% ethanol in 1% acetic acid. Cell viability was determined on a microplate absorbance reader with 540 nm filter (Anthos Labtec Instruments, Austria).

3 Results and discussion

3.1 Optimization of chromatographic conditions

A simple stability-indicating RP-LC method has been developed for determination of rimonabant in the presence of its degradation products. The method was optimized to provide a good separation of the components (acceptable theoretical plates and resolution between peaks) with a sufficient sensitivity and suitable peak symmetry (peak tailing factor < 2) in a short run. For this purpose, analytical column, solvent selection, mobile phase composition, flow-rate, and detector wavelength were studied.

Rimonabant is an active lipophilic agent, practically insoluble in water. Although the drug is a weak base with pK_a value 3.6, the use of acidic solutions, which favors protonation of rimonabant, has little effect on dissolving the compound in aqueous solution. Our experiments and also data reported in literature showed that both methanol and DMSO could

dissolve rimonabant. Tests using DMSO as initially solvent showed that it compromise the detection sensitivity of the analyte by UV detection interfering in the baseline of the chromatogram. So that, methanol was chosen as a suitable solvent to extract rimonabant from pharmaceutical formulation since the molecule is easily soluble in this solvent.

The use of hydrophobic stationary phases usually provides adequate retention of organic non-polar molecules. The chromatographic separation was achieved using a reversed-phase C₁₈ column, because it is suitable to resolve the degradation products from rimonabant with adequate resolution and symmetrical peak shapes. The use of acetonitrile as organic modifier resulted in better sensitivity when compared to methanol. Small variations in the percentage of acetonitrile in the mobile phase resulted in considerable change in the retention time of rimonabant. Tests involving the use of mixtures of acetonitrile and different buffer solutions (e.g., potassium phosphate or ammonium acetate) with different pH values did not affected both peak symmetry, sensitivity and retention time substantially. Finally, it was found that a mixture of acetonitrile: water (75:25, v/v) as mobile phase was suitable for the analytical separation. The method has many advantages, for example simplicity, isocratic conditions, and absence of buffers in mobile phase composition, which could damage the chromatographic column and equipment. Under these conditions, retention time of rimonabant was about 7.12 min, with a good peak shape (peak symmetry), and the chromatographic analysis time was less than 10 min.

3.2 Method validation

3.2.1 Linearity

The analytical curves were constructed by plotting concentration versus peak area and showed to be linear in the 0.5-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ range. The representative linear equation was $y =$

$79228x + 6390.7$, with a highly significant correlation coefficient ($r = 1$). The RSD of the slope was 0.8%. The validity of the three analytical curves was verified by means of ANOVA, which demonstrated significant linear regression and no significant deviation from linearity ($p > 0.05$). The linear range obtained for the procedure allows its application to *in vitro* drug-dissolution profiles of oral dosage forms containing 20 mg of rimonabant, since the calibration curve is linear to range $0.5\text{-}50 \mu\text{g mL}^{-1}$ and the method has an appropriate sensitivity ($\text{LOQ} = 0.24 \mu\text{g mL}^{-1}$).

3.2.2 Precision and accuracy

The intra-day precision of the method ($\text{mean} \pm \text{RSD}\%$) was 100.1 ± 0.3 ($n = 6$). The intermediate-precision was evaluated by comparing the results obtained on three different days and between analysts. The value was found to be 100.2 ± 0.5 ($n = 18$). Results are shown in Table 1. The low variability of the experimental values obtained for the determination of rimonabant in samples indicates that precision and reproducibility of the method are acceptable. The intra-day accuracy of the assay was performed from nine determinations of rimonabant at concentrations of 80, 100 and 120% of the work solution ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$). The recoveries obtained for rimonabant were 99.6 ± 0.4 ($n = 9$). The values of inter-day accuracy were found to be 100.0 ± 1.0 ($n = 27$). Results are shown in Table 2. Recovery and RSD data confirm the accuracy of the method.

Table 1. Intra-day and inter-day precision results for rimonabant samples in pharmaceutical dosage form

Sample	Recovery (%)		
	Day 1	Day 2	Day 3 ^a
1	100.6	100.1	100.3
2	100.0	100.9	100.3
3	100.1	99.5	101.0
4	100.0	99.4	100.3
5	100.3	99.9	100.5
6	99.6	99.7	101.3
Intra-day precision, $n = 6$ (mean \pm RSD% ^b)	100.1 \pm 0.3	99.9 \pm 0.5	100.6 \pm 0.4
Inter-day precision, $n = 18$	100.2 \pm 0.5		

^a Different analyst

^b RSD% Relative standard deviation

Table 2. Intra-day and inter-day accuracy data for the method applied to rimonabant pharmaceutical dosage form

Theoretical ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recovery (%) ^a		
	Day 1	Day 2	Day 3
20	100.0	100.1	101.7
25	99.4	99.7	100.7
30	99.4	98.6	100.7
Intra-day accuracy, $n = 9$ (mean \pm RSD% ^b)	99.6 \pm 0.4	99.5 \pm 1.1	101.0 \pm 0.8
Inter-day accuracy, $n = 27$	100.0 \pm 1.0		

^a Mean of three replicates

^b RSD% Relative standard deviation

3.2.3 Limit of detection and limit of quantification

The LOD and LOQ were calculated using the mean of the slope and the standard deviation of the intercept of three independent analytical curves. The values obtained were 0.08 and 0.24 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively.

3.2.4 System suitability test

The mean and RSD values of peak area, retention time, number of theoretical plates, tailing factor and capacity factor are shown in Table 3. The experimental results show that the parameters tested were satisfactory and within the acceptable range (RSD < 2%), indicating that the LC system and procedure are suitable for the analysis intended.

Table 3. Results of system suitability test

Parameter	Result obtained ^a	
	Mean	RSD%
Peak area (A)	2022685	0.1
Retention time (min)	7.14	0.1
Theoretical plates (N)	8772.11	0.1
Tailing factor	1.15	0.1
Capacity factor (k')	3.78	0.2

^a Mean of five replicates

3.2.5 Robustness and solution stability

Deliberate variations in method parameters had no significant effect on the determination of the drug in the pharmaceutical dosage form, demonstrating that measurements are not susceptible to variations in analytical conditions. The results from the stability testing revealed that the methanolic stock solutions of rimonabant were stable for at least 8 h when maintained at room temperature and protected from light. When stored under refrigeration at 4 °C in an amber glass flask, the solutions remained stable for at least 72 h. Samples were also stable for at least 8 h when maintained into the auto-sampler diluted in mobile phase, which was sufficient for the whole analytical process. In the period studied, there was no formation of any unknown peak or decrease on peak area of rimonabant. Data described in literature show that rimonabant when dissolved in DMSO were stable for at least 6 months when kept at -20 °C (11), and methanolic solutions remained stable under refrigeration (4 °C) for 30 days (12). However, our tests revealed that its solutions are sensitive to light and to oxidants. A solution exposed to ambient light for 5 h had a degradation of 4.5% on the amount of rimonabant and formation of additional peaks

simultaneously. The low photostability of rimonabant was confirmed by forced degradation studies described below.

3.3 Stress degradation studies

Figure 1 shows the extent of degradation of rimonabant under various stress conditions. The drug was stable to acidic and basic hydrolysis. It was not observed decrease of the peak area when rimonabant was exposed to acidic and alkali conditions at 80 °C for 6 h. Under the oxidative condition with 30% hydrogen peroxide for 12 h, the drug showed significant degradation. The extent of degradation in this condition was 37.6% and two main degradation products were observed at 6.40 and 7.82 min. After 24 h of exposition 68.9% of the drug was degraded. During the photolytic condition, rimonabant was rapidly and extensively degraded and two main additional peaks were detected at 6.44 and 12.17 min. Under exposition to ultraviolet light for 10 min the drug showed a degradation of 86.6%, and after 4 h of exposition less than 1% of the drug content remained in solution, while peak area of product III had increased simultaneously. These results show that compound III is the main photodegradation product of rimonabant. Chromatographic peak purity values obtained for rimonabant were higher than 0.9999, indicating homogenous peaks and absence of any coeluting peak with the same retention time. Resolution between rimonabant and degradation product III was found to be greater than 2.4. In optimized conditions rimonabant and its degradants were well separated, thus demonstrating that the proposed method is selective and stability-indicating. No interferences from excipients with the peak of interest were observed through the analysis of a placebo formulation, confirming the specificity of the method.

Analyzing the diode array spectrum (190-300 nm) of each degradation product it was found that the compounds I and III possess different spectrum, although its retention times are almost the same, suggesting that they are of distinct substances (Fig. 2). Since rimonabant and

compound III have shown similar retention times it seems that they are structurally related, but the isolation and identification of this degradation product was not yet performed.

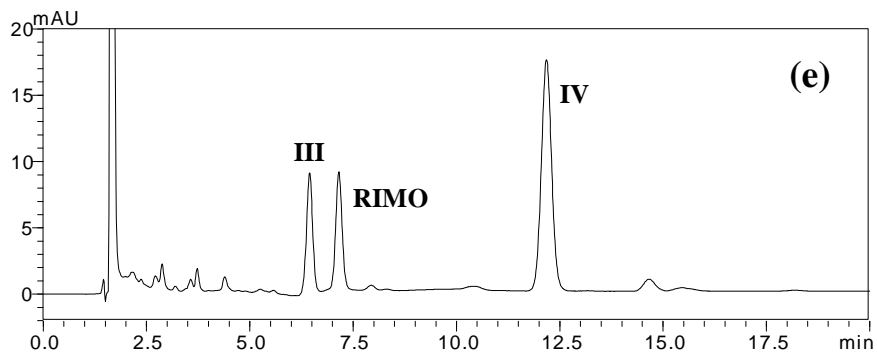
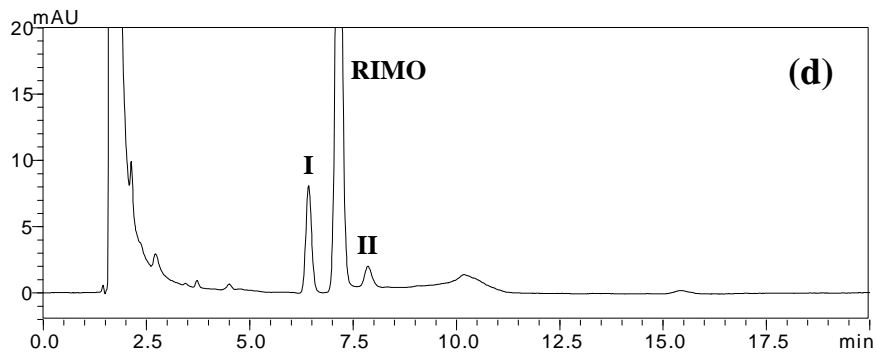
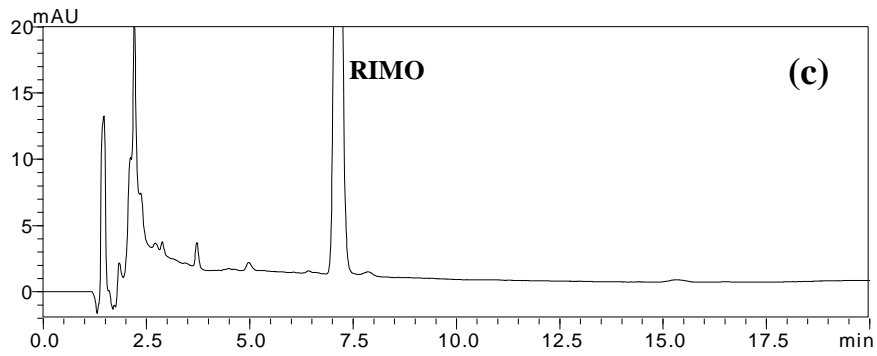
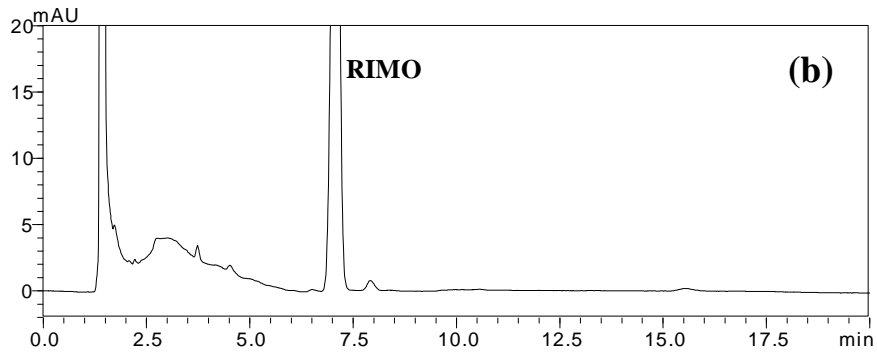
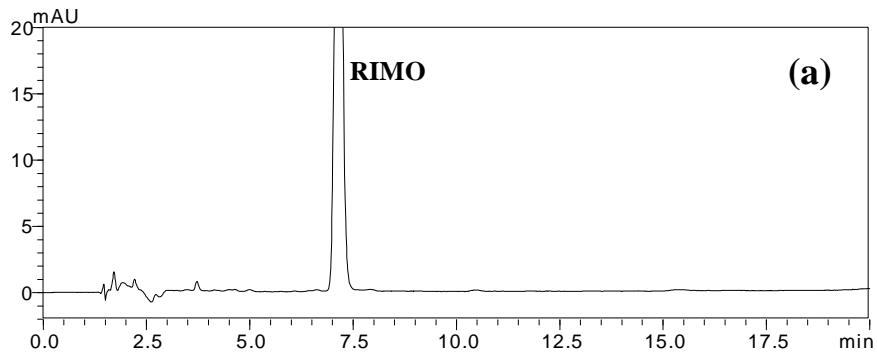


Figure 1. LC chromatograms of rimonabant reference solution ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) submitted to stress degradation conditions. (a) reference solution; (b) after acidic hydrolysis; (c) after alkali hydrolysis; (d) under oxidative condition for 12 h: degradation products I and II; (e) after exposition to ultraviolet light for 10 min: degradation products III and IV

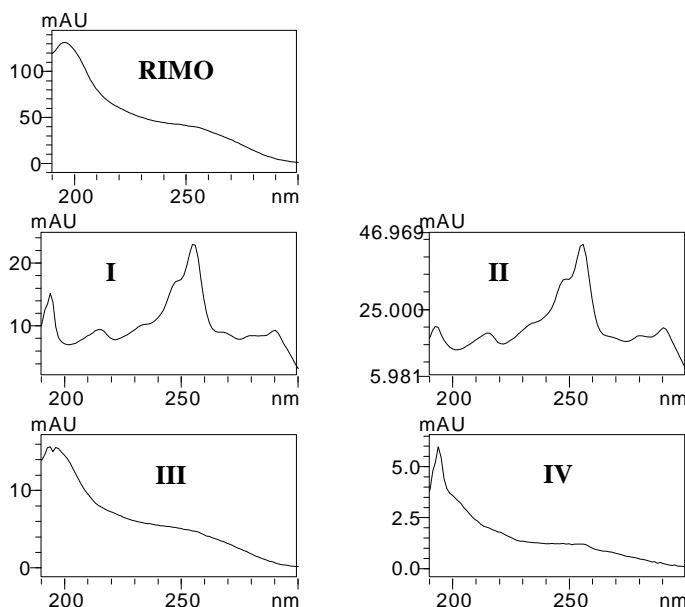


Figure 2. Diode array spectrum data (190-300 nm) of rimonabant and its degraded forms

3.4 In vitro cytotoxicity assay

The cytotoxicity assay against NCTC clone 929 cells was performed to evaluate the effect of the degraded forms related to the intact molecule, to foresee possible undesirable effects resulting from the unstable samples, showing non-significant differences ($p > 0.05$). The results obtained indicate that the degraded samples showed no increase in cytotoxicity against the assayed cell culture after 24 h of exposure.

