



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

TALITA ATANAZIO ROSA

**DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO E ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO DE
DIFERENTES COMPRIMIDOS DE LIBERAÇÃO PROLONGADA DE
BENZNIDAZOL PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS**

Orientador:

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

Coorientadora:

Prof^a. Dr^a. Larissa Araújo Rolim

**RECIFE
2015**

TALITA ATANAZIO ROSA

**DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO E ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO DE
DIFERENTES COMPRIMIDOS DE BENZNIDAZOL PARA O TRATAMENTO DA
DOENÇA DE CHAGAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Produção e Controle de Medicamentos

Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Larissa Araújo Rolim

**Recife
2015**

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

R788d Rosa, Talita Atanzio.
Desenvolvimento farmacotécnico e estudos de dissolução de diferentes comprimidos de liberação prolongada de benznidazol para o tratamento da doença de Chagas / Talita Atanzio Rosa. – Recife: O autor, 2015.
88 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Pedro José Rolim Neto.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2015.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Doença de Chagas. 2. Tripanossomicidas. 3. Comprimidos. 4. Estudos de dissolução. 5. Correlação in vitro - in vivo. I. Rolim Neto, Pedro José (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2015-084)

TALITA ATANAZIO ROSA

**DESENVOLVIMENTO DE DIFERENTES COMPRIMIDOS DE LIBERAÇÃO
PROLONGADA DE BENZNIDAZOL PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE
CHAGAS E ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 25/02/2015

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto (Presidente e Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Rosali Maria Ferreira da Silva (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Lariza Darlene Santos Alves (Examinadora Externa)
Centro Universitário Maurício de Nassau - UNINASSAU



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof^a Dr^a Vânia Pinheiro Ramos

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof^a Dr^a Ana Cristina Lima Leite

À minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deuhy66s por ter permitido que este trabalho tenha sido realizado.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Pedro Rolim e Prof^a Dr^a Larissa Rolim, pelos ensinamentos e pelo apoio recebido durante esse período.

Aos integrantes do LTM pela convivência, amizade e apoio, em especial aos doutorandos José Lourenço, Danilo Fontes e Fabiana Lícia por disporem de tempo para ajudar no projeto; a Prof^a Rosali Silva por discussões úteis ao trabalho; aos estagiários, importantes na realização dos trabalhos práticos: Thiane Paixão, Débora Dolores, Amanda Bastos, Érica, Ana Paula, Michelle.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco.

Ao Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes (LAFEPE), ao Lapon[®], a Nortec[®] e Hebron[®] pela disponibilização de materiais necessários à execução do projeto.

Ao Ministério da Saúde, pela disponibilização dos comprimidos comerciais.

Ao grupo de pesquisa da Prof. Dr^a Rosângela G. Peccini do Laboratório de Toxicologia do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia - FCF-UNESP/Araraquara, em especial ao mestrando Marcelo Davanço, pela parceria no projeto e discussões úteis.

À minha família, em especial aos meus pais Edmilson e Josete e às tias Gicélia, Cleonice e Janeide, pelo apoio e torcida pela conclusão do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa de mestrado concedida.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

RESUMO

O benznidazol é único fármaco aprovado no Brasil para o tratamento da doença de Chagas e está disponível sob a forma de comprimido de uso adulto e pediátrico de liberação imediata. Sabendo-se que as formas de liberação prolongada possuem vantagens como a redução de efeitos adversos e o aumento da adesão terapêutica, o objetivo deste trabalho foi investigar por ensaios de liberação *in vitro* formas farmacêuticas de liberação prolongada e confrontá-las com resultados dos comprimidos de liberação imediata. Para isto, foram obtidos três lotes de liberação prolongada (LBI, LBII e LBIII) utilizando os polímeros hidroxipropilmetilcelulose K100LV, K100M e K4M, respectivamente. O estudo de dissolução realizado avaliou quatro tipos de meios de dissolução: tampão pH 1,2; tampão pH 1,2 adicionado de 1% de lauril sulfato de sódio; fluido biorrelevante gástrico em jejum (FASSGF); FASSGF por 4h e fluido biorrelevante intestinal em jejum (FASSIF) nas horas seguintes. Modelos cinéticos de ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Peppas-Sahlin foram utilizados para avaliar o mecanismo da liberação *in vitro*, enquanto que o teste ANOVA univariada e fatores f1 e f2 foram utilizados para avaliar a similaridade dos perfis. Estudos *in vivo* foram realizados por grupo de pesquisa da UNESP, sendo utilizados os dados obtidos para estimar a correlação *in vitro/in vivo*. Os testes de controle de qualidade descartam o lote LBI por não atender ao critério de uniformidade de conteúdo, enquanto que os lotes LBII e LBIII demonstraram atender aos critérios de qualidade. Os estudos de dissolução constataram o aumento do tempo total de liberação de 2 h em comprimidos comerciais para 24-72 h nos lotes LBII e LBIII. O ajuste a modelos cinéticos sugeriu a liberação do fármaco por mecanismos de relaxamento polimérico e difusão fickiana. Os métodos avaliados de dissolução mostraram-se discriminativos em relação aos resultados de ANOVA univariada e fator f1 e f2. Foi possível estabelecer uma correlação de nível A para os comprimidos pediátricos e para o lote LBIII de dissolução prolongada, sendo o método II de dissolução o que refletiu melhor as condições *in vivo*. Dessa forma, o projeto contribuiu com o desenvolvimento de uma nova forma farmacêutica de liberação prolongada, assim como o estabelecimento de correlação *in vitro/in vivo*.

Palavras-chave: Doença de Chagas. Tripanossomicidas. Comprimidos. Estudos de dissolução. Correlação *in vitro/in vivo*

ABSTRACT

The benznidazole is the only drug approved in Brazil for the treatment of Chagas disease and it is available in the form of immediate release tablet of adult and pediatric use. Whereas the extended-release forms have advantages such as reducing side effects and increasing adherence, the aim of this study was to investigate the *in vitro* release assays of extended-release dosage forms and compare them with results of immediate release tablets. It were obtained three lots of extended-release (LBI, LBII and LBIII) using the polymers hydroxypropyl methylcellulose K100LV, K100M and K4M, respectively. The dissolution study evaluated four different dissolution media: pH 1.2 buffer; pH 1.2 buffer plus 1% sodium lauryl sulfate; Fasted State Simulated Gastric Fluid (FASSGF); FASSGF medium till 4 h and Fasted State Simulated Intestinal Fluid (FaSSIF) medium in the following hours. Kinetic models such as zero order, first order, Higuchi, Korsmeyer-Peppas and Peppas-Sahlin were used to evaluate the mechanism of *in vitro* release, whereas the univariate ANOVA and f1 and f2 factors were used to evaluate the similarity of the profiles. *In vivo* studies were performed by the UNESP research group, the results were used to estimate obtained *in vitro/in vivo* correlation. The results showed that LBI batch failed at criteria of uniformity of content, while lots LBII and LBIII showed meet quality criteria. Dissolution studies have found an increase in the total time of 2 hours in commercial release tablets to 24-72 h in lots LBII and LBIII. The kinetic models suggested adjustment to the release of drug per polymer relaxation mechanisms and Fickian diffusion. The dissolution methods evaluated proved to be discriminatory in relation to the results of univariate ANOVA and factor f1 and f2. It was possible to establish a level A correlation for pediatric tablets and the LBIII lot of extended release tablets and the method II dissolution which better reflect the conditions *in vivo*. Thus, the project contributed to the development of a new pharmaceutical form of extended-release, as well as the establishment of correlation *in vitro/in vivo*.

Keywords: Chagas disease. Trypanocidal Agents. Tablets. Dissolution studies. *In vitro/in vivo* correlation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	23
Figura 2 – Estrutura química do benznidazol.....	25
Figura 3 – Aparatos dos métodos 1, 2 e 3, respectivamente, do teste de dissolução.	29
Figura 4 – Esquema do processo de obtenção dos comprimidos de BNZ lote LB I.	37
Figura 5 - Esquema do processo de obtenção dos comprimidos de BNZ dos lotes LB II e III.	38
Figura 6 – Difratoograma do BNZ lote 15986.	45
Figura 7 – Curva DSC do BNZ lote 15986.	46
Figura 8 - Perfis de liberação imediata do comprimido adulto de BNZ utilizando três meios de dissolução diferentes.....	50
Figura 9 - Perfis de liberação imediata do comprimido pediátrico de BNZ utilizando três meios de dissolução diferentes.	52
Figura 10 – Perfil de dissolução no método I do comprimido LBII de BNZ.....	55
Figura 11 – Perfil de dissolução no método II do comprimido LBII de BNZ.	56
Figura 12 – Perfil de dissolução no método IV do comprimido LBII de BNZ.	57
Figura 13 – Perfil do comprimido Lote LBIII de BNZ no método I de dissolução.	59
Figura 14 – Perfil do comprimido de BNZ Lote LBIII no método II de dissolução.....	60
Figura 15 – Perfis de liberação <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> dos comprimidos de BNZ de uso adulto.	64
Figura 16 - Correlação entre fração absorvida e a quantidade dissolvida de BNZ nos comprimidos de uso adulto para os métodos I, II e III de dissolução.	65
Figura 17 – Perfis de liberação <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> dos comprimidos de BNZ de uso pediátrico.	66
Figura 18 – Correlação entre fração absorvida e a quantidade dissolvida de BNZ nos comprimidos pediátricos, respectivamente, para os métodos I, II e III de dissolução.	67
Figura 19 – Perfis de liberação <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> do comprimido de BNZ de liberação prolongada lote LBIII.	68
Figura 20 - Correlação entre fração absorvida e a quantidade dissolvida de BNZ nos comprimidos do lote LBIII, respectivamente, para os métodos I e II de dissolução.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição e propriedades das versões mais recentes dos meios biorrelevantes estomacais.....	31
Tabela 2- Composição e propriedades das versões mais recentes dos meios biorrelevantes intestinais.....	32
Tabela 3 - Lotes de comprimidos de liberação prolongada de BNZ.....	37
Tabela 4 – Métodos utilizados para o estudo de dissolução dos comprimidos de BNZ.	39
Tabela 5 - Modelos matemáticos de cinética de dissolução usados na avaliação do perfil de dissolução de comprimidos de BNZ.....	42
Tabela 6 – Teste de solubilidade de BNZ (lote 15986) a $37 \pm 0,5$ °C em diferentes metodologias analíticas.....	47
Tabela 7 - Controle de qualidade físico-químico dos comprimidos de BNZ obtidos.	48
Tabela 8 – Parâmetros obtidos a partir do perfil de dissolução dos comprimidos adulto de BNZ.	51
Tabela 9 – Coeficientes de determinação (R^2) obtidos a partir do ajuste a modelos cinéticos utilizando comprimidos de BNZ de uso adulto.	51
Tabela 10 – Parâmetros obtidos a partir do perfil de dissolução dos comprimidos pediátricos de BNZ.	53
Tabela 11 – Coeficientes de determinação (R^2) obtidos a partir do ajuste a modelos cinéticos utilizando comprimidos pediátricos de BNZ.....	53
Tabela 12 – Valores de f1 e f2 aplicados aos métodos de dissolução obtidos dos comprimidos de uso adulto e pediátrico de BNZ.	54
Tabela 13 – Parâmetros obtidos a partir do perfil de dissolução do comprimido LBII de BNZ.	57
Tabela 14 – Coeficientes de determinação (R^2) obtidos a partir do ajuste a modelos cinéticos utilizando comprimidos LBII de BNZ.	58
Tabela 15 – Constantes obtidas a partir do ajuste a modelos cinéticos utilizando comprimidos LBII de BNZ.....	59
Tabela 16 – Parâmetros obtidos a partir do perfil de dissolução do comprimido lote LBIII de BNZ.	61
Tabela 17 – Coeficientes de determinação (R^2) obtidos a partir do ajuste a modelos cinéticos utilizando comprimidos LBIII de BNZ.	61

Tabela 18 – Constantes obtidas a partir do ajuste a modelos cinéticos utilizando comprimidos LBIII de BNZ.	62
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BNZ	Benznidazol
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNDi	<i>Drugs for Neglected Diseases initiative</i>
DP	Desvio Padrão
FASSGF	<i>Fasted State Simulated Gastric Fluid</i>
FASSIF	<i>Fasted State Simulated Intestinal Fluid</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GAPDH	Glicosil-3-fosfato desidrogenase
HCl	Ácido clorídrico
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
IVIV	<i>in vitro/in vivo</i>
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
LB	Lote de Bancada
LTM	Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos
LSS	Lauril Sulfato de Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
pH	Potencial de hidrogênio
PVP	Polivinilpirrolidona
Qs.	Quantidade suficiente
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
SIF	<i>Simulated Fluid</i>
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UV	Ultravioleta
Vis	Visível
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
θ	Medida angular
Σ	Somatório
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
f1	Fator de diferença
f2	Fator de semelhança
g	Gramas
h	Hora
K	Constante cinética
Kgf	Kilogramaforça
μm	Micrometro
μM	Micromolar
mg	Miligramas
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
$\text{mmol.L}^{-1}.\Delta\text{pH}^{-1}$	Milimolar por litro por diferença de pH
mN/m	Milnewton por metro
mPa.s	Milipascal-segundo
mOsm.kg^{-1}	Miliosmol por kilograma
nm	Nanômetro
ED%	Eficiência de dissolução
R^2	Coefficiente de determinação
R^2_{ajustado}	Coefficiente de determinação ajustado
rpm	Rotações por minuto
T	Tempo
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3 REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1 Doença de Chagas	22
3.2 Tratamento da doença de Chagas	24
3.3 Benznidazol	25
3.4 ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO	27
3.4.1 Fatores que influenciam a dissolução	28
3.4.2 Teste de dissolução farmacopeico	29
3.4.3 Métodos de dissolução biorrelevantes	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Material	35
4.2 Controle de qualidade físico-químico do BNZ	35
4.2.1 Teor de princípio ativo	35
4.2.2 Difração de raios X	36
4.2.3 Calorimetria exploratória diferencial	36
4.2.4 Estudo de solubilidade	36
4.3 Obtenção dos comprimidos de liberação prolongada de BNZ	36
4.4 Controle de qualidade físico-químico das formas farmacêuticas obtidas	39
4.5 Estudo dos perfis de dissolução <i>in vitro</i>	39
4.5.1 Tratamento de dados	40
4.5.2 Modelos cinéticos	41
4.6 Estudos de biodisponibilidade	42
4.6.1 Correlação <i>in vitro/in vivo</i> (IVIV)	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1 Controle físico-químico do insumo farmacêutico ativo BNZ	45
5.1.1 Teor do insumo farmacêutico ativo BNZ	45
5.1.2 Difração de raios X	45
5.1.3 Análise térmica	46

<i>5.1.4 Estudos de solubilidade</i>	47
5.2 Obtenção e controle de qualidade físico-químico dos comprimidos de liberação prolongada de BNZ	48
5.3 Estudos de dissolução	50
<i>5.3.1 Comprimidos de liberação imediata</i>	50
<i>5.3.2 Comprimidos de liberação prolongada</i>	54
<i>5.4 Correlação IVIV</i>	63
<i>5.4.1 Comprimidos de liberação imediata</i>	64
<i>5.4.2 Comprimidos de liberação prolongada: Lote LBIII</i>	68
CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
REFERÊNCIAS	74
ANEXO A – Certificado de análises do padrão de trabalho do BNZ (lote 301026)	83
ANEXO B – Modo de preparo dos meios biorrelevantes.	84
APÊNDICE A – Imagens do teste de dissolução utilizando o método I para comprimidos de BNZ do lote LBII.	85
APÊNDICE B – Imagens do teste de dissolução utilizando o método II para comprimidos de BNZ do lote LBII	86
APÊNDICE C – Imagens do teste de dissolução utilizando o método I para comprimidos de BNZ do lote LBIII.	87
APÊNDICE D – Imagens do teste de dissolução utilizando o método II para comprimidos de BNZ do lote LBIII.	88

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma doença negligenciada endêmica da América Latina que atinge em torno de oito milhões de pessoas. No entanto, países não endêmicos como Estados Unidos, Canadá e Japão também têm registrado casos da doença devido ao movimento migratório da população infectada, o que constitui um desafio ao sistema de saúde por não existir tratamento e diagnóstico adequados (COURA; VIÑAS, 2010; WHO, 2013).

O benznidazol (BNZ) é o único fármaco disponível para tratamento da doença de Chagas em países como o Brasil, Argentina, Chile e Uruguai (SOARES-SOBRINHO, 2009). Apesar da toxicidade e da baixa solubilidade, é utilizado na fase aguda com chances de cura e na fase crônica da doença prevenindo a progressão da doença. Reduz a quantidade de recursos médicos utilizados pelo paciente durante a vida, economizando recursos do sistema de saúde, quando comparado com a não utilização do BNZ (CASTRO, MECCA, BARTEL, 2006; SAGGIA, SANTOS, DIETZE, 2007).

Fármacos como o BNZ possuem classificação biofarmacêutica II (baixa solubilidade e alta permeabilidade) e tendem a ter baixa absorção oral devido à limitação da taxa de dissolução (LEHTO et al., 2011). Desta forma, o uso de estratégias que promovam o aumento da solubilidade, como a vetorização em ciclodextrinas e a incorporação de polímeros, é indicado, sendo necessária também a realização de estudos pré-clínicos para as novas formulações com o intuito de constatar a melhoria da biodisponibilidade.

Neste sentido, têm sido realizadas pesquisas para oferecer novas alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas. Já foram desenvolvidos sistemas de vetorização, como dispersões sólidas, comprimido de liberação prolongada, além de formas pediátricas do comprimido e da suspensão de BNZ (SOARES-SOBRINHO, 2009; LYRA, 2010; MEDEIROS, 2010; SANTOS, 2011). Apesar de todo o acervo de informações encontrado na literatura, apenas os comprimidos pediátricos prosseguiram nos estágios de desenvolvimento de medicamentos, resultando na disponibilização desta forma farmacêutica para o mercado em 2012. Foi a primeira mudança significativa na forma de apresentação dos comprimidos de BNZ desde a sua introdução na terapêutica na década de 70.

Testes de dissolução *in vitro* são utilizados na rotina para o controle da qualidade tanto no setor de produção industrial quanto no setor de pesquisa e

desenvolvimento. No entanto, os métodos normalmente utilizados não refletem as condições fisiológicas, podendo não apresentar correlação com os dados observados *in vivo*. Como alternativa, o uso de meios biorrelevantes têm sido descrito como capaz de prever com maior segurança o comportamento *in vivo*. Além disso, possui maior caráter discriminativo que pode levar à detecção de mudanças na formulação e no processo de fabricação, reduzindo custos, o número e o tamanho de estudos clínicos (MANADAS, PINA, VEIGA, 2002; MARQUES, LOEBENBERG, ALMUKAINZI, 2011).

Logo, este trabalho aborda o desenvolvimento de novas formulações de comprimidos de liberação prolongada, a análise dos perfis de diferentes métodos de dissolução *in vitro* e a análise do estabelecimento de uma possível correlação *in vitro/in vivo*.

Objetivos

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são apresentados abaixo subdivididos em objetivo geral e objetivos específicos.

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver diferentes comprimidos de liberação prolongada contendo benznidazol para o tratamento da doença de Chagas e realizar estudos de dissolução.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e realizar o controle de qualidade de comprimidos de BNZ de liberação prolongada contendo o polímero hidroximetilcelulose, com diferentes graus de viscosidade: K100 LV, K100M, K4M, como agente promotor de liberação prolongada;
- Estudar a liberação *in vitro* das formas farmacêuticas de liberação imediata de uso adulto e pediátrico e de liberação prolongada, utilizando diferentes métodos de dissolução;
- Realizar o estudo da cinética da liberação *in vitro* utilizando os seguintes modelos cinéticos: zero ordem, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Peppas-Sahlin;
- Estabelecer correlação *in vitro* / *in vivo* para as formas farmacêuticas de BNZ.

Revisão da literatura

3 REVISÃO DA LITERATURA

Para melhor embasamento do trabalho, foi realizada uma revisão da literatura sobre a Doença de Chagas, os tratamentos disponíveis, o fármaco de escolha (benznidazol) e estudos de dissolução utilizados para avaliação de formas farmacêuticas sólidas.

