



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CÂMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS –
HENRIQUE SANTILLO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
MOLECULARES

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO
ANALÍTICO PARA AVALIAR A DISSOLUÇÃO DE
COMPRIMIDOS DE NIMESULIDA BETA-CICLODEXTRINA**

CARLOS EDUARDO CARVALHO PEREIRA

Anápolis-GO
2015

CARLOS EDUARDO CARVALHO PEREIRA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO
ANALÍTICO PARA AVALIAR A DISSOLUÇÃO DE
COMPRIMIDOS DE NIMESULIDA BETA-CICLODEXTRINA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Moleculares.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Lúcio Benedito de Aquino.

Anápolis-GO

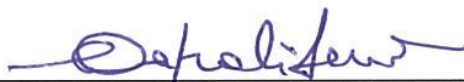
2015

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA
AVALIAR A DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDOS DE NIMESULIDA BETA-
CICLODEXTRINA

CARLOS EDUARDO CARVALHO PEREIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Moleculares da Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, da Universidade Estadual de Goiás, apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Aprovada em 03/03/2015 por:



Prof. Dr. Hamilton Barbosa Napolitano (UEG)



Profa. Dra. Marilene Silva Oliveira (UEG)



Prof. Dr. Wilsione José Carneiro (UFMT)

ANÁPOLIS – GO
MARÇO 2015

Dedico este trabalho a Deus por seu amor infinito.

À minha querida mãe (in memoriam) e à minha esposa por toda dedicação e amor incondicional.

Aos amigos e familiares pelo apoio, paciência e presença nos momentos difíceis e felizes de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter concedido a sabedoria e a força para concretizar esta oportunidade crescimento profissional e pessoal.

À minha família pelo estímulo, oportunidades e sacrifícios. Aos meus pais que nunca mediram esforços para me proporcionar um futuro brilhante e repleto de perspectivas.

À minha mãe agradeço especialmente pelo amor, carinho e pelas palavras de incentivo nos momentos difíceis e por confiar plenamente na minha capacidade.

À minha esposa, Gracielle, pelo carinho, companheirismo, amor, incentivo, apoio e cumplicidade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gilberto Lúcio Benedito de Aquino, pela oportunidade, pela confiança e por acreditar no projeto de pesquisa.

Ao apoio do Programa de Mestrado em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás.

“A felicidade não se resume na ausência de problemas, mas sim na sua capacidade de lidar com eles.”

Albert Einstein

RESUMO

A nimesulida pertence à classe dos anti-inflamatórios não-esteróides (AINEs) e a categoria II da classificação biofarmacêutica. A complexação de nimesulida com β -ciclodextrina é uma estratégia farmacotécnica para aumentar a solubilidade do fármaco. O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um método analítico para avaliar a dissolução de comprimidos de nimesulida β -ciclodextrina. Durante o desenvolvimento do método de dissolução a avaliação de polimorfismo e a de solubilidade do fármaco em diferentes meios de dissolução dentro da faixa de pH fisiológico de 1,2 a 6,8 foram imprescindíveis. A forma polimórfica presente nas amostras foi a I e a mistura de nimesulida com β -ciclodextrinas aumentou a solubilidade do fármaco em mais de 10 vezes. Uma vez desenvolvido, o método de dissolução foi validado de acordo com os parâmetros da resolução nº 899/2003 da ANVISA. No desenvolvimento do método verificou-se que o período de duração do teste de dissolução foi de 60 minutos, que o volume e o meio de dissolução mais adequados foram 900 mL de solução aquosa de lauril sulfato de sódio a 1% (p/v). Foi também notado que a rotação de 100 rpm e que o aparato pá foram os mais apropriados para avaliação da dissolução do fármaco. Utilizou-se espectrofotometria para quantificar a porcentagem de fármaco dissolvida. O comprimento de onda de 390 nm foi utilizado para a quantificação. Na validação do método os parâmetros de adequação do sistema, de especificidade/seletividade, de linearidade, de precisão, de exatidão e robustez foram satisfatórios o que comprovou que a metodologia desenvolvida de dissolução é adequada ao uso pretendido.

PALAVRAS-CHAVE: Metodologia analítica. Estudo de dissolução. Validação. Nimesulida beta-ciclodextrina.

ABSTRACT

Nimesulide belongs to the class of anti-inflammatory non-steroidal drugs (NSAIDs) and category II of the biopharmaceutical classification. Complexation of nimesulide with β -cyclodextrin is a pharmacological strategy to increase the solubility of the drug. The objective of this study was to develop and validate an analytical method to evaluate the dissolution of β -cyclodextrin nimesulide tablets. During the development of dissolution method to evaluate polymorphism and drug solubility in different dissolution media within the physiological pH range of 1,2 to 6,8 are essential. The polymorphic form was present in the samples I and the mixture of nimesulide with β -cyclodextrin increased the solubility of the drug by more than 10 times. Once developed, the dissolution method was validated according to the parameters of Resolution N^o. 899/2003 of ANVISA. In the development of the method it has been found that the duration of the dissolution test was 60 minutes, the volume and the medium more suitable dissolution were 900 ml of aqueous solution of sodium lauryl sulfate 1% (w/v). It was also noted that rotation of 100 rpm and the paddle apparatus have been most suitable for assessment of drug dissolution. Spectrophotometry was used to quantify the percentage of dissolved drug. The wavelength of 390 nm was used for quantification. In method validation the adequacy of the system parameters of specificity/selectivity, linearity, precision, accuracy and robustness were satisfactory which proved that the developed dissolution methodology is appropriate to the intended use.

KEYWORDS: Analytical methodology. Dissolution study. Validation. Nimesulide beta-cyclodextrin.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Representação esquemática dos efeitos relacionados à ativação da COX-1 e COX-2	20
FIGURA 2. Fórmula estrutural plana da NMS	21
FIGURA 3. Polimorfismo conformacional da NMS mostrando os grupos que possuem liberdade torsional.....	26
FIGURA 4 Sobreposição dos três confômeros da forma polimórfica I da NMS (azul e rosa) e da forma II (vermelho)	26
Figura 5 Empacotamento cristalino da forma polimórfica I da NMS mostrando o arranjo das moléculas na sequência XYYX	26
FIGURA 6. Empacotamento cristalino da forma polimórfica II da NMS mostrando o arranjo das moléculas na sequência XYXY	27
FIGURA 7 . Representação esquemática da estrutura molecular das ciclodextrinas	28
FIGURA 8. Esquema do funcionamento de um difratômetro de raios X	35
FIGURA 9. Aparelho de dissolução.....	36
FIGURA 10. Ilustração do aparato 1 (cesto)	37
FIGURA 11. Ilustração do aparato 2 (pá)	37
FIGURA 12. Aplicações do estudo de perfil de dissolução <i>in vitro</i>	39
FIGURA 13. Representação esquemática de um tensoativo	42
FIGURA 14. Equipamento incubadora com plataforma de agitação orbital	46
FIGURA 15. Termograma do padrão de NMS da Farmacopeia Brasileira.....	75
FIGURA 16. Termograma da amostra de matéria-prima de NMS.....	76
FIGURA 17. Termograma da amostra de matéria-prima de β -CD na ausência da NMS	77
FIGURA 18. Termograma da amostra de matéria-prima de NMS β -CD	78
FIGURA 19. Difratoograma da amostra de matéria prima de NMS.....	79
FIGURA 20. Difratoograma da amostra de matéria prima de NMS β -CD 400 mg	80
FIGURA 21. Resultados de variação percentual de área observados durante estudo de estabilidade do fármaco NMS associado a β -CD nos meios de dissolução água; HCl 0,1 N; tampão acetato 0,05 M pH 4,5; tampão fosfato 0,05 M pH 6,8 e solução aquosa de lauril sulfato de sódio a 0,5%, a 0,75% e a 1,0% a 37° C durante 24 horas. Os valores apresentados correspondem a média de 3 determinações.....	85

FIGURA 22. Cromatogramas extraídos no comprimento de onda 230 nm que representam a avaliação da estabilidade do fármaco NMS associado a β -CD nos meios de dissolução água; HCl 0,1 N; tampão acetato 0,05 M pH 4,5; tampão fosfato 0,05 M pH 6,8 e solução aquosa de lauril sulfato de sódio a 0,5%, a 0,75% e a 1,0% a 37°C ao término de 24 horas.....	86
FIGURA 23. Teste de pureza de pico da solução amostra do fármaco do fármaco NMS associado a β -CD nos meios de dissolução água; HCl 0,1 N; tampão acetato 0,05 M pH 4,5; tampão fosfato 0,05 M pH 6,8 e solução aquosa de lauril sulfato de sódio a 0,5%, a 0,75% e a 1,0% a 37°C ao término de 24 horas obtido com detector de fotodiodos.....	87
FIGURA 24. Varredura da solução amostra do fármaco do fármaco NMS associado a β -CD nos meios de dissolução água; HCl 0,1 N; tampão acetato 0,05 M pH 4,5; tampão fosfato 0,05 M pH 6,8 e solução aquosa de lauril sulfato de sódio a 0,5%, a 0,75% e a 1,0% a 37°C ao término de 24 horas obtido com detector de fotodiodos.	88
FIGURA 25. Resultados do estudo de solubilidade da NMS β -CD à temperatura de 37 °C \pm 1° C em água, em HCl 0,1 N, em tampão acetato 0,05M pH 4,5 e em tampão fosfato 0,05 M pH 6,8, a 37° C e a 50 rpm durante 24 horas. Os valores correspondem a média de 3 determinações(\pm desvio padrão).....	91
FIGURA 26. Demonstração do comprimido de NMS β -CD na cuba de dissolução. .	95
FIGURA 27. Perfis de dissolução de NMS β -CD comprimidos (400 mg) em água, em HCl 0,1 N, em tampão acetato 0,05M pH 4,5 e tampão fostato 0,05 M pH 6,8, a 37° C e a 50 rpm. Os valores correspondem a média de 6 determinações e as barras na vertical ao desvio padrão.	98
FIGURA 28. Perfis de dissolução de NMS β -CD comprimidos (400 mg) em meios de dissolução com diferentes concentrações LLS. Os valores correspondem a média de 6 determinações e as barras na vertical ao desvio padrão.	100
FIGURA 29. Perfis de dissolução de NMS β -CD comprimidos (400 mg) em água + LSS 1,0% no aparato pá e em diferentes rotações. Os valores correspondem à média de 6 determinações e as barras na vertical ao desvio padrão.....	102
FIGURA 30. Perfis de dissolução de NMS β -CD comprimidos (400 mg) em 900 mL de LSS 1,0% nos aparatos pá e cesto em 900 mL a 100 rpm . Os valores correspondem à média de 6 determinações e as barras na vertical ao desvio padrão.	104

FIGURA 31. Perfis de dissolução de NMS β -CD comprimidos (400 mg) em LSS 1,0% no aparato pá a 100 rpm em 500 mL e 900 mL. Os valores correspondem à média de 6 determinações e as barras na vertical ao desvio padrão.....	107
FIGURA 32. Espectro de varredura do padrão de NMS β -CD no UV-Visível (200 a 900 nm) em hidróxido de sódio 0,1 M	111
FIGURA 33. Espectro de varredura das soluções amostra de NMS β -CD no UV-Visível (200 a 900 nm) diluída em hidróxido de sódio 0,1 M	112
FIGURA 34. Espectro de varredura da solução placebo diluída em hidróxido de sódio 0,1 M no UV-Visível (200 a 900 nm)	113
FIGURA 35. Espectro de varredura da solução diluente (hidróxido de sódio 0,1 M) no UV-Visível (200 a 900 nm)	113
FIGURA 36. Equação da reta obtida pela regressão linear	116
FIGURA 37. Distribuição dos erros residuais	118
FIGURA 38. Demonstrativo dos valores de recuperação.....	124
FIGURA 39. Resultados do teste de robustez – Carta controle para avaliar a estabilidade das soluções analíticas.	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Solubilidade da NMS em diferentes meios de dissolução.	25
Tabela 2. Dada de monocristal das formas polimórficas I e II da NMS	27
Tabela 3. Classificação dos testes segundo sua finalidade.	49
Tabela 4. Ensaio necessários para validação do método analítico, segundo sua finalidade.	49
Tabela 5. Limites percentuais recomendados para o intervalo de linearidade de acordo com a aplicação da metodologia.	53
Tabela 6. Parâmetros espectrofotométricos para quantificação da NMS β -CD	61
Tabela 7. Condições cromatográficas para a quantificação da NMS β -CD em diferentes meios de dissolução durante o estudo de estabilidade do fármaco.....	62
Tabela 8. Diluição das amostras no estudo de solubilidade da NMS β -CD.	64
Tabela 9. Parâmetros usados nos perfis de dissolução no teste de avaliação de meio dissolução.	66
Tabela 10. Parâmetros usados nos perfis de dissolução no teste de avaliação de rotação.	67
Tabela 11. Parâmetros usados nos perfis de dissolução no teste de avaliação de aparato.	67
Tabela 12. Parâmetros usados nos perfis de dissolução no teste de avaliação de aparato.	68
Tabela 13. Diluição da solução estoque para construção da curva de calibração	73
Tabela 14. Resultados do estudo de teste de filtro realizado na matéria-prima de NMS β -CD com as membranas de 0,22 μ m e 0,45 μ m.....	83
Tabela 15. Resultados do estudo de teste de filtro realizado no medicamento NMS β -CD 400 mg comprimido com as membranas de 0,22 μ m e 0,45 μ m.	83
Tabela 16. Resultados de variação percentual de área observados nos cromatogramas obtidos durante estudo de estabilidade do fármaco NMS associado a β -CD nos meios de dissolução água; HCl 0,1 N; tampão acetato 0,05 M pH 4,5; tampão fosfato 0,05 M pH 6,8 e solução aquosa de lauril sulfato de sódio a 0,5%, a 0,75% e a 1,0% a 37° C durante 24 horas. Os valores apresentados correspondem a média de 3 determinações.	85

Tabela 17. Resultados de pH, de condição <i>sink</i> e de solubilidade obtidos durante do teste de solubilidade do fármaco NMS associado a β -CD nos meios de dissolução água; HCl 0,1 N; tampão acetato 0,05 M pH 4,5; tampão fosfato 0,05 M pH 6,8 e solução aquosa de lauril sulfato de sódio a 0,5%, a 0,75% e a 1,0% a 37°C ao término de 24 horas.	90
Tabela 18. Valores médios de porcentagens dissolvidas (\pm desvio padrão) de NMS β -CD comprimidos (400 mg) para os tempos de coleta de 5', 10', 15', 30', 45', 60' e <i>Infinity Test</i> em água, em HCl 0,1 N, em tampão acetato 0,05M pH 4,5 e em tampão fosfato 0,05 M pH 6,8, a 37° C e a 50 rpm. Os valores correspondem a média de 6 determinações.....	97
Tabela 19. Valores de desvio padrão relativo em porcentagem para os tempos de coleta de 5', 10', 15', 30', 45', 60' e <i>Infinity Test</i> encontrados no perfil de dissolução de NMS β -CD comprimidos (400 mg) em água, em HCl 0,1 N, em tampão acetato 0,05M pH 4,5 e em tampão fosfato 0,05 M pH 6,8, a 37° C e a 50 rpm.....	98
Tabela 20. Valores médios de porcentagens dissolvidas (\pm desvio padrão) de NMS β -CD comprimidos (400 mg) para os tempos de coleta de 5', 10', 15', 30', 45', 60' e <i>Infinity Test</i> com diferentes concentrações de LLS. Os valores correspondem a média de 6 determinações.	99
Tabela 21. Valores de desvio padrão relativo em porcentagem para os tempos de coleta de 5', 10', 15', 30', 45', 60' e <i>Infinity Test</i> encontrados no perfil de dissolução de NMS β -CD comprimidos (400 mg) em meios de dissolução com diferentes concentrações de LLS.....	100
Tabela 22. Valores médios de porcentagens dissolvidas (\pm desvio padrão) de NMS β -CD comprimidos (400 mg) para os tempos de coleta de 5', 10', 15', 30', 45', 60' e <i>Infinity Test</i> em diferentes rotações. Os valores correspondem a média de 6 determinações.....	101
Tabela 23. Valores de desvio padrão relativo em porcentagem para os tempos de coleta de 5', 10', 15', 30', 45', 60' e <i>Infinity Test</i> encontrados no perfil de dissolução de NMS β -CD comprimidos (400 mg) em água + LLS 1% em diferentes rotações.	102
Tabela 24. Valores médios de porcentagens dissolvidas (\pm desvio padrão) de NMS β -CD comprimidos (400 mg) para os tempos de coleta de 5', 10', 15', 30', 45', 60' e <i>Infinity Test</i> nos aparatos pá e cesto a 100 rpm e em LLS 1%. Os valores correspondem a média de 6 determinações.	104

Tabela 25. Valores de desvio padrão relativo em porcentagem para os tempos de coleta de 5', 10', 15', 30', 45', 60' e <i>Infinity Test</i> encontrados no perfil de dissolução de NMS β -CD comprimidos (400 mg) e em 900 mL de LLS 1% nos apartatos pá e cesto a 100 rpm.....	105
Tabela 26. Valores médios de porcentagens dissolvidas (\pm desvio padrão) de NMS β -CD comprimidos (400 mg) para os tempos de coleta de 5', 10', 15', 30', 45', 60' e <i>Infinity Test</i> em diferentes volumes de LLS 1% a 100 rpm no aparato pá. Os valores correspondem a média de 6 determinações.	106
Tabela 27. Valores de desvio padrão relativo em porcentagem para os tempos de coleta de 5', 10', 15', 30', 45', 60' e <i>Infinity Test</i> encontrados no perfil de dissolução de NMS β -CD comprimidos (400 mg) em LLS 1% para os volumes de 500 mL e 900 mL a 100 rpm no aparato pá.	107
Tabela 28. Resultados de adequação do sistema.....	111
Tabela 29. Resultados de teste de especificidade	114
Tabela 30. Demonstrativo das absorbâncias obtidas nos diferentes níveis de concentração para o teste de linearidade	115
Tabela 31. Regressão linear dos dados do teste de linearidade.....	117
Tabela 32. Soma dos resíduos para o teste de linearidade	117
Tabela 33. Teste de Cochran para avaliação da homocedasticidade no teste de linearidade.....	119
Tabela 34. Resultados do teste de precisão (dia 1, analista 1, espectrofotômetro 1)	120
Tabela 35. Resultados do teste de precisão (2° dia - analista 2 – espectrofotômetro 2).....	121
Tabela 36. Resultados do teste de precisão intermediária.....	122
Tabela 37. Resultados do teste de ANOVA para o teste de precisão intermediária.....	122
Tabela 38. Resultados do teste de exatidão (Grau de recuperação)	123
Tabela 39. Resultados do teste de robustez - Variação no comprimento de onda .	124
Tabela 40. Resultados do teste de robustez – Variação da marca das membranas filtrantes.....	125
Tabela 41. Resultados do teste de robustez - estabilidade das soluções analíticas.	125

SIGLAS E ABEVIATURAS

AINES – Anti-inflamatórios não-esteroidais

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

β -CD – Beta-ciclodextrina

Ccal – Ccalculado

CICP - Cloreto de cetilpiridino

CTAB - Brometo de cetiltrimetil amônio

Cmax – Concentração máxima

COX – Enzima cicloxigenase

Ctab – Ctabelado

CV – Coeficiente de variação

DPR – Desvio padrão relativo

DRX – Cristalografia por difratometria de RX

DSC – Calorimetria exploratória diferencial

DTAB - Brometo de dodeciltrimetil amônio

EMA – Agência Europeia de Avaliação de Medicamentos

FDA – Food and Drug Administration

HCTZ - Hidroclorotiazida

ICH – Conferência Internacional de Harmonização

IFA - Insumo farmacêutico ativo

IFAs – Insumos Farmacêuticos Ativos

INMETRO – Instituto Brasileiro de Metrologia

IV – Infravermelho

LSS – Lauril sulfato de sódio

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária de Abastecimento

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

NMS – Nimesulida

NMS β -CD – Nimesulida beta-ciclodextrina

OMS – Organização Mundial da Saúde

pH – Potencial hidrogeniônico

RMN – Ressonância magnética Nuclear

RPM – Rotações por minuto

SNVS – Sistema Nacional de Vigilância Sanitária

SUS – Sistema Único de Saúde

TG – Termogravimetria

Tmax – Tempo em que a concentração máxima foi atingida

USP – Farmacopeia dos Estados Unidos da América

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO-ESTEROIDAIIS (AINES).....	19
2.2 NIMESULIDA	21
2.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DA NMS	24
2.4 COMPLEXO NMS β -CD.....	28
2.5 POLIMORFISMO DE FÁRMACOS	30
2.6 CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA (DSC).....	33
2.7 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DR-X).....	33
2.8 DISSOLUÇÃO DE FORMAS FARMACÊUTICAS SÓLIDAS.....	35
2.9 TENSOATIVOS OU SURFACTANTES.....	42
2.10 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO.....	45
2.12 ASPECTOS REGULATÓRIOS DE VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA	47
3. OBJETIVOS	57
3.1 OBJETIVO GERAL	57
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
4.1 ANÁLISE DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	57
4.2 ANÁLISE DE DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DR-X).....	58
4.3 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA DE DISSOLUÇÃO PARA ANÁLISE DO MEDICAMENTO NMS β -CD 400 MG COMPRIMIDO	59
4.4.1 Estudo da solubilidade do fármaco NMS β -CD – Estudo preliminar.....	60
4.3.1.1 Estudo de filtro	60
4.3.1.2 Estudo de estabilidade.....	62
4.3.1.3 Método de <i>shake flask</i>	63
4.3.1.4 Estudo da condição <i>sink</i>	65
4.3.2 Estudo de meio de dissolução	65
4.3.2.1 Estudo de meio de dissolução	65
4.3.2.2 Avaliação de rotação	66
4.3.2.3 Avaliação de aparato	67
4.3.2.4 Avaliação de volume de meio de dissolução	67
4.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE DISSOLUÇÃO PARA ANÁLISE DO MEDICAMENTO NMS β -CD 400 MG COMPRIMIDO	68
4.4.1 Preparo de soluções	69

4.4.1.1	Preparo do meio de dissolução	69
4.4.1.2	Preparo da solução padrão NMS.....	69
4.4.1.3	Preparo das soluções amostra do medicamento NMS β -CD 400 mg comprimido	69
4.4.1.4	Preparo da solução placebo do medicamento NMS β -CD 400 mg comprimido	70
4.4.2	Condições da dissolução	70
4.4.3	Condições espectrofotométricas.....	71
4.4.4	Parâmetros de validação do teste de dissolução.....	71
4.4.4.1	Adequação do Sistema.....	71
4.4.4.2	Especificidade / Seletividade	72
4.4.4.3	Linearidade / Faixa de Trabalho	72
4.4.4.4	Precisão.....	73
4.4.4.5	Exatidão.....	74
4.4.4.6	Robustez.....	74
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.1	ANÁLISE DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	75
5.2	ANÁLISE DE DIFRATOMETRIA DE RX (DRX).....	78
5.3	DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA DE DISSOLUÇÃO	81
5.3.1	Estudo da solubilidade da NMS β -CD	81
5.3.2	Estudo de meio de dissolução	94
5.4	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA DE DISSOLUÇÃO DESENVOLVIDA.....	110
5.4.1	Adequação do Sistema.....	110
5.4.2	Especificidade / Seletividade	112
5.4.3	Linearidade	115
5.4.4	Precisão.....	120
5.4.5	Exatidão.....	123
5.4.6	Robustez.....	124
6	CONCLUSÃO	127
	REFERÊNCIAS.....	129

1 INTRODUÇÃO

A nimesulida (NMS) é um fármaco classificado como anti-inflamatório não esteroide inibidor da enzima ciclooxigenase 2. No Brasil, é um anti-inflamatório presente no mercado farmacêutico há mais de 15 anos com autorização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Possui ampla aceitação e comercialização, sendo prescrita com grande frequência por médicos e odontólogos, além de ser usada pela população em geral sem prescrição ou acompanhamento de profissional da saúde. Após seu lançamento mundial houve vários relatos de hepatotoxicidade e insuficiência hepática fatal relacionada ao seu uso. Isto fez com que a Agência Europeia para Avaliação de Medicamentos (EMA) reavaliasse perfil de segurança deste fármaco e recomendasse que a dose máxima diária fosse de 100 mg e que a duração do tratamento não excedesse 15 dias. Países como Finlândia, Espanha e Irlanda a retiraram de seus mercados enquanto que outros países como Estados Unidos, Canadá e Austrália nem sequer chegaram a colocá-la. No entanto, nos últimos anos demonstrou-se que a NMS possui propriedades neuroprotetoras e que é um fármaco promissor na terapia da isquemia cerebral aguda (CANDELARIO, 2008; CHATTERJEE, PAL, BISWAS, 2008; SILVA, 2010; BESSONI *et. al*, 2010; CRFSP, 2011).

A NMS pertence a categoria II da classificação biofarmacêutica, ou seja, é classificada como um fármaco de baixa solubilidade e alta permeabilidade. Nesta categoria, a dissolução do fármaco é uma etapa limitante da velocidade de absorção oral. Fármacos que pertencem a esta classificação estão sujeitos a estratégias de formulação especiais destinadas a melhorar a velocidade de dissolução e consequentemente a biodisponibilidade oral. A mistura ou a complexação da NMS com beta-ciclodextrinas (β -CD) é uma estratégia farmacotécnica usada para melhorar a solubilidade deste fármaco e para que o início da atividade analgésica e anti-inflamatória seja mais rápido (SILVA, VOLPATO, 2002; AULTON, 2005).

Outro fator que está diretamente relacionado com a solubilidade de um fármaco é o polimorfismo. Este é um item imprescindível para registrar medicamentos como genéricos, similares e para avaliação da estabilidade. Sabe-se que as diferentes formas polimórficas de um mesmo fármaco podem apresentar

diferenças significativas nas propriedades físicas. O principal impacto do polimorfismo é na dissolução do medicamento e conseqüentemente na biodisponibilidade do fármaco. A dissolução é um pré-requisito de bioequivalência. Como consequência, modificações cristalinas de fármacos podem levar a distintas eficácias farmacológicas, pois os diferentes polimorfos apresentam, em geral, diferentes solubilidades no equilíbrio. Desta forma, para garantir qualidade dos medicamentos produzidos é fundamental a identificação e a caracterização das estruturas cristalinas de fármacos. Técnicas como calorimetria exploratória diferencial (DSC), difratometria de raios X (DRX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) são usualmente usada para caracterização das diferentes formas polimórficas RAW *et al*, 2004; CARINI *et al*, 2009; SILVA *et al*, 2010; ROY, AITIPAMULA, NANGIA, 2005; ZENCIRCI *et al*, 2010; VIRTANEN, MAUNU, 2010; BRITAIN, 2000; FERREIRA *et al*, 2010).

A dissolução é uma excelente ferramenta para avaliar a qualidade lote a lote de formas farmacêuticas sólidas, além de possibilitar a detecção de alterações entre formulações que poderiam comprometer o desempenho do medicamento e conseqüentemente sua biodisponibilidade. Este teste possui grande importância principalmente para fármacos em que a velocidade de dissolução é a etapa determinante do processo de absorção e este é o caso dos fármacos da classificação biofarmacêutica II. Os métodos de dissolução devem ser discriminativos e serem capazes de apontar possíveis problemas de qualidade (ANVISA, 2010; ANAND *et al*, 2011; JAMZAD, FASSIHI, 2006). A dissolução passou a ser exigida para o registro a partir de 1999 com a introdução dos medicamentos genéricos. Hoje no mercado farmacêutico brasileiro há apenas um fabricante do medicamento NMS beta-ciclodextrina (NMS β -CD) 400 mg comprimido (ANVISA, 2014). Os demais fabricantes apenas produzem o medicamento NMS sem qualquer associação.

Nas monografias das Farmacopeias Brasileira, Americana, Europeia, Britânica, Japonesa, Mexicana somente há metodologia de dissolução para a NMS sem associação. Não há metodologia de dissolução para a associação da NMS com beta-ciclodextrinas (β -CD). Desta forma, é imprescindível o desenvolvimento e a validação de um método de dissolução para a NMS β -CD dado a sua inexistência em monografias de farmacopeias e em dados da literatura. A RDC 31 de 11 de

agosto de 2010 prevê que na ausência de método analítico de dissolução descrito em compêndio oficial (farmacopeias), normas ou regulamentos específicos aprovados e referendados pela ANVISA é necessário o desenvolvimento e a validação do método de dissolução.

No desenvolvimento de métodos analíticos de dissolução deve-se avaliar a solubilidade da substância ativa experimentalmente para cada fabricante em, no mínimo, 3 meios diferentes dentro da faixa de pH fisiológico (1,2 a 6,8), considerando a temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. A escolha dos meios deve levar em consideração a natureza química do fármaco, suas constantes de dissociação (pKa's), farmacocinética e a via de administração. Para a determinação experimental da solubilidade, quantidades crescentes do fármaco são acrescentadas ao meio selecionado para a obtenção de uma solução saturada que deve ser mantida em agitação constante (geralmente por 24 ou 48 horas) em velocidades e temperatura controladas até que o equilíbrio seja atingido. A estabilidade do fármaco nos meios de dissolução e a possível interferência das membranas filtrantes nos resultados de solubilidade devem ser avaliadas. Depois de concluída a etapa de determinação da solubilidade, os perfis de dissolução são feitos para determinar os parâmetros mais adequados para a execução do teste. Nesta etapa é que se definem o aparato, a rotação, o meio de dissolução, o volume do meio de dissolução, o tempo de execução do teste e a quantidade mínima a ser liberada para que o medicamento seja aprovado no ensaio de dissolução.

Para assegurar e demonstrar confiança nos resultados fornecidos pela metodologia analítica ela deve demonstrar que ela é apropriada à finalidade pretendida. Esta demonstração caracteriza a validação, que é a comprovação através de estudos experimentais que o método desenvolvido atende às exigências das aplicações analíticas. A validação de métodos de dissolução envolve a avaliação da especificidade, seletividade, linearidade, intervalo, exatidão, precisão e robustez. Caso estes parâmetros sejam considerados satisfatórios diz-se que a metodologia foi validada e pode ser usada na rotina analítica de indústrias farmacêuticas.

Devido ao grande impacto que a NMS representa para a saúde pública brasileira, a avaliação da qualidade dos medicamentos que contém este fármaco é imperativo. Considerando a ausência de métodos de dissolução para analisar o

medicamento NMS β -CD, este trabalho corrobora com o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) e com o Sistema Único de Saúde (SUS) ao propor uma metodologia de dissolução discriminativa e validada para analisar possíveis desvios de qualidade em medicamentos. Além disso, este trabalho propõe avaliar a forma polimórfica presente na amostra de NMS- β -CD.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO-ESTEROIDAIIS (AINES)

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) atuam bloqueando a formação de prostaglandinas pela inibição sobre a cicloxigenase (COX). Atualmente há mais de 50 AINES diferentes no mercado farmacêutico mundial (RANG, DALE, 2012; SILVA, 2010). Eles proporcionam alívio sintomático de cefaleias, enxaquecas, das dores pós-operatórias, odontológicas, menstruais e para outros tipos de dores menores. Eles encontram-se disponíveis em formulações de comprimidos, géis e injetáveis (ANVISA, 2015).

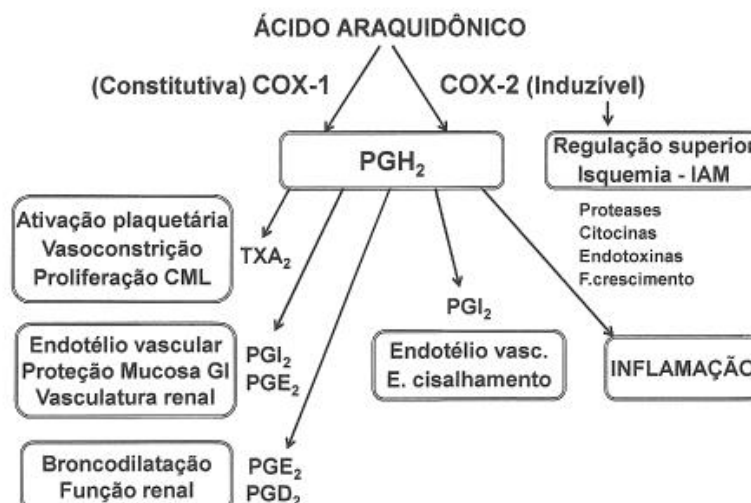
A ação farmacológica primária dos AINES relaciona-se a sua capacidade de inibir a enzima COX de ácidos graxos, inibindo desta maneira a produção de prostaglandinas e tromboxanas. Há duas isoformas desta enzima: a COX-1 e a COX-2. A COX-1 é constitutiva e expressa na maioria dos tecidos. Atua na manutenção do organismo através da produção de prostaglandinas com funções de citoproteção gástrica, agregação plaquetária, alteração do fluxo renal e início do parto. Já a COX-2 é induzida em processos inflamatórios ou infecciosos. A isoforma 2 é responsável pela produção de prostanoídes da inflamação (TECHIO, BELO, 2012; RANG, DALE, 2012; SILVA, 2010).

A maioria dos AINES “tradicionalis” inibem tanto a COX-1 quanto a COX-2, embora haja uma variação na inibição de cada isoforma. Acredita-se que a ação anti-inflamatória dos AINES relacione-se com a COX-2 enquanto que os efeitos indesejáveis (principalmente os gastrintestinais) resultem da inibição da isoforma 1 (RANG, DALE, 2012; SILVA, 2010).

As prostaglandinas estão envolvidas na proteção gástrica, na agregação plaquetária, na regulação vascular renal e indução do trabalho de parto. Em virtude disso, os efeitos colaterais desta classe de fármacos relacionam-se com distúrbios gastrintestinais, reações cutâneas, efeitos renais adversos, efeitos cardiovasculares adversos. Outros efeitos adversos menos comuns incluem distúrbios nos sistema nervoso central e na medula óssea e alterações hepáticas (RANG, DALE, 2012; SILVA, 2010).

O mecanismo de atuação dos AINES relaciona-se com a inibição da oxidação do ácido araquidônico pelas COXs de ácidos graxos. A ativação da cascata enzimática do ácido araquidônico inicia-se pela ativação da enzima fosfolipase A2, em resposta a vários estímulos. A fosfolipase A2 hidrolisa os fosfolípidos da membrana, liberando ácido araquidônico no citoplasma. Este, por sua vez, serve de substrato para duas vias enzimáticas: cicloxigenase e lipoxigenase. Pela via da COX é formada a prostaglandina (PG) H_2 , que estimula a formação de vários prostanóides, como PGI_2 , PGD_2 , PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, e tromboxano A2. Pela via da lipoxigenase formam-se leucotrienos, lipoxinas e outros produtos (BATLOUNI, 2010). O mecanismo de atuação prostanóides pode ser visto na Figura 1.

FIGURA 1. Representação esquemática dos efeitos relacionados à ativação da COX-1 e COX-2



Legenda: COX – ciclo-oxigenase; PG - prostaglandina; TX - tromboxano; IAM - infarto agudo do miocárdio.

Adaptado de BATLOUNI (2010)

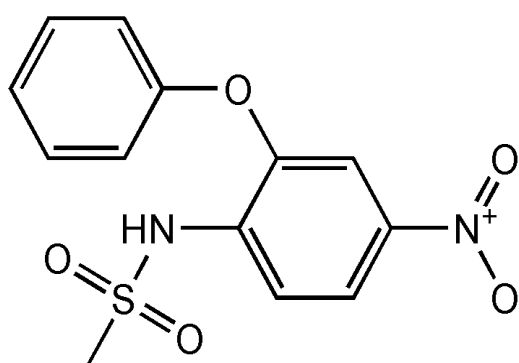
Os AINES possuem três efeitos terapêuticos principais: efeito anti-inflamatório, efeito analgésico e efeito antipirético. Além disso, eles podem ser classificados em inibidores seletivos de COX-1 (exemplo: ácido acetilsalicílico), inibidores não seletivos de COX-1 (exemplo: ibuprofeno), inibidores seletivos de COX-2 (exemplo: NMS) e inibidores altamente seletivos de COX-2 (coxibes) (exemplo: celecoxibe e rofecoxibe). Alguns inibidores de COX-2 foram retirados por mercado farmacêutico devido ao aumento de eventos adversos cardiovasculares associados ao uso de inibidores altamente seletivos de COX-2. De uma maneira geral, os riscos de reações adversas cardiovasculares estão relacionados à dose e ao tempo de uso dos coxibes. O valdecoxibe e o rofecoxibe são inibidores de COX-2 que foram retirados do mercado (RANG, DALE, 2012; SILVA, 2010).

2.2 NIMESULIDA

A NMS é considerada um potente inibidor da síntese de prostaglandina e da agregação plaquetária, sendo responsável também pela neutralização de espécies reativas de oxigênio gerados nos processos inflamatórios. Este fármaco é prescrito no Brasil para o tratamento de inflamações osteoarticulares e musculoesqueléticas, estados febris, cefaleias, mialgias e na dor pós-operatória devido às suas atividades analgésicas, anti-inflamatórias e antipiréticas (SILVA, 2010; PEREIRA *et. al*, 2011).

A NMS (N-(4-nitro-2-fenoxifenil) metanossulfonamida) pertence à classe dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) e inibe seletivamente a enzima cicloxigenase 2 (COX-2) (DELLIS, GIANINIS, TSANTILI-KAKOULIDOU, 2007; PEREIRA *et. al*, 2011). A Figura 2 apresenta a fórmula estrutural plana da NMS.

FIGURA 2. Fórmula estrutural plana da NMS



Cambridge Soft Corporation, 2003

Os primeiros AINEs colocados no mercado provocavam efeitos colaterais desagradáveis a médio e longo, tais como: problemas gástricos e intestinais e sérias complicações renais. Os efeitos colaterais gerados pelos primeiros AINES incentivaram os estudos a respeito de meios mais eficazes e seguros para o tratamento das inflamações (RANG, DALE, 2012; SILVA, 2010).

A cicloxigenase (COX), também conhecida como prostaglandina sintase (PGH) é um potente mediador de inflamação. Até o momento são conhecidas duas isoformas da enzima cicloxigenase: a cicloxigenase-1 (COX-1) e a cicloxigenase-2 (COX-2), que apresentam as mesmas funções, semelhantes pesos moleculares embora sejam codificadas por genes diferentes (FABIOLA, PATTABHI, NAGARAJAN, 1998; RANG, DALE, 2012; SILVA, 2010).

