



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

JOSÉ VALDILÂNIO VIRGULINO PROCÓPIO

**ESTUDOS DE CORRELAÇÃO *IN VITRO*-*IN VIVO* EM FORMULAÇÕES
CONTENDO FÁRMACOS DE DIFERENTES CLASSES BIOFARMACÊUTICAS**

**Recife-PE
2015**

JOSÉ VALDILÂNIO VIRGULINO PROCÓPIO

**ESTUDOS DE CORRELAÇÃO *IN VITRO*-*IN VIVO* EM FORMULAÇÕES
CONTENDO FÁRMACOS DE DIFERENTES CLASSES BIOFARMACÊUTICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Produção e Controle da Qualidade de Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Rui Oliveira Macêdo

Coorientador: Prof. Dr. Fábio Santos de Souza

**Recife-PE
2015**

Catalogação na fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

P963e Procópio, José Valdilânio Virgulino.
Estudos de correlação in vitro-in vivo em formulações contendo fármacos de diferentes classes biofarmacêuticas / José Valdilânio Virgulino Procópio. – 2015.
148 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Rui Oliveira Macêdo.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2015.

Inclui referências e apêndices.

1. Celulose. 2. Dissolução. 3. Biofarmacêutica. 4. Biodisponibilidade.
5. Tecnologia farmacêutica. I. Macêdo, Rui Oliveira (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2016-280)

JOSÉ VALDILÂNIO VIRGULINO PROCÓPIO

**ESTUDOS DE CORRELAÇÃO *IN VITRO*-*IN VIVO* EM FORMULAÇÕES
CONTENDO FÁRMACOS DE DIFERENTES CLASSES BIOFARMACÊUTICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 27 / 02 / 2015.

BANCA EXAMINADORA

Profº. Dr. Rui Oliveira Macêdo (Orientador)
Universidade Federal da Paraíba

Profº. Dr. Davi Pereira de Santana (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Dra. Ana Cristina Lima Leite (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Dr. Irinaldo Diniz Basílio Júnior (Examinador Externo)
Universidade Federal de Alagoas

Profº. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento (Examinador Externo)
Universidade Federal de Alagoas

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Reitor

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Vice-Reitor

Prof. Silvio Romero de Barros Marques

Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação

Prof. Francisco de Sousa Ramos

Diretor do Centro de Ciências da Saúde

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

Vice-Diretor do Centro de Ciências da Saúde

Profa. Vânia Pinheiro Ramos

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Prof. Almir Gonçalves Wanderley

Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Profa. Ana Cristina Lima Leite

Aos meus filhos Igor e Júlia.

A minha esposa Alenilda.

Aos meus pais Héleno Virgulino Primo e Maria Procópio de Souza Primo.

Dedico com muito amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e ao qual muitas vezes recorri, solicitando a paz e a tranqüilidade necessárias para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco pela oportunidade.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelo financiamento através da bolsa de doutorado.

Ao meu orientador Dr. Rui Oliveira Macêdo e coorientador Dr. Fábio Santos de Souza, pela orientação, amizade e oportunidade de crescimento profissional.

Aos amigos dos Laboratórios Unificados de Desenvolvimento e Ensaios de Medicamentos (LUDEM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), sem os quais não teria como realizar este trabalho, pois muitos dias e noites deixaram seus afazeres para ao meu lado enfrentar o desafio de execução deste trabalho.

Ao Instituto de Desenvolvimento e Estudos Farmacêuticos (IDEF) pela parceria e apoio no desenvolvimento do projeto.

RESUMO

Há vários relatos científicos de modificações *in vitro*, nas características de Insumos farmacêuticos ativos (IFAs) em formulações contendo celulose microcristalina (CMC), porém há escassez de estudos para avaliar sua influência *in vivo*. Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da celulose microcristalina de diferentes origens e tamanhos de partícula na estabilidade, cinética de liberação *in vitro* e correlacionar com estudos *in vivo* utilizando IFAs de diferentes classes biofarmacêuticas. Foram utilizados lotes de CMC de dois diferentes fabricantes (A e B), com diferentes tamanhos CMC101 e CMC102, três lotes dos IFAs simvastatina (Sinv) e fluconazol (Fluc) e um lote do ibuprofeno (Ibup). Foram obtidos dezesseis lotes de comprimidos dos IFAs com as celuloses. As técnicas analíticas: difração de raio X, análise térmica, microscopia eletrônica de varredura, cromatografia líquida de alta eficiência e dissolução permitiram a caracterização dos IFAs, CMCs e comprimidos. Estudos de biodisponibilidade foram realizados utilizando coelhos *Nova Zelândia* como modelo, após avaliação e aprovação ética, Certificado n° 0308/11, e validação dos métodos bioanalíticos. As CMCs apresentaram diferenças nas características de degradação térmica, nas análises microscópicas e de cristalinidade em função da origem e/ou do tamanho de partícula. A Simvastatina mostrou diferenças entre os lotes no comportamento de fusão, decomposição térmica e dissolução intrínseca. Os comprimidos contendo simvastatina apresentaram liberação conforme o modelo matemático de El-Yazigi e houve diferenças nas características de estabilidade e dissolução em função do tipo de celulose utilizada na sua produção. Foi estabelecida correlação direta entre a quantidade liberada na dissolução e os dados de estabilidade térmica para todos os comprimidos contendo a Sinv com todas as CMCs, exceto para a CMC101B, que apresentou cristalinidade diferente das demais. O Fluconazol não apresentou diferenças significativas entre os lotes na dissolução, fusão e decomposição térmica. Os comprimidos contendo Fluc e CMC101 dos diferentes fabricantes apresentaram liberação conforme o modelo matemático de El-Yazigi, os perfis de dissolução em água foram semelhantes, no entanto diferiram *in vivo*, de modo que não foi estabelecida correlação *in vitro/in vivo*, sendo o modelo *in vivo* mais eficiente no sentido de detectar a diferença existente entre as formulações. O ibuprofeno apresentou perda de massa em uma única etapa na termogravimetria e através do DSC-fotovisual e pirólise acoplada a espectrometria de massa foi possível confirmar que ela ocorreu por vaporização. Os comprimidos contendo Ibuprofeno e CMC101 dos diferentes fabricantes não apresentaram diferenças entre os perfis de dissolução utilizando tampão fosfato pH 7,2. Utilizando água, como meio de dissolução, a liberação ocorreu conforme o modelo matemático de Higuchi havendo diferença na liberação em função da origem da CMC101 utilizada. Foi estabelecida correlação *in vitro/in vivo* utilizando água como meio de dissolução. Houve diferença na liberação e absorção do ibuprofeno, a partir dos comprimidos, em função da celulose microcristalina utilizada para sua produção. Esses resultados mostram a importância e necessidade de estudos mais amplos que os farmacopéicos, incluindo estudos de correlação *in vitro-in vivo*, na avaliação da influência dos excipientes, em função da origem, na cinética de liberação dos comprimidos e biodisponibilidade durante a qualificação de fornecedores.

Palavras-chave: Celulose. Dissolução. Biofarmacêutica. Biodisponibilidade. Tecnologia farmacêutica.

ABSTRACT

There are several scientific reports of *in vitro* changes in the characteristics of various active pharmaceutical ingredients (APIs) in Formulações containing microcrystalline cellulose (MCC), but there are few studies to evaluate its influence *in vivo*. This study aimed to evaluate the influence of microcrystalline cellulose from different Fontes and particle size to stability, *in vitro* release kinetics and correlate with *in vivo* studies using APIs of different biopharmaceutical classes. Were used two different lots of MCC by manufacturers (A and B) with different sizes CMC101 and CMC102, three lots of APIs simvastatin (Sinv) and fluconazole (Fluc) and one lot of ibuprofen (Ibup). Sixteen batches of tablets were obtained by direct compression of APIs with cellulose. The analytical techniques: X-ray diffraction, thermal analysis, scanning electron microscopy, high performance liquid chromatography and dissolution efficiency allowed the characterization of APIs, CMCs and tablets. Bioavailability studies were conducted using rabbits *New Zealand* as a model, after analysis and approval Certificate No. 0308/11, and validation of bioanalytical methods. The MCCs showed different characteristics of thermal degradation, the microscopic analysis and crystallinity according to the origin and / or size. The Simvastatin showed differences between batches behavior during melting, thermal decomposition and intrinsic dissolution. Tablets containing simvastatin showed release as a mathematical model El-Yazigi were differences in the stability and dissolution characteristics depending on the type of MCC used in its production, was established a direct correlation between the amount released in the dissolution and stability data Thermal for all Sinv tablets containing CMC with all except for the CMC-101B, which has different crystallinity characteristics. The Fluconazole no showed significant differences between the lots in the dissolution, melting and thermal decomposition. Tablets containing Fluc and CMC101 from different manufacturers presented equal release (El-Yazigi) and dissolution profiles in water however differed *in vivo*, correlation of data *in vivo* / *in vitro* is not established. The *in vivo* model was more efficient in order to detect the difference between the formulations containing fluconazole. Ibuprofen showed weight loss in one step by the thermogravimetry and DSC-fotovisual and pyrolysis-mass spectrometry it was that it is vaporization. Tablets containing Ibup and CMC101 from different manufacturers showed no differences between the dissolution profiles using pH 7.2 phosphate buffer. Using water as the dissolution medium, the release occurred as the mathematical model of Higuchi and showed difference in the release as to the origin of CMC101, correlation of data *in vitro* / *in vivo* is established and showed differences in absorption. These results show the need for studies beyond pharmacopoeial methods, including correlation studies *in vitro-in vivo*, at the evaluation of the excipients, depending on the origin, the release kinetics of tablets and bioavailability during qualifying suppliers.

Keywords: Cellulose. Dissolution. Biopharmaceutics. Biological availability. Technology pharmaceutical.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma geral para o desenvolvimento de um novo medicamento.....	22
Figura 2 - Fluxograma geral para a produção das formas farmacêuticas sólidas comprimido e cápsula	25
Figura 3 - Classificação das técnicas termoanalíticas conforme as propriedades estudadas	28
Figura 4 - Curva DSC típica da simvastatina.....	28
Figura 5 - Curvas termogravimétricas típicas da decomposição da simvastatina: curva termogravimétrica dinâmica em A e isotérmica em B.....	29
Figura 6 - Difratogramas da simvastatina (A) e celulose microcristalina CMC102 (B).....	31
Figura 7 - Estrutura química da simvastatina	42
Figura 8 - Estrutura química do fluconazol	44
Figura 9 - Estrutura química do ibuprofeno	45
Figura 10 - Micrografias MEV (A, B e C), difratogramas (D), curvas calorimétricas (E) e curvas de dissolução intrínseca (F) dos diferentes lotes de simvastatina.....	55
Figura 11 - DSC-Fotovisual das amostras Sinv-A, Sinv-B e Sinv-C na razão de aquecimento de 5 °C/min.....	56
Figura 12 - Cromatogramas das amostras de simvastatina no doseamento: Sinv-A, Sinv-B e Sinv-C.....	57
Figura 13 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura de quatro diferentes lotes de celulose microcristalina: CMC101 (CMC101A e CMC101B) e CMC102 (CMC102A e CMC102B).....	58
Figura 14 - Curvas termogravimétricas (A e B) e difratogramas (C e D) de quatro diferentes lotes de celulose microcristalina: CMC101 (CMC101A e CMC101B) e CMC102 (CMC102A e CMC102B).....	60
Figura 15 – Curvas teóricas para o referência, calculadas conforme o modelo de El-Yazigi, e pontos experimentais do lote referência e lotes contendo celulose microcristalina CMC101 (CMC101A e CMC101B) e CMC102 (CMC102A e CMC102B)	64
Figura 16 - Curvas médias do ln do percentual remanescente, em função do tempo para todos os lotes (n=12 para cada lote)	65
Figura 17 - Curvas calorimétricas dos diferentes lotes de fluconazol	77
Figura 18 - Perfil de dissolução intrínseca (A) e valores médios com intervalo de confiança de 95% para a liberação no tempo de 60 minutos (B) e velocidade de liberação intrínseca (C) de um lote de fluconazol em três diferentes meios de dissolução. Perfil de dissolução intrínseca (D) e valores médios com intervalo de confiança de 95% para a liberação no tempo de 60 minutos (E) e velocidade de liberação intrínseca (F) de três diferentes lotes de fluconazol em meio de dissolução pH 4,5	79