3.5 Assay of rimonabant in tablets

The applicability of the validated LC method to the determination of rimonabant was verified by analysis of 20 mg rimonabant tablets. The percentage recovery of rimonabant in

pharmaceutical dosage forms ranged from 102.0 to 103.2%, with a mean \pm RSD% of 102.6 ± 0.5 ($n = 9$), corresponding to 20.5 mg per tablet. These values were in accordance with the labeled claim amount. The retention time observed in the assay (7.12 min) associated with the simple sample preparation allows a fast quantitative analysis of the drug in pharmaceutical formulations, which is suitable for quality control laboratories.

4 Conclusions

The presented RP-LC method proved to be simple, linear, specific, precise, accurate and sensitive. The proposed method was successfully applied for the quantitative analysis of rimonabant in tablet dosage forms. It was also suggested that the method can be applied to the determination of rimonabant in dissolution studies of solid dosage forms. It can therefore be easily adopted for routine quality control of rimonabant in pharmaceutical formulations. Moreover, the method is stability-indicating and can be used for the analysis of the drug and degradation products in stability tests.

Acknowledgments

The authors wish to thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) for their support.

References

- (1) Van Gaal, L.F., Rissanen, A.M., Scheen, A.J., Ziegler, O., & Rössner, S. (2005) *The Lancet* **365**, 1389-1397
- (2) Hampp, C., Hartzema, A.G., & Kauf, T.L. (2008) *Value Health* **11**, 389-399
- (3) Rubio, M.A., Gargallo, M., Millán, A.I., & Moreno, B. (2007) *Public Health Nutr.* **10(10A)**, 1200-1205
- (4) Scheen, A.J. (2007) *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **21**, 535-553
- (5) Després, J.P., Golay, A., & Sjöström, L. (2005) *N. Engl. J. Med.* **353**, 2121-2134
- (6) Pi-Sunyer, F.X., Aronne, L.J., Heshmati, H.M., Devin, J., & Rosenstock, J. (2006) *J. Am. Med. Assoc.* **295**, 761-775
- (7) Cox, S.L. (2005) *Drugs Today* **41**, 499-508
- (8) Patel, P.N., & Pathak, R. (2007) *Am. J. Health Syst. Pharm.* **64**, 481-489
- (9) European Medicines Agency (2006) *Acomplia: Scientific Discussion*, European Public Assessment Report, London, UK
- (10) Delyle, S.G., Abe, E., Devillier, P., & Alvarez, J.C. (2008) *J. Chromatogr. B* **872**, 115-120
- (11) McCulloch, M., Zhou, X., Xu, Y., Brunell, S., & Spear, L. (2008) *J. Chromatogr. B* **863**, 258-265
- (12) Nirogi, R., Kandikere, V., Mudigonda, K., & Ajjala, D. (2008) *Biomed. Chromatogr.* **22**, 469-477
- (13) Hsieh, Y., Duncan, C.J.G., & Brisson, J.M. (2007) *Anal. Chem.* **79**, 5668-5673
- (14) Javors, M.A., & McMahon, L.R. (2007) *FASEB J.* **21**, 566.4
- (15) Bhaumik, U., Ghosh, A., Chatterjee, B., Sengupta, P., Darbar, S., Roy, B., Nandi, U., & Pal, T.K. (2009) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **49**, 1009-1013

- (16) Raju, T.S., Ravikumar, M., Kumar, K.V., Raghavachary, K.S.V., Varma, M.S., Rao, C.S.N.M., & Swamy, P.Y. (2008) *Chromatographia* (**in press**)
- (17) *The United States Pharmacopeia* (2008) 31st Ed., The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD
- (18) *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* (2005), International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland

5.2 HURTADO, F. K.; RAVANELLO, A.; TORRES, B. G. S.; SOUTO, G. D.; BECK, R. C. R.; ROLIM, C. M. B. Dissolution testing and in vitro release profile of a poorly water soluble drug from different commercially available dosage forms.

(Artigo submetido para publicação no periódico *Scientia Pharmaceutica*)

Dissolution testing and in vitro release profile of a poorly water soluble drug from different commercially available dosage forms

Felipe K. HURTADO, Aline RAVANELLO, Bruna G. S. TORRES, Gabriele D. SOUTO, Ruy Carlos R. BECK, Clarice M. B. ROLIM *

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

* Corresponding author. E-mail: crolim@smail.ufsm.br (C. M. B. Rolim)

Abstract

The effect of formulation parameters on in vitro release profile of a poorly soluble drug was investigated, using rimonabant as model drug. A dissolution test was developed to evaluate the release profile of rimonabant from both 20 mg film-coated tablet and capsule dosage forms. The test was applied to compare dissolution profiles of different dosage forms and to evaluate the effect of formulation parameters on the in vitro release profile of the drug. Four different commercially available products were evaluated and the results obtained showed very distinct rate and extent of dissolution among them. The type of excipients used in capsule formulation influenced significantly the dissolution rate of formulations studied.

Keywords

Poorly water soluble drugs • In vitro drug release • Immediate release solid oral dosage forms
• Dissolution testing • HPLC analysis

Introduction

Many drugs are poorly soluble or insoluble in water, which results in poor bioavailability because the solubility of a drug is an important factor in determining the rate and extent of its absorption [1]. The drug release rate is one of the most important parameters for solid oral drug delivery systems, therefore, the therapeutic response is a function of the concentration of the drug available to be absorbed and reach the blood stream [2]. Physical factors important to drug dissolution include particle size, molecular size, hydrophilicity and its crystalline structure. The volume of medium into which the drug must dissolve can also play a role in determining the dissolution rate [3].

Physical modifications often aim to increase the surface area, solubility and wettability of the powder particles and therefore typically focus on particle size reduction or generation of amorphous states. Classically, particle size reduction is performed by milling and a wide variety of apparatus is available. The increase in bioavailability after micronization of drugs is well known and the technique has been applied to a variety of poorly water soluble compounds [4]. Another approach for improving solubility is by complexation and incorporation of drugs into cyclodextrins [5].

In recent years, the number of compounding pharmacies has increased considerably. One reason for the proliferation of this kind of pharmacy is the low selling price of the drugs compared to those produced by the pharmaceutical industry, which attracts the attention of customers. Besides the manipulation and sale of cosmetics, some establishments provide drugs under special control, such as antidepressants and appetite inhibitors. Although Current Good Manufacturing Practices (CGMP) establishes the minimum requirements in manufacturing, processing, packaging, and holding of human drug products [6], it is known that many establishments do not meet the minimum requirements to be observed in preparation, storage and dispensation of magistral preparations, as well as purchase of raw materials and packaging materials. Thus, often the products purchased by the patients are of low quality and without evidence of their therapeutic efficacy.

The incorporation of adjuvants (e.g., diluents, lubricants and surfactants) to the formulation of a solid oral dosage form can cause significant effects on the dissolution rate of drugs, especially those that are hydrophobic and poorly soluble [7]. In the case of class II drugs, according to the Biopharmaceutics Classification System (BCS), dissolution may be the rate limiting step for drug absorption, so the use of suitable dissolution tests can be applied to

predict differences in bioavailability among different formulations [8]. The choice of formulation is often of critical importance to establishing a successful product for oral administration of this class of drugs [9].

The aim of this study was to evaluate and compare the dissolution profiles of the compounded formulations compared with the reference product, using rimonabant as a model drug (Fig. 1). This drug is poorly soluble in water and its *in vitro* permeability was found to be high. Rimonabant is therefore classified as a class II compound considering solubility and permeability properties, according to the BCS [10]. To date, there is no dissolution testing published for the evaluation of *in vitro* release profile of this drug from immediate release solid oral dosage forms. Therefore, we also developed a dissolution method for rimonabant to determine its release profile from pharmaceutical formulations. To assess the influence of formulation on dissolution kinetics of the drug, we prepared formulations containing different types and proportions of excipients and particle size of the drug.

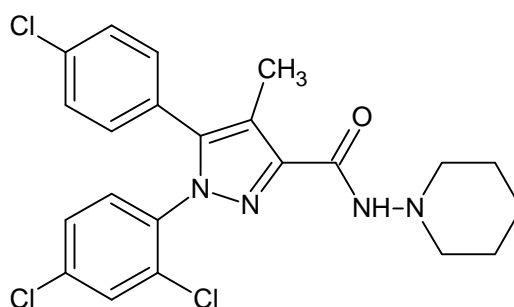


Fig. 1. Chemical structure of rimonabant (MW = 463.79 g mol⁻¹)

Materials and Methods

Chemicals

Model drug rimonabant (99.5%) was purchased from Sequoia Research Products (Oxford, UK). Acomplia[®] film-coated tablets (Sanofi-Aventis, France) and compounded capsules, both containing 20 mg of rimonabant, were obtained from the market. Gradient-grade LiChrosolv acetonitrile and methanol were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Sodium lauryl sulfate (SLS) was purchased from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). Water was purified with WaterPro[™] PS, Labconco system (Missouri, USA). All other chemicals were of

pharmaceutical grade. The pharmaceutical formulations used for comparison of dissolution profiles were:

Reference product (Acomplia[®], film-coated tablet) – starch, lactose monohydrate, povidone K 30, croscarmellose sodium, sodium lauryl sulfate, microcrystalline cellulose, magnesium stearate, hypromellose 15 mPa.s, titanium dioxide, macrogol 3000 and carnauba wax.

Product A (capsule) – starch and Aerosil[®] (colloidal silicon dioxide).

Product B (capsule) – starch, sodium lauryl sulfate and microcrystalline cellulose.

Product C (capsule) – lactose, magnesium stearate, microcrystalline cellulose, Aerosil[®], HPMC (hydroxypropylmethylcellulose) and Explotab[®] (sodium starch glycolate and sodium carboxymethyl starch).

In vitro drug release study

The dissolution test was performed in a Pharma Test multi-bath ($n = 6$) dissolution system (Hamburg, Germany). The assay was performed using USP apparatus 2 (paddle) at 50 rpm and 900 mL of medium at 37 ± 0.5 °C. The dissolution medium consisted of 0.15% (w/v) SLS in water. Each dissolution test was performed with twelve dosage forms. Sample aliquots of 10 mL were withdrawn at 5, 10, 15, 20, 30, 45 and 60 min and replaced with an equal volume of the fresh medium at 37 °C to maintain a constant total volume. Sinkers were used to prevent floating of the capsules. Each sample was filtered on a quantitative filter paper (Schleicher & Schuell, Germany), appropriately diluted with mobile phase and filtered through a 0.45 µm polyamide membrane filter (Sartorius, Germany) before HPLC analysis.

HPLC analysis

Rimonabant was analyzed using a previously validated HPLC method [11]. Briefly, analysis of dissolution samples was performed on a Shimadzu LC system (Kyoto, Japan) equipped with a CBM-20A system controller, LC-20AT pump, DGU-20A5 on-line degasser, SIL-20A auto-sampler and SPD-M20A diode array detector (DAD). Analytical separation was performed on a Gemini C18 column (150 × 4.6 mm i.d., 5 µm particle size) coupled to a C18 guard cartridge (4 × 3.0 mm i.d.) from Phenomenex (Torrance, USA). The isocratic mobile phase was a mixture of acetonitrile: water (75:25, v/v) without pH adjustment, which was

pumped at a flow-rate of 1.0 mL min^{-1} . The injection volume was $20 \text{ }\mu\text{L}$. The detection was achieved with a DAD at 215 nm .

The method was validated by the evaluation of the following parameters: specificity, linearity, precision and accuracy, according to the ICH guidelines for validation of analytical procedures [12]. The specificity of the analytical method was evaluated by preparing a placebo sample of the reference tablet formulation. The placebo consisted of all the excipients and hard gelatin capsule without the active ingredient. The concentration of excipients in formulation was based on the literature [13] and calculated for a medium weight of content (312.6 mg) for the tablets. The placebo sample was transferred to the vessel, filled with 900 mL of dissolution medium at $37 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ and stirred for 60 min using paddle. Aliquots were withdrawn and analyzed by HPLC.

Solubility determination and drug stability

Drug solubility and solution stability are important properties to be considered when selecting the dissolution medium [14]. In order to evaluate sink conditions for dissolution testing of dosage forms, solubility of rimonabant in dissolution medium ($0.15\% \text{ SLS}$) was determined. Bulk drug was transferred to a flask containing dissolution medium (10 mL) maintained at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ and under constant agitation until, by visual inspection, precipitation of the drug occurred. Saturation of medium was achieved by adding excess of the drug. At the end of 72 h , undissolved drug was removed by centrifugation followed by filtration on cellulose acetate membrane (porosity $0.45 \text{ }\mu\text{m}$). The resulting solution was diluted in mobile phase and analyzed by HPLC.