As ações benéficas dos medicamentos anti-inflamatórios não-esteróides (AINEs) têm sido associados com a inibição de cicloxigenase-2 (COX-2), ao passo que alguns dos seus efeitos adversos estão associados, principalmente, com a inibição da COX-1. As duas cicloxigenases são igualmente eficazes, mas os fármacos seletivos para COX-2 devem ser preferencialmente utilizados ante os fármacos não-seletivos, pois aqueles proporcionam menor risco de efeitos adversos gastrointestinais. As ações benéficas dos medicamentos anti-inflamatórios não-esteróides (AINEs) têm sido associados com a inibição de cicloxigenase-2 (COX-2), ao passo que alguns dos seus efeitos adversos estão associados, principalmente, com a inibição da COX-1. (KEROLA *et al*, 2009; Xue *et al*, 2011).

Nos últimos anos a NMS demonstrou propriedades neuroprotetoras em modelos animais de lesão neurológica aguda. Ela mostrou-se eficaz em reduzir o enfarte, em melhorar a função neurológica, em atenuar a ruptura da barreira cérebro-sangue e reduzir a infiltração leucocitária no cérebro isquêmico. Estes efeitos benéficos foram observados mesmo quando o primeiro tratamento é dado várias horas após o início da isquemia cerebral. A neuroproteção produzida pela NMS foi de longa duração, o que torna a NMS um fármaco promissor na terapia da isquemia cerebral aguda (CANDELARIO -JALIL, 2008)

A inibição da COX-2 pela NMS ocorre por meio de uma interação do grupamento sulfonamida do fármaco com um resíduo de arginina na cavidade hidrofílica da enzima. (RUELA, ARAÚJO, PEREIRA, 2009). Em 2009, Kerola *et al*, realizaram um estudo duplo-cego com 15 voluntários que receberam por via oral ou

ácido acetilsalicílico 500 mg ou 400 mg de ibuprofeno ou nabumetona 1 g ou 100 mg de NMS. Neste estudo verificou-se que, dentre os outros AINES, a NMS causou supressão quase total da atividade da COX-2 e uma redução parcial da atividade de COX-1, confirmando assim a seletividade da NMS pela COX-2.

Além da inibição seletiva da COX-2, a NMS neutraliza a formação de espécies reativas de oxigênio produzidos durante o processo inflamatório. A eliminação deste fármaco dá-se quase exclusivamente por metabolismo hepático através de enzimas do citocromo P450. Em processos patológicos de insuficiência hepática há um aumento significativo de seu metabólito 4-hidroxi-NMS e de sua meia-vida plasmática. A incidência da hepatotoxicidade induzida pela NMS não é homogênea na literatura médica. Há vários casos clínicos descritos na literatura em que houve hepatotoxicidade associada ao uso da NMS, o que tem gerado discussões em torno da segurança deste fármaco. A hepatotoxicidade causada pela NMS é grave e fatal, o que levou países como Finlândia, Espanha e Irlanda a retirá-la do mercado. Alguns países como Canadá, Austrália e Estados Unidos não chegaram a colocá-la no mercado por considerarem sua segurança questionável. No Brasil, ela é amplamente utilizada por médicos e dentistas em processos inflamatórios e pela população em geral sem prescrição ou acompanhamento de profissional da saúde. Assim percebe-se que no Brasil ela é usada principalmente em casos de automedicação (CHATTERJEE, PAL, BISWAS, 2008; SILVA, 2010; BESSONI *et al*, 2010)

A Agência Europeia para Avaliação de Medicamentos (EMA) recomenda que o uso de NMS deve limitar-se a 15 dias e com dose diária máxima de 100 mg (BESSONI *et. al*, 2010). A incidência de hepatopatologias relacionadas à NMS foi estimada em 35,2 por 100.000 mil pacientes-ano enquanto a de lesões hepáticas foi de 33,1 por 100.000 mil pacientes-ano em um estudo baseado na avaliação de 2 milhões de prescrições. A Organização Mundial da Saúde (OMS) registrou até o ano de 2008 320 casos de desordens hepato-biliares relacionadas ao uso de NMS (KHAN, 2008).

No Brasil, a NMS é comercializada há mais de 15 anos com autorização da ANVISA e a bula dos medicamentos que contem este fármaco traz alertas, cuidados e recomendações para pacientes que fazem tratamento prolongado com a NMS (CRFSP, 2011).

2.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DA NMS

A NMS apresenta-se como um pó amarelo pálido, cristalino, levemente untuoso ao tato, inodoro e não higroscópico (ANVISA, 2010).

Este fármaco apresenta faixa de fusão entre 143,3°C a 144,5°C e caracteriza-se ainda por ser praticamente insolúvel em água, facilmente solúvel em etanol e metanol e muito solúvel em acetona, clorofórmio, acetonitrila e dimetilformamida. É, ainda, solúvel em soluções de hidróxidos alcalinos e insolúvel em soluções ácidas (ANVISA, 2010).

A NMS possui caráter fracamente ácido com pKa aproximado de 6,5 e pertence a categoria II da classificação biofarmacêutica, ou seja, é classificada como um fármaco de baixa solubilidade e alta permeabilidade. Nesta categoria, a dissolução do fármaco é uma etapa limitante da velocidade de absorção oral, por isso, é possível obter uma forte correlação a dissolução *in vitro* e a absorção *in vivo* por meio do teste de dissolução. Fármacos que pertencem à categoria biofarmacêutica II estão sujeitos a estratégias de formulação destinadas a melhorar a velocidade de dissolução e conseqüentemente a biodisponibilidade oral. A complexação da NMS com β -CD é uma estratégia farmacotécnica destinada a aumentar a solubilidade deste fármaco (AULTON, 2005; AUDA, 2014). A Tabela 1 apresenta a solubilidade da NMS em diferentes meios de dissolução.

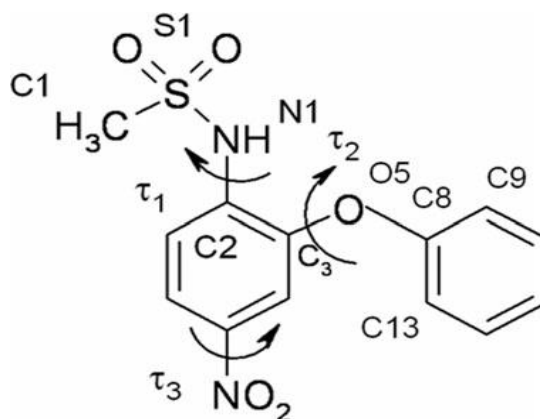
Tabela 1. Solubilidade da NMS em diferentes meios de dissolução.

Meio de dissolução	Solubilidade ($\mu\text{g/mL}$)
Água	10,1
HCl 0,1M	7,9
Tampão pH 5,8	9,5
Tampão pH 7,8	62,6

Adaptado de Silva, Volpato (2002)

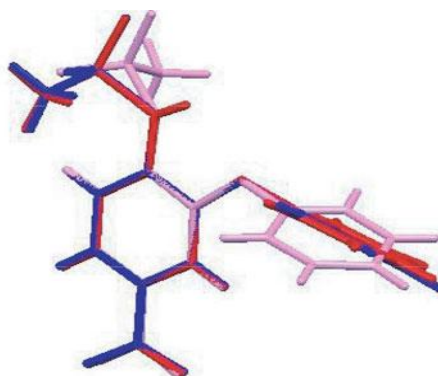
A NMS apresenta polimorfismo conformacional devido ao grau de liberdade torcional dos grupos sulfonamida, fenoxi e nitro (Figura 3). As formas polimórficas encontradas para este fármaco são a I e a II, conforme empacotamento cristalino exibido nas Figuras 5 e 6. A forma I possui dois confômeros com ângulos torsionais semelhantes (azul e rosa na Figura 4) e a forma II possui diferentes ângulos de torção entre os grupos fenoxi e sulfonamida (vermelha na Figura 4). As estruturas cristalinas são estabilizadas por ligações de hidrogênio N-H...O e por interações C-H...O e C-H... π . A forma polimórfica II é cerca de 4,3 vezes mais solúvel do que a forma I. Em geral, a razão de solubilidade entre os polimorfos de um mesmo fármaco é menor que 2. Em estudos de dissolução intrínseca e de solubilidade de equilíbrio a forma II dissolve-se muito mais rápido do que a forma I. Os cristais da forma polimórfica II caracterizam-se morfológicamente como aciculares e prismáticos enquanto que os da forma I caracterizam-se como forma de haste. A diferenciação entre as duas formas polimórficas pode ser feita por calorimetria exploratória diferencial (DSC), por difratometria de raios X (DRX), por ressonância magnética nuclear (RMN), por espectroscopia de infravermelho e espectroscopia de Raman. A forma polimórfica I é mais estável que a II (forma metaestável). Pode ocorrer transformação polimórfica, na qual a forma metaestável converte-se na forma mais estável (SANPHUI, SARMA, NANGIA, 2011).

FIGURA 3. Polimorfismo conformacional da NMS mostrando os grupos que possuem liberdade torsional



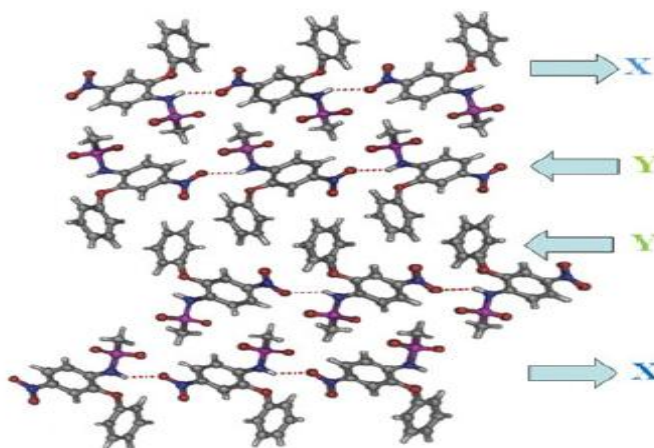
Adaptado de Sanphui, Sarma, Nangia (2011)

FIGURA 4 Sobreposição dos três confômeros da forma polimórfica I da NMS (azul e rosa) e da forma II (vermelho)



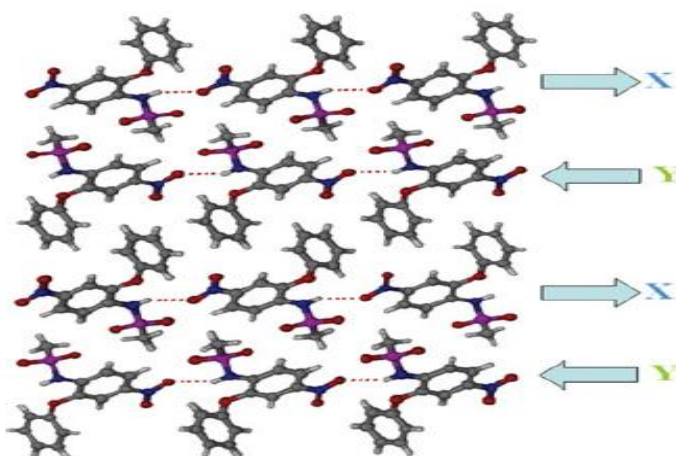
Adaptado de Sanphui, Sarma, Nangia (2011)

Figura 5 Empacotamento cristalino da forma polimórfica I da NMS mostrando o arranjo das moléculas na sequência XYYX



Adaptado de Sanphui, Sarma, Nangia (2011)

FIGURA 6. Empacotamento cristalino da forma polimórfica II da NMS mostrando o arranjo das moléculas na sequência XYXY



Adaptado de Sanphui, Sarma, Nangia (2011)

A caracterização do polimorfismo da NMS geralmente é realizada por DRX e por DSC. O fármaco apresenta estrutura cristalina característica. Por DRX é possível observar picos característicos de difração de 2θ em $17,23^\circ$; $19,43^\circ$; $21,70^\circ$; $23,15^\circ$; $25,60^\circ$; $33,25^\circ$ e $33,09^\circ$ (AUDA, 2014). De acordo com Sanphui, Sarma, Nangia (2011) a massa molecular da NMS é $308,31 \text{ g/mol}$ e a fórmula molecular é $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$. A forma polimórfica I possui sistema cristalino ortorrômbico e a forma II monoclinico. A célula unitária, que é a menor unidade que se repete e que possui todas as características de simetria da forma organizada espacial dos átomos, das formas polimórfica I e II são semelhantes, tendo a relação $a_I \approx a_{II}$, $b_I \approx b_{II}$, $c_I \approx a_{II}$ (tabela 2).

Tabela 2. Dada de monocristal das formas polimórficas I e II da NMS

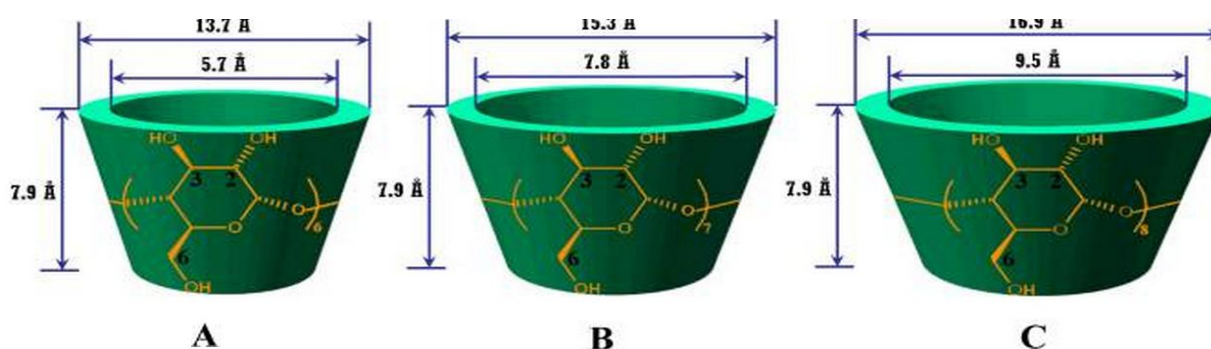
Nimesulida	Forma I	Forma II
Fórmula química	$\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$	$\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$
Peso molecular	308,31	308,31
Sistema cristalino	Ortorrômbico	Monoclinico
Temperatura em (K)	100	100
$a/\text{Å}$	16,1268 (19)	33,231 (2)
$b/\text{Å}$	5,0411 (6)	5,072 (4)
$c/\text{Å}$	32,761 (4)	15,8736 (12)
$\alpha/^\circ$	90	90
$\beta/^\circ$	90	92,712 (2)
$\gamma/^\circ$	90	90

Adaptado de Sanphui, Sarma, Nangia (2011)

2.4 COMPLEXO NMS β -CD

Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos derivadas do amido que possuem uma cavidade central relativamente hidrofóbica e uma superfície externa hidrofílica. Podem ser classificadas de acordo com o número unidades de α -D-glucopiranosose ligadas por ligações do tipo 1,4 em alfa-ciclodextrina (α -CD) (constituída por 6 unidades), beta-ciclodextrina (constituída por 7 unidades) e gama-ciclodextrinas (γ -CD) (constituída por 8 unidades) (LARRAÑETA, ISASI, 2014). A Figura 7 mostra a representação esquemática da estrutura molecular de uma α -CD, de uma β -CD e de uma γ -CD.

FIGURA 7 . Representação esquemática da estrutura molecular das ciclodextrinas



Legenda: A (α -CD); B (β -CD) e C (γ -CD)

Adaptado de Zhang, Ma (2013)

As CDs possuem a forma de um cone truncado com uma cavidade oca afunilada de 0,79 Å de profundidade (Figura 7). Os diâmetros das partes superiores e inferiores aumentam com o número de unidades de glicose. A cavidade hidrofóbica das CDs possuem a capacidade de inclusão de íons, proteínas, oligonucleotídeos e fármacos. As inclusões em CDs de fármacos relacionam-se com o aumento de sua solubilidade e de sua absorção, com o mascaramento de odores e sabores, com o melhoramento da permeabilidade do fármaco nas barreiras biológicas e com a diminuição da toxicidade local e sistêmica. Produtos farmacêuticos formulados com CDs podem ser administrados por via nasal, oral, retal, ocular e dérmica (ZHANG, MA, 2013).

Estudos revelaram que as α -CDs e as β -CDs naturais apresentam certo grau de nefrotoxicidade que resulta da acumulação de cristais de CDs ou de cristais de CDs complexadas com colesterol. Estes cristais possuem baixa solubilidade em água. Este problema foi contornado por meio do desenvolvimento de β -CDs modificadas que possuem a solubilidade aumentada em água. Entre estas novas destaca-se a hidroxipropil e a sulfobutileter-beta-ciclodextrina (ZHANG, MA, 2013).

As β -CDs apresentam boa solubilidade em água. A associação de fármacos com a β -CDs ocorrem devido à capacidade que elas possuem de encapsular moléculas apolares de fármaco. Neste caso, formam-se complexos reversíveis e solúveis em água. Como consequências do encapsulamento observa-se melhoria na taxa de dissolução, de biodisponibilidade e estabilidade das apresentações farmacêuticas (MONEGHINI *et al*, 2004; TEIXEIRA, 2012).

Vizzard *et al.* (1998) realizaram um estudo randomizado com 185 pacientes, utilizando a NMS associada com a β -CD e a NMS sem associação. Demonstrou-se que a NMS associada possui início de atividade analgésica mais rápida em relação à NMS sem associação.

O preparo do encapsulamento do fármaco com a β -CD pode ser realizado por meio de diversas técnicas tais como a moagem (mistura do fármaco com a ciclodextrina em moinhos de alta energia), o prensamento, a secagem por pulverização, a criodessecagem, rollmixing, a compactação por ultrassons e a precipitação a partir de vários solventes (co-precipitação, co-evaporação ou co-liofilização). Recentemente vem sendo utilizados fluidos supercríticos para preparar os complexos livres de solventes. (MURA, FAUCCI, PARRINI, 2001; POSE-VILARNOVO *et al*, 2001; CHAROENCHAITRAKOOL, DEGHANI, FOSTER, 2002; JUNCO *et al*, 2002; AUDA, 2014).

Após a realização da associação são utilizados testes para determinar as constantes de complexação entre fármaco e a CD. Entre estes podem-se citar a absorção de UV-visível, RMN, medições potenciométricas, fluorescência, eletroforese capilar, DSC e DRX (MURA, 2014; AUDA, 2014).

2.5 POLIMORFISMO DE FÁRMACOS

Todos os fármacos conhecidos apresentam a capacidade de se cristalizar em diferentes estruturas cristalinas. Logo, todos os fármacos podem apresentar o fenômeno do polimorfismo. No entanto, isso nem sempre é observado em função de barreiras cinéticas e termodinâmicas (ARAÚJO *et. al*, 2012). Na formulação de medicamentos geralmente o polimorfo de escolha é o mais termodinamicamente mais estável de modo a assegurar a estabilidade do fármaco durante todo o prazo de validade em que o medicamento é submetido às condições ambientes de armazenamento. No entanto, a forma polimórfica mais estável possui a menor energia livre e é a que possui a menor solubilidade. Isso leva a uma menor velocidade de dissolução e, conseqüentemente, em menor velocidade de absorção (SINGHAL, CURATOLO, 2004).

A capacidade de uma substância de existir em mais de uma estrutura cristalina é chamada de polimorfismo. Este se caracteriza pela ocorrência de alterações no arranjo cristalino, sem, contudo, alterar a conformação molecular e espacial da molécula. Assim, o polimorfismo só ocorre no estado sólido e a sua ocorrência está ligado ao processo de cristalização, de secagem e armazenamento (GIRON, 1995; BRITAIN, 1999; BOTTON, 1999).

Muitas propriedades físico-químicas de um sólido variam quando a estrutura cristalina deste é alterada. As diferentes formas polimórficas podem apresentar diferenças significativas nas propriedades físico-químicas. Desta maneira, o polimorfismo farmacêutico apresenta grande influência nas propriedades farmacocinéticas de um fármaco. Os diferentes polimorfos de uma substância podem apresentar diferenças nos pontos de fusão e de sublimação, na solubilidade, na pressão de vapor, na reatividade no estado sólido, no comportamento térmico, na forma do cristal, na cor, na higroscopicidade, na estabilidade física e química, na velocidade de dissolução (podendo levar a desvios na biodisponibilidade), na densidade aparente e verdadeira, na morfologia do cristal e na compactação e escoamento do pó (GIRON, 1995; BRITAIN, 1999; BOTTON, 1999; ARAÚJO *et. al*, 2012).

Os insumos farmacêuticos ativos (IFAs) são frequentemente administrados aos pacientes em formas farmacêuticas sólidas, o que justifica o grande impacto que o polimorfismo possui na área farmacêutica. As diferentes propriedades dos polimorfos são oriundas das diferentes conformações e interações intra e intermoleculares que modificam os arranjos das moléculas nos polimorfos (BYRN, 1999).

Entre as características tecnológicas dos insumos ativos que mais apresentam interesse na produção de medicamentos, destacam-se o perfil de solubilidade (perfil de dissolução intrínseca e solubilidade no equilíbrio), comportamento calorimétrico, perfil de higroscopicidade e morfologia do cristal. Dessa forma, é importante o desenvolvimento de métodos analíticos que garantam a reprodutibilidade inter e intra-lote (BRYN *et al.*, 1995).

O principal impacto do polimorfismo na área farmacêutica ocorre quando existe a dependência entre a dissolução *in vivo* do fármaco e a velocidade de absorção. Os principais parâmetros que sofrem impacto *in vivo* são a concentração plasmática máxima ($C_{máx}$) e o tempo necessário para obtê-la ($T_{máx}$). Assim, o polimorfismo possui relação direta com a dissolução do medicamento e conseqüentemente com a sua biodisponibilidade. A dissolução é um pré-requisito de bioequivalência, pois a droga deve primeiro, desintegrar-se e depois, dissolver-se no trato gastrointestinal antes de ser absorvida. Como consequência, modificações cristalinas de fármacos podem levar a distintas eficácias farmacológicas, pois os diferentes polimorfos apresentam, em geral, diferentes solubilidades no equilíbrio (KHAN, 1996; POSTALI, 2011).

A literatura possui diversos exemplos que relacionam polimorfismo com dissolução e biodisponibilidade. Por exemplo, o anti-helmíntico mebendazol possui diferentes solubilidades para os polimorfos A, B e C. Swanepoel, Liebenberg, Villiers (2003) propuseram um ensaio de dissolução para o mebendazol presente em comprimidos capaz de distinguir seus polimorfos. Nesse estudo, os perfis de percentagem dissolvida versus tempo mostraram que o polimorfo C é dissolvido mais rapidamente (70% em 120 min) quando comparado ao polimorfo B (37% em 120 min) e ao polimorfo A (20% em 120 min).

A cimetidina é um fármaco que possui sete formas polimórficas sendo as formas A, B, C e D as formas anidras e as modificações M1, M2 e M3 as formas

monoidratadas. Os polimorfos usados na produção de formas farmacêuticas sólidas são as formas A e B. A forma A é mais comumente usada devido às propriedades de fluxo e de aderência aos equipamentos. As formas B e C não são usadas para a produção de comprimidos, pois exibem pobres propriedades de fluxo, enquanto que a forma D não apresenta boas características de compressibilidade. Já as formas monoidratadas não são usadas, pois sofrem conversões polimórficas. A forma B tem sido mais usada na preparação de suspensões farmacêuticas. Assim a presença do polimorfismo a biodisponibilidade da cimetidina e, portanto, sua eficácia clínica (DANESH, *et al.*, 2000; JANTRATID, *et. al*, 2006).

Diante do impacto do polimorfismo sobre as propriedades farmacotécnicas e farmacológicas, a identificação e a caracterização das estruturas cristalinas de fármacos é um passo fundamental para garantir a qualidade, a segurança e a eficácia de um medicamento. Isto se tornou mais evidente com a criação dos medicamentos genéricos por meio da lei 9.787 de 10 de fevereiro de 1999 e com a RDC nº 60 de 10 de outubro de 2014 que trata dos critérios para a concessão renovação do registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. (BRASIL, 1999; BRASIL, 2014).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para caracterização estrutural do estado sólido e para identificar as diferentes formas cristalinas de fármacos. Entre elas destacam-se a microscopia eletrônica de varredura (MEV), DSC, termogravimetria (TG), RMN, DRX, além de técnicas espectroscópicas por absorção na região do infravermelho (IV) e espalhamento de Raman (RAW *et al*, 2004; CARINI *et al*, 2009; SILVA *et al*, 2010; ROY, AITIPAMULA, NANGIA, 2005; ZENCIRCI *et al*, 2010; VIRTANEN, MAUNU, 2010; BRITAIN, 2000; FERREIRA *et al*, 2010).

Fármacos que pertence à classe II da classificação biofarmacêutica são mais suscetíveis de variações de eficácia terapêutica devido à presença de polimorfismo (WHO, 2010). Neste trabalho foram utilizadas as técnicas de DSC e DRX para avaliar e investigar a forma polimórfica da NMS. A NMS possui dois polimorfos: uma fase nativa e uma fase com ponto de fusão mais baixo (BERGESE *et al*, 2003).

2.6 CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA (DSC)

A DSC é uma técnica termo-analítica usada em vários campos da análise farmacêutica qualitativa. As análises precisam somente de 2 a 5 mg de amostra para serem realizadas. Esta técnica mede a quantidade e o fluxo de calor entre uma substância e um material de referência em função de um programa de aquecimento ou resfriamento. Quando não ocorrem mudanças físicas ou químicas na amostra não haverá variação de temperatura nem de fluxo de energia para manter a condição isotérmica. No entanto, quando ocorrem mudanças de fases, o calor latente será registrado pelo equipamento como um sinal elétrico. Desta forma, podem ser quantificadas transições cristalinas e mudanças de estado como fusão, evaporação e sublimação (AULTON, 2005).

A DSC é aplicável no desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas, sendo aplicada na determinação de pureza de fármacos, na caracterização de sólidos farmacêuticos, na estabilidade, na avaliação de compatibilidades fármaco-fármaco e fármaco-excipiente, em estudos de avaliação de polimorfismo e na cinética de degradação fármacos. Esta técnica não envolve a utilização de padrões de referência para determinação de impurezas e possui a vantagem de permitir o rápido preparo da amostra e pequeno tempo de análise (MOREIRA *et al.*, 2010; OLIVEIRA, YOSHIDA, GOMES, 2011).

A DSC tem sido amplamente utilizada na detecção da formação de complexos entre fármacos e β -CDs (MOREIRA *et al.*, 2010).

2.7 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DR-X)

A DR-X é uma técnica que utiliza a natureza partícula-onda dos raios X para obter informações sobre a estrutura cristalina de materiais. A técnica consiste em incidir os raios X sobre a amostra em um ângulo Θ . Os raios X são desviados (difratados) quando encontram os átomos da amostra. O ângulo formado entre a amostra e o detector é denominado 2Θ . A radiação passa por filtros e atinge o

detector. A intensidade máxima de difração está relacionada com a força desta difração na amostra. Os ângulos e intensidades de difração são capturados pelo detector e um software plota um gráfico com os valores obtidos de 2θ versus a intensidade de difração. Este gráfico representa o perfil de difração da amostra (CONNOLLY, 2005). A Figura 8 representa o funcionamento de um difratômetro de raios X.

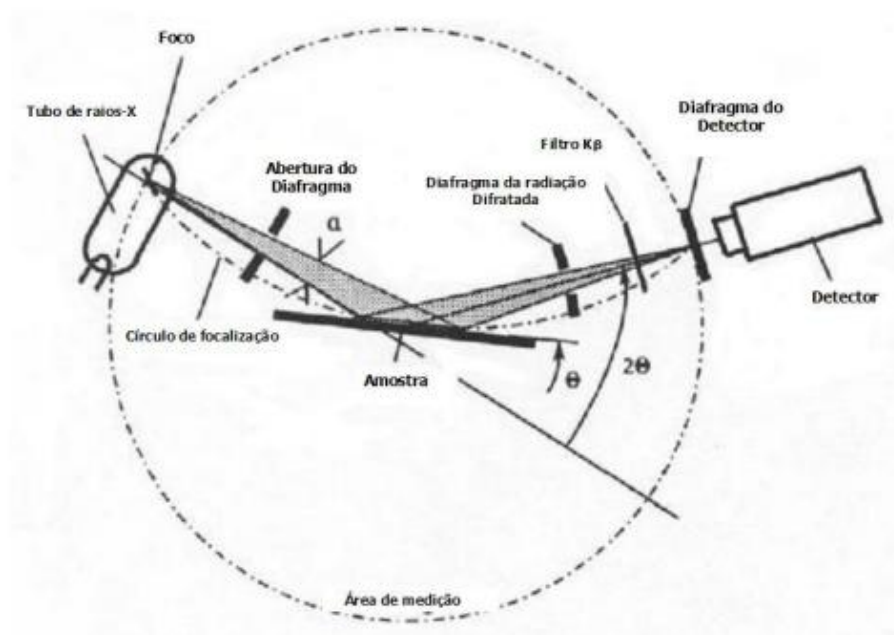
Em um material onde os átomos estejam arranjados periodicamente no espaço, o fenômeno da difração de raios-X ocorre nas direções de espalhamento que satisfazem a Lei de Bragg (equação 2.1). Admitindo que um feixe monocromático de determinado comprimento de onda (λ) incide sobre um cristal a um ângulo θ , chamado de ângulo de Bragg, tem-se:

$$2 d \sin\theta = n \lambda \quad (2.1)$$

onde θ corresponde ao ângulo medido entre o feixe incidente e determinados planos do cristal, “d” é a distância entre os planos de átomos e “n” a ordem de difração. Cada sólido cristalino tem um padrão de difração de raios X policristalino particular, podendo este ser utilizado como “impressão digital” para sua identificação. Este padrão de difração consiste de intensidades para uma série de ângulos 2θ que satisfazem as condições de difração impostas pela lei de Bragg (equação 2.1) (FERNANDES *et al.* 2010).

A difração de raios X é uma técnica usualmente usada na determinação de polimorfismo em fármacos e para detecção de compostos de inclusão cristalinos em β -CDs. Neste último caso, comparam-se os difratogramas das substâncias puras e do complexo. O difratograma sem picos bem definidos caracteriza o material amorfo e é indicativo da ocorrência de complexação entre o fármaco e a CD. Assim observa-se que os padrões de difração dos complexos obtidos são claramente diferentes dos obtidos a partir dos componentes individuais (CORTI *et al.*, 2007).

FIGURA 8. Esquema do funcionamento de um difratômetro de raios X



Adaptado de Connolly *et al* (2005).

2.8 DISSOLUÇÃO DE FORMAS FARMACÊUTICAS SÓLIDAS

O processo de absorção de fármacos no organismo está submetido a influências de fatores intrínsecos ao fármaco como a lipossolubilidade, a hidrossolubilidade, o tamanho molecular, estrutura química, carga elétrica, forma farmacêutica, concentração da droga no local de absorção, solubilidade e velocidade de dissolução (SILVA, 2010).

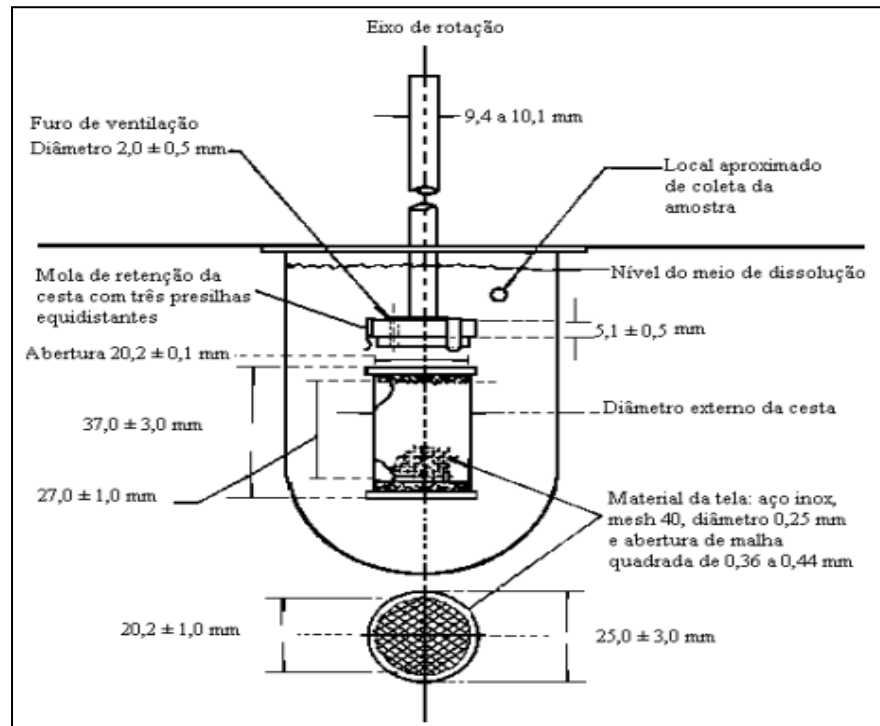
A dissolução é um teste em que um fármaco é liberado de sua forma farmacêutica para tornar-se disponível para ser absorvido pelo organismo. O teste de dissolução permite determinar a quantidade de insumo ativo dissolvido no meio de dissolução quando o produto é submetido à ação de aparelhagem específica e às condições experimentais descritas nas monografias presentes em compêndios oficiais denominados farmacopeias. O teste aplica-se a comprimidos, cápsulas, suspensões e adesivos transdérmicos (CHOWDARY, RAJYALAKSHIMI, 1987; ANVISA, 2010).

O teste de dissolução é realizado em um aparelho de dissolução (dissolutor – Figura 9) que consiste em um sistema composto por recipientes abertos de forma cilíndrica e fundo hemisférico (cubas) feitos de material transparente e inerte com aberturas adequadas para o agitador, para as coletas de amostra e para a inserção do termômetro. O dissolutor, ainda, possui hastes de aço inoxidável para promover a agitação do meio de dissolução. As hastes apresentam-se sob duas formas: cestas (aparato 1- Figura 10) e pá (aparato 2 – Figura 11). Além disso, ele possui um motor que possibilita ajustar a velocidade de rotação da haste de acordo com a monografia do produto e um banho de água termostaticado para que a temperatura seja mantida entre $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Quando as amostras do medicamento flutuam no meio de dissolução recorre-se a um dispositivo confeccionado em fio de aço espiralado em poucas voltas e com diâmetro suficiente para aprisionar a cápsula ou comprimido sem deformá-los ou reduzir a área de contato com o meio (ANVISA, 2010).

FIGURA 9. Aparelho de dissolução

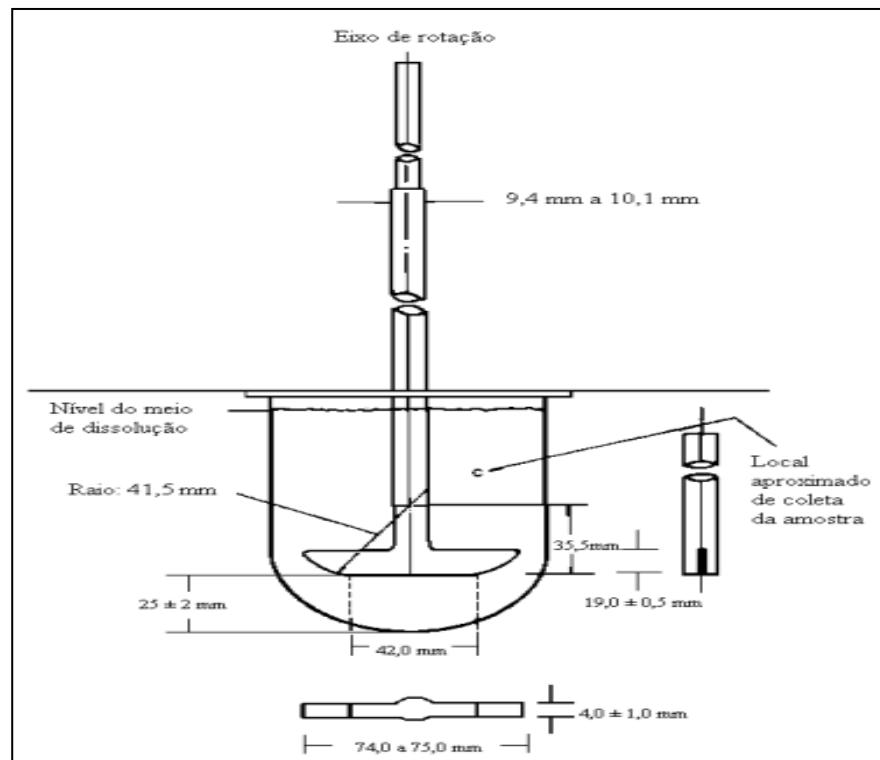


FIGURA 10. Ilustração do aparato 1 (cesto)



Adaptado de Anvisa (2010)

FIGURA 11. Ilustração do aparato 2 (pá)



Adaptado de Anvisa (2010)

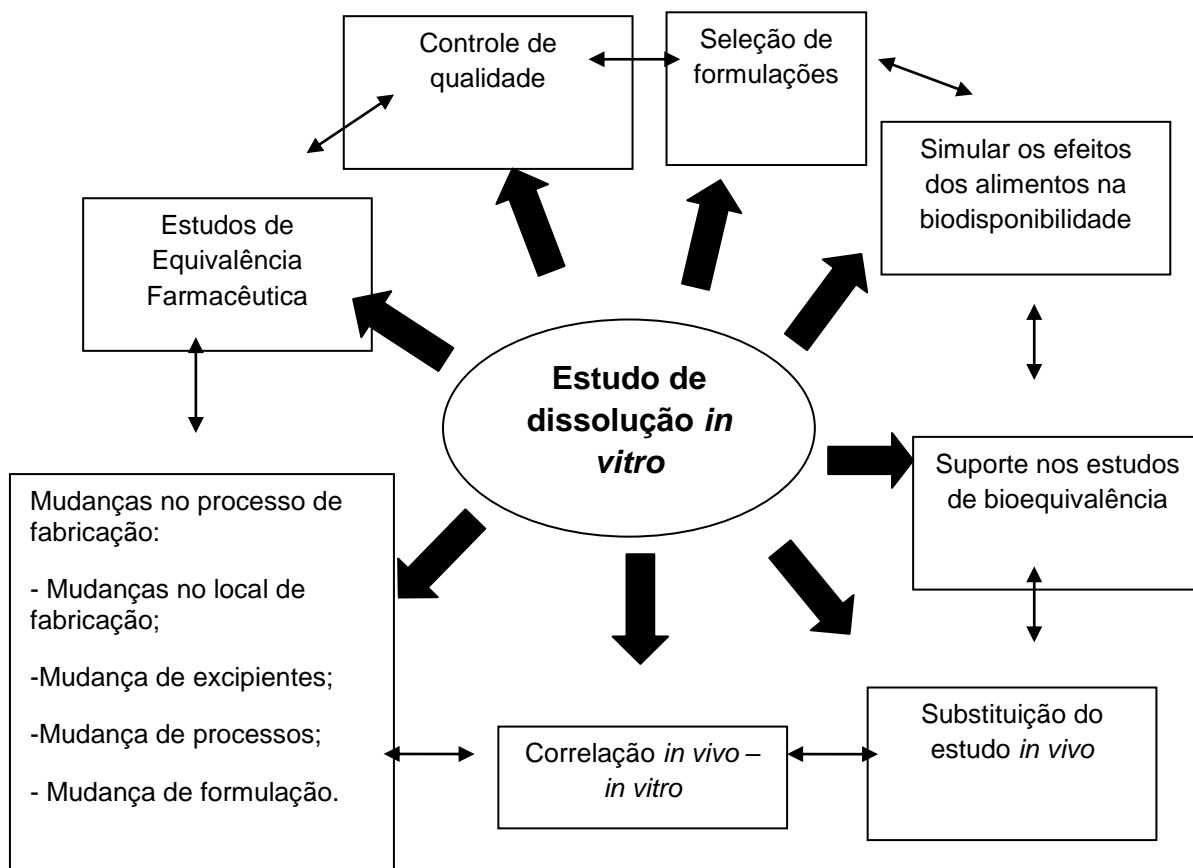
O teste de dissolução é uma excelente ferramenta para avaliar a qualidade lote a lote de formas farmacêuticas sólidas. Com este teste é possível detectar alterações entre formulações que poderiam comprometer o desempenho do medicamento. Desta forma, a dissolução *in vitro* é um ensaio capaz de indicar potenciais problemas de biodisponibilidade de uma determinada formulação (BRASIL, 2004).