Figura 19 - Curvas médias de liberação com desvio padrão (A), curvas médias de liberação com intervalos de confiança de 95%(B), logarítmico natural do percentual remanescente (C-D), em função do tempo para as formulações Fluc-TA e Fluc-TB (n=12 para cada formulação)	81
Figura 20 - Cromatogramas obtidos após injeção de 20 μ L de amostras de plasma de coelhos normal, lipêmica, hemolisada, plasma adicionado com tinidazol (5 μ g/mL), fluconazol (10 μ g/mL) e tinidazol/fluconazol (5/10 μ g/mL).....	85
Figura 21 – Avaliação da pureza de pico para o fluconazol e tinidazol em plasma de coelhos	86
Figura 22 - Gráfico da avaliação de normalidade dos resíduos da regressão linear do método para determinação de teor de fluconazol em plasma (n=27)	87
Figura 23 – Gráfico da avaliação de normalidade dos resultados obtidos na precisão método para determinação de teor de fluconazol em plasma (n = 90)	88
Figura 24 - Gráfico da avaliação de normalidade dos resultados obtidos na exatidão método para determinação do teor de fluconazol em plasma (n=90)	90
Figura 25 – Concentração plasmática média versus tempo (A) ln da área sob a curva remanescente versus tempo (B) após administração de comprimidos Fluc-TA e Fluc-TB contendo 50 mg de fluconazol em coelhos (n = 12) e cromatogramas representativos do fluconazol no plasma a 1 μ g/mL (C) e 10 μ g/mL (D)	91
Figura 26 – Intervalo de confiança de 90% para a razão Fluc-TB/Fluc-TA do Cmax(A) e ASC (B) obtidos após administração dos comprimidos Fluc-TA e Fluc-TB (50 mg de fluconazol) a coelhos (n = 12)	94
Figura 27 - Curva calorimétrica (A), imagens de DSC-fotovisual (B) e curva termogravimétrica (C) do ibuprofeno	104
Figura 28 – Piroogramas (A) e espectro de massa (B) obtido a 250°C para o ibuprofeno	105
Figura 29 - Curvas médias de liberação do Ibup-TA e Ibup-TB com desvio padrão para tampão fosfato pH 7,2 (A) e água (B). Curvas médias de liberação do Ibup-TA e Ibup-TB com intervalos de confiança de 95% para tampão fosfato pH 7,2 (C) e água (D), (n=12 para cada formulação)	106
Figura 30 – Razão entre o resultado obtido Ibup-TB/Ibup-TA para o valor médio ASC _{0-t} nos meios tampão fosfato pH 7,2 e água (n=12 comprimidos de cada lote em cada tempo).....	107
Figura 31 - Cromatogramas obtidos após injeção de 20 μ L de amostras de plasma de coelhos normal (A), lipêmica (B), hemolisada (C), plasma adicionado com indometacina (2,5 μ g/mL) (D), ibuprofeno (2,5 μ g/mL) (E) e indometacina/ibuprofeno (2,5/2,5 μ g/mL) (F).....	111
Figura 32 - Gráfico da avaliação de normalidade dos resíduos da regressão linear do método para determinação de teor de ibuprofeno em plasma (n=24)	112
Figura 33 – Gráfico da avaliação de normalidade dos resultados obtidos na precisão do método para determinação de teor de ibuprofeno em plasma (n = 90).	114
Figura 34 – Gráfico da avaliação de normalidade dos resultados obtidos na exatidão método para determinação de teor de ibuprofeno em plasma (n=90)	115

Figura 35 –Gráfico da avaliação de normalidade dos resultados obtidos na avaliação da robustez do método para determinação de teor de ibuprofeno em plasma (n=12)	117
Figura 36 – Curva média da concentração plasmática versus tempo (A) após administração dos comprimidos Ibup-TA e Ibup-TB contendo 100 mg de ibuprofeno em coelhos e cromatograma representativo da quantificação plasmática (B) (n = 12)	117
Figura 37 – Intervalo de confiança de 90% para a razão Ibup-TB/Ibup-TA do Cmax (A) e ASC (B) obtidos após administração dos comprimidos Ibup-TA e Ibup-TB (2 x 100 mg de ibuprofeno) (n = 12)	119
Figura 38 – Intervalo de confiança de 90% para a razão InIbup-TB/InIbup-TA do Cmax (A) obtidos após administração dos comprimidos Ibup-TA e Ibup-TB (2 x 100 mg de ibuprofeno) (n = 12)	120
Figura 39 – Correlação <i>in vitro/in vivo</i> entre as áreas sob a curva da biodisponibilidade e os percentuais liberados em água nos tempos de 30, 45 e 60 minutos	121
Figura 40 – Correlação <i>in vitro/in vivo</i> entre as áreas sob a curva da biodisponibilidade e os percentuais liberados em tampão fosfato pH 7,2 nos tempos de 30, 45 e 60 minutos	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Modelos matemáticos utilizados na avaliação do perfil de dissolução dos comprimidos de simvastatina	53
Tabela 2 - Parâmetros determinados por calorimetria exploratória diferencial e CLAE-UV para três diferentes lotes de simvastatina (média ± DP).....	55
Tabela 3 - Avaliação do peso médio, dureza, friabilidade, desintegração e uniformidade de dose dos diferentes lotes de comprimidos	61
Tabela 4 – Resultados obtidos para determinação do mecanismo de liberação do insumo farmacêutico ativo das formulações usando métodos modelo dependente e independente	63
Tabela 5 - Parâmetros determinados por calorimetria exploratória diferencial e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada espectrofotometria eletrônica no ultravioleta (CLAE-UV) para três diferentes lotes de fluconazol (Fluc-A, Fluc-B e Fluc-C) expressos em média ± DP.	77
Tabela 6 - Avaliação do peso médio, dureza, friabilidade, desintegração e uniformidade de dose dos diferentes comprimidos	80
Tabela 7 – Resultados obtidos para comparação dos perfis de dissolução do fluconazol Fluc-TA e Fluc-TB, em água, através de análise univariada	82
Tabela 8 – Resultados obtidos para determinação do mecanismo de liberação do insumo farmacêutico ativo das formulações usando métodos modelo dependente e independente através dos fatores de diferença (f_1) e de similaridade (f_2) para Fluc-TA versus Fluc-TB.....	83
Tabela 9 – Tratamento estatístico obtido por ANOVA fator único para a regressão linear do método para determinação de teor de fluconazol em plasma.....	86
Tabela 10 – Repetibilidade e precisão intermediária, do método para determinação do teor de fluconazol em plasma	88
Tabela 11 – Exatidão, do método para determinação de teor de fluconazol em plasma	89
Tabela 12 - Estabilidade das soluções analíticas, do método para determinação de teor de fluconazol em plasma	90
Tabela 13 - Estatística de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade dos parâmetros C_{max} , t_{max} , ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} encontrados para o Fluc-TA e Fluc-TB (n = 12).....	92
Tabela 14 - Parâmetros farmacocinéticos médios, em coelhos, após administração oral de um comprimido contendo 50 mg de fluconazol (n = 12)	93
Tabela 15 - Avaliação do peso médio, dureza, friabilidade, desintegração e uniformidade de dose dos diferentes comprimidos	106
Tabela 16 – Resultados obtidos para comparação dos perfis de dissolução do ibuprofeno Ibup-TA e Ibup-TB, em tampão fosfato pH 7,2 e água, através de análise univariada	108

Tabela 17 – Resultados obtidos para determinação do mecanismo de liberação do insumo farmacêutico ativo das formulações usando métodos modelo dependente e independente através dos fatores de diferença (f_1) e de similaridade (f_2) para Ibup-TA versus Ibup-TB (meio de dissolução tampão fosfato)	109
Tabela 18 – Resultados obtidos para determinação do mecanismo de liberação do insumo farmacêutico ativo das formulações usando métodos modelo dependente e independente através dos fatores de diferença (f_1) e de similaridade (f_2) para Ibup-TA versus Ibup-TB (meio de dissolução água)	109
Tabela 19 – Tratamento estatístico obtido por ANOVA fator único para a regressão linear do método para determinação do teor de ibuprofeno em plasma	113
Tabela 20 – Repetibilidade e precisão intermediária, do método para determinação de teor de ibuprofeno em plasma	113
Tabela 21 – Exatidão do método para determinação do teor de ibuprofeno em plasma	116
Tabela 22 – Robustez do método para determinação de teor de ibuprofeno em plasma (concentration 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	116
Tabela 23 – Estatística de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade dos parâmetros C_{max} , t_{max} , ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} encontrados para o Ibup-TA e Ibup-TB ($n = 12$)	118
Tabela 24 – Parâmetros farmacocinéticos médios, em coelhos, após administração oral de 2 (dois) comprimidos contendo 100 mg de ibuprofeno ($n = 12$)	118

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS	22
3.2 PRÉ-FORMULAÇÃO	23
3.3 FORMAS FARMACÊUTICAS SÓLIDAS	24
3.4 ANÁLISE TÉRMICA	26
3.4.1 Aspectos gerais.....	26
3.4.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	28
3.4.3 Análise Termogavimétrica (TG).....	29
3.5 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)	30
3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	31
3.7 DISSOLUÇÃO	32
3.8 SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA	35
3.9 CORRELAÇÃO IN VITRO-IN VIVO (CIVIV)	37
3.10 EXCIPIENTES	39
3.11 INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO.....	41
3.11.1 Sinvastatína	41
3.11.2 Fluconazol.....	43
3.11.3 Ibuprofeno	45
4 INFLUÊNCIA DA CELULOSE MICROCRISTALINA DE DIFERENTES TAMANHOS E ORIGENS NA CINÉTICA DE DISSOLUÇÃO E ESTABILIDADE DA SINVASTATINA	47
4.1 INTRODUÇÃO	47
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.2.1 Reagentes, matérias-primas e formulações farmacêuticas	49
4.2.2 Estudos termoanalíticos	49
4.2.2.1 <i>Calorimetria exploratória diferencial</i>	49
4.2.2.2 <i>DSC acoplado a Sistema fotovisual (DSC-fotovisual)</i>	50
4.2.2.3 <i>Termogravimetria (TG)</i>	50

4.2.3 Difração de raio-X (DRX)	50
4.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	51
4.2.5 Quantificação do insumo farmacêutico ativo	51
4.2.6 Perfis de dissolução	52
4.2.6.1 <i>Perfil de dissolução intrínseca</i>	52
4.2.6.2 <i>Perfil de dissolução dos comprimidos</i>	53
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.3.1 Caracterização do insumo farmacêutico ativo	54
4.3.2 Caracterização da celulose microcristalina.....	57
4.3.3 Caracterização da forma farmacêutica	60
5 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO-IN VIVO</i> DE COMPRIMIDOS DE LIBERAÇÃO IMEDIATA OBTIDOS UTILIZANDO INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO DA CLASSE BIOFARMACÊUTICA I E CELULOSE MICROCRISTALINA DE DIFERENTES ORIGENS	67
5.1 INTRODUÇÃO	67
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	70
5.2.1 Reagentes, matérias-primas e formulações farmacêuticas	70
5.2.2 Caracterização físico-química	70
5.2.2.1 <i>Calorimetria exploratória diferencial</i>	70
5.2.3 Estudo de liberação do insumo farmacêutico ativo.....	71
5.2.3.1 <i>Dissolução intrínseca</i>	71
5.2.3.2 <i>Liberação do insumo farmacêutico ativo a partir dos comprimidos</i>	72
5.2.4 Estudo de biodisponibilidade.....	72
5.2.4.1 <i>Animais</i>	72
5.2.4.2 <i>Protocolo e procedimento in vivo</i>	72
5.2.4.3 <i>Análise do insumo farmacêutico ativo no plasma de coelho</i>	73
5.2.4.3.1 <i>Instrumentação e condições de operação</i>	73
5.2.4.3.2 <i>Preparação das amostras</i>	74
5.2.4.3.3 <i>Validação do método</i>	74
5.2.4.3.4 <i>Análise farmacocinética</i>	75
5.2.5 Análise estatística	75
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
5.3.1 Caracterização do insumo farmacêutico ativo	76