Stability of samples in dissolution medium was evaluated by leaving them into the dissolution vessels, at room temperature and protected from light, for 24 h . All assays and measurements were performed in a dark room to avoid degradation of the drug due its low photostability. Samples were considered stable when the content of drug in solution was between 98 and 102% of the initial value.

Preparation of the hard gelatin capsules

Rimonabant capsules containing different excipients were prepared for evaluation of formulation parameters on in vitro release profile of the drug. Influence of capsule diluent

(e.g, starch, lactose, microcrystalline cellulose), disintegrants (e.g., crospovidone, croscarmellose sodium) and SLS, an anionic surfactant, was studied. Formulations were prepared by physically mixing rimonabant (6.67%) with excipients for 10 min, and then manually filling the powder mixture into hard gelatin capsules. It was also studied the effect of particle size on dissolution rate of rimonabant. Micronization was accomplished by milling the drug and mixing it with excipients. Particle size analysis was determined by optical microscopy at 200x. The composition of capsule formulations is shown in Table 1.

Tab. 1. Composition of formulations prepared for in vitro release study

Ingredient	Amount per capsule*									
	Formulation 1		Formulation 2		Formulation 3		Formulation 4		Formulation 5**	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
Rimonabant, hydrochloride	20	6.67	20	6.67	20	6.67	20	6.67	20	6.67
Starch	274	91.33	268	89.33	45	15.00	45	15.00	45	15.00
Lactose	-	-	-	-	115	38.33	115	38.33	115	38.33
Povidone K 30	-	-	-	-	15	5.00	15	5.00	15	5.00
Croscarmellose sodium	-	-	-	-	30	10.00	30	10.00	30	10.00
Sodium lauryl sulfate	-	-	6	2.00	6	2.00	-	-	6	2.00
Microcrystalline cellulose	-	-	-	-	68.25	22.75	74.25	24.75	68.25	22.75
Magnesium stearate	-	-	-	-	0.75	0.25	0.75	0.25	0.75	0.25
Colloidal silicon dioxide	6	2.00	6	2.00	-	-	-	-	-	-

* Total capsule weight: 300 mg

** Rimonabant bulk drug after particle size reduction

Analysis of dissolution profiles

Mathematical modeling of dissolution profiles (Acomplia[®], products A, B and C) was performed using the software MicroMath Scientist[®]. To better understand the kinetics of drug release from dosage forms, both mono-exponential and bi-exponential models were applied to verify which best fits to dissolution data [15]. Parameters calculated were k (a kinetic constant measuring the velocity of drug release), A , B , r (correlation coefficient) and MSC (model selection criteria). The dissolution profiles were also compared by the model independent method dissolution efficiency (DE). The DE was calculated from the area under the dissolution curve at time t (measured using the trapezoidal rule) and expressed as a percentage of the area of the rectangle described by 100% dissolution in the same time. DE results were submitted to analysis of variance (one-way ANOVA) and Student's t -test. The Scheffé's test was applied in order to determine differences between the means obtained. Differences between means were considered to be statistically significant at $p < 0.05$. Mathematical models are showed in Table 2.

Tab. 2. Calculation of the dissolution efficiency and applied mathematical models to the dissolution data of rimonabant film-coated tablets and capsules

Approach	Method	Equation
Model-independent	Dissolution efficiency (DE)	$DE\% = \frac{AUC_{0-60}}{AUC_{TR}} \times 100$
Model-dependent	Zero-order	$\% \text{ dissol} = kt$
	Mono-exponential	$\% \text{ dissol} = 100(1 - e^{-kt})$
	Bi-exponential	$\% \text{ dissol} = 100[1 - (Ae^{-k_1t} + Be^{-k_2t})]$

AUC_{0-60} : area under the dissolution curve from 0 to 60 min; AUC_{TR} : total area of the rectangle at the same time; % dissol: percentage dissolved at time t ; k_1 and k_2 : dissolution rate constants.

Results and Discussion

Development of the dissolution test

Different dissolution medium and rotation speed were tested in order to find the best conditions to evaluate the dissolution rate of rimonabant from the pharmaceutical dosage forms. Initial testing was carried out using three units of the reference product (Acomplia[®]),

in each of the four medium: phosphate buffer pH 6.8, acetate buffer pH 4.5, hydrochloric acid 0.1 M and 0.5% (w/v) SLS in water. The volume of the medium was maintained at 900 mL and the paddle method (50 rpm) was used. As expected for a poorly water soluble drug, the product exhibited poor dissolution in buffered solutions with different pH values (data not shown). Since rimonabant is a weak basic compound with pKa 3.6 [16], its dissolution in 0.1 M hydrochloric acid was substantially higher, which occurs due its protonation in low pH values, increasing its solubility. In this medium, a maximum dissolution of 60.63% within 60 min was achieved, and saturation of the medium seems to occur since 30 min of the test. Best results were obtained with the surfactant agent SLS in ultra-pure water, which was added to the medium to improve the solubility of the drug.

Concentration of SLS in dissolution medium, type of apparatus (paddle or basket) and rotation speed were optimized in order to obtain a discriminating ability of the assay to evaluate different formulations. For BCS class II compounds, in vitro dissolution testing can be predictive of in vivo performance since absorption is solubility limited [17]. When evaluating the concentration of the surfactant, the aim is to use the lowest amount of surfactant needed to solubilize the drug substance in the dosage form to achieve greater than 85% dissolution in a reasonable amount of time [18, 19]. As a result of the initial screening, the conditions selected were 900 mL 0.15% SLS in water as dissolution medium and USP apparatus 2 (paddle) at 50 rpm, which were used in all subsequent tests. Surfactants enhance the dissolution rate of poorly water soluble drug products, even when present at a level below the critical micellar concentration (CMC). This may be due to a reduction in the interfacial tension as well as a possible association between the drug and/or excipients and the surfactants [20]. The concentration of SLS used in the medium is below its CMC, 8.2 mM or 0.24% in water at 20 °C [13], which probably resulted in a solubilization by the tensoative effect in the particle/medium layer, and not by micellar solubilization.

HPLC assay

An analytical method was developed to analyze the dissolution of immediate release tablets and capsules. The HPLC method used to quantify rimonabant in dissolution samples was previously validated and showed to be simple, linear, specific, precise, accurate and sensitive. The standard curve used in determination of the drug in samples showed excellent correlation in the concentration range of 0.5 – 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($y = 86036x + 464.65$, $r^2 = 1$). The limit of

quantification of the assay is $0.24 \mu\text{g mL}^{-1}$ and the time of analysis is 9 min per sample. Chromatographic peak purity values obtained by DAD were higher than 0.9999, indicating homogenous peaks and absence of any coeluting peak with the same retention time (7.1 min). As seen in Fig. 2, no interferences from excipients or dissolution medium with the peak of interest were observed through the analysis of a placebo formulation, confirming the selectivity of the method. The experimental values obtained for the determination of rimonabant in samples are presented in Table 3. The low variability ($\text{RSD} < 2\%$) of values obtained shows the good precision of the method. The recoveries obtained (mean \pm RSD%, $n = 9$) ranged from 99.14 to 100.19% ($99.60 \pm 0.40\%$) for the film-coated tablets, and from 100.01 to 101.47% ($100.52 \pm 0.55\%$) for the capsules. Results from accuracy of the HPLC method are shown in Table 4.

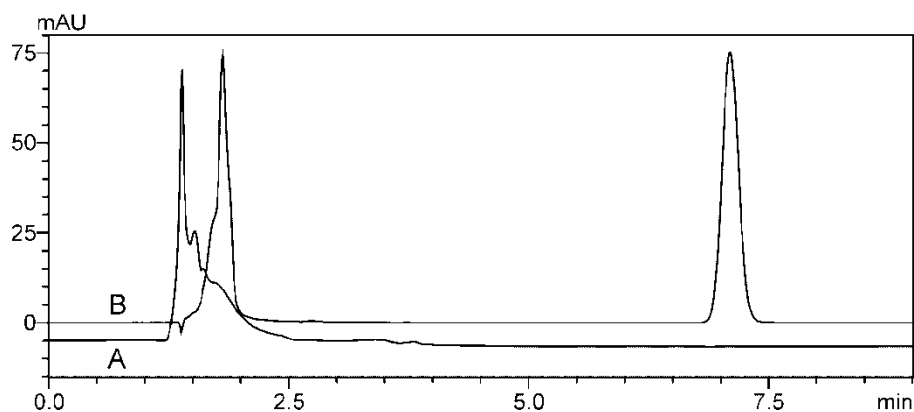


Fig. 2. HPLC chromatograms of placebo (A) and reference tablet formulation (B) after 60 min of the dissolution test. The concentration of rimonabant (peak at 7.1 min) in this sample is $21 \mu\text{g mL}^{-1}$

Tab. 3. Intra-day and intermediate precision results for rimonabant samples in pharmaceutical dosage forms

Dosage form	Precision	Concentration found ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^b	Recovery (%) ^b	RSD%
Tablet ^a	Intra-day	25.03	100.10	0.34
	Inter-day	24.98	99.92	0.54
	Between-analysts	25.15	100.61	0.42
Capsule ^a	Intra-day	25.44	101.74	0.40
	Inter-day	25.21	100.86	1.06
	Between-analysts	26.22	101.34	0.78

^a Samples at theoretical concentration of 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. ^b Mean of six determinations for each concentration. RSD%: relative standard deviation.

Tab. 4. Accuracy data for the HPLC method applied to rimonabant pharmaceutical dosage forms

Dosage form	Nominal concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentration found ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^a	Recovery (%) ^a	RSD%
Tablet	20	20.00	99.99	0.29
	25	24.85	99.40	0.42
	30	29.82	99.41	0.21
Capsule	20	20.05	100.23	0.16
	25	25.18	100.72	0.65
	30	30.18	100.61	0.74

^a Mean of three determinations for each concentration. RSD%: relative standard deviation.

Solubility determination and drug stability

Experimental solubility of rimonabant in dissolution medium was found to be 0.50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Its aqueous solubility is 96.5 nM or 0.04 $\mu\text{g mL}^{-1}$ [16]. Samples remained stable in dissolution medium for at least 24 h when maintained at room temperature and protected from light, indicating that samples can be analyzed on the day after the assay, because there is no

significant change in the drug content. Peak purity of rimonabant remained within high values, which was assessed by DAD analysis. It was not observed any degradation product or decrease on peak area of rimonabant, indicating that the drug is stable in dissolution samples through the period evaluated.

In vitro release study from different solid dosage forms

Fig. 3 demonstrates the dissolution profiles of poorly soluble drug rimonabant from different commercially available formulations. Acomplia[®] film-coated tablets showed rapid disintegration and a fast dissolution rate (more than 50% of the drug was released within 5 min) and about 95% was dissolved after 60 min of the test. Relative standard deviation (RSD) values were found to be 10.29% at the early time point (5 min), and ranged from 1.65 to 3.89% at the other time points. The dissolution profiles were analyzed by model-dependent methods. The selection of model was based on the best correlation coefficient, the best model selection criteria and the best graphic adjustment. As seen in Table 5, dissolution profile best fits with bi-exponential model, due higher values for r and MSC compared to those obtained with mono-exponential. For Acomplia[®], results from mathematical modeling demonstrate that about 74% of the drug is released in a fast initial phase (0.2040 min^{-1}), followed by 26% in a slower rate (0.0265 min^{-1} , which is about 10-fold lower than k_1). For product A, e.g., 20% is released in a faster rate (0.0667 min^{-1}) followed by 80% in a slower rate (0.0005 min^{-1}). Product B profile is also better described by the bi-exponential model. Although Product C presented also a higher value for MSC, the graphic showed a dissolution profile compatible with zero-order kinetic in the interval 0-60 min, which is characteristic of controlled-release formulations [21]. This probably occurred due to high concentration of HPMC in its formulation. In order to prove our hypothesis, the modeling using zero-order model was carried out. In this case, the observed rate constant was $k = 0.2530 \text{ min}^{-1}$ ($r = 0.9990$, MSC = 5.0006).

Tab. 5. Observed rate constants, correlation coefficients and MSC obtained by fitting of rimonabant release from different dosage forms

	Acomplia [®]	Product A	Product B	Product C
Mono-exponential				
k (min ⁻¹)	0.1133 ± 0.0109	0.0055 ± 0.0007	0.0107 ± 0.0017	0.0027 ± 0.0001
r (range)	0.9914	0.9206	0.8864	0.9980
MSC (range)	3.0340	0.9290	0.3301	4.3777
Bi-exponential				
k_1 (min ⁻¹)	0.2040 ± 0.0232	0.0667 ± 0.0234	0.1517 ± 0.0217	0.0969 ± 0.0528
k_2 (min ⁻¹)	0.0265 ± 0.0066	0.0005 ± 0.0012	0.0028 ± 0.0005	0.0031 ± 0.0001
A (µg ml ⁻¹)	0.7414 ± 0.0550	0.2024 ± 0.0592	0.2463 ± 0.0181	-0.0171 ± 0.0064
B (µg ml ⁻¹)	0.2570 ± 0.0541	0.8018 ± 0.0012	0.7521 ± 0.0173	1.0173 ± 0.0065
r (range)	0.9993	0.9967	0.9986	0.9998
MSC (range)	5.5469	4.0224	4.8659	6.6435

Marked differences in the kinetics of drug release can be observed in Fig. 3. Compounded capsules (products A, B and C) reached discrete and unsatisfactory rate and extent of dissolution when compared to the reference product. The differences between the products could change their bioavailability. Some reasons for this poor performance could be: incorrect choice of excipients used in formulation; source of raw material and its process of obtaining; polymorphism; particle size of active substance; manufacturing process of dosage form. It is known that Acomplia[®] tablets are manufactured by a standard wet granulation process and this factor may be related to different dissolution profiles of rimonabant in relation to the drug formulated in capsule dosage form [10]. Polymorphism of drug substance may also be related to different dissolution characteristics, since polymorphs have distinct crystalline structures and two polymorphic forms of rimonabant have been identified during development [10]. The effect of particle shape on the dissolution rate of poorly soluble drugs had also been reported [22].