Os ensaios de dissolução de formas farmacêuticas têm sido cada vez mais utilizados para realizar o controle de qualidade de medicamentos através do comparativo entre lotes diferentes. Este teste ainda proporciona suporte durante o desenvolvimento de novas formulações (FDA, 1997).

As metodologias de dissolução presentes nas monografias das farmacopeias geralmente estabelecem um único ponto de coleta para avaliar a quantidade de fármaco dissolvido. No entanto, para uma possível correlação *in vivo* - *in vitro* e para a detecção de pequenas alterações na formulação é necessário que, durante o ensaio de dissolução, várias coletas do meio de dissolução sejam feitas. Este estudo com coletas em múltiplos pontos caracteriza o perfil de dissolução (FDA, 1997).

Para uma análise mais detalhada do desempenho de um produto farmacêutico sólido o ensaio mais indicado é o perfil de dissolução. Este é mais conclusivo que é um teste do que uma simples dissolução, pois permite avaliar a liberação do princípio ativo em determinados tempos de coletas (ADAMS *et. al*, 2001)

O perfil de dissolução é uma importante ferramenta para o desenvolvimento e aprovação de medicamentos genéricos e similares, para o desenvolvimento farmacotécnico, para otimizar formulações, para avaliar a estabilidade de formas farmacêuticas sólidas, para isentar estudos de bioequivalência de menores dosagens, para conhecer o comportamento do medicamento antes de submetê-lo a estudo de biodisponibilidade relativa/bioequivalência, para comparar o medicamento referência/comparador com medicamento teste e para alterações pós-registro (ANVISA, 2010; ANAND *et. al*, 2011). A Figura 12 mostra as aplicações do estudo de dissolução na área farmacêutica.

FIGURA 12. Aplicações do estudo de perfil de dissolução *in vitro*

Adaptado de Jamzad, Fassihi, 2006

Na comparação de perfis de dissolução de medicamentos deve-se avaliar a curva de dissolução como um todo. Os métodos propostos para comparação de perfis de dissolução podem ser classificados em: métodos baseados na análise de variância; métodos dependentes do modelo e métodos independentes do modelo (VIEIRA, REDIGUIERI, C. F., REDIGUIERI, C.F, 2013; YUKSEL, KANIK, BAYKARA, 2000).

O modelo estatístico baseado na análise de variância não usa procedimentos de ajustes de curvas. Este modelo pode ser dividido em análise de variância única (ANOVA) e análise de variância multivariada (MANOVA). Estes métodos são geralmente utilizados para comparar as médias de dois conjuntos de dados de liberação de fármacos durante um teste de dissolução. Os métodos ANOVA e MANOVA podem evidenciar variações entre formulações que não apresentam impacto no desempenho *in vivo* do medicamento (VIEIRA, REDIGUIERI, C. F., REDIGUIERI, C. F., 2013; BRASIL, 2010; YUKSEL, KANIK, BAYKARA, 2000).

Os métodos dependentes do modelo são baseados em diferentes funções matemáticas que avaliam os perfis de dissolução dependendo dos parâmetros derivados de cada modelo. Neste caso, incluí-se apenas os dados que representam a dinâmica do processo de dissolução. A limitação deste modelo é que um tempo final de amostragem específico é usado para todos os perfis da mesma formulação. Os métodos dependentes do modelo são mais complicados e devem ser usados com cautela, uma vez que há possibilidade de violação de avaliações estatísticas. A principal desvantagem deste modelo é sua incapacidade de prever valores com exatidão suficiente. Os principais métodos dependentes do modelo são os de Ordem Zero, Primeira Ordem, Hixson-Crowell, Epóxi, Quadrático, Weibull, Gompertz e Logística (VIEIRA, REDIGUIERI, C. F., REDIGUIERI, C. F, 2013; YUKSEL, KANIK, BAYKARA, 2000).

Os métodos independentes do modelo são descritos como testes de razão ou par de matrizes. Este método usa a razão entre parâmetros obtidos na quantidade de fármaco liberado do medicamento referência e na quantidade liberada no medicamento teste ao mesmo tempo. O teste de razão é útil na determinação de critérios de aprovação do ensaio de dissolução. A porcentagem dissolvida do fármaco geralmente é o método de escolha por ser o mais simples e permitir o estabelecimento de critérios de aprovação em qualquer tempo. Já o teste do par de matrizes envolve um fator de diferença (F_1), um fator de semelhança (F_2), o índice de Rescigno e fator de similaridade. O fator de diferença avalia a porcentagem de erro entre as curvas de dissolução do medicamento referência e o medicamento teste considerando todos os tempos de coleta. A porcentagem de erro é 0 quando os perfis de dissolução são idênticos e aumenta proporcionalmente com o aumento da diferença entre os dois perfis. O fator de semelhança é uma transformação logarítmica do erro da soma quadrática das diferenças entre o medicamento teste e o referência considerando todos os tempos. O valor de 100 é quando os perfis de dissolução do medicamento teste e referência são idênticos e tende a 0 quando há aumento da diferenças entre os perfis. O fator de semelhança é uma função das médias de cada período de coleta. Por isso, para permitir o uso das médias durante a comparação, o desvio-padrão relativo (coeficiente de variação) deve ser menor que 20% nos primeiros pontos e de 10% nos outros pontos. A RDC Nº 31/2010 considera como primeiros pontos aqueles que correspondem a 40% do total dos

pontos coletados. O índice de Rescigno geralmente é usado em estudos de bioequivalência para comparar perfis de concentração do fármaco no plasma versus tempo. Já o fator de similaridade é uma extensão do método modelo independente e utiliza a relação das áreas sob a curva de dissolução dos medicamentos referência e teste para avaliar a eficiência da dissolução (VIEIRA, REDIGUIERI, C. F., REDIGUIERI, C.F, 2013; BRASIL, 2010).

A ANVISA preconiza na RDC Nº 31/2010 que a comparação entre perfis de dissolução devem ser avaliados pelo método modelo independente simples, utilizando apenas o fator de semelhança (F2). A utilização de outros modelos estatísticos de comparação devem ser devidamente justificados (BRASIL, 2010). O fator de semelhança é expresso matematicamente pela seguinte equação 2.2:

$$F2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n (Rt - Tt)^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right\} \quad (2.2)$$

Em que:

F2: fator de semelhança;

n: número de tempos de coleta considerados para fins de cálculo de F2;

Rt = valor de porcentagem dissolvida no tempo t, obtido com o Medicamento de referência ou comparador;

Tt = valor de porcentagem dissolvida do Medicamento Teste ou da formulação alterada, no tempo t.

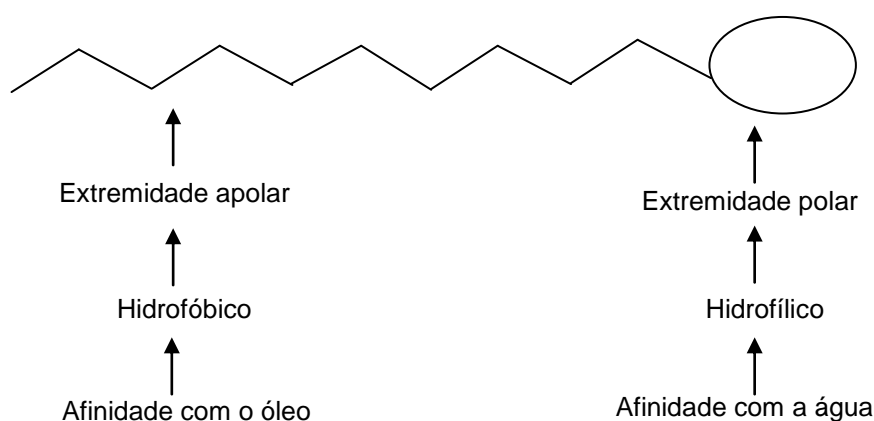
Para que dois perfis de dissolução sejam semelhantes os medicamentos em teste devem possuir dissoluções correspondentes, o fator de semelhança calculado deve estar compreendido entre 50 e 100, os tempos de coletas devem ser os mesmos para as duas formulações, os tempos de coletas devem ser no mínimo 5 e eles devem ser representativos do processo de dissolução (ANVISA, 2010).

2.9 TENSOATIVOS OU SURFACTANTES

Uma das dificuldades encontradas durante a execução do teste de dissolução relaciona-se à solubilidade do fármaco. Por este motivo alguns métodos têm sido desenvolvidos para contornar este problema. As modificações físicas geralmente realizadas objetivam o aumento da área superficial do fármaco com a redução do tamanho das partículas. Neste caso, aumenta-se a molhabilidade e solubilidade do pó. Outra alternativa é a geração de estados amorfos para contornar o problema de solubilidade. (HANCOCK, ZOGRAFI, 1997; GRAU, KAYSER, MÜLLER, 2000). Outro meio de melhorar a solubilidade do fármaco nos testes de solubilidade e de dissolução é a utilização de surfactantes ou tensoativos. Os surfactantes são substâncias também presentes nos fluidos gastrintestinais, tais como: sais biliares, lecitina, colesterol. (AMIDON *et. al*, 1995).

O tensoativo ou surfactante é um tipo de molécula que apresenta uma parte com característica apolar (lipofílica) ligada a outra parte com característica polar (hidrofílica). Este tipo de molécula que é apolar e polar ao mesmo tempo é denominada de anfifílica. A presença destas duas regiões distintas em uma mesma molécula possibilita adsorção em interfaces ar-água, óleo-água e sólido-água. A substância tensoativa pode ser denominada também de surfactante (ROSSI *et al*, 2006; DALTIM, 2012). A Figura 13 representa uma representação esquemática de um tensoativo.

FIGURA 13. Representação esquemática de um tensoativo



Adaptado de Rossi *et. al* (2006)

As substâncias tensoativas em presença de água e óleo adsorvem-se nas interfaces. Elas orientam-se de modo que o grupo polar fique voltado para a fase aquosa e o grupo apolar orientado para a fase oleosa. Isto gera um filme molecular ordenado nas interfaces o que acaba diminuindo a tensão interfacial e superficial. Geralmente a parte apolar (grupo lipofílico) de um tensoativo tem origem em uma cadeia carbônica (ramificada, linear, com partes cíclicas, contendo ou não grupos aromáticos) enquanto que a parte polar é formada por átomos que apresentam concentração de carga, com formação de um polo negativo ou positivo. A grande afinidade desta parte da molécula pela água dá-se em virtude da atração eletrostática entre as cargas (negativas ou positivas) da parte polar do tensoativo pelas moléculas de água vizinhas, já que estas apresentam cargas negativas e positivas dentro da mesma molécula. Este fato é responsável pela solubilidade da molécula do tensoativo em água (ROSSI *et. al*, 2006; DALTIM, 2012).

As moléculas de tensoativos apresentam-se dispersas em soluções diluídas enquanto que em soluções concentradas elas organizam-se em agregados moleculares denominados micelas. Estas contem geralmente de 50 a 200 moléculas de tensoativos, são termodinamicamente estáveis e facilmente reproduzíveis. A diminuição da área de contato entre as cadeias de hidrocarbônicas e a água é a principal razão que leva os monômeros de surfactante a se organizarem em micelas. Este processo é denominado de micelização. A concentração em que se inicia o processo de micelização é denominada de concentração micelar crítica (cmc). Esta propriedade é intrínseca de cada surfactante a uma dada temperatura e concentração eletrolítica. A micela é a configuração das moléculas de tensoativo com melhor estabilidade da solução, com as cadeias hidrofóbicas agrupadas e a parte hidrofílica voltada para o seio da água. O efeito dos tensoativos é mais pronunciado quando uma quantidade significativa de micelas encontra-se presente na solução (RIZZATTI, ZANETTE, 2009; ROSSI *et al*, 2006; DALTIM, 2012; SANTOS *et. al*, 2007).

O processo de micelização pode ser detectado pela variação brusca de determinadas propriedades físico-químicas da solução tais como espalhamento de luz, viscosidade, condutividade elétrica, tensão superficial, pressão osmótica e capacidade de solubilização de solutos. As técnicas usadas para a determinação da concentração micelar crítica de tensoativos são a tensiometria, a condutimetria e a

potenciometria. Diante do exposto, os tensoativos são uma classe de compostos versáteis e que podem ser utilizados como agentes de dispersão de fases, agentes umectantes e de molhabilidade, como emulsificantes, lubrificantes, agentes de catálise em aplicações químicas, nas indústrias farmacêuticas e têxteis, de limpeza, de cosméticos, na petroquímica (recuperação avançada de petróleo) e em outras aplicações (ROSSI *et al*, 2006 ; RIZZAMATTI, ZANETTE, 2009, SILVA, VOLPATO, 2002; SANTOS *et. al*, 2007; DALTIM, 2012; MANIASSO, 2001). Os tensoativos podem ser classificados em catiônicos, aniônicos, não-iônicos e anfotéricos (zwitteriônicos).

Os tensoativos aniônicos são aqueles que em meio aquoso originam íons carregados negativamente na superfície ativa. Os mais frequentemente usados possuem ácidos carboxílicos (graxos) monopróticos ou polipróticos com metais alcalinos ou alcalinos terrosos. Outros representantes dos tensoativos aniônicos são os alquil alcanoatos (sabões) que são derivados de gorduras animais por reações de saponificações. O dodecil sulfato de sódio (sds ou lauril sulfato de sódio), Bis(2-etilhexil) sulfosuccinato sódico (Aerosol OT), Dihexadecil fosfato (DHF) são outros representantes dessa classe (MANIASSO, 2001; DALTIM, 2012; SANTOS *et. al*, 2007). O lauril sulfato de sódio (LSS) é o tensoativo mais comumente utilizado em ensaios de dissolução.

Os tensoativos catiônicos são aqueles que em meio aquoso originam íons carregados positivamente na superfície ativa. Estes tensoativos possuem um elemento químico capaz de formar uma espécie química catiônica. Geralmente estes elementos são o nitrogênio, fósforo, enxofre, arsênio, telúrio, antimônio e bismuto. Os sais de quaternários de amônio e as aminas de cadeia longa são os principais representantes desta classe. O brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB), o brometo de dodeciltrimetil amônio (DTAB) e o cloreto de cetilpiridino (CICP) são representantes de tensoativos catiônicos. Geralmente os tensoativos catiônicos são menos solúveis em água do que os aniônicos. Os tensoativos catiônicos e aniônicos possuem cargas verdadeiras, que são formadas a partir da dissociação de um sal (MANIASSO, 2001; DALTIM, 2012; SANTOS *et. al*, 2007).

Os tensoativos não-iônicos são aqueles que não apresentam cargas verdadeiras, ou seja, há somente uma concentração de cargas em virtude das

ligações polares das moléculas. Estes tensoativos não são oriundos de sais dissociados. São geralmente derivados da reação entre um composto graxo com óxido eteno. O polioxietileno (9-10) p-tercetil fenol (Triton X-100), polioxietileno (23) dodecanol (brij 35), monooleato de sorbitan etoxilado 20 EO (Tween 80) são representantes dessa classe (MANIASSO, 2001; DALTIM, 2012; SANTOS *et. al*, 2007).

Os tensoativos anfotéricos (zwitteriônicos) são aqueles que se comportam como tensoativos catiônicos ou aniônicos dependendo do pH da solução em que se encontram. Assim, apresentam tanto carga positiva quanto carga negativa na mesma molécula. Eles comportam-se como aniônicos em meio alcalino e como catiônicos em meio ácido. Os tensoativos anfotéricos mais conhecidos são as cocoamidopropilbetáinas (MANIASSO, 2001; DALTIM, 2012; SANTOS *et. al*, 2007).

2.10 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO

A RDC 31 de 11 de agosto de 2010 prevê que na ausência de método analítico de dissolução descrito em compêndio oficial (farmacopeias), normas ou regulamentos específicos aprovados e referendados pela ANVISA é necessário o desenvolvimento e a validação de método de dissolução. Este método desenvolvido deve ser discriminativo, ou seja, ele deve ser capaz de evidenciar mudanças nas formulações e nos processos de fabricação de medicamentos (BRASIL, 2010).

Para o desenvolvimento de métodos de dissolução para estudos de equivalência farmacêutica e de perfil de dissolução comparativo é necessário em primeiro lugar determinar a solubilidade do fármaco. A ANVISA recomenda o *shake-flask* como método de escolha para a determinação da solubilidade em equilíbrio. Este método foi desenvolvido há mais de 40 anos e é considerado o mais confiável para a determinação da solubilidade. O *shaker* (incubadora com plataforma de agitação orbital com temperatura controlada - Figura 14) é o equipamento usado para a determinação da solubilidade em equilíbrio de fármacos (BRASIL, 2013; APLEY *et. al*, 2015).

FIGURA 14. Equipamento incubadora com plataforma de agitação orbital



No desenvolvimento de metodologia de dissolução a avaliação da solubilidade do fármaco é essencial e feita preliminarmente. A legislação vigente preconiza que a solubilidade da substância ativa deve ser determinada experimentalmente para cada fabricante em, no mínimo, 3 meios diferentes dentro da faixa de pH fisiológico (1,2 a 6,8), considerando a temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. A ANVISA, a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Agência Europeia de Avaliação de Medicamentos (EMA) consideram a faixa de 1,0 a 6,8 como sendo a faixa de pH fisiológico. Já o FDA considera a faixa de 1,0 a 7,5. Já a escolha dos meios deve levar em consideração a natureza química do fármaco, suas constantes de dissociação (pK_a 's), farmacocinética e a via de administração. Para a determinação experimental da solubilidade usando-se a técnica do *shake-flask* deve-se adicionar quantidades crescentes do fármaco ao meio selecionado para a obtenção de uma solução saturada que deve ser mantida em agitação constante (geralmente por 24 ou 48 horas) em velocidades e temperatura controladas até que o equilíbrio seja atingido. (BRASIL, 2010; BRASIL, 2013; APLEY *et. al*, 2015).

Durante a determinação da solubilidade pelo método *shake-flask* é necessário registrar o pH inicial e final da solução saturada do fármaco. Deve-se também verificar a estabilidade do fármaco nos pH's de escolha e nas condições do ensaio de solubilidade. Na avaliação da estabilidade usa-se método analítico validado, geralmente por cromatografia líquida de alta eficiência, que seja indicativo de estabilidade e que permita quantificar o fármaco solubilizado na presença de seus possíveis produtos de degradação. A filtração e a centrifugação são usadas para separar a solução saturada do excesso de fármaco adicionado e que não foi

solubilizado. Além disso, é indispensável avaliar os filtros de diferentes materiais e porosidades, pois estes podem ser potenciais fontes de erros na determinação da solubilidade. Para fármacos poucos solúveis, pode ser necessário usar tensoativo. Neste caso, devem-se usar quantidades crescentes e demonstrar que a concentração pretendida é a mais baixa possível. (FDA, 1997; EMEA, 2008; BRASIL, 2010; BRASIL, 2013; APLEY *et. al*, 2015).

Após a avaliação dos dados do teste de solubilidade do fármaco, segue-se para o desenvolvimento da metodologia de dissolução. Nesta etapa, a escolha do meio de dissolução é feita com base na formulação, no sistema de liberação do fármaco, na via de administração, na farmacocinética e nos dados de solubilidade do fármaco em diferentes meios e pH's. A rotação e o aparato usados no procedimento de coleta de amostras devem adequados à substância ativa e à forma farmacêutica em estudo. A demonstração de que a rotação é a mais adequada requer investigação, onde parte-se de rotações mais baixas até as mais altas (BRASIL, 2010; BRASIL, 2013; APLEY *et. al*, 2015).

2.12 ASPECTOS REGULATÓRIOS DE VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

A qualidade nas medições químicas está cada vez mais sendo exigida por órgãos regulatórios como a ANVISA e o Inmetro. Dados analíticos não confiáveis podem levar a prejuízos financeiros irreparáveis principalmente na área da saúde. Para garantir que uma metodologia analítica gere informações confiáveis, interpretáveis e com qualidade sobre a amostra ele deve passar por um processo de avaliação denominado validação de metodologia analítica. A ANVISA e o Inmetro disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE Nº 899, de 29/05/2003 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de fevereiro/2010. Estes dois órgãos exigem como requisito técnico fundamental no credenciamento de qualidade e de demonstração de competência técnica (CODEX, 1995; WHO, 1992).

Os laboratórios analíticos devem dispor de meios e critérios objetivos para demonstrar por meio da validação que os métodos de ensaio executados conduzem a resultados esperados e à qualidade pretendida. Os laboratórios analíticos devem validar métodos não normatizados, métodos criados e desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos normatizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos e ampliações e modificações de métodos normatizados (INMETRO, 2010).

Para que a condução do processo de validação alcance êxito é necessária a utilização de equipamentos e instrumentos dentro das especificações. Além disso, eles devem estar funcionando corretamente e devidamente calibrados. O pessoal responsável pela realização dos estudos de validação deve ser competente na área e possuir conhecimento suficiente sobre o trabalho, sendo capaz de tomar decisões apropriadas quando necessário (INMETRO, 2010).

O planejamento é uma etapa de grande importância para execução da validação. Para tanto os seguintes passos devem ser observados e executados: a aplicação, objetivo e o escopo do método; os parâmetros de validação e os critérios de aceitação; verificar se as características de desempenho do equipamento estão compatíveis com o exigido pelo método em estudo; qualificar padrões e reagentes; planejar, registrar e documentar os experimentos de validação, incluindo o tratamento estatístico. (INMETRO, 2010).

A validação de uma metodologia analítica na área farmacêutica é a demonstração de que ela é apropriada para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. A validação aplica-se a métodos cromatográficos, não-cromatográficos (espectrometria ou titulação) e a testes microbiológicos e imunobiológicos. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, adequados à análise. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) classifica os testes de validação em 4 categorias de acordo com sua finalidade (BRASIL, 2003). A tabela 3 mostra a classificação dos testes de validação segundo sua finalidade.

Tabela 3. Classificação dos testes segundo sua finalidade.

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

Adaptado de Brasil (2003)

Os testes que devem ser realizados durante a validação segundo sua finalidade (categoria) encontram-se descritos na tabela 4.

Tabela 4. Ensaio necessários para validação do método analítico, segundo sua finalidade.

Parâmetro	Categoria	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
	I	Quantitativo	Ensaio limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão/repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Precisão Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da precisão.

Adaptado de ANVISA, 2003.

Adaptado de Brasil (2003)

- Especificidade/Seletividade

A especificidade é a capacidade que o método tem de avaliar uma substância de interesse na presença de outros componentes como impurezas, produtos de degradação, componentes da matriz, excipientes, bem como outros compostos com propriedades semelhantes ao analito em exame. Em métodos cromatográficos, a seletividade garante que o pico de resposta seja atribuído exclusivamente ao composto de interesse. Caso a especificidade não seja assegurada parâmetros como linearidade, exatidão e precisão estão comprometidas (BRASIL, 2003; FDA, 2014; USP 38, 2015).

A especificidade é o primeiro passo que deve ser avaliado e assegurado durante o desenvolvimento e validação de método instrumental de separação. Para análise de teor e impurezas, a seletividade pode ser obtida através da comparação dos resultados obtidos de amostras contaminadas com impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas. Este procedimento tem o objetivo de demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais. Ainda, as comparações entre amostras contaminadas e não contaminadas devem incluir amostras armazenadas sob condições de estresse (por ex. luz, calor umidade, hidrólise ácida/básica, oxidação). Outra forma de avaliar a seletividade em métodos cromatográficos é por meio de detectores modernos (arranjos de diodos e espectrômetro de massas), no qual se procura demonstrar que o pico (sinal) é atribuído a somente um componente. Neste tipo de avaliação, os detectores comparam o pico obtido na separação com o de um padrão e utiliza isto como uma indicação da presença do composto puro (BRASIL, 2003; FDA, 2014; USP38, 2015; ICH, 1996; INMETRO, 2010).

- Linearidade

A linearidade é a capacidade que a metodologia analítica possui em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito de interesse na amostra dentro de um intervalo especificado. A relação entre a concentração ou massa da espécie de interesse e o sinal deve ser determinado empiricamente. A

relação matemática traduz-se, na maioria das vezes, em uma equação de reta chamada de curva analítica. Recomenda-se que a linearidade seja obtida pela análise de pelo menos 5 pontos que não incluam o ponto zero na curva, devido aos possíveis erros associados. Os resultados dos testes podem ser tratados estatisticamente usando o modelo matemático conhecido como regressão linear. A partir deste modelo é possível determinar-se o coeficiente de correlação (r), intersecção com o eixo Y (b), coeficiente angular (a), soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. Em qualquer técnica instrumental, a relação linear simples somente é válida em determinado intervalo de concentração (BRASIL, 2003; FDA, 2014; USP 38, 2015; ICH, 1996; INMETRO, 2010).

O coeficiente de correlação (r) avalia a qualidade da curva obtida. Quanto mais o coeficiente de correção estiver próximo de 1,0, menor é a dispersão do conjunto dos pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão obtidos. A ANVISA preconiza como critério mínimo aceitável o valor de 0,99 para o coeficiente de correlação. Quando não houver relação linear deve-se realizar transformação matemática adequada em que seja possível descrever uma função que modele a resposta analítica em relação à concentração do analito na amostra (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010).

A curva de calibração deve ser construída da mesma forma como será empregada na rotina. Deve-se verificar a ausência de valores discrepantes para cada nível de concentração, a homoscedasticidade (homogeneidade das variâncias dos resíduos) dos dados, a independência e a normalidade da distribuição dos resíduos utilizando testes estatísticos apropriados (BRASIL, 2011).

A homoscedasticidade pelo teste de Cochran pode ser avaliada pela relação entre o ponto de maior variância na curva de calibração e a soma das variâncias de todos os pontos. Esse valor é comparado ao encontrado na tabela de Cochran. De modo que $C_{calculado}$ (C_{cal}) seja menor que $C_{tabelado}$ (C_{tab}). Caso essa relação não seja atendida diz-se que a curva é heterocedástica. As equações 2.3 e 2.4 detalham o cálculo do C_{cal} (MONTGOMERY, 2004).

$$C_{\text{Calc}} = \frac{S^2}{\sum S^2} \quad (2.3)$$

$$C_{\text{Calc}} < C_{\text{tab}} \quad (2.4)$$

Em que

S^2 = variância do maior ponto na curva de calibração;

$\sum S^2$ = somatório das variâncias de todos os pontos;

O critério da reta de regressão é encontrar os coeficientes a e b, que minimizem a soma dos quadrados dos resíduos, procedimento denominado método dos quadrados mínimos (MONTGOMERY, 2004).

- Intervalo

A partir do estudo de linearidade é possível definir a faixa de intervalo em que a resposta é linear a concentração. A determinação da linearidade deve ser estabelecida em todo o alcance do método de análise. O intervalo especificado é a faixa de quantificação entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. A faixa do procedimento deve fornecer precisão, exatidão e linearidade aceitáveis. O ICH, a ANVISA e a Farmacopeia Americana (USP) recomendam que, para o estabelecimento da linearidade pelo menos cinco concentrações devem ser usadas. É também recomendado que as seguintes distâncias mínimas sejam respeitadas considerando a aplicação pretendida pelo método. Na tabela 5 é possível verificar os limites percentuais de analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos (BRASIL, 2003; FDA, 2014; USP 38, 2015; ICH, 1996; INMETRO, 2010).

Tabela 5. Limites percentuais recomendados para o intervalo de linearidade de acordo com a aplicação da metodologia.

Ensaio	Alcance
Determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas	De 80% a 120% da concentração teórica do teste
Determinação de impurezas	Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando apresentarem importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados, os limites de quantificação e detecção devem ser adequados às quantidades de impurezas a serem controladas.
Uniformidade de conteúdo	De 70% a 130% da concentração teórica do teste
Ensaio de dissolução	De $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para o intervalo. Caso a especificação para a dissolução envolva mais que um tempo, o alcance do método deve incluir 20% sobre o menor valor e +20% sobre o maior valor.

Adaptado de Brasil (2003)

- Precisão

A precisão representa o grau de concordância entre os resultados de um teste individual quando o procedimento analítico é aplicado repetidamente a múltiplas amostragens de uma amostra homogênea. Representa a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra sob condições definidas. A precisão é avaliada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (BRASIL, 2003; FDA, 2014; USP 38, 2015; ICH, 1996; INMETRO, 2010).

A repetibilidade representa a concordância entre resultados em um curto período de tempo com a mesma instrumentação, o mesmo analista, o mesmo método e mesmo local. A repetibilidade também é conhecida como precisão intra-corrída ou intra-ensaio. Esta pode ser determinada por no mínimo 9 determinações, ou seja, em 3 concentrações em triplicata: baixa, média e alta ou, ainda, por 6 determinações a 100% da concentração do teste. Ela é avaliada estatisticamente através da estimativa do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação

(CV). Não são admitidos valores superiores a 5% (BRASIL, 2003; FDA, 2014; USP 38, 2015; ICH, 1996; INMETRO, 2010).

A precisão intermediária representa a concordância entre resultados do mesmo laboratório em dias diferentes, com analistas diferentes e com equipamentos diferentes. O objetivo da precisão intermediária é demonstrar que dentro do mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados. A precisão intermediária também é conhecida como precisão inter-corridas. Ela pode ser expressa estatisticamente por meio da estimativa do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) (BRASIL, 2003; FDA, 2014; USP 38, 2015; ICH, 1996; INMETRO, 2010).

A reprodutibilidade ou ensaio inter-laboratórios representa a concordância entre resultados em laboratórios diferentes e deve ser considerada em estudos de colaboração entre laboratórios e nos casos de padronização de metodologia analítica em farmacopeias. Os dados do estudo de reprodutibilidade não precisam ser apresentados para concessão de registro de medicamento (BRASIL, 2003; FDA, 2014; USP 38, 2015; ICH, 1996; INMETRO, 2010).

- Exatidão

A exatidão de uma metodologia é a proximidade dos resultados obtidos em determinado ensaio em relação ao valor de referência aceito como verdadeiro. Os ensaios mais utilizados para a determinação da exatidão de um método são: materiais de referência certificados, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição do padrão. No ensaio de materiais de referência certificados aplica-se a metodologia analítica proposta para a análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência) e compara-se o resultado obtido com aqueles resultantes de um segundo método bem caracterizado, cuja exatidão tenha sido estabelecida previamente. O ensaio de comparação de métodos consiste na avaliação dos resultados obtidos empregando-se o método desenvolvido com os resultados obtidos através de um método de referência, no qual se avalia o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos 2 métodos. No ensaio de recuperação avalia-se a proporção da quantidade da substância de interesse presente ou

adicionada na porção analítica do material teste que é extraível e quantificável (BRASIL, 2003; FDA, 2014; USP 38, 2015; ICH, 1996; INMETRO, 2010).

- Limite de detecção

O limite de detecção é a menor quantidade do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. Analistas, quando desenvolvem métodos novos ou modificados para análise de traços, frequentemente definem o limite de detecção (LD) em termos do desvio-padrão de medidas do branco. Os valores do limite de detecção são extremamente baixos e podem ser determinados mediante a análise do sinal/ruído, do desvio-padrão da resposta e do coeficiente angular e por processos estatísticos. Em métodos instrumentais como cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa e absorção atômica, a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base. No caso de métodos não instrumentais como cromatografia de camada delgada, titulação e comparação de cor a determinação do limite de detecção pode ser feita visualmente. Neste último caso, o limite de detecção é o menor valor de concentração capaz de produzir o efeito esperado como, por exemplo, turvação e mudança de cor (BRASIL, 2003; FDA, 2014; USP 38, 2015; ICH, 1996; INMETRO, 2010).

- Limite de quantificação

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação geralmente é expresso em concentração do analito na amostra em porcentagem em peso/volume ou peso/peso ou então em parte por milhão (ppm). Ele é um parâmetro calculado principalmente para ensaios quantitativos de impurezas e produtos de degradação em fármacos. O limite de quantificação pode ser determinado por meio da relação

sinal/ruído, do desvio padrão e por processos estatísticos (BRASIL, 2003; FDA, 2014; USP 38, 2015; ICH, 1996; INMETRO, 2010).

- Robustez

A robustez da metodologia analítica refere-se a sua capacidade de resistir a pequenas e deliberadas variações nos parâmetros analíticos. O método é robusto quando ele não é afetado pelas pequenas modificações nos parâmetros analíticos. No entanto, quando o método demonstra susceptibilidade a variações, medidas de controle e precauções devem ser incluídas nos procedimentos analíticos. Em métodos cromatográficos a avaliação da robustez deve incluir a variações no pH da fase móvel, variação da composição da fase móvel, variação na temperatura da coluna cromatográfica e a utilização de diferentes lotes ou fabricantes de reagentes e colunas cromatográficas. Já em métodos espectrofotométricos deve-se considerar a variação na temperatura e variação no pH das soluções (BRASIL, 2003; FDA, 2014; USP 38, 2015; ICH, 1996; INMETRO, 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método analítico para avaliar a dissolução de comprimidos de NMS β -CD.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização da forma polimórfica da NMS por meio de análises DSC e DR-X;
- Avaliação da solubilidade de NMS usando método do *shake-flask*;
- Desenvolvimento de um método analítico para avaliação da dissolução de comprimidos de NMS β -CD;
- Validação do método de dissolução desenvolvido.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANÁLISE DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

Foram analisados pela técnica de DSC amostras de padrão primário de NMS da Farmacopeia Brasileira (lote: 2049), matéria prima de NMS, matéria-prima de β -CD e matéria prima de NMS β -CD usada na fabricação do medicamento NMS β -CD 400 mg comprimido. Todas estas amostras foram gentilmente cedidas pela empresa Brainfarma Indústria Química e Farmacêutica S/A. Elas foram analisadas em um

aparelho da marca Mettler Toledo modelo DSC 1 Star^e System localizado nas dependências da empresa supracitada. As condições analíticas foram adaptadas de Gouveia (2011) e as mesmas foram:

1. Intervalo de aquecimento na faixa entre 25 a 400° C;
2. Razão de aquecimento 10° C min⁻¹;
3. Atmosférica dinâmica de nitrogênio, na vazão de 100 mL min⁻¹ para o arraste dos gases formados;
4. Cápsula aberta de alumínio;
5. Massa das amostras usadas entre 2,0 e 3,5 mg.

4.2 ANÁLISE DE DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DR-X)

Analisou-se pela técnica de DRX amostras do fármaco NMS e amostras de matéria-prima de NMS β -CD. O equipamento usado na análise por difração de raios X foi o Miniflex 600 do fabricante Rigaku. O programa PDXL2 (Rigaku) foi utilizado para análise qualitativa e quantitativa de polimorfos associado ao banco de dados cristalográfico PDF- 4 Organics 2014.

As seguintes condições foram usadas:

2Θ (°): 2-50 (10°/min);

Tempo: 60s;

Radiação: Cu k1, com monocromador;

Detector: D/teX Ultra;

Scan mode: Contínuo.

As amostras e o difratômetro de raios X foram gentilmente cedidos pela empresa Brainfarma Indústria Química e Farmacêutica S/A.