5.3.1.1 <i>Calorimetria exploratória diferencial, espectroscopia vibracional e doseamento</i>	76
5.3.1.2 <i>Dissolução intrínseca</i>	78
5.3.2 Caracterização da forma farmacêutica e mecanismo de liberação do insumo farmacêutico ativo	80
5.3.3 Estudo in vivo.....	83
5.3.3.1 <i>Desenvolvimento e validação do método bioanalítico</i>	83
5.3.3.2 <i>Estudo de biodisponibilidade</i>	91
5.3.3.3 <i>Correlação In vitro-in vivo</i>	94
6 AVALIAÇÃO IN VITRO-IN VIVO DE COMPRIMIDOS DE LIBERAÇÃO IMEDIATA OBTIDOS UTILIZANDO INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO DA CLASSE BIOFARMACÊUTICA II E CELULOSE MICROCRISTALINA DE DIFERENTES ORIGENS	96
6.1 INTRODUÇÃO	96
6.2 MATERIAL E MÉTODOS	97
6.2.1 Reagentes, matérias-primas e formulações farmacêuticas	97
6.2.2 Caracterização do insumo farmacêutico ativo	98
6.2.2.1 <i>Calorimetria exploratória diferencial</i>	98
6.2.2.2 <i>Termogravimetria dinâmica</i>	98
6.2.2.3 <i>DSC acoplado a Sistema fotovisual (DSC-fotovisual)</i>	98
6.2.2.4 <i>Pirólise acoplada a Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa</i>	99
6.2.3 Estudo de liberação do insumo farmacêutico ativo dos comprimidos	99
6.2.4 Estudo de biodisponibilidade	100
6.2.4.1 <i>Animais</i>	100
6.2.4.2 <i>Protocolo e procedimento in vivo</i>	100
6.2.4.3 <i>Análise do insumo farmacêutico ativo no plasma do coelho</i>	101
6.2.4.3.1 <i>Instrumentação e condições de operação</i>	101
6.2.4.3.2 <i>Preparação das amostras</i>	101
6.2.4.3.3 <i>Validação do método</i>	102
6.2.4.3.4 <i>Análise farmacocinética</i>	102
6.2.5 Análise estatística	103
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	104
6.3.1 Caracterização do insumo farmacêutico ativo	104
6.3.1.1 <i>Calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria e DSC-fotovisual</i> ...	104
6.3.1.2 <i>Pirólise acoplada cromatografia gasosa/espectrometria de massa</i>	105

6.3.2 Caracterização da forma farmacêutica e mecanismo de liberação do insumo farmacêutico ativo	105
6.3.3 Estudo <i>in vivo</i>	110
6.3.3.1 <i>Desenvolvimento e validação do método bioanalítico</i>	110
6.3.4 Estudo de biodisponibilidade	117
6.3.5 Correlação <i>in vitro-in vivo</i>	120
7 CONCLUSÃO	123
REFERÊNCIAS	124
APENDICE A – Artigo publicado no Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.	139
APENDICE B – Artigo publicado no Latin American Journal of Pharmacy	145

1 INTRODUÇÃO

Em todas as indústria é evidente a importância do controle da qualidade para verificação da conformidade com os padrões estabelecidos, e está intimamente ligado ao fator econômico. Na indústria farmacêutica, a importância e o rigor com o controle da qualidade são bem maiores devido aos aspectos morais e éticos que estão relacionados com a produção de medicamentos.

A produção de medicamentos com qualidade, segurança e eficácia comprovadas que assegurem o restabelecimento da saúde dos indivíduos, seu bem estar e qualidade de vida, atendendo as exigências dos órgãos reguladores, é hoje um dos maiores desafios das Indústrias Farmacêuticas.

A Lei 9787 de 10 de fevereiro de 1999 (BRASIL, 1999a), regulamentada pela Resolução 391 de 09 de agosto de 1999 (BRASIL, 1999b), criou as exigências para o registro de medicamentos similares e genéricos no Brasil. Os medicamentos sintéticos com qualidade, segurança de uso, e eficácia requerem ensaios analíticos avançados nos estudos da padronização das matérias-primas sintéticas, no desenvolvimento farmacotécnico e na verificação das características biofarmacêuticas dos produtos.

O desenvolvimento e a formulação apropriados da forma farmacêutica requerem a consideração das características físicas, químicas, físico-químicas e biológicas de todas as matérias-primas utilizadas na elaboração do produto, bem como a anatomoefisiologia do local de administração e absorção (ANSEL; ALLEN; POPOVICH, 2013). Assim, o estudo de pré-formulação consiste no ponto de partida para a formulação de um medicamento com qualidade reproduzível.

Consideráveis esforços têm sido feitos para melhorias nos instrumentos analíticos, refletindo diretamente no desenvolvimento de técnicas e métodos para análise da composição química de medicamentos e seus produtos de degradação, bem como na separação de um determinado componente a partir de uma mistura.

Outro ponto importante a considerar é a avaliação da dissolução intrínseca e estabilidade do ingrediente farmacêutico ativo, por exemplo, provenientes de diferentes fabricantes ou lotes diferentes do mesmo fabricante. A necessidade de se demonstrar a similaridade entre eles se baseia no fato que diferenças na cristalização, tamanho de partículas e área superficial podem gerar lotes, de um mesmo produto farmacêutico, com biodisponibilidade diferente acarretando prejuízos no tratamento e

risco aos pacientes, principalmente quando considerados os ingredientes farmacêuticos ativos que apresentam baixo índice terapêutico (YU et al., 2004).

Em relação ao produto acabado, o teste de dissolução representa importante ferramenta utilizada na indústria farmacêutica, podendo ser utilizado em diferentes estágios do ciclo de vida de um medicamento, como por exemplo: identificação de variáveis críticas na produção, seleção e otimização de formulações, controle da qualidade dos lotes produzidos e isenção dos estudos de biodisponibilidade relativa para algumas dosagens do mesmo produto (MARCOLONGO, 2003).

A implementação da análise térmica na indústria farmacêutica mostra-se como uma outra técnica analítica, quantitativa e comparativa, capaz de produzir resultados rápidos e reprodutíveis, podendo ser utilizada no controle de qualidade (MACÊDO; NASCIMENTO, 2002). Quando associado a outras técnicas tais como microscopia, difração de raios-X (DRX) e estudos de dissolução, entre outras, fornece resultados conclusivos da qualidade física da amostra.

De grande importância para a qualidade do medicamento é a qualificação dos fornecedores seja dos princípios ativos ou dos excipientes utilizados na formulação. Essa exigência deve ser considerada porque a diferença nos processos tecnológicos empregados bem como a fonte de obtenção das matérias-primas pode ser suficiente para modificar as características de um excipiente como a celulose microcristalina (THOORENS et al., 2014) e interferir na qualidade do produto final, seja *in vitro* ou *in vivo* onde os mecanismos envolvidos nem sempre são conhecidos (FATHIMA et al., 2011), como por exemplo:

Vehovec et al. (2012) avaliaram a influência de diferentes tipos de celulose microcristalina comercialmente disponíveis na degradação do perindopril erbumina e maleato de enalapril em misturas binárias, onde foi verificado que a estabilidade destes IFAs diferiu quando em contato com as diferentes tipos de CMCs.

Steele et al. (2003) estudaram as características de adsorção de ativos em celulose microcristalina e celulose microcristalina silicificada de diferentes fornecedores e diferentes lotes do mesmo fabricante e verificaram diferenças em relação ao fabricante e entre lotes do mesmo fabricante, concluindo que alteração na marca de CMC utilizada numa formulação pode ter um efeito significativo sobre a adsorção observada *in vitro* e, potencialmente, afetar a biodisponibilidade do IFA.

Suzuki e Nakagami (1999a) estudaram o efeito da cristalinidade da celulose microcristalina na compactabilidade e dissolução de comprimidos de paracetamol e

verificaram que o perfil de liberação droga pode ser modificada em função da alteração do grau de cristalinidade da celulose microcristalina.

Rowe, Cmckillop e Bray (1994) estudaram o efeito da variação de lotes e da fonte de celulose microcristalina e verificaram a existência de diferenças na cristalinidade em magnitude que neutralizavam qualquer diferença no tamanho de partícula (como por exemplo entre a celuloses microcristalinas CMC101 e CMC102) ou da fonte.

Landin et al. (1993a) avaliaram o efeito do país de origem sobre as propriedades da celulose microcristalina onde foi verificado diferenças significativas no teor de lignina, hemicelulose, composição e teor de açúcares, presença ou ausência de celulose II, entalpia de imersão, granulometria e propriedades de fluxo.

Landin et all (1993b) estudaram a influência da fonte e do lote de celulose microcristalina no comportamento e estabilidade de formulações de comprimidos de prednisona e verificaram variação significativa nas propriedades mecânicas e na taxa de dissolução da prednisona com a granulometria e composição química da celulose microcristalina.

Justifica-se assim a realização do trabalho tendo como proposição desenvolver estudos para avaliar a influência da origem e do tipo de celulose microcristalina nas características cinéticas de liberação e biodisponibilidade, de comprimidos formulados com ingredientes farmacêuticos ativos de diferentes classes biofarmacêuticas, tendo em vista a verificação do estabelecimento de correlação *in vitro-in vivo*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver estudos com formulações contendo ingrediente farmacêutico ativo de diferentes classes biofarmacêuticas, visando verificar a influência de diferentes fabricantes do excipiente celulose microcristalina no estabelecimento de correlação *in vitro-in vivo*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar os ingredientes farmacêuticos ativos e celuloses utilizadas para a produção dos comprimidos de simvastatina, ibuprofeno e fluconazol;
- ✓ Obter os perfis de dissolução dos comprimidos e analisar aplicando diferentes modelos;
- ✓ Desenvolver e validar métodos bioanalíticos para quantificação dos diferentes ingredientes farmacêuticos ativos nas amostras biológicas utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- ✓ Coletar e analisar as amostras biológicas;
- ✓ Determinar os parâmetros farmacocinéticos para os diferentes produtos;
- ✓ Analisar a correlação *in vitro-in vivo* para os comprimidos obtidos com as diferentes celuloses.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

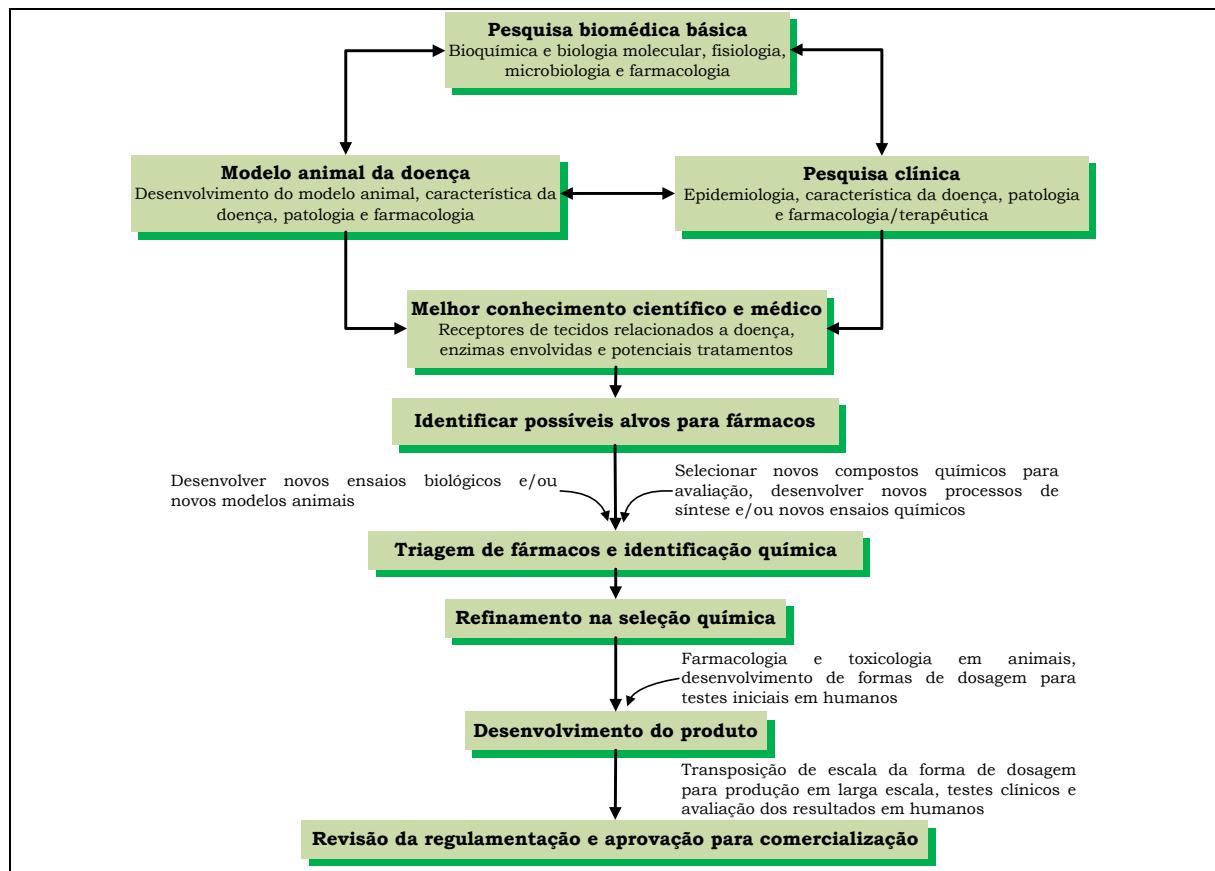
3.1 PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS

Nos últimos anos, a indústria farmacêutica passou por grandes transformações. Houve significativos avanços científicos com potencial para revolucionar o tratamento de diversas doenças humanas. No entanto, ainda há uma demanda substancial de novos medicamentos para tratar necessidades médicas não atendidas (CAMEJO; CMCGRATH; HERINGS, 2011; HAN; DAVIS; WANG, 2010).