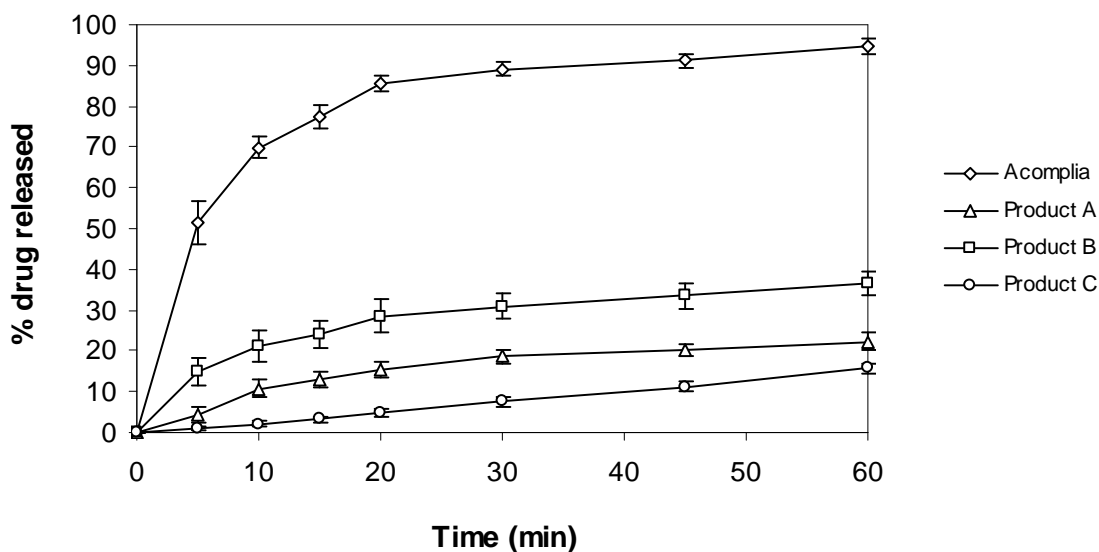


Fig. 3. Graphic representation of dissolution profiles of rimonabant (mean \pm SD, $n = 12$) from the reference tablet formulation (Acomplia[®]) and compounded capsules obtained from different pharmacies (products A, B and C). Dissolution medium 0.15% SLS in water (900 mL) at 37 °C, USP apparatus 2 (paddle), stirring speed 50 rpm

To further understand the differences on the dissolution profile of different dosage forms, 20 mg capsules were prepared using five different formulations. The release of poorly soluble rimonabant depended on the solubility of diluent. Both rate and extent of dissolution of drug from lactose-based formulations (3, 4 and 5) was significantly higher than starch-based formulations (1 and 2) (Fig. 4). Addition of 2% SLS (w/w) to starch-based formulations enhanced the rate of release during the early time points (30 min), although percent of release was almost equal after 60 min of the assay. This can be attributed to the capacity of surfactants to facilitate the wettability of the powder, allowing the dissolution fluid to permeate the solid particles more efficiently, thus increasing the surface area exposed to the medium and enhancing the dissolution rate of the drug [7]. The effect of SLS was not observed on formulations containing lactose as diluent. According to the literature, the dissolution of hard gelatin capsule shells on 50 mM sodium phosphate buffer pH 6.8 was not affected by adding 1% SLS to the medium. However, SLS in dissolution medium caused a slowdown of the dissolution of hard gelatin capsule shells at pH < 5 due to the formation of a less-soluble precipitate of gelatin [23]. Since pH used in this assay is close to 7, we attributed that the effect of SLS is related to its capacity of increasing the surface of powder available to the medium, and not due to the increase of the dissolution of the gelatin capsule shell. Besides

the hydrophilic diluent lactose, disintegrants crospovidone and croscarmellose sodium could also contribute to the higher drug release from formulations 3, 4 and 5 compared to starch-based formulations. The maximum dissolved fraction obtained in this study occurred with formulation 5 (69.09% within 60 min).

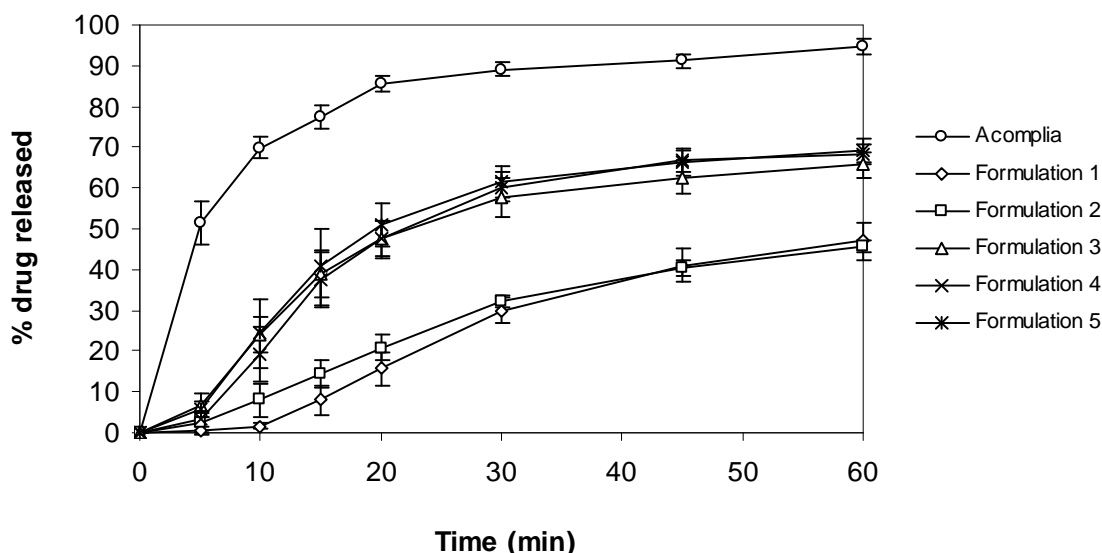


Fig. 4. Graphic representation of in vitro release study of rimonabant ($n = 6$) after formulation modifications and particle size reduction. Were used the same conditions described in Fig. 3

Since particle size may affect the solubility of the drug and therefore the dissolution rate of the product, particle size reduction is a commonly used approach to enhance dissolution of poorly water soluble drugs, affecting its bioavailability. Particle size reduction was accomplished by milling the drug and mixing it with lactose, disintegrants and surfactant (formulation 5). Particle size was reduced from 53 to 25 μm (2-fold reduction) by the process employed. Micronization of rimonabant to mean particle size of 25 μm did not enhance both rate and extent of release when compared to untreated drug, as seen in Fig. 4. It is well established in literature that particle size reduction to 5-10 μm generally causes an increase in dissolution for poorly soluble drugs, for example in the case of antifungal griseofulvin, antiplatelet cilostazol and steroidal hormone danazol [5, 24, 25]. It can, therefore, suggest that the process employed was not suitable for particle size reduction, and probably an increasing on micronization will reflect on enhance of in vitro dissolution of rimonabant by increasing the surface area that are exposed to the medium.

The dissolution efficiency was calculated for all products and formulations (Table 6). One-way ANOVA of the DE% values showed that the percent of drug released is not similar for the commercially available products ($p < 0.05$). For the formulations used in the vitro release study, Scheffé's test showed that starch-based formulations are significantly different from lactose-based formulations. DE% of formulation 2 does not differ from formulation 1, and formulations 3, 4 and 5 are not different among them. These data confirm the results observed previously involving the addition of surfactant to the formulation and reducing the particle size of the drug.

Tab. 6. Comparison of dissolution profiles of rimonabant from 20 mg solid oral dosage forms through the dissolution efficiency (DE)

Formulation	DE% (mean \pm SD)
Acomplia [®]	80.46 \pm 1.54
Product A	15.98 \pm 1.12
Product B	27.93 \pm 3.08
Product C	7.44 \pm 0.93
Formulation 1	25.76 \pm 3.12
Formulation 2	27.02 \pm 1.72
Formulation 3	47.65 \pm 3.79
Formulation 4	48.67 \pm 3.03
Formulation 5	50.36 \pm 2.99

Conclusion

There are many variables influencing the in vitro dissolution of class II drugs from immediate release solid oral dosage forms. Differences in the type of salt used (rimonabant hydrochloride vs. rimonabant base in Acomplia[®]), dosage forms (capsule vs. film-coated tablet), manufacturing process (capsule filling vs. wet granulation) and distinct particle size distribution of bulk drug are the main factors influencing extent of dissolution from prepared formulations compared to the reference product. About commercially available dosage forms, only the reference product obtained extent of dissolution up to 85% within 60 min, indicating that the other products need to improve their formulations. With this study, we concluded that the choice of excipients is of great importance during developing of a successful formulation for oral drug delivery of poorly water-soluble compounds. Therefore, the manipulation of

class II drugs associated with the incorrect choice of excipients or problems during the formulation may be risks to the quality of these products, compromising their therapeutic efficacy.

Acknowledgements

The authors wish to thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) for their support. F. K. Hurtado thanks CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for his fellowship.

Authors Statement

The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] Varshosaz J, Talari R, Mostafavi SA, Nokhodchi A. Dissolution enhancement of gliclazide using in situ micronization by solvent change method. *Powder Technol.* 2008; 187: 222-230. doi:10.1016/j.powtec.2008.02.018
- [2] Lima DE, Santos LD, Lima EM. Stability and in vitro release profile of enalapril maleate from different commercially available tablets: Possible therapeutic implications. *J Pharm Biomed Anal.* 2008; 47: 934-937. doi:10.1016/j.jpba.2008.02.030
- [3] Dressman JB, Reppas C. In vitro-in vivo correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs. *Europ J Pharm Sci.* 2000; 11: S73-S80. doi:10.1016/S0928-0987(00)00181-0
- [4] Vogt M, Kunath K, Dressman JB. Dissolution improvement of four poorly water soluble drugs by cogrinding with commonly used excipients. *Europ J Pharm Biopharm.* 2008; 68: 330-337. doi:10.1016/j.ejpb.2007.05.009
- [5] Hörter D, Dressman JB. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001; 46: 75-87. doi:10.1016/S0169-409X(00)00130-7
- [6] Willig SH. *Status and Applicability of U.S. Regulations: Current Good Manufacturing Practices in Manufacturing, Processing, Packing, and Holding of Drugs.* In: *Good Manufacturing Practices for Pharmaceuticals: A Plan for Total Quality Control from Manufacturer to Consumer.* 5th ed. Volume 109. New York: Marcel Dekker, Inc., 2001: 1-15.
- [7] Aulton ME. *Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design.* 2nd ed. New York: Churchill Livingstone, 2001.
- [8] Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. *Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms.* August 1997. <http://www.fda.gov/CDER/guidance/1713bp1.pdf>

- [9] Pouton CW. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: Physicochemical and physiological issues and the lipid classification system. *Europ J Pharm Sci.* 2006; 29: 278-287. doi:10.1016/j.ejps.2006.04.016
- [10] European Medicines Agency, European Public Assessment Report. *Acomplia: Scientific Discussion.* June 2006. <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/acomplicia/H-666-en6.pdf>
- [11] Hurtado FK, Ravanello A, Arend MZ, Wrasse M, Dalmora SL, Rolim CMB. Validated stability-indicating RP-LC method for the determination of rimonabant in pharmaceutical dosage forms. *J AOAC Int.* 2009; article in press.
- [12] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. November 2005. <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>
- [13] Rowe RC. *Handbook of Pharmaceutical Excipients.* 5th ed. London: The Pharmaceutical Press, 2006.
- [14] *United States Pharmacopeia.* 31st ed. Rockville: U.S. Pharmacopeial Convention, 2008.
- [15] Yuksel N, Kanik AE, Baykara T. Comparison of in vitro dissolution profiles by ANOVA-based, model-dependent and -independent methods. *Int J Pharm.* 2000; 209: 57-67. doi:10.1016/S0378-5173(00)00554-8
- [16] Bergström CAS, Wassvik CM, Johansson K, Hubatsch I. Poorly soluble marketed drugs display solvation limited solubility. *J Med Chem.* 2007; 50: 5858-5862. doi:10.1021/jm0706416
- [17] Papp R, Luk P, Mullett WM, Kwong E, Debnath S, Thibert R. Development of a discriminating in vitro dissolution method for a poorly soluble NO-donating selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *J Pharm Biomed Anal.* 2008; 47: 16-22. doi:10.1016/j.jpba.2007.12.025

- [18] Noory C, Tran N, Ouderkirk L, Shah V. Steps for development of a dissolution test for poorly water-soluble drug products. *Dissolution Technol.* 2000; 7: 16-19.
- [19] Shah VP, Noory A, Noory C, McCullough B, Clarke S, Everett R, Naviasky H, Srinivasan BN, Fortman D, Skelly JP. In vitro dissolution of sparingly water-soluble drug dosage forms. *Int J Pharm.* 1995; 125: 99-106. doi:10.1016/0378-5173(95)00123-Z
- [20] Shah VP, Konecny JJ, Everett RL, McCullough B, Noorizadeh AC, Skelly JP. In vitro dissolution profile of water-insoluble drug dosage forms in the presence of surfactants. *Pharm Res.* 1989; 6: 612-618. doi:10.1023/A:1015909716312
- [21] Chattaraj SC, Das SK. Effect of formulation variables on dissolution profile of diclofenac sodium from ethyl- and hydroxypropylmethyl cellulose tablets. *Drug Dev Ind Pharm.* 1996; 22: 555-559. doi:10.3109/03639049609063208
- [22] Mosharraf M, Nyström C. The effect of particle size and shape on the surface specific dissolution rate of micronized practically insoluble drugs. *Int J Pharm.* 1995; 122: 35-47. doi:10.1016/0378-5173(95)00033-F
- [23] Zhao F, Malayev V, Rao V, Hussain M. Effect of sodium lauryl sulfate in dissolution media on dissolution of hard gelatin capsule shells. *Pharm Res.* 2004; 21: 144-148. doi:10.1023/B:PHAM.0000012162.52419.b3
- [24] Liversidge GG, Cundy KC. Particle size reduction for improvement of oral bioavailability of hydrophobic drugs: I. Absolute oral bioavailability of nanocrystalline danazol in beagle dogs. *Int J Pharm.* 1995; 125: 91-97. doi:10.1016/0378-5173(95)00122-Y
- [25] Jinno J, Kamada N, Miyake M, Yamada K, Mukai T, Odomi M, Toguchi H, Liversidge GG, Higaki K, Kimura T. Effect of particle size reduction on dissolution and oral absorption of a poorly water-soluble drug, cilostazol, in beagle dogs. *J Control Rel.* 2006; 111: 56-64. doi:10.1016/j.jconrel.2005.11.013

6 CONTROLE DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICO DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS CONTENDO RIMONABANTO

6.1 Introdução

Além do Acomplia[®] produzido pelo laboratório Sanofi-Aventis, diferentes farmácias magistrais estão manipulando o rimonabanto na forma de cápsulas contendo 20 mg da substância ativa. Os produtos manipulados na forma de cápsulas apresentam composição bastante distinta em relação aos excipientes utilizados na fabricação do produto de referência. As diferenças em termos de liberação do fármaco da forma farmacêutica, dissolução no fluido gastrintestinal, absorção pela parede intestinal e, conseqüentemente, efeito terapêutico podem ser, portanto, significativas entre os diferentes produtos. Nesse sentido, testes que avaliem a qualidade desses medicamentos tornam-se importantes.