4.3 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA DE DISSOLUÇÃO PARA ANÁLISE DO MEDICAMENTO NMS β -CD 400 MG COMPRIMIDO

Para a execução dos ensaios analíticos de solubilidade, desenvolvimento e validação do método de dissolução foram usados os seguintes reagentes e soluções:

- Ácido clorídrico PA (Mallinckodt[®])
- Água purificada (Milli Q[®])
- Fosfato de potássio monobásico (J.T. Baker[®])
- Acetato de sódio triidratado (J.T. Baker[®])
- Ácido acético glacial (J.T. Baker[®])
- Hidróxido de sódio (Macron[®])
- Acetonitrila (Merck[®])
- Lauril sulfato de sódio (J.T. Baker[®])
- Fosfato de amônio monobásico (Sigma[®])
- Solução de ácido clorídrico 0,1 N
- Solução tampão acetato 0,05 M pH 4,5
- Solução tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 6,8
- Água + LLS 0,5%
- Água + LLS 0,75%
- Água + LLS 1,0%

Já os equipamentos e materiais usados foram:

- Balança analítica (Ohaus[®] – Adventurer)
- Banho de ultrassom (Unique[®] - USC2880A)
- Centrífuga (Fanem[®] - Excelsa II)
- pHmetro (Metrohm[®] – 827)
- HPLC (Waters[®] – AcQuity) acoplado a detector Waters 2998 Photodiode Array Detector
- Incubadora com agitação (Nova Ética[®] - 430/RDBP)
- Espectrofotômetro (Agilent[®] -8453)

- Dissolutor (Hanson[®] - SR8Plus)
- PVDF 0,22 μm
- PVDF 0,45 μm

4.4.1 Estudo da solubilidade do fármaco NMS β -CD – Estudo preliminar

4.3.1.1 Estudo de filtro

Para a avaliação da interferência dos filtros na quantificação do ativo na matéria-prima, pesou-se 88,8 mg de NMS β -CD matéria prima (equivalente a 22,2 mg de NMS) para 7 balões volumétricos de 100,0 mL. Completou-se o volume de cada balão com os meios de dissolução água; ácido clorídrico 0,1 N; tampão acetato 0,05 M pH 4,5; tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 6,8; água mais LLS 0,5%, água mais LLS 0,75% e água mais LLS 1,0%. Após isso, cada um dos 7 balões foram levados ao ultrassom por 20 minutos e homogeneizados. Transferiu 5,0 mL de cada um dos 7 balões para outros 7 balões volumétricos de 100,0 mL e completou-se o volume de cada um com hidróxido de sódio 0,01M e homogeneizou-se (concentração final: 0,0444 mg/mL de NMS β -CD equivalente a 0,0111 mg/mL de NMS). Retirou-se uma alíquota de amostra de cada um dos 7 balões para centrifugar-se à 2000 rpm por 10 minutos (soluções de referência). Do restante de cada solução não centrifugada, filtrou-se uma parte em filtro PVDF 0,22 μm e outra parte em filtro PVDF 0,45 μm . Durante a filtração em cada tipo de filtro coletou-se uma amostra sem desprezar os primeiros mililitros e outra amostra após desprezar os primeiros 5 mL da solução. Este procedimento para determinar a interferência das membranas filtrantes na quantificação do ativo na matéria-prima foi realizado em triplicata.

Para a avaliação da interferência dos filtros na quantificação do ativo no produto acabado (medicamento), transferiu-se 1 peso médio de um pool de 20 comprimidos de NMS β -CD 400 mg comprimido para balão volumétrico de 900,0 mL,

completou-se o volume com o meio de dissolução água, levou-se ao ultrassom até a completa solubilização e homogeneizou-se. Transferiu-se 5,0 mL desta solução para balão volumétrico de 50,0 mL, completou-se o volume com hidróxido de sódio 0,01M e homogeneizou-se (concentração final: 0,0444 mg/mL de NMS β -CD equivalente a 0,0111 mg/mL de NMS). Retirou-se uma alíquota da amostra e a centrifugou a 2000 rpm por 10 minutos (solução de referência). Do restante da solução não centrifugada, filtrou-se uma parte da solução amostra no filtro PVDF 0,22 μ m e outra parte no filtro PVDF 0,45 μ m. Durante a filtração em cada tipo de filtro coletou-se uma amostra sem desprezar os primeiros mililitros e outra amostra após desprezar os primeiros 5 mL da solução. Além da água, este procedimento foi realizado para o meio de dissolução ácido clorídrico 0,1 N, para o meio tampão acetato 0,05 M pH 4,5, para o meio tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 6,8, para o meio água mais LLS 0,5%, para o meio água mais LLS 0,75% e para o meio para o meio água mais LLS 1,0%. Este preparo foi realizado em triplicata para cada meio de dissolução.

As amostras preparadas durante o teste de filtro foram avaliadas de acordo com os parâmetros espectrofotométricos adaptados de Gouveia (2011). Estes estão descritos na tabela 6.

Tabela 6. Parâmetros espectrofotométricos para quantificação da NMS β -CD

Parâmetro	Especificação
Comprimento de onda	390 nm
Concentração de trabalho	0,0444 mg/mL de NMS β -CD equivalente a 0,0111 mg/mL de NMS
Branco	Solução de hidróxido de sódio 0,01 M
Cubeta	Quartzo

A equação (4.1) foi utilizada para avaliação dos resultados obtidos durante o teste de filtro.

$$\% \text{ variação} = \frac{\text{Resp.amostra filtrada} - \text{Resp.amostra centrifugada}}{\text{Resp.amostra centrifugada}} \times 100 \quad (4.1)$$

4.3.1.2 Estudo de estabilidade

O estudo de estabilidade tem como finalidade avaliar a estabilidade da NMS β -CD nos mesmos diluentes utilizados no teste de filtro pelo período de 24 horas.

Para a condução do estudo de estabilidade adicionou-se 40 mg de NMS β -CD (equivalente a 10 mg de NMS) em 250 mL de cada meio dissolução utilizado no teste de filtro. Agitou-se cada sistema a 150 rpm durante 2 horas. Retirou-se uma alíquota de cada sistema, filtrou-se em membrana PVDF 0,45 μ m. Após isto, cada sistema foi deixado em agitação constante a 150 rpm em incubadora a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante por 24 horas (GOUVEIA, 2011). A cada 6 horas, retirou-se uma amostra, filtrou-se em membrana PVDF 0,45 μ m. Todas as amostras do estudo de estabilidade foram feitas em triplicata e submetidas às condições cromatográficas descritas na tabela 7.

Tabela 7. Condições cromatográficas para a quantificação da NMS β -CD em diferentes meios de dissolução durante o estudo de estabilidade do fármaco.

Parâmetro	Especificação
Comprimento de onda	230 nm
Concentração de trabalho	0,16 mg/mL de NMS beta-ciclodextrina
Coluna cromatográfica	LiChrospher RP C8 Select B; 125 x 4 mm; 5 μ m; 60 Å
Fase móvel	Solução pH 7 composta por fosfato de amônio 6,5 mM e acetonitrila na proporção 65:35
Fluxo de fase móvel	1,3 mL/min
Volume de injeção	10 μ L

Adaptado de Kovarikova, Mokry, Klimes (2003) e de Khaksa, Udupa (1999)

A equação (4.2) foi utilizada para calcular-se a estabilidade da NMS β -CD em cada meio de dissolução.

$$\% \text{ variação} = \frac{\text{Resposta no tempo (n)} - \text{Resposta no tempo (0)}}{\text{Resposta no tempo (0)}} \times 100 \quad (4.2)$$

4.3.1.3 Método de *shake flask*

Para o estudo de solubilidade do fármaco NMS β -CD utilizou-se o equipamento incubadora com plataforma de agitação orbital com temperatura controlada (*shaker*) e o método de *shake flask*. Para tanto, determinou-se a solubilidade da NMS β -CD em equilíbrio a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (temperatura do corpo humano) nos meios de dissolução usados no durante o teste de filtro. Estes meios encontram-se da faixa de pH fisiológico de 1,2 a 6,8 (GOUVEIA, 2011; BRASIL, 2013; DEZANI *et. al*, 2013).

Antes de iniciar o estudo de solubilidade aferiu-se o pH de cada meio. Após isso, adicionou-se separadamente 5 mg de NMS β -CD em cada frasco âmbar com tampa contendo 50 mL dos meios descritos na tabela abaixo e de capacidade de 120 mL. Após isso, levou-se o sistema anteriormente preparado à agitação constante de 150 rpm e à temperatura de 37°C . A temperatura foi devidamente monitorada para evitar grandes variações, pois normalmente temperaturas elevadas favorecem a dissolução e a solubilidade do fármaco. Deixou-se agitar por 1 hora e, em seguida, verificou-se visualmente o aspecto das soluções. Assim adotou-se o seguinte procedimento para cada frasco contendo o meio de dissolução. Se a solução, ao término de 1 hora, apresentar-se límpida e sem formação de precipitado considerava-se que a quantidade de fármaco adicionada encontrava-se totalmente dissolvida. Nesse caso, mais fármaco era adicionado. Repetiu-se este procedimento até que os 50 mL de cada meio fossem saturados. Isto foi indicado pela presença visual de excesso de ativo não dissolvido (precipitado). Após a formação de precipitado, cada solução saturada permaneceu em agitação de 150 rpm durante 24 horas e à temperatura constante de 37°C até que o equilíbrio entre as duas fases foi estabelecido (saturação). Ao término das 24 horas (término do estudo de solubilidade) aferiu-se novamente o pH de cada meio e comparou-se com o pH registrado no início do estudo. A determinação da solubilidade em cada meio deu-se em triplicata e calculou-se o desvio padrão relativo (GOUVEIA, 2011; BRASIL, 2013; DEZANI *et. al*, 2013).

Após o término das 24 horas, as amostras foram retiradas e passaram por um processo de centrifugação a 2000 rpm por 10,0 minutos e depois filtradas com

auxílio do filtro Millipore 0,45 μm . Do filtrado retirou-se uma alíquota de 1 mL de cada condição e diluiu-se com o respectivo meio conforme tabela 8. Foi necessário fazer ajustes na diluição da amostra para que a quantificação do ativo ficasse dentro do intervalo linear do método (BRASIL, 2013).

A concentração da NMS β -CD em cada meio foi determinada através de método analítico validado e indicativo de estabilidade que permitiu quantificar o fármaco dentro da faixa de linearidade e na presença de possíveis produtos de degradação. Foram utilizadas as condições que constam na tabela 7 para determinação da solubilidade da NMS β -CD nos meios propostos (GOUVEIA, 2011; BRASIL, 2013; DEZANI *et. al*, 2013).

Tabela 8. Diluição das amostras no estudo de solubilidade da NMS β -CD.

Meio de dissolução	Diluição
H ₂ O	50 mL
HCl 0,1 N	50 mL
Tampão acetato 0,05 M pH 4,5	50 mL
Tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 6,8	50 mL
Meio água + LLS 0,5%	250 mL
Meio água + LLS 0,75%	250 mL
Meio água + LLS 1,0%	250 mL

A partir dos dados obtidos calculou-se a solubilidade do fármaco em cada meio analisado conforme equação (4.3). O valor encontrado corresponde à solubilidade do fármaco na solução saturada do solvente testado a 37 °C.

$$\text{Solubilidade (mg/mL)} = \frac{\text{Resp.da amostra} \times [\text{Padrão}] \times \text{Vol. do balão}}{\text{Resp.do Padrão} \times \text{volume pipetado}} \quad (4.3)$$

4.3.1.4 Estudo da condição *sink*

A condição *sink* impede que a concentração no meio de dissolução aproxime-se da concentração de saturação, o que evita uma velocidade de dissolução lenta. Para o cálculo da condição *sink*, primeiramente, avaliou-se a solubilidade do fármaco NMS nos meios de dissolução descritos na tabela 8. A partir daí, calculou-se o valor da condição *sink* conforme a equação 4.4.

$$\text{Condição } \textit{sink} = \frac{\text{solubilidade (mg/mL)} \times \text{volume do meio}}{\text{Dosagem rotulada}} \quad (4.4)$$

4.3.2 Estudo de meio de dissolução

A realização do estudo de solubilidade não isenta a realização dos perfis de dissolução, uma vez que os excipientes da formulação podem alterar a solubilidade do ativo nos diferentes meios de dissolução. Assim durante o desenvolvimento da metodologia de dissolução para o medicamento NMS β -CD 400 mg realizou-se perfis de dissolução em todos os meios propostos, com diferentes rotações, com diferentes aparatos e com diferentes volumes de meio de dissolução para definir-se as condições ideais para que a metodologia seja discriminativa.

4.3.2.1 Estudo de meio de dissolução

No estudo de avaliação de meio de dissolução, realizou-se perfis de dissolução em todas condições descritas na tabela 9. Este estudo foi conduzido a temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. As condições para a quantificação da percentagem dissolvida em cada meio de dissolução estão descritas na tabela 6. A condição *infinity test* é realizada ao término do teste de dissolução e caracteriza-se por aumentar a rotação do dissolutor para 150 rpm durante 30 minutos.

Tabela 9. Parâmetros usados nos perfis de dissolução no teste de avaliação de meio dissolução.

Meio de dissolução	Volume do meio	Aparato	Rotação	Tempo de dissolução	Tempos de coleta	<i>Infinity test</i>
Água	900 mL	pá	50 rpm	60 min	05, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos	30 minutos a 150 rpm
HCl 0,1N	900 mL	pá	50 rpm	60 min	05, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos	30 minutos a 150 rpm
Tampão acetato 0,05 M pH 4,5	900 mL	pá	50 rpm	60 min	05, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos	30 minutos a 150 rpm
Tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 6,8	900 mL	pá	50 rpm	60 min	05, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos	30 minutos a 150 rpm
Meio água + LLS 0,5%	900 mL	Pá	50 rpm	60 min	05, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos	30 minutos a 150 rpm
Meio água + LLS 0,75%	900 mL	Pá	50 rpm	60 min	05, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos	30 minutos a 150 rpm
Meio água + LLS 1,0%	900 mL	Pá	50 rpm	60min	05, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos	30 minutos a 150 rpm

4.3.2.2 Avaliação de rotação

No estudo de avaliação de rotação, realizou-se perfis de dissolução nas condições descritas na tabela 10. Este estudo foi conduzido a temperatura de 37 °C \pm 0,5 °C. As condições para a quantificação da percentagem dissolvida em cada meio de dissolução estão descritas na tabela 6.

Tabela 10. Parâmetros usados nos perfis de dissolução no teste de avaliação de rotação.

Meio de dissolução	Volume do meio	Aparato	Rotação	Tempo de dissolução	Tempos de coleta	Infinity test
Meio água + LLS 1,0%	900 mL	Pá	75 rpm	60 min	05, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos	30 minutos a 150 rpm
Meio água + LLS 1,0%	900 mL	pá	100 rpm	60 min	05, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos	30 minutos a 150 rpm

4.3.2.3 Avaliação de aparato

No estudo de avaliação de aparato, realizou-se perfis de dissolução nas condições descritas na tabela 11. Este estudo foi conduzido a temperatura de 37 °C \pm 0,5 °C. As condições para a quantificação da percentagem dissolvida em cada meio de dissolução estão descritas na tabela 6.

Tabela 11. Parâmetros usados nos perfis de dissolução no teste de avaliação de aparato.

Meio de dissolução	Volume do meio	Aparato	Rotação	Tempo de dissolução	Tempos de coleta	Infinity test
Meio água + LLS 1,0%	900 mL	cesto	100 rpm	60 min	05, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos	30 minutos a 150 rpm

4.3.2.4 Avaliação de volume de meio de dissolução

No estudo de avaliação de aparato, realizou-se perfis de dissolução nas condições descritas na tabela 12. Este estudo foi conduzido a temperatura de 37 °C \pm 0,5 °C. As condições para a quantificação da percentagem dissolvida em cada meio de dissolução estão descritas na tabela 6.

Tabela 12. Parâmetros usados nos perfis de dissolução no teste de avaliação de aparato.

Meio de dissolução	Volume do meio	Aparato	Rotação	Tempo de dissolução	Tempos de coleta	<i>Infinity test</i>
Meio água + LLS 1,0%	500 mL	pá	100 rpm	60 min	05, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos	30 minutos a 150 rpm

4.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE DISSOLUÇÃO PARA ANÁLISE DO MEDICAMENTO NMS β -CD 400 MG COMPRIMIDO

Após definir as condições de dissolução no estudo de solubilidade do fármaco NMS e no estudo de meio de dissolução, a metodologia desenvolvida foi validada conforme os parâmetros estabelecidos pela resolução da ANVISA RE nº 899/2003 e capítulo 1225 da Farmacopéia Americana USP 38/2015.

Para validação da metodologia realizou-se os testes de validação conforme preconizado pela RE Nº 899/2003 da ANVISA. O método para determinação de dissolução é classificado na categoria III (testes de performance, por exemplo: dissolução, liberação do ativo). Esta categoria prevê que os parâmetros de especificidade, intervalo, linearidade, precisão, exatidão e robustez sejam avaliados para validar o método desenvolvido.

4.4.1 Preparo de soluções

4.4.1.1 Preparo do meio de dissolução

O meio de dissolução água + LLS 1% foi preparado adicionando-se 10 g de LLS para cada 1 litro de água ultrapura. Após isso, homogeneizou-se até completa solubilização.

4.4.1.2 Preparo da solução padrão NMS

Pesou-se 33,3 mg de NMS padrão, transferiu-se para balão volumétrico de 100,0 mL, adicionou-se hidróxido de sódio 0,01M até completar o volume, homogeneizou-se e levou-se ao ultrassom até completa solubilização.

Transferiu-se 2,0 mL desta solução para balão volumétrico de 50,0 mL, completou-se o volume com hidróxido de sódio 0,01M e homogeneizou-se. A concentração final do padrão de NMS foi de 0,0133 mg/mL de NMS (equivalente a 0,0532 mg/mL de NMS β -CD).

4.4.1.3 Preparo das soluções amostra do medicamento NMS β -CD 400 mg comprimido

Pesou-se 1 comprimido do medicamento NMS β -CD 400 mg (equivalente a 100 mg de NMS) comprimido e transferiu-se para 900 mL de solução aquosa de lauril de sódio 1% presente em uma cuba do dissolutor. Este procedimento foi realizado seis vezes. Gerou-se, então, seis amostras para o ensaio de dissolução da amostra.

Antes de iniciar o ensaio de dissolução da amostra anotou-se a temperatura individual de cada uma das seis cubas. Após decorrido 60 minutos de dissolução, coletou-se cerca de 10,0 mL de cada cuba, filtrou-se em papel de filtro para um béquer de 50 mL, pipetou-se volumetricamente 3,0 mL e transferiu-se para balão volumétrico de 25,0 mL e completou-se o volume com hidróxido de sódio 0,01M. A concentração final da amostra foi de 0,0133 mg/mL de NMS (equivalente a 0,0532 mg/mL de NMS β -CD).

4.4.1.4 Preparo da solução placebo do medicamento NMS β -CD 400 mg comprimido

Pesou-se 277,5 mg de placebo do medicamento NMS β -CD 400 mg comprimido e transferiu-se para 900 mL de solução aquosa de lauril de sódio 1,0% presente em uma cuba do dissolutor. Este procedimento foi realizado seis vezes. Gerou-se, então, seis amostras para o ensaio de dissolução do placebo.

Antes de iniciar o ensaio de dissolução do placebo anotou-se a temperatura individual de cada uma das seis cubas. Após decorrido 60 minutos de dissolução, coletou-se cerca de 10,0 mL de cada cuba, filtrou-se em papel de filtro para um béquer de 50 mL, pipetou-se volumetricamente 3,0 mL e transferiu-se para balão volumétrico de 25,0 mL e completou-se o volume com hidróxido de sódio 0,01M.

4.4.2 Condições da dissolução

As soluções preparadas nos itens 4.4.1.3 e 4.4.1.4 foram submetidas às seguintes condições de dissolução:

- Meio de dissolução: solução aquosa de LLS 1%
- Tempo de dissolução: 60 minutos a $37 \pm 0,5$ °C;
- Aparato: pá;

- Volume do meio de dissolução: 900,0 mL;
- Diluente: hidróxido de sódio 0,01 M;
- Rotação: 100 rpm.

4.4.3 Condições espectrofotométricas

As soluções preparadas nos itens 4.4.1.2, 4.4.1.3 e 4.4.1.4 foram submetidas às seguintes condições espectrofotométricas para quantificação:

- Comprimento de onda: 390 nm;
- Concentração de trabalho: 0,0133 mg/mL de NMS equivalente a 0,0532 mg/mL de NMS β -CD;
- Cubeta: quartzo;
- Branco: hidróxido de sódio 0,01 M

4.4.4 Parâmetros de validação do teste de dissolução

Para a validação da metodologia analítica do teste de dissolução foram avaliados os parâmetros de adequação do sistema espectrofotométrico, especificidade/seletividade, linearidade (faixa de trabalho), precisão, exatidão e robustez.

4.4.4.1 Adequação do Sistema

Preparou-se a solução padrão de NMS de acordo com o item 4.4.1.2. Realizou-se uma varredura na região do ultravioleta e do visível (200 a 900 nm).

Determinou-se o comprimento de onda em que a absorbância é máxima. A partir daí realizou-se 5 leituras consecutivas no espectrofotômetro e mediu-se a absorbância no comprimento de onda em que absorção é máxima. Calculou-se o desvio padrão relativo entre as leituras da solução padrão.

4.4.4.2 Especificidade / Seletividade

Para a determinação da especificidade/seletividade preparou-se as soluções analíticas de meio de dissolução, de padrão de NMS, de amostra do medicamento e de placebo do medicamento conforme os itens 4.4.1.1, 4.4.1.2, 4.4.1.3 e 4.4.1.4. Após a preparação destas soluções, realizou-se 3 leituras da solução padrão e 2 leituras das demais soluções nas condições descritas no item 4.2.3. Realizou-se, ainda, em paralelo uma varredura de cada uma das preparações na faixa de comprimento de onda de 200-900 nm para verificar a interferência de outros componentes (placebo e impurezas) com o princípio ativo. Após isto, determinou-se o teor das soluções analisadas através da quantificação do analito no comprimento de onda de 390 nm.

4.4.4.3 Linearidade / Faixa de Trabalho

Para a determinação da linearidade/faixa de trabalho do método de dissolução do medicamento NMS β -CD 400 mg comprimido, fez-se a, partir da solução padrão, uma curva de calibração em 7 diferentes níveis de concentrações. Estas concentrações foram 45%, 55%, 65%, 75%, 85%, 95% e 105%.

Para a construção da curva de calibração fez-se uma solução estoque de padrão de NMS na concentração de 0,1666 mg/mL. Para preparar esta solução pesou-se 33,33 mg de NMS padrão, transferiu-se para balão volumétrico de 200,0 mL, adicionou-se hidróxido de sódio 0,01 M até completar o volume, homogeneizou-

se e levou-se ao ultrassom até completa solubilização. A curva de calibração foi determinada diluindo-se a solução estoque conforme a tabela 13.

Tabela 13. Diluição da solução estoque para construção da curva de calibração

Nível (%)	Volume (mL)	Diluição (mL)	NMS (mg/mL)
45,0	1,08	30,0	0,0059994
55,0	1,32	30,0	0,0073326
65,0	1,56	30,0	0,0086658
75,0	1,80	30,0	0,009999
85,0	2,04	30,0	0,0113322
95,0	2,28	30,0	0,0126654
105,0	2,52	30,0	0,0139986

Após as diluições seriadas, as soluções obtidas foram submetidas às condições espectrofotométricas descritas no item 4.4.3. Realizou-se três leituras de cada solução e calculou-se a absorbância média de cada solução diluída. A partir dos dados obtidos calculou-se o coeficiente de correlação linear (r), o intercepto (a), a inclinação (b), a equação da reta e a soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear.

4.4.4.4 Precisão

A precisão da metodologia desenvolvida foi determinada em dois níveis: repetibilidade (intra-corridas) e precisão intermediária (inter-corridas).

A repetibilidade foi determinada após a preparação de 6 soluções amostra como descrito no item 4.4.1.3. Após a preparação realizou-se a leitura das soluções de acordo com as condições descritas no item 4.4.3. Calculou-se a média e o desvio padrão relativo entre as seis preparações.

A precisão intermediária foi determinada conforme o teste de repetibilidade, porém, o teste foi realizado em dias diferentes, com analistas diferentes e equipamentos diferentes.

4.4.4.5 Exatidão

Para a determinação da exatidão, preparou-se, sob as mesmas condições, soluções analíticas em triplicata da amostra nas concentrações teóricas de trabalho correspondentes a 80% (0,01066 mg/mL de NMS equivalente a 0,04264 mg/mL de NMS β -CD), 100% (0,01333 mg/mL de NMS equivalente a 0,05332 mg/mL de NMS β -CD) e 120% (0,015996 mg/mL de NMS equivalente a 0,063984 mg/mL de NMS β -CD). Preparou-se ainda uma solução padrão conforme descrito no item 4.4.1.2. Estas soluções foram submetidas às condições espectrofotométricas descritas no item 4.4.3, calculou-se a quantidade média recuperada (exatidão em %) em cada nível de concentração.

4.4.4.6 Robustez

A robustez da metodologia foi determinada após a preparação das soluções padrão (item 4.4.1.2) e amostra (item 4.4.1.3). Realizou-se 5 leituras consecutivas da solução padrão e 2 leituras da solução amostra variando-se os seguintes parâmetros analíticos:

- Comprimento de onda (390 nm, 396 nm e 400 nm);
- Marca do papel de filtro.

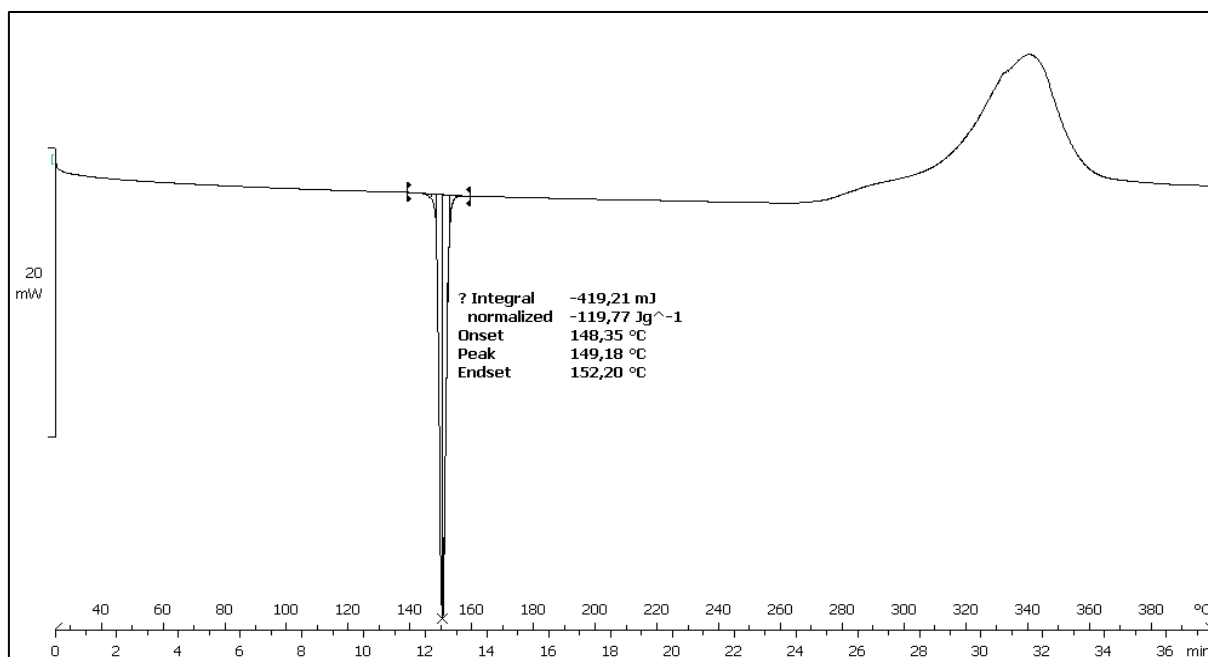
Determinou-se ainda a estabilidade das soluções analíticas preparadas. Para tanto, preparou-se as soluções padrão (item 4.4.1.2) e amostra (item 4.4.1.3) e realizou-se nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas 2 leituras consecutivas de cada solução.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

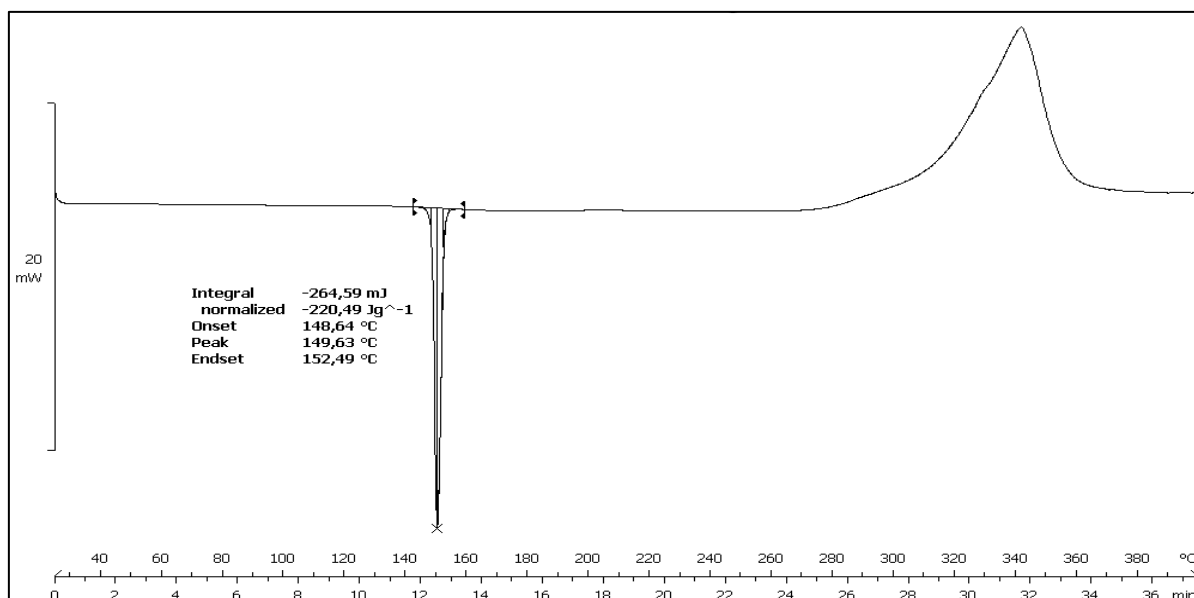
De acordo com Sanphui, Sarma, Nangia (2011) a NMS apresenta duas formas polimórficas. Por DSC, eles verificaram que a forma I caracteriza-se pela presença de apenas um evento endotérmico largo entre 144 e 147° C e a forma II caracteriza-se pela presença de dois eventos térmicos muito próximos, no qual o primeiro ocorre por volta de 140° C e o segundo por volta de 144° C. Assim, verifica-se que a presença de apenas um evento térmico é indicativo de que apenas uma forma polimórfica está presente na amostra. No presente trabalho, a análise do padrão de NMS da Farmacopeia Brasileira revelou que a forma polimórfica era a forma I, visto que o seu termograma apresentou apenas um evento endotérmico em 149,18° C referente ao processo de fusão do fármaco. A figura 15 mostra a análise de DSC do padrão de NMS da Farmacopeia Brasileira.

FIGURA 15. Termograma do padrão de NMS da Farmacopeia Brasileira



A análise da matéria prima de NMS mostrou que a forma polimórfica presente é a I, pois no termograma (figura 16) é possível observar a presença de apenas um evento térmico característico em 149,63° C referente à fusão do fármaco.

FIGURA 16. Termograma da amostra de matéria-prima de NMS



A análise da curva de DSC da matéria-prima NMS β -CD (figura 18) revelou que a forma cristalina I da NMS está presente na amostra, uma vez que foi possível verificar a presença de um único evento térmico em 148,88° C referente à fusão do fármaco NMS. O outro evento térmico iniciado em 63,61° C e terminado em 100,64° C refere-se à desidratação da β -CD. Resultados semelhantes foram obtidos por ASBAHR (2008) ao avaliar as interações da finasterida com CDs por DSC. Nesta avaliação a autora, verificou que o evento endotérmico entre 38 e 121°C referia-se à desidratação da CD. O evento térmico observado em torno de 300° C provavelmente referia-se à decomposição exotérmica da β -CD.

Gouveia (2011) verificou que as curvas de DSC das amostras de NMS apresentaram um endoterma caracterizado por um pico estreito entre 145°C e 153°C e com ápice em 148,7°C, devido à fusão do fármaco. Já a curva de DSC obtida por Skiba *et. al* (2013) demonstrou que o pico relativo à fusão da NMS ocorria em 152°C. Estes resultados são semelhantes aos observados nesse trabalho, uma vez que nas análises realizadas a faixa de fusão da NMS foi de 147°C a 152°C e com ápice em 149°C.

A análise da curva de DSC da matéria-prima β -CD (figura 14) apresentou o mesmo comportamento térmico da NMS- β CD sem o fármaco, ou seja, não foi possível observar o evento térmico referente à fusão da NMS. Nesta figura pode-se observar o evento térmico referente à desidratação da β -CD entre 63,64 °C e 100,64 °C e a decomposição exotérmica em torno de 300 °C.

Assim foi possível observar que não houve interação entre o fármaco e a β -CD, pois a curva de DSC resultante (fármaco + β -CD - figura 18) corresponde à soma das curvas de DSC dos componentes individuais: fármaco (figuras 15 e 16) + β -CD (figura 17). Caso houvesse interação entre a β -CD e a NMS, a curva de DSC da NMS β -CD obtida deveria ter apresentado um perfil térmico diferente da soma das curvas de DSC individuais da NMS e da β -CD. Assim, observou-se que a amostra analisada por DSC manteve o perfil cristalino do fármaco NMS e não houve a formação de um complexo de inclusão. Os dados obtidos de DSC sugerem que a amostra analisada é constituída apenas por uma mistura física de NMS com β -CD. Araújo (2011) obteve resultados semelhantes ao estudar a inclusão do fármaco nifedipino em CDs. Neste estudo, o autor verificou que quando ocorreu a formação de complexos de inclusão entre o fármaco e a CD houve o desaparecimento dos eventos térmicos que antecederam a decomposição da CD. Isto quer dizer que o comportamento térmico do complexo de inclusão foi distinto daquele observado para os componentes isolados.

FIGURA 17. Termograma da amostra de matéria-prima de β -CD na ausência da NMS

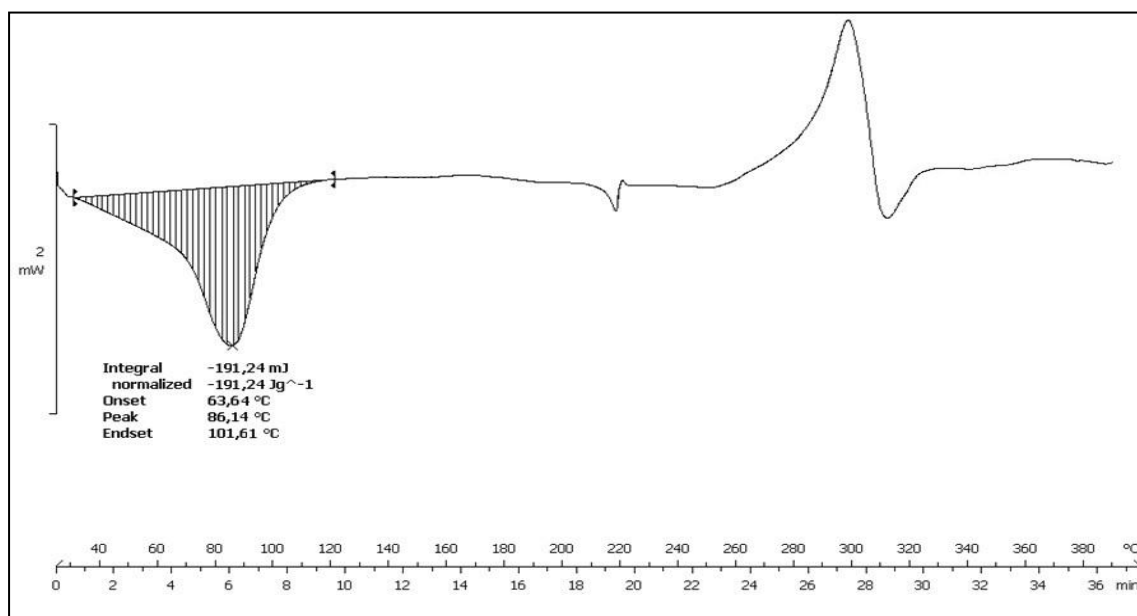
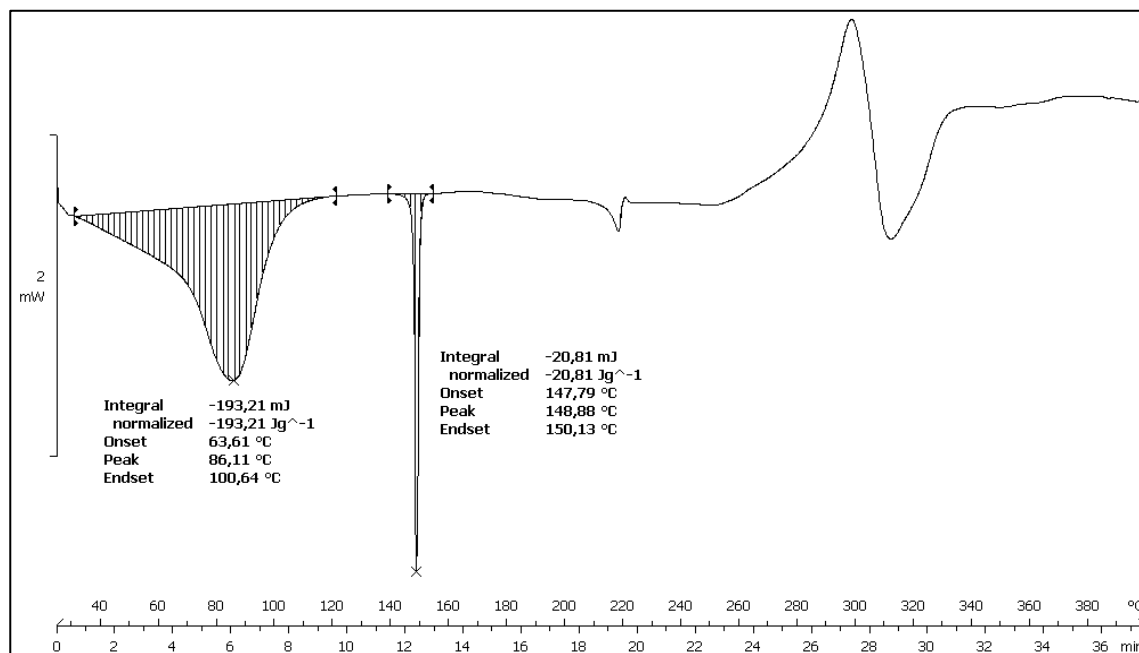


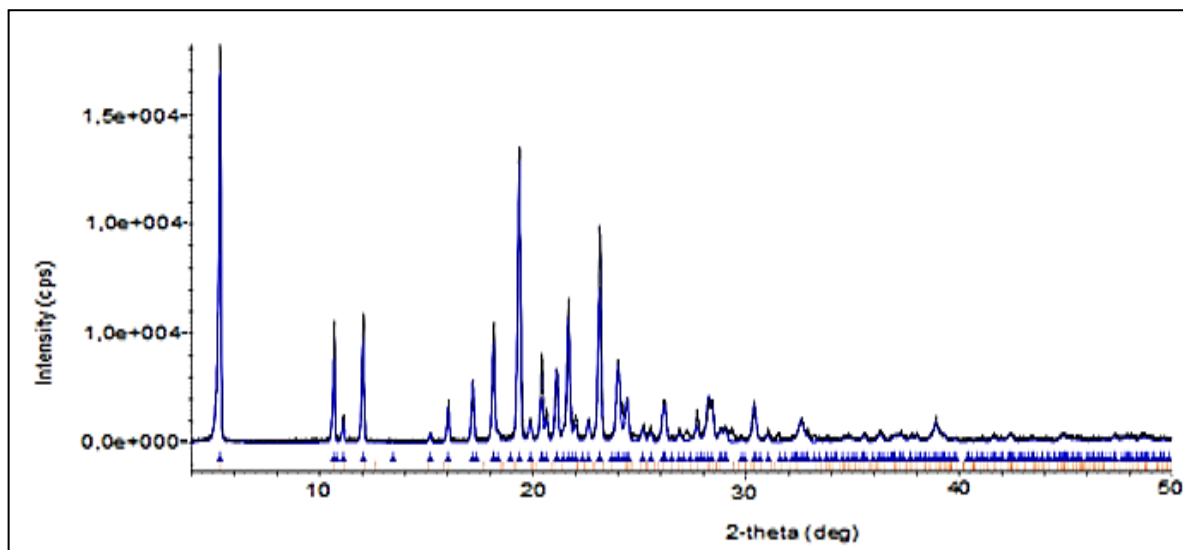
FIGURA 18. Termograma da amostra de matéria-prima de NMS β -CD

5.2 ANÁLISE DE DIFRATOMETRIA DE RX (DRX)

A análise de DRX é uma técnica que permite a investigação de complexos no estado sólido e as interações que se estabelecem entre a molécula hóspede e a CD.