O medicamento é definido como sendo um produto farmacêutico, tecnicamente, obtido, ou elaborado, que contém um ou mais insumo farmacêutico ativos e outras substâncias, com finalidade profilática; curativa; paliativa; ou para fins de diagnóstico (BRASIL, 2015; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010;).

O desenvolvimento de um novo medicamento representa um processo longo e complexo de custo muito elevado e que envolve uma abordagem multidisciplinar em várias fases conforme Figura 1.

Figura 1 - Fluxograma geral para o desenvolvimento de um novo medicamento.



Fonte: Dailey, 2011.

As formas farmacêuticas utilizadas são diversas (por exemplo soluções, suspensões, pós, géis, cremes, cápsulas, comprimidos, etc) sendo as formas sólidas as mais extensivamente utilizadas destacando-se entre elas, para utilização oral, os comprimidos.

3.2 PRÉ-FORMULAÇÃO

A pré-formulação é a etapa no desenvolvimento de uma forma farmacêutica, onde se ocupa da investigação do comportamento físico-químico de um insumo farmacêutico ativo isoladamente e/ou combinado à outras substâncias presentes na formulação, e tem como objetivo gerar informações que auxiliem o pré-formulador a desenvolver uma forma farmacêutica estável e com características de biodisponibilidade adequadas (AULTON, 2005; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001; ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2013).

Um estudo de pré-formulação bem elaborado deve incluir avaliação de diversas propriedades incluindo (AULTON, 2005; SOUZA, 2005).

- Caracterização química
 - { Identificação;
Pureza;
Perfil de impurezas;
Solventes residuais.
- Caracterização estrutural
 - { Polimorfismo;
Pseudo-polimorfismo;
Grau de cristalinidade.
- Caracterização física
 - { Dimensão;
Distribuição granulométrica;
Superfície específica;
Densidade;
Ponto de fusão;
Análise térmica;
Umidade;
Molhabilidade.
- Caracterização mecânica
 - { Coesão;
Adesão;
Escoamento;
Volume aparente.

3.3 FORMAS FARMACÊUTICAS SÓLIDAS

A terminologia para classificação das formas farmacêuticas sólidas é complexa e pode ser feita utilizando diferentes critérios (modo de liberação do insumo farmacêutico ativo, tipo de forma farmacêutica preparada, método de obtenção utilizado, etc). Será adotada a classificação geral adotada por Manadas, Pina e Veiga (2002) conforme segue:

a) Formas farmacêuticas de liberação convencional (FFLC)

- ✓ Formas farmacêuticas de liberação imediata: A *Food and Drug Administration* (FDA) estabelece que de acordo com as características biofarmacêuticas do insumo farmacêutico ativo (IFA) estas formas farmacêuticas deverão liberar 85% do insumo farmacêutico ativo entre os 15 e os 60 minutos (COSTA; LOBO, 1999; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1997). Conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) são formas farmacêuticas que não são modificadas intencionalmente por um desenho de formulação especial e/ou método de fabricação (BRASIL, 2011). A dose total da substância ativa é disponibilizada rapidamente após sua administração e em ensaios *in vitro* apresenta, em geral, dissolução média de no mínimo 75% da substância ativa em até 45 minutos. Tal forma farmacêutica pode ainda apresentar tipos de dissolução diferenciadas em rápida e muito rápida (BRASIL, 2010):
 - ◆ Dissolução rápida: dissolução média de no mínimo 85% da substância ativa em até 30 minutos.
 - ◆ Dissolução muito rápida: dissolução média de no mínimo 85% da substância ativa em até 15 minutos.

b) Formas farmacêuticas de liberação modificada ou não convencional (FFLM)

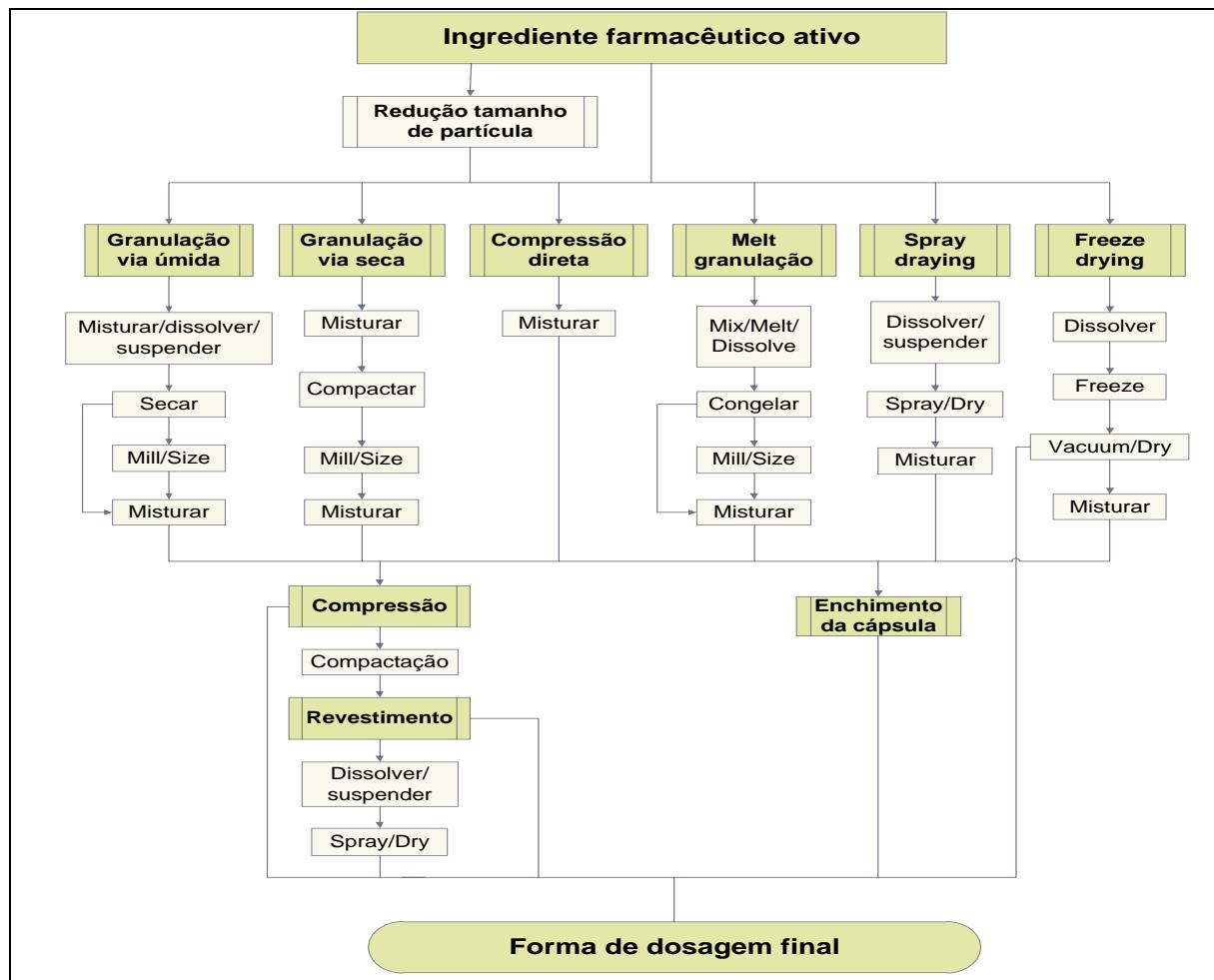
- ✓ Formas farmacêuticas de liberação retardada: a liberação do IFA é retardada, o que pode ser obtido por meio de um desenho de formulação especial e/ou método de fabricação. As preparações gastrorresistentes são consideradas formas de liberação retardada, pois são destinadas a resistir ao fluido gástrico e liberar o insumo farmacêutico ativo no fluido intestinal (BRASIL, 2011). A liberação da substância ativa é retardada por período de tempo determinado, após o qual a liberação é

praticamente imediata. A liberação retardada provoca um T_{max} (Tempo máximo) mais longo, mas sem modificação quer do C_{max} quer no $t_{1/2}$ (CPMP/QWP/604/96, 2000; EEC-DIRECTIVE-75/318, 1992).

- ✓ Formas farmacêuticas de liberação prolongada: permite pelo menos uma redução na frequência de dose quando comparada com o medicamento apresentado na forma de liberação imediata. É obtida por meio de um desenho de formulação especial e/ou método de fabricação (BRASIL, 2011). A taxa de liberação do IFA é reduzida após a administração, de modo a manter a atividade terapêutica, reduzir efeitos tóxicos, ou para atingir qualquer outro fim terapêutico (CPMP/QWP/604/96, 2000; EEC-DIRECTIVE-75/318, 1992).

A Figura 2 mostra os processos gerais para obtenção das formas farmacêuticas sólidas de uso oral cápsulas e comprimidos.

Figura 2 - Fluxograma geral para a produção das formas farmacêuticas sólidas comprimido e cápsula



Fonte: Qiu et al., 2009; Zhang et al., 2004.

Os comprimidos, particularmente os obtidos por compressão direta, são considerados como sendo uma das formas farmacêuticas mais desejáveis para a disponibilização do insumo farmacêutico ativo, pois é acessível e conveniente para os pacientes, são obtidas por um processo de fabricação relativamente simples, facilmente controlável e de “baixo custo”, o que é atraente para os fabricantes de produtos farmacêuticos e amigável ao meio ambiente (STRYDOM et al., 2011).

Tal qual se observa para uma substância farmacologicamente ativa, no estudo de pré-formulação de comprimidos, deve-se estudar as propriedades físico-químicas, físico-mecânicas dos excipientes utilizados e a influência destes na *performance* da formulação final, verificando-se em cada caso a influência na solubilidade, distribuição granulométrica, cristalinidade e polimorfismo, higroscopia, densidade real, densidade aparente e compactabilidade, entre outros fatores, que podem influenciar a biodisponibilidade do produto fabricado, chamando-se este processo de estudo de funcionalidade do excipiente (KLEVAN et al., 2012; KLEVAN et al., 2010; PIFFERI; SANTORO; PEDRANI, 1999; ARMSTRONG, 1997).

Diferentes técnicas são utilizadas para realização dos estudos de caracterização de IFAs, excipientes e formulações.

3.4 ANÁLISE TÉRMICA

3.4.1 Aspectos gerais

A análise térmica tem sido utilizada em muitos campos a exemplo da caracterização de minerais, substâncias inorgânicas, metais, cerâmicas, materiais eletrônicos, polímeros, substâncias orgânicas, produtos farmacêuticos, alimentos e organismos biológicos (BROWN; GALLAGHER, 2008; CHENG et al., 2000; OZAWA, 2000).

Na industria farmacêutica a implementação da análise térmica surge como um método analítico, qualitativo e comparativo, capaz de produzir resultados rápidos e reproduutíveis, visando a análise global da qualidade tecnológica de medicamentos (CRAIG; READING, 2007; MACÊDO, 1996).

São varias as aplicações na área farmacêutica, incluindo: determinação da pureza de fármacos, estudos de compatibilidade entre os constituintes da formulação

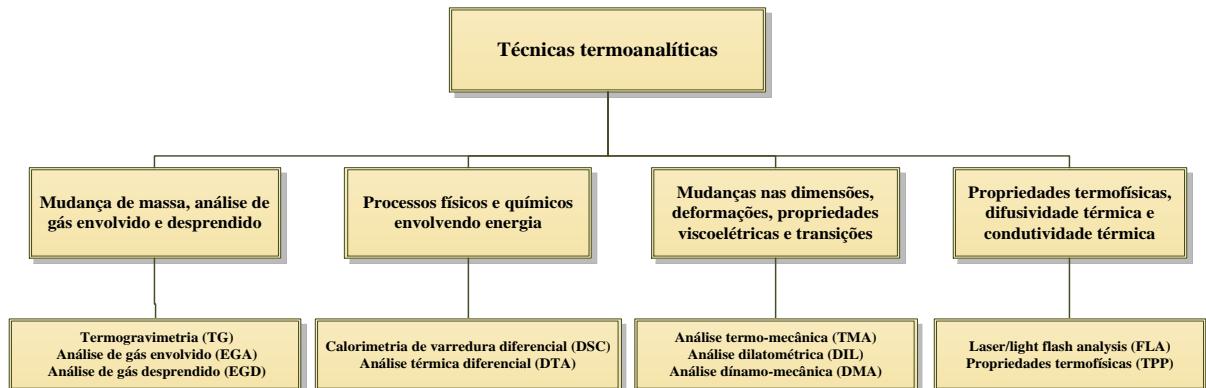
e identificação de polimorfismo com determinação das entalpias de cada forma cristalina.