O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade desses produtos que estão sendo disponibilizados à população. Para isso, testes físico-químicos como peso médio, teor de princípio ativo, uniformidade de doses unitárias e perfil de dissolução foram realizados em amostras de comprimidos (Acomplia[®], produto de referência) e cápsulas produzidas por três farmácias de manipulação diferentes de Santa Maria (produtos A, B e C).

Nas farmacopéias estão estabelecidas as especificações de testes físicos gerais para formas farmacêuticas sólidas de uso oral, entre eles peso médio e uniformidade de doses unitárias. Devido ao fato de não existir monografia do rimonabanto em nenhuma farmacopéia, com as exigências específicas para o fármaco, as especificações para ensaios como teor e perfil de dissolução são baseadas na literatura. Assim, geralmente adota-se que o teor do fármaco deve estar entre 90 – 110% do valor declarado pelo fabricante. Para o perfil de dissolução, levando em conta a baixa solubilidade do fármaco, uma percentagem de fármaco dissolvido acima de 85% em 60 min é considerada satisfatória (FDA, 1997; BRASIL, 2004).

6.2 Peso médio

O peso médio das amostras de comprimidos e cápsulas manipuladas de rimonabanto foi realizado conforme a Farmacopéia Brasileira 4ª edição (1988), utilizando 20 unidades de cada produto. Foi utilizada balança analítica Sartorius, devidamente calibrada. Para determinação do peso médio das cápsulas, cada unidade foi pesada individualmente, em

seguida, esvaziou-se a cápsula e pesou-se o invólucro de gelatina vazio, sendo que o peso médio do conteúdo da cápsula é calculado pela diferença entre as duas medidas.

A Tabela 4 apresenta os resultados do peso individual dos comprimidos e conteúdo das cápsulas manipuladas. Calculou-se então o peso médio, a variação e os limites permitidos, conforme a Farmacopéia Brasileira 4^a edição.

Tabela 4 – Resultados da avaliação do peso médio de comprimidos e cápsulas manipuladas de rimonabanto

Amostra	Peso (mg)			
	Acomplia [®]	Produto A	Produto B	Produto C
1	310,9	106,1	113,6	86,2
2	311,9	106,4	114,8	87,1
3	309,7	91,8	119,4	85,8
4	314,1	108,0	119,6	83,8
5	311,4	97,5	113,0	82,6
6	317,7	93,5	112,2	91,1
7	317,4	99,2	114,2	82,7
8	309,2	103,9	114,1	83,8
9	308,7	96,7	120,1	81,1
10	310,7	<u>108,8</u>	122,1	83,2
11	302,3	<u>79,1</u>	116,3	85,2
12	318,0	92,3	121,4	89,7
13	317,5	<u>87,9</u>	122,2	87,1
14	312,2	103,6	118,8	86,7
15	314,0	93,5	119,1	85,0
16	318,6	93,0	115,6	85,6
17	311,1	104,3	119,5	87,0
18	314,4	99,7	116,5	86,7
19	304,8	105,4	121,7	83,5
20	317,7	96,2	118,8	81,6
Peso médio (mg)	312,62	98,35	117,65	85,28
Limite inferior ^a	296,98	88,51	105,89	76,75
Limite superior ^a	328,25	108,18	129,42	93,80
DPR%	1,44	7,79	2,76	3,01

^a Limites de variação: comprimidos com peso médio maior que 250 mg: $\pm 5\%$; cápsulas com peso médio de até 300 mg: $\pm 10\%$

Pelos resultados observa-se que o produto A apresentou três unidades fora dos limites especificados pela Farmacopéia Brasileira para o peso médio de formas farmacêuticas. Os demais produtos testados cumpriram as especificações.

6.3 Uniformidade de doses unitárias

A uniformidade de doses unitárias das amostras de comprimidos e cápsulas manipuladas de rimonabanto foi realizada conforme a Farmacopéia Brasileira 4ª edição (1988), utilizando 10 unidades de cada produto.

Para determinação da uniformidade de doses unitárias, o conteúdo individual de dez comprimidos ou cápsulas foi transferido separadamente para balões volumétricos de 50 mL e adicionou-se 30 mL de metanol. Para as cápsulas, lavou-se, com auxílio de seringa, o invólucro de gelatina com metanol para que todo o conteúdo da cápsula fosse transferido para o balão. Os balões foram deixados em banho ultrassônico por 5 min para solubilização e completou-se o volume com o mesmo solvente. A suspensão obtida foi centrifugada e alíquota de 1,25 mL do sobrenadante foi transferida para balão volumétrico de 20 mL e diluída em fase móvel (concentração final: 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A quantificação do fármaco foi feita através do método por LC previamente validado. As amostras foram comparadas com solução padrão de SQR na mesma concentração para se determinar a concentração de fármaco em cada unidade. A Tabela 5 exibe os resultados da uniformidade de conteúdo nos produtos avaliados.

Pelos resultados observa-se que o produto A apresenta duas unidades fora da faixa de 85 – 115% do valor declarado. Nesse caso, mais vinte unidades deveriam ser testadas.

6.4 Teor de princípio ativo

Para análise do teor de princípio ativo nas formas farmacêuticas, o equivalente a 10 mg de rimonabanto foi pesado, em triplicata, a partir do pó de 20 comprimidos ou cápsulas e transferido para balão volumétrico de 50 mL com auxílio de 30 mL de metanol. As amostras foram deixadas em banho ultrassônico por 5 min e completou-se o volume com metanol. Centrifugaram-se as suspensões por 5 min, transferiram-se 1,25 mL do sobrenadante para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com fase móvel (concentração final: 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A quantificação do fármaco foi feita através do método por LC previamente

validado As amostras foram comparadas com solução padrão de SQR na mesma concentração.

Na Tabela 6 são mostrados os resultados da análise do teor de fármaco nas amostras avaliadas. O Acomplia[®] e produto B tiveram teores próximos ao valor declarado, enquanto que para os outros dois a quantidade de rimonabanto estava abaixo da declarada.

Tabela 5 – Resultados do teste de uniformidade de conteúdo de comprimidos e cápsulas manipuladas de rimonabanto

Amostra	Teor individual (%)			
	Acomplia [®]	Produto A	Produto B	Produto C
1	98,28	96,95	94,10	93,96
2	101,02	<u>83,08</u>	102,29	91,11
3	100,42	97,39	102,60	87,48
4	101,31	90,92	105,42	91,00
5	101,40	91,91	99,85	89,92
6	100,98	<u>84,16</u>	99,13	91,08
7	98,92	94,51	96,99	85,42
8	101,22	86,94	101,27	87,13
9	102,37	86,63	98,52	87,01
10	98,84	94,21	99,52	91,79
Média (%)	100,47	90,67	99,97	89,59
DPR%	1,33	5,74	3,17	3,00

Tabela 6 – Resultados da análise do teor de rimonabanto nos comprimidos e cápsulas manipuladas de 20 mg

Amostra	Teor (%)			
	Acomplia [®]	Produto A	Produto B	Produto C
1	102,13	82,76	96,78	86,04
2	103,17	85,71	98,45	84,77
3	102,41	84,76	99,29	85,21
Média (%)	102,57	84,41	98,17	85,34
DPR%	0,52	1,78	1,30	0,76

6.5 Perfil de dissolução

O perfil de dissolução foi obtido a partir de doze unidades de cada forma farmacêutica, utilizando as condições previamente descritas na **PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 5.2**. A composição dos diferentes produtos avaliados é mostrada na página 70. A partir dos perfis de dissolução, foram determinadas as áreas sob a curva da quantidade dissolvida de rimonabanto em função do tempo individualmente para doze unidades de cada produto farmacêutico. Em seguida, calcularam-se os valores de eficiência de dissolução, os quais foram comparados estatisticamente (tabela 6, p. 82).

O perfil de dissolução está mostrado na Tabela 7. Apenas o produto de referência (comprimido revestido) apresentou dissolução satisfatória, sendo que em torno de 95% do fármaco foi dissolvido em 60 min, valor considerado adequado conforme descrito na literatura (SHAH et al., 1995; FDA, 1997). O produto C apresentou uma liberação baixa e constante do fármaco em função do tempo, caracterizando uma cinética de ordem zero (figura 3, p. 80). A justificativa para esta baixa liberação poderia ser a presença de grande quantidade de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) na sua formulação, excipiente esse que tem a capacidade de retardar a liberação do fármaco para o meio de dissolução através da formação de um colóide (Figura 8).

Tabela 7 – Quantidade dissolvida de rimonabanto em função do tempo a partir das formas farmacêuticas sólidas orais avaliadas

Tempo (min)	% dissolvida (média \pm DP, $n = 12$)			
	Acomplia [®]	Produto A	Produto B	Produto C
5	51,61 \pm 5,32	4,34 \pm 1,83	14,92 \pm 3,53	0,85 \pm 0,58
10	69,88 \pm 2,72	10,73 \pm 2,20	21,22 \pm 3,74	2,01 \pm 0,71
15	77,48 \pm 2,73	12,91 \pm 1,91	24,15 \pm 3,43	3,27 \pm 0,75
20	85,52 \pm 1,92	15,46 \pm 1,87	28,51 \pm 4,14	4,67 \pm 0,91
30	89,06 \pm 1,57	18,58 \pm 1,60	30,95 \pm 3,16	7,54 \pm 1,17
45	91,11 \pm 1,51	20,20 \pm 1,53	33,42 \pm 3,09	11,29 \pm 1,36
60	94,84 \pm 2,02	22,26 \pm 2,06	36,35 \pm 2,93	15,65 \pm 1,41

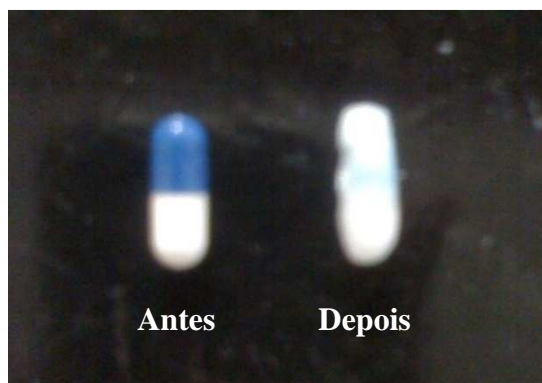


Figura 8 – Ilustração de cápsula de gelatina dura contendo 20 mg de rimonabanto e excipientes (produto C) antes e após 60 min do teste de dissolução

6.6 Conclusão

O produto referência apresentou resultados adequados em todos os testes realizados. O produto A não cumpriu os requisitos nos teste de peso médio, uniformidade de doses unitárias e teor de princípio ativo. O produto B apresentou resultados adequados nas análises de peso médio, uniformidade de conteúdo e teor. O produto C cumpriu com os requisitos nos testes de peso médio e uniformidade de conteúdo, porém foi reprovado no teor de fármaco. Nenhum dos produtos manipulados (cápsulas) cumpriu com a especificação da dissolução, indicando que esses produtos necessitam ter suas formulações melhoradas.

Com base nos resultados encontrados, conclui-se que é necessário um controle mais rigoroso por parte das agências que regulamentam a fabricação e venda de medicamentos por farmácias de manipulação, sendo que o controle da qualidade desses produtos deveria ser rigorosamente realizado antes de sua liberação para comercialização.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise farmacêutica é fundamental para as diversas fases do estudo de fármacos e medicamentos. Os métodos analíticos são necessários para a identificação e quantificação de fármacos em matéria-prima, produtos farmacêuticos e fluidos biológicos. Metodologias para análise de fármacos são amplamente utilizadas na rotina de controle de qualidade de medicamentos, a fim de assegurar que os produtos cumpram com as especificações de qualidade estabelecidas. O desenvolvimento de ensaios que permitam avaliar a dissolução de fármacos é fundamental para a área de medicamentos, pois esses testes são ferramentas indispensáveis na etapa de controle de qualidade e equivalência farmacêutica de produtos acabados. Além disso, estudos de dissolução de medicamentos requerem a disponibilidade de métodos analíticos simples, específicos e sensíveis para quantificação do fármaco dissolvido nas amostras. Nesse sentido, é conveniente destacar que o rimonabanto é um medicamento de lançamento recente no mercado mundial, não possui monografia descrita em nenhuma farmacopéia e, até o início do presente trabalho, não haviam métodos descritos na literatura para análise em formulações farmacêuticas.

Inicialmente foi realizada a caracterização da substância química de referência por técnicas analíticas qualitativas e quantitativas. Os resultados dos testes realizados por RMN de ^{13}C e ^1H e análise elementar foram compatíveis com os dados reportados para a substância, demonstrando que a SQR apresenta identidade e pureza adequadas. Os espectros de absorção no UV do fármaco presente na SQR e na amostra de comprimidos revestidos foram compatíveis. Além disso, a análise cromatográfica demonstrou que os espectros de absorção obtidos por DAD e os tempos de retenção das duas amostras foram semelhantes, indicando que possuem a mesma identidade. O índice de pureza do pico calculado foi próximo a 100%, indicando que este se encontra puro, homogêneo e livre de substâncias que apresentam o mesmo tempo de retenção.