O difratograma resultante da análise do fármaco puro de NMS presente na figura 19 correspondeu ao perfil de difração de raios X da forma polimórfica I encontrado no trabalho de Sanphui, Sarma, Nangia (2011). Neste estudo os autores verificaram que a NMS possui polimorfismo conformacional devido a grau de liberdade torsional em torno dos grupos sulfonamida, fenoxi e nitro. Este fenômeno leva a formação de duas formas polimórficas: a forma I (menos solúvel) e a forma II (forma metaestável e mais solúvel).

FIGURA 19. Difratoograma da amostra de matéria prima de NMS

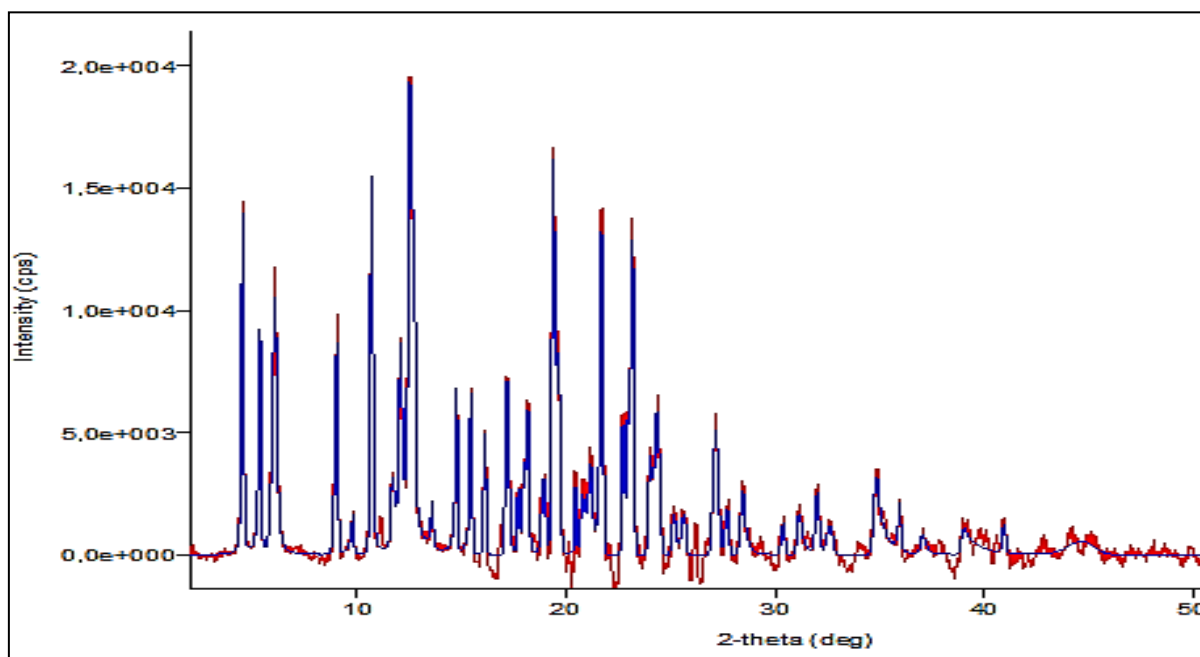


A partir dos dados obtidos na análise de DRX da amostra de matéria prima de NMS β -CD (figura 20) foi possível inferir que a amostra é apenas uma mistura física do fármaco NMS com β -CDs, pois não houve redução da cristalinidade ou a formação do estado amorfo. A NMS não se encontra formando complexos de inclusão com β -CDs. Isto foi confirmado pela avaliação do perfil de difração da amostra. Nesta avaliação foi possível observar a manutenção dos picos de difração que caracterizam o estado cristalino. A NMS apresenta picos característicos de difração de 2θ em $17,23^\circ$; $19,43^\circ$; $21,70^\circ$; $23,15^\circ$; $25,60^\circ$; $33,25^\circ$ e $33,09^\circ$. Esperava-se que caso a amostra fosse formada pela inclusão da NMS em β -CDs haveria uma redução dos picos de difração ou a haveria a formação de halos no difratograma e isto não foi observado. Auda (2014) ao estudar a inclusão de NMS com metil- β -CD verificou que o padrão de difração do complexo é distinto da sobreposição de cada componente individual se um complexo de inclusão verdadeiro é formado.

A análise por DRX da amostra de matéria prima de NMS β -CD indicou ainda que a amostra possui ordenamento estrutural cristalino, o que ficou evidenciado pelos picos característicos de difração presentes na figura 20. Nesta figura a linha vermelha indica o perfil de difração obtido e a linha azul o perfil de difração calculado para a amostra analisada. Giordano, Novak, Moyano (2001) verificaram em seu trabalho com inclusão de fármacos em β -CDs que quando ocorreu a inclusão do

ativo em β -CDs a estrutura resultante no estado sólido é diferente da de seus constituintes puros. Na maioria das vezes formam-se estruturas amorfas que se caracterizam pela ausência de picos característicos de difração. Neste caso, verifica-se a formação de um halo no difratograma (ARAÚJO, 2011).

FIGURA 20. Difratograma da amostra de matéria prima de NMS β -CD 400 mg



Araújo (2011) encontrou resultados semelhantes à caracterização da amostra de NMS β -CD ao investigar a estrutura do complexo de inclusão do nifedipino com β -CDs por DRX. Neste estudo, o autor observou que o surgimento ou o desaparecimento de picos nos difratogramas ou mudanças em suas intensidades relativas constituem a formação de complexos. Foi verificado ainda que tanto a β -CD quanto o fármaco apresentaram padrões individuais de difração característicos de ordenamento estrutural cristalino. No entanto, quando se formou um complexo de inclusão entre o nifedipino e a β -CD houve uma redução significativa de cristalinidade. Na simples mistura física entre o nifedipino e a β -CD houve a sobreposição dos difratogramas correspondentes aos das substâncias isoladas.

Alexandrino (2011) ao estudar e caracterizar o fármaco tiabendazol em β -CD obteve resultados semelhantes à caracterização da NMS β -CD realizada neste trabalho. Ele verificou que na formação do complexo fármaco- β -CD houve redução

do estado cristalino dos constituintes ou a formação do estado amorfo. Já a simples mistura física entre o tiabendazol e a β -CD correspondeu à sobreposição de cada componente individual.

Assim, os resultados obtidos por DRX confirmaram os resultados obtidos por DSC, ou seja, que a amostra de matéria prima de NMS β -CD é formada apenas pela mistura física do fármaco NMS com β -CDs. A matéria prima não é formada pela inclusão (complexação) da NMS com β -CD. Além disso, não foi possível determinar por DRX a forma polimórfica presente na amostra da mistura da NMS com β -CDs, pois a presença da β -CD interferiu na avaliação. Na Figura 20 é possível observar a presença de outros picos (interferentes) que não estão presentes no difratograma da NMS isolada (Figura 19). Esses picos provavelmente referem-se à β -CD.

A sobreposição dos picos da NMS com os picos cristalinos da β -CD (Figura 20) indica que houve interferência no padrão de difração da NMS. A DRX de policristais, só é uma técnica eficiente de caracterização da forma polimórfica do insumo farmacêutico ativo (IFA) quando na amostra analisada os excipientes ou demais constituintes são amorfos ou quando existe um alto conteúdo do IFA na composição do produto final (NEWMAN, BYRN; 2003). A β -CD é caracterizada por regiões altamente organizadas (cristalinas) o que permite que sejam obtidos picos de intensidade em ângulos 2θ característicos no difratograma. Dessa forma, a β -CD mascara e interfere no padrão de difração da NMS, o que não torna possível identificar a verdadeira forma polimórfica presente na amostra NMS + β -CD.

5.3 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA DE DISSOLUÇÃO

5.3.1 Estudo da solubilidade da NMS β -CD

Para realizar o desenvolvimento de uma metodologia analítica de dissolução que seja discriminativa é necessário avaliar as propriedades físicas e químicas do

fármaco que incluem sua solubilidade em diferentes meios de dissolução dentro da faixa de pH fisiológico e seu pKa. Através do pKa pode-se ter conhecimento da carga da substância em determinado pH. O grau de ionização de um fármaco está relacionado com a absorção, já que a solubilidade de um ácido ou base fraca pode mudar consideravelmente em função do pH. É imprescindível também que se avaliem a possível interferência dos filtros utilizados durante os processos de filtragem das amostras, a variação de pH durante a condução do estudo de solubilidade e a possível utilização de tensoativo. Este trabalho avaliou a solubilidade da NMS β -CD em água, em HCl 0,1 N, em tampão acetato 0,05 M pH 4,5, em tampão fosfato 0,05M pH 6,8 e em água contendo o tensoativo LLS a 0,5%, a 0,75% e a 1,0%.

Antes de iniciar a determinação da solubilidade da NMS β -CD foi necessário realizar o teste de estudo de filtro. Este teve como finalidade avaliar a adequabilidade das membranas filtrantes utilizados no teste de dissolução do medicamento NMS β -CD 400 mg comprimido, bem como avaliar a interferência dos excipientes na quantificação do ativo. Essa avaliação é imprescindível e deve ser um dos primeiros estudos a serem realizados na determinação da solubilidade de um fármaco. A utilização de membranas filtrantes inadequadas pode levar a resultados equivocados de solubilidade e comprometer o desenvolvimento do método de dissolução. Neste trabalho, o teste de filtro avaliou a interferência das membranas filtrantes de 0,22 μ m e 0,45 μ m na filtração das amostras provenientes de matéria-prima usada na fabricação do medicamento e na filtração de amostras do produto acabado. Avaliou-se ainda a interferência das membranas filtrantes descartando os primeiros 5 mililitros e sem desprezar nenhum volume inicial. Os resultados do teste de filtro encontram-se nas tabelas 14 e 15.

Tabela 14. Resultados do estudo de teste de filtro realizado na matéria-prima de NMS β -CD com as membranas de 0,22 μ m e 0,45 μ m.

Meios de dissolução	Especificação da variação	Resultados obtidos com o filtro 0,22 μ m		Resultados obtidos com o filtro 0,45 μ m	
		Sem desprezar	Após desprezar 5 mL	Sem desprezar	Após desprezar 5 mL
Água	$\pm 2,0\%$	-3.41%	-2.33%	-1.67%	-1.42%
HCl 0,1 N	$\pm 2,0\%$	-1.01%	0.66%	0.96%	0.93%
Tampão acetato 0,05 M pH 4,5	$\pm 2,0\%$	-0.52%	-0.47%	1.22%	1.01%
Tampão fostato 0,05 M pH 6,8	$\pm 2,0\%$	-1.46%	-0.89%	-0,28%	-0.09%
LSS 0,5%	$\pm 2,0\%$	-0.47%	0.65%	1.01%	0.77%
LSS 0,75%	$\pm 2,0\%$	-2.06%	-2.86%	-0.68%	-0.56%
LSS 1,0%	$\pm 2,0\%$	-0.54%	-0.85%	1.36%	1.28%

Legenda: HCl: ácido clorídrico; LSS: lauril sulfato de sódio

Tabela 15. Resultados do estudo de teste de filtro realizado no medicamento NMS β -CD 400 mg comprimido com as membranas de 0,22 μ m e 0,45 μ m.

Meios de dissolução	Especificação da variação	Resultados obtidos com o filtro 0,22 μ m		Resultados obtidos com o filtro 0,45 μ m	
		Sem desprezar	Após desprezar 5 mL	Sem desprezar	Após desprezar 5 mL
Água	$\pm 2,0\%$	-2.36%	-0.57%	-0.91%	-0.82%
HCl 0,1 N	$\pm 2,0\%$	-1.80%	-1.70%	1.86%	-0.05%
Tampão acetato 0,05 M pH 4,5	$\pm 2,0\%$	-3.29%	-1.83%	-1.29%	-0.94%
Tampão fostato 0,05 M pH 6,8	$\pm 2,0\%$	-4.36%	0.75%	-1.11%	-0.11%
LSS 0,5%	$\pm 2,0\%$	-2.98%	-0.72%	-0.06%	-1.84%
LSS 0,75%	$\pm 2,0\%$	-2.13%	-1.92%	-0.25%	-0.24%
LSS 1,0%	$\pm 2,0\%$	-3.84%	-1.77%	-1.11%	-1.18%

Legenda: HCl: ácido clorídrico; LSS: lauril sulfato de sódio

Definiu-se como referência a especificação de variação de $\pm 2\%$ em relação à solução centrifugada (solução referência). Assim, considerou-se que há interferência da membrana filtrante quando os valores estão fora deste parâmetro. Analisando-se os resultados obtidos que constam nas tabelas 13 e 14, verificou-se que a filtração em membrana 0,22 μm interfere na quantificação das soluções testes de matéria-prima e de produto acabado. A interferência da membrana 0,22 μm foi menor quando os primeiros 5 mililitros foram desprezados.

Já para o teste de filtração em membrana 0,45 μm observou-se que os resultados apresentaram-se dentro do especificado em todos os meios de dissolução propostos. A interferência da membrana 0,45 μm foi menor quando os primeiros 5 mililitros foram descartados.

Assim, com base nos resultados obtidos, a membrana 0,45 μm é a mais indicada para a filtração, pois apresentou resultados dentro da especificação para todas as soluções testadas e em todas as condições de filtração. A partir desse estudo, a membrana filtrante de 0,45 μm foi escolhida para ser usada para a filtração das amostras no teste de estabilidade NMS β -CD nos meios de dissolução, na determinação da solubilidade da NMS β -CD e no desenvolvimento e validação do método de dissolução.

Após a avaliação da interferência das membranas filtrantes, foi realizado o estudo de estabilidade do fármaco NMS β -CD nos meios de dissolução propostos para conduzir o desenvolvimento da metodologia de dissolução. Para tanto, utilizou-se método cromatográfico validado e indicativo de estabilidade que permitiu quantificar o fármaco solubilizado nos meios de dissolução na presença de seus possíveis produtos de degradação. As condições analíticas e cromatográficas indicativas de estabilidade foram adaptadas de Kovarikova, Mokry, Klimes (2003) e de Khaksa, Udupa (1999).

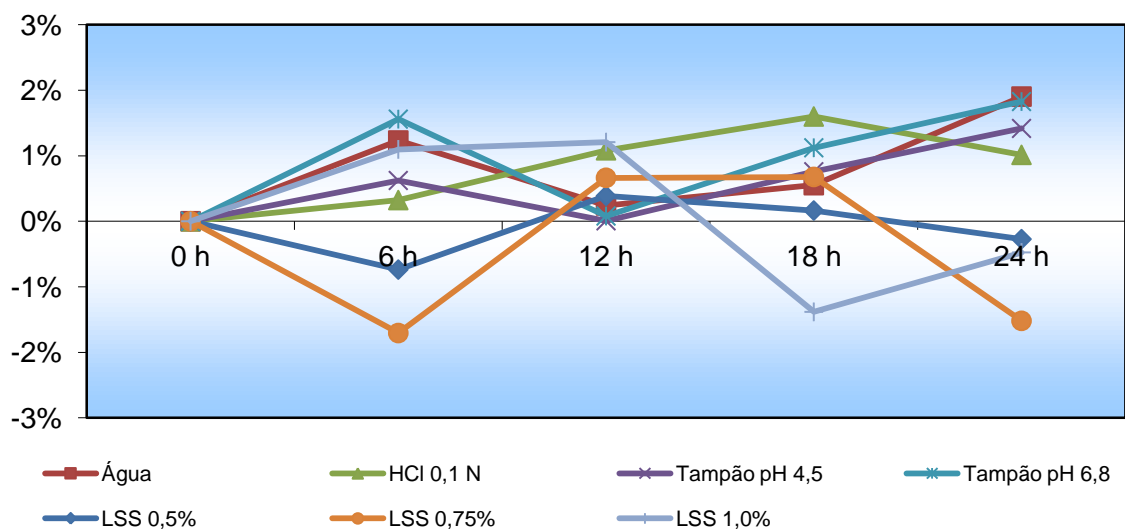
Em cada meio de dissolução, variações nas áreas do pico de NMS em até $\pm 2\%$ em relação à área no tempo de 0 hora foram consideradas não significativas. Já variações de área superiores a $\pm 2\%$ e o surgimento de picos secundários nos cromatogramas demonstram que o fármaco não possui estabilidade no meio de dissolução. Os resultados encontrados para o teste de estabilidade do fármaco NMS β -CD em cada meio de dissolução encontra-se descrito na tabela 16 e na Figura 21.

Tabela 16. Resultados de variação percentual de área observados nos cromatogramas obtidos durante estudo de estabilidade do fármaco NMS associado a β -CD nos meios de dissolução água; HCl 0,1 N; tampão acetato 0,05 M pH 4,5; tampão fosfato 0,05 M pH 6,8 e solução aquosa de lauril sulfato de sódio a 0,5%, a 0,75% e a 1,0% a 37° C durante 24 horas. Os valores apresentados correspondem a média de 3 determinações.

Meios de dissolução	Especificação da variação	0 h	6 h	12 h	18 h	24 h
Água	$\pm 2,0\%$	0,00%	1,23%	0,24%	0,55%	1,90%
HCl 0,1 N	$\pm 2,0\%$	0,00%	0,32%	1,08%	1,60%	1,01%
Tampão acetato 0,05 M pH 4,5	$\pm 2,0\%$	0,00%	0,62%	0,01%	0,76%	1,42%
Tampão fosfato 0,05 M pH 6,8	$\pm 2,0\%$	0,00%	1,56%	0,08%	1,12%	1,83%
LSS 0,5%	$\pm 2,0\%$	0,00%	-0,74%	0,39%	0,16%	-0,27%
LSS 0,75%	$\pm 2,0\%$	0,00%	-1,71%	0,66%	0,68%	-1,52%
LSS 1,0%	$\pm 2,0\%$	0,00%	1,10%	1,21%	-1,38%	-0,48%

Legenda: HCl: ácido clorídrico; LSS: lauril sulfato de sódio

FIGURA 21. Resultados de variação percentual de área observados durante estudo de estabilidade do fármaco NMS associado a β -CD nos meios de dissolução água; HCl 0,1 N; tampão acetato 0,05 M pH 4,5; tampão fosfato 0,05 M pH 6,8 e solução aquosa de lauril sulfato de sódio a 0,5%, a 0,75% e a 1,0% a 37° C durante 24 horas. Os valores apresentados correspondem a média de 3 determinações.



Legenda: HCl: ácido clorídrico; LSS: lauril sulfato de sódio

A partir dos dados presentes na tabela 16 e na Figura 21 observa-se que o fármaco NMS β -CD é estável durante 24 horas a 37° C em água; em HCl 0,1 N; em tampão acetato 0,05 M pH 4,5; em tampão fosfato 0,05 M pH 6,8 e em solução aquosa de lauril sulfato de sódio a 0,5%, a 0,75% e a 1,0% a 37° C. A estabilidade foi confirmada, pois em 6 horas, em 12 horas, em 18 horas e em 24 horas a variação de área é inferior a $\pm 2\%$ e não houve a formação de picos secundários que pudessem ser provenientes da degradação do fármaco conforme demonstram os cromatogramas da Figura 22, o teste de pureza de pico da Figura 23 e a varredura da Figura 24.

FIGURA 22. Cromatogramas extraídos no comprimento de onda 230 nm que representam a avaliação da estabilidade do fármaco NMS associado a β -CD nos meios de dissolução água; HCl 0,1 N; tampão acetato 0,05 M pH 4,5; tampão fosfato 0,05 M pH 6,8 e solução aquosa de lauril sulfato de sódio a 0,5%, a 0,75% e a 1,0% a 37°C ao término de 24 horas.

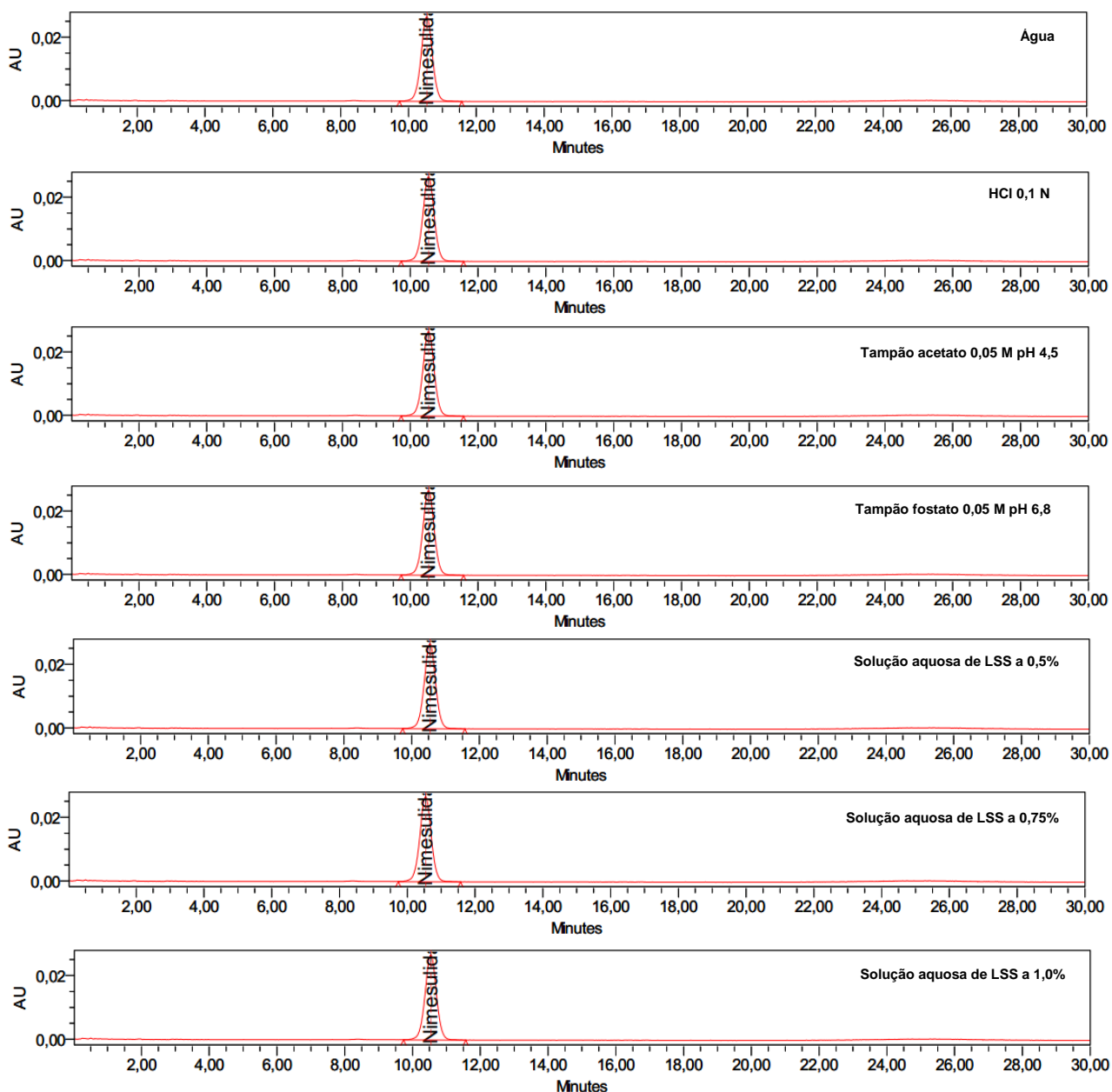


FIGURA 23. Teste de pureza de pico da solução amostra do fármaco do fármaco NMS associado a β -CD nos meios de dissolução água; HCl 0,1 N; tampão acetato 0,05 M pH 4,5; tampão fosfato 0,05 M pH 6,8 e solução aquosa de lauril sulfato de sódio a 0,5%, a 0,75% e a 1,0% a 37°C ao término de 24 horas obtido com detector de fotiodiodos.

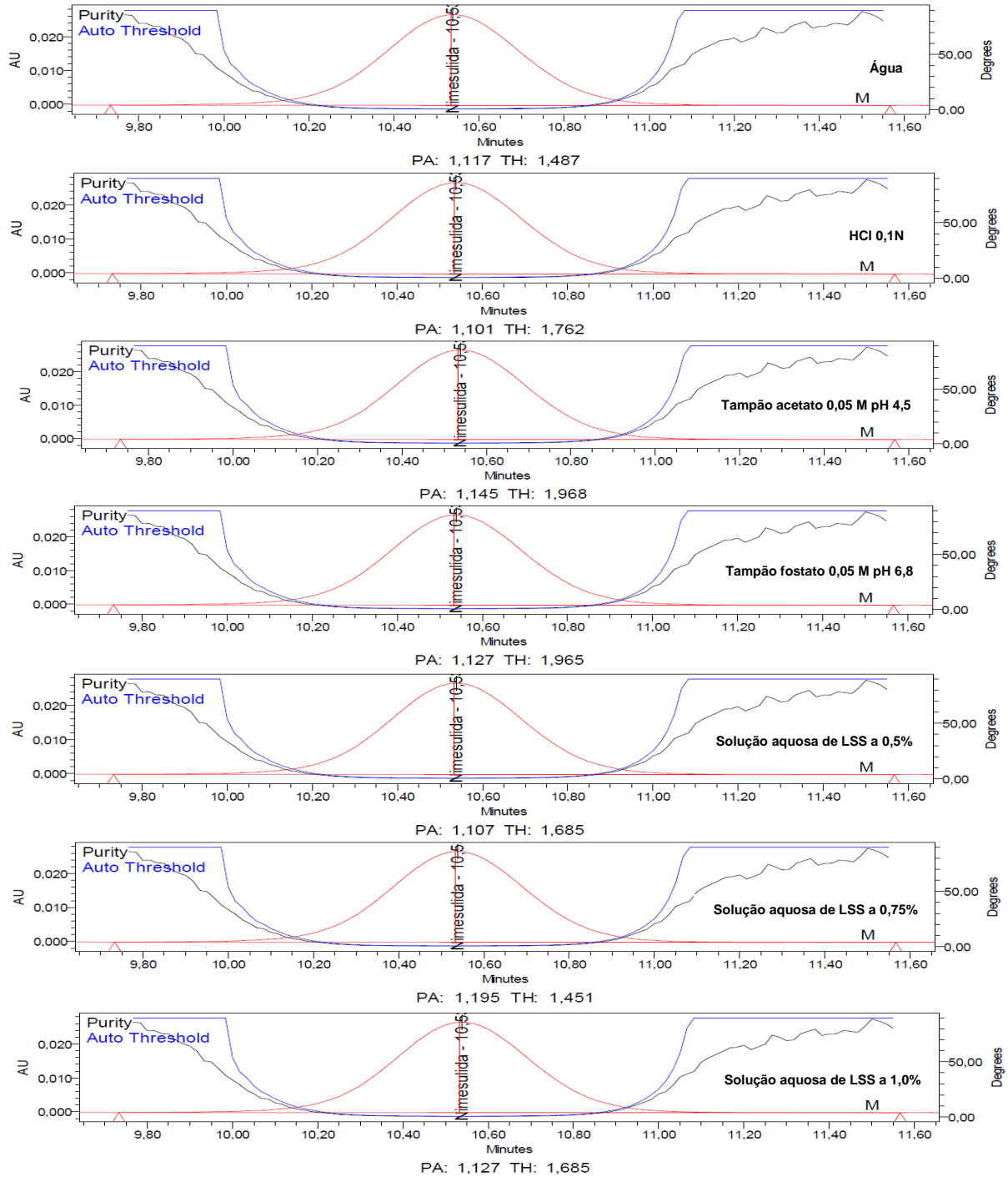
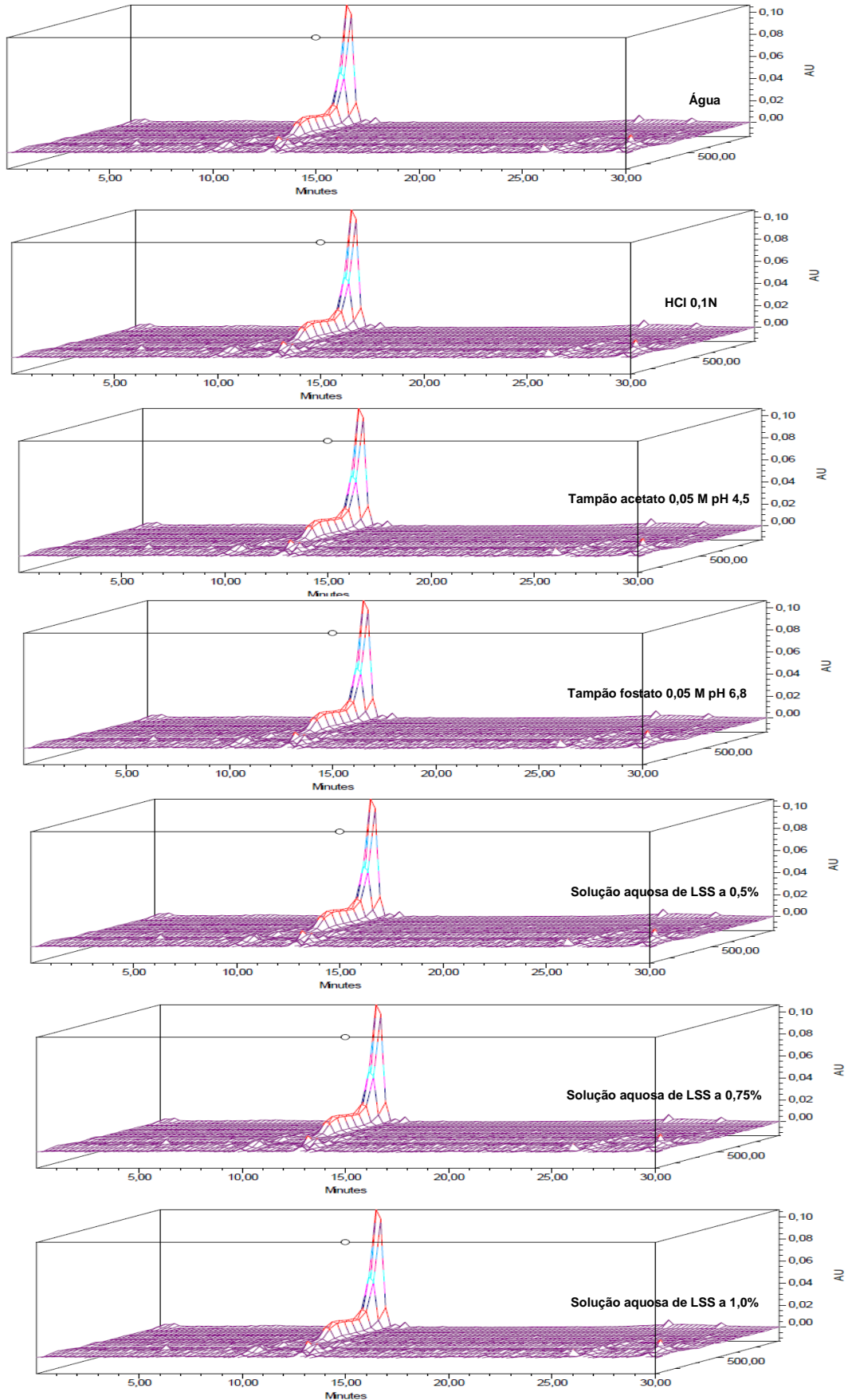


FIGURA 24. Varredura da solução amostra do fármaco do fármaco NMS associado a β -CD nos meios de dissolução água; HCl 0,1 N; tampão acetato 0,05 M pH 4,5; tampão fosfato 0,05 M pH 6,8 e solução aquosa de lauril sulfato de sódio a 0,5%, a 0,75% e a 1,0% a 37°C ao término de 24 horas obtido com detector de fotiododos.



A pureza do pico de NMS foi confirmada através da varredura com o detector de arranjo de fotodiodos (figura 23). Este com o auxílio do software Empower 2 é capaz de realizar a leitura da amostra em vários comprimentos de onda ao mesmo. Comprovou-se que o pico de NMS em todos os meios de dissolução avaliados apresentou-se espectralmente homogêneo, uma vez que o valor obtido pelo ângulo de pureza dos picos (PA) é inferior ao valor do ângulo limite (TH). O manual do equipamento esclarece que picos que não cumpram a relação $PA < TH$ exibem heterogeneidade espectral, isto é um sinal que indica a co-eluição de vários compostos em um mesmo pico cromatográfico (WATERS, 2002).

A estabilidade dos fármacos nos meios de dissolução é um item importante que deve ser observado durante o estudo de solubilidade. Isso foi demonstrado no trabalho de Dezani *et. al* (2013) em que a solubilidade dos fármacos anti-retrovirais lamivudina, estavudina e zidovudina foi avaliada usando a técnica do equilíbrio (*shake flask*) nos tampões pHs 1,2; 4,5; 6,8 e 7,5 e em água purificada. Nesse estudo realizou-se o teste de estabilidade dos fármacos nos tampões anteriormente citados. Para determinar a estabilidade dos fármacos lamivudina, estavudina e zidovudina as soluções foram analisadas por cromatografia em 12 horas, em 24 horas, em 36 horas e em 72 horas e os resultados obtidos foram comparados aos obtidos com soluções recém-preparadas. Eles concluíram que o tempo total de estabilidade dos fármacos foi de 72 horas a 37 °C e que foi impossível obter a solubilidade da estavudina em tampão pH 1,2, pois ao final do teste (após 72 horas a 37°C e a 150 rpm), o tampão com o fármaco apresentava mudança de cor e cheiro, o que sugere uma possível reação de degradação. Eles confirmaram a degradação por cromatografia.

Gouveia (2011) também avaliou a solubilidade da NMS em equilíbrio (*shake flask*) em água, em solução tampão HCl pH 1,2, em solução de tampão acetato pH 4,5, em soluções tampão fosfato pH 6,8 e 7,5. No entanto, ela não avaliou a solubilidade da NMS na presença de tensoativos e nem realizou os testes de filtro e de estabilidade do fármaco nos meios de dissolução.

Depois de avaliar a estabilidade do fármaco NMS β -CD nos meios de dissolução, determinou-se sua solubilidade pelo método clássico do *shake flask* usando a incubadora com plataforma de agitação orbital com temperatura controlada (37°C). A solubilidade foi determinada em meios de dissolução dentro da faixa de pH

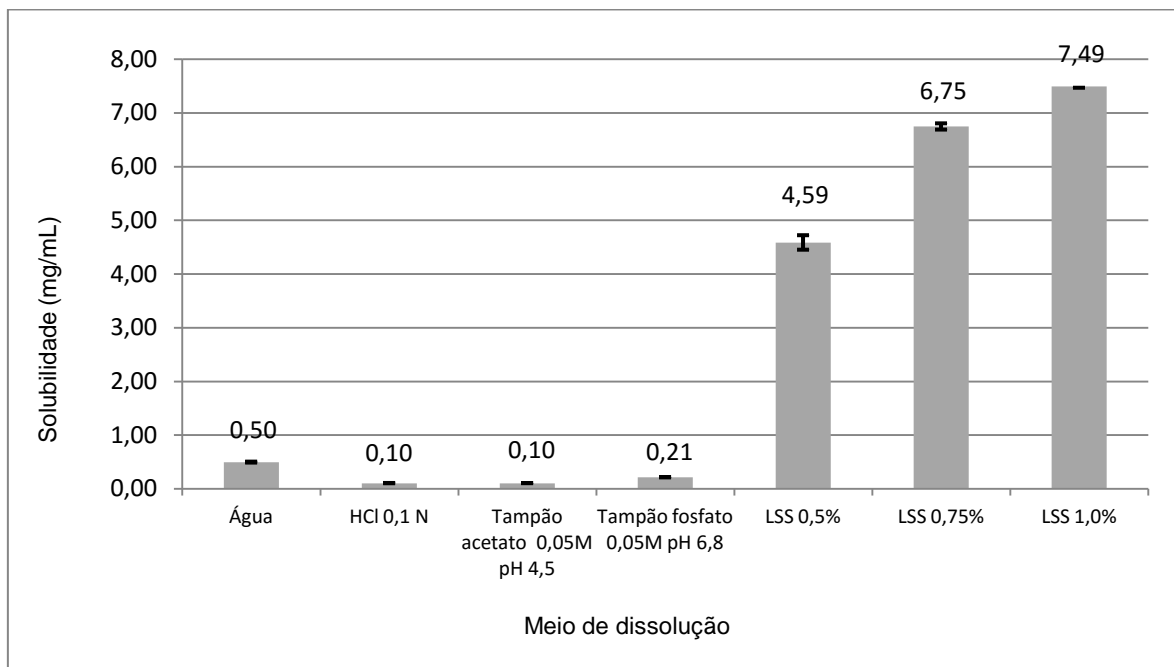
fisiológico e em meios de dissolução contendo o tensoativo LLS. A solubilidade é um parâmetro termodinâmico que representa a concentração da solução de um fármaco em equilíbrio com o solvente. É o fator que mais afeta a velocidade de dissolução (MARCOLONGO, 2003; BRASIL, 2013).