Para Macêdo e Nascimento, 2002, a análise térmica na indústria farmacêutica pode ser utilizada no controle de qualidade, seja de substâncias isoladas ou associadas sendo variadas as possibilidades de uso como por exemplo: estudo de caracterização e decomposição térmica de IFAs (FANDARUFF et al., 2014; BÖER et al., 2013.; PROCOPIO et al. 2011; MOURA et al., 2009; SILVA et al., 2009; RODRIGUES et al., 2005), compatibilidade e desenvolvimento de formas farmacêuticas (SANTOS, 2013.; FREITAS et al., 2012.; SOARES et al., 2011.; SOARES-SOBRINHO et al., 2010; STULZER et al., 2008; MEDEIROS et al., 2007a; MEDEIROS et al., 2007b; CIDES et al. 2006). Quando associado a outras técnicas tais como microscopia, difração de raios-X (DRX), pirólise acoplada a cromatografia gasosa e estudos de dissolução, entre outras, fornece resultados conclusivos da qualidade física da amostra.

Na Farmacopéia Brasileira 5^a edição (2010) a análise térmica foi incluída como técnica analítica que pode ser utilizada para avaliação do comportamento térmico, determinação do teor de umidade e/ou solventes, determinação da temperatura de ebulição e sublimação, determinação da temperatura de decomposição térmica e determinação do teor de cinzas através da análise termogravimétrica. A calorimetria exploratória diferencial foi introduzida podendo ser aplicada para: determinação do ponto e faixa de fusão, determinação da temperatura de sublimação, evaporação e solidificação, determinação da temperatura de transição vítreia, avaliação de polimorfismo, construção de diagrama de fases, determinação da pureza (exceto as substâncias amorfas, os polimorfos instáveis na faixa da temperatura experimental, os compostos que fundem com decomposição térmica e as substâncias que possuem pureza inferior a 95%). Há ensaios específicos descritos para caracterização de recipientes e correlatos plásticos: de polietileno de baixa e de alta densidade, polipropileno, poli(tereftalato de etileno) e poli(tereftalato de etileno glicol) utilizando a calorimetria exploratória diferencial (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Conforme a propriedade analisada, as técnicas de análise térmica didaticamente podem ser agrupadas conforme o esquema abaixo, Figura 3 (CRAIG; READING, 2007):

Figura 3 - Classificação das técnicas termoanalíticas conforme as propriedades estudadas

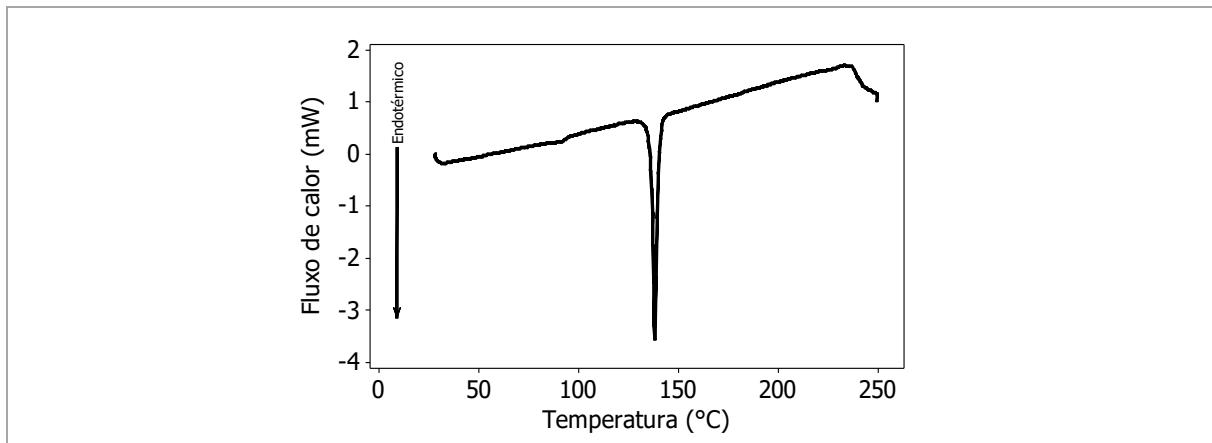


Entre estas, na área farmacêutica, três delas destacam-se como importantes ferramentas no estudo de pré-formulação e formulação, são elas: Calorimetria exploratória diferencial (DSC), Análise Térmica Diferencial (DTA) e Análise Termogravimétrica (TG).

3.4.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A Calorimetria exploratória diferencial é uma técnica térmica em que a diferença na taxa de fluxo de calor entre a amostra e um material de referência é medida (BROWN; GALLAGHER, 2008; CRAIG; READING, 2007). Uma curva calorimétrica típica é mostrada na Figura 4.

Figura 4 - Curva DSC típica da simvastatina



Fonte: Dados não publicados do próprio autor.

Os picos da Calorimetria exploratória diferencial resultam tanto de modificações físicas como reações químicas induzidas por variações de temperatura da amostra.

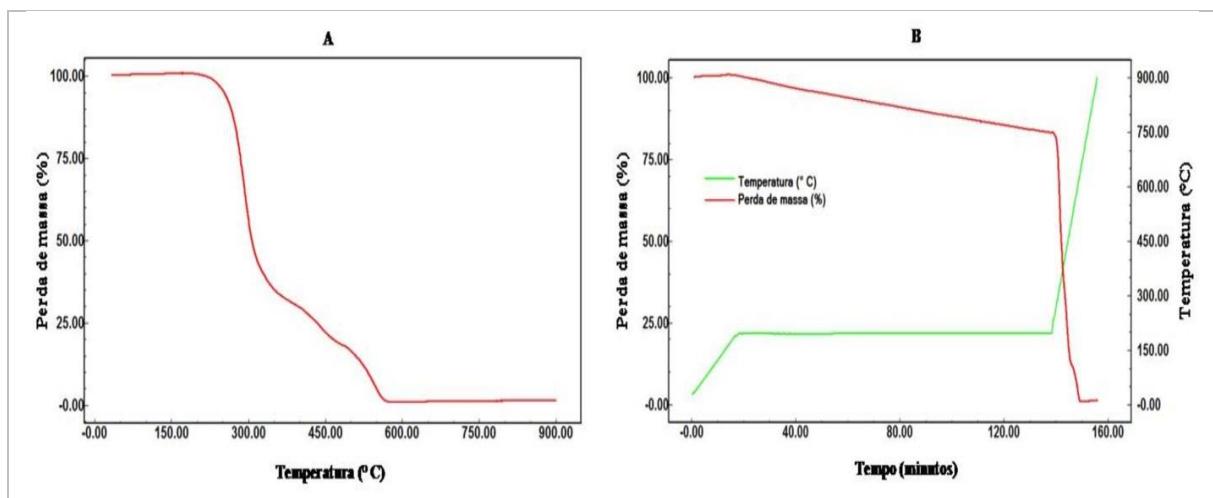
Os processos físicos endotérmicos incluem fusão, vaporização, absorção e desorção. A adsorção e a cristalização geralmente são exotérmicas. As reações químicas podem ser também exotérmicas ou endotérmicas. As reações exotérmicas incluem oxidação no ar ou na presença de oxigênio, polimerização e reações catalíticas. As reações endotérmicas incluem desidratação, redução em uma atmosfera gasosa e decomposição (CRAIG; READING, 2007).

3.4.3 Análise Termogavimétrica (TG)

É uma técnica termoanalítica na qual se analisa continuamente a massa da amostra, em uma atmosfera controlada, em função da temperatura ou do tempo (BROWN; GALLAGHER, 2008). A termogravimetria fornece informações sobre reações de decomposição e oxidação, e de processos físicos como vaporização, sublimação e desorção. O estudo de decomposição térmica de sólidos compreende três etapas principais: isolamento e identificação dos intermediários e produtos finais da reação; determinação das constantes de velocidade; determinação dos parâmetros cinéticos, que caracterizam as reações de decomposição térmica (CRAIG; READING, 2007; MOTHÉ; AZEVEDO, 2002).

O registro da análise é representado pela curva termogravimétrica, sendo a massa colocada no eixo das ordenadas, com valores decrescentes de cima para baixo e o tempo (t) ou temperatura (T) no eixo das abscissas, com valores crescentes da esquerda para a direita Figura 5.

Figura 5 - Curvas termogravimétricas típicas da decomposição da simvastatina: curva termogravimétrica dinâmica em A e isotérmica em B.



Fonte: Dados não publicados do próprio autor.

A interpretação das observações obtidas com TG frequentemente requer apoio de métodos complementares. Métodos importantes para confirmar a identidade dos processos investigados por TG frequentemente útil incluem medições de entalpia (DSC e DTA), análise de gás desprendido (EGD), as determinações estruturais (difração de raios-X), microscopia (mudanças texturais dos sólidos), cromatografia gasosa, etc (CRAIG; READING, 2007).

3.5 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)

A difração de raios-X (DRX) é uma das técnicas utilizadas para determinar a natureza cristalina de sólidos (WANG; CAI, 2008).

Materiais de estrutura cristalina apresentam formação de picos característicos no difratograma, enquanto que materiais amorfos caracterizam-se por apresentar difratogramas sem picos finos bem definidos (CORTI, 2007).

A Figura 6 mostra um difratograma do insumo farmacêutico ativo simvastatina evidenciando os picos bem definidos característicos de uma amostra cristalina e da celulose microcristalina CMC102, a qual por apresentar maior conteúdo amorfos que a simvastatina apresenta menos picos e menor definição.

Conforme Aleem et al. (2008), para determinar o grau de cristalinidade relativa (RDC, da sigla em inglês *Relative Degree of Crystallinity*) entre duas amostras pode ser utilizada a Equação 1. Menores valores de RDC indicam menor grau relativo de cristalinidade.

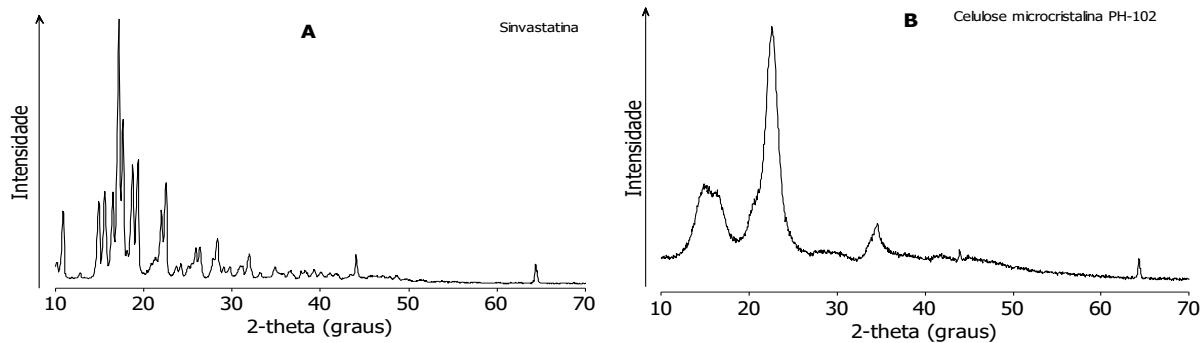
$$Grau\ de\ cristalinidade\ relativa\ (RDC) = \frac{I_A}{I_R} \quad \text{Equação 1}$$

Onde: I_A e I_R representam a intensidade dos picos da amostra e referência no mesmo ângulo.

Outra forma de determinar o grau de cristalinidade é através da equação de Segal, Equação 1.2, através das medidas na intensidade máxima e no fundo amorfos do mesmo difratograma (SINGH; PHILIPA; PATHAK, 2012; MEDINA; KUMAR, 2007).

$$\text{Índice de cristalinidade\ (\%)} = \left(\frac{I_{05} - I_{am}}{I_{05}} \right) * 100 \quad \text{Equação 2}$$

Figura 6 - Difratogramas da simvastatina (A) e celulose microcristalina CMC102 (B)



Fonte: Dados não publicados do próprio autor.

3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um equipamento que pode fornecer rapidamente informações sobre a análise microestrutural de amostras sólidas. Sua utilização é comum em biologia, farmácia, odontologia, engenharia, química, metalurgia, física, medicina e geologia entre outras (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

O princípio de funcionamento de um MEV consiste em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica cuja varredura está perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente (GALLETI, 2003; MANNHEIMER, 2002).