A cromatografia líquida promove a separação e quantificação dos diferentes componentes de uma formulação farmacêutica através da escolha adequada dos parâmetros cromatográficos como fase estacionária, fase móvel e sistema de detecção. O método por cromatografia líquida em fase reversa foi desenvolvido e validado para determinação de rimonabanto em produtos farmacêuticos (comprimidos revestidos e cápsulas manipuladas), revelando especificidade, linearidade, precisão e exatidão, conforme demonstrado no **ARTIGO 5.1**. O método proposto utilizou coluna cromatográfica C_{18} , amplamente

empregada na rotina de laboratórios de controle de qualidade de medicamentos. Na avaliação da especificidade do método, o pico do rimonabanto (eluído em 7.1 min) foi separado dos picos dos produtos de degradação com adequada resolução entre os sinais (figura 1, p. 60), demonstrando seletividade e que a metodologia pode ser empregada em estudos de estabilidade do fármaco. Além disso, foi verificado que os excipientes presentes no produto farmacêutico não interferem na análise do fármaco. O método apresentou excelente linearidade na faixa de concentração de 0,5 – 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($r^2 = 1,0000$) e adequada sensibilidade (LOQ = 0.24 $\mu\text{g mL}^{-1}$), permitindo sua utilização na análise do perfil de dissolução de formulações farmacêuticas. Os valores encontrados para a repetibilidade e precisão intermediária apresentaram coeficientes de variação inferiores a 1,06%, indicando a precisão do método analítico proposto. O valor médio do teste de exatidão foi de 99,60% para análise do fármaco em comprimidos revestidos e de 100,52% em cápsulas manipuladas, demonstrando exatidão significativa, pois o valor recomendado é de $100 \pm 2\%$ em relação ao declarado (SHABIR, 2003). Durante a avaliação da robustez do método, observou-se que as modificações na proporção de acetonitrila, fluxo de fase móvel, fabricante da coluna e volume de injeção não alteram de forma significativa os resultados da quantificação do fármaco nas amostras, embora ocorra mudança no seu tempo de retenção com as três primeiras modificações. Através do teste de adequabilidade do sistema verificou-se que os parâmetros testados apresentaram DPR inferiores a 2%, demonstrando que o equipamento e as condições do método são adequados para assegurar a confiabilidade dos dados analíticos (tabela 3, p. 57). Conclui-se, portanto, que o método proposto cumpre com os requisitos preconizados pela literatura, podendo ser empregado para análise de rimonabanto.

O estudo de degradação forçada do rimonabanto sob condições de estresse tais como temperatura elevada, hidrólise ácida e básica, oxidação química e fotólise, foi conduzido com o objetivo de verificar quais os fatores que comprometem sua estabilidade, além de ter sido utilizado para avaliar a especificidade do método analítico frente a produtos de degradação. O fármaco foi instável quando exposto a peróxido de hidrogênio, ocorrendo diminuição no seu teor com simultânea formação de produtos de degradação. Ocorreu degradação significativa do fármaco quando exposto à luz, tanto a proveniente de lâmpada UV-C quanto de luz ambiente. Nesta última, soluções que são mantidas expostas à luz, sem proteção, são instáveis e originam produtos de degradação do fármaco (ANEXO E, p. 115). A respeito da baixa estabilidade frente à luz do rimonabanto em solução, testes adicionais que avaliassem a fotoestabilidade do fármaco no estado sólido seriam importantes. Para o taranabant, a literatura relata que amostras do fármaco no estado sólido submetidas a estresse térmico

apresentam perfis de degradação similares ao do fármaco em solução, porém a velocidade da reação foi diferente nas condições investigadas (CHEN et al., 2009). Destaca-se que, a partir dos resultados obtidos, nenhuma conclusão pode ser feita com relação à estabilidade da matéria-prima sob condições normais de manuseio e armazenamento, pois as condições extremas de estresse aplicadas nas soluções do fármaco favorecem sua degradação. Ressalta-se ainda que o método cromatográfico foi capaz de quantificar o rimonabanto mesmo na presença de seus degradantes. Através do detector de arranjo de diodos, verificou-se que o pico do fármaco permaneceu com elevada pureza em todas as determinações. Logo, o método analítico pode ser caracterizado como indicativo de estabilidade.

Os estudos de dissolução *in vitro* de fármacos são fundamentais para garantir a qualidade das formulações sólidas de uso oral. O perfil de dissolução relaciona a porcentagem dissolvida de fármaco em diferentes tempos de amostragem, possibilitando a avaliação das características biofarmacotécnicas *in vitro* dos diferentes produtos existentes para um mesmo fármaco. Foi desenvolvido ensaio para avaliar a dissolução do rimonabanto a partir formas farmacêuticas, visto que não foram encontrados métodos descritos na literatura. O ensaio foi então aplicado na determinação dos perfis de dissolução de comprimidos revestidos e cápsulas manipuladas do fármaco. Também foi realizado estudo para avaliar a influência dos excipientes da formulação na velocidade e extensão de dissolução do fármaco a partir de cápsulas de gelatina. A parte experimental e os resultados obtidos são demonstrados no **ARTIGO 5.2**. O delineamento do ensaio de dissolução foi baseado nas propriedades físico-químicas do fármaco, o qual possui baixa solubilidade em água, e na dosagem de 20 mg dos comprimidos. Com base nessas considerações, foram testadas inicialmente diversas condições do ensaio com o intuito de escolher aquela que melhor caracterizasse um perfil de liberação gradual do fármaco em função do tempo e com quantidade dissolvida acima de 85% no intervalo de duração do teste. As condições selecionadas foram 900 mL de LSS 0,15% em água como meio de dissolução, aparato 2 (pá) e velocidade de rotação de 50 rpm. A quantificação do fármaco no meio de dissolução foi realizada pelo mesmo método por LC desenvolvido para análise em produtos farmacêuticos, o qual demonstrou adequada especificidade (figura 2, p. 76). Os dados experimentais obtidos na determinação da estabilidade da amostra de comprimidos no meio de dissolução encontram-se na faixa estabelecida (98 – 102%), demonstrando que o rimonabanto é estável sob as condições estudadas. O produto de referência (Acomplia[®]) e as cápsulas manipuladas (produtos A, B e C) exibiram perfis de dissolução bastante distintos (figura 3, p. 80), tanto pela comparação gráfica dos resultados quanto pelos valores de eficiência de dissolução (tabela 6, p. 82). A

maioria dos perfis obtidos foi mais bem descrita pelo modelo bi-exponencial de liberação, conforme observado na tabela 5 (p. 79). As causas para a baixa dissolução atingida pelos três produtos manipulados podem estar relacionadas a diversos fatores já discutidos, sendo que problemas na etapa de formulação parecem ser os fatores principais. O estudo de liberação, que foi realizado através da incorporação de diferentes excipientes ao fármaco (tabela 1, p. 73), revelou que o uso de diluente hidrofílico e desintegrantes melhoram a dissolução do fármaco, fato que não foi observado com o uso de tensoativo na formulação e após redução de 52% do tamanho de partícula da substância ativa (figura 4, p. 81). Foi atingida percentagem de fármaco dissolvido próxima a 70% em 60 min com umas das formulações elaboradas, aquém da atingida pelo produto de referência. Dessa forma, muitas foram as estratégias usadas pelo fabricante para melhorar a dissolução do fármaco, que apresentou uma rápida desintegração e dissolução próxima a 95% a partir dos comprimidos comerciais. Essa avaliação demonstrou que a escolha correta dos excipientes usados na formulação de fármacos poucos solúveis têm grande importância, visto que para o fármaco ser absorvido e exercer sua ação terapêutica, sua adequada liberação e dissolução da forma farmacêutica é fundamental. O ensaio de dissolução proposto mostrou-se adequado para avaliar a dissolução do rimonabanto a partir de formas farmacêuticas sólidas de uso oral, podendo, portanto, ser empregado em estudos de dissolução e no controle de qualidade do medicamento.

A eficácia clínica de uma formulação farmacêutica não é atribuída somente à atividade intrínseca da substância ativa. Os componentes utilizados na preparação, os processos de fabricação do produto e as características físico-químicas do fármaco podem afetar o comportamento do medicamento no organismo, gerando problemas de ineficácia, intoxicações e diferenças na biodisponibilidade do fármaco (ANSEL et al., 2004). Até novembro de 2008, quando a ANVISA suspendeu a comercialização do rimonabanto, o Acomplia[®] não era a única apresentação do medicamento disponível no país. Após seu lançamento, diversas farmácias magistrais manipulavam cápsulas contendo o fármaco como alternativa mais econômica em relação ao produto de referência. No entanto, embora a legislação preconize que esses estabelecimentos devam cumprir com as exigências mínimas de qualidade dos medicamentos manipulados, sabe-se que, na prática, esse controle nem sempre é realizado.

Considerando-se a importância de assegurar a eficácia terapêutica e segurança do uso de medicamentos, torna-se imprescindível o controle de qualidade de produtos farmacêuticos. Nesse contexto, produtos farmacêuticos contendo rimonabanto foram submetidos a testes físico-químicos de controle de qualidade. As amostras avaliadas foram o Acomplia[®]

(medicamento de referência) e cápsulas vendidas por três farmácias de manipulação de Santa Maria, RS. O método cromatográfico proposto neste trabalho foi aplicado na análise do teor de princípio ativo e uniformidade de doses unitárias. Adicionalmente, alguns testes físicos gerais descritos na Farmacopéia Brasileira 4ª edição (1988), tais como peso médio e perfil de dissolução, foram executados. Os resultados são demonstrados na **SEÇÃO 6**.

A maioria das formulações testadas foi aprovada com relação ao peso médio, como pode ser observado na Tabela 4, exceto o produto A. Os demais produtos avaliados cumpriram as especificações do teste de peso médio, pois os respectivos limites de $\pm 5\%$ e $\pm 10\%$ para os comprimidos e cápsulas não foram ultrapassados por nenhuma das unidades. A avaliação da uniformidade de conteúdo de comprimidos e cápsulas demonstrou que apenas o produto A apresentou unidades fora da faixa de 85 – 115% do valor declarado, sendo que os demais produtos foram aprovados nos teste. Em razão de não haver parâmetros definidos por monografia para o rimonabanto, a especificação para o teor do fármaco foi baseada nas porcentagens geralmente permitidas em monografias oficiais (90 – 110%). A análise quantitativa das amostras de comprimidos e do produto B utilizadas neste estudo forneceu resultado médio de 102,57% e 98,17% no teor de fármaco, respectivamente, estando de acordo com os parâmetros de qualidade exigidos. As cápsulas manipuladas A e C apresentaram teor abaixo do especificado. A porcentagem dissolvida de rimonabanto obtida para os comprimidos revestidos foi superior a 85% em 60 minutos, conforme estabelecido para fármacos de dissolução lenta ou fracamente solúveis em água (classe 2) presentes em formulações sólidas orais de liberação imediata (FDA, 1997). Em relação às cápsulas manipuladas, a porcentagem de fármaco dissolvido foi inferior ao valor especificado para os três produtos, ou seja, apenas 22% para o A, 36% para o B e 16% para o C.

8 CONCLUSÕES

- As análises por RMN de ^{13}C e ^1H , espectrofotometria no ultravioleta, análise elementar e cromatografia líquida permitiram a caracterização da substância química de referência utilizada neste estudo;
- O método desenvolvido e validado por cromatografia líquida em fase reversa mostrou-se específico, preciso, exato e sensível para análise quantitativa de rimonabanto em produtos farmacêuticos, sugerindo-se sua aplicação no controle de qualidade de medicamentos e em estudos de dissolução;
- O método cromatográfico proposto promoveu a separação do rimonabanto de seus produtos de degradação, indicando que o procedimento analítico é adequado para estudos de estabilidade do fármaco;
- O uso de 900 mL de lauril sulfato de sódio 0,15% a $37 \pm 0,5$ °C, aparato 2 (pá) e velocidade de agitação de 50 rpm, forneceu resultados satisfatórios para avaliar a dissolução de formas farmacêuticas sólidas orais de rimonabanto e foi capaz de discriminar entre os diferentes produtos testados;
- O estudo de dissolução do rimonabanto a partir das diferentes formulações preparadas demonstrou que os excipientes exercem grande influência tanto na velocidade quanto na quantidade de fármaco dissolvido;
- Os ensaios físico-químicos de controle de qualidade foram empregados satisfatoriamente para análise de parâmetros como peso médio, uniformidade de conteúdo, teor e perfil de dissolução de comprimidos e cápsulas contendo o fármaco;
- Os métodos desenvolvidos e validados estabelecem parâmetros para efetiva continuidade de estudos científicos na área e procedimentos importantes em controle da qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica dos produtos farmacêuticos disponíveis no País.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE, N. Obesity and cardiovascular disease: pathogenetic role of the metabolic syndrome and therapeutic implications. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 14, p. 154-174, 2000.

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

ADDY, C. et al. Multiple-dose pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of taranabant, a novel selective cannabinoid-1 receptor inverse agonist, in healthy male volunteers. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 48, p. 734-744, 2008.

AKBAS, F. et al. A critical review of the cannabinoid receptor as a drug target for obesity management. **Obesity Reviews**, v. 10, p. 58-67, 2009.

ALBERTS, J. J. et al. In vitro and in vivo metabolism of rimonabant (SR-141716), a cannabinoid (CB1) receptor antagonist. **Drug Metabolism Reviews**, v. 35, p. 38, 2003.

AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, p. 413-420, 1995.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. **Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems**. 8. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. 672 p.

ANTONIADES, C. et al. Adiponectin: from obesity to cardiovascular disease. **Obesity Reviews**, v. 10, p. 269-279, 2009.

ARONNE, L.J.; ISOLDI, K.K. Cannabinoid-1 receptor blockade in cardiometabolic risk reduction: efficacy. **The American Journal of Cardiology**, v. 100, p. 18-26, 2007.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 677 p.

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

BERGSTRÖM, C. A. S. et al. Poorly soluble marketed drugs display solvation limited solubility. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 5858-5862, 2007.