A partir dos dados de solubilidade obtidos foi possível definir o meio de dissolução mais adequado para o teste *in vitro* de dissolução. Os resultados do teste de solubilidade encontram-se na tabela 17 e na figura 25.

Tabela 17. Resultados de pH, de condição *sink* e de solubilidade obtidos durante do teste de solubilidade do fármaco NMS associado a β -CD nos meios de dissolução água; HCl 0,1 N; tampão acetato 0,05 M pH 4,5; tampão fosfato 0,05 M pH 6,8 e solução aquosa de lauril sulfato de sódio a 0,5%, a 0,75% e a 1,0% a 37°C ao término de 24 horas.

Meio de Dissolução	Solubilidade (mg/mL)	Condição <i>sink</i> (vezes)		pH	
		Em 500,0 mL	Em 900,0 mL	Inicial	Final
Água purificada	0,50 ± 0,0089	0,6	1,1	6,30	6,38
HCl 0,1 N	0,11 ± 0,0026	0,1	0,2	1,34	1,60
Tampão acetato 0,05 M pH 4,5	0,10 ± 0,0012	0,1	0,2	4,50	4,59
Tampão fosfato 0,05 M pH 6,8	0,21 ± 0,0006	0,3	0,5	6,80	6,73
LSS 0,5%	4,59 ± 0,1349	5,7	10,3	5,90	5,91
LSS 0,75%	6,75 ± 0,0578	8,4	15,2	6,30	6,37
LSS 1,0%	7,49 ± 0,0271	9,4	16,9	6,80	6,89

FIGURA 25. Resultados do estudo de solubilidade da NMS β -CD à temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1^\circ \text{C}$ em água, em HCl 0,1 N, em tampão acetato 0,05M pH 4,5 e em tampão fosfato 0,05 M pH 6,8, a 37°C e a 50 rpm durante 24 horas. Os valores correspondem a média de 3 determinações (\pm desvio padrão).



Legenda: HCl: ácido clorídrico; LSS: lauril sulfato de sódio

Os dados obtidos do teste de solubilidade indicaram que a NMS β -CD apresentou uma solubilidade de 0,5 mg/mL em água; de 0,11 mg/mL em ácido clorídrico 0,1 N; de 0,10 mg/mL em tampão acetato pH 4,5 e de 0,21 mg/mL em tampão fosfato pH 6,8. A baixa solubilidade da NMS em água e HCl 0,1N já era esperada, uma vez que os dados de literatura já indicavam que sua baixa hidrossolubilidade. Silva, Volpato (2002) determinaram a solubilidade da NMS em água (0,0101 mg/mL), em ácido clorídrico 0,1 N (0,0079 mg/mL) e em solução aquosa de LLS 1% (p/v) (0,1036 mg/mL). Assim, observou-se que a complexação da NMS com β -CDs aumentou significativamente sua solubilidade em mais de 10 vezes nos solventes água, ácido clorídrico 0,1N (HCl 0,1 N) e em LLS 1,0%.

Apesar da complexação da NMS com β -CDs aumentar significativamente a solubilidade do fármaco NMS, o valor de condição *sink* de no mínimo 3 não foi atingida nos meios água, HCl 0,1N, tampão acetato pH 4,5 e tampão fosfato pH 6,8. A condição *sink* impede que a concentração no meio de dissolução aproxime-se da concentração de saturação, o que levaria a uma velocidade de dissolução lenta. A

Farmacopeia Americana USP 38 (2015) preconiza que a condição *sink* seja no mínimo 3 dentro de uma faixa de volume de 500 mL a 1000 mL. A condição *sink* é um pré-requisito para definir o volume mínimo de meio a ser empregado no teste de dissolução. Os valores de condição *sink* encontrados para os volumes de 500 mL e 900 mL em cada meio de dissolução estão descritos na tabela 17.

Como a condição *sink* não foi atingida nos meios de dissolução que contemplam a faixa de pH fisiológico de 1,2 a 6,8 (água, HCl 0,1N, tampão acetato 0,05 M pH 4,5 e tampão fosfato 0,05 M pH 6,8) foi necessário investigar a solubilidade da NMS β -CD em meios contendo tensoativos. Para tanto, utilizou-se o LLS em concentrações crescentes de 0,5% (0,0173 mol/L), 0,75% (0,0260 mol/L) e 1,0% (0,0347 mol/L) em meio aquoso. O principal mecanismo de atuação do LLS na promoção da solubilização da NMS beta-ciclodextrina foi a solubilização micelar (formação de micelas), uma vez que as concentrações de 0,5%, 0,75% e 1,0% estão acima da concentração micelar crítica do LLS. Rizzatti, Zanetti (2009) determinaram potenciométricamente que a concentração micelar crítica do LLS está em torno de 0,0080 mol/L. O efeito dos tensoativos é mais pronunciado com o aumento da formação de micelas e isto é verificado com o aumento da concentração do tensoativo. No estudo de solubilidade da NMS β -CD a 37 °C, observou-se experimentalmente que a solubilidade do fármaco aumentou com o aumento da concentração de tensoativo. Assim, na concentração de 0,5% de LLS a solubilidade do fármaco a 37° C foi de 4,6 mg/mL, na concentração de 0,75% a solubilidade foi de 6,7 mg/mL e na concentração de 1,0% foi de 7,5 mg/mL.

Os resultados do teste de solubilidade indicaram que o valor de condição *sink* de no mínimo 3 foi atingido apenas nos meios com LLS a 0,5%, a 0,75% e 1,0%, considerando os volumes de 500,0 mL e 900,0 mL conforme a Tabela 17.

Os valores de pH obtidos para os diversos meios de dissolução estudados variaram entre 1,34 e 6,89. Não foi observado variação significativa de pH entre a condição inicial e a condição final (após 24 horas) no estudo de solubilidade. A maior variação de pH (0,26) entre a condição inicial e a condição final foi observada no meio HCl 0,1 N. Nos demais meios a variação foi inferior a 0,1. Os valores de pH obtidos e sua variação durante o estudo estão descritos na tabela 16. A relação entre o aumento da solubilidade da NMS β -CD e o pH do meio deve-se a crescente ionização da mesma à medida que o pH aumenta, uma vez que a mesma possui

caráter fracamente ácido ($pK_a = 6,5$). Pela equação de Henderson Hasselbach, espera-se maior solubilização da NMS β -CD com a elevação do pH. Os dados experimentais de solubilidade obtidos nas diversas faixas de pH comprovaram o que estava previsto pela Henderson Hasselbach. O maior valor de solubilidade encontrado para a NMS β -CD foi de 7,49 mg/mL. Este valor foi observado no meio com 1,0% de lauril de sulfato de sódio e no pH 6,8. Já o menor valor de solubilidade foi encontrado nos meios HCl 0,1 N (0,10 mg/mL) e tampão acetato 0,05 M pH 4,5 (0,10 mg/mL).

Enquanto o presente trabalho avaliou a solubilidade da NMS β -CD em água; em HCl 0,1 N; em tampão acetato 0,05 M pH 4,5; em tampão fosfato 0,05 M pH 6,8 e em solução aquosa contendo concentrações de 0,5%; 0,75% e 1,0% do tensoativo LLS, Silva, Volpato (2002) avaliaram a solubilidade da NMS em água; em HCl 0,1 N; em tampão fosfato pH 5,8; em tampão fosfato pH 7,4; em soluções aquosas contendo LLS (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5%); em soluções aquosas contendo polissorbato 80 (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5%); em HCl 0,1 N contendo LSS (1,0 e 2,0% p/v); HCl 0,1 N contendo Poli 80 (1,5 e 2,5%); tampão fosfato pH 5,8 contendo polissorbato 80 (1,5; 2,0 e 2,5%); tampão fosfato pH 7,4 contendo polissorbato 80 (1,5; 2,0 e 2,5%) e tampão fosfato pH 7,4 contendo LLS (1,5; 2,0 e 2,5%). Os resultados obtidos por eles revelaram que em soluções aquosas de LLS e polissorbato 80, em diferentes concentrações % (p/v), a solubilidade da NMS é maior em LLS. Mas quando se avalia a mesma situação em termos de concentração molar percebeu-se que o polissorbato possui maior poder de solubilização comparado com o LLS. Eles concluíram ainda que a presença de tensoativos é imprescindível para a solubilização e que é necessário a presença dos mesmos nos meios para a dissolução de comprimidos de NMS. Nesse mesmo sentido, o FDA (1997) preconiza que para produtos que contenham fármacos insolúveis ou pouco solúveis em água (fármacos pertencentes às classes biofarmacêuticas II e IV) é recomendável o uso de surfactantes nos meios de dissolução.

Considerando-se o estudo de solubilidade realizado em que foram avaliados o pH, a interferência das membranas filtrantes, a solubilidade e a condição *sink*, os meios de dissolução mais indicados para a realização dos perfis de dissolução seriam os meios contendo LLS nas concentrações crescentes de 0,5%, 0,75% e 1,0%. No entanto, a realização dos estudos de solubilidade não isenta a realização

dos perfis de dissolução em todos os solventes propostos, uma vez que os excipientes da formulação podem alterar a solubilidade do ativo nos diferentes meios de dissolução.

5.3.2 Estudo de meio de dissolução

Para o desenvolvimento de um método de dissolução é necessário demonstrar que o meio de escolha é o mais adequado ao princípio ativo na forma farmacêutica em que se encontra. Deve-se levar em consideração ainda o teste de solubilidade, o pKa da molécula e sua classificação biofarmacêutica, a formulação do medicamento, o sistema de liberação, a via de administração, a permeabilidade e a farmacocinética. Além disso, é necessário a investigação das curvas de dissolução na faixa de pH fisiológico considerando a temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Para investigar as curvas de dissolução é necessário a realização de perfis de dissolução (MARCOLONGO, 2003; BRASIL, 2010).

Para o início dos testes de perfis de dissolução, o volume de meio de escolha foi de 900 mL para cada cuba, o aparato foi a pá, a rotação inicial foi de 50 rpm. Não foi necessário utilizar âncoras, pois o medicamento não flutuou no meio de dissolução e nem ficou aderido à parede da cuba. Para determinação da rotação mais adequada, parte-se de rotações mais baixas para rotações mais altas (FDA, 1997; BRASIL, 2013;). A Farmacopeia Americana – USP 38 (2015) não recomenda a utilização de rotações abaixo de 25 rpm por causa da inconsistência hidrodinâmica e nem rotações acima de 150 rpm por causa da turbulência. O aparato pá é comumente utilizado em rotações de 50 ou 75 rpm. A rotação de 100 rpm no aparato pá pode ser utilizado desde que seja devidamente justificado (USP 38, 2015). A figura 26 demonstrou que a forma farmacêutica permaneceu localizada no fundo central da cuba, o que justificou a não utilização das âncoras.

FIGURA 26. Demonstração do comprimido de NMS β -CD na cuba de dissolução.

O medicamento NMS β -CD 400 mg é classificado como forma farmacêutica de liberação imediata e o fármaco NMS pertence à classe II da classificação biofarmacêutica, ou seja, o fármaco possui alta permeabilidade e baixa solubilidade. O Sistema de Classificação Biofarmacêutica sugere que fármacos das classes I (alta solubilidade e alta permeabilidade) e III (alta solubilidade e baixa permeabilidade) que apresentam dissolução de 85% em 15 minutos não possuem problemas de biodisponibilidade relacionados com a dissolução. Já para fármacos da classe II a dissolução é uma etapa limitante da absorção e nesse caso uma relação *in vitro in vivo* pode ser esperada. Fármacos da classe IV (baixa solubilidade e baixa permeabilidade) possuem significativos problemas de biodisponibilidade. Em virtude disso, é muito importante o desenvolvimento de métodos de dissolução discriminativos (FDA, 1997).

Foram realizadas 6 coletas e testados 6 comprimidos durante a execução de cada perfil de dissolução realizado nesse trabalho. A Anvisa preconiza que sejam feitos no mínimo 5 (BRASIL, 2010). Em geral, para formas farmacêuticas de liberação imediata, a duração da dissolução é tipicamente de 30 a 60 minutos. Os pontos de coleta são escolhidos para caracterizar o desempenho da formulação (USP 38, 2015). Os tempos de coleta de 5, 10, 15 e 30 45 e 60 minutos foram utilizados para definir a curva de dissolução de comprimidos de NMS β -CD. Os pontos de 5, 10, 15 minutos foram incluídos para comprovar que a dissolução do medicamento não se trata de dissolução muito rápida (liberação de 85% do fármaco

em 15 minutos). Os pontos de 30, 45 e 60 minutos foram incluídos para detectar a formação do platô da curva de dissolução. Além disso, foi incluído um ponto chamado de *infinity test* após os 60 minutos de dissolução com o intuito de verificar se houve a liberação total do ativo em comparação ao último tempo de coleta. O ponto *infinity test* é realizado ao término da dissolução (após os 60 minutos de dissolução) e caracteriza-se por aumentar a rotação do dissolutor para 150 rpm durante 30 minutos.

Os primeiros perfis de dissolução do medicamento NMS β -CD 400 mg comprimido foram realizados em 900 mL de água, em 900 mL de HCl 0,1N, em 900 mL de tampão acetato 0,05 M pH 4,5 e em 900 mL de tampão fosfato 0,05M pH 6,8 à temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, a 50 rpm. O teste de solubilidade já indicava que esses meios não seriam adequados e discriminativos para o estudo de dissolução, uma vez que o valor de condição *sink* de no mínimo 3 não havia sido atingido. No entanto, eles foram realizados assim mesmo, pois sabe-se que os excipientes usados na preparação de sólidos orais determinam a velocidade de dissolução e desintegração (FILHO *et. al*, 2013). Os resultados obtidos nos perfis de dissolução confirmaram o que teste de solubilidade já havia previsto. Observou-se ainda que o patamar de 20% de liberação do ativo não foi alcançado em nenhum desses meios de dissolução. Os valores encontrados para o teste de perfil de dissolução nos meios supracitados encontram-se dispostos na tabela 18 e na figura 27. Os valores do desvio padrão relativo (coeficientes de variação) estão presentes na tabela 19. Para permitir o uso das médias e do modelo matemático método modelo independente, os valores do coeficiente de variação devem ser inferior a 20% para os tempos de coleta de 5 e 10 minutos e inferior a 10% para os tempos de 15, 30, 45 e 60 minutos (BRASIL, 2010; USP 38, 2015).

Os excipientes influenciam diretamente na dissolução de formas farmacêuticas sólidas orais. Markman, Rosa, Koschtschak (2010) ao avaliarem a qualidade de cápsulas de sinvastatina de farmácias magistrais verificaram que a variação na quantidade de excipiente utilizada nas formulações podem interferir na solubilidade da sinvastatina e na sua equivalência farmacêutica. Eles ainda verificaram que a forma cristalina da sinvastatina (classe 2 do Sistema de Classificação Biofarmacêutica), a granulometria dos insumos e o tipo dos excipientes presentes na formulação determinaram a solubilidade do fármaco, o que ficou evidenciado no

ensaio de dissolução. Essas variações modificam a quantidade absorvida e, portanto a atividade farmacológica. Já Ferreira *et. al* (2013) ao estudar comparativamente a influência dos excipientes na qualidade hidroclorotiazida (HCTZ), fármaco da classe IV (pouco solúvel e pouco permeável), 25 mg em medicamentos referência e genéricos verificou homogeneidade na dissolução dos comprimidos de cada amostra, ou seja, os diferentes excipientes usados não modificaram as características da dissolução da HCTZ.

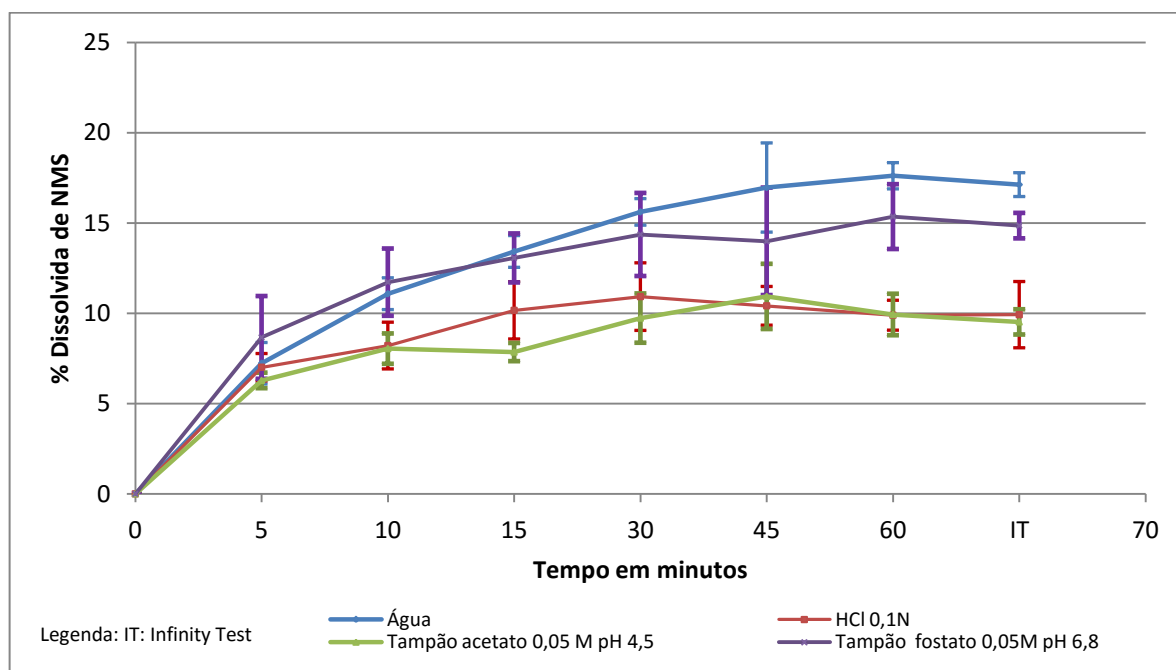
Tabela 18. Valores médios de porcentagens dissolvidas (\pm desvio padrão) de NMS β -CD comprimidos (400 mg) para os tempos de coleta de 5', 10', 15', 30', 45', 60' e *Infinity Test* em água, em HCl 0,1 N, em tampão acetato 0,05M pH 4,5 e em tampão fosfato 0,05 M pH 6,8, a 37° C e a 50 rpm. Os valores correspondem a média de 6 determinações.

Aparato/Vol. de Meio		Pá – 900 mL		
Rotação		50 rpm		
Tempo (min)	Água (%) $\pm \sigma$	HCl 0,1N (%) $\pm \sigma$	Tampão acetato 0,05M pH 4,5 (%) $\pm \sigma$	Tampão fosfato 0,05M pH 6,8 (%) $\pm \sigma$
5	7,23 \pm 1,15	7,01 \pm 0,76	6,28 \pm 0,43	8,66 \pm 2,29
10	11,08 \pm 0,88	8,21 \pm 1,29	8,04 \pm 0,84	11,72 \pm 1,86
15	13,42 \pm 0,88	10,16 \pm 1,59	7,85 \pm 0,50	13,06 \pm 1,36
30	15,61 \pm 0,74	10,92 \pm 1,87	9,73 \pm 1,36	14,36 \pm 2,30
45	16,96 \pm 2,47	10,41 \pm 1,07	10,93 \pm 1,80	13,98 \pm 2,98
60	17,61 \pm 0,73	9,89 \pm 0,83	9,93 \pm 1,15	15,35 \pm 1,79
<i>Infinity Test</i>	17,12 \pm 0,66	9,92 \pm 1,83	9,52 \pm 0,70	14,85 \pm 0,71

Tabela 19. Valores de desvio padrão relativo em porcentagem para os tempos de coleta de 5', 10', 15', 30', 45', 60' e *Infinity Test* encontrados no perfil de dissolução de NMS β -CD comprimidos (400 mg) em água, em HCl 0,1 N, em tampão acetato 0,05M pH 4,5 e em tampão fosfato 0,05 M pH 6,8, a 37° C e a 50 rpm.

Aparato/Vol. de Meio		Pá – 900 mL		
Rotação		50 rpm		
Tempo (min)	Água (%)	HCl 0,1N (%)	Tampão acetato 0,05M pH 4,5 (%)	Tampão fosfato 0,05M pH 6,8 (%)
5	15,89	10,81	6,86	26,46
10	7,94	15,76	10,46	15,89
15	6,55	15,62	6,43	10,38
30	4,71	17,13	14,02	16,01
45	14,56	10,29	16,51	21,29
60	4,12	8,37	11,56	11,69
<i>Infinity Test</i>	3,85	18,49	7,34	4,75

FIGURA 27. Perfis de dissolução de NMS β -CD comprimidos (400 mg) em água, em HCl 0,1 N, em tampão acetato 0,05M pH 4,5 e tampão fosfato 0,05 M pH 6,8, a 37° C e a 50 rpm. Os valores correspondem a média de 6 determinações e as barras na vertical ao desvio padrão.



Geralmente utiliza-se água purificada como meio quando o produto apresenta um comportamento de dissolução independente do pH (USP 38, 2015). Pelo teste de solubilidade verificou-se que a NMS β -CD tem sua solubilidade modificada em função do pH. No entanto, durante a avaliação dos meios de dissolução, a água purificada foi o que apresentou maior quantidade de NMS β -CD dissolvida entre os meios sem tensoativo. Por isso, a continuação do estudo de dissolução deu-se com a adição em concentrações crescentes do tensoativo LLS à água. Adotaram-se as concentrações de 0,5%, 0,75% e de 1,0% (p/v) de lauril para a realização dos próximos perfis. Os meios HCl 0,1N, tampão acetato 0,05M pH 4,5 e tampão fosfato 0,05M pH 6,8 não foram usados para a realização de perfis de dissolução com adição de tensoativo por apresentarem dissolução bastante inferiores à água purificada e por terem apresentados valores de condição *sink* inferiores a 3.

Os resultados dos perfis de dissolução usando-se tensoativo nas concentrações propostas encontram-se descritos na tabela 20 e na figura 28. Como o intuito foi avaliar o meio, as condições iniciais de dissolução foram mantidas, ou seja, usou-se a rotação de 50 rpm, a temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, o aparato pá e 900 mL de meio de dissolução. Os valores do desvio padrão relativo obtido em cada tempo de coleta estão presentes na tabela 21.

Tabela 20. Valores médios de porcentagens dissolvidas (\pm desvio padrão) de NMS β -CD comprimidos (400 mg) para os tempos de coleta de 5', 10', 15', 30', 45', 60' e *Infinity Test* com diferentes concentrações de LLS. Os valores correspondem a média de 6 determinações.

Aparato	Pá		
Rotação	50 rpm		
Tempo	LLS 0,5% (%) $\pm \sigma$	LLS 0,75% (%) $\pm \sigma$	LLS 1,0% (%) $\pm \sigma$
5	17,24 \pm 1,16	32,90 \pm 5,28	32,70 \pm 2,92
10	29,45 \pm 2,06	45,30 \pm 1,37	46,63 \pm 3,33
15	37,22 \pm 2,69	61,15 \pm 14,46	58,40 \pm 3,81
30	57,89 \pm 2,29	73,00 \pm 8,16	77,18 \pm 2,42
45	70,04 \pm 2,15	77,22 \pm 0,83	82,11 \pm 3,66
60	81,31 \pm 2,78	79,64 \pm 1,27	84,67 \pm 1,71
Infinity Test	83,01 \pm 0,45	89,77 \pm 1,21	91,47 \pm 1,58

FIGURA 28. Perfis de dissolução de NMS β -CD comprimidos (400 mg) em meios de dissolução com diferentes concentrações LLS. Os valores correspondem a média de 6 determinações e as barras na vertical ao desvio padrão.

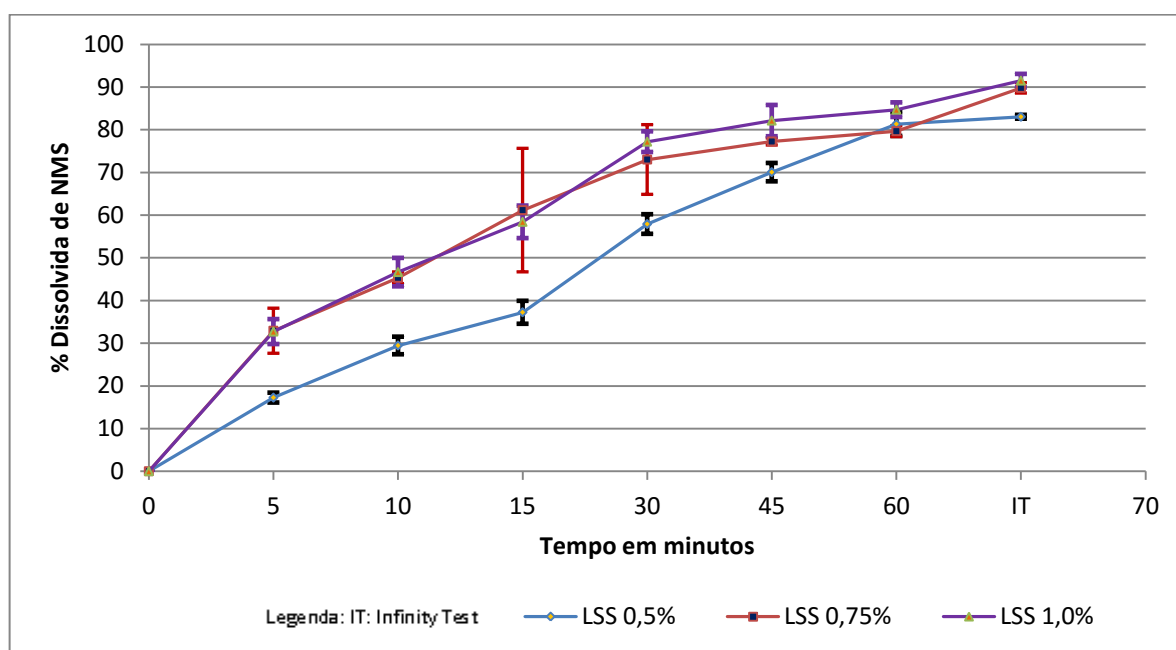


Tabela 21. Valores de desvio padrão relativo em porcentagem para os tempos de coleta de 5', 10', 15', 30', 45', 60' e *Infinity Test* encontrados no perfil de dissolução de NMS β -CD comprimidos (400 mg) em meios de dissolução com diferentes concentrações de LLS.

Aparato	Pá		
Rotação	50 rpm		
Tempo	LSS 0,5% (%)	LSS 0,75% (%)	LSS 1,0% (%)
5	6,71	16,05	8,93
10	6,99	3,02	7,14
15	7,22	23,65	6,52
30	3,96	11,18	3,14
45	3,07	1,07	4,46
60	3,42	1,60	2,02
<i>Infinity Test</i>	0,54	1,35	1,73

Com base nos resultados obtidos, o meio de dissolução contendo 1,0% de LLS (p/v) foi escolhido para continuação do estudo, pois apresentou maior liberação do ativo e coeficientes de variação inferiores a 20% para os dois primeiros pontos (5 e 10 minutos) e inferiores a 10% para os demais tempos de coleta (15, 30, 45, 60 e

infinity test). O meio contendo 0,5% (p/v) de lauril não foi selecionado para a continuação do estudo de dissolução, pois demonstrou possuir uma menor liberação do ativo em comparação aos meios contendo 0,75% e 1,0% (p/v) de tensoativo. Já o meio contendo 0,75% (p/v) de lauril também não foi selecionado devido ao elevado coeficiente de variação no tempo de 15 minutos (23,65%) e pelo fato do medicamento neste meio liberar apenas 79,64% ao término de 60 minutos. Valores de CV superiores a 10% nos tempos de 15, 30, 45 e 60 minutos indicam alta variabilidade nos resultados o que tornar difícil a identificação de tendências ou efeitos das mudanças de formulação e também não permite o uso do modelo matemático método modelo independente (BRASIL, 2010; USP 38, 2015). Após a avaliação de todos os meios de dissolução, o mais adequado foi a solução aquosa de LLS 1,0% (p/v).

Uma vez definido o meio de dissolução, realizou-se perfis de dissolução utilizando o aparato pá, com 900 mL de solução aquosa de LLS 1,0% (p/v) em cada cuba, à temperatura de $37^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ para determinar-se a rotação mais adequada. Para tanto, investigou-se a liberação do ativo em rotações crescentes de 50, 75 e 100 rpm conforme a nota técnica N° 3/2013 da ANVISA (BRASIL, 2013) e as recomendações da Farmacopeia Americana (USP 38/2015). Os resultados obtidos durante a realização dos perfis de dissolução estão presentes na tabela 22 e na figura 29. A tabela 23 demonstra os valores do desvio padrão relativo obtidos durante a avaliação da rotação mais adequada.

Tabela 22. Valores médios de porcentagens dissolvidas (\pm desvio padrão) de NMS β -CD comprimidos (400 mg) para os tempos de coleta de 5', 10', 15', 30', 45', 60' e *Infinity Test* em diferentes rotações. Os valores correspondem a média de 6 determinações.

Aparato/Vol. de Meio	Pá / 900 mL		
	Rotação	50 rpm (%) $\pm \sigma$	75 rpm (%) $\pm \sigma$
Tempo (min)	Água + LSS 1,0%		
5	32,70 \pm 2,92	36,45 \pm 2,78	44,78 \pm 0,71
10	46,63 \pm 3,33	65,63 \pm 2,40	73,79 \pm 0,75
15	58,40 \pm 3,81	65,63 \pm 2,55	80,65 \pm 0,62
30	77,18 \pm 2,42	76,42 \pm 1,04	88,30 \pm 0,72
45	82,11 \pm 3,66	87,14 \pm 1,23	92,97 \pm 1,04
60	84,67 \pm 1,71	90,92 \pm 0,44	99,08 \pm 0,59
<i>Infinity Test</i>	91,47 \pm 1,58	94,93 \pm 0,82	100,37 \pm 0,44

FIGURA 29. Perfis de dissolução de NMS β -CD comprimidos (400 mg) em água + LSS 1,0% no aparato pá e em diferentes rotações. Os valores correspondem à média de 6 determinações e as barras na vertical ao desvio padrão.

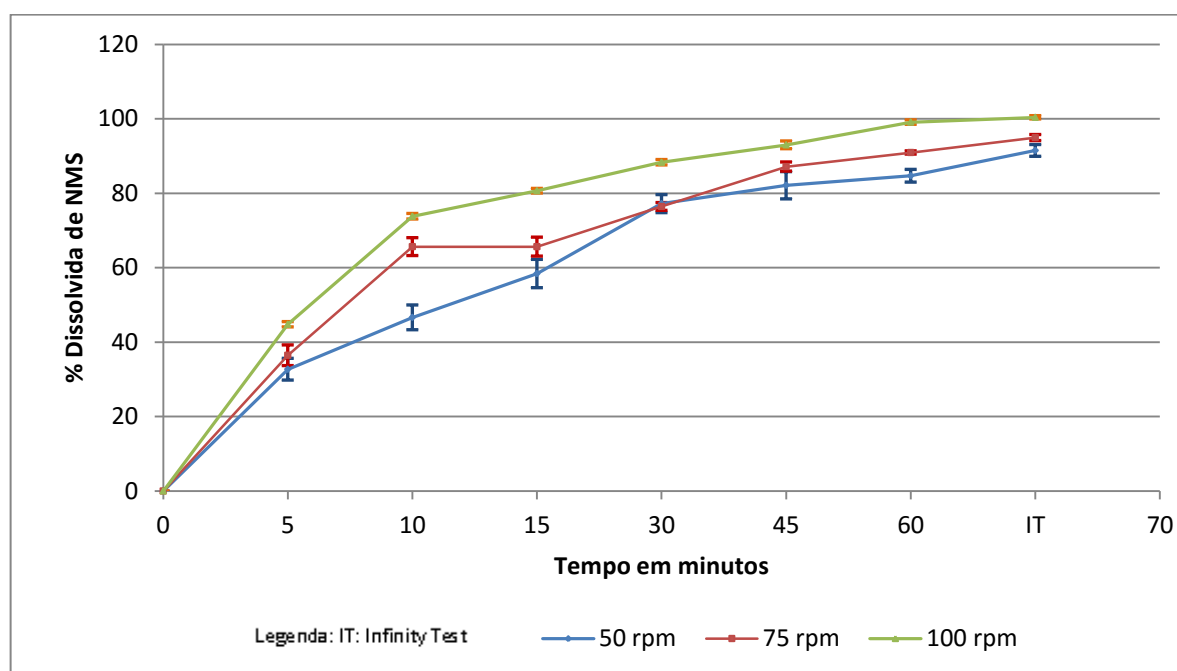


Tabela 23. Valores de desvio padrão relativo em porcentagem para os tempos de coleta de 5', 10', 15', 30', 45', 60' e *Infinity Test* encontrados no perfil de dissolução de NMS β -CD comprimidos (400 mg) em água + LLS 1% em diferentes rotações.

Aparato/Vol. de Meio	Pá / 900 mL			
	Rotação	50 rpm (%)	75 rpm (%)	100 rpm (%)
Tempo (min)	Água + LSS 1,0%			
5		8,93	7,62	1,58
10		7,14	3,66	1,01
15		6,52	3,88	0,77
30		3,14	1,36	0,82
45		4,46	1,41	1,12
60		2,02	0,48	0,60
Infinity Test		1,73	0,86	0,44

Com base nos resultados obtidos, foi possível definir que a rotação mais adequada para a análise de dissolução do medicamento NMS β -CD 400 mg comprimido foi a rotação de 100 rpm, pois nesta foi possível verificar a liberação mais gradativa do ativo e houve a formação do platô. Observou-se também que a

diferença de liberação foi mínima entre o tempo de coleta de 60 minutos (99,08% de liberação do ativo) e a condição de *infinity test* (100,37%). Além disso, os coeficientes de variação obtidos foram menores que 20% nos tempos de coleta de 5 e 10 minutos e menores que 10% para os tempos de coleta de 15, 30, 45 e 60 minutos. A rotação de 50 rpm foi considerada não-adequada para análise de dissolução do medicamento porque houve uma diferença considerável entre a liberação do ativo em 60 minutos (84,67%) e a condição *infinity test* (91,47%). Apesar disso, os valores dos CV estão de acordo com o preconizado pela RDC N° 31/2010 e os valores encontrados foram menores que 20% para os tempos de coletas de 5 e 10 minutos e menores que 10% para os tempos de tempos de coleta de 15, 30, 45 e 60 minutos. Também a rotação de 75 rpm não mostrou-se adequada para a análise de dissolução, pois não foi observado a liberação de 100% do ativo e houve uma diferença de aproximadamente 4% entre a liberação em 60 minutos (90,92%) e a condição *infinity test* (94,93%).

Uma vez definidos o meio de dissolução e a rotação mais adequados e discriminativos, foram realizados dois perfis de dissolução usando-se como meio uma solução aquosa de LLS 1,0% (p/v) à temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ com 900 mL em cada cuba e a rotação de 100 rpm para definir-se o aparato mais adequado. Para tanto, investigou-se a liberação do ativo nos aparatos de pá e cesto. Os resultados comparativos dos perfis de dissolução realizados com os aparatos pá e cesto estão presentes na tabela 24 e na figura 30. A tabela 25 demonstra os valores do desvio padrão relativo obtidos na comparação entre os aparatos.

Tabela 24. Valores médios de porcentagens dissolvidas (\pm desvio padrão) de NMS β -CD comprimidos (400 mg) para os tempos de coleta de 5', 10', 15', 30', 45', 60' e *Infinity Test* nos aparatos pá e cesto a 100 rpm e em LLS 1%. Os valores correspondem a média de 6 determinações.

Vol. de Meio /Rotação	900 mL /100 rpm	
Aparato	Pá (%) $\pm \sigma$	Cesto (%) $\pm \sigma$
Tempo (min)	LLS 1,0%	
5	44,78 \pm 0,71	53,05 \pm 5,45
10	73,79 \pm 0,75	69,32 \pm 1,35
15	80,65 \pm 0,62	73,30 \pm 1,59
30	88,30 \pm 0,72	77,00 \pm 2,13
45	92,97 \pm 1,04	77,62 \pm 2,43
60	97,33 \pm 0,91	78,22 \pm 3,32
Infinity Test	100,05 \pm 0,54	88,30 \pm 0,49

FIGURA 30. Perfis de dissolução de NMS β -CD comprimidos (400 mg) em 900 mL de LSS 1,0% nos aparatos pá e cesto em 900 mL a 100 rpm. Os valores correspondem à média de 6 determinações e as barras na vertical ao desvio padrão.