3.1 Doença de Chagas

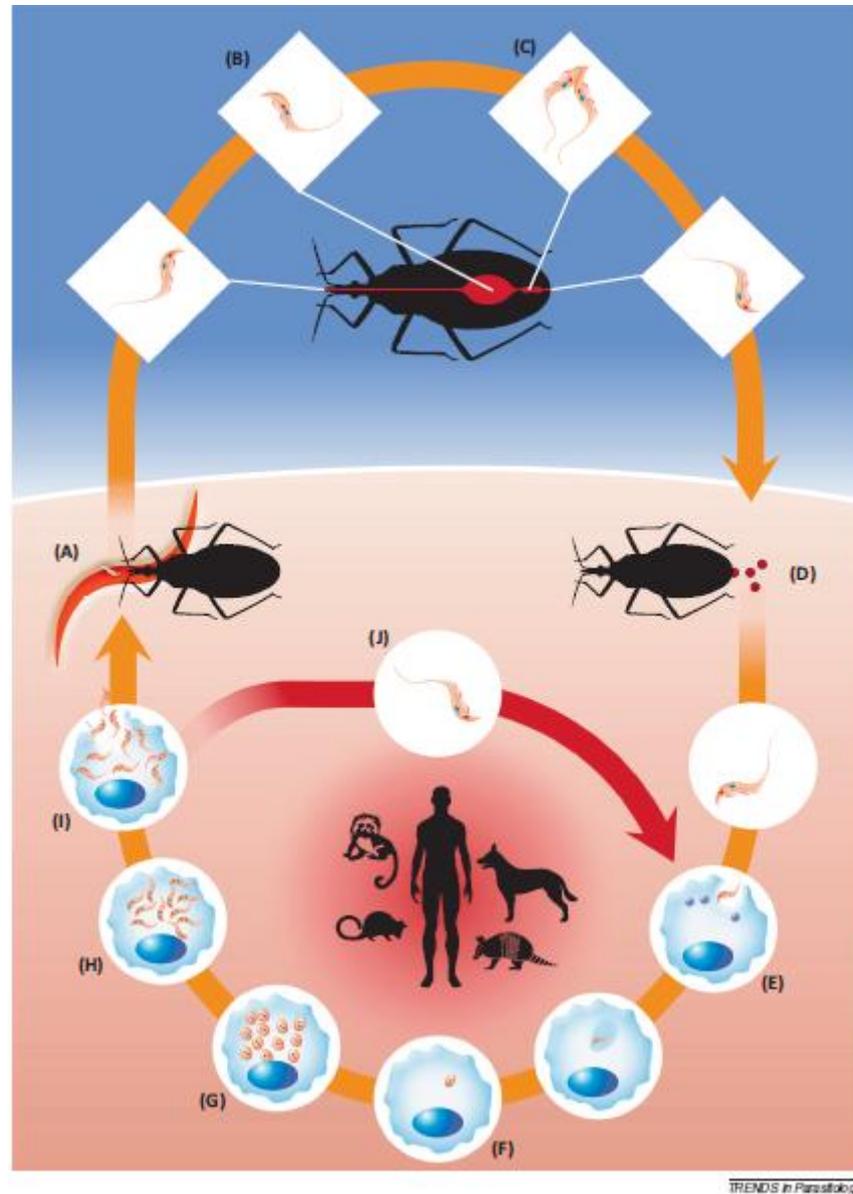
Em 1909, o médico sanitarista Carlos Chagas, juntamente com o Instituto Oswaldo Cruz, anunciou três descobertas: uma nova doença tropical, que em homenagem ao descobridor foi denominada doença de Chagas; o agente etiológico, o protozoário *Trypanosoma cruzi* e o vetor, um inseto hematófago, o barbeiro (*Triatoma spp.*). Por tantas descobertas, este momento foi considerado um momento único na história da ciência e saúde brasileira, destacando o potencial científico nacional (KROPF; SÁ, 2009).

De modo geral, a doença de Chagas emerge de um contexto bioecológico intimamente relacionado à forma de viver e à história natural do *T. cruzi* e de seus reservatórios superiores (mamíferos) e hospedeiros intermediários (insetos vetores) (DIAS, 2007). O ciclo da doença começa quando inseto hematófago alimenta-se de mamíferos contaminados e infecta-se com as formas tripomastigotas. O parasita, então se diferencia em epimastigotas e entram no intestino do inseto onde se reproduzem. Após replicação, os parasitas se diferenciam na forma tripomastigota metacíclica e são eliminadas nas fezes do inseto no local da picada. Quando as fezes contaminadas do triatomíneo entram em contato com sangue do mamífero transmitem os tripomastigotas metaciclícos. Estes infectam células hospedeiras, diferenciam-se em amastigotas, reproduzem-se, diferenciam-se novamente em tripomastigotas e só, então, saem das células contaminadas em busca de outras células sadias (Figura 1).

Na fase aguda da doença, os parasitas circulam pelo sangue podendo haver os sintomas específicos, como o sinal de Romaña (edema localizado na pálpebra) e o chagoma (lesão ulcerativa no local da picada do inseto), além de outros mais gerais como fadiga, febre, anorexia, diarreia e vômitos. Na fase indeterminada, os parasitas não circulam no sangue, mas vivem como hospedeiros em órgãos. Os sintomas não são mais presentes e ainda não é verificada alteração morfológica dos órgãos. Já na fase crônica,

há o aumento do volume de órgãos, principalmente do coração e órgãos do trato gastrointestinal.

Figura 1 - Ciclo de vida do *T. cruzi*.



Fonte: PEREZ, LYMBERY, THOMPSON, 2014.

A infecção humana pode ser muito grave, com mortalidade significativa em crianças na fase aguda e severo comprometimento cardíaco e/ou digestivo em adultos na fase crônica da doença. A doença em adultos jovens tem sido causa de incapacitação para o trabalho, gerando perdas econômicas significativas (LEE et al., 2013).

Visto que não existe vacina para prevenir a infecção, o modo de diminuir o aparecimento de novos casos reside, especialmente, no controle dos principais mecanismos de transmissão do protozoário *T. cruzi*. Os mecanismos são classificados

em primários (transmissão por vetores, transfusão de sangue, via oral, vertical e congênita) e secundários (acidente de laboratório, manuseamento de animais contaminados, transplante de órgãos e outros meios em que a infecção ocorre com menor frequência) (COURA, 2015). Como a imensa maioria dos pacientes chagásicos existentes é contaminada por meio de vetores infectados, o afastamento destes da moradia deve ser o enfoque preventivo principal (VILLELA et al., 2009).

Ações de controle da transmissão têm sido esboçadas desde a década de 1940 no Brasil, mas apenas em 2006, o Brasil recebeu a certificação internacional de eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*, sendo registrada grande redução da prevalência da infecção (FERREIRA, SILVA, 2006). No entanto, a transmissão vetorial ainda persiste, principalmente pelo *T. brasiliensis*, vetor que é considerado o mais importante em regiões semiáridas do Nordeste brasileiro (BATISTA et al, 2013).

3.2 Tratamento da doença de Chagas

Infelizmente, os únicos fármacos atualmente disponíveis para o tratamento da doença de Chagas são os mesmos registrados há décadas: o nifurtimox e o benznidazol (BNZ), que foram desenvolvidos em 1960 e 1970, respectivamente (CROFT et al., 2005; COURA, BORGES-PEREIRA, 2012).

O nifurtimox teve seu uso interrompido por apresentar muitos efeitos secundários, mas ainda permanece disponível para uso em alguns países sob o nome comercial Lampit[®]. No Brasil, apenas o BNZ está disponível, apesar de restrições como: baixa eficácia na fase crônica da doença, significativas variações regionais na eficácia pelo surgimento de resistência do *T. cruzi* e alta taxa de abandono do tratamento devido aos efeitos colaterais causados (SALOMON, 2012; SANTOS et al., 2012).

Pesquisas de novos agentes para o tratamento da doença de Chagas continuam sendo realizadas. Uma das linhas de pesquisa utiliza substâncias inibidoras de enzimas específicas do parasita *T. cruzi*, como os inibidores da cruzaina, os bisfosfonatos (inibidores da farnesil pirofosfato sintase), fosfatases, esterol-14-desmetilase, diidroorotato desidrogenase, topoisomerases I, tripanotona redutase e a glicosil-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Apesar de promissores, muitos estudos pré-clínicos revelam haver a necessidade de mudanças estruturais dessas substâncias, não havendo

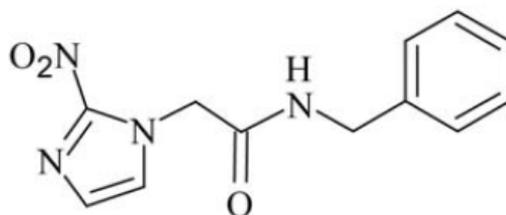
ainda nenhuma molécula desse tipo em fase clínica de estudo (GARZONI et al., 2004; FERREIRA, 2012; RECHER et al., 2013).

Já o posoconazol, um dos compostos que apresentou a capacidade de induzir a cura parasitológica nos estágios agudos e crônicos da doença de Chagas em estudos pré-clínicos, não apresentou a mesma eficácia em estudos clínicos de fase II. No entanto, da mesma forma que se podem fazer alterações estruturais na molécula, pode haver também a combinação do posoconazol com outras drogas com a finalidade de aumentar a potência (FUGI et al., 2015). Ou seja, o desenvolvimento de medicamentos com novas moléculas para o tratamento de Chagas é um processo lento. Logo, deve-se investir na melhoria da veiculação do BNZ, molécula padrão para o tratamento da doença de Chagas.

3.3 Benznidazol

O BNZ é um derivado de 2-nitroimidazol (figura 2) com largo espectro de atividade farmacológica, efetivo principalmente na fase aguda da doença de chagas.

Figura 2 – Estrutura química do benznidazol.



Fonte: Farmacopeia Brasileira 5ª edição, 2010.

Apesar de ser uma droga conhecida desde a década de 70 ainda não possui o mecanismo de ação completamente esclarecido. Na literatura, há informações de que por ser uma pró-droga depende de ativação pela nitroreductase tipo I, enzima presente no *T. cruzi*, para a formação de metabólitos citotóxicos capazes de destruir o DNA do parasita (HALL; WILKINSON, 2012). Casos de resistência à droga têm sido relatados por mutações genéticas presentes no *T. cruzi* que evitam a ativação do BNZ no organismo do parasita (CAMPOS et al., 2014).

Além dos casos de resistência do parasita à droga, a toxicidade e a baixa solubilidade em água tornam o tratamento do BNZ problemático, contudo ainda assim o BNZ continua sendo a melhor escolha terapêutica disponível.

Visando diminuir a incidência de efeitos colaterais (muitos deles relacionados à baixa solubilidade aquosa), pesquisas recentes têm comprovado a eficiência do incremento de solubilidade por meio de técnicas de dispersões sólidas com polímeros hidrofílicos e complexos de inclusão com ciclodextrinas (LIMA et al., 2011; LYRA, 2010; SOARES-SOBRINHO et al., 2010; SOARES-SOBRINHO et al., 2012).

Dispersões sólidas de BNZ com PVP foram utilizadas em 2011 por Santos para desenvolver comprimidos de liberação prolongada utilizando o polímero HPMC K4M na proporção de 25 e 35%. A formulação proposta conseguiu prolongar a liberação por até 12 h.

Mais recentemente, em 2015, Fonseca-Berzal e colaboradores testaram *in vivo* cápsulas contendo sistemas de dispersões sólidas de BNZ em hidroxipropilcelulose de baixa substituição e desoxicolato sódico nas proporções de 44,44 a 90,90%. As novas formulações apresentaram uma melhor atividade tripanomicida do que as formulações contendo apenas BNZ, sugerindo que o aumento da solubilidade do BNZ melhoraria a biodisponibilidade do fármaco e a eficácia terapêutica.

Também seguindo essa linha de pesquisa, foi proposto o aumento da potência e redução da toxicidade do BNZ através da obtenção do complexo benznidazol-rutênio e do complexo do BNZ com rutênio e óxido nítrico. A formação dos complexos melhora a hidrossolubilidade, a atividade *in vitro* e *in vivo* e diminui a citotoxicidade quando comparado ao fármaco isolado. Pesquisas ainda devem ser realizadas para a veiculação em uma forma farmacêutica e comparação dos resultados com os comprimidos utilizados atualmente (SESTI-COSTA et al., 2014; SILVA et al., 2010).

Em 2006, também foi delineada a forma farmacêutica parenteral de BNZ. Desse modo, seria possível aumentar a seletividade e reduzir a toxicidade do fármaco, entretanto a necessidade da administração por via endovenosa representaria um incômodo em tratamentos diários e prolongados. Além disso, não teria viabilidade comercial, uma vez que seu custo é consideravelmente mais elevado. Por se tratar de um medicamento destinado a uma doença negligenciada, o custo do produto final é um importante fator relacionado ao acesso da população a esta alternativa farmacêutica (LAMAS et al., 2006).

Abordagens de BNZ veiculados em outras formas farmacêuticas também já foram propostas e estão em desenvolvimento, tendo como exemplo formulação de suspensão e associações de diferentes ativos numa única preparação (DINIZ et al., 2013; MANARIN et al., 2013; MEDEIROS, 2010).

Outro grande inconveniente do tratamento com o BNZ era a inexistência de uma forma farmacêutica pediátrica. As crianças infectadas eram tratadas com frações do comprimido de uso adulto. Com objetivo de tornar essa ação obsoleta, a organização *Drugs for Neglected Diseases initiative* (DNDi), o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) e o Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos da UFPE desenvolveram uma formulação pediátrica de BNZ, prevenindo possíveis erros no fracionamento e impactos negativos na eficácia, qualidade e segurança da medicação (MEDEIROS, 2010). O medicamento foi registrado em dezembro de 2011 e hoje, se encontra disponível nos postos de saúde do país.

3.4 ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO

Dissolução, de forma simplificada, é o processo no qual o fármaco é liberado de sua forma farmacêutica para poder ser absorvido no organismo. Como ensaio, é um teste físico de natureza destrutiva, em que é analisada a liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica ou fragmentos destas. Em geral, o conceito é relacionado à biodisponibilidade, pois para estar biodisponível o fármaco precisa ser dissolvido (MARCOLONGO, 2003).

Anteriormente ao desenvolvimento deste conceito, a biodisponibilidade estava limitada apenas à desintegração da forma farmacêutica. A dissolução como uma propriedade intrínseca de substâncias começou a ser analisada no final do século XIX. Dois pesquisadores, Noyes e Whitney em 1897 publicaram o primeiro estudo sobre a dissolução de compostos. Como resultados obtiveram que a taxa de dissolução seria proporcional à diferença entre a solubilidade e a concentração ($C_s - C$) no tempo t (equação 1).

$$\frac{dC}{dt} = k(C_s - C) \quad (\text{Equação 1})$$

Este estudo influenciou trabalhos posteriores. Em 1900, Brunner e Tolloczko concluíram que a dissolução também dependeria da superfície exposta, velocidade de

agitação, temperatura, estrutura da superfície e do aparato utilizado. Em 1904, Nernst e Brunner adicionaram o volume do meio como fator, utilizando um modelo de difusão por camada, onde o processo de dissolução seria explicado pela difusão das moléculas em um filme líquido.

Após anos evoluindo o conceito físico da dissolução, apenas a partir da década de 50 começaram a surgir os primeiros estudos práticos relacionando a dissolução *in vitro* à biodisponibilidade de fármacos. Vários artigos relacionavam a falta de eficiência farmacológica de formas farmacêuticas, muitas vezes devido à baixa taxa de dissolução. De modo que nos anos 70, a Farmacopeia Americana passou a utilizar o teste em algumas monografias como um requerimento devido ao reconhecimento que excipientes e processos de obtenção podem ocasionar diferenças em testes de dissolução e conseqüentemente na biodisponibilidade de fármacos (DOKOUMETZIDIS; MACHERAS, 2006).

No Brasil, os primeiros estudos de dissolução começaram nos anos 80, sendo a 4ª edição da Farmacopeia Brasileira (1988), a primeira a recomendar este tipo de teste. Mesmo assim, ainda não era obrigatório o uso. Somente, em 1999, com a criação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), o teste se tornou requisito para o registro de medicamentos (MARCOLONGO, 2003).

3.4.1 Fatores que influenciam a dissolução

Como descrito anteriormente, a dissolução é uma propriedade diretamente relacionada à biodisponibilidade. Propriedades intrínsecas da molécula como pKa, forma cristalina e solubilidade, assim como características da própria forma farmacêutica (excipientes e modo de produção) e de fatores fisiológicos como pH, sais biliares, taxa de esvaziamento gástrico, volume intestinal e motilidade intestinal influenciam diretamente na taxa de dissolução e, conseqüentemente na biodisponibilidade (MUDIE et al., 2012).

Dessa forma, ao realizar melhorias na formulação, a forma farmacêutica deve ser caracterizada para identificação de alterações de propriedades, sendo o teste de dissolução um dos parâmetros avaliados por determinar a quantidade de substância ativa dissolvida em condições específicas (BRASIL, 2010a).

As condições não necessariamente são as mesmas que as encontradas *in vivo*. O aparato, a composição do meio de dissolução, a agitação e o tempo de análise são

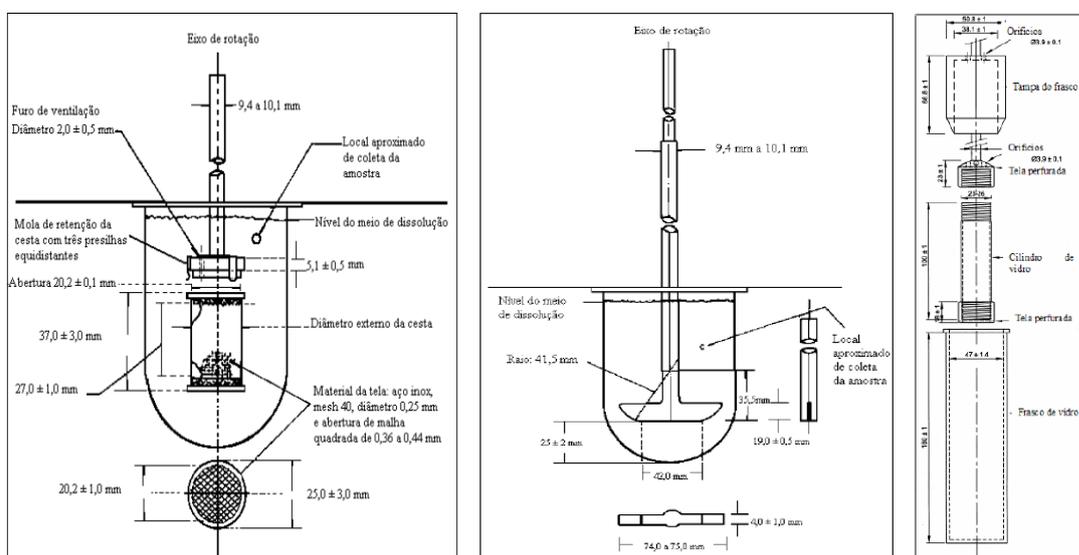
validados como elementos de método analítico. O método validado é, então, incluso em monografias específicas da farmacopeia e devem ser seguidos para fins de controle de qualidade.

3.4.2 Teste de dissolução farmacopeico

A Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010) recomenda a utilização de três aparatos para o teste de dissolução de formas farmacêuticas sólidas.

Os dois primeiros consistem em um sistema de três componentes: cubas de vidro de borossilicato; hastes de aço inoxidável ou de material inerte para promover a agitação do meio de dissolução e de motor com ajuste de velocidade de rotação. Os métodos diferenciam no aparato utilizado na extremidade da haste, o método 1 se utiliza de uma cesta, onde a forma farmacêutica é inserida, enquanto que o método 2 utiliza uma pá. Já o método 3 são constituídos de uma série de frascos cilíndricos de fundo plano e uma série de cilindros de vidro com tela acopladas nas partes superior e inferior. A agitação é realizada de forma vertical nos cilindros, com movimentos ascendentes e descendentes, e também de forma horizontal (Figura 3).

Figura 3 – Aparatos dos métodos 1, 2 e 3, respectivamente, do teste de dissolução.



Fonte: Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010).

Pelas diferenças dos sistemas de agitação, cada método possui uma hidrodinâmica diferente, portanto cada forma farmacêutica deve seguir a monografia individual indicada ou o método de dissolução validado.

Enquanto isso, a Farmacopeia Americana ainda descreve um quarto método para formas farmacêuticas sólidas, as células de fluxo contínuo. Esse sistema possui um bombeamento contínuo de meio com fluxo de 240 a 960 mL/h, de forma que o meio que promove a dissolução está sempre limpo, mantendo a condição *sink* (volume equivalente a três vezes o volume necessário para saturar determinada substância) em todo o tempo de teste.

Em geral, os métodos encontrados nas monografias da Farmacopeia Brasileira apenas descrevem testes de dissolução utilizando os aparatos 1 e 2 em diferentes condições. O meio pode ser composto somente por água ou por tampões com pH ácido ou básico, incluindo ou não tensoativos. Os volumes variam de 500 a 1000 mL, podendo ser em condição *sink* ou não. O tempo total de teste varia na faixa de 20 a 120 minutos e a agitação varia de 25 a 150 rpm. A temperatura é o único fator comum a todos os métodos citados cujo valor é de $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, em razão da média da temperatura corporal.

3.4.3 Métodos de dissolução biorrelevantes

O método de dissolução é considerado biorrelevante quando as condições utilizadas são próximas às condições fisiológicas. Um dos parâmetros mimetizados é o meio de dissolução. Na literatura, são citados meios biorrelevantes destinados a diferentes vias: parenteral, oral, bucal, sublingual, pulmonar, vaginal e oftálmica (MARQUES; LOEBENBERG; ALMUKAINZI, 2011).

Para a via oral, meios biorrelevantes são baseados em dados publicados sobre a composição de fluidos gástricos e intestinais aspirados de homens ou mulheres. Os primeiros meios descritos foram os fluidos intestinais simulados em estado de jejum (FASSIF) e em estado alimentado (FESSIF) em 1998 (GALIA et al., 1998). Em 2005, Vertzoni e colaboradores, divulgaram os fluidos gástricos simulados em estado de jejum (FASSGF). Para o desenvolvimento, os pesquisadores se apoiaram em estudos que revelavam a quantidade da enzima pepsina e da existência do refluxo de uma pequena concentração de sais biliares para o estômago. Em 2008, Jantratid e colaboradores atualizaram a composição dos meios propostos, devido a publicações que indicavam que o FESSGF representaria mais adequadamente o fluido biológico se estivessem presentes quantidades de alimento líquido, que pela viabilidade dos métodos de quantificação deveria ser representado por frações de leite.