BHAUMIK, U. et al. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for bioanalytical application with rimonabant. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 1009-1013, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 310, de 01 de setembro de 2004. Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 3 set. 2004. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15466&word=>>>. Acesso em: 15 mar. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2 jun. 2003. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=>>>. Acesso em: 15 mar. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. VIGITEL Brasil 2008: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília, DF, 2009. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_2008.pdf>. Acesso em: 2 nov. 2009.

BRAY, G. A.; RYAN, D. H. Drug treatment of the overweight patient. **Gastroenterology**, v. 132, p. 2239-2252, 2007.

CANNON, C. P.; KUMAR, A. Treatment of overweight and obesity: lifestyle, pharmacologic, and surgical options. **Clinical Cornerstone**, v. 9, p. 55-71, 2009.

CHEN, Y. W. et al. Identification and structural elucidation of process impurities generated in the end-game synthesis of taranabant (MK-0364) via cyanuric chloride. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 702-710, 2009.

CHIADMI, F.; SCHLATTER, J.; CHARIOT, P. Liquid chromatographic method with ultraviolet absorbance detection for measurement of rimonabant in human plasma. **Analytical Letters**, v. 42, p. 833-841, 2009.

COTA, D. et al. Endogenous cannabinoid system as a modulator of food intake. **International Journal of Obesity**, v. 27, p. 289-301, 2003.

COX, S. L. Rimonabant hydrochloride: an investigational agent for the management of cardiovascular risk factors. **Drugs of Today**, v. 41, p. 499-508, 2005.

DELYLE, S. G. et al. Determination of rimonabant in human plasma and hair by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 872, p. 115-120, 2008.

DESPRÉS, J. P. et al. Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant. **The Lancet**, v. 371, p. 555, 2008.

DESPRÉS, J. P.; GOLAY, A.; SJÖSTRÖM, L. Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, p. 2121-2134, 2005.

DI MARZO, V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, p. 438-455, 2008.

DONOHUE, S. R.; HALLDIN, C.; PIKE, V. W. A facile and regioselective synthesis of rimonabant through an enamine-directed 1,3-dipolar cycloaddition. **Tetrahedron Letters**, v. 49, p. 2789-2791, 2008.

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

DRESSMAN, J. B.; REPPAS, C. In vitro-in vivo correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, p. S73-S80, 2000.

EDITORIAL REV. ASSOC. MED. BRAS. Obesidade: podemos melhorar? **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, p. 1-2, 2001.

EMA – European Medicines Agency. Acomplia: Scientific Discussion. European Public Assessment Report, London, UK, 2006. Disponível em: <<http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/acompria/H-666-en6.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2008.

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

FDA – Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, 1997. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/Guidance/1713bp1.pdf>>. Acesso em: 9 abr. 2008.

FDA – Food and Drug Administration. New Drug Application 21-888: Zimulti (rimonabant). Advisory Committee Meeting, Estados Unidos, 2007. Disponível em: <<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/07/briefing/2007-4306b1-01-sponsor-backgroundunder.pdf>>. Acesso em: 9 abr. 2008.

GODOY-MATOS, A. F. et al. O sistema endocanabinóide: novo paradigma no tratamento da síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, p. 390-399, 2006.

HAMPP, C.; HARTZEMA, A. G.; KAUF, T. L. Cost-utility analysis of rimonabant in the treatment of obesity. **Value in Health**, v. 11, p. 389-399, 2008.

HILL, M. N.; GORZALKA, B. B. Impairments in endocannabinoid signaling and depressive illness. **The Journal of the American Medical Association**, v. 301, p. 1165-1166, 2009.

HÖRTER, D.; DRESSMAN, J. B. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, p. 75-87, 2001.

HSIEH, Y.; DUNCAN, C. J. G.; BRISSON, J. M. Fused-core silica column high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric determination of rimonabant in mouse plasma. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 5668-5673, 2007.

ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Geneva, Switzerland, 2003. Disponível em: <<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA419.pdf>>. Acesso em: 2 jan. 2008.

ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Geneva, Switzerland, 2005. Disponível em: <<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>>. Acesso em: 2 jan. 2008.

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry. Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, p. 835-855, 2002.

JAVORS, M. A.; MCMAHON, L. R. Quantification of rimonabant (SR 141716A) in plasma using HPLC with UV detection. **The FASEB Journal**, v. 21, p. 566.4, 2007.

JONES, D. End of the line for cannabinoid receptor 1 as an anti-obesity target? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, p. 961-962, 2008.

KHAN, K. A. The concept of dissolution efficiency. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 27, p. 48-49, 1975.

KIM, M. et al. Convenient total synthesis of taranabant (MK-0364), a novel cannabinoid-1 receptor inverse agonist as an anti-obesity agent. **Tetrahedron**, v. 63, p. 12845-12852, 2007.

LE FOLL, B.; GORELICK, D. A.; GOLDBERG, S. R. The future of endocannabinoid-oriented research after CB₁ antagonists. **Psychopharmacology**, v. 205, p. 171-174, 2009.

LIN, L. S. et al. Discovery of *N*-[(1*S*,2*S*)-3-(4-chlorophenyl)-2-(3-cyanophenyl)-1-methylpropyl]-2-methyl-2-[[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy]propanamide (MK-0364), a novel, acyclic cannabinoid-1 receptor inverse agonist for the treatment of obesity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 7584-7587, 2006.

MANCINI, M.C.; HALPERN, A. Pharmacological treatment of obesity. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, p. 377-389, 2006.

MCCULLOCH, M. et al. Determination of endocannabinoid antagonist SR141716 (rimonabant) in plasma by liquid chromatograph tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 863, p. 258-265, 2008.

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

NIH-NHLBI – National Institutes of Health – National Heart, Lung, and Blood Institute. Practical guide to the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults. U.S. Department of Health and Human Services, October 2000. Disponível em: <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/obesity/prctgd_b.pdf>. Acesso em: 2 out. 2009.

NIROGI, R. et al. Liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the quantification of rimonabant, a CB₁ receptor antagonist, in human plasma. **Biomedical Chromatography**, v. 22, p. 469-477, 2008.

NISOLI, E.; CARRUBA, M. O. Emerging aspects of pharmacotherapy for obesity and metabolic syndrome. **Pharmacological Research**, v. 50, p. 453-469, 2004.

PANCHAGNULA, R.; THOMAS, N. S. Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 201, p. 131-150, 2000.

PASQUALOTO, K. F. M. et al. Utilização de probitos como instrumento estatístico simples à avaliação da distribuição de tamanho de partículas de dois tipos de celulose microcristalina. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 86, p. 31-34, 2005.

PATEL, P. N.; PATHAK, R. Rimonabant: a novel selective cannabinoid-1 receptor antagonist for treatment of obesity. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 64, p. 481-489, 2007.

PERTWEE, R. G. Pharmacology of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 74, p. 129-180, 1997.

PI-SUNYER, F. X. et al. Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients. **The Journal of the American Medical Association**, v. 295, p. 761-775, 2006.

POLLI, J. E. et al. Methods to compare dissolution profiles and a rationale for wide dissolution specifications for metoprolol tartrate tablets. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, p. 690-700, 1997.

POUTON, C. W. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, p. 278-287, 2006.

RAJU, T. S. et al. A stability-indicating LC method for rimonabant. **Chromatographia**, v. 69, p. 97-102, 2009.

RASMUSSEN, M. S. et al. Adiponectin receptors in human adipose tissue: effects of obesity, weight loss, and fat depots. **Obesity**, v. 14, p. 28-35, 2006.

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

RINALDI-CARMONA, M. et al. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. **FEBS Letters**, v. 350, p. 240-244, 1994.

RITCHIE, S. A.; CONNELL, J. M. C. The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 17, p. 319-326, 2007.

RÖSSNER, S. et al. Long-term weight loss and weight-loss maintenance strategies. **Obesity Reviews**, v. 9, p. 624-630, 2008.

RUBIO, M. A. et al. Drugs in the treatment of obesity: sibutramine, orlistat and rimonabant. **Public Health Nutrition**, v. 10, p. 1200-1205, 2007.

SCHEEN, A. J. Cannabinoid-1 receptor antagonists in type-2 diabetes. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 21, p. 535-553, 2007.

SCHEEN, A. J. et al. Efficacy and tolerability of rimonabant in overweight or obese patients with type 2 diabetes: a randomised controlled study. **The Lancet**, v. 368, p. 1660-1672, 2006.

SCHEEN, A. J., PAQUOT, N. Use of cannabinoid CB1 receptor antagonists for the treatment of metabolic disorders. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 23, p. 103-116, 2009.

SELTZMAN, H. H. et al. Synthesis, spectral studies and tritiation of the cannabinoid antagonist SR141716A. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, v. 15, p. 1549-1550, 1995.

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, p. 57-66, 2003.

SHAH, V. P. et al. In vitro dissolution profile comparison – statistics and analysis of the similarity factor, f_2 . **Pharmaceutical Research**, v. 15, p. 889-896, 1998.

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. 892 p.

SIRISUTH, N.; EDDINTON, N. D. In-vitro-in-vivo correlation definitions and regulatory guidance. **International Journal of Generic Drugs**, v. 2, p. 1-11, 2002.

SPOTO, B. et al. Human adipose tissue binds and metabolizes the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol. **Biochimie**, v. 88, p. 1889-1897, 2006.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. **Analytical Method Development and Validation**. 1. ed. New York: Marcel Dekker, 1997. 92 p.

USP – THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 31. ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2008.

VAN GAAL, L. F. et al. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. **The Lancet**, v. 365, p. 1389-1397, 2005.

VARSHOSAZ, J. et al. Dissolution enhancement of gliclazide using in situ micronization by solvent change method. **Powder Technology**, v. 187, p. 222-230, 2008.

VEMURI, V. K.; JANERO, D. R.; MAKRIYANNIS, A. Pharmacotherapeutic targeting of the endocannabinoid signaling system: drugs for obesity and the metabolic syndrome. **Physiology & Behavior**, v. 93, p. 671-686, 2008.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists**. 2. ed. Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone, 2005. 396 p.

WHO – World Health Organization. Fact sheet n° 311: Obesity and overweight. September 2006. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/index.html>>. Acesso em: 31 mar. 2008.

WHO – World Health Organization. Obesity and overweight. 2003. Disponível em: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/media/en/gfsfs_obesity.pdf>. Acesso em: 31 mar. 2008.

WILDING, J. P. H. Pathophysiology and aetiology of obesity. **Medicine**, v. 34, p. 501-505, 2003.

YUKSEL, N.; KANIK, A. E.; BAYKARA, T. Comparison of in vitro dissolution profiles by ANOVA-based, model-dependent and -independent methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 209, p. 57-67, 2000.

10 ANEXOS

ANEXO A – Análise do tamanho de partícula do rimonabanto

A análise do tamanho de partícula da matéria-prima do fármaco foi realizada antes e após a sua moagem, para avaliação do grau de micronização atingido. Utilizou-se microscópio óptico devidamente equipado. Foram avaliadas quinhentas partículas no aumento de 200x. A linearização da curva sigmóide de distribuição de tamanho de partículas foi realizada utilizando-se a tabela estatística de probitos, conforme método descrito na literatura (PASQUALOTO et al., 2005). A distribuição do tamanho de partícula dos dois grupos é apresentada na Tabelas 8 e 9.

Os valores de percentagem acumulada foram transformados em probitos através da tabela estatística. Na representação gráfica, os valores de diâmetro (D) ou logaritmo do diâmetro (log D) foram dispostos nas abscissas (x) e os valores de probitos foram dispostos nas ordenadas (y). O diâmetro médio das partículas é calculado através da equação da reta obtida por regressão linear de uma de duas formas: 1) D (μm) \times probitos, tratando-se de uma distribuição normal; ou, 2) log D \times probitos, tratando-se de uma distribuição log-normal. A equação da reta escolhida foi aquela que apresentou coeficiente de determinação (r^2) mais próximo a 1. Utilizou-se o ponto 50% (probito = 5) para a determinação do diâmetro médio das partículas (D_{50}) de cada grupo.

Tabela 8 – Análise granulométrica da matéria-prima de rimonabanto

Faixa (μm)	D (μm)	log D	<i>n</i>	%	% acumul.	Probitos
10 – 50	30	1,48	119	23,8	23,8	4,29
50 – 90	70	1,85	217	43,4	67,2	5,44
90 – 130	110	2,04	91	18,2	85,4	6,04
130 – 170	150	2,18	31	6,2	91,6	6,41
170 – 210	190	2,28	20	4,0	95,6	6,75
210 – 250	230	2,36	14	2,8	98,4	7,14
250 – 290	270	2,43	5	1,0	99,4	7,51
290 – 370	330	2,52	2	0,4	99,8	7,88
370 – 410	390	2,59	1	0,2	100,0	8,09
Total			500	100,0		

Tabela 9 – Análise granulométrica da matéria-prima de rimonabanto após redução do tamanho de partícula

Faixa (μm)	D (μm)	log D	<i>n</i>	%	% acumul.	Probitos
0 – 20	10	1,00	79	15,8	15,8	4,01
20 – 40	30	1,48	190	38,0	53,8	5,10
40 – 60	50	1,70	120	24,0	77,8	5,77
60 – 80	70	1,85	58	11,6	89,4	6,23
80 – 100	90	1,95	21	4,2	93,6	6,55
100 – 120	110	2,04	14	2,8	96,4	6,75
120 – 140	130	2,11	10	2,0	98,4	7,14
140 – 160	150	2,18	3	0,6	99,0	7,33
160 – 180	170	2,23	2	0,4	99,4	7,51
180 – 200	190	2,28	1	0,2	99,6	7,65
200 – 220	210	2,32	2	0,4	100,0	8,09
Total			500	100,0		

D: diâmetro médio da classe; *n*: número de observações; % acumul.: frequência ou porcentagem acumulada crescente

Os resultados obtidos para as regressões utilizando $\log D \times$ probitos apresentaram melhor correlação estatística para os dois grupos de matéria-prima de rimonabanto (Tabela 10). Desta forma, a distribuição de tamanho das partículas de cada grupo segue uma distribuição log-normal (Figura 9).