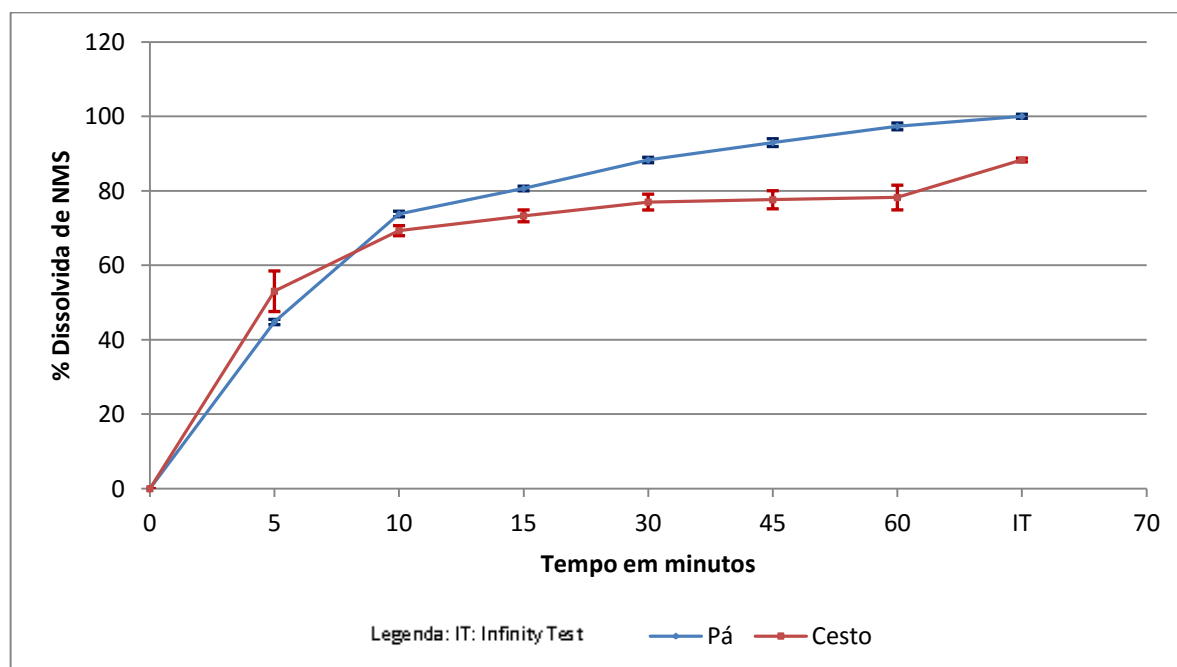


Tabela 25. Valores de desvio padrão relativo em porcentagem para os tempos de coleta de 5', 10', 15', 30', 45', 60' e *Infinity Test* encontrados no perfil de dissolução de NMS β -CD comprimidos (400 mg) e em 900 mL de LLS 1% nos apartatos pá e cesto a 100 rpm.

Vol. de Meio/Rotação		900 mL - 100 rpm	
Aparato	Pá (%)	Cesto (%)	
Tempo (min)	LSS 1,0%		
5	1,58	10,28	
10	1,01	1,95	
15	0,77	2,17	
30	0,82	2,76	
45	1,12	3,13	
60	0,93	4,24	
<i>Infinity Test</i>	0,54	0,56	

A comparação entre os aparatos pá e cesto demonstrou que o cesto é inviável para analisar o medicamento NMS β -CD 400 mg, pois sua utilização afetou de forma significativa a liberação do ativo. Observou-se que não foi atingida nem 80% de liberação do ativo com o aparato cesto em 60 minutos de dissolução. Observou-se grande variação de liberação entre os 60 minutos de dissolução (78,22% de liberação do ativo) e a condição *infinity test* (88,30%). No entanto, os coeficientes de variação para os tempos de 5 e 10 minutos foram menores que 20% e para os tempos de 15, 30, 45 e 60 minutos foram inferiores a 10%. Mesmo com os coeficientes aprovados, a utilização do aparato cesto é inadequada para analisar a dissolução do medicamento. Já para o aparato pá houve a liberação de praticamente toda a substância ativa em 60 minutos de dissolução (97,33%) e a diferença de liberação para a condição *infinity test* foi de aproximadamente 3%. Os coeficientes de variação para o aparato pá para os tempos de 5 e 10 minutos formam menores que 20% e para os tempos de 15, 30, 45 e 60 minutos foram inferiores a 10%. Desta maneira, o aparato pá apresentou desempenho superior na avaliação da dissolução do medicamento NMS β -CD em relação ao aparato cesto.

Após definir-se o meio de dissolução, a rotação e o aparato mais adequados para o desenvolvimento da metodologia discriminativa de dissolução investigou-se a influência do volume de meio de dissolução adicionado a cuba na liberação do

princípio ativo. Nesta avaliação realizou-se dois perfis de dissolução usando-se uma solução aquosa de LLS 1,0% (p/v) como meio a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, a rotação de 100 rpm e o aparato pá. Estas condições foram definidas a partir do estudo da influência de cada um destes parâmetros na performance da dissolução do medicamento.

A partir dos resultados obtidos no teste de solubilidade, verificou-se que o meio de dissolução LLS 1% foi capaz de solubilizar em 500 mL cerca de 3760 mg de NMS β -CD (condição *sink* 9,4) enquanto que 900 mL foi capaz de solubilizar cerca de 6760 mg de NMS β -CD (condição *sink* 16,9). O valor referência de condição *sink* adotado durante o estudo foi de no mínimo 3 para evitar a formação de uma solução saturada de NMS β -CD (USP 38, 2015). Caso houvesse a formação de uma solução saturada, a velocidade de dissolução tornar-se-ia lenta e o meio adotado não seria discriminativo. A condição *sink* é um pré-requisito para definir o volume mínimo de meio a ser empregado no teste de dissolução. Os dados do teste de solubilidade indicaram que os volumes de 500 e 900 mL poderiam ser utilizados para o teste de perfil de dissolução, uma vez que o valor mínimo de 3 vezes o volume necessário para evitar a formação de uma solução saturada foi satisfeito (condição *sink*). Os resultados comparativos dos perfis de dissolução realizados com os volumes de 500 e 900 mL estão presentes na tabela 26 e na figura 31. A tabela 27 demonstra os valores do coeficiente de variação obtidos na comparação entre os volumes.

Tabela 26. Valores médios de porcentagens dissolvidas (\pm desvio padrão) de NMS β -CD comprimidos (400 mg) para os tempos de coleta de 5', 10', 15', 30', 45', 60' e *Infinity Test* em diferentes volumes de LLS 1% a 100 rpm no aparato pá. Os valores correspondem a média de 6 determinações.

Aparato/Rotação	Pá / 100 rpm	
Vol. de Meio	500 mL (%) $\pm \sigma$	900 mL (%) $\pm \sigma$
Tempo (min)	LLS 1,0%	
5	48,64 \pm 4,54	44,78 \pm 0,71
10	66,58 \pm 0,93	73,79 \pm 0,75
15	75,18 \pm 2,86	80,65 \pm 0,62
30	81,10 \pm 2,73	88,30 \pm 0,72
45	83,99 \pm 3,52	92,97 \pm 1,04
60	85,16 \pm 4,16	97,33 \pm 0,91
<i>Infinity Test</i>	87,39 \pm 2,60	100,05 \pm 0,54

FIGURA 31. Perfis de dissolução de NMS β -CD comprimidos (400 mg) em LSS 1,0% no aparato pá a 100 rpm em 500 mL e 900 mL. Os valores correspondem à média de 6 determinações e as barras na vertical ao desvio padrão.

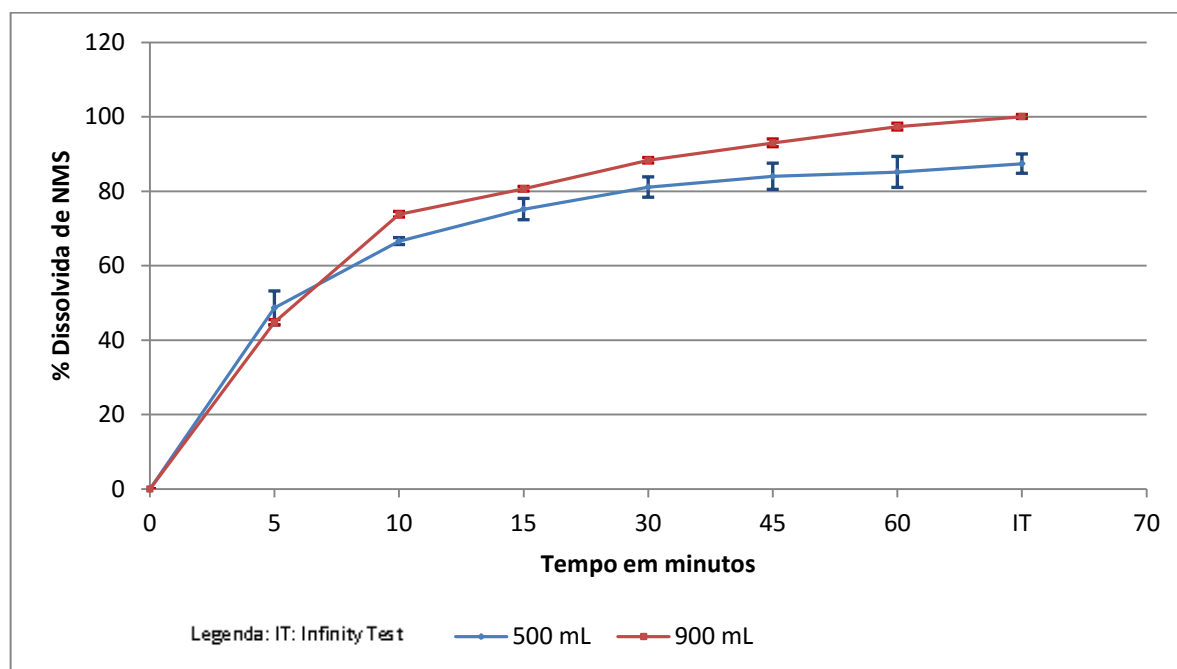


Tabela 27. Valores de desvio padrão relativo em porcentagem para os tempos de coleta de 5', 10', 15', 30', 45', 60' e *Infinity Test* encontrados no perfil de dissolução de NMS β -CD comprimidos (400 mg) em LLS 1% para os volumes de 500 mL e 900 mL a 100 rpm no aparato pá.

Aparato/Rotação	Pá - 100 rpm	
	500mL (%)	900mL(%)
Vol. de Meio	LSS 1,0%	
Tempo (min)		
5	9,34	1,58
10	1,39	1,01
15	3,81	0,77
30	3,37	0,82
45	4,19	1,12
60	4,89	0,93
<i>Infinity Test</i>	2,97	0,54

A partir dos dados obtidos verificou-se que o volume do meio de dissolução influenciou na liberação do princípio ativo. O volume de 500 mL, apesar de atingir a condição *sink*, afetou de forma negativa a dissolução do medicamento, pois em 60 minutos de dissolução apenas 85,16% do ativo foi liberado. Segundo Filho *et. al*

(2013) os excipientes presentes em uma formulação farmacêutica podem favorecer ou dificultar a dissolução do fármaco e, conseqüentemente, a velocidade e a quantidade do mesmo que estará disponível para ser absorvido. Isto pode justificar os resultados obtidos para o volume de 500 mL. Os valores do coeficiente de variação para o volume de 500 mL foram aprovados e os mesmos para os tempos de 5 e 10 minutos formam menores que 20% e para os tempos de 15, 30, 45 e 60 minutos foram inferiores a 10%. Além disso, a diferença de liberação entre 60 minutos de dissolução e a condição *infinity test* foi de aproximadamente 2 pontos percentuais. Logo, observou-se que o volume de 500 mL não foi indicado, pois o aumento da rotação para 150 rpm na condição *infinity* praticamente não modificou a liberação do ativo. Já os dados obtidos para o volume de 900 mL indicaram que este volume foi ideal, pois liberou praticamente todo o ativo em 60 minutos de dissolução (97,33%). A diferença de liberação entre os 60 minutos de dissolução e a condição *infinity test* foi de aproximadamente 3 pontos percentuais. Além disso, os CV para o volume de 900 mL foram aprovados e os valores encontrados para os tempos de 5 e 10 minutos formam menores que 20% e para os tempos de 15, 30, 45 e 60 minutos foram inferiores a 10%, conforme preconizado pela RDC N° 31 de 2010 (BRASIL, 2010). Desta forma, o volume de 900 mL apresentou desempenho superior na avaliação da dissolução do medicamento NMS β -CD em relação ao volume de 500 mL.

Após avaliar a influência de cada variável na dissolução do medicamento NMS β -CD é necessário estabelecer os critérios aceitação do teste. Estes devem ser estabelecidos baseados nos dados obtidos dos perfis de dissolução realizados durante o desenvolvimento. Há uma expectativa aceitável de que os vários lotes produzidos do medicamento devem ter comportamento de dissolução semelhante, o que reafirma a importância de um método que não seja altamente variável e que seja capaz de discriminar entre um lote aceitável e outro inaceitável. Assim, o critério de aceitação para um teste de dissolução é dado em função do termo Q, que corresponde à quantidade mínima dissolvida de um fármaco em um tempo especificado. Este termo consta na monografia individual do produto e é expresso como porcentagem da quantidade declarada (USP 38, 2015).

Após a avaliação das condições analíticas em que se testou os parâmetros que podem influenciar no desempenho do método de dissolução, definiu-se com base

nos estudos de perfis de dissolução realizados anteriormente que a solução aquosa de LLS 1% (p/v) a $37^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$, que o volume de 900 mL de meio de dissolução por cuba, que o aparato pá e que a rotação de 100 rpm foram as condições e os parâmetros mais adequados e discriminativas para a análise para o medicamento NMS β -CD 400 mg comprimido. Já o critério de aceitação Q adotado foi de no mínimo 80% do fármaco dissolvido em solução de LLS 1% em 60 minutos de teste. Adotou-se o valor de no mínimo 80%, pois o fármaco NMS encontra-se misturado com β -CDs, o que levou ao aumento da solubilidade do fármaco NMS em mais de 10 vezes. Além disso, usou-se o tensoativo LLS acima da concentração micelar crítica para aumentar a solubilidade do fármaco no meio de dissolução (água). Para a USP 38 (2015) os valores típicos de Q para formas farmacêuticas de liberação imediata variam de 75 a 80%.

Auda (2014) ao estudar a solubilidade e a dissolução em tampão fosfato pH 5,5 e em 7,4 de NMS sozinha e de complexos de NMS com CDs verificou que os sistemas de inclusão aumentam a solubilidade do fármaco, o fluxo de dissolução e a atividade anti-inflamatória. Os resultados encontrados por Auda (2014) são similares ao encontrados nesse trabalho. Além disso, o autor verificou que a dissolução NMS foi melhor em meio alcalino (pH 7,4) dada a natureza ácida do fármaco. O aumento da quantidade de metil β -CD no complexo aumentou também a dissolução, o que pode ser atribuído à natureza surfactante das CDs e a formação de complexos solúveis com a água. Alves *et. al* (2012) ao comparar a qualidade de preparações sólidas contendo 200 mg carbamazepina (fármaco da classe II do sistema de classificação biofarmacêutica) por meio de estudo de perfil de dissolução comparativo usou LSS a 1% como meio de dissolução, o aparato pá a 75 rpm e o critério de aceitação Q de não menos que 45% e não mais que 75% dissolvidos no tempo de 15 minutos e não menos que 75% no tempo de 60 minutos. Dessa forma, percebe-se que em métodos de dissolução para fármacos da classe II geralmente usa-se tensoativos nos meios de dissolução, dada a baixa solubilidade do fármaco.

O método descrito na Farmacopeia Brasileira 5^a ed. (Brasil, 2010) recomenda para a análise de dissolução do medicamento NMS 100 mg comprimido o uso de 900 mL de tampão fosfato de potássio pH 7,4 com polissorbatos 80 a 2% (v/v), com o aparato pá a 75 rpm durante 45 minutos. Assim, percebe-se que o método desenvolvido e o presente na Farmacopeia Brasileira 5^a ed. tiveram que usar

tensoativo, que o volume de cada cuba em ambos foi de 900 mL e que eles usaram rotações acima de 50 rpm. O método da Farmacopeia Brasileira 5ª ed. não seguiu as recomendações da Nota Técnica N° 3/2013 da ANVISA quanto a faixa de pH usado no teste de dissolução (BRASIL, 2013).

5.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA DE DISSOLUÇÃO DESENVOLVIDA

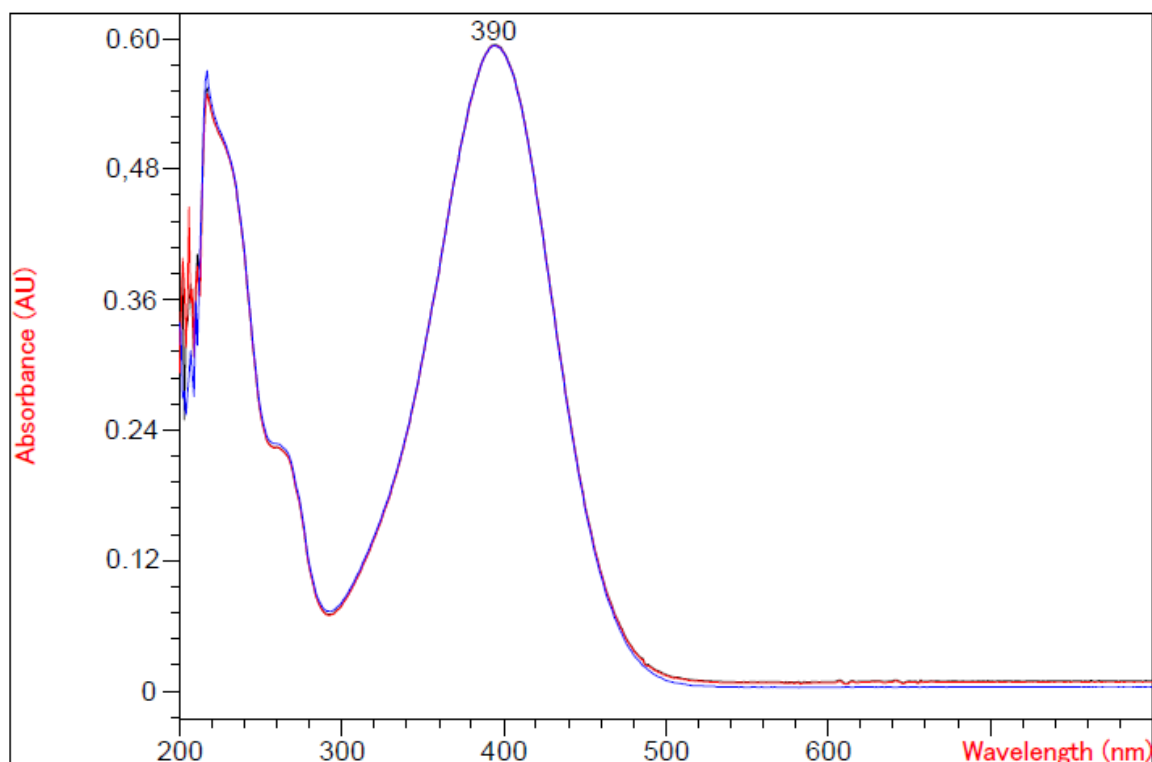
Após o desenvolvimento do método analítico de dissolução procedeu-se sua validação conforme os parâmetros constantes na RE N° 899 da ANVISA (BRASIL, 2003).

5.4.1 Adequação do Sistema

A adequação do sistema espectrofotométrico possui a finalidade de avaliar a aplicação do método durante a execução dos ensaios analíticos. Este teste tem o intuito de verificar a reprodutibilidade dos resultados do equipamento, se este está adequado ao uso e se é capaz de fornecer dados de qualidade aceitável.

Antes da realização do teste de adequação, realizou-se uma varredura na região do ultravioleta e do visível (200 a 900 nm) do espectro eletromagnético para determinar-se o comprimento de onda ideal para quantificar a NMS β -CD. A Figura 32 revelou que o comprimento de onda ideal para a quantificação do ativo foi 390 nm, pois neste a absorbância foi máxima na concentração 0,0133 mg/mL de NMS equivalente a 0,0532 mg/mL de NMS β -CD.

FIGURA 32. Espectro de varredura do padrão de NMS β -CD no UV-Visível (200 a 900 nm) em hidróxido de sódio 0,1 M



O teste de adequação consistiu em 5 leituras consecutivas da solução padrão de NMS β -CD. Os resultados obtidos estão presentes na tabela 28. Verificou-se que o sistema espectrofotométrico estava adequado, pois o desvio padrão relativo (DPR) entre as 5 leituras foi inferior 2%.

Tabela 28. Resultados de adequação do sistema

Leitura	Absorbâncias
1	0,60497
2	0,60520
3	0,60483
4	0,60437
5	0,60498
Média	0,60487
DPR (%)	0,05%

5.4.2 Especificidade / Seletividade

A especificidade/seletividade foi determinada pela varredura na faixa de 200 a 900 nm das soluções padrão, amostra, placebo e diluente. Os espectros das varreduras de cada solução estão presentes nas Figuras 32, 33, 34 e 35 respectivamente.

FIGURA 33. Espectro de varredura das soluções amostra de NMS β -CD no UV-Visível (200 a 900 nm) diluída em hidróxido de sódio 0,1 M

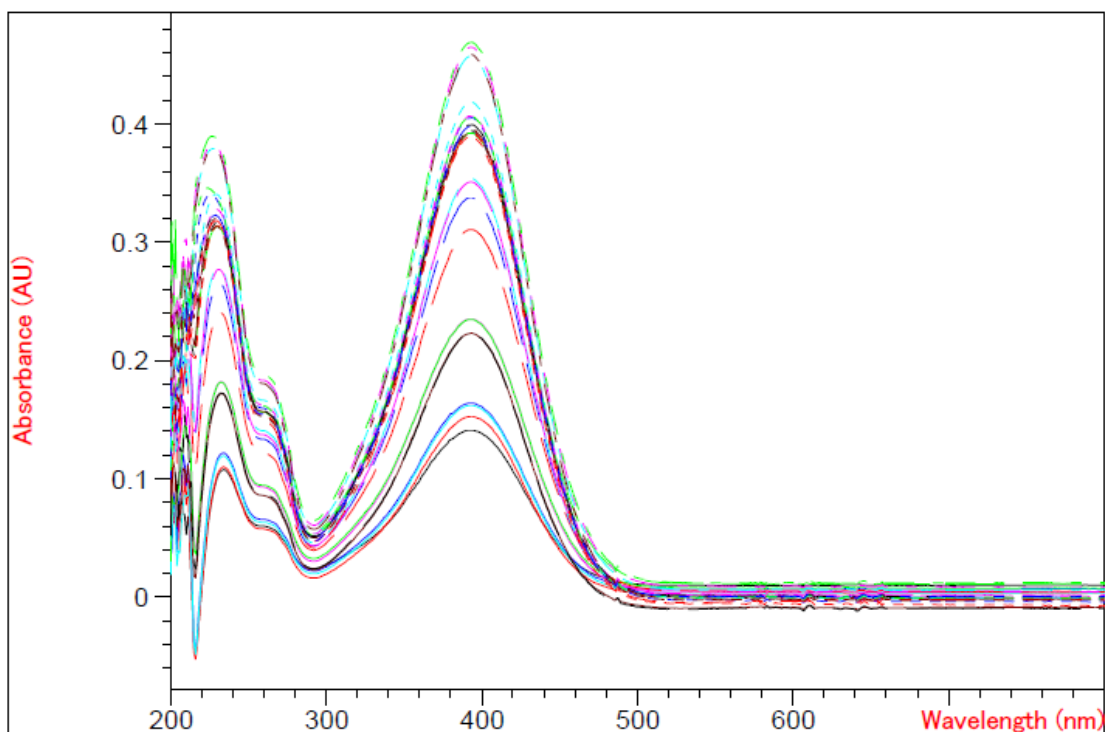


FIGURA 34. Espectro de varredura da solução placebo diluída em hidróxido de sódio 0,1 M no UV-Visível (200 a 900 nm)

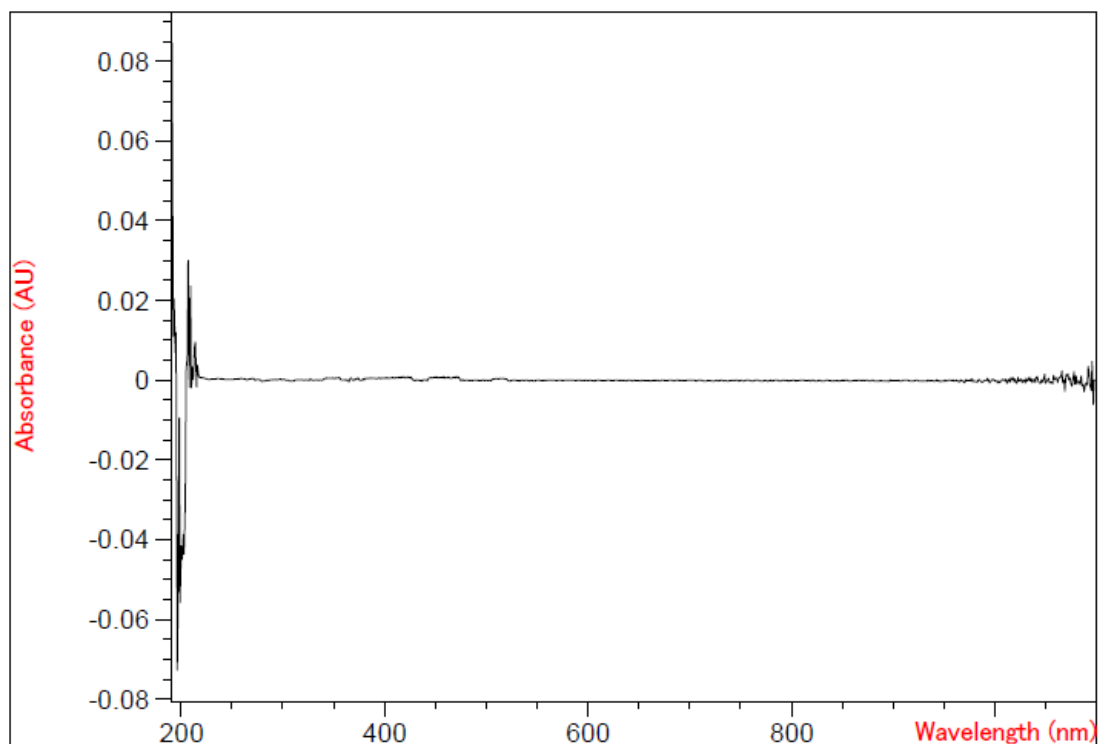
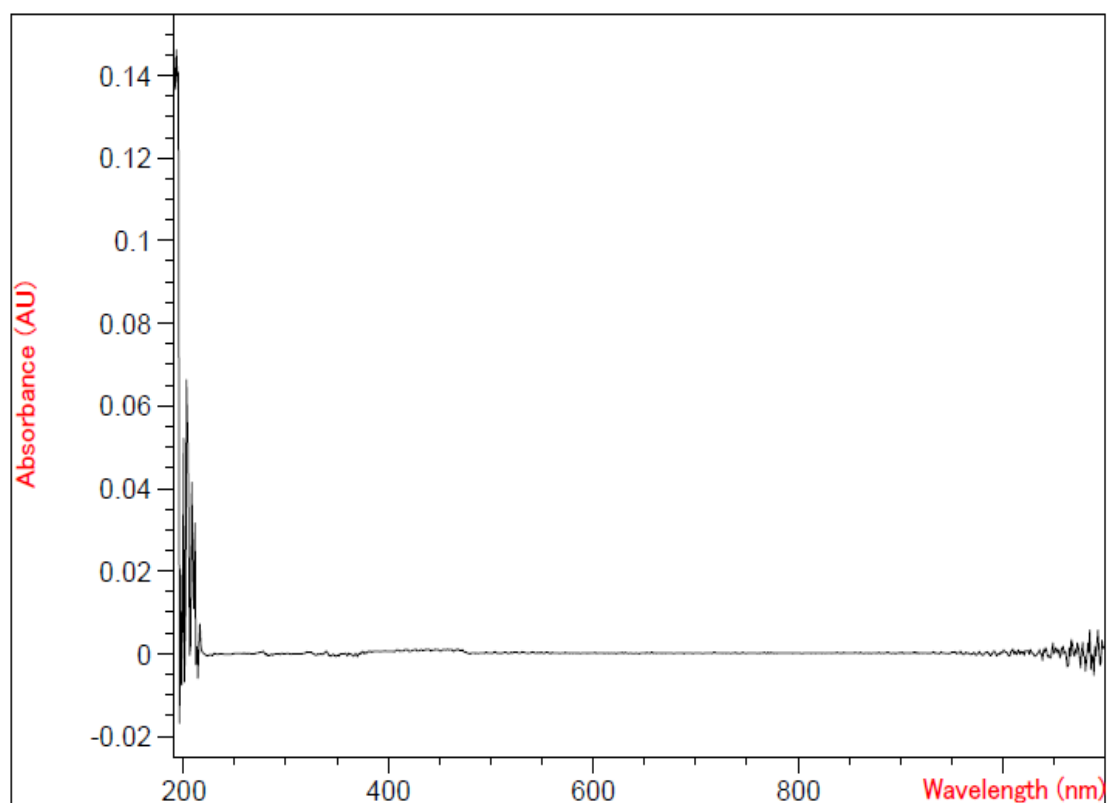


FIGURA 35. Espectro de varredura da solução diluente (hidróxido de sódio 0,1 M) no UV-Visível (200 a 900 nm)



A análise dos espectros de varredura mostraram que as soluções de placebo e diluente não interfeririam na quantificação do analito NMS β -CD no comprimento de onda de 390 nm (comprimento em que apresenta absorção máxima). As absorbâncias obtidas para cada solução no comprimento de onda de 390 nm estão presentes na tabela 29.

Tabela 29. Resultados de teste de especificidade

Solução	Média das absorbâncias	Concentração (%)
Padrão	0,59940	100%
Solução diluente (NaOH 0,01M)	0,00107	0,18%
Solução amostra 1	0,54403	90,76%
Solução amostra 2	0,53571	89,37%
Solução amostra 3	0,53927	89,97%
Solução amostra 4	0,55381	92,39%
Solução amostra 5	0,54415	90,78%
Solução amostra 6	0,54859	91,52%
Solução placebo1	0,00442	0,74%
Solução placebo2	0,00398	0,66%
Solução placebo3	0,00367	0,61%
Solução placebo4	0,00789	1,32%
Solução placebo5	0,00733	1,22%
Solução placebo6	0,00750	1,25%

Diante dos resultados obtidos para o teste de especificidade/seletividade foi possível confirmar que a metodologia é capaz de medir exatamente o analito NMS β -CD na presença dos componentes da matriz (placebo), uma vez que sua interferência foi menor que 1,5%. A interferência observada para o para a solução diluente foi de 0,18%. Desta forma, foi possível determinar que o método é seletivo e específico, pois os componentes da matriz e o diluente não interferem na

quantificação do analito e nem em sua absorvância. Assim o teste não é afetado pelo diluente e nem pelo placebo, o que indica ausência de interferência.

5.4.3. Linearidade

A linearidade foi obtida por meio pela análise em triplicata de soluções padrão em sete níveis de concentração dentro da faixa de concentração de trabalho. O valor de Q adotado no estudo de dissolução foi de no mínimo 80,0%. Assim o estudo avaliou a linearidade do método na faixa de 45 a 105%, abrangendo, dessa forma, o intervalo de $\pm 20\%$ em relação ao Q. A concentração de 0,0133 mg/mL de NMS equivalente a 0,0532 mg/mL de NMS β -CD correspondeu a 100%. As absorvâncias encontradas para cada nível de concentração estão demonstradas na tabela 30.

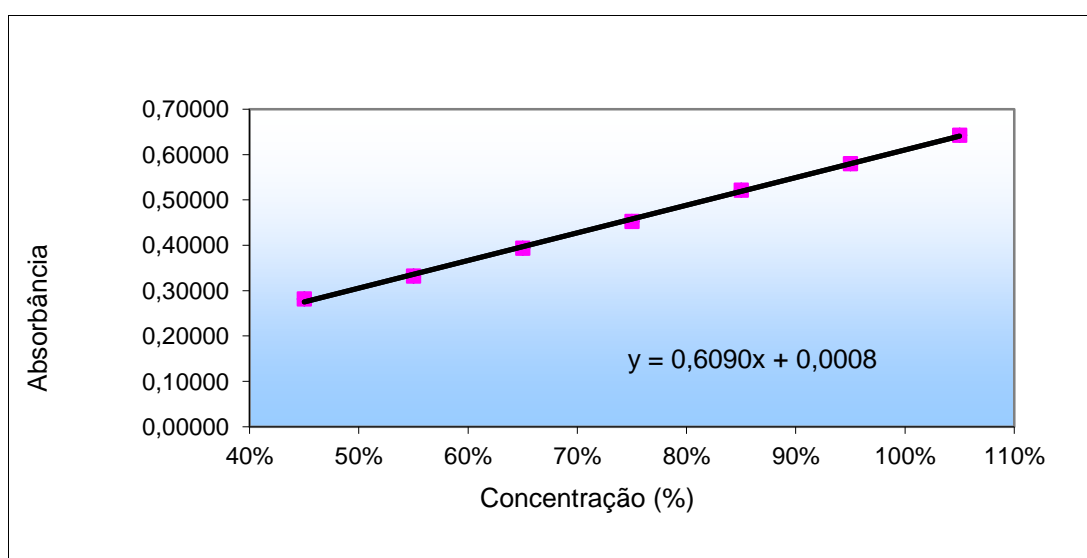
Tabela 30. Demonstrativo das absorvâncias obtidas nos diferentes níveis de concentração para o teste de linearidade

%	Concentração (mg/mL) de NMS	Absorvâncias	Média das absorvâncias
		0,28175	
45%	0,0059994	0,28145	0,28123
		0,28048	
		0,33215	
55%	0,0073326	0,33228	0,33233
		0,33256	
		0,39350	
65%	0,0086658	0,39357	0,39354
		0,39354	
		0,45257	
75%	0,009999	0,45260	0,45266
		0,45282	

		0,52149	
85%	0,0113322	0,52160	0,52154
		0,52154	
		0,57991	
95%	0,01266	0,57993	0,57967
		0,57917	
		0,64259	
105%	0,0139986	0,64171	0,64210
		0,64201	

A partir das absorvâncias médias obtidas para cada concentração plotou-se o gráfico que consta na Figura 36. Os dados da curva analítica foram ajustados por análise de regressão linear utilizando o método dos quadrados mínimos para minimizar a soma dos quadrados dos resíduos da regressão. Para a curva obtida calculou-se o coeficiente de correlação linear (r), o intercepto (a), a inclinação (b), a equação da reta e a soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear. Estes dados encontram-se na tabela 31.

FIGURA 36. Equação da reta obtida pela regressão linear



A equação matemática que descreveu a relação linear entre a absorvância e a concentração foi $y = 0,6090x + 0,0008$. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,9995, o que significa que 99,95% da variação total em torno da média é explicada pela regressão linear. O coeficiente de correlação obtido cumpriu o critério mínimo de aceitação de 0,99 estabelecido pela ANVISA na RE N° 899 de 2003 (BRASIL, 2003). Além disso, ele apontou que houve uma relação linear muito forte entre as variáveis absorvância e concentração.

Tabela 31. Regressão linear dos dados do teste de linearidade

Parâmetro	Especificação	Valor
a - intercepto	<i>informativo</i>	0,0008
b coeficiente angular	<i>informativo</i>	0,6090
Equação da reta	<i>informativo</i>	$y = 0,6090x + 0,0008$
R coeficiente de correlação	> 0,99	0,9995

A soma dos resíduos (erros) obtidos foi de -0,00265, ou seja, muito próximo de zero, conforme consta na tabela 32. Além disso, na Figura 37, foi possível observar que os resíduos estão distribuídos aleatoriamente e de forma independente. Logo, o modelo matemático linear foi capaz de descrever a relação de proporcionalidade entre a absorvância e concentração do ativo na amostra.

Tabela 32. Soma dos resíduos para o teste de linearidade

Conc. (%)	Absorvância prevista (uA)	Resíduos (uA)
	0,27492	0,00683
45%	0,27492	0,00653
	0,27492	0,00556
	0,33585	-0,00370
55%	0,33585	-0,00357
	0,33585	-0,00329
	0,39678	-0,00328
65%	0,39678	-0,00321

	0,39678	-0,00324
	0,45771	-0,00514
75%	0,45771	-0,00511
	0,45771	-0,00489
	0,51864	0,00285
85%	0,51864	0,00296
	0,51864	0,00290
	0,57957	0,00034
95%	0,57957	0,00036
	0,57957	-0,00040
	0,64050	0,00209
105%	0,64050	0,00121
	0,64050	0,00151
Soma Residual		-0,00265

FIGURA 37. Distribuição dos erros residuais

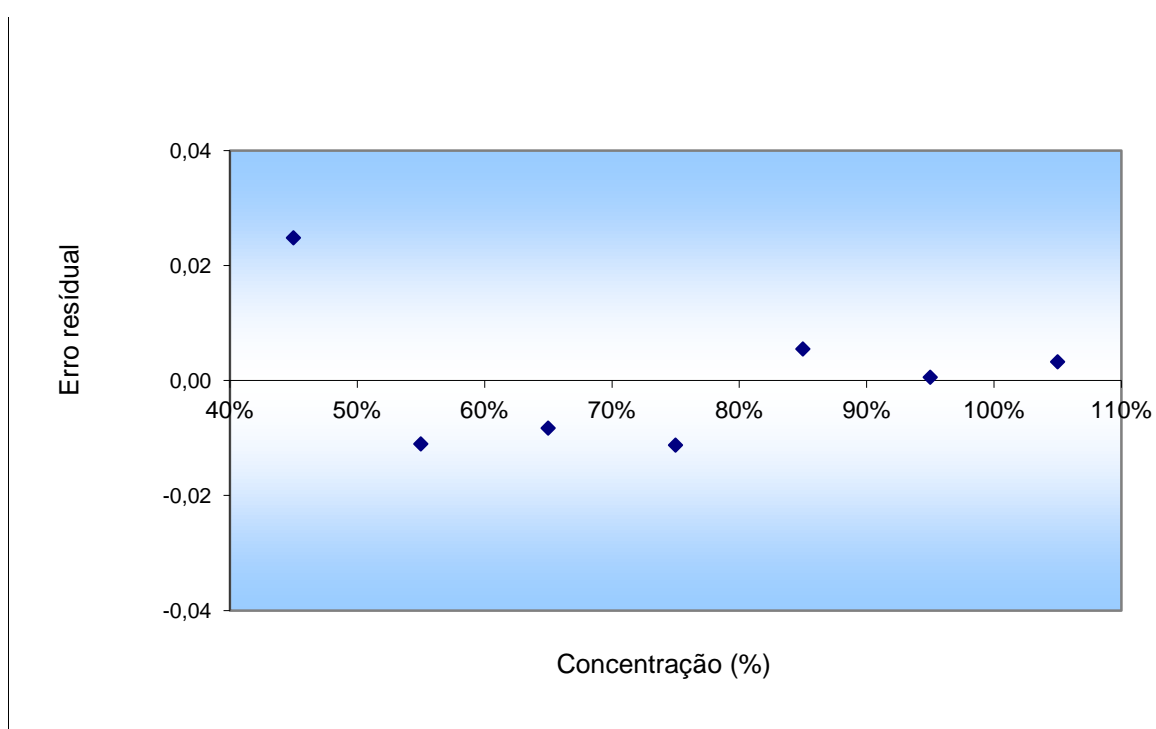


Tabela 33. Teste de Cochran para avaliação da homocedasticidade no teste de linearidade

CONCENTRAÇÕES (%)	ABSORBÂNCIAS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	VARIÂNCIA
45,00%	0,281750	0,28123	0,000664	0,0000004406
	0,281450			
	0,280480			
55,00%	0,332280	0,33233	0,000210	0,0000000439
	0,332560			
	0,332150			
65,00%	0,393500	0,39354	0,000035	0,0000000012
	0,393570			
	0,393540			
75,00%	0,452570	0,45266	0,000137	0,0000000186
	0,452600			
	0,452820			
85,00%	0,521490	0,52154	0,000055	0,0000000030
	0,521600			
	0,521540			
95,00%	0,579910	0,57967	0,000433	0,0000001876
	0,579930			
	0,579170			
105,00%	0,642590	0,64210	0,000447	0,0000002001
	0,641710			
	0,642010			
Ccal para 7 grupos e com 3 réplicas em cada				0,492
Ctab para 7 grupos e com 3 réplicas em cada				0,561

Por meio do teste de Cochran foi possível verificar a homocedasticidade dos dados obtidos na linearidade, pois o C_{cal} (0,492) é menor que o C_{tab} (0,561) de acordo com a tabela 33. Assim houve homogeneidade das variâncias dos resíduos na linearidade no nível de confiança de 95%, a independência e a normalidade da distribuição dos resíduos. Portanto, a curva analítica pode ser descrita pelo método dos mínimos quadrados normais.