O princípio de operação baseia-se fundamentalmente na quantificação dos elétrons secundários emitidos por uma amostra como resposta a uma excitação eletrônica incidente. Esta medida de elétrons secundários (ES) permite uma definição qualitativa da morfologia e topografia da amostra.

Uma das principais razões da utilidade da microscopia eletrônica de varredura é a alta resolução das imagens que pode ser obtida quando as amostras são observadas (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2003; NAGATANI et al., 1987). Outra característica importante do MEV é a aparência tridimensional da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo e permite, também, o exame com grande profundidade de foco, o que é extremamente útil (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2003).

A imagem formada a partir do sinal captado na varredura eletrônica de uma superfície pode apresentar diferentes características, uma vez que a imagem resulta

da amplificação de um sinal obtido de uma interação entre o feixe eletrônico e o material da amostra. Diferentes sinais podem ser emitidos pela amostra. Dentre os sinais emitidos, os mais utilizados para obtenção da imagem são originários dos elétrons secundários e/ou dos elétrons retroespalhados (MALISKA, 2008).

Os elétrons secundários são bem pouco energéticos. Eles não podem percorrer um trajeto importante dentro do material. Eles provêm, portanto, de uma zona da ordem de alguns angstrons (Å) em torno do feixe incidente. Os elétrons secundários são as interações que permitem obter a melhor resolução. Os elétrons retroespalhados possuem uma energia que é em torno daquela do feixe incidente (choques elásticos). A resolução será, portanto, maior à medida que a tensão for mais fraca. Mas é preciso salientar o fato de que se produzem menos elétrons retroespalhados à medida que a tensão diminui (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2003).

Os parâmetros que mais influenciam na resolução da imagem em um MEV são (TOLEDO; DUARTE; NAKASHIMA, 2004):

- ✓ Tensão de aceleração dos elétrons;
- ✓ Corrente da sonda: quanto maior a corrente, maior é o diâmetro do feixe;
- ✓ Distância entre a amostra e a lente objetiva.

3.7 DISSOLUÇÃO

Atualmente o Controle da Qualidade de um medicamento não se restringe às análises físico-químicas a fim de atestar o teor da substância ativa e sua uniformidade na formulação. É inquestionável a necessidade da determinação da capacidade da formulação em liberar o insumo farmacêutico ativo para que este possa ser absorvido em quantidade e velocidade adequadas e consequentemente proporcionar o efeito terapêutico desejado.

A relevância do estudo da velocidade de dissolução no comportamento clínico de fármacos tem sido reconhecida. Esta significância é baseada no fato de que o fármaco deve estar na forma de solução para ser absorvido e estar disponível na circulação sistêmica (AMEUR; BOUZIT, 2013). Os ensaios de dissolução constituem importante ferramenta no desenvolvimento de novas formulações e na garantia de qualidade dos medicamentos. Estes testes adquirem maior relevância quando podem ser correlacionados com dados obtidos *in vivo*, o que permite prever o comportamento

de uma formulação específica no organismo a partir de dados obtidos *in vitro* (STORPIRTS et al. 2011).

Verifica-se, portanto, que os estudos de dissolução representam uma ferramenta indispensável nas várias etapas dos processos de desenvolvimento de um produto farmacêutico, identificação de variáveis críticas na produção, formulação, controle de qualidade, estabelecimento de correlações *in vitro/in vivo* e assuntos regulamentares relacionados a medicamentos (MENEGOLA; STEPPE; SCHAPOVAL, 2007; HANSON; GRAY, 2004; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1997).

Neste sentido, em 1970 a Farmacopéia dos Estados Unidos (USP XVIII) oficializou o primeiro teste de dissolução para comprimidos (UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 1970). No Brasil, a oficialização deu-se somente em 1988 pela Farmacopéia Brasileira 4^a edição (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1988).

O teste de dissolução é correntemente utilizado como um ensaio indicador, *in vitro*, de bioequivalência (BE), utilizando para tal finalidade a comparação entre perfis de dissolução de formulações farmacêuticas diferentes. A comparação pode ser feita através de diferentes métodos a exemplo dos métodos modelos independente utilizando os fatores de diferença (F_1) e de semelhança (F_2) e da eficiência de dissolução (ED) (LEHTO et al., 2011; KAKRAN; SAHOO; LI, 2011; GARBACZ et al., 2009; MENEGOLA; STEPPE; SCHAPOVAL, 2007).

A taxa de dissolução de um soluto num solvente é diretamente proporcional à sua solubilidade, tal como descrito pela equação de Noyes-Whitney:

$$Taxa\ de\ dissolução = \frac{dM}{dt} = \left[\left(\frac{DA}{h} \right) (C_s - C_t) \right] \quad \text{Equação 2}$$

Onde: dM/dt é a taxa de transferência de massa; D é o coeficiente de difusão (cm^2/sec); A é a área de superfície da droga (cm^2); h é a camada limite estático (cm); C_s é a solubilidade de saturação do insumo farmacêutico ativo e C_t é a concentração da droga no tempo t .

Para verificar a cinética de liberação de um insumo farmacêutico ativo de uma formulação existem diferentes modelos. O Quadro 1 mostra alguns modelos e as equações aplicadas para cada um deles.

Para que os resultados do teste sejam confiáveis, é necessário que haja reprodutibilidade em testes sucessivos, quando um mesmo produto é analisado por

diferentes analistas e/ou em laboratórios. Para isto, é necessário que as variáveis que possam afetar o teste sejam conhecidas e controladas. Diversas variáveis podem afetar os ensaios de dissolução, algumas delas sendo mostrados a seguir (HANSON; GRAY, 2004).

Quadro 1 - Modelos para estudo da cinética de liberação do insumo farmacêutico ativo de da formulação.

Equação	Modelo	Legenda
$Q_t = Q_0 + k_0 t$	Cinética de ordem zero	Q_0 = quantidade de insumo farmacêutico ativo inicialmente presente na forma farmacêutica; Q_t = quantidade de insumo farmacêutico ativo presente na forma farmacêutica após o tempo t ; k_0 = constante de proporcionalidade.
$\ln Q_t = \ln Q_0 + k_1 t$	Cinética de primeira ordem	Q_t = quantidade de insumo farmacêutico ativo liberado no tempo t ; Q_0 = quantidade inicial de insumo farmacêutico ativo na solução; k_1 = constante de liberação de primeira ordem.
$Q = k t^{1/2}$	Cinética de segunda ordem	Q = quantidade do insumo farmacêutico ativo liberado no tempo t ; k = constante cinética de dissolução.
$k_t = \left(\frac{W_\infty}{W_\infty - W} \right)$	Kitazawa	w_∞ = quantidade do insumo farmacêutico ativo liberado em um tempo infinito (quantidade total que pode ser liberada); w = quantidade liberada nos vários tempos t ; k = constante cinética de dissolução.
$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = k t$	Hixson-Crowell	Q_0 = quantidade de insumo farmacêutico ativo liberado no tempo inicial; Q_t = quantidade do insumo farmacêutico ativo liberado no tempo t ; k = constante cinética de dissolução.
$Q_t = k \sqrt{t}$	Higuchi	Q_t = quantidade de insumo farmacêutico ativo liberado no tempo t ; k = constante cinética de dissolução.

Fonte: Qiu et al. (2009); Gibson (2004); Costa e Lobo (2001).

- Fatores relacionados ao equipamento
 - Nivelamento do aparelho em relação à superfície plana
 - Alinhamento do sistema de agitadores
 - Centralização do eixo de agitação em relação ao recipiente
 - Vibração
 - Velocidade de agitação
 - Temperatura
 - Posicionamento da haste

- Fatores relacionados ao meio de dissolução
 - Diferença de pH do meio
 - Gases dissolvidos no meio
 - Volume do meio
 - Temperatura do meio

3.8 SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA

Em 1995 a FDA publicou o guia denominado SUPAC (*Scale-up and Postapproval changes: chemistry, manufacturing and controls, in vitro dissolution testing and in vivo bioequivalence documentation*). Neste guia estão descritas as alterações que podem ser feitas após o produto estar registrado, bem como a documentação de suporte necessária para a sua avaliação e aprovação. Dependendo do nível de complexidade da mudança, os fabricantes deverão apresentar testes de dissolução in vitro ou estudos de bioequivalência in vivo (GUPTA et al., 2006; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1995).

Em 1995 foi introduzida as bases teóricas do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) proposto por Amidon et al. (1995), o qual apresenta um novo paradigma na bioequivalência, com base em princípios científicos promovendo impacto crescente na prática regulatória relativa a medicamentos. De acordo com os princípios do SCB, certos medicamentos podem ser considerados para *biowaivers*, ou seja, aprovar o produto com base em testes de dissolução in vitro em vez de exigir estudos de bioequivalência em seres humanos (LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004).

As primeiras aplicações de *biowaivers* só foram para transposição de escala e alterações pós-aprovação, porém ao longo dos anos o princípio de bioisenção foi

estendido para a aprovação de novos medicamentos, genéricos e aprovações pós-registro tendo sido publicado em 2000 pela FDA o guia para indústrias (*Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System*) (MARTINEZ; AMIDON, 2002; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2000). Como resultado, estudos *in vivo* utilizando seres humanas podem ser evitados e os custos de desenvolvimento de produtos genéricos podem ser significativamente reduzidos.

A absorção oral de um medicamento é fundamentalmente dependente da solubilidade aquosa e permeabilidade gastrintestinal. O SCB, quando combinado com a dissolução do medicamento, leva em consideração três fatores importantes que afetam a velocidade e extensão da absorção de formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata: solubilidade, dissolução e permeabilidade (GUPTA et al., 2006; AMIDON et al., 1995).

De acordo com o SCB os Insumos farmacêuticos ativos podem ser classificados em quatro classes biofarmacêuticas.

- a) Classe I: alta permeabilidade e alta solubilidade;
- b) Classe II: alta permeabilidade e baixa solubilidade;
- c) Classe III: baixa permeabilidade e alta solubilidade;
- d) Classe IV: baixa permeabilidade e baixa solubilidade.

Conforme descrito por Martinez e Amidon (2002), citado por Bonamici (2009), a isenção de estudos de bioequivalência com base no perfil de dissolução *in vitro* deve ser baseada no entendimento da relação entre as características de absorção, solubilidade e dissolução do insumo farmacêutico ativo, assumindo que:

A comparação do perfil de dissolução *in vitro* de duas formulações deve refletir as diferenças no comportamento da dissolução *in vivo* destas formulações

Se duas formulações apresentarem perfil de dissolução equivalente *in vivo*, sob todas as condições do lúmen intestinal, essas formulações apresentarão concentração equivalente de fármaco na superfície da membrana

Para que a comparação de perfil de dissolução garanta a comparação da absorção *in vivo*, a velocidade e a extensão do fármaco, presentes na superfície da membrana, deve determinar as características de absorção da formulação

Para classificar um insumo farmacêutico ativo de acordo com o SCB, o número de dose, a solubilidade e permeabilidade precisam ser conhecidos (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2000; AMIDON et al., 1995).

A solubilidade é calculada com base na maior dose de medicamento disponível no mercado. É definida como base na solubilidade mínima do insumo farmacêutico ativo através de uma faixa de pH de 1 a 8 a uma temperatura de $37\pm0,5$ °C. Insumo farmacêutico ativos de alta solubilidade são aqueles com relação (dose/volume de solubilidade) menor que ou igual a 250 ml. A permeabilidade (P_{eff} , expressa em unidades de 10^4 cm por segundo) é definida como a permeabilidade efetiva da parede jejunal humana a um insumo farmacêutico ativo. Insumo farmacêutico ativos de alta permeabilidade são aqueles com um grau de absorção maior do que ou igual a 90% e geralmente não são associados a qualquer instabilidade documentada no trato gastrointestinal.

Conforme a FDA a bioisenção pode ser requerida apenas para formas sólidas de liberação imediata administradas por via oral (liberação mínima de 85% em 30 minutos), contendo insumo farmacêutico ativos de alta solubilidade na faixa de pH de 1 a 7,5 (a razão dose/solubilidade deve ser menor que 250 mL) e alta permeabilidade (a fração absorvida deve ser maior que 90%). Outras restrições são que insumo farmacêutico ativo com estreita faixa terapêutica e medicamentos destinados a ser absorvido no interior da cavidade oral não podem ser considerados para *biowaivers* (LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004).