Tabela 10 – Resultados da análise de regressão linear ($y = ax + b$) a partir dos dados de granulometria de cada grupo de matéria-prima, utilizando D ou log D versus os valores de frequência acumulada transformados em probitos

Grupo	Distribuição	Equação	r^2
Não tratada	Normal	$y = 0,0098x + 4,6845$	0,9243
	Log-normal	$y = 3,4424x - 0,9297$	0,9907
Micronizada	Normal	$y = 0,0176x + 4,6268$	0,9179
	Log-normal	$y = 3,0146x + 0,7638$	0,9836

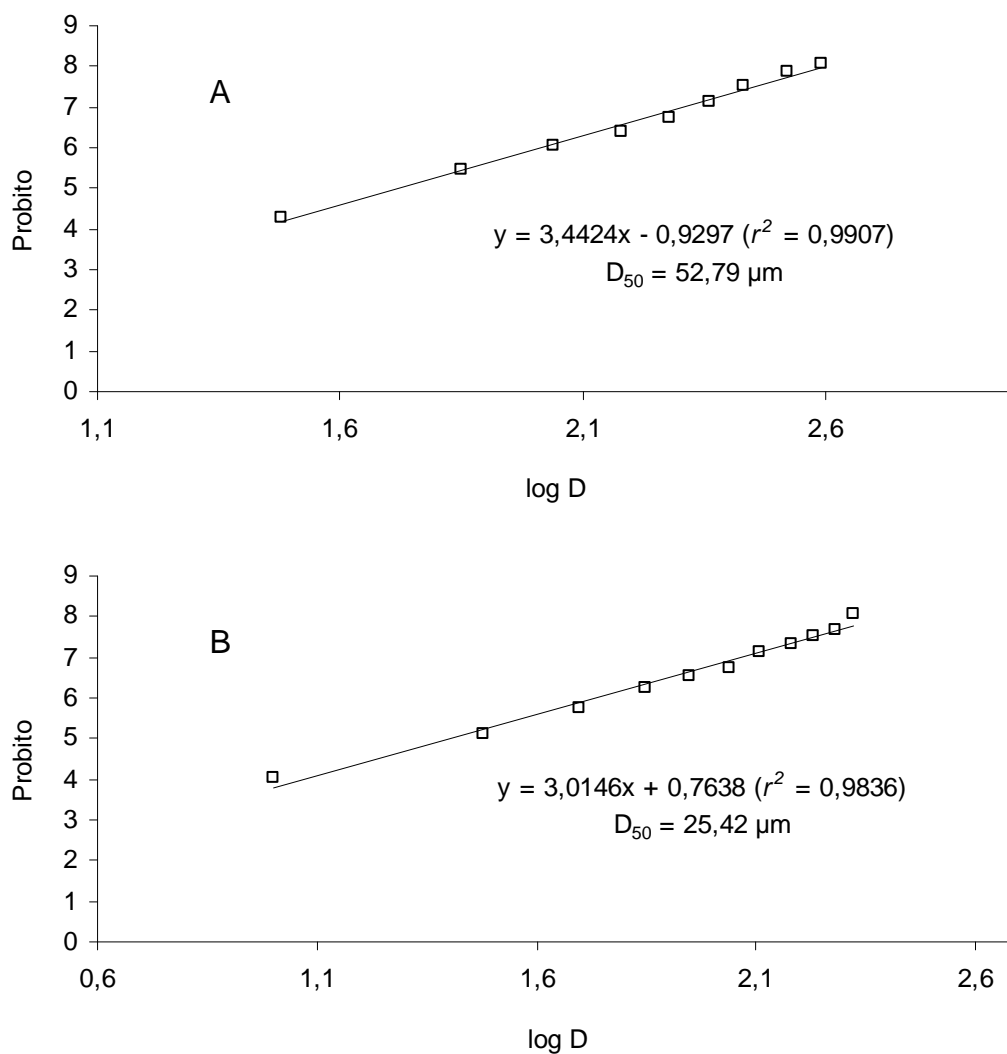


Figura 9 – Distribuição log-normal do tamanho das partículas de rimonabanto antes (A) e após (B) redução da granulometria através de moagem

Comparando-se os resultados para os diâmetros médios das partículas dos dois grupos de matéria-prima, verifica-se que houve redução de 51,8% no tamanho de partícula do fármaco após o processo de micronização.

ANEXO B – Protocolo para avaliação da exatidão pelo método da recuperação após adição de padrão à amostra

Tabela 11 – Protocolo para avaliação da exatidão pelo método da recuperação após adição de padrão à amostra

Amostra	Vol. sol. amostra (mL)	Vol. sol. padrão (mL)	Balão vol. (mL)	Concentração final ($\mu\text{g/mL}$)
Padrão	-	1,25	5	12,5
Amostra	1,25	-	5	12,5
1	1,25	0,75	5	20,0
2	1,25	0,75	5	20,0
3	1,25	0,75	5	20,0
4	1,25	1,25	5	25,0
5	1,25	1,25	5	25,0
6	1,25	1,25	5	25,0
7	1,25	1,75	5	30,0
8	1,25	1,75	5	30,0
9	1,25	1,75	5	30,0

Para avaliação da exatidão do método por LC em produtos farmacêuticos, foi usado o método da recuperação, que consiste em adicionar diferentes concentrações de solução padrão à solução amostra de concentração conhecida (Tabela 11). A exatidão foi avaliada em três concentrações (em triplicata), em dias diferentes.

Para preparação da solução padrão, transferiu-se 10 mg de rimonabanto SQR para balão volumétrico de 200 mL, solubilizou-se com metanol e completou-se o volume com o mesmo solvente (concentração: $50 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Para preparação da solução amostra, transferiu-se o equivalente a 5 mg de rimonabanto (a partir do pó dos comprimidos ou cápsulas) para balão volumétrico de 100 mL, adicionou-se 50 mL de metanol, deixou-se em banho ultrassônico por 5 min e completou-se o volume com o mesmo solvente (concentração: $50 \mu\text{g mL}^{-1}$). Para os comprimidos, centrifugou-se a suspensão por 5 min e utilizou-se o sobrenadante para as análises.

ANEXO D – Curva analítica obtida por LC e análise de variância (ANOVA) dos resultados da linearidade do método

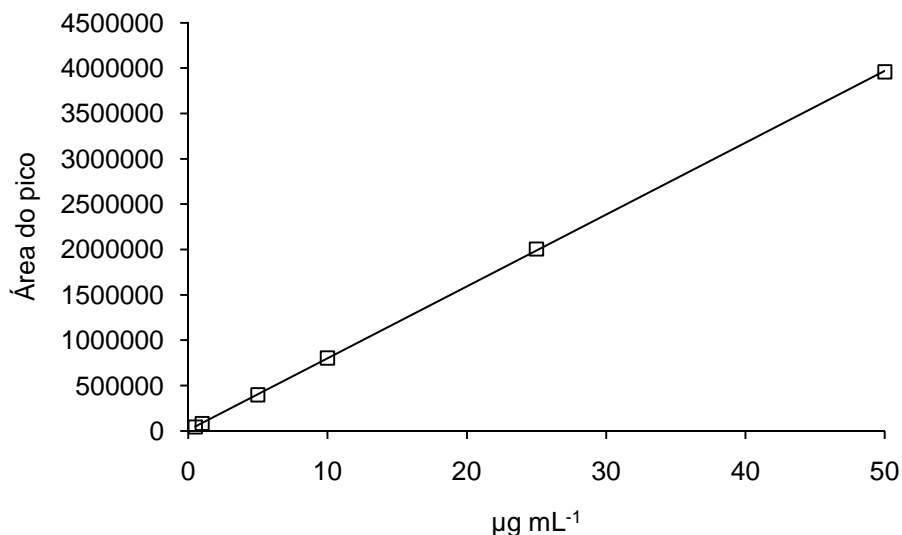


Figura 10 – Representação gráfica da curva analítica do rimonabanto obtida pelo método por LC para quantificação em comprimidos e cápsulas

Tabela 12 – Resultados da curva analítica de rimonabanto para o ensaio por LC para formulações farmacêuticas, obtidos através do método dos mínimos quadrados

Parâmetro	Resultado
Faixa de linearidade	0,5 – 50 µg mL ⁻¹
Equação da reta: $y = ax + b$	$y = 79228x + 6390,7$
Inclinação (a) ± desvio padrão	$79228 \pm 639,54$
Intercepto (b) ± desvio padrão	$6390,7 \pm 1914,08$
Coefficiente de determinação (r^2)	1,0000

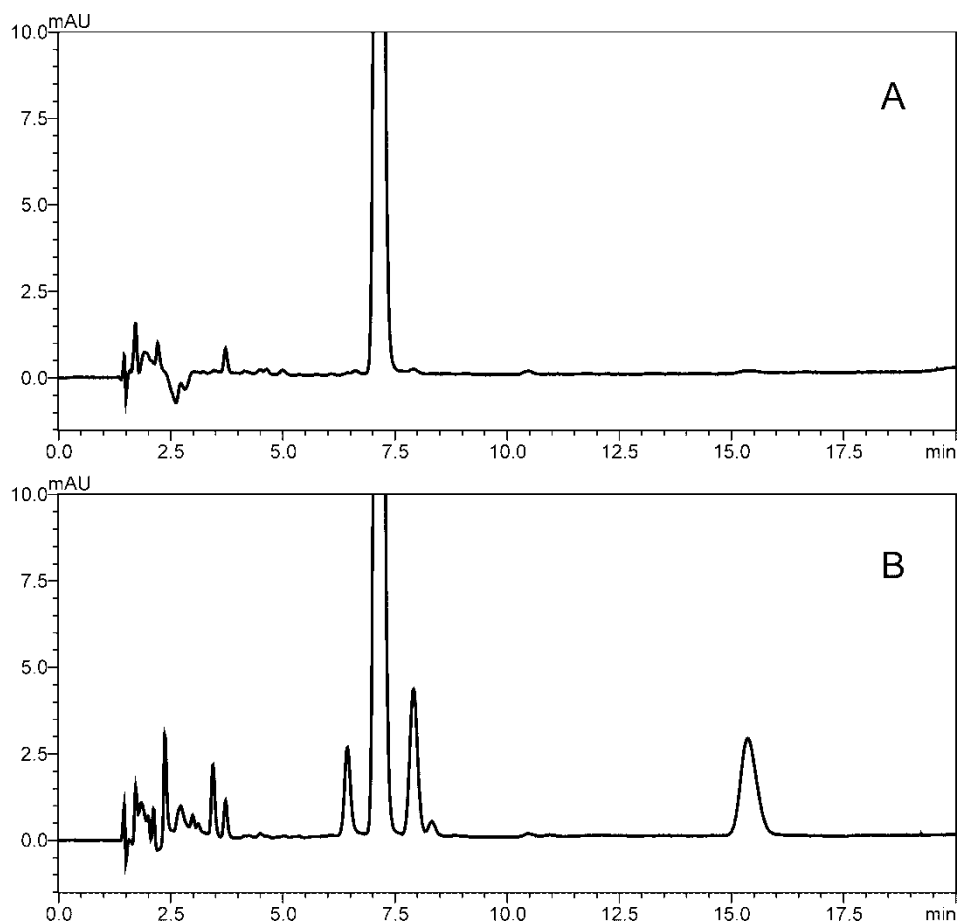
Tabela 13 – Análise de variância (ANOVA) das áreas absolutas para as curvas padrão de rimonabanto, obtidas por LC

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	F ^a
Entre concentrações	5	$3,49503 \times 10^{13}$	$6,99006 \times 10^{12}$	33038 (3,11)
- regressão linear	1	$3,49488 \times 10^{13}$	$3,49488 \times 10^{13}$	165185 (4,75)
- desvio da linearidade	4	$1,46504 \times 10^9$	$3,66261 \times 10^8$	1,73 (3,26)
Resíduo	12	$2,53889 \times 10^9$	$2,11574 \times 10^8$	
Total	17	$3,49528 \times 10^{13}$		

^a Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $p = 0,05$

GL: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados

ANEXO E – Cromatogramas obtidos da estabilidade de solução de SQR de rimonabanto ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) em metanol, deixada na bancada sem proteção contra a luz. (A) solução de referência; (B) amostra exposta à luz ambiente por 5 h: formação de produtos de degradação em 6,4, 7,9 e 15,4 min, com diminuição de 4,5% na área do pico do rimonabanto (7,1 min)



ANEXO F – Trabalhos publicados referentes ao projeto**Artigos publicados**

HURTADO, F. K.; RAVANELLO, A.; AREND, M. Z.; WRASSE, M.; DALMORA, S. L.; ROLIM, C. M. B. Validated stability-indicating RP-LC method for the determination of rimonabant in pharmaceutical dosage forms. *Journal of AOAC International*, *in press*, 2009.

Resumos publicados em anais de congressos

HURTADO, F. K.; FLORES, F. C.; MARCOLINO, A. I. P.; RAVANELLO, A.; SOUTO, G. D.; TORRES, B. G. S.; ROLIM, C. M. B. Determination of anti-obesity drug rimonabant in pharmaceutical dosage forms by reversed phase liquid chromatography with diode array detection. In: COLACRO XII: Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas, Florianópolis, SC, 2008.

HURTADO, F. K.; FLORES, F. C.; MARCOLINO, A. I. P.; RAVANELLO, A.; SOUTO, G. D.; TORRES, B. G. S.; ROLIM, C. M. B. Application of a RP-LC method to in vitro release study of poorly water soluble drug rimonabant. In: COLACRO XII: Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas, Florianópolis, SC, 2008.

TORRES, B. G. S.; MARCOLINO, A. I. P.; FLORES, F. C.; SOUTO, G. D.; HURTADO, F. K.; ROLIM, C. M. B. Comparação dos perfis de dissolução do rimonabanto a partir de diferentes formas farmacêuticas disponíveis comercialmente. In: 23ª Jornada Acadêmica Integrada da UFSM, Santa Maria, RS, 2008.

FLORES, F. C.; MARCOLINO, A. I. P.; TORRES, B. G. S.; SOUTO, G. D.; HURTADO, F. K.; ROLIM, C. M. B. Desenvolvimento e validação de método por cromatografia líquida em fase reversa para determinação de rimonabanto em produtos farmacêuticos. In: 23ª Jornada Acadêmica Integrada da UFSM, Santa Maria, RS, 2008.