Tabela 1 - Composição e propriedades das versões mais recentes dos meios biorrelevantes estomacais.

Composição	FASSGF	FESSGF Versão 2		
		Inicial	Intermediário	Final
Taurocolato de sódio (μM)	80	-	-	-
Lecitina (μM)	20	-	-	-
Pepsina (mg/mL)	0,1	-	-	-
Ác. clorídrico	qs. pH 1,6	-	-	-
Cloreto de sódio (mM)	34,2	148	237,02	122,6
Ácido acético		-	17,12	-
Acetato de sódio		-	29,75	-
Ácido ortofosfórico		-	-	5,5
Fosfato monossódico		-	-	32
Leite/Tampão		1:0	1:1	1:3
Ácido clorídrico/Hidróxido de sódio		qs pH 6,4	qs pH 5	qs pH 3
Propriedades				
pH	1,6	6,4	5	3
Osmolalidade (mOsm.kg^{-1})	$120,7 \pm 2,5$	559	400	300
Capacidade tamponante ($\text{mmol.L}^{-1}.\Delta\text{pH}^{-1}$)	-	21,33	25	25
Tensão superficial (mN/m)	42,6	$49,7 \pm 0,3$	$52,3 \pm 0,3$	$58,1 \pm 0,2$

Fonte: Jantratid et al., 2009.

Além disso, a alimentação faria com que os fluidos estomacais (Tabela 1) e intestinais (Tabela 2) possuísem composições diferentes ao longo do tempo, sendo representados por “snapshots” das fases iniciais, intermediárias e finais da digestão.

Tabela 2- Composição e propriedades das versões mais recentes dos meios biorrelevantes intestinais.

Composição (mM)	FASSIF	FESSIF Versão 2		
	Versão 2	Inicial	Intermediário	Final
Taurocolato de sódio	3	10	7,5	4,5
Lecitina	0,2	3	2	0,5
Monooleato de glicerila	-	6,5	5	1
Oleato de sódio	-	40	30	0,8
Ác. maleico	19,12	28,6	44	58,09
Hidróxido de sódio	34,8	52,5	65,3	72
Cloreto de sódio	68,62	145,2	122,8	51
Propriedades				
pH	6,5	6,5	5,8	5,4
Osmolalidade (mOsm.kg ⁻¹)	180 ± 10	400 ± 10	390 ± 10	240 ± 10
Capacidade tamponante (mmol.L ⁻¹ .ΔpH ⁻¹)	10	25	25	15
Tensão superficial (mN/m)	54,3	30,1 ± 0,2	32,7 ± 0,5	46,0 ± 0,2

Fonte: Jantratid et al., 2009

O meio FASSIF também foi alterado resultando em uma segunda versão por motivos de atualizações na literatura sobre a composição analisada *in vivo*. A concentração de lecitina foi de 0,75 para 0,2 mM, havendo a redução da osmolalidade, que antes era de 270 mOsm.kg⁻¹. Nas formulações FESSIF versão 2, também foram incluídos produtos da lipólise, o monooleato de glicerila e o oleato de sódio, que são

elementos-chave do aumento da solubilidade de drogas pouco solúveis e só ocorrem como resultado da digestão de alimentos gordurosos.

Recentemente também sido publicadas alternativas de aparatos de dissolução, com fins de melhor mimetizar as condições *in vivo*. Com finalidade de melhor representar as condições de volume, já é encontrado o aparato 2 miniaturizado (KLEIN, 2006), pois nas condições de jejum, o volume do estômago teoricamente seria de 300 mL, volume que não pode ser utilizado em aparato tradicionais. Sistemas complexos também foram desenvolvidos tais como o TIM (*TNO gastro-Intestinal Model*), um sistema multicompartimental controlado por computador que simula as condições fisiológicas do estômago e intestino tais como: a hidrodinâmica, os tempos de esvaziamento estomacais e intestinais, o pH e os fluidos secretórios em tempo real, podendo ser ainda acoplado a um sistema de absorção que prediz a biodisponibilidade da forma farmacêutica testada (KOSTEWICZ et al., 2014).

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Algumas matérias-primas foram cedidas pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE[®]) para execução deste trabalho: BNZ (lote: 15986), estearato de magnésio (lote: 17285), lactose spray-dried (lote: 17134), polivinilpirrolidona - PVP K-30 (lote: 17125). O padrão de trabalho de BNZ, com teor de 100,8% (Anexo A), (lote: 301026) foi doado pela Nortec Química[®]. A hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) K100 LV, K100M e K4M (Colorcon[®]) foram doados pelo Lapon[®].

Para os meios de dissolução foram utilizados: ácido clorídrico (Vetec[®]), cloreto de sódio (Dinâmica[®]), lauril sulfato de sódio – LSS (Dinâmica[®]), hidróxido de sódio (Dinâmica[®]), fosfato de sódio monobásico anidro (Dinâmica[®]) e SIF[®] Powder Original (Lote: 01-1405-04). Todos os outros solventes e substâncias utilizadas foram de grau analítico.

Os comprimidos de liberação imediata de BNZ 100 mg para uso adulto (lote: 13030214) foram doados LAFEPE, enquanto que os comprimidos pediátricos 12,5 mg (lote: 13030261) foram cedidos pelo Ministério da Saúde, por meio da Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco.

4.2 Controle de qualidade físico-químico do BNZ

4.2.1 Teor de princípio ativo

Para o cálculo do teor de BNZ (lote 15986), foi realizado o doseamento segundo método validado utilizando espectroscopia UV/Vis (espectrofotômetro UVmini-1240 Shimadzu[®]) a 324 nm (SOARES-SOBRINHO et al., 2006). O teor foi obtido por meio da razão da concentração da amostra pela concentração do padrão (15 µg/mL), sendo o resultado a média de nove amostras.

4.2.2 Difração de raios X

A difração foi realizada no difratômetro Shimadzu[®] (XRD-7000), equipado com anodo de cobre. As amostras foram analisadas com intervalo de $2 < 2\theta < 60$, tamanho de fenda $0,02^\circ$ e tempo de tomada de dois segundos (SOARES-SOBRINHO et al., 2010).

4.2.3 Calorimetria exploratória diferencial

Amostras com peso aproximado de 4 mg foram colocadas no porta-amostra de alumínio e aquecidas entre 20 a 300°C na razão de $2^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando o módulo de temperatura DSC-60 Shimadzu[®]. O gás de purga foi o nitrogênio com fluxo de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A pureza do fármaco foi calculada com o auxílio do *software* TA60 da Shimadzu[®].

4.2.4 Estudo de solubilidade

Os estudos foram conduzidos em triplicata utilizando 200 mg de BNZ em 250 mL de diferentes meios utilizados nos testes de dissolução (BRASIL, 2013). As amostras pulverizadas de BNZ foram colocadas sob agitação a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ no banho Dubnoff (Nova ética[®], modelo 304-TPA) durante 24 h. Em seguida, as amostras foram filtradas ($0,45\ \mu\text{m}$) e doseadas por metodologia espectrofotométrica previamente validada a 324 nm (SOARES-SOBRINHO et al., 2006) em sala com temperatura ambiente.

4.3 Obtenção dos comprimidos de liberação prolongada de BNZ

Foram obtidos três tipos diferentes de comprimidos por dois métodos de granulação por via úmida, os lotes de bancada (LB) I de 250 g e os lotes LB II e LBIII de 300 g, contendo a composição descrita na tabela 3.

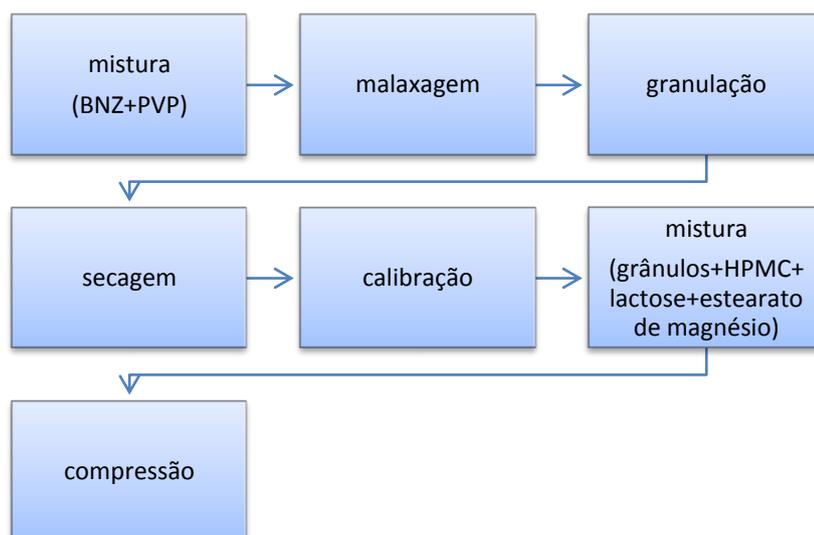
Tabela 3 - Lotes de comprimidos de liberação prolongada de BNZ.

Composição	LB I (%)	LB II (%)	LB III (%)
BNZ	40,00	40,00	40,00
PVP K-30	10,00	1,00	1,00
HPMC K100 LV	25,00	-	-
HPMC K100M	-	25,00	-
HPMC K4M	-	-	25,00
Lactose spray-dried	24,00	33,00	33,00
Estearato de magnésio	1,00	1,00	1,00

Legenda: LB= Lote de Bancada; BNZ= Benznidazol; PVP= Polivinilpirrolidona; HPMC= Hidroxipropilmetilcelulose. Fonte: Autoria própria.

O primeiro método de obtenção dos comprimidos de liberação prolongada de BNZ foi desenvolvido por Santos e colaboradores (2011) e está esquematizado na figura 4.

Figura 4 – Esquema do processo de obtenção dos comprimidos de BNZ lote LB I.

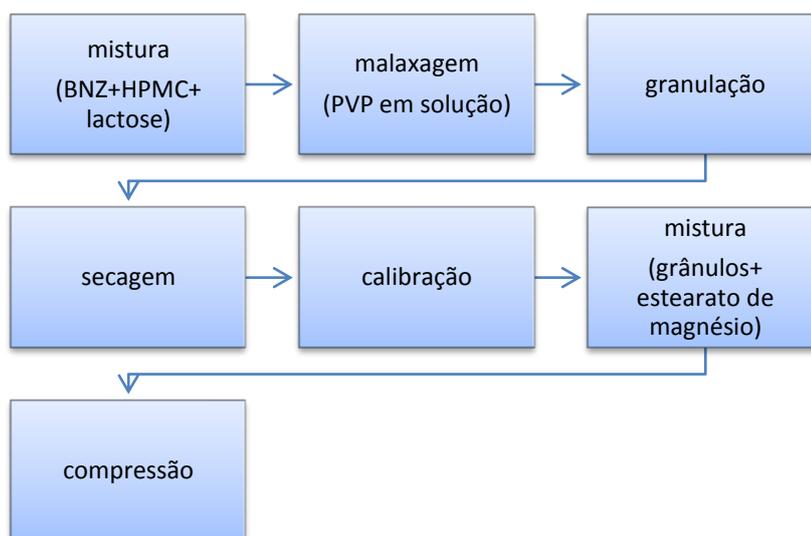


Legenda: BNZ= Benznidazol; LB= Liberação prolongada; PVP= Polivinilpirrolidona; HPMC= Hidroxipropilmetilcelulose. Fonte: Autoria Própria.

O processo foi iniciado com a mistura de BNZ e PVP K-30 (4:1) em um gral com o auxílio do pistilo, posteriormente foi realizada a malaxagem com solução hidroetanólica 1:1 (v/v). A massa úmida obtida foi passada por uma malha de 2,5 mm para obtenção dos grânulos. Em seguida, estes foram secos em estufa com circulação de ar com temperatura em torno de 60°C por 12 h, sendo posteriormente calibrados em malha 2 mm. Após a obtenção do granulado, este foi misturado ao HPMC K100 LV, em seguida à lactose e, por último, ao estearato de magnésio. A mistura obtida foi comprimida em compressora rotativa Neuberger, modelo MN2 utilizando punção nº 10 (SANTOS, 2011).

O segundo método consistiu no processo esquematizado na figura 5.

Figura 5 - Esquema do processo de obtenção dos comprimidos de BNZ dos lotes LB II e III.



Legenda: BNZ= Benznidazol; LB= Liberação prolongada; PVP= Polivinilpirrolidona; HPMC= Hidroxipropilmetilcelulose. Fonte: Autoria Própria.

No segundo método, o processo foi iniciado com a mistura do BNZ com HPMC e lactose, sendo, em seguida, realizada a malaxagem utilizando solução hidroetanólica 1:1 (v/v) contendo PVP dissolvido. Posteriormente, a mistura umedecida foi passada através da malha de 3 mm e os grânulos obtidos foram secos em estufa estabilizada a 60°C por aproximadamente 19h. Após secagem, os grânulos foram calibrados em malha de 1,5 mm, sendo depois misturados ao estearato de magnésio. Por fim, o material foi comprimido utilizando punção nº 10 em compressora rotativa Neuberger, modelo MN2.

4.4 Controle de qualidade físico-químico das formas farmacêuticas obtidas

Os procedimentos metodológicos empregados para a realização do controle de qualidade das formas farmacêuticas obtidas seguiram os critérios estabelecidos na Farmacopeia Brasileira 5ª Edição.

O peso médio dos comprimidos foi determinado com o auxílio de balança analítica Bioprecisa® FA2104N. Para o teste de dureza foi utilizado o durômetro Varian® VK 200 e para a realização do teste de friabilidade dos comprimidos de BNZ foi empregado um friabilômetro PressTest®.

Para a quantificação do fármaco nos comprimidos foi utilizado o método desenvolvido e validado por Soares-Sobrinho e colaboradores (2006). A análise foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu® 1240, comprimento de onda de 324 nm.

4.5 Estudo dos perfis de dissolução *in vitro*

O aparato II (Varian VK 7010), a 75 rpm e $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ foi utilizado nos estudos de dissolução. Os experimentos foram realizados com 6 a 8 comprimidos, utilizando quatro métodos diferentes (Tabela 4).

Tabela 4 – Métodos utilizados para o estudo de dissolução dos comprimidos de BNZ.

Métodos	Meio	pH	Volume (mL)
I	Tampão HCl / NaCl	1,2	900
II	Tampão HCl / NaCl, 1% de LSS	1,3	1000
III	FASSGF	1,6	500
IV	FASSGF / FASSIF	1,6/6,5	500

Fonte: Autoria própria.

Os tempos de coleta para as formas de liberação imediata seguiram a literatura, possuindo tempo de duração total de 2 h (LIMA et al., 2009; MEDEIROS, 2010). Em relação às formas de liberação prolongada, as coletas ocorreram, nos tempos 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24, 28, 30, 32, 36, 48, 52, 56, 60 e 72 h, até que houvesse uma liberação de fármaco superior a 85%. As alíquotas retiradas (7 mL) foram filtradas em filtro de

membrana 0,45 μm e, posteriormente diluídas para a determinação do teor de BNZ em espectrofotômetro UV/Vis (UVmini -1240 Shimadzu[®]) pelo método de Soares-sobrinho e colaboradores (2006).

Os meios contendo FASSGF (*Fasted State Simulated Gastric Fluid*) e FASSIF (*Fasted State Simulated Intestinal Fluid*), considerados biorrelevantes, foram obtidos a partir da diluição do pó SIF (*Simulated Intestinal Fluid*), um complexo composto por dois tensoativos endógenos taurocolato de sódio e lecitina de soja, em uma solução tamponada (Anexo A). O FASSGF é utilizado em tampão ácido (HCl/NaCl) e o FASSIF em tampão básico (NaCl/NaOH/Fosfato monossódico anidro) (JANTRATID et al., 2009). Nos comprimidos de liberação imediata, foi testado apenas o FASSGF por 2 h (método III), como modo de comparação aos métodos considerados não biorrelevantes (métodos I e II). Nos comprimidos de liberação prolongada, foi utilizada o método IV que consiste no uso do FASSGF nas primeiras 4 h e do FASSIF nas horas seguintes, com o intuito de simular a transição do meio gástrico para o meio intestinal (FERRERO, JIMÉNEZ-CASTELLANOS, 2014).

4.5.1 Tratamento de dados

Os dados de dissolução foram corrigidos quanto à perda de volume e fármaco durante as coletas, de acordo com cálculo similar ao encontrado na literatura (ARONSON, 1993; SINGH, KAUR, SINGH, 1997). A equação 2 representa a correção da concentração (C_{corr}) em teste de dissolução em que há reposição, métodos I, III e IV.

$$C_{corr} = C_n + \frac{V_s}{V_t} \sum_1^{n-1} C_i \quad (\text{Equação 2})$$

A equação 3 representa a C_{corr} em teste de dissolução sem reposição, cálculo que foi utilizado apenas no método II de dissolução (Singh, 1997).

$$C_{corr} = C_n + \frac{V_s}{V_t} \cdot [(\sum_1^n C_i) - (n \cdot C_n)] \quad (\text{Equação 3})$$

Nas equações, C_n é a concentração no ponto de coleta n , V_t é o volume total inicial, V_s é o volume das coletas e C_i é a concentração das amostras nos pontos anteriores a n .

Foram calculados os desvios padrão relativos à porcentagem de BNZ dissolvido ao longo do tempo, sendo os valores plotados nos perfis de dissolução com os valores da média \pm desvio padrão. A eficiência da dissolução (ED%) foi calculada nos tempos correspondentes a 30 e 60 min para formas de liberação imediata e para 12 e 24 h em formas de liberação prolongada. A ED% é a área sobre a curva no tempo t da curva de dissolução expressa como porcentagem da área do retângulo em $y^{100\%}$ no mesmo tempo t (KHAN, RHODES, 1972; KHAN, 1975). O cálculo foi realizado com auxílio do software Origin[®] 8 da Origin Lab Solutions.

Foi realizado o teste ANOVA univariada comparando-se os perfis de dissolução obtidos nos métodos I, II e III para os comprimidos adulto e pediátrico a cada ponto de coleta, considerando estatisticamente significantes as amostras com um valor de $P < 0,05$. Outros parâmetros utilizados para a comparação dos perfis de dissolução foram os fatores de diferença (f_1) e de semelhança (f_2) (MOORE, FLANNER, 1996), representados pelas equações 4 e 5, respectivamente. Os cálculos foram realizados utilizando o software Microsoft Excel[®] 2007 e o *add-in* DDSolver[®] (ZHANG et al., 2010).

$$f_1 = \left\{ \frac{[\sum_{t=1}^n |R_f - T_f|]}{\sum_{t=1}^n R_t} \right\} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

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

Onde, n é o número de intervalos de coleta, R_f é a quantidade de fármaco liberado do medicamento referência no tempo t, T_f é a quantidade de fármaco liberado do medicamento teste no tempo t.

4.5.2 Modelos cinéticos

Os resultados do perfil de dissolução também foram analisados quanto ao ajuste a modelos cinéticos. A equação de regressão da reta foi determinada para linhas de tendência dos gráficos correspondentes, seguindo as fórmulas gerais (Tabela 5).

A escolha do modelo matemático foi realizada a partir do coeficiente de determinação (R^2) e do coeficiente de determinação ajustado (R^2_{ajustado}), o último é

calculado pela equação 6, quanto mais próximo de 1 o valor numérico de $R^2_{ajustado}$, melhor a amostra se ajusta ao modelo (ZHANG et al., 2010).

$$R^2_{ajustado} = 1 - \frac{n-1}{n-p} \times (1 - R^2) \quad (\text{Equação 6})$$

Onde n é o número de pontos da amostra, p é o número de parâmetros do modelo e R^2 é o coeficiente de determinação.

Os cálculos foram realizados utilizando o *software* Microsoft Excel[®] 2007 e o *add-in* DDSolver[®] (ZHANG et al., 2010).

Tabela 5 - Modelos matemáticos de cinética de dissolução usados na avaliação do perfil de dissolução de comprimidos de BNZ

Modelo	Equação*	Gráficos plotados
Ordem zero	$Q_0 = Q_t + K_0.t$	Q_0 versus t
Primeira ordem	$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1.t$	$\log Q_t$ versus t
Higuchi	$Q_t = K_H.t^{1/2}$	Q_t versus $t^{1/2}$
Peppas-Sahlin	$M_t/M_\infty = K_1.t^m + K_2.t^{2m}$	M_t/M_∞ versus t^m
Korsmeyer-Peppas	$M_t/M_\infty = K.t^n$	M_t/M_∞ versus t

* Q_t - quantidade de fármaco liberado no tempo t ; Q_0 - quantidade inicial de fármaco em solução; Q_∞ - quantidade de fármaco dissolvida no tempo total; M_t - quantidade de fármaco dissolvido no tempo t ; M_∞ - quantidade total de fármaco dissolvido quando a forma farmacêutica se desintegra por completo; K_0 , K_1 , K_2 , K_H , constantes características de cada modelo; t - tempo. Fonte: Adaptado de SANTOS, 2011.

4.6 Estudos de biodisponibilidade

Os estudos de biodisponibilidade foram realizados em parceria com o grupo de pesquisa do Laboratório de Toxicologia do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia - FCF-UNESP/Araraquara sob coordenação da Prof. Dr^a Rosângela G. Peccini, como dissertação de mestrado da FCF/UNESP/Araraquara. O grupo foi responsável pela realização dos estudos farmacocinéticos *in vivo* desde a administração no modelo animal, quantificação do BNZ no plasma até o tratamento e discussão dos dados. Enquanto que a correlação foi trabalhada em conjunto com o Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos da UFPE, como parte dos objetivos do presente trabalho.

Para os estudos foram utilizados, como modelo animal, coelhos albinos em jejum, experimento que foi realizado após aprovação pelo comitê de ética no uso de animais da FCF/UNESP sob nº 01/2014. Os animais foram separados em grupos de sete para administração das formas farmacêuticas, sendo as coletas realizadas nos tempos de:

- Comprimidos de uso adulto: 0,25; 0,50; 0,75; 1; 2; 4; 6; 8; 12; 18 e 24 h;
- Comprimidos de uso pediátrico: 0,25; 0,50; 0,75; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 5 e 6 h.
- Comprimido lote III: 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 30, 36 h.

Para a quantificação do BNZ foi utilizado método validado por cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por UV/Vis a 324 nm (DAVANÇO, CAMPOS, PECCINI, 2014).

4.6.1 Correlação *in vitro/in vivo* (IVIV)

Os valores das concentrações plasmáticas ao longo do tempo obtidos pelo grupo da UNESP foram convertidos em porcentagem de quantidade de fármaco absorvido por meio da equação 7 (WAGNER, NELSON, 1963):

$$F (\%) = \frac{[C_t + (k_e \times AUC_{0-t})]}{k_e \times AUC_{0-\infty}} \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

A quantidade absorvida foi plotada em relação à quantidade dissolvida na tentativa de estabelecer uma correlação IVIV nível A (EMAMI, 2006). Os gráficos foram avaliados em relação ao coeficiente de determinação (R^2) obtido a partir da regressão linear.

Também foram obtidos os gráficos da porcentagem absorvida e dissolvida em relação ao tempo para verificação da correlação IVIV.

Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Controle físico-químico do insumo farmacêutico ativo BNZ

Análises físico-químicas foram realizadas para assegurar a qualidade do princípio ativo. Os resultados estão expressos a seguir.

5.1.1 Teor do insumo farmacêutico ativo BNZ

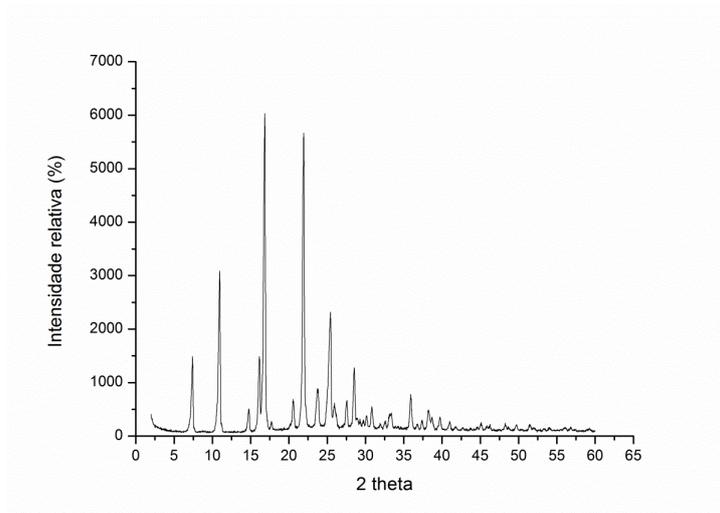
O BNZ apresentou teor de $101,5237 \pm 2,79\%$ em relação ao padrão de trabalho utilizado, valor que foi considerado aceitável por estar aproximadamente dentro do teor especificado (99-101%) na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010).

5.1.2 Difração de raios X

A difração de raios X é uma técnica capaz de determinar a pureza física ao revelar sobre a conformação cristalina de amostras, podendo identificar a presença de polimorfos.

O difratograma do BNZ apresentou um perfil tipicamente policristalino, com picos principais bem definidos a 2θ posicionados em $10,96^\circ$, $16,84^\circ$, $21,92^\circ$ (Figura 6).

Figura 6 – Difratograma do BNZ lote 15986.



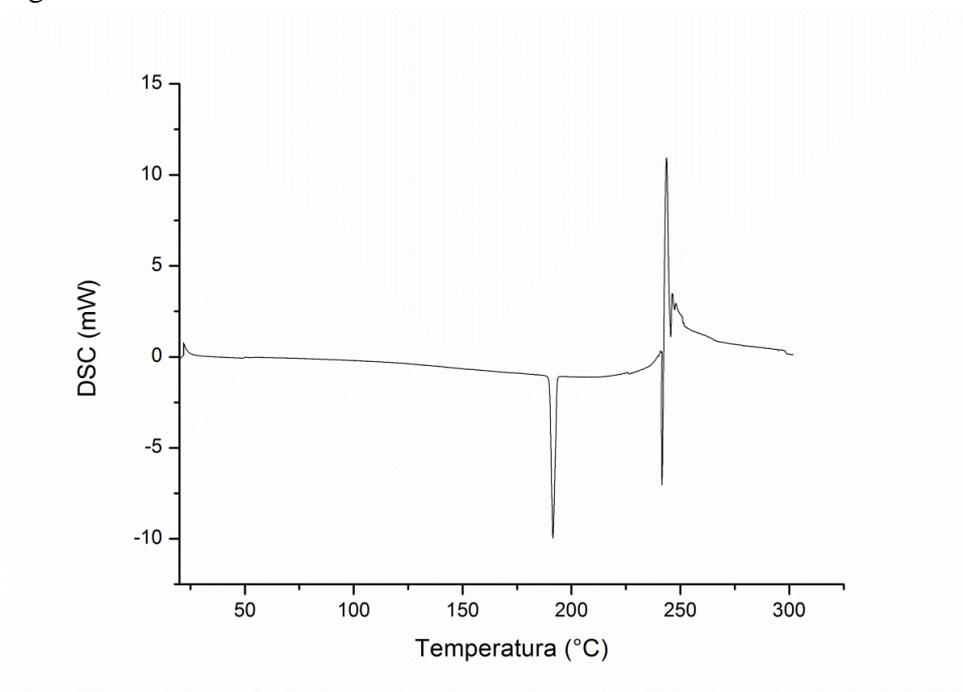
Fonte: Autoria própria.

Soares-Sobrinho e colaboradores (2010) obtiveram resultados semelhantes, o que diferiu foi que o pico no ângulo $7,5^\circ$ foi maior do que o pico no ângulo $10,96^\circ$. Estas variações na intensidade podem ser justificadas pela orientação preferencial dos cristais e indicam tratar-se da mesma forma cristalina estabelecida na literatura (MAXIMIANO et al., 2010).

5.1.3 Análise térmica

A curva DSC da amostra de BNZ apresentou três eventos: dois são endotérmicos e um exotérmico (Figura 7). O primeiro evento que ocorre de $189,87$ a $193,09^\circ\text{C}$ e possui pico em $191,38^\circ\text{C}$ é característico do ponto fusão, cujo referencial especificado pelo fabricante é de 189 - 192°C . O alargamento da faixa do ponto de fusão detectado na amostra pode representar a presença de impurezas. Apesar disso, a pureza do pico foi de $99,51\%$. Os demais eventos estão relacionados a processos de degradação do BNZ (MAXIMIANO et al., 2010).

Figura 7 – Curva DSC do BNZ lote 15986.



Fonte: Autoria própria.

5.1.4 Estudos de solubilidade

A solubilidade de fármacos é considerada um fator importante na absorção, pois apenas o fármaco dissolvido é capaz de ser absorvido.

Os resultados demonstraram que o BNZ é praticamente insolúvel de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª edição (Tabela 6). Enquanto na literatura, é encontrado que o fármaco é pouco solúvel, possuindo valores de solubilidade maiores do que os encontrados neste trabalho. No entanto, as condições utilizadas foram diferentes. Maximiano e colaboradores (2010) utilizaram um agitador magnético a 25°C e quantidade de BNZ suficiente para saturar 10 mL de solução, a quantificação também foi realizada por espectroscopia de UV. Enquanto Medeiros (2010) utilizou um volume de 5,5 mL de uma suspensão de 1 mg/mL de BNZ em sistema de agitação a 37°C ± 0,5°C por 24 h, a quantificação foi realizada por método validado por cromatografia líquida de alta eficiência (SILVA et al., 2007).

Tabela 6 – Teste de solubilidade de BNZ (lote 15986) a 37 ± 0,5 °C em diferentes metodologias analíticas.

Meios de dissolução	Resultados (mg/mL ± DP)	Solubilidade (mg/mL)	
		MAXIMIANO et al., 2010	MEDEIROS, 2010
Fluido gástrico	0,0630 ± 0,0018	0,2360	~0,3100
Fluido gástrico + 1% LSS	0,1066 ± 0,0028	0,4060	~0,5900
Fluido Intestinal	-	0,2440	-
FASSGF	0,0606 ± 0,0025	-	-
FASSIF	0,0572 ± 0,0023	-	-

Legenda: LSS= Lauril Sulfato de Sódio; FASSGF= *Fasted State Simulated Gastric Fluid*; FASSIF= *Fasted State Simulated Intestinal Fluid*; DP= Desvio padrão. Fonte: A autoria própria.

A diferença dos valores de solubilidade, principalmente em relação aos dados de Medeiros (2010), pode ter sido causada pela não reprodutibilidade da hidrodinâmica do sistema, devendo o teste ser repetido para volumes menores. Ainda assim, pode ser observado que o BNZ possui maior solubilidade no meio contendo LSS a 1%, devido à presença do tensoativo que permite a melhor solubilização de moléculas pouco solúveis. Embora, o FASSGF e FASSIF também contenham tensoativos, estes não

incrementaram a solubilidade em relação ao meio de fluido gástrico (meio do método I da dissolução).

5.2 Obtenção e controle de qualidade físico-químico dos comprimidos de liberação prolongada de BNZ

Durante a produção dos comprimidos, a molhagem foi uma etapa crítica devido à formação de uma massa rígida após secagem, de forma a dificultar a formação dos grânulos. A compressão resultou em comprimidos brancos, brilhantes, sem fissuras ou capeamento, medindo aproximadamente 10 mm de diâmetro por 6,4 mm de largura.

Após a obtenção dos comprimidos foram realizados os controles de qualidade mostrados na tabela 7, de acordo com especificações da Farmacopeia Brasileira (2010).

Tabela 7 - Controle de qualidade físico-químico dos comprimidos de BNZ obtidos.

Parâmetros	Especificações	LB I	LB II	LB III
Peso médio	(500 mg ± 5%)	502,18 (0,44%)	501,10 (0,22%)	490,35 (1,93%)
Friabilidade	(<1,5%)	0,34	0,09	0,19
Dureza	(>3 Kgf.cm ⁻² ± DP)	7,86 ± 1,55	9,71 ± 1,63	6,49 ± 1,33
Teor	(90-110%)	97,45	94,84	96,47
Uniformidade de dose unitária	(VA ≤ 15)	28,54	7,47	9,54

Legenda: DP= Desvio Padrão; VA= Valor de aceitação. Fonte: Autoria própria.

No teste do peso médio, a Farmacopeia Brasileira 5ª edição regulamenta que para comprimido não revestidos com valor de massa maior que 250 mg devem variar até 5% em relação ao peso (BRASIL, 2010a). As formulações foram desenvolvidas para produzir comprimidos com 500 mg, sendo assim a faixa de variação de peso permitida foi de 475 a 525 mg. Como pode ser observado na tabela 7, os três lotes tiveram valores de peso médio que variaram dentro da faixa permitida.

A friabilidade, parâmetro que determina a resistência ao rolamento, oferece informações úteis quanto à resistência ao desgaste por atrito dos comprimidos em operações de embalagem, transporte e desgaste durante o revestimento. Os valores de friabilidade dos lotes testados mostraram-se aceitáveis (BRASIL, 2010a) e demonstram que o uso do polímero HPMC com viscosidades diferentes não interferem no cumprimento dessa especificação.

A dureza, parâmetro que relaciona a resistência do comprimido ao esmagamento ou à ruptura sob pressão radial, com a força medida em Newton (N). A dureza de um comprimido é proporcional à força de compressão e inversamente proporcional à sua porosidade. De acordo com a edição atual da Farmacopeia Brasileira (2010), não há uma especificação da faixa de aceitação para esse parâmetro, sendo apenas de caráter informativo. A especificação anterior presente na farmacopeia brasileira 4ª edição (1988) regulamentava que o valor mínimo aceitável da dureza era de 3 Kgf.cm^{-2} , os valores de dureza apresentados foram superiores a esse valor mínimo.

Em relação ao ensaio de teor do fármaco, a farmacopeia brasileira não possui monografia sobre comprimidos de benznidazol, de forma que a faixa de 90 a 110% foi empregada por ser a especificação utilizada para os comprimidos de liberação imediata produzidos pelo Lafepe (MEDEIROS, 2010). Os lotes produzidos tiveram teor dentro da faixa especificada.

A uniformidade de conteúdo foi realizada pelo método de variação de peso como prevê a Farmacopeia Brasileira (2010), devido à proporção de BNZ ser acima de 25% nos comprimidos analisados. Neste teste, os comprimidos do lote LBI de BNZ foram reprovados, pois os valores de aceitação foram de 35,67 para os 10 primeiros comprimidos e de 28,54 para 30 comprimidos testados, valores que são superiores a 15, o limite especificado. Provavelmente, a falta de uniformidade observada é devido ao modo de produção, pois os grânulos da dispersão sólida de BNZ e PVP possuíam 1,5 mm e foram misturados aos demais excipientes (HPMC, lactose, estearato de magnésio) que são pós finos. Essa diferença do tamanho das partículas pode resultar na segregação do material, gerando comprimidos com proporções desiguais de grânulos e excipientes no decorrer da compressão (LAKIO et al., 2012).

Dessa forma, foi idealizado o modo de produção dos lotes LBII e LBIII, em que a granulação por via úmida foi realizada com todos os excipientes sem a etapa de obtenção da dispersão do BNZ em PVP. Este último foi utilizado como aglutinante na formulação, tendo sido reduzida a quantidade de 10% para 1%.

5.3 Estudos de dissolução

O teste de dissolução é uma análise imprescindível no controle de qualidade de comprimidos, porque traz informações a respeito da liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica e pode prever o comportamento *in vivo*.

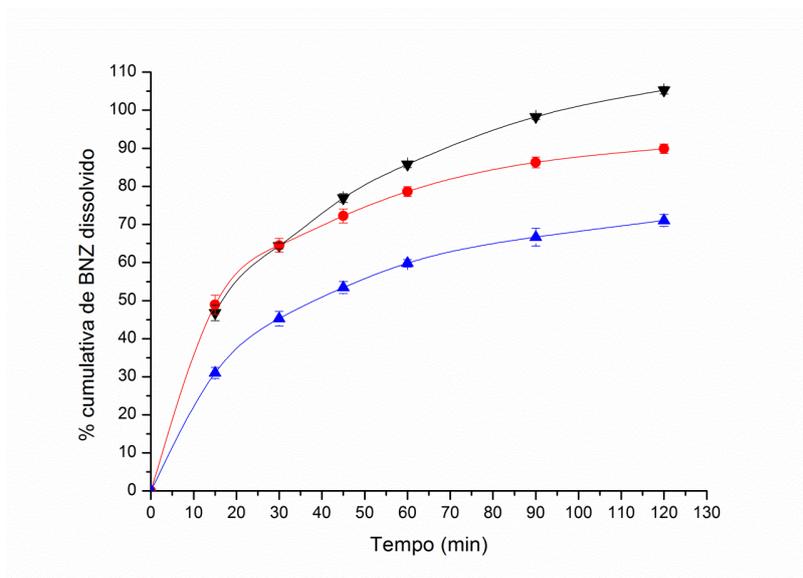
5.3.1 Comprimidos de liberação imediata

Os comprimidos de liberação imediata de uso adulto e pediátrico foram analisados quanto aos diferentes métodos existentes na literatura. Os resultados estão representados a seguir.

5.3.1.1 Comprimidos de BNZ de uso adulto

Os perfis de dissolução obtidos nestes três métodos são apresentados na figura 8. Os perfis dos métodos I e II tiveram maior semelhança, atingindo valores acima de 90% no último ponto. Enquanto que o método III atingiu apenas 70% da dissolução, possivelmente devido à falta de condição *sink*, o que dificultou a solubilização do BNZ mesmo em presença de tensoativos.

Figura 8 - Perfis de liberação imediata do comprimido adulto de BNZ utilizando três meios de dissolução diferentes.



Legenda: Triângulo invertido (▼) = perfil no método I, ponto (●) = perfil no método II, triângulo (▲) = perfil no método III. Fonte: Autoria própria.

Na tabela 8, pode ser observado que os métodos I e II possuem parâmetros semelhantes, sendo a maior eficiência de dissolução do método I. No entanto, o teste ANOVA realizado entre os valores obtidos, identificou semelhança significativa apenas no ponto de 30 min ($p = 0,897$) dos métodos I e II e nenhuma semelhança foi encontrada entre estes e o método III.

Tabela 8 – Parâmetros obtidos a partir do perfil de dissolução dos comprimidos adulto de BNZ.

Parâmetros	Método I (%) (±DP)	Método II (%) (±DP)	Método III (%) (±DP)
Q ₃₀	64,37 ± 0,76	64,50 ± 1,80	45,27 ± 1,93
Q ₆₀	85,78 ± 0,84	78,65 ± 1,30	59,82 ± 1,64
ED ₃₀	39,48	40,58	26,82
ED ₆₀	57,75	56,24	39,90

Legenda: Q30 = Quantidade de BNZ dissolvida em 30 min; Q60 = Quantidade de BNZ dissolvida em 60 min; ED30 = Eficiência de dissolução em 30 min; ED60 = Eficiência de dissolução em 60 min; DP= Desvio Padrão. Fonte: Autoria própria.

A escolha do modelo cinético foi realizada considerando o R^2 com valor mais próximo a um. Dessa forma, o modelo cinético que mais se ajustou aos perfis dos métodos I e II foi o de primeira ordem, seguido pelo de Higuchi e por fim o de ordem zero, enquanto o perfil do método III teve afinidade na seguinte ordem: modelo de Higuchi > primeira ordem > zero ordem (Tabela 9). Na liberação imediata, apenas estes modelos foram utilizados, pois os demais modelos representam perfis de liberação prolongada.

Tabela 9 – Coeficientes de determinação (R^2) obtidos a partir do ajuste a modelos cinéticos utilizando comprimidos de BNZ de uso adulto.

Modelos	Método I	Método II	Método III
Ordem zero	0,9184	0,8214	0,8809
Primeira ordem	0,9934	0,9713	0,9508
Higuchi	0,9902	0,9649	0,9718

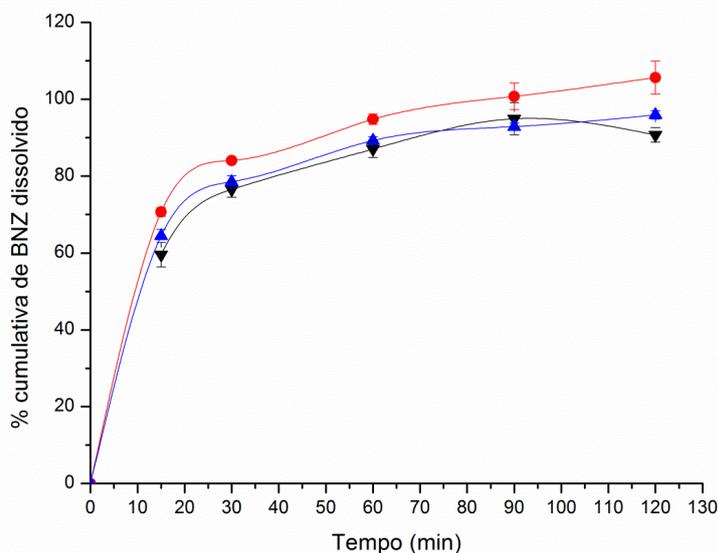
Fonte: Autoria própria.

5.3.1.2 Comprimidos pediátricos de BNZ

Os perfis de liberação dos comprimidos pediátricos de BNZ apresentaram-se visualmente semelhantes (Figura 9). O teste ANOVA univariada constatou que, nos pontos de 30 e 90 min, os perfis dos métodos I e III são estatisticamente semelhantes com um valor de p igual a 0,092 e 0,261, respectivamente. Pode ser também observado uma proporção maior de fármaco dissolvido (Tabela 10) em relação ao comprimido adulto (tabela 8).

Aparentemente, a maior porcentagem de dissolução nos perfis dos comprimidos pediátricos no método III, deve-se a menor quantidade de fármaco presente (12,5 mg) que é oito vezes menor que a dose do comprimido adulto (100 mg). Inclusive o método III está sob condição *sink* para comprimidos pediátricos (concentração teórica máxima de 0,025 mg/mL) se considerar a solubilidade do BNZ em FASSGF como 0,061 mg/mL (valor obtido no ensaio de solubilidade). Porém, o teste não ocorre em condição *sink* para os comprimidos de uso adulto (concentração teórica máxima de 0,2 mg/mL).

Figura 9 - Perfis de liberação imediata do comprimido pediátrico de BNZ utilizando três meios de dissolução diferentes.



Legenda: Triângulo invertido (▼) = perfil obtido no método I, ponto (●) = perfil obtido no método II, triângulo (▲) = perfil obtido no método III. Fonte: Autoria própria.

A maior eficiência de dissolução obtida foi com o método II, seguido do método III (tabela 10), ou seja, os meios contendo tensoativos tiveram uma eficiência de dissolução.

Em relação à cinética dos perfis de dissolução dos comprimidos pediátricos, o modelo que mais se justou aos métodos II e III foi o modelo de primeira ordem (Tabela 11). Enquanto, no método I, houve melhor ajuste ao modelo de Higuchi. Sendo assim, o modelo de primeira ordem está vinculado a uma eficiência de dissolução maior e o modelo de Higuchi a uma liberação mais lenta, característica da baixa solubilização da droga.

Tabela 10 – Parâmetros obtidos a partir do perfil de dissolução dos comprimidos pediátricos de BNZ.

Parâmetros	Método I (%) (±DP)	Método II (%) (±DP)	Método III (%) (±DP)
Q ₃₀	76,53 ± 3,20	84,07 ± 0,97	78,50 ± 1,59
Q ₆₀	87,05 ± 2,20	94,81 ± 1,34	89,27 ± 1,02
ED ₃₀	48,91	56,35	51,86
ED ₆₀	65,35	72,90	67,87

Legenda: Q30 = Quantidade de BNZ dissolvida em 30 min; Q60 = Quantidade de BNZ dissolvida em 60 min; ED30 = Eficiência de dissolução em 30 min; ED60 = Eficiência de dissolução em 60 min; DP= Desvio Padrão. Fonte: Autoria própria.

Tabela 11 – Coeficientes de determinação (R²) obtidos a partir do ajuste a modelos cinéticos utilizando comprimidos pediátricos de BNZ.

Modelos	Método I	Método II	Método III
Ordem zero	0,7271	0,8406	0,7871
Primeira ordem	0,7424	0,9771	0,9725
Higuchi	0,9081	0,9687	0,9454

Fonte: Autoria própria.

Ao comparar por ANOVA univariada, os perfis de dissolução dos dois tipos de comprimido para cada método, foram constatados que há similaridade significativa apenas nos pontos 60 e 90 min do método I, com *p* igual a 0,266 e 0,0782,

respectivamente. Os demais métodos discriminaram o perfil de dissolução dos dois comprimidos com intervalo de confiança de 95%.

Quanto aos fatores de diferença (f1) e de semelhança (f2), apenas o método I possuiu perfis similares, considerando que o critério de similaridade é de valores de 0 a 15 para f1 e de 50 a 100 para f2 (UNITED STATES, 1997).

Tabela 12 – Valores de f1 e f2 aplicados aos métodos de dissolução obtidos dos comprimidos de uso adulto e pediátrico de BNZ.

	Método I	Método II	Método III
f1	9,94	23,83	54,92
f2	50,59	37,50	26,03

Legenda: f1= fator de diferença; f2= fator de semelhança. Fonte: Autoria própria.

No desenvolvimento do comprimido pediátrico por Medeiros (2010), foi utilizado o método II de dissolução e inicialmente foram relatados problemas na obtenção de lotes similares aos comprimidos adultos em relação ao f1 e ao f2. Após a transposição do lote piloto para a escala industrial o problema havia sido resolvido, mas diante dos resultados obtidos neste trabalho, pode ser visto que este critério continua a não ser atendido.

Para fins regulatórios o f₂ é importante, pois a sua aceitação isenta de estudos de biodisponibilidade relativa / bioequivalência para medicamentos desenvolvidos com menor dosagem em relação a um medicamento de referência já registrado (BRASIL, 2010b; 2011).

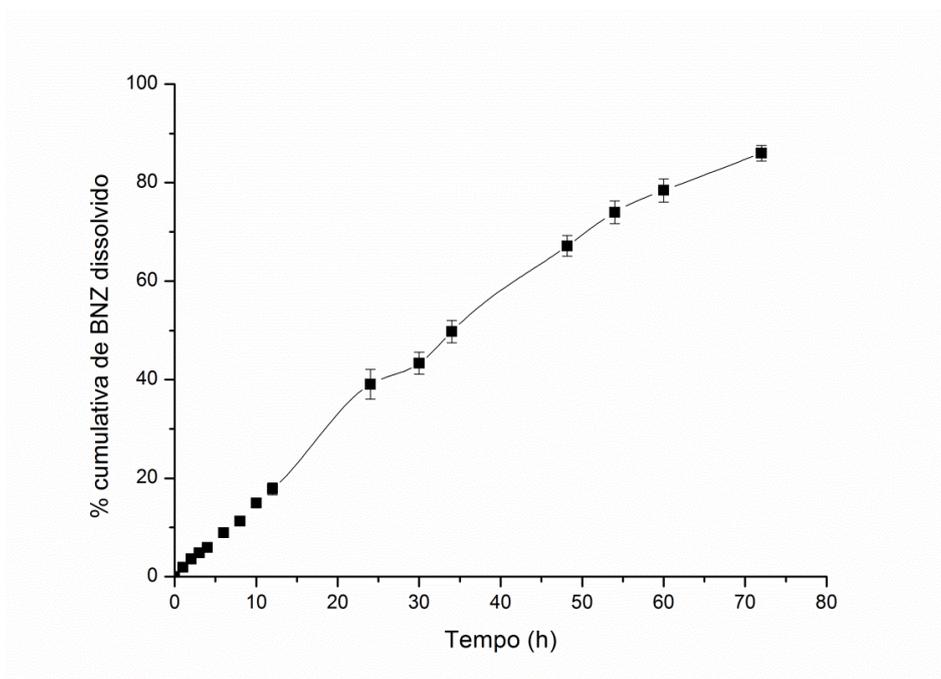
5.3.2 Comprimidos de liberação prolongada

Nesta seção, os métodos de dissolução duraram o tempo necessário para alcançar teor dissolvido acima de 80% (UNITED STATES, 1997), com exceção do meio biorrelevante por possuir uso limitado até 24 h a 37°C por questões de estabilidade conforme informações do fabricante (anexo A). Houve também a troca do método III pelo método IV, pois o último simula a dissolução da forma farmacêutica de modo similar ao que ocorre *in vivo*, com a dissolução do comprimido ocorrendo primeiramente em estágio ácido (estomacal) e, posteriormente, em estágio básico (intestinal).

5.3.2.1 Lote LBII

O perfil de dissolução do comprimido de BNZ do lote LBII no método I possui o tempo mais elevado de dissolução em 72 h apenas 85% de BNZ foi dissolvido (figura 10).

Figura 10 – Perfil de dissolução no método I do comprimido LBII de BNZ.



Fonte: Autoria própria.

Provavelmente, o fato é devido à baixa solubilidade do BNZ, pois a liberação da forma farmacêutica matricial de liberação pode acontecer por processos de difusão e a droga necessita estar dissolvida para ser difundida (MANADAS, PINA, VEIGA, 2002). Além disso, o HPMC utilizado neste lote é o K100M, que possui alta viscosidade (100000 mPa.s), podendo este ter uma capacidade maior de reter fármacos (SIEPMANN, PEPPAS, 2001).

O comportamento de intumescimento do comprimido LBII no método I pode ser observado em imagens no apêndice A. O intumescimento ocorre devido à formação de gel pela entrada de meio de dissolução no comprimido por processo de difusão. Após a formação do gel, ocorrem processos de degradação/erosão que irão reduzir o tamanho do comprimido até a completa dissolução que irá depender da solubilidade dos componentes da formulação (MANADAS, PINA, VEIGA, 2002). Todos esses

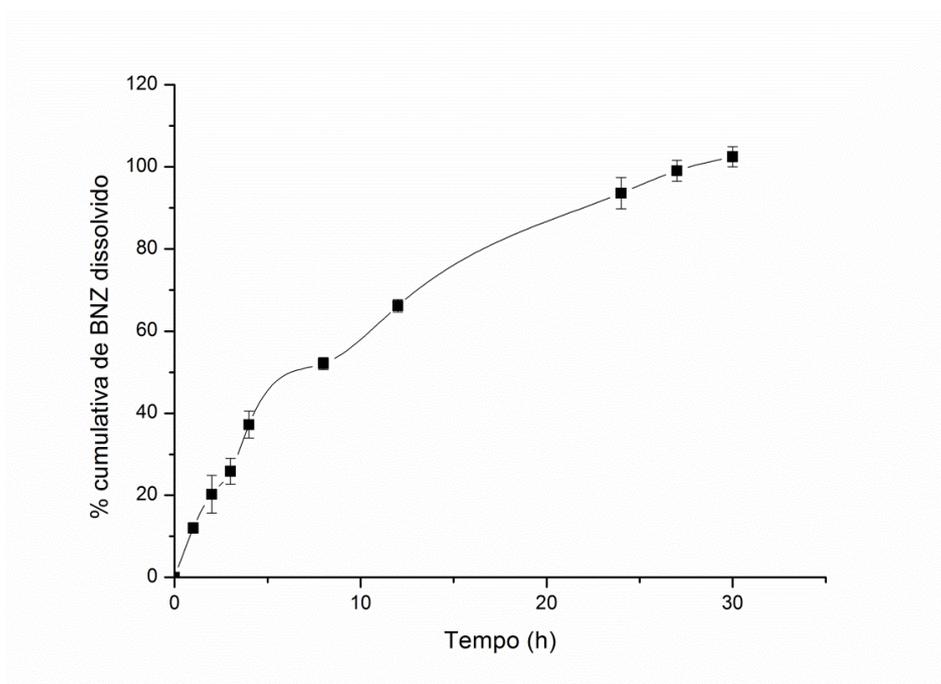
processos podem ser observados no lote LBII no método I de dissolução: de 0 a 12 h o comprimido intumescce, em 24 h já é possível observar um pouco de erosão e em 48 h, processos de erosão reduzem boa parte do tamanho do comprimido.

Nas imagens da dissolução do método II, pode ser visto que ocorre intumescimento na primeira hora, mas após 4 h o comprimido LBII se desprende do fundo da cuba de dissolução e começou a se mover de acordo com o fluxo produzido pela pá. Sendo assim, no método II, não pôde ser observada a erosão da mesma forma que o método I.

A falta de fixação do comprimido no fundo da cuba pode ter sido um fator de contribuição para o aumento da velocidade de dissolução de BNZ no método II, mas principalmente este fato ocorreu pela presença de LSS a 1% no meio que auxiliou na solubilização do fármaco.

A dissolução completa do comprimido ocorreu em 30 h (Figura 11), resultando, portanto, em maior eficiência de dissolução entre os métodos analisados (tabela 13).

Figura 11 – Perfil de dissolução no método II do comprimido LBII de BNZ.



Fonte: Autoria própria.

Em relação ao método IV (figura 12), a liberação de BNZ ocorreu bem lentamente, alcançando apenas 26% de dissolução em 24 h (tabela 13), podendo apenas

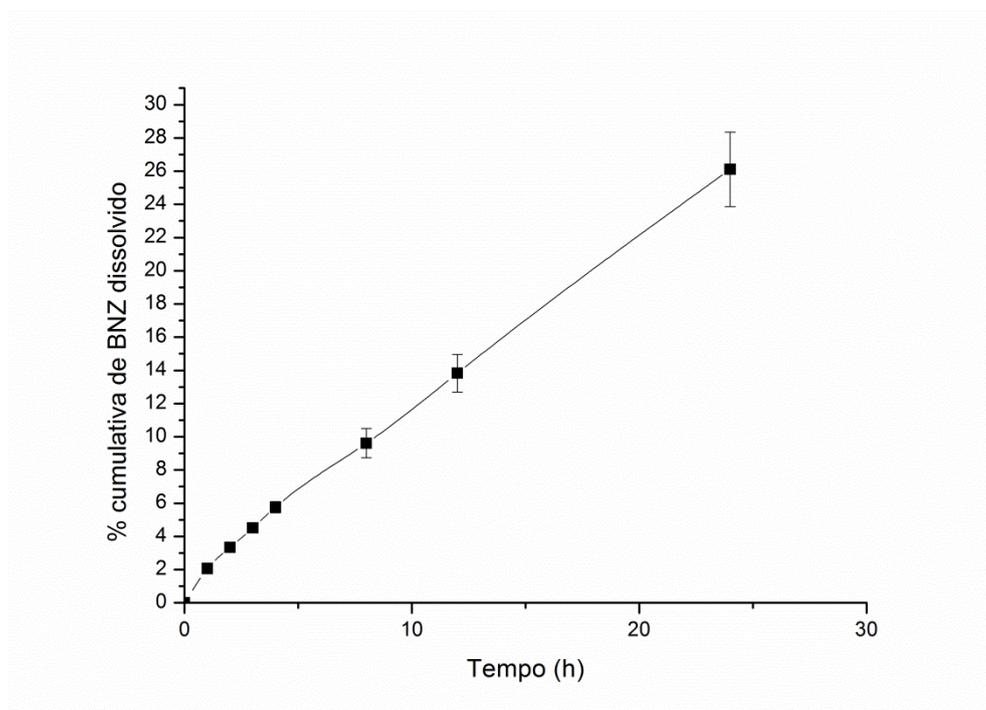
ser observado o intumescimento do comprimido, por isso imagens do processo de dissolução do método IV não foram anexadas.

Tabela 13 – Parâmetros obtidos a partir do perfil de dissolução do comprimido LBII de BNZ.

Parâmetros	Método I (%)	Método II (%)	Método III (%)
Q_{24}	$39,08 \pm 3,02$	$93,63 \pm 3,8$	$26,11 \pm 2,24$
ED_{24}	18,17	58,9819	13,75

Legenda: Q_{24} = Quantidade de BNZ dissolvida em 24 h; ED_{24} = Eficiência de dissolução do comprimido LBII em 24 h. Fonte: Autoria própria.

Figura 12 – Perfil de dissolução no método IV do comprimido LBII de BNZ.



Fonte: Autoria própria.

A mudança de FASSGF para FASSIF (ponto de 8 h) não pareceu alterar o mecanismo de dissolução, possuindo uma boa correlação com os modelos de zero e primeira ordem (tabela 14).

Os modelos cinéticos testados tiveram números de parâmetros diferentes, o que pode aumentar o valor de R^2 devido à sobreajustes que podem ocorrer. Enquanto o $R^2_{ajustado}$ tende a diminuir o sobreajuste e, portanto foi o coeficiente utilizado para a escolha do melhor modelo (ZHANG et al., 2010). Para a dissolução do método I, os

melhores modelos foram: Higuchi > Korsmeyer-Peppas > Peppas-Sahlin > Primeira ordem > Zero ordem. O método II ajustou-se melhor ao modelo de Higuchi com R^2 de valor 1. E a condição IV obedeceu aos modelos cinéticos na seguinte ordem: Peppas-Sahlin > Primeira ordem > Higuchi > Ordem zero > Korsmeyer-Peppas. O modelo de Higuchi foi, então, o modelo escolhido pelos métodos I e II, segundo o R^2 , demonstrando que a liberação ocorreu sobre forte influência de difusão fickiana, ou seja, a difusão ocorre por gradiente de concentração.

Tabela 14 – Coeficientes de determinação (R^2) obtidos a partir do ajuste a modelos cinéticos utilizando comprimidos LBII de BNZ.

Modelos	Método I		Método II		Método IV	
	R^2	$R^2_{\text{ajust.}}$	R^2	$R^2_{\text{ajust.}}$	R^2	$R^2_{\text{ajust.}}$
Ordem zero	0,9869	0,9869	0,938	0,938	0,9983	0,9983
Primeira ordem	0,984	0,984	0,9882	0,9882	0,999	0,999
Higuchi	0,9972	0,9972	1	1	0,9972	0,9972
Korsmeyer-Peppas	0,9959	0,9953	0,9862	0,9816	0,9972	0,9966
Peppas-Sahlin	0,9956	0,9934	0,9838	0,9676	0,9996	0,9994

Fonte: Autoria própria.

Os outros modelos, Korsmeyer-Peppas e Peppas-Sahlin, também podem indicar a relação do mecanismo de relaxamento dos polímeros da matriz de intumescimento. Nas condições de dissolução estudadas, o n (obtido da equação de regressão linear) está entre 0,5 e 1 (tabela 15). Segundo Korsmeyer e colaboradores (1983), valores dentro desta faixa representariam um caso de difusão anômala não Fickiana, em que a liberação ocorre por mais de um processo, tanto por mecanismos de difusão quanto por erosão, devido ao relaxamento polimérico (PANI, NATH, 2014). Isso ocorre também no método II de dissolução, apesar de um ajuste considerado ideal ($R^2 = 1$) ao modelo de Higuchi, comportamento observado por ESCUDERO e colaboradores (2008).

Em relação ao modelo Peppas-Sahlin, as constantes K_1 e K_2 representam, respectivamente, a influência da difusão e do relaxamento polimérico. O valor maior de K_2 significaria a maior influência do relaxamento polimérico na dissolução que a própria difusão (PEPPAS, SAHLIN, 1989), isso ocorre nos métodos I e IV, enquanto que o método II possui o K_2 maior, reiterando a maior atuação do processo de difusão

fickiana, isso pode ser explicado pelo papel do tensoativo LSS solubilizar o BNZ e favorecer a maior atuação de mecanismo de difusão.

Tabela 15 – Constantes obtidas a partir do ajuste a modelos cinéticos utilizando comprimidos LBII de BNZ.

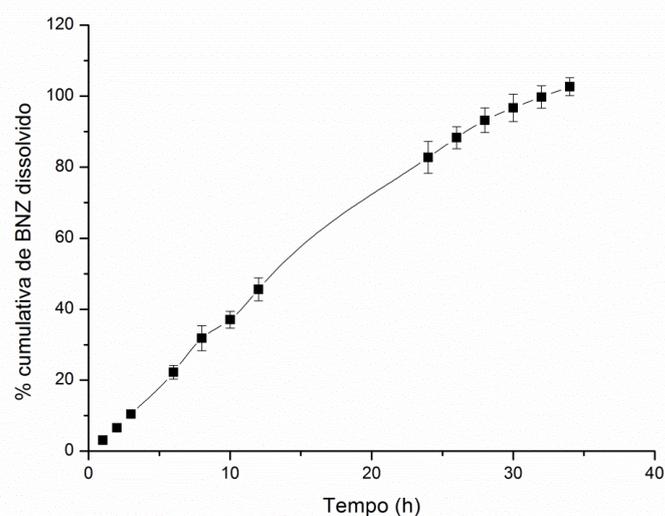
Modelos	Método I		Método II		Método IV	
	K		K		K	
Ordem zero	1,268		2,9356		1,0521	
Primeira ordem	0,011		-0,1094		-0,0118	
Higuchi	1,826		1		1,9396	
	K_k	n	K_k	n	K_k	n
Korsmeyer-Peppas	0,0179	0,9358	0,1196	0,7205	0,0194	0,7966
	K_1	K_2	K_1	K_2	K_1	K_2
Peppas-Sahlin*	-0,0327	0,0304	0,2564	0,0064	-0,0159	0,0198

* As unidades das constantes K_1 e K_2 são $\text{min}^{-0,43}$ e $\text{min}^{-0,86}$, respectivamente. A unidade da K_H é $\text{h}^{1/2}$ e a unidade das demais constantes é h^{-1} . Fonte: Autoria própria.

5.3.2.2 Lote LBIII

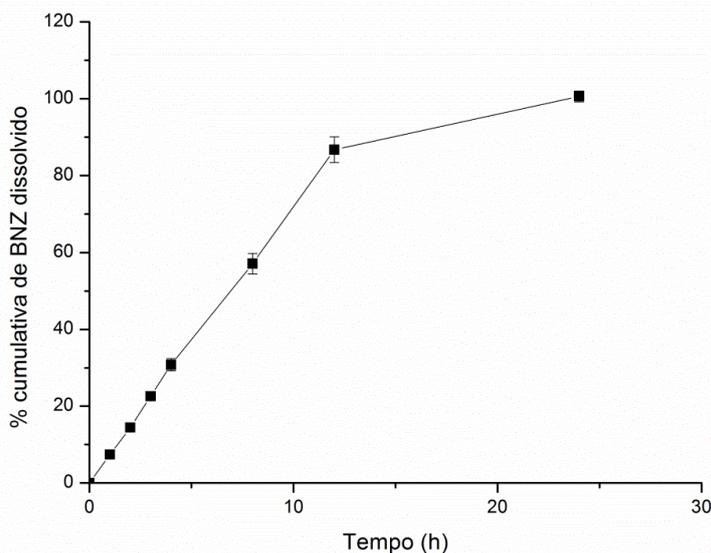
O estudo de dissolução no lote LBIII foi analisado apenas pelos métodos I e II (figura 13 e 14).

Figura 13 – Perfil do comprimido Lote LBIII de BNZ no método I de dissolução.



Fonte: Autoria própria.

Figura 14 – Perfil do comprimido de BNZ Lote LBIII no método II de dissolução.



Fonte: Autoria própria.

Comparando-se os resultados dos lotes LBII e LBIII, pode-se observar também que a troca do polímero promotor da liberação prolongada de HPMC K100M por K4M aumentou a velocidade de liberação do BNZ. O HPMC K4M possui viscosidade de 4000 mPa.s, valor que é 25 vezes menor que a viscosidade encontrada para HPMC K100M. Isso confirma que a viscosidade da malha polimérica influenciou na velocidade de dissolução de BNZ a partir dos comprimidos obtidos, como pode ser encontrado na literatura (ESCUADERO, FERRERO, JIMÉNEZ-CASTELLANOS, 2008; MADERUELO, ZARZUELO, LANA O, 2012). De forma que, enquanto o lote LBII demorou 72 h para atingir 85% de dissolução de BNZ, nas mesmas condições o lote LBIII demorou em torno de 25 h. O modo de produção também influenciou na velocidade de liberação do BNZ, pois 100% de dissolução foi obtido em 12 h em comprimido de liberação prolongada contendo dispersão sólida de BNZ em PVP (4:1) com a mesma proporção de HPMC K4M que o lote LBIII por Santos (2010). Isso ocorreu devido ao aumento da solubilidade ocasionado pela introdução da dispersão sólida na formulação.

As fases de intumescimento e erosão do ensaio de dissolução dos métodos I e II para os comprimidos do lote LBIII podem ser observados nos Apêndices C e D, respectivamente. No método I é observado o intumescimento em 3 e 9 h, após o início da dissolução, enquanto após 25 h, grande parte do comprimido foi reduzido por

processos de erosão. No método II, em 2 h é observado o intumescimento e a erosão é observada fortemente em 9 h, enquanto em 25h o comprimido não pode ser mais observado, devido à completa dissolução.

Na tabela 16, o método com a maior eficiência de dissolução também foi o método II devido à contribuição do tensoativo LSS, levando a 100% de dissolução em 24 h.

Tabela 16 – Parâmetros obtidos a partir do perfil de dissolução do comprimido lote LBIII de BNZ.

Parâmetros	Método I (%)	Método II (%)
	(±DP)	(±DP)
Q ₁₂	45,56 ± 3,22	86,74 ± 3,34
Q ₂₄	82,77 ± 4,49	100,63 ± 1,43
ED ₁₂	22,32	43,61
ED ₂₄	43,24	68,65

Legenda: Q₂₄ = Quantidade de BNZ dissolvida em 24 h; Q₁₂ = Quantidade de BNZ dissolvida em 12 h; ED₁₂ = Eficiência de dissolução em 12 h; ED₂₄ = Eficiência de dissolução em 24 h; DP= Desvio Padrão.

Fonte: Autoria própria.

O lote LBIII no método I parece ajustar-se aos modelos na seguinte ordem: Korsmeyer-Peppas > Higuchi > Zero ordem > Peppas-Sahlin. O método II ajusta-se melhor novamente ao modelo de Higuchi, seguido de Korsmeyer-Peppas, ordem zero e Peppas-Sahlin (tabela 17).

Tabela 17 – Coeficientes de determinação (R²) obtidos a partir do ajuste a modelos cinéticos utilizando comprimidos LBIII de BNZ.

Modelos	Método I		Método II	
	R ²	R ² _{ajust.}	R ²	R ² _{ajust.}
Ordem zero	0,9932	0,9932	0,9977	0,9977
Primeira ordem	0,9337	0,9337	0,9050	0,9050
Higuchi	0,9969	0,9969	0,9991	0,9991
Korsmeyer-Peppas	0,9986	0,9981	0,9985	0,998
Peppas-Sahlin	0,9932	0,9864	0,9992	0,99484

Fonte: Autoria própria.

Em geral, o valor de n foi maior para o lote LBIII. No método I, o expoente n de Korsmeyer possui valor acima de 1 (tabela 18), significando super caso II de transporte (KORSMEYER et al., 1983). Enquanto no método II permanece o mecanismo de difusão anômala. Em relação às constantes de Peppas-Sahlin, a constante K_2 maior do que a K_1 indicou uma maior influência do relaxamento polimérico em ambos os métodos de dissolução.

Sendo assim, o mecanismo de liberação do fármaco sofreu influências do grau de viscosidade do HPMC utilizado, assim como do método de dissolução utilizado. O fenômeno da erosão polimérica aparece nos dois lotes, sendo mais importante no lote LBIII. Enquanto o mecanismo de difusão polimérica foi mais relevante no lote LBII, de maior grau de viscosidade, no método II de dissolução, que mais favorece a solubilização do BNZ. Esse comportamento tem sido reportado na literatura para a dissolução de fármacos de baixa solubilidade (MADERUELO, ZARZUELO, LANAO, 2012; MANADAS, PINA, VEIGA, 2002).

Tabela 18 – Constantes obtidas a partir do ajuste a modelos cinéticos utilizando comprimidos LBIII de BNZ.

Modelos	Método I		Método II	
	K		K	
Ordem zero	3,2058		7,1836	
Primeira ordem	-0,0997		-0,1094	
Higuchi	3,2112		7,4638	
	K	n	K	n
Korsmeyer-Peppas	0,0263	1,3661	0,074	0,9939
	K_1	K_2	K_1	K_2
Peppas-Sahlin	-0,0105	0,0526	-0,0095	0,103

Legenda: K= constante cinética; n= expoente de liberação difusional. Fonte: Autoria própria.

5.4 Correlação IVIV

Segundo a *Food and Drug Administration* (FDA), a correlação IVIV é um modelo matemático preditivo que descreve a relação entre as propriedades *in vitro* da forma farmacêutica e a resposta desta *in vivo* (UNITED STATES, 1997).

Entre os fatores a serem considerados no estabelecimento da correlação IVIV está o sistema de classificação biofarmacêutico (SCB). O Sistema classifica drogas em 4 grupos, em função da solubilidade e permeabilidade:

- Classe I: Alta permeabilidade e solubilidade;
- Classe II: Alta permeabilidade e baixa solubilidade;
- Classe III: Alta solubilidade e baixa permeabilidade;
- Classe IV: Baixa solubilidade e permeabilidade.

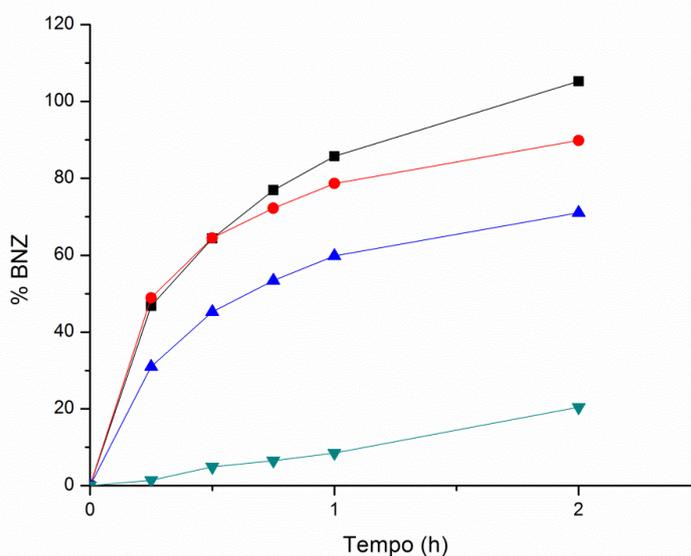
O sistema serve como base teórica para correlacionar a dissolução dos produtos *in vitro* e a performance *in vivo* (AMIDON et al., 1995).

No SCB, o BNZ é caracterizado como classe 2, de baixa solubilidade aquosa e alta permeabilidade e, por isso tem a biodisponibilidade limitada pela dissolução. De forma que, se o método de dissolução *in vitro* conseguir mimetizar bem as condições fisiológicas é esperado que ocorra a correlação IVIV nas formas de liberação prolongada e em formas de liberação imediata. No entanto, é relatado que a correlação é difícil de ser alcançada em formas de liberação imediata contendo doses altas (EMAMI, 2006).

5.4.1 Comprimidos de liberação imediata

Ao analisar os perfis de liberação *in vitro* e *in vivo* obtidos para os métodos I, II e III de dissolução dos comprimidos de liberação imediata de uso adulto (figura 15), pôde se observar que o perfil de dissolução *in vitro* difere muito da quantidade absorvida de BNZ, podendo significar uma baixa correlação IVIV.

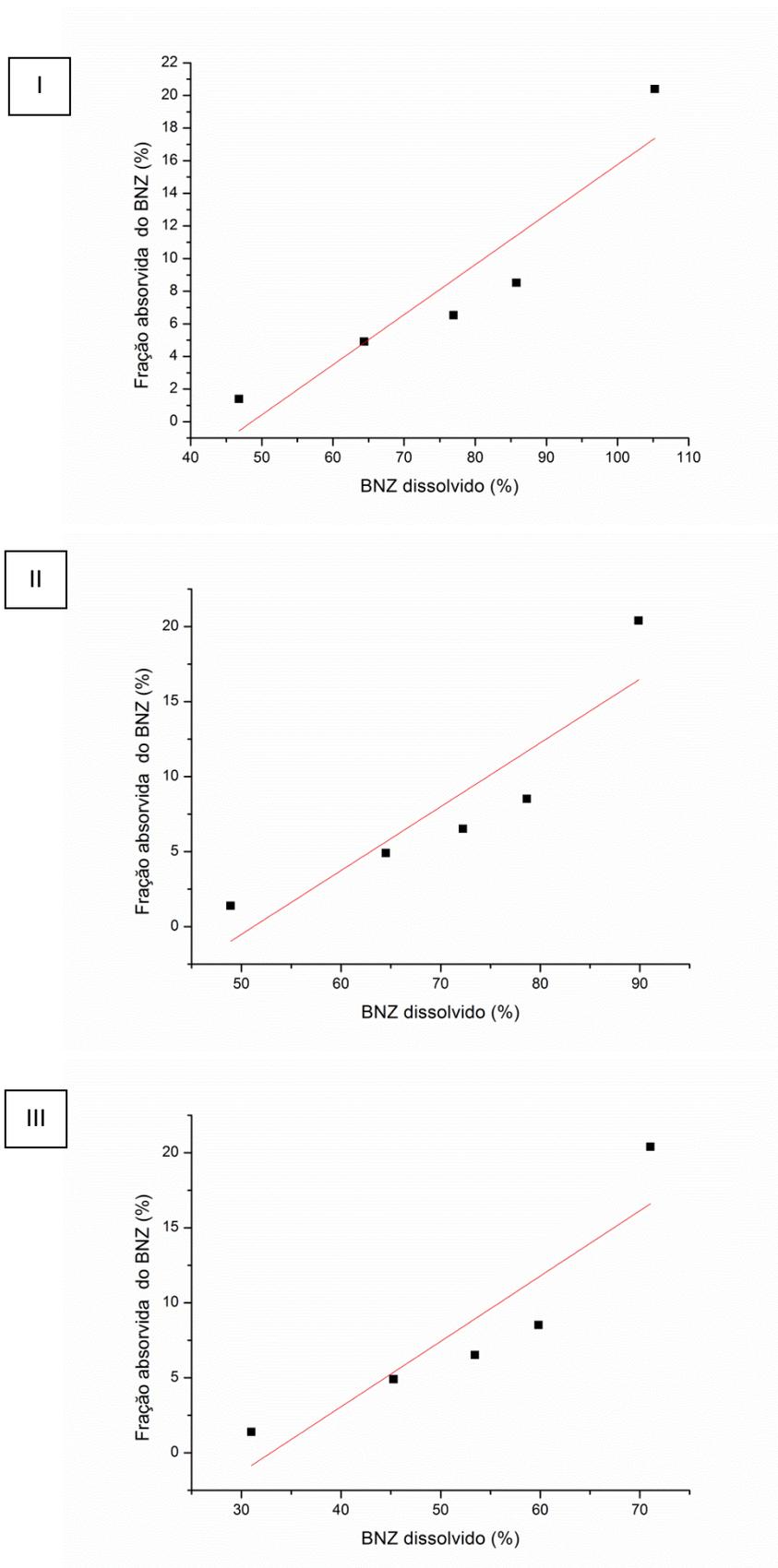
Figura 15 – Perfis de liberação *in vitro* e *in vivo* dos comprimidos de BNZ de uso adulto.



Legenda: Os símbolos representam: ▼ - % de BNZ absorvido; ▲ - % de BNZ dissolvido no método III de dissolução; ● - % de BNZ dissolvido no método II de dissolução; ■ - % de BNZ dissolvido no método I de dissolução. Fonte: Autoria própria.

Na figura 16, estão demonstrados os resultados dos perfis de fração absorvida versus quantidade de dissolvida para a estimativa da correlação de nível A. Os valores R^2 obtidos pela regressão linear variaram de 0,81 a 0,87. Teoricamente, quanto maior esse valor for de 1, maior será a correlação entre os valores experimentais e os valores previstos pela regressão linear (KUMAR et al., 2014). Portanto, os valores de R^2 obtidos confirmam que não houve uma forte correlação IVIV de nível A.

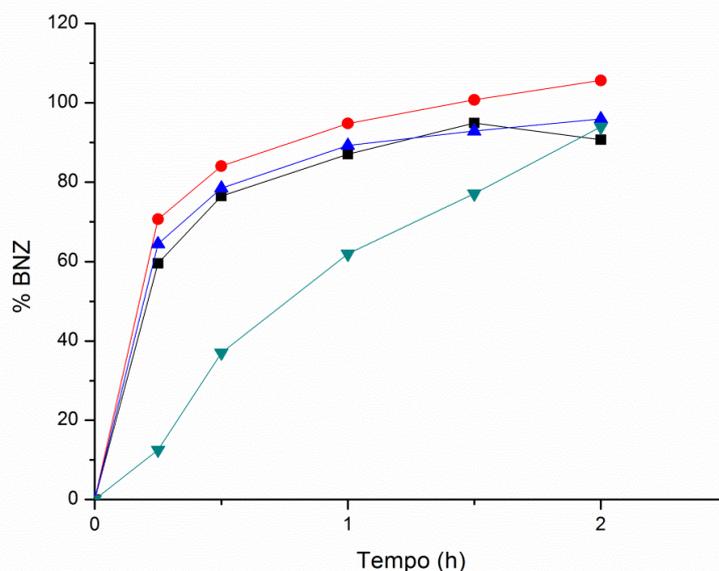
Figura 16 - Correlação entre fração absorvida e a quantidade dissolvida de BNZ nos comprimidos de uso adulto para os métodos I, II e III de dissolução.



Fonte: Autoria própria.

Em relação aos comprimidos pediátricos, a diferença foi menor entre os valores dissolvidos e absorvidos (Figura 17). Inclusive o último ponto de coleta da dissolução tem valor bem próximo ao encontrado para absorção, indicando possivelmente o estabelecimento de uma correlação IVIV.

Figura 17 – Perfis de liberação *in vitro* e *in vivo* dos comprimidos de BNZ de uso pediátrico.

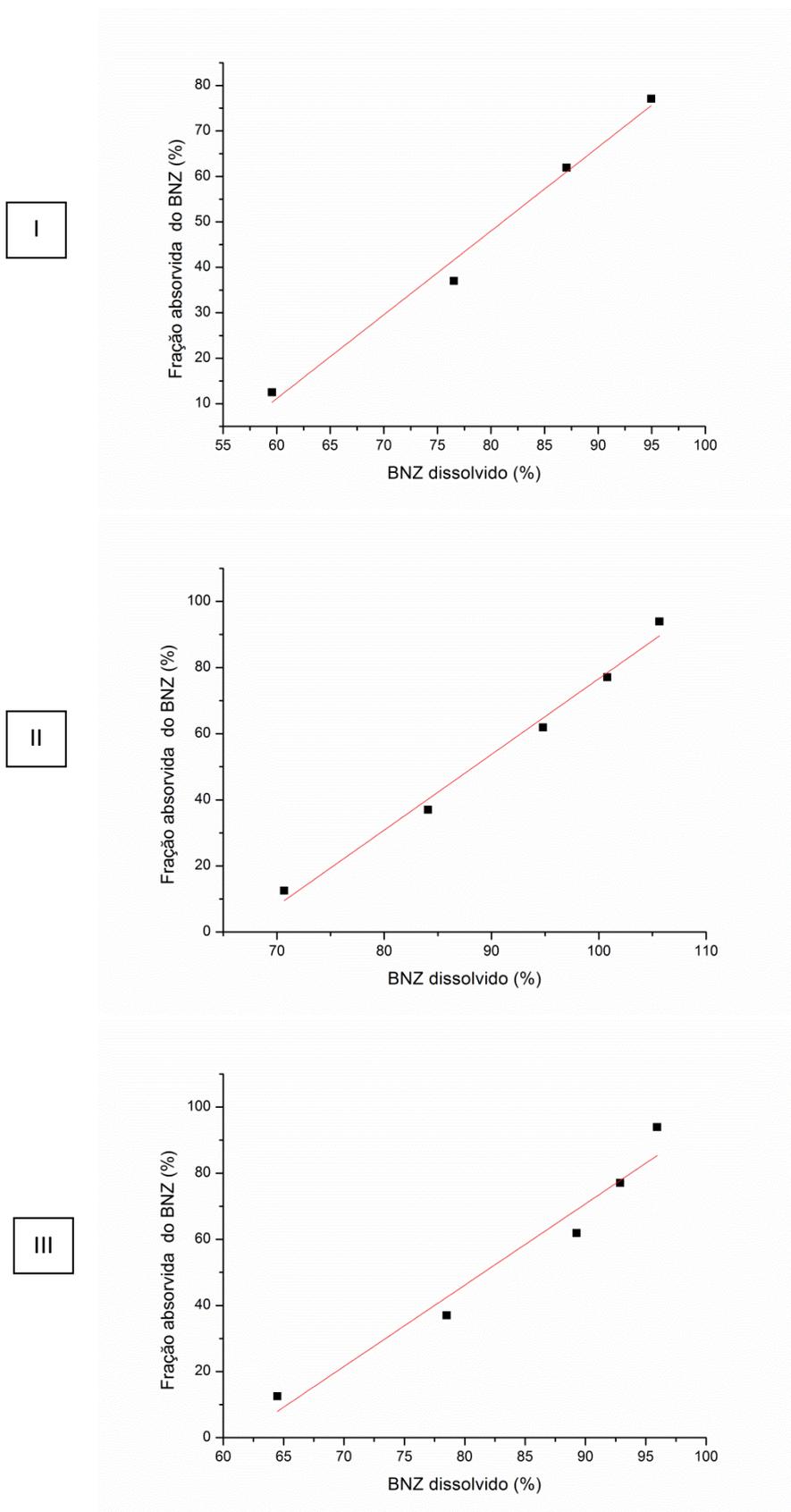


Legenda: Os símbolos representam: ▼ - % de BNZ absorvido; ▲ - % de BNZ dissolvido no método III de dissolução; ● - % de BNZ dissolvido no método II de dissolução; ■ - % de BNZ dissolvido no método I de dissolução. Fonte: Autoria própria.

A correlação IVIV é confirmada ao analisar os gráficos de correlação (figura 18). A correlação mais forte foi obtida para o método II ($R^2 = 0,9884$), seguida dos métodos I ($R^2 = 0,9878$) e III ($R^2 = 0,9442$).

O estabelecimento da correlação para o comprimido de liberação de menor dosagem em detrimento do comprimido de maior dosagem, como foi mencionado, é relatado na literatura (EMAMI, 2006) e os dados aqui presentes seguem esta regra. Com a menor dosagem a velocidade de dissolução é maior e, conseqüentemente a absorção ocorre de forma mais rápida.

Figura 18 – Correlação entre fração absorvida e a quantidade dissolvida de BNZ nos comprimidos pediátricos, respectivamente, para os métodos I, II e III de dissolução.

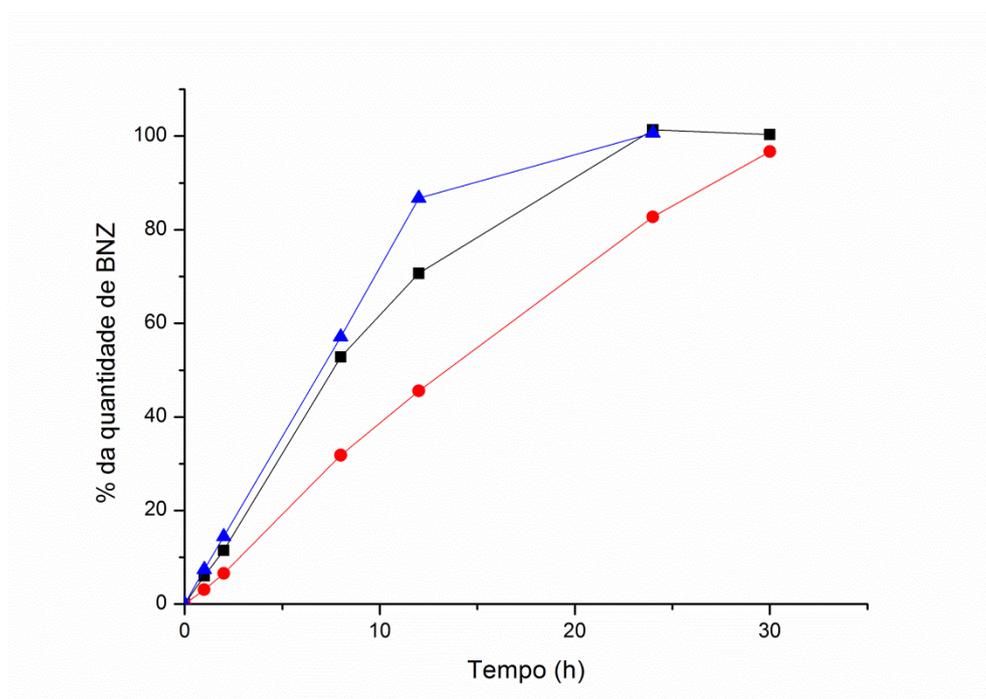


Fonte: Autoria própria.

5.4.2 Comprimidos de liberação prolongada: Lote LBIII

Em relação aos comprimidos de liberação prolongada, o lote LBIII apresentou perfis de liberação *in vitro* semelhante à liberação *in vivo* (figura 19). No entanto, pode ser observado que o método I de dissolução não prediz a biodisponibilidade, pois a quantidade de fármaco absorvido é maior que a quantidade de fármaco dissolvido em um mesmo período de tempo.

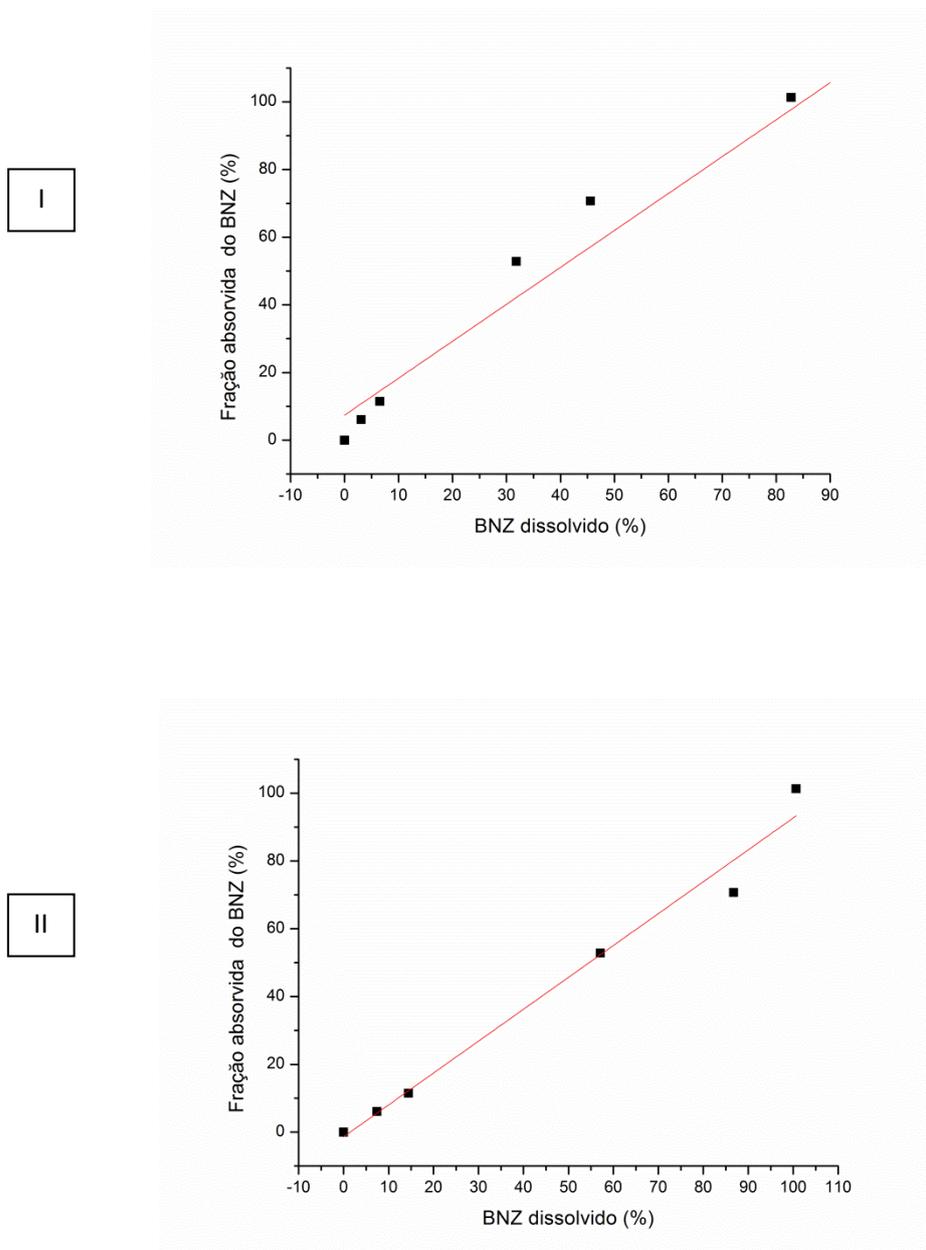
Figura 19 – Perfis de liberação *in vitro* e *in vivo* do comprimido de BNZ de liberação prolongada lote LBIII.



Legenda: Os símbolos representam: ▲ - % de BNZ dissolvido no método II de dissolução; ● - % de BNZ dissolvido no método I de dissolução; ■ - % de BNZ absorvido. Fonte: Autoria própria.

Na figura 20 estão representados os gráficos de correlação para os comprimidos LBIII. A correlação foi considerada satisfatória para as condições analisadas com valores de R^2 acima de 0,9 (KUMAR et al., 2014; SIRISUTH; EDDINGTON, 2002) tendo sido o método II o que teve uma correlação IVIV mais significativa com a obtenção do maior valor de R^2 (0,9765) na regressão linear, enquanto que o método I obteve um R^2 de 0,9421.

Figura 20 - Correlação entre fração absorvida e a quantidade dissolvida de BNZ nos comprimidos do lote LBIII, respectivamente, para os métodos I e II de dissolução.



Fonte: Autoria própria.

Considerações finais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Foram obtidas novas formulações de liberação prolongada do tipo matricial utilizando o HPMC em graus diferentes de viscosidade (K4M e K100M), resultando na liberação por tempos de 24 a 72 h a depender do método de dissolução utilizado.
- O uso de modelos cinéticos de zero ordem, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Peppas-Sahlin demonstrou que os lotes de liberação prolongada possuem mecanismo de liberação baseado principalmente no relaxamento polimérico e erosão, havendo também relativa influencia da difusão fickiana.
- Os métodos de dissolução analisados demonstraram ser discriminativos para as formas farmacêuticas comerciais e novas formulações contendo BNZ.
- Foi possível estabelecer correlação IVIV de nível A para os comprimidos de BNZ de uso adulto e pediátrico para os métodos I, II e III, sendo a correlação mais forte no método II para os comprimidos pediátricos.
- Para os comprimidos de BNZ lote LBIII, o método I não resultou em correlação IVIV, enquanto foi possível obter correlação IVIV nível A para o método II de dissolução. Em relação ao método III, ainda será realizado o ensaio.
- O teste *In vivo* ainda será realizado para os comprimidos de BNZ do lote LBII, pelo grupo de pesquisa da prof. Dr^a Rosângela Peccini da UNESP/Araraquara, sendo possível avaliar se o método II é, de fato, o método de dissolução que mais representa as condições fisiológicas.
- Após a escolha do método de dissolução que mais representa as condições fisiológicas, será possível estabelecer com maior segurança a formulação que possui a liberação ideal.
- Serão realizados outros ensaios para caracterizar o intumescimento e a porosidade dos comprimidos de liberação prolongada desenvolvidos.

- Será realizada a caracterização da uniformidade dos lotes de comprimido de liberação prolongada pela técnica de espectroscopia por imagem na região próxima do infravermelho (análise que está em andamento, sendo realizada em parceria com o laboratório de combustíveis do departamento de Engenharia Química da UFPE).

- É previsto que haja a publicação de três artigos científicos:
 - Artigo sobre o desenvolvimento e caracterização das novas formas farmacêuticas de liberação prolongada;
 - Artigo contendo os estudos farmacocinéticos das formas farmacêuticas de BNZ pelo grupo da UNESP;
 - Publicação dos resultados da correlação IVIV para os níveis A, B e C.

Referências

REFERÊNCIAS

AMIDON, G. L.; LENNERNÄS, 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. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413-20, 1995.

ARONSON, H. Correction factor for dissolution profile calculations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, n. 11, p. 1190, 1993.

BATISTA, V. S. P.; FERNANDES, F. A.; CORDEIRO-ESTRELA, P.; SARQUIS, O.; LIMA, M. M. Ecotope effect in *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) suggests phenotypic plasticity rather than adaptation. **Medical and veterinary entomology**, 27(3): 247–54, 2013.

BRASIL, **Farmacopeia brasileira**. 5ª Ed. Brasília: Anvisa, 2010a.

BRASIL. Resolução RDC n. 31, de 11 de agosto de 2010b. Agência Nacional de Vigilância Sanitária dispõe sobre a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 154, 12 ago. de 2010b. Seção 1, pág. 36-38.

BRASIL. Resolução RDC n. 37, de 03 de agosto de 2011. Agência Nacional de Vigilância Sanitária dispõe sobre o Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 1, 05 ago. 2011. Seção 1, pág.117.

BRASIL. Nota técnica n. 03/2013. A Anvisa dispõe sobre a avaliação da solubilidade de fármacos e o desenvolvimento de métodos de dissolução para estudos de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução comparativo, e dá outras providências. Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ddf957004f6206189687f79a71dcc661/nota+t%C3%A9cnica.pdf?MOD=AJPERES&attachment=true&id=1366839901426>.
Acesso em 12 de fevereiro de 2015.

CAMPOS, M. C. O.; LEON, L. L.; TAYLOR, M. C.; KELLY, J. M. Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: Evidence that distinct mechanisms can act in concert. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 193, n. 1, p. 17–19, 2014.

CASTRO, J.A.; MECCA, M.M.; BARTEL, L.C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Human & Experimental Toxicology**, v. 25, p. 471-479, 2006.

COURA, J. R. C.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, S6-7, 2010.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. What is known and what should be improved : a systemic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p. 286–296, 2012.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. p. 1–6, 2015.

CROFT, S. L.; BARRETT, M. P.; URBINA, J. A. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 11, p. 508-12, 2005.

DAVANÇO, M. G.; CAMPOS, M.; PECCININI, R. G. Rapid and sensitive ultra-performance liquid chromatography method for quantification of antichagasic benznidazole in plasma: application in a preclinical pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, v. 28, n. novembro, 2014.

DIAS, J. C. P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23(Supl I): S13-S22, 2007.

DINIZ, L. D. F.; URBINA, J. A.; ANDRADE, I. M.; MAZZETI, A; L.; MARTINS, T. A. F.; CALDAS, I. S.; TALVANI, A.; RIBEIRO, I.; BAHIA, M. T. Benznidazole and posaconazole in experimental chagas disease: positive interaction in concomitant and sequential treatments. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 8, p. 2367, 2013.

DOKOUMETZIDIS, A.; MACHERAS, P. A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 321, p. 1–11, 2006.

EMAMI, J. In vitro - in vivo correlation: from theory to applications. **Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société canadienne des sciences pharmaceutiques**, v. 9, n. 2, p. 169–89, 2006.

ESCUADERO, J. J.; FERRERO, C.; JIMENEZ-CASTELLANOS, M. R. Compaction properties, drug release kinetics and fronts movement studies of matrices combining mixtures of swellable and inert polymers. III: Effect of polymer substitution type. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 351, p. 61–73, 2008.

FERREIRA, I. L. M.; SILVA, T. P. T. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 5, p. 507-509, 2006.

FERREIRA, E. I. Planejamento de Fármacos na Área de Doença de Chagas : Avanços e Desafios. **Revista Virtual Quimica.**, v. 4, n. 3, p. 225-246, 2012.

FERRERO, C.; JIMÉNEZ-CASTELLANOS, M. R. In vitro release testing of matrices based on starch-methyl methacrylate copolymers: Effect of tablet crushing force, dissolution medium pH and stirring rate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 461, n. 1-2, p. 270–279, 2014.

FONSECA-BERZAL, C.; PALMEIRO-ROLDÁN, R.; ESCARIO, J. A. Experimental Parasitology Novel solid dispersions of benznidazole : Preparation, dissolution profile and biological evaluation as alternative antichagasic drug delivery system. **Experimental Parasitology**, v. 149, p. 84–91, 2015.

FOTAKI, N.; GRAY, V.; KESISOGLOU, F.; Mayock, S.; MIRZA, T.; SALT, A.; SELEN, A. Survey Results for In Vitro-In Vivo Correlations (IVIVC): Critical Variables for Success. **Dissolution Technologies**, n. May, p. 48–50, 2013.

FUGI, M. A.; KAISER, M.; TANNER, M.; SCHNEITER, R.; MASER, P.; GUAN, X. L. Match-making for posaconazole through systems thinking. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 2, p. 46–51, 2015.

GALIA, E.; NICOLAIDES, E.; HORTER, D.; LOBENBERG, R.; REPPAS, C.; DRESSMAN, J. B. Evaluation of various dissolution media for predicting In vivo performance of class I and II drugs. **Pharmaceutical Research**, vol. 15, n. 5, 1998.

GARZONI, L. R.; CALDERA, A.; MEIRELLES, M. N.; CASTRO, S. L.; DOCAMPO, R.; MEINTS, G. A.; OLDFIELD, E.; URBINA, J. A. Selective in vitro effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risedronate on *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, n. 3, p. 273-285, 2004.

HALL, B. S.; WILKINSON, S. R. Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 115–23, 2012.

JANTRATID, E.; JANSSEN, N.; REPPAS, C.; DRESSMAN, J. B. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: An update. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 7, p. 1663–1676, 2008.

JANTRATID, E.; DRESSMAN, J. Biorelevant Dissolution Media Simulating the Proximal Human Gastrointestinal Tract: An Update. **Dissolution Technologies**, v. 16, n. August, p. 21–25, 2009.

KHAN, K.A., RHODES, C.T. Effect of compaction pressure on the compare dissolution profiles and a rationale for wide dissolution efficiency of some direct compression systems. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 47, 594–607, 1972.

KHAN, K. A. The concept of dissolution efficiency. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 27, p. 48–49, 1975.

KLEIN, S. The Mini Paddle Apparatus—a Useful Tool in the Early Developmental Stage? Experiences with Immediate-Release Dosage Forms. **Dissolution Technologies**, n. November, p. 6–11, 2006.

KORSMEYER, R. W.; GUMY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 15, p. 25–35, 1983.

KOSTEWICZ, E. S.; ABRAHAMSSON, B.; BREWSTER, M.; BROUWERS, J.; BUTLER, J.; CARLERT, S.; DICKINSON, P. A.; DRESSMAN, J.; HOLM, R.; KLEIN, S.; MANN, J.; MCALLISTER, M.; MINEKUS, M.; MUENSTER, U.; MULLERTZM, A.; VERWEI, M.; VERTZONI, M.; WEITSCHIES, W.; AUGUSTIJNS, P. In vitro models for the prediction of in vivo performance of oral dosage forms. **European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 57C, p. 342–366, 2014.

KROPF, S. P.; SÁ, M. R. The discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. **História, Ciência e Saúde - Manguinhos**; 16(supl.1): 13-34, 2009.

KUMAR, P.; GANURE, A. L.; SUBUDHI, B. B.; SHUKLA, S.; UPADHYAY, P. Design and comparative in-vitro and in-vivo evaluation of starch-acrylate graft copolymer based salbutamol sulphate sustained release tablets. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2014.

LAKIO, S.; HATARA, J.; TERVAKANGAS, H.; SANDLER, N. Determination of segregation tendency of granules using surface imaging. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 6, p. 2229–2238, 2012.

LAMAS, M.C.; VILLAGGI, L.; NOCITO, I.; BASSANI, G.; LEONARDI, D.; PASCUTTI, F.; SERRA, E.; SALOMÓN, C.J. Development of parenteral formulations and evaluations of the biological activity of the trypanocide drug benznidazole. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, n. 2, p. 239-243, 2006.

LEE, B. Y.; BACON, K. M.; BOTTAZZI, M. E.; HOTEZ, P. J. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **The Lancet infectious diseases**, v. 13, n. 4, p. 342–8, abr. 2013.

LEHTO, P.; KORTEJÄRVI, H.; LIIMATAINEN, A.; OJALA, K.; KANGAS, H.; HIRVONEN, J.; TANNINEN, P.; PELTONEN, L. Use of conventional surfactant media as surrogates for FaSSIF in simulating in vivo dissolution of BCS class II drugs. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik**, v. 78, n. 3, p. 531–8, 2011.

LIMA, A. A. N.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; SILVA, J. L.; CORRÊA-JÚNIOR, R. A. C.; LYRA, M. A. M.; ROLIM-NETO, P. J. Development of dissolution method for benznidazole tablets. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2196–2199, 2009.

LIMA, A. A. N.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; SILVA, J. L.; CORRÊA-JÚNIOR, R. A. C.; LYRA, M. A. M.; SANTOS, F. L. A.; OLIVEIRA, B. G.; HERNANDES, M. Z.; ROLIM, L. A.; ROLIM-NETO, P. J. The use of solid dispersion systems in hydrophilic carriers to increase benznidazole solubility. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 6, p. 2443–2451, 2011.

LYRA, M. A. M. **Obtenção de complexos de inclusão benzidazol ciclodextrina em solução para o combate da doença de chagas**. 2010. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

MADERUELO, C.; ZARZUELO, A.; LANA O, J. M. Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices. **Journal of Controlled Release**, v. 154, n. 1, p. 2–19, 2011.

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

MANARIN, R.; LAMAS, M. C.; BOTTASSO, E.; SERRA, E.; REVELLI, S.; SALOMÓN, C. J. Efficacy of novel benznidazole solutions during the experimental

infection with *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology international**, v. 62, n. 1, p. 79–81, 2013.

MARCOLONGO, R. Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica. 2003. 117f. Dissertação (Mestrado em Produção e Controle Farmacêuticos), Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2003.

MARQUES, M. R. C.; LOEBENBERG, R.; ALMUKAINZI, M. Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing. **Dissolution Technologies**, v. 18, p. 15–28, 2011.

MAXIMIANO, F. P.; COSTA, G. H. Y.; SOUZA, J.; CUNHA-FILHO, M. S. S. Caracterização físico-química do fármaco antichagásico benznidazol. *Química Nova*, v. 33, n. 8, 1714-1719, 2010.

MEDEIROS, F. P. M. **Potenciais formulações com o benznidazol para o tratamento de crianças com a doença de chagas**. 2010. 173f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

MOORE, J. W.; FLANNER, H. H. Mathematical Comparison of Dissolution Profiles. **Pharmaceutical Technology**, v. 20, n. 6, p. 64-74, 1996.

MUDIE, D. M. ; SHI, Y.; PINGA, H.; GAO, P.; AMIDON, G. L.; AMIDON, G. E. Mechanistic analysis of solute transport in an in vitro physiological two-phase dissolution apparatus. **Biopharmaceutics & drug disposition**, v. 402, n. July, p. 378–402, 2012.

PANI, N. R.; NATH, L. K. Development of controlled release tablet by optimizing HPMC: Consideration of theoretical release and RSM. **Carbohydrate Polymers**, v. 104, p. 238–245, 2014.

PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J. J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 57, p. 169–172, 1989.

PEREZ, C. J.; LYMBERY, A. J.; THOMPSON, R. C. A. Chagas disease: The challenge of polyparasitism? **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 4, p. 176–182, 2014.

RECHER, M.; BARBOZA, A. P.; LI, Z.; GALIZZI, M.; FERRER-CASAL, M.; SZAJNMAN, S. H.; DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. J.; RODRIGUEZ, J. B. Design, synthesis and biological evaluation of sulfur-containing 1,1-bisphosphonic acids as antiparasitic agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 431–440, 2013.

SAGGIA, M. G.; SANTOS, E.; DIETZE, R. Custo-efetividade de benzonidazol para a doença de chagas no Brasil. In: **VIII Encontro ABRES**, 2007, Recife. Anais eletrônicos, São Paulo, 2007. Disponível em: <<http://www.abresbrasil.org.br/pdf/13.pdf>>. Acesso em: 03 Fev. 2011.

SALOMÓN, C. J. First century of Chagas' disease: an overview on novel approaches to nifurtimox and benzonidazole delivery systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 3, p. 888-94, 2012.

SANTOS, F. L.; LYRA, M. A. M.; ALVES, L. D. S.; SILVA, K. E. R. S.; ROLIM, L. A.; GOMES, T. C. B. L.; FERRAZ, L. R. M.; LIMA, A. A. N.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; ROLIM-NETO, P. J. Pesquisa, desenvolvimento e inovação para o controle das doenças negligenciadas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 1, p. 37-47, 2012.

SANTOS, F. L. A. **Desenvolvimento de comprimido de liberação prolongada de benznidazol**. 2011. 122p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

SESTI-COSTA, R.; CARNEIRO, Z. A.; SILVA, M. C.; SANTOS, M.; SILVA, G. K.; MILANEZI, C.; SILVA, R. S.; SILVA, J. S. Ruthenium Complex with Benznidazole and Nitric Oxide as a New Candidate for the Treatment of Chagas Disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p. 2–8, 2014.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 139–157, 2001.

SILVA, A. L. M.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; SILVA, R. M. F.; LIMA, L. G.; ROLIM NETO, P. J. Desenvolvimento de método analítico por CLAE em comprimidos de benznidazol para doença de Chagas. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1163–1166, 2007.

SILVA, J. J. N.; GUEDES, P. M. M.; ZOTTIS, A.; BALLIANO, T. L.; SILVA, F. O. N.; LOPES, L. G. F.; ELLENA, J.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D.; FRANCO, D. W.; SILVA, J. S. Novel ruthenium complexes as potential drugs for Chagas's disease:

enzyme inhibition and in vitro/in vivo trypanocidal activity. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 2, p. 260–269, 2010.

SINGH, B.; KAUR, T.; SINGH, S. Correction of raw dissolution data for loss of drug and volume during sampling. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 59, n. 4, p.196-199, 1997.

SIRISUTH, N.; EDDINGTON, N. D. The influence of first pass metabolism on the development and validation of an IVIVC for metoprolol extended release tablets. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 53, p. 301–309, 2002.

SOARES-SOBRINHO, J. L.; SILVA, A. L. M; GRANGEIRO-JÚNIOR, S.; MEDEIROS, F. P. M.; ROLIM-NETO, P. J. Desenvolvimento e validação do método analítico para o doseamento de benznidazol. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 87, n. 3, p. 78–80, 2006.

SOARES SOBRINHO, J. L. **Sistemas de vetorização de Benznidazol para o tratamento da doença de Chagas**. 2009. 164f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

SOARES-SOBRINHO, J. L.; LYRA, M. A. M.; ALVES, L. D. S.; ROLIM-NETO, P. J. Caracterização Físico-Química do tripanomicida Benznidazol para o desenvolvimento de medicamentos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 29, p. 803–807, 2010.

SOARES-SOBRINHO, J. L.; SANTOS, F. L. A., LYRA, M. A. M.; ALVES, L. D. S.; ROLIM, L. A.; LIMA, A. A. N.; NUNES, L. C. C.; SOARES, M. F. R.; ROLIM-NETO, P. J.; TORRES-LABANDEIRA, J. J. Benznidazole drug delivery by binary and multicomponent inclusion complexes using cyclodextrins and polymers. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 2, p. 323–330, 2012.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. **Guidance for industry: dissolution testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms**. Rockville. 1997. 24p.

VERTZONI, M.; DRESSMAN, J.; BUTLER, J.; HEMPENSTALL, J.; REPPAS, C. Simulation of fasting gastric conditions and its importance for the in vivo dissolution of lipophilic compounds. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 60, p. 413–417, 2005.

VILLELA, M. M.; SOUZA, J. M. B.; MELO, V. P.; DIAS, J. C. P. Avaliação do Programa de Controle da Doença de Chagas em relação à presença de *Panstrongylus megistus* na região centro-oeste do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 4, p. 907-17, 2009.

ZHANG, Y.; Huo, M.; Zhou, J.; Zou, A.; Li, W.; Yao, C.; Xie, S. DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. **The AAPS journal**, v. 12, n. 3, p. 263–271, 2010.

WAGNER, J. G.; NELSON, E. Per cent. absorbed time plots derived from blood level and/or urinary excretion data. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, p. 610-611, 1963.

WHO (World Health Organization), Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases - Second WHO report on neglected tropical diseases, 2013. Disponível em: <http://www.who.int/iris/bitstream/10665/77950/1/9789241564540_eng.pdf>, acesso em: 04 de setembro de 2013.

ANEXO A – Certificado de análises do padrão de trabalho do BNZ (lote 301026).



CERTIFICADO DE ANÁLISE	Controle de Qualidade	Código: 302400001		
		Rev.: 00	Pág 1 / 1	
	BENZNIDAZOL	Lote nº: 301026	Referência: Hoffmann La Roche	
		Data de Fabricação: JANEIRO/2013	Data de Validade: JANEIRO/2015	

TESTES	RESULTADOS	ESPECIFICAÇÕES
. Aparência	. De acordo	. Pó fino
. Cor	. Levemente amarelado	. Branco, amarelo esbranquiçado ou levemente amarelo.
. Identificação Infravermelho	. De acordo	. De acordo com o padrão.
. Opalescência da solução a 1% (p/v) em acetona.	. Límpido – 1,0 NTU	. Límpida (Máximo 3,0 NTU)
. Cor da solução a 1% (p/v) em acetona	. <BY6	. Máximo (EP): GY ₆ , BY ₆ ou B ₆ .
. pH da solução 1% (p/v) suspensão em água	. 5,1	. 5,0 – 7,0
. Absorbância no UV em metanol λ máximo A (1%, 1 cm) λ mínimo	. 315 nm . 286,2 . 265 nm	. 313 – 317 nm . 286 -304 . 262 -266 nm
. Ponto de fusão	. 192 °C	. 189 °C – 192 °C
. Perda por secagem	. 0,1%	. Máximo 0,5%
. Cinzas sulfatadas	. 0,0%	. Máximo 0,1%
. Metais pesados	. <20 ppm	. Máximo 20 ppm
. Substâncias relacionadas 2-nitroimidazol N-benzil-2-cloroacetamida Impureza desconhecida Total de imp. desconhecida Soma total de impurezas	. <0,1% . <0,1% . <2 . <0,1% . <0,1%	. Máximo 0,1% . Máximo 0,1% . Máximo 2 impurezas . Máximo 0,1% . Máximo 0,3%
. Teor (base seca)	. 100,8%	. 98,5 – 101,5%
. Granulometria Através da peneira nº120 USP Partículas estranhas	. 93% . Ausente	. Mínimo 85% . Ausente

Embalagem: Manter o recipiente hermeticamente fechado e evitar temperatura superior a 30 °C.

Aprovado pelo Gerente do Controle de Qualidade conforme especificação acima e reconciliação de todos os documentos do lote na data 18/01/2013 sob nº de análise 01/13-0125
Rua Dezesete, nº 200 – Distrito Industrial de Duque de Caxias – Xerém – D. Caxias-RJ
Cep: 25250-612 Tel.: + 55 21 3651-7300

ANEXO B – Modo de preparo dos meios biorrelevantes.

SIF Powder Original How To Use



Document Name: SIF Powder Original How To Use Document Version: 1.4

This User Guide explains how to make 1 Litre of FaSSiF, FeSSiF or FaSSGF. For any other volume use the Calculator on our website <http://biorelevant.com/fassif-fessif-fassgf/how-to-make>.

How to make 1 litre of FaSSiF

Step 1

Preparation of phosphate buffer for FaSSiF (1 Litre):

Dissolve:

0.42 g NaOH (pellets)

3.95 g of NaH₂PO₄*H₂O (monohydrate)

6.19 g of NaCl

in 0.9 L of purified water

Adjust the pH to 6.5 with either 1 N NaOH or 1 N HCl and make up to volume (1 L) with purified water

Step 2

To make 1 litre of FaSSiF:

- Add 2.24 g of SIF Powder to about 500 mL of buffer at room temperature
- Stir until SIF Powder has dissolved
- Make up to volume (1 L) with the buffer

Let FaSSiF stand for 2 hours. FaSSiF will become slightly opalescent and is ready to use.

How to make 1 litre of FaSSGF

Step 1

Preparation of NaCl/HCl solution for FaSSGF (1 Litre):

Dissolve:

2.00 g of NaCl

in 0.9 L of purified water

Adjust the pH to 1.6 with HCl and make up to volume (1 L) with purified water.

Step 2

Add 0.06 g of SIF Powder to approximately 500 mL of the NaCl/HCl solution at room temperature
Make up to volume (1 L) with the NaCl/HCl solution

FaSSGF will have a clear appearance and is ready to use.

How to make 1 litre of FeSSiF

Step 1

Preparation of acetate buffer for FeSSiF (1 Litre):

Dissolve:

4.04 g of NaOH (pellets)

8.65 g of Glacial Acetic Acid

11.87 g of NaCl

in 0.9 L of purified water

Adjust the pH to 5.0 with either 1 N NaOH or 1 N HCl and make up to volume (1 L) with purified water

Step 2

To make 1 litre of FeSSiF:

- Add 11.2 g of SIF Powder to about 500 mL of buffer at room temperature
- Stir until SIF Powder has dissolved
- Make up to volume (1 L) with the buffer

FeSSiF will have a clear appearance and is ready to use.

Storage and Handling

- Refrigerate SIF Powder Original bottle at 2-8°C
- Before opening, equilibrate SIF Powder Original bottle to room temperature
- Use the FaSSiF, FeSSiF or FaSSGF you have made within 48 hours at room temperature and 24 hours at 37°C

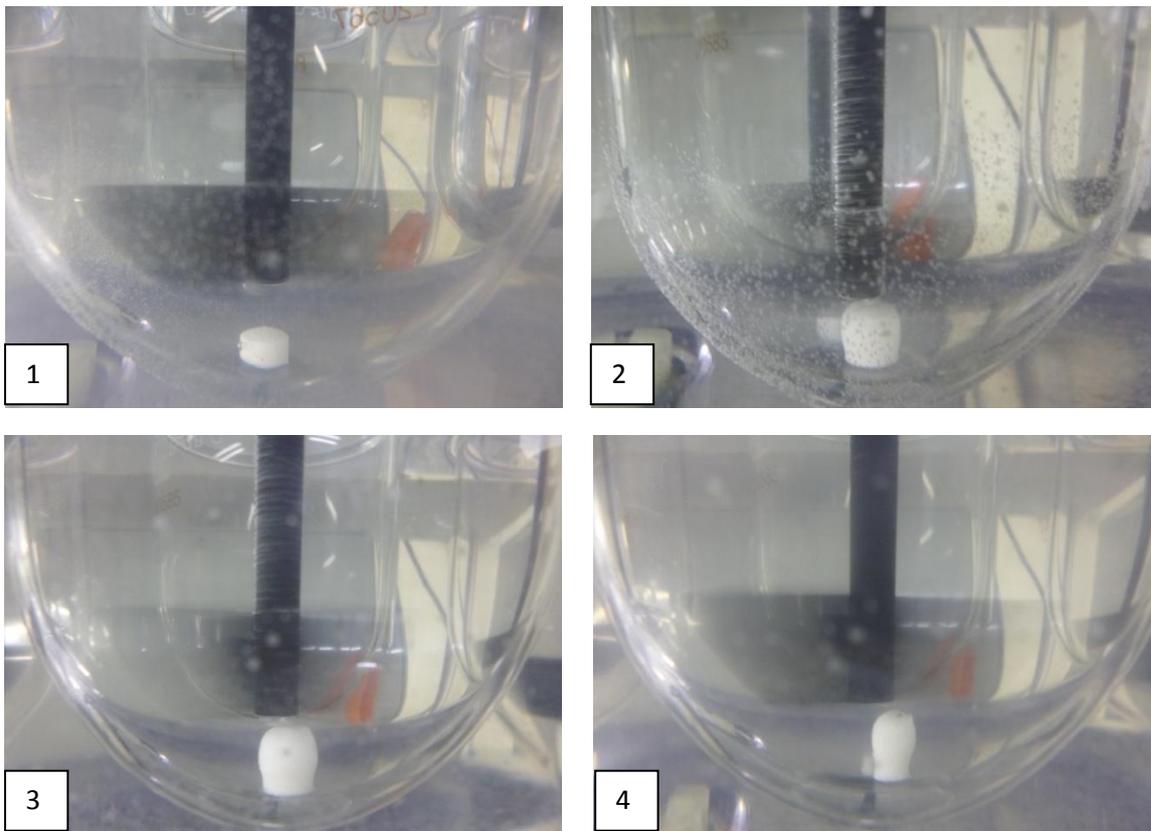
Drug Analysis

Use HPLC to measure drug content

Any questions? Contact us: info@biorelevant.com

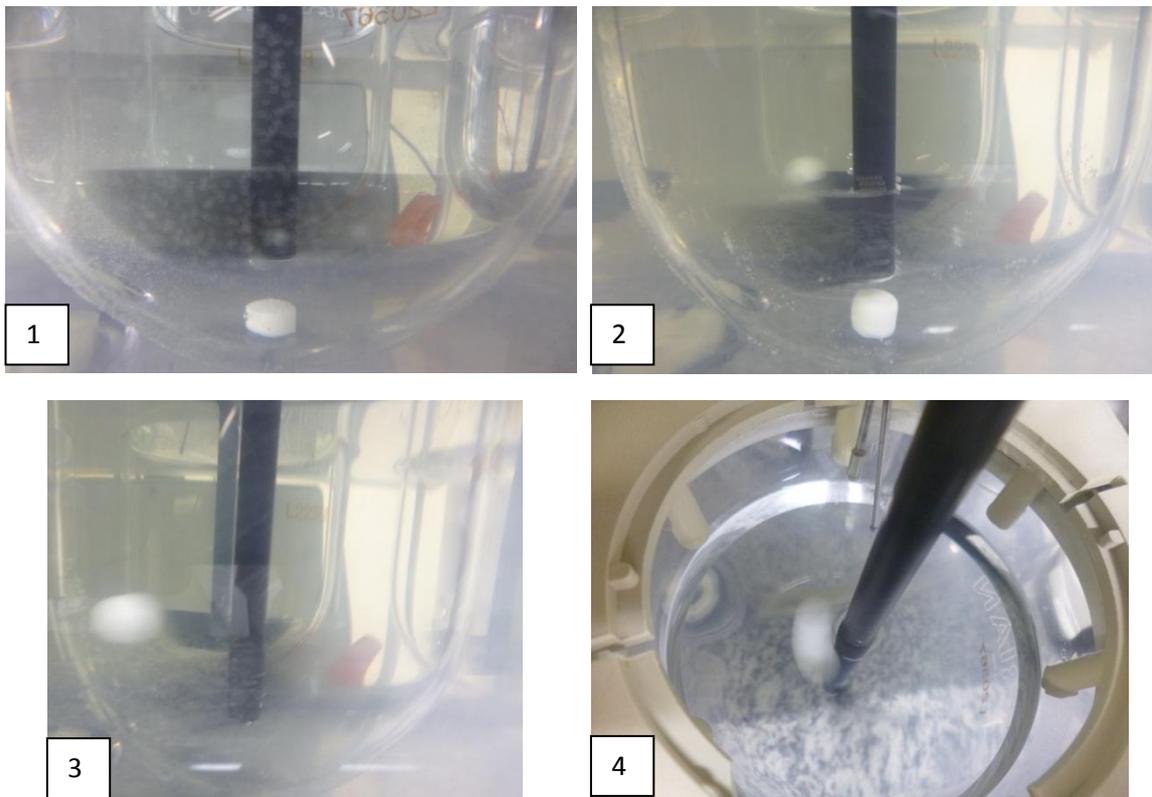
Instant Powders for the preparation of biorelevant media are covered by PCT/EP2006/010809.
biorelevant.com, Unit 20, Capital Business Centre, 22 Carlton Rd., CR2 0BS, United Kingdom
Tel: +44 (0)20 7609 3499 E-Mail: info@biorelevant.com Webpage: <http://www.biorelevant.com>

APÊNDICE A – Imagens do teste de dissolução utilizando o método I para comprimidos de BNZ do lote LBII.



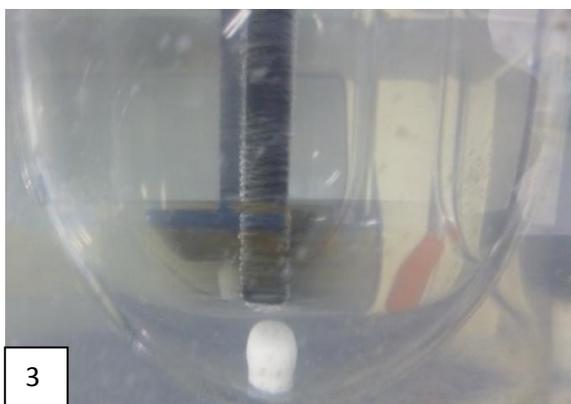
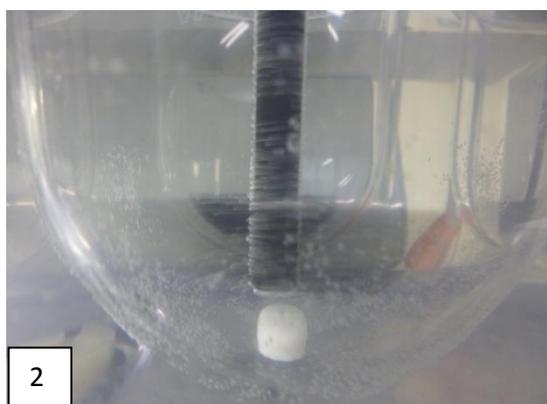
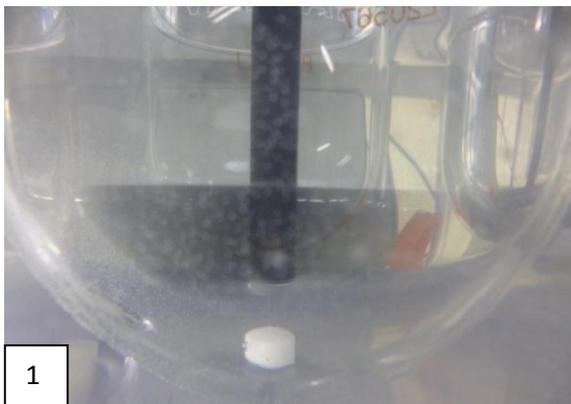
Legenda: Comprimido LBII no primeiro minuto do teste de dissolução; 2 – Comprimido LBII após 12 h do teste de dissolução; 3 - Comprimido LBII após 24 h do teste de dissolução; 4 - Comprimido LBII após 48 h do teste de dissolução.

APÊNDICE B – Imagens do teste de dissolução utilizando o método II para comprimidos de BNZ do lote LBII.



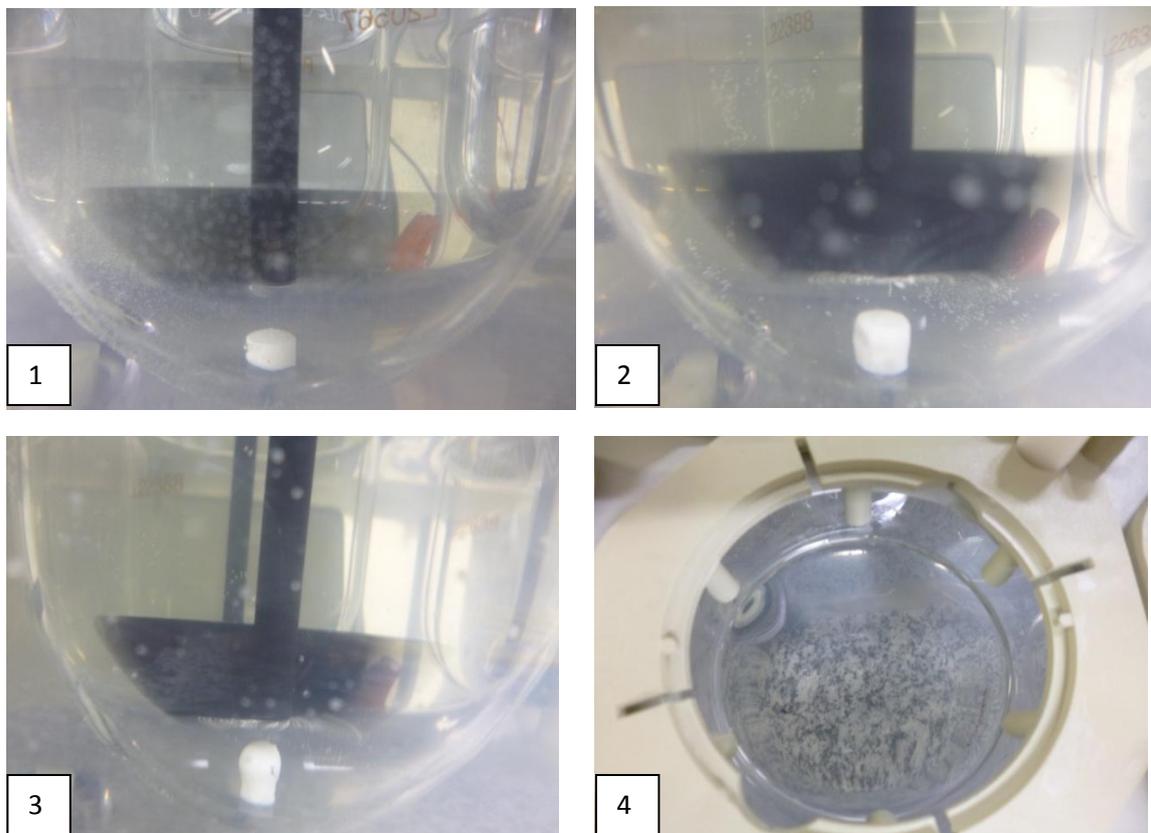
Legenda: 1 - Comprimido no primeiro minuto do teste de dissolução; 2 – Comprimido LBII após 1h do teste de dissolução; 3 - Comprimido LBII após 4h do teste de dissolução; 4 - Comprimido LBII após 27h do teste de dissolução.

APÊNDICE C – Imagens do teste de dissolução utilizando o método I para comprimidos de BNZ do lote LBIII.



Legenda: 1 - Comprimido no primeiro minuto do teste de dissolução; 2 – Comprimido LBIII após 3h do teste de dissolução; 3 - Comprimido LBIII após 9h do teste de dissolução; 4 - Comprimido LBIII após 25h do teste de dissolução.

APÊNDICE D – Imagens do teste de dissolução utilizando o método II para comprimidos de BNZ do lote LBIII.



Legenda: 1 - Comprimido no primeiro minuto do teste de dissolução; 2 – Comprimido LBIII após 2h do teste de dissolução; 3 - Comprimido LBIII após 9h do teste de dissolução; 4 - Comprimido LBIII após 25h do teste de dissolução.