3.9 CORRELAÇÃO IN VITRO-IN VIVO (CIVIV)

Na década de 1960, Levy, Leonards e Pocknal (1965) iniciaram as pesquisas na possibilidade de existência de uma possível relação entre dados de estudos (*in vitro*) e de estudos de biodisponibilidade (*in vivo*), e conseguiram relatar uma significante correlação entre tais dados, para comprimidos de ácido acetilsalicílico. Em 1973, Wagner e colaboradores demonstraram existir correlação entre dados *in vitro* e *in vivo* para várias formas farmacêuticas de digoxina, o qual foi confirmado por estudos posteriores (LINDENBAUM et al., 1973; JOHNSON et al., 1973). A partir daí surgiram diversos trabalhos na literatura com o objetivo de estabelecer correlação entre os parâmetros da dissolução *in vitro* e os parâmetros relativos aos estudos de biodisponibilidade *in vivo*.

Nos últimos anos, a aplicação da correlação *in vitro/in vivo*, tem sido um dos principais focos no desenvolvimento de produtos e otimização de processos, visando obter resultados que refletem os dados de biodisponibilidade. A correlação *in vitro–in vivo* (CIVIV) do ponto de vista biofarmacêutico é definida como um modelo matemático preditivo que descreve a relação entre as propriedades de dissolução *in vitro* de um fármaco a partir de uma formulação farmacêutica e sua biodisponibilidade (CARDOT; DAVIT, 2012; QIU et al., 2009; CARDOT; BEYSSAC; ALRIC, 2007; EMAMI, 2006; BRASIL, 2002).

Os estudos de CIVIV apresentam importantes aplicações nas áreas de farmacotécnica e biofarmácia, por permitirem a avaliação e elucidação dos mecanismos envolvidos na liberação *in vivo* do fármaco a partir de uma formulação farmacêutica e a correlação do comportamento *in vivo* com aquele observado *in vitro* (YASIR et al., 2010; MOURÃO et al., 2009; PORTA et al., 2008).

O objetivo primordial do estabelecimento da correlação *in vitro–in vivo* é a substituição da biodisponibilidade *in vivo* pelos estudos *in vitro* fundamentando as bioisenções. Pode ser empregada na etapa de desenvolvimento, reduzindo número de testes em humanos durante esta etapa, auxilia no estabelecimento de especificações da dissolução e validação do método (EMAMI, 2006).

A CIVIV aparece como uma importante estratégia para a definição de métodos *in vitro* adequados capazes de substituírem os estudos *in vivo* de biodisponibilidade/bioequivalência (CAMPOS et al., 2011; VOLPE, 2010). São estudos extremamente vantajosos, apesar das dificuldades para estabelecer uma correlação preditiva, pois podem proporcionar o desenvolvimento racional de novas formulações farmacêuticas.

Além da possibilidade de avaliar as características que a formulação é capaz de desempenhar *in vivo*, os dados de solubilidade e de permeabilidade de fármacos podem ser utilizados para justificar uma bioisenção, ou seja, substituir o estudo de bioequivalência *in vivo*, pelos dados de solubilidade e de permeabilidade determinados *in vitro*. Embora os dados da solubilidade de fármacos e as características como o tamanho das partículas (entre outras propriedades físico-químicas) estão facilmente disponíveis, dados de permeabilidade são mais restritos, o que dificulta a previsibilidade do mecanismo de absorção de medicamentos (AMIDON et al., 1995).

São definidos três níveis de CIVIV, A, B e C. O nível A de correlação é o mais alto que pode ser obtido e representa uma relação ponto a ponto entre a dissolução *in vitro* do fármaco, a partir da forma farmacêutica e a velocidade de entrada do mesmo no organismo *in vivo*. Neste nível, as curvas de dissolução *in vivo* e *in vitro* são sobreponíveis (BRASIL, 2002). Quando no desenvolvimento da correlação se essas curvas não forem sobreponíveis, algumas estratégias podem ser adotadas, como a otimização do ensaio de dissolução por meio da variação das condições experimentais (DUNNE; O'HARA; DEVANE, 1999).

A obtenção de uma correlação nível A, permite a previsão do desempenho biológico de um medicamento em situações nas quais ocorreram pequenas alterações no processo de produção, após seu registro. Neste caso, não haveria necessidade de novos estudos de biodisponibilidade em seres humanos (EMAMI, 2006).

A correlação de nível B utiliza os princípios da análise estatística de momentos, como o tempo médio de dissolução *in vitro* que é comparada ao tempo médio de residência (TMR) ou ao tempo médio de dissolução (TMD) *in vivo*. A correlação de nível C relaciona um ponto de dissolução *in vitro*, com o tempo necessário de dissolução de 50% ($t_{50\%}$) ou 90% ($t_{90\%}$) do fármaco presente na forma farmacêutica, a um parâmetro farmacocinético *in vivo*, como a área sob a curva da concentração plasmática em função do tempo (ASC), o pico de concentração máxima ($C_{\text{máx}}$) ou o tempo de atingir $C_{\text{máx}}$ ($T_{\text{máx}}$) (BRASIL, 2002).

Neste sentido, buscam-se alternativas que permitam a substituição dos ensaios *in vivo* por estudos *in vitro* através de resultados confiáveis e seguros, e que garantam a eficácia e segurança dos medicamentos. Os estudos de CIVIV são extremamente vantajosos, apesar das dificuldades de estabelecer uma correlação preditiva, pois podem proporcionar o desenvolvimento racional de novas formulações farmacêuticas.

Atualmente são encontrados na literatura diversos trabalhos que desenvolveram estudos de correlação para formas farmacêuticas (OCHOA et al., 2010, SOULIMAN et al., 2006; GHOSH et al., 2008; LI et al., 2011).

3.10 EXCIPIENTES

De grande importância para a qualidade do medicamento é a qualificação dos fornecedores seja do insumo farmacêutico ativo (API) ou dos excipientes utilizados na formulação, pois a diferença nos processos tecnológicos empregados bem como a

fonte de obtenção das matérias-primas pode ser suficiente para interferir na qualidade do produto final.

A celulose microcristalina é comumente usada como diluente e desintegrante para obtenção de comprimidos para compressão direta (STRYDOM et al., 2011).

A celulose microcristalina é obtida pela hidrólise controlada com soluções de ácidos minerais diluídos da celulose obtida como fibras de celulose a partir de materiais vegetais fibrosos. Após a hidrólise, a hidrocelulose é purificada por filtração e a suspensão aquosa é seca formando partículas porosas de uma ampla distribuição de tamanho (ADEL et al., 2011; STRYDOM et al., 2011).

Em função das diferentes fontes de obtenção e dos diferentes processos tecnológicos utilizados na sua obtenção, a celulose microcristalina apresenta diferenças em sua características física e tecnológicas.

Vehovec et al. (2012) avaliaram a influência de diferentes tipos de celulose microcristalina comercialmente disponíveis na degradação do perindopril erbumina e maleato de enalapril em misturas binárias, onde foi verificado que a estabilidade destes IFAs diferiu quando em contato com os diferentes tipos de CMCs.

Podczeck e Al-Muti (2010) avaliaram a influência de diferentes graus de celulose microcristalina e verificaram que presença de diferentes tamanhos de partícula da celulose microcristalina implicam em obtenção de comprimidos de camada dupla com características diferentes.

Laity et al. (2010) realizaram estudos para investigar estrutura intragranular de celulose microcristalina e amido pré-gelatinizado.

Mihranyan et al. (2004) estudaram e verificaram diferenças na sorção de água da celulose microcristalina com diferentes graus de cristalinidade e de porosidade.

Chambin et al. (2004) estudaram e verificaram a diferença de liberação da teofilina a partir de comprimidos obtidos utilizando diferentes derivados de celulose.

Steele et al. (2003) estudaram as características de adsorção de ativos em celulose microcristalina e celulose microcristalina silicificada de diferentes fornecedores e diferentes lotes do mesmo fabricante e verificaram diferenças em relação ao fabricante e entre lotes do mesmo fabricante, concluindo que alteração na marca de CMC utilizada numa formulação pode ter um efeito significativo sobre a adsorção observada *in vitro* e, potencialmente, afetar a biodisponibilidade do IFA.

Suzuky e Nakagami (1999) estudaram o efeito da cristalinidade da celulose microcristalina na compactabilidade e dissolução de comprimidos de paracetamol e

verificaram que o perfil de liberação do API pode ser modificado em função da alteração do grau de cristalinidade da celulose microcristalina.

Ek et al. (1995) estudaram a variação no índice de cristalinidade das partículas de celulose microcristalina quando submetidas ao processo de compactação.

Rowe et al. (1994) estudaram o efeito da variação inter lotes e da fonte de celulose microcristalina e verificaram a existência de diferenças na cristalinidade em magnitude que neutralizavam qualquer diferença no tamanho de partícula (como por exemplo entre a celulose microcristalina CMC101 e CMC102) ou da fonte.

Landin et al. (1993a) avaliaram o efeito do país de origem sobre as propriedades da celulose microcristalina onde foi verificado diferenças significativas no teor de lignina, hemicelulose, composição e teor de açúcares, presença ou ausência de celulose II, entalpia de imersão, granulometria e propriedades de fluxo da celulose microcristalina.

Landin et al. (1993b) estudaram a influência da fonte e do lote de celulose microcristalina no comportamento e estabilidade de formulações de comprimidos de prednisona e verificaram variação significativa nas propriedades mecânicas e na taxa de dissolução da prednisona com a granulometria e composição química da celulose microcristalina.

3.11 INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO

3.11.1 Sinvastatína

As estatinas representam poderoso instrumento terapêutico na prevenção e no controle das dislipidemias, reduzindo efetivamente os eventos fatais e não fatais de coronariopatia (CP), acidente vascular encefálico e mortalidade total em função da aterosclerose (CHAPMAN et al., 2010; KRYSIAK; ABUZEK; OKOPIEŃ, 2009; HAHN et al., 2008; NISSEN et al., 2005; JORGE et al., 2005; DAVIDSON; TOTH, 2004; VAUGHAN; GOTTO, 2004), sendo portanto, insumo farmacêutico ativos de primeira linha usados com esta finalidade (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

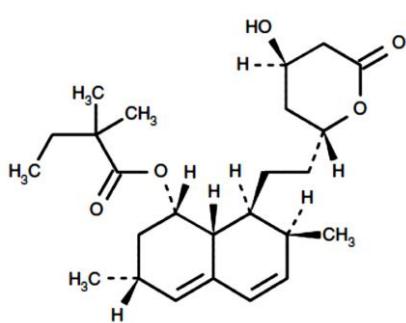
Ainda que 85% da dose de sinvastatina seja absorvida após administração oral, menos de 5% atinge a circulação devido ao extenso metabolismo de primeira passagem. O pico plasmático é atingido em 1,3 a 2,4 horas. A taxa de ligação protéica é alta (95%). Sofre biotransformação hepática, originando por hidrólise metabólitos

ativos. É excretada, principalmente, pelas fezes (60%) e parcialmente, na urina (13%). A eliminação no leite humano e os possíveis efeitos no lactente são desconhecidos, logo o seu uso é contra-indicado durante a amamentação. A meia-vida é de cerca de 3 horas (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2010; HOFER, 2002).

Existe metodologia farmacopéica para análise da matéria-prima e comprimidos da simvastatina na *United States Pharmacopoeia 34* (UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2012) e *British Pharmacopoeia 2009* (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009), a qual é descrita como sendo um pó cristalino branco ou quase branco, praticamente insolúvel em água, muito solúvel em cloreto de metileno e solúvel em álcool, com peso molecular de 418,57 e fórmula molecular C₂₅H₃₈O₅ e estrutura química mostrada na Figura 7.

Os ensaios descritos para a matéria-prima são: Identificação (infravermelho e comparação do tempo de retenção da solução amostra com a solução padrão determinada no doseamento); rotação óptica específica; perda por dessecção (secagem a vácuo); resíduo por incineração; metais pesados (método II), pureza cromatográfica (cromatografia líquida de alta eficiência com sistema de gradiente e detecção no ultravioleta); doseamento (cromatografia líquida de alta eficiência com sistema de gradiente e detecção e detecção no ultravioleta) (UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2012; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009).

Figura 7 - Estrutura química da simvastatina



Fonte: Procópio et al., 2013.

Os ensaios descritos para os comprimidos são: Identificação (comparação do tempo de retenção da solução amostra com a solução padrão determinada no doseamento); dissolução (tampão pH 7,0 com lauril sulfato de sódio e determinação por espectrofotometria no ultravioleta); uniformidade de dosagem; doseamento

(cromatografia líquida de alta eficiência com sistema isocrático e detecção no ultravioleta) (UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2012; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009).

Sinvastatina ácida apresenta pKa de 4,3 (TUBIC-GROZDANIS et al., 2008) e 4,18 (YOSHINARI et al., 2007) e a forma lactona apresenta pKa 13,5 (TUBIC-GROZDANIS et al., 2008) e 13,2 (MARTÍN et al., 2011) e no sistema de classificação biofarmacêuticas é classificado na classe II (alta permeabilidade e baixa solubilidade) (JIANG et al., 2012).

3.11.2 Fluconazol

Em virtude da carência de agentes antifúngicos seguros e eficazes no tratamento de infecções graves, iniciou-se, em 1978, um programa de pesquisa dirigido ao desenvolvimento de um agente antifúngico de amplo espectro de ação, ativo pelas vias oral e intravenosa, possibilitando sua utilização profilática em pacientes de alto risco de infecções fúngicas sistêmicas e o tratamento de infecções de pouca gravidade, mas que causam desconforto, como candidíase vaginal e dermatomicose (PEREIRA, 2007).

Os derivados imidazólicos foram escolhidos como materiais de partida por serem geralmente bem tolerados e porque oferecia à vantagem de um modo de ação seletivo, a inibição da 14- α -desmetilase, uma enzima essencial na biossíntese do ergosterol da membrana de fungos. Quando administrados por via oral, entretanto, estes compostos sofriam extenso metabolismo de primeira-passagem no fígado, o que consequentemente resultava em baixa biodisponibilidade. Além disso, a alta lipofilicidade de muitos deles levava a um alto grau de ligação às proteínas plasmáticas (freqüentemente > 99%) e, assim, à presença de baixos níveis do insumo farmacêutico ativo não-ligado no sítio da infecção (RICHARDSON et al., 1990).

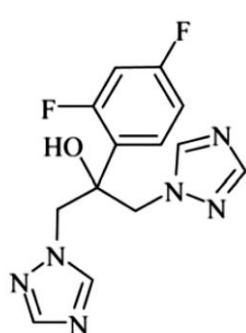
O Fluconazol (Fluc) foi sintetizado em 1985, e representa à primeira geração dos compostos azólicos, resultante da substituição do anel imidazólico por dois anéis triazólico, o que favoreceu amplo espectro de ação e seletividade para o citrocromo P-450 da célula fúngica. Exerce atividade sobre várias espécies de fungos causadores de micoses profundas e mucocutâneas, como *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* e várias espécies de cândida tendo sido utilizado com sucesso no combate a infecções fúngicas sistêmicas e das

mucosas por *Candida albicans*. Este antifúngico é atualmente um dos insumo farmacêutico ativos mais prescritos no tratamento de infecções sistêmicas causadas por fungos (YUZBASIOGLU et al, 2008).

O Fluconazol foi o mais polar da série de derivados triazóis e, devido à sua adequada solubilidade em água (8mg/mL a 37°C), pode ser prontamente formulado para uso intravenoso. Embora o FLU apresente lipofilicidade suficiente para ser consideravelmente reabsorvido (80%) no túbulo renal, sua depuração é predominantemente renal devido à sua alta estabilidade metabólica. A sua baixa taxa de depuração renal proporciona um tempo de meia-vida de 24 h, adequado para administração uma vez ao dia (AYUB et al., 2007; LIM et al., 1993). A estabilidade metabólica do fluconazol foi conseguida pela combinação de três elementos estruturais: a resistência dos anéis triazólicos ao ataque oxidativo; o bloqueio da hidroxilação aromática pela presença dos dois átomos de flúor e o impedimento estérico da hidroxila, um sítio de possível conjugação (PEREIRA, 1990).

O fluconazol é quimicamente denominado 2-(2,4-difluorofenil)-1,3-bis(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil) propano-2-ol. Apresenta-se como pó branco, cristalino e inodoro. O peso molecular para o fluconazol é 306,27. Pouco solúvel em água, facilmente solúvel em metanol, solúvel em etanol e acetona, ligeiramente solúvel em acetato de etila, clorofórmio e éter etílico, pouco solúvel em n-hexano. Solúvel em ácido clorídrico 0,1 M e hidróxido de sódio 0,1 M. Sua faixa de fusão é 138-140 °C (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009). Comporta-se como uma base fraca de pKa 3,7 (CHAPMAN et al, 2010). Apresenta molécula polar e simétrica (Figura 8) o que favorece a hidrosolubilidade. No sistema de classificação biofarmacêuticas é um insumo farmacêutico ativo de classe I (alta permeabilidade e alta solubilidade) (LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004).

Figura 8 - Estrutura química do fluconazol



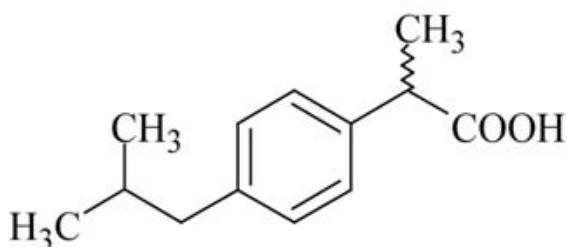
Fonte: Farmacopeia Brasileira, 2010.

3.11.3 Ibuprofeno

O ibuprofeno é um fármaco do grupo dos anti-inflamatórios não esteróides, que têm em comum a capacidade de combater a inflamação, a dor e a febre. Tal como os outros anti-inflamatórios não esteróides atuam inibindo a produção de prostaglandinas, substâncias químicas produzidas pelo corpo que causam inflamação e contribuem para a percepção de dor pelo cérebro. Ao bloquear a síntese de prostaglandinas no hipotálamo, uma estrutura do cérebro responsável pela regulação da temperatura do corpo, reduz também a febre. O ibuprofeno tem ainda propriedades anticoagulantes, diminuindo a formação de coágulos sanguíneos. O ibuprofeno conjuntamente com outros ativos farmacêuticos com o ácido acetilsalicílico e o paracetamol, entre outros, faz parte da lista de fármacos essenciais da Organização Mundial de Saúde (BUSHRA; ASLAM, 2010).

Caracteriza-se como sendo um pó cristalino, branco ou quase branco, odor característico. Praticamente insolúvel em água, facilmente solúvel em etanol, acetona, metanol e clorofórmio, ligeiramente solúvel em acetato de etila. Solúvel em soluções aquosas de hidróxidos alcalinos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Há relatos na literatura de que o seu pK_a é na faixa de 4,2 a 4,6 (ZHU et al., 2011; PITARRESIA et al., 2004; POTTHAST et al., 2006). Apresenta estrutura química conforme mostrado na Figura 9.

Figura 9 - Estrutura química do ibuprofeno



Fonte: Farmacopeia Brasileira, 2010.

Em estudo publicado por Kondal e Garg (2003) o $C_{máx}$, T_{max} , ASC_{0-t} e $t_{1/2}$ encontrados após administração de 56 mg/kg de ibuprofeno administrado via intra

gástrica, em coelhos, foi de $24,85 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, $1,18 \text{ h}$, $75,14 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1} \text{ h}$ e $1,81 \text{ h}$, respectivamente.

Após administração intravenosa de 100 mg de ibuprofeno a coelhos de 2,5-3,5 kg a A_{SC} e k_{e} foi de $(79,5 \pm 23 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e $2,53 \pm 0,81 \text{ h}$) e $(87,9 \pm 39,8 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e $2,16 \pm 1,01 \text{ h}$), para as formas R e S, respectivamente, (LIN et al., 2004). Em estudo realizado por Staziak et al. (2010), utilizando injeção intramuscular de 25 mg/kg em coelhos, encontrou $A_{\text{SC}_{0-t}}$, de $48,4 \pm 25,1 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1} \text{ h}$.

Pertence à Classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutico (SCB), apresentando baixa solubilidade aquosa e elevada permeabilidade de membrana (TSUME et al., 2012; KLEIN; SHAH, 2008; POTTHAST et al., 2006).

4 INFLUÊNCIA DA CELULOSE MICROCRISTALINA DE DIFERENTES TAMANHOS E ORIGENS NA CINÉTICA DE DISSOLUÇÃO E ESTABILIDADE DA SINVASTATINA

4.1 INTRODUÇÃO

O parque industrial brasileiro de medicamentos é bastante desenvolvido com relação à capacidade de fabricação de produtos finais. Ao mesmo tempo em que se constata esse desenvolvimento na produção, evidencia-se forte dependência da importação de farmacoquímicos (COSTA et al., 2014; OLIVEIRA; LABRA; BERMUDEZ, 2006).

A qualificação dos fornecedores é um requisito das Boas Práticas de Fabricação (BPF) definida na RDC nº 17, de 16 de abril de 2010, onde os fabricantes de medicamentos devem possuir um cadastro de fornecedores qualificados, uma vez que a aquisição das matérias-primas constitui fator decisivo na manutenção da qualidade dos produtos a serem fabricados (BRASIL, 2010).

A preocupação com a qualificação de fornecedores seja dos princípios ativos ou dos excipientes utilizados na formulação, é justificada cientificamente pelo fato que diferença nos processos tecnológicos empregados bem como a fonte de obtenção das matérias-primas pode ser suficiente para modificar as características de um excipiente como a celulose microcristalina (THOORENS et al. 2014) e interferir na qualidade do produto final, seja *in vitro* ou *in vivo* onde os mecanismos envolvidos nem sempre são conhecidos (FATHIMA et al. 2011), como por exemplo:

Vehovec et al. (2012) avaliaram a influência de diferentes tipos de celulose microcristalina comercialmente disponíveis na degradação do perindopril erbumina e maleato de enalapril em misturas binárias, onde foi verificado que a estabilidade destes IFAs diferiu quando em contato com as diferentes tipos de CMCs.

Steele et al. (2003) estudaram as características de adsorção de ativos em celulose microcristalina e celulose microcristalina silificada de diferentes fornecedores e diferentes lotes do mesmo fabricante e verificaram diferenças em relação ao fabricante e entre lotes do mesmo fabricante, concluindo que alteração na marca de CMC utilizada numa formulação pode ter um efeito significativo sobre a adsorção observada *in vitro* e, potencialmente, afetar a biodisponibilidade do IFA.

A padronização da qualidade das matérias-primas utilizadas no processo de fabricação de medicamentos colabora para evitar possíveis problemas decorrentes das variações físicas presentes nos insumos que possibilitem influenciar no desempenho da formulação final, o que poderia favorecer mudanças físico-químicas no formulado gerando prejuízo à estabilidade e/ou na biodisponibilidade do IFA (DIAS et al., 2015; AMORIM; KLER; ANGELIS, 2013).

A implementação da análise térmica na indústria farmacêutica mostra-se como um conjunto de técnicas analíticas, quantitativas e comparativas, capaz de produzir resultados rápidos e reproduutíveis, podendo ser utilizada no controle de qualidade, seja de substâncias isoladas ou associadas (MACÊDO; NASCIMENTO, 2002), sendo variadas as possibilidades de uso como por exemplo: estudo de caracterização e decomposição térmica de IFAs (BÖER et al., 2013.; PROCOPIO et al. 2011; MOURA et al., 2009; SILVA et al., 2009), compatibilidade e desenvolvimento de formas farmacêuticas (SANTOS, 2013.; FREITAS et al., 2012.; SOARES et al., 2011.; SOARES-SOBRINHO et al., 2010; MEDEIROS et al., 2007a; MEDEIROS et al., 2007b). Quando associado a outras técnicas tais como microscopia, difração de raios-X (DRX), pirólise acoplada a cromatografia gasosa e estudos de dissolução, entre outras, fornece resultados conclusivos da qualidade física da amostra.

No que se refere a liberação do ativo no meio, seja isolado ou associado a excipientes, os ensaios de dissolução *in vitro* constituem importante meio de caracterização da qualidade biofarmacêutica de uma forma farmacêutica sólida oral, possibilitando o controle da qualidade farmacêutica em todas as fases de seu ciclo de “vida” e o estabelecimento de correlações com os dados obtidos *in vivo*. Existe necessidade real de desenvolver ensaios de dissolução que possam prever de forma mais eficaz o comportamento *in vivo* das formas farmacêuticas, devendo levar não só à redução dos custos e trabalho necessários ao desenvolvimento de uma forma farmacêutica, mas também ao número e tamanho dos estudos clínicos requeridos e a controle de qualidade mais confiável (CRISTOFOLLETTI et al., 2013; LIMA et al., 2009; SOUZA; FREITAS; STORPIRTS, 2007).

Levando em consideração a possibilidade de influencia dos excipientes nas características finais da formulação, esse trabalho objetivou avaliar a influência de lotes de celulose microcristalina de diferentes origens na cinética de liberação e estabilidade da simvastatina na forma farmacêutica comprimido.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Reagentes, matérias-primas e formulações farmacêuticas

Foram utilizados três diferentes lotes do insumo farmacêutico ativo simvastatina (Sinv-A, Sinv-B e Sinv-C), padrão analítico de simvastatina, lotes de celulose microcristalina de diferentes tamanhos de partícula e origem do fabricante (CMC101A e CMC102A, CMC101B e CMC102