A partir do tratamento estatístico realizado foi possível afirmar que o método possui linearidade satisfatória dentro da faixa estudada, ou seja, os resultados são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra.

5.4.4 Precisão

A precisão foi avaliada pela proximidade dos resultados de 6 (seis) preparações da amostra realizada por analistas diferentes em dias diferentes. Os resultados obtidos estão apresentados nas tabelas de 34 e 35.

Tabela 34. Resultados do teste de precisão (dia 1, analista 1, espectrofotômetro 1)

Preparação	Leitura	Absorbâncias	Média das absorbâncias
1	1	0,54412	0,54247
	2	0,54082	
2	1	0,53728	0,53715
	2	0,53702	
3	1	0,53985	0,53971
	2	0,53957	
4	1	0,55076	0,54970
	2	0,54863	
5	1	0,54990	0,54856
	2	0,54722	
6	1	0,55332	0,55135
	2	0,54937	
Desvio Padrão Relativo (DPR) (Especificação: máximo 5%)			1,07%

A resolução RE N° 899 da ANVISA (BRASIL, 2003) não admite valores maiores que 5% de desvio padrão relativo para analisar-se precisão de uma metodologia analítica. A repetibilidade ou precisão intra-corridas foi determinada no primeiro dia pelo analista 1 usando o espectrofotômetro 1. O desvio padrão relativo para este teste foi de 1,07%, logo, o método possui repetibilidade. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 34. Já para a determinação da precisão

intermediária, o analista 2 preparou mais 6 amostras que foram lidas no espectrofotômetro 2. Os valores das absorvâncias estão na tabela 35. O desvio padrão relativo das 6 preparações do 2º dia pelo analista 2 foi de 0,71%.

Tabela 35. Resultados do teste de precisão (2º dia - analista 2 – espectrofotômetro 2)

Preparação	Leitura	Absorbâncias	Média das absorbâncias
7	1	0,54175	0,54130
	2	0,54085	
8	1	0,54615	0,54577
	2	0,54538	
9	1	0,55042	0,55024
	2	0,55005	
10	1	0,54808	0,54790
	2	0,54771	
11	1	0,54298	0,54244
	2	0,54189	
12	1	0,54079	0,54072
	2	0,54064	
Desvio Padrão Relativo (DPR)			0,71%
(Especificação: máximo 5%)			

O método proposto para a análise da dissolução do NMS β -CD 400 mg possui precisão intermediária ou precisão inter-corridas, uma vez que o desvio padrão relativo foi de apenas 0,87% considerando-se as preparações em dias diferentes, por diferentes analistas e em equipamentos diferentes. Os resultados obtidos para a precisão intermediária estão descritos na tabela 36.

Tabela 36. Resultados do teste de precisão intermediária

Preparação	Média das absorvâncias	Preparação	Média das absorvâncias
1	0,54247	7	0,54130
2	0,53715	8	0,54577
3	0,53971	9	0,55024
4	0,54970	10	0,54790
5	0,54856	11	0,54244
6	0,55135	12	0,54072
DPR	1,07%	DPR	0,71%
Desvio Padrão Relativo (DPR)		0,87%	
(Especificação: máximo 5%)			

Além da análise do desvio padrão relativo, aplicou-se o teste estatístico ANOVA à precisão intermediária para comparar as absorvâncias médias obtidas entre as preparações dos dois diferentes dias. Os resultados obtidos estão presentes na tabela 37.

Tabela 37. Resultados do teste de ANOVA para o teste de precisão intermediária

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,00000002708	1	0,00000002708	0,0011	0,97416	4,9646
Dentro dos grupos	0,00024548602	10	0,00002454860			
Total	0,00024551309	11				

A análise de variância (ANOVA) demonstrou que não existe diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos para o teste de precisão intermediária, pois o valor do F calculado (0,0011) foi menor que o valor calculado para o F crítico (4,9646) no nível de confiança de 95%. Portanto, a metodologia analítica é precisa.

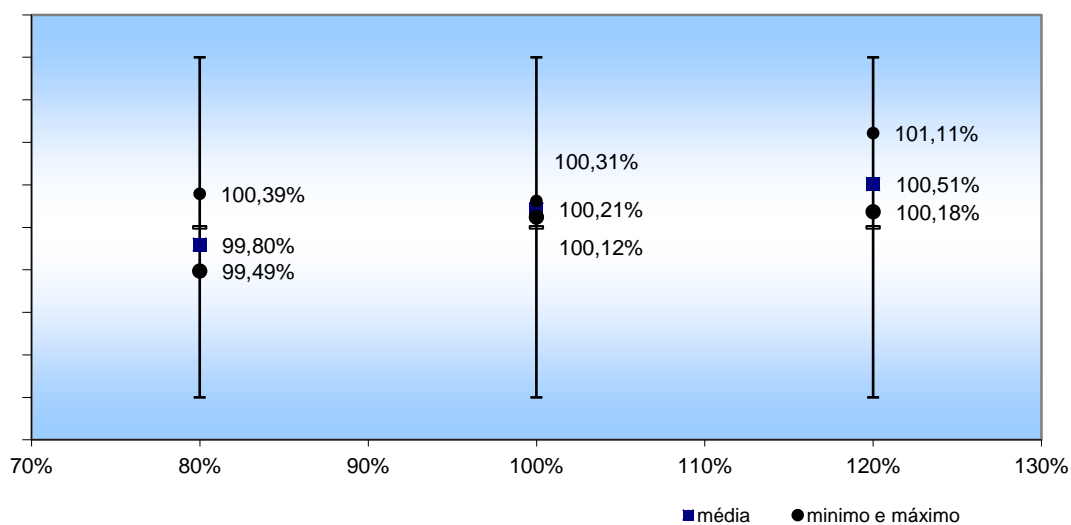
5.4.5. Exatidão

A exatidão do método analítico representa o grau de concordância entre o valor médio obtido de uma série de resultados e o valor de referência. Os limites que foram adotados para este teste foram de 98 a 102% (BRASIL, 2003; USP 38, 2015; ICH, 2005). A exatidão foi verificada através do grau de recuperação para três níveis de concentração: baixa, média e alta. Os dados experimentais obtidos revelaram que a média de recuperação do analito NMS β -CD foi de 100,17% e que o maior valor de desvio padrão relativo foi de 0,4% na concentração de 120%. Verificou-se que em todas as concentrações experimentais utilizadas (80, 100 e 120%) os teores médios de recuperação encontram-se dentro dos limites especificados, o que permite concluir a adequada exatidão do método. Na tabela 38 e na Figura 38 estão presentes os resultados e a análise estatística do teste de exatidão.

Tabela 38. Resultados do teste de exatidão (Grau de recuperação)

Replicata	80%	100%	120%
	Conc. (%)	Conc. (%)	Conc. (%)
	79,64	100,23	121,33
A1	79,65	100,24	121,22
	79,59	100,17	121,19
	79,67	100,31	120,22
A2	79,65	100,29	120,29
	79,61	100,27	120,36
	80,32	100,13	120,31
A3	80,22	100,15	120,33
	80,19	100,12	120,24
DRP(%)	0,38	0,07	0,40
Média	79,84	100,21	120,61
Mínimo	79,59	100,12	120,22
Máximo	80,32	100,31	121,33
Exatidão 98,0 a 102,0%	99,80	100,21	100,51

FIGURA 38. Demonstrativo dos valores de recuperação



5.4.6. Robustez

A robustez da metodologia foi avaliada através da adequação do sistema e da variação do teor de amostras submetidas a condições alteradas propositalmente no método analítico. Foram alterados os seguintes parâmetros: comprimento de onda e marca de filtro. Os resultados obtidos para a robustez estão demonstrados nas tabelas 39 e 40.

Tabela 39. Resultados do teste de robustez - Variação no comprimento de onda

Parâmetro	Especificação	Tipo	*390 nm	392 nm	394 nm
Média das absorvâncias	-	P	0,60121	0,60372	0,60349
		A	0,55132	0,55309	0,55280
Teor da amostra	91,70% ± 2,0% de 89,87 % a 93,53%	-	91,70%	91,61%	91,60%

Legenda: P - Padrão; A - Amostra; * - Condição original do método

Tabela 40. Resultados do teste de robustez – Variação da marca das membranas filtrantes

Parâmetro	Especificação	Tipo	*Membrana 0,45 µm	Nalgon	Max
Média das absorvâncias	-	P	0,61194	0,60372	0,61167
		A	0,55690	0,55309	0,55975
Teor da amostra	91,00% ± 2,0% de 89,18 % a 92,82%	A	91,00%	91,61%	91,51%

Legenda: P - Padrão; A - Amostra; * - Condição original do método

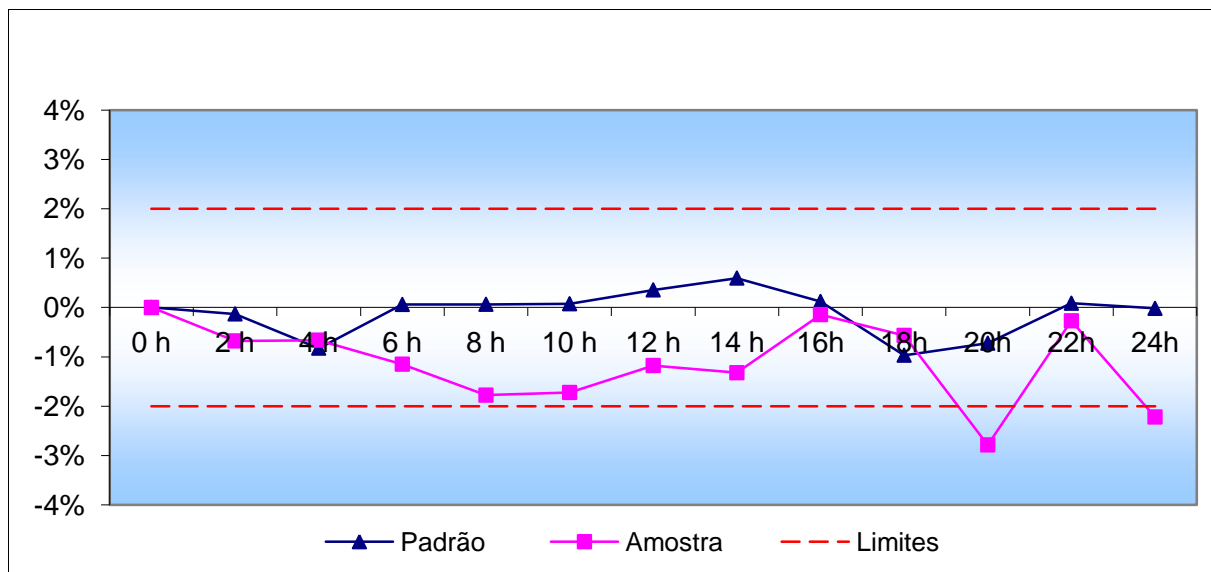
Os dados presentes na tabela 39 revelaram que a mudança no comprimento de onda não alterou o desempenho do método, pois os resultados obtidos em diferentes comprimentos de onda foram semelhantes estatisticamente. A variação observada foi inferior a 1%. Os resultados obtidos para a membrana de 0,45 µm e para papel de filtro das marcas Nalgon® e Max® também foram semelhantes conforme os resultados que estão presentes na tabela 40. A variação observada para a robustez de filtro também foi inferior a 1%.

O ensaio de estabilidade de soluções analíticas foi realizado através da comparação das absorvâncias iniciais das soluções padrão e amostra recém preparadas (tempo zero) com a absorvância das mesmas soluções depois de tempos pré-determinados. Os resultados do ensaio e suas variações estão apresentados na tabela 41 e na Figura 39.

Tabela 41. Resultados do teste de robustez - estabilidade das soluções analíticas.

		0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	14 h	16h	18h	20h	22h	24h
Padrão	± 2%	0,00 %	- 0,13 %	- 0,82 %	0,06 %	0,06 %	0,07 %	0,36 %	0,59 %	0,12 %	- 0,97 %	- 0,72 %	0,09 %	- 0,02 %
Amostra	± 2%	0,00 %	- 0,68 %	- 0,66 %	- 1,15 %	- 1,78 %	- 1,72 %	- 1,18 %	- 1,32 %	- 0,14 %	- 0,57 %	- 2,79 %	- 0,27 %	- 2,22 %

FIGURA 39. Resultados do teste de robustez – Carta controle para avaliar a estabilidade das soluções analíticas.



A solução padrão mostrou-se estável por 24 horas enquanto que a solução amostra por 18 horas. Durante estes períodos as variações observadas nas absorbâncias foram inferiores a $\pm 2,0\%$ em relação a absorbância inicial, de acordo com a carta controle presente na Figura 39. As variações superiores a $\pm 2,0\%$ foram consideradas significativas.

Assim, o método desenvolvido para a dissolução do medicamento NMS β -CD 400 mg comprimido é robusto, pois é capaz de resistir a pequenas e deliberadas variações nos parâmetros analíticos sem comprometer os resultados analíticos, a exatidão, precisão e seletividade. Isso demonstrou a confiança durante o uso normal.

6 CONCLUSÃO

A caracterização da NMS β -CD por DSC e por DRX demonstrou que a NMS não está formando um complexo de inclusão com β -CDs. A matéria-prima analisada é apenas uma mistura física de NMS com β -CDs. A forma polimórfica encontrada para a NMS isolada foi a I que se caracteriza por ser mais estável (possui menor conteúdo energético) e menos solúvel que a forma II. Não foi possível determinar a forma polimórfica da amostra de NMS β -CD por DRX, pois a β -CD interferiu no padrão de difração da NMS. A determinação da forma polimórfica nesse caso deu-se por meio de DSC.

O estudo de solubilidade realizado neste trabalho para a NMS β -CD em diferentes meios de dissolução dentro da faixa de pH fisiológico (1,2 a 6,8) revelou que a mistura da NMS com β -CD aumentou em pelo menos 10 vezes a solubilidade do fármaco. A mistura física da NMS com β -CD foi uma importante estratégia farmacotécnica para contornar o problema da baixa solubilidade da NMS e para melhorar a velocidade de dissolução e conseqüentemente a biodisponibilidade oral.

Na execução do teste de solubilidade observou-se que a membrana 0,45 μ m foi a mais indicada para a quantificação do IFA. O fármaco NMS β -CD foi estável por 24 horas em água, em HCl, 0,1 M, tampão acetato pH 4,5, tampão fosfato pH 6,8 e em solução aquosa de LLS 1% (p/v). Não foi observada variação significativa de pH entre o início e o final do estudo de solubilidade.

Durante o desenvolvimento do método constatou-se que as condições mais discriminativas para a execução do teste de dissolução foram: 60 minutos para duração do teste de dissolução, 900 mL para o volume do meio de dissolução, solução aquosa de LLS 1% (p/v) para o meio de dissolução, 100 rpm para a rotação e pá para o aparato.

O critério de aceitação Q adotado foi de no mínimo 80% do fármaco dissolvido em solução de LLS 1% em 60 minutos de teste. Isso se justifica pelo fato da NMS estar misturada com β -CD e pelo meio de dissolução conter o tensoativo LLS acima da concentração micelar crítica.

A validação do método desenvolvido confirmou e assegurou sua adequabilidade ao uso pretendido, pois comprovou precisão, exatidão, robustez, especificidade e seletividade.

É necessário, ainda, a realização de estudos adicionais como os de correlação *in vivo* - *in vitro* para o estabelecimento de uma relação racional entre as propriedades biológicas do medicamento NMS β -CD comprimido e suas características físico-químicas. Isso representaria um grande avanço e traria vantagens econômicas e éticas. Há uma maior probabilidade de se obter uma correlação *in vivo* - *in vitro* quando a absorção do fármaco é limitada pela dissolução e isso ocorre para fármacos da classe biofarmacêutica II (caso da nimesulida).

REFERÊNCIAS

ADAMS, E.; COOMANS, D.; SMEYERS-VERBEKE, J.; MASSART, D. L. Application of linear mixed effects models to the evaluation of dissolution profile. **Int. J. Pharm.**, v. 226, p. 107-125, 2001.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA (2014). **Consulta de produtos**. Disponível em: http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto/consulta_medicamento.asp. Acesso em 22/02/2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. 5ª ed. Brasília: Agencia Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA; 2010.

ALEXANDRINO, G. L. **Encapsulação, Caracterização Físico-química e Estudo Teórico do Fármaco Tiabendazol em β -Ciclodextrina**. Dissertação (Mestrado). Instituto de Química, Departamento de Física, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP. 2011.

ALVES, M. C.; POLONINI, H. C.; VAZ, U. P.; FERREIRA, A. de O.; BRANDÃO, M. A. F. Estudo comparativo de preparações orais sólidas contendo carbamazepina: teste e perfil de dissolução. **Rev. Bras. Farm.** 93(4): 487-492, 2012.

AMIDON, G.L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharm. Res.**, v. 12, p. 413–420, 1995.

ANAND, O.; YU, L. X.; CONNER, D. P.; DAVIT, B. M. Dissolution Testing for Generic Drugs: An FDA Perspective. **The AAPS Journal**, v. 13, n. 3, 2011.

APLEY, M.; CRIST, G. B.; FELLNER, V.; GONZALEZ, M. A.; HUNTER, R. P.; MARTINEZ, M. N.; MESSENHEIMER, J. R.; MODRIC, S.; PAPICH, M. G.; PARR, A. F.; RIVIERE, J. E.; Marques, M. R. C. Determination of Thermodynamic Solubility of Active Pharmaceutical Ingredients for Veterinary Species: A New USP General Chapter. **STIMULI TO THE REVISION PROCESS**, Vol. 41(3), May–June 2015.

ARAÚJO, M. V. G. **Polímeros derivados de ciclodextrina: síntese, caracterização e aplicação farmacêutica**. Tese (Doutorado). Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

ARAÚJO, G. L. B de.; JR., A.P.; ANTÔNIO, S. G.; SANTOS, C. de O. P.; MATOS, J. do R. Polimorfismo na produção de medicamentos. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**;33(1):27-36, 2012.

ASBAHR, A. C. C. **Obtenção e caracterização de complexos binários e ternários de finasterida**. Dissertação (Mestrado). Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

AUDA, S. H. Nimesulide/Methyl β -Cyclodextrin Inclusion Complexes Physicochemical Characterization, Solubility, Dissolution, and Biological Studies. **Drug development research**. 75 : 68–75, 2014.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BATLOUNI, M. Anti-Inflamatórios Não Esteroides: Efeitos Cardiovasculares, cerebrovasculares e Renais. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 4, 2010.

BERGESE, P.; BONTEMPI, E.; COLOMBOB, I.; GERVASONI, D.; DEPERO, L.E. Microstructural investigation of nimesulide–crospovidone composites by X-ray diffraction and thermal analysis. **Composites Science and Technology**, v. 63, p. 1197–1201, 2003.

BESSONE, F. *et al.* The spectrum of nimesulide-induced-hepatotoxicity. An overview. Anti Inflammatory & Anti-Allergy Agents. **Med Chem**. v.9, n.4, p. 355-365, 2010.

BOTTOM, R. The role of modulated temperature differential scanning calorimetry in the characterization drugmolecule exhibiting polymorphic and glass forming tendencies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 192, p. 47-53, 1999.

BRASIL. Lei nº 9787 de 10 de fevereiro de 1999. Altera a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 fev 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual de garantia da qualidade analítica**. / Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA/ACS, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 310, de 1 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, 22 dez. 2000. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br>. Acesso em Set. de 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução Específica – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da União**, 02 de jun. de 2003. Disponível em: < www.anvisa.gov.br >. Acesso em: 26 out. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução Específica – RDC nº 31, de 11 de agosto de 2010. **Diário Oficial da União**, 12 de ago. de 2010. Disponível em: < www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 26 out. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Nota técnica – Nota Técnica nº 003/2013/CEFAR/GTFAR/GGMED/ANVISA**, de 16 de abril de 2013. Disponível em: << <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ddf957004f6206189687f79a71dcc661/nota+t%C3%A9cnica.pdf?MOD=AJPERES&attachment=true&id=1366839901426>>>. Acesso em: 26 out. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução Específica – RDC nº 60, de 10 de outubro de 2014. **Diário Oficial da União**, 13 de out. de 2014. Disponível em: < http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0060_10_10_2014.pdf>. Acesso em: 03 nov. 2014.

BRITTAİN, H.G. **Polymorphism in pharmaceutical solids**. Marcel Dekker: New York, v. 95, 1999.

BRITTAİN, H.G. X-ray diffraction II: using single-crystal X-ray diffraction to study polymorphism and solvatomorphism. **Spectroscopy**, v. 15, p. 34-39, 2000.

BRYN, S. *et al.* Pharmaceutical solids: A strategic approach to regulatory considerations. **Pharmaceutical Review**, v. 12, n. 7, p. 945-954, 1995.

BYRN, S.R., PFEIFFER R. R.AND STOWELL J. G.**Solid- State Chemistry of Drugs**, 2ª ed. West Lafayette: Indiana 1999.

CAMBRIDGE SOFT CORPORATION. **ChemDraw 8.0**. Chemical Structure Drawing Standard, Cambridge, 2003.

CANDELARIO-JALIL, E. Nimesulide as a promising neuroprotectant in brain ischemia: New experimental evidences, **Pharmacological Research**, p. 266–273, 2008.

CARINI, J. P.; PAVEI, C.; SILVA, A. P. C.; MACHADO, G.; MEXIAS, A. S.; PEREIRA, V. P.; FIALHO, S. L.; MAYORGA, P. Solid state evaluation of some thalidomide raw materials. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 372, p. 17-23, 2009.

CHAROENCHAITRAKOOL, M.; DEHGHANI, F.; FOSTER, N.R. Utilization of supercritical carbon dioxide for complex formation of ibuprofen and methyl- β -cyclodextrin. **Int. J. Pharm.** v. 23, p. 103–112, 2002.

CHATTERJEE, S.; PAL, J.; BISWAS, N. Nimesulide-induced hepatitis and toxic epidermal necrolysis. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 54, n.2, p. 150-151, 2008.

CHOWDARY, K.P.R; RAJYALAKSHIMI, Y. Dissolution rate in modern pharmacy. **East Pharm.**, v. 30, n. 350, p. 51-4. 1987.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION ON METHODS OF ANALYSIS AND SAMPLING. **Criteria for Evaluating Acceptable Methods of Analysis for Codex Purposes**, CX/MAS 95/3, 1995.

CONNOLLY, J. R. **Introduction to X-ray Powder Diffraction**. Spring, 2005. Disponível em: <<http://www.trincoll.edu/~jgourley/GEOS%20204%20files/01-XRD-Intro.pdf>>. Acessado em: 26 out. 2014.

CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA DO ESTADO DE SÃO PAULO - CRFSP. **Sentinela Constante: Farmacovigilância monitora novos medicamentos no mercado e garante a segurança ao paciente**. Farmácias Notificadoras: São Paulo, n. 21, 2011.

CORTI, G. et al. Physicalchemical characterization of binary systems of metformin hydrochloride with triacetyl- β -cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.45, p.480-186, 2007.

DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 2012.

DANESH, A., CHEN, X.; DAVIES, M. C., ROBERTS, C. J., SANDERS, G. H. W., TENDLER, S. J. B., WILLIAMS, P. M. Polymorphic Discrimination Using Atomic Force Microscopy: Distinguishing between Two Polymorphs of the Drug Cimetidine. **Langmuir**. v. 16, p. 866-870, 2000.

DELLIS, D.; GIAGINIS, C.; TSANTILI-KAKOULIDOU, A. Physicochemical profile of nimesulide. Exploring the interplay of lipophilicity, solubility and ionization. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 44, p. 57-62, 2007.

DEZANI, A. B.; PEREIRA, T. M.; CAFFARO, A. M.; REIS, J. M.; SERRA, C. H. D. R. Equilibrium solubility versus intrinsic dissolution: characterization of lamivudine, stavudine and zidovudine for BCS classification. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 49, n. 4, oct./dec., 2013.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Pre-Authorization Evaluation of Medicines for Human Use**. Committee for Medicinal Products for Human Use. DRAFT: Guideline on the investigations of bioequivalence. London, 2008. (CPMP/EWP/QWP/1401/98). Disponível em:

<http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003011.pdf>. Acessado em: 26 out. 2014.

FABIOLA, G. F.; PATTABHI, V.; NAGARAJAN, K. Structural Basis for Selective Inhibition of COX-2 by Nimesulide. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 2337-2344, 1998.

FERNANDES, W. B.; NAPOLITANO, H. B.; NODA-PEREZ, C.; LARIUCCI, C. Aplicações tecnológicas da metodologia cristalográfica. **Revista Processos Químicos**, n. 7, 2010, p.19-27.

FERREIRA, F. F.; ANTONI, S. G.; ROSA, P. C. P.; SANTOS, C. D. P. Crystal structure determination of mebendazole form a using high-resolution synchrotron X-ray powder diffraction data. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 1734-1744, 2010.

FERREIRA, T. F.; MOURÃO, A. S. R.; RIBEIRO, L. A. L.; FREITAS, M. B. Estudo comparativo da influência dos excipientes na qualidade de hidroclorotiazida 25 mg em medicamentos referência e genéricos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 34(1):63-68, 2013.

FILHO, E. Q. da S.; AGUIAR, J. L. N. de; ALBERT, A. L. M.; NOBREGA, A. W. Estudo das propriedades físico-químicas da glibenclamida e excipientes que influem sobre resultados do ensaio de dissolução para medicamento similar e genérico. **Rev Inst Adolfo Lutz**. São Paulo, 72(4):316-21, 2013.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. **Guidance for industry: dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms**. U.S. Department of Health, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Maryland, 1997. Disponível em <<<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070237.pdf>>> Acesso em: 4 out 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for Industry Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics**. 2014. Disponível em: <<<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM386366.pdf>>>. Acessado em: 26 out. 2014.

GIORDANO, F., NOVAK, C, MOYANO, J. R. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. **Thermochimica Acta**. V 380, N 2, p. 123-151(29), 2001.

GIRON, D. Thermal analysis and calorimetric methods in the characterization of polymorphs and solvates. **Thermochimica Acta**, v. 248, p. 1-59, 1995.

GOUVEIA, M. A. **Obtenção e caracterização de dispersões sólidas de nimesulida**. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo. 2011.

GRAU, M.J.; KAYSER, O.; MÜLLER, R.H., Nanosuspensions of poorly soluble drugs – reproducibility of small scale production. **Int. J. Pharm.**, v. 196, p.155–157, 2000.

HANCOCK, B.C.; ZOGRAFI, G. Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems. **J. Pharm. Sci.**, v. 86, p. 1–12 ,1997.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. DOQ-CGCRE-008. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos**. Rio de Janeiro: INMETRO, 2010.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION - ICH. **Guideline for Industry: Q2B text on Validation of Analytical Procedures: Methodology**. Geneva: ICH Steering Committee; Commission of the European Communities, 1996.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION - ICH. **Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: Text and Methodology – Q2(R1): Current Step 4 version Parent Guideline Dated 27 October 1994 (Complementary Guideline on Methodology dated 6 November 1996 incorporated in November 2005)**. Geneva: ICH Steering Committee; Commission of the European Communities; 2005.

JAMZAD, S. FASSIHI, R. Role of surfactant and pH on dissolution properties of fenofibrate and glipizide - A technical note. **AAPS PharmSciTech**, n. 7. p. E1- E6, 2006.

JANTRATID, E. PRAKONGPAN, S.; DRESSMAN, J. B.; AMIDON, G. L.; JUNGINGER, H. E.; MIDHA, K. K.; BARENDTS, D. M. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Cimetidine. **Journal of Pharmaceutical Science**. v. 95, n. 5, p. 974-984, 2006.

JUNCO, S.; CASIMIRO, T.; RIBEIRO, N.; PONTE M. N.; CABRAL H.M.M. A comparative study of naproxen: b-cyclodextrin complexes prepared by conventional methods and using supercritical carbon dioxide. **J. Incl. Phen.**, v. 44, p. 117–121, 2002.

KEROLA, M; VUOLTEENAHO, K.; KOSONEN, O.; KANKAANRANTA, H.; SARNA, S.; MOILANEN, E. Effects of nimesulide, acetylsalicylic acid, ibuprofen and nabumetone on cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2-mediated prostanoid production in healthy volunteers ex vivo. **Basic ClinPharmacolToxicol**, v. 104, n. 1, p. 17-21, 2009.

KHAKSA, G.; UDUPA, N. Rapid and sensitive method for determination of nimesulide in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 727, n 1-2, p. 241-244, 1999.

KHAN, M. Z. I. Dissolution testing for sustained or controlled release oral dosage forms and correlation with in vivo data: challenges and opportunities. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 140, p. 131-143, 1996.

KHAN, S. Nimesulide and adverse drug reactions: time for a database. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 54, n. 3, p.242, 2008.

KOVARIKOVA, P.; MOKRY, M.; KLIMES, J. Photochemical stability of nimesulide. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 31, n. 4, p. 827-832, 2003.

LARRAÑETA, E.; ISASI, J.R. Non-covalent hydrogels of cyclodextrins and poloxamines for the controlled release of proteins. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 674-681, 2014.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 87-93, 2001.

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

MARKMAN, B. E. O.; ROSA; P. C.P.; KOSCHTSCHAK, M. R. W. Avaliação da qualidade de cápsulas de sinvastatina de farmácias magistrais, **Rev Saúde Pública**; 44(6):1055-62, 2010.

MONEGUINI, M.; KIKICB, I.; PERISSUTTIA, B.; FRANCESCHINISA, E.; CORTESIBA, A. Characterisation of nimesulide–betacyclodextrins systems prepared by supercritical fluid impregnation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 637–644, 2004.

MONTGOMERY, D. C. **Introdução ao Controle Estatístico de Qualidade**. Rio de Janeiro: LTC, 2004.

MOREIRA, G. F. *et al.* Aplicação da Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) para Determinação da Pureza de Fármacos. **Produto&Produção**, vol. 11, n. 1, p. 22 - 29, 2010.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 101, p. 238–250, 2014.

MURA, P.; FAUCCI, M.T.; PARRINI, P.L. Effects of grinding with microcrystalline cellulose and cyclodextrins on the ketoprofen physicochemical properties. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 27, p. 119–128, 2001.

NEWMAN, A. W.; Byrn, S. R. Solid-state analysis of the active pharmaceutical ingredient in drug products. **Drug Discovery Today**. v.8, n.19, p. 898-905, 2003.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. de L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química. Nova**, v. 34, n. 7, p. 1224-1230, 2011.

PEREIRA, A.V., GARABELI, A.A., SCHUNEMANN, G.D. BORCK, P.C.: Determination of Dissociation Constant (K-a) of Captopril and Nimesulide - Analytical Chemistry Experiments for Undergraduate Pharmacy. **Quim Nova**, v. 34, n. 9, p. 1656, 2011.

POSTALI, M. **Estudo De Bioequivalência - Proposição De Um Modelo Animal Em Ratos Para Avaliação Preditiva Da Biodisponibilidade De Formulações Contendo Nimesulida Em Humanos**. Dissertação (Mestrado Profissional em Farmacologia), Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, Toledo, 2011.

RANG, H.P., DALE, M.M. **Farmacologia**. 7. Ed. Elsevier. Rio de Janeiro, 2012.

RAW, A. S.; FURNESS, M. S.; GILL, D. S.; ADAMS, R. C.; HOLCOMBE, F. O.; YU, L. X. Regulatory considerations of pharmaceutical solid polymorphism in abbreviated new drug applications (ANDAs). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 397-414, 2004.

RIZZATTI, I. M.; ZANETTE, D. R. Determinação potenciométrica da concentração micelar crítica de surfactantes: uma nova aplicação metodológica no ensino de Química. **Quim. Nova**, v. 32, n. 2, p. 518-521, 2009.

ROSSI, C. G. F. T.; DANTAS, T. N. C.; NETO, A. A.; MACIEL, M. A. M. Tensoativos: uma abordagem básica e perspectivas para a aplicabilidade industrial. **Rev. Univ. Rural. Sér. Ci. Exatas e da Terra**, Seropédica. Rio de Janeiro, EDUR, v. 25, n. 1-2, p. 59-71, 2006.

ROY, S.; AITIPAMULA, S.; NANGIA, A. Thermochemical analysis of venlafaxine hydrochloride polymorphs 1-5. **Crystal Growth & Design**, v. 5, p. 2268-2276, 2005.

RUELA, A. L. M.; ARAÚJO, M. B.; PEREIRA, G. R. Desenvolvimento e validação de um método analítico rápido por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de NMS em estudos de liberação in vitro. **Quim.Nova**, v. 32, n. 1, p. 165-168, 2009.

SANPHUI P., SARMA, B., NANGIA, A. Phase Transformation in Conformational Polymorphs of Nimesulide. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 100, n. 6, 2011

SANTOS, F. K. G.; ALVES, J. V. A.; DANTAS, T. N. C.; NETO, A. A. D.; DUTRA JR., T. V. D.; NETO, E.L.B. **Determinação da concentração micelar crítica de tensoativos obtidos a partir de óleos vegetais para uso na recuperação avançada de petróleo**. 4º PDPETRO. Campinas, São Paulo, 2007.

SILVA, C. C. P.; MARTINS, F. T.; HONORATO, S. B.; BOECHAT, N.; AYALA, A. P.; ELLENA, J. Triple structural transition below room temperature in the antifilarial drug diethylcarbamazinecitrate. **Crystal Growth & Design**, v. 10, p. 3094-3101, 2010.

SILVA, P. **Farmacologia**, 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SILVA, R. L.; VOLPATO, N. M. Meios para dissolução de comprimidos de nimesulida: ação dos tensoativos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 2, 2002.

SINGHAL, D.; CURATOLO, W. Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 335– 347, 2004.

SKIBA, M., LAHIANI-SKIBA, M., MILON, N., BOUNOURE, F., FESSI, H. Preparation and Characterization of Amorphous Solid Dispersions of Nimesulide in Cyclodextrin Copolymers. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology** Vol. 13, 1–8, 2013.

SWANEPOEL, E.; LIEBENBERG, W.; VILLIERS, M. M. de. Quality evaluation of generic drugs by dissolution test: changing the US dissolution medium to distinguish between active and non-active mebendazole polymorphs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 55, p. 345-349, 2003.

TECHIO, P. X.; BELO, M. A. A. Estrutura química e interação molecular farmacodinâmica entre salicilatos e oxicans. **Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v.8, N.14; p. – 2012.

TEIXEIRA, A. C. L. S. **Interação de fármacos com ciclodextrinas**. Ciclo Integrado em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, USP 38: **The National Formulary: NF-33**, Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2015.

VIEIRA, F. P.; REDIGUIERI, C. F.; REDIGUIERI, C. F. **A Regulação de Medicamentos No Brasil**. Ed. Artmed, Porto Alegre, 2013.

VIRTANEN, T.; MAUNU, S. L. Quantification of a polymorphic mixture of an active pharmaceutical ingredient with solid state C-13 CPMAS NMR spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 394, p. 18-25, 2010.

WATERS CORPORATION. **Empower PDA Software: Getting Started Guide**. Revisão A, Estados Unidos, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations**; Thirty-second report. WHO Technical Report Series: Geneva, n.823, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Pharmaceutical development for multisource (Generic) Pharmaceutical Products**. v. 1, 2010.

XUE, D.; ZHENG, Q.; LI, H.; QIAN, S.; ZHANG, B.; PAN, Z. Selective COX-2 inhibitor versus nonselective COX-1 and COX-2 inhibitor in the prevention of heterotopic ossification after total hip arthroplasty: a meta-analysis of randomised trials. **International Orthopaedics**, v. 35, n. 1, p. 3-8, 2011.

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.

ZENCIRCI, N.; GELBRICH, T.; APPERLEY, D. C.; HARRIS, R. K.; KAHLENBERG, V.; GRIESSER, U. J. Structural features, phase relationships and transformation behavior of the polymorphs I-VI of phenobarbital. **Crystal Growth & Design**, v. 10, p. 302-313, 2010.

ZHANG, J.; MA, P. X. Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: Recent progress and future perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 9, p. 1215-1233, 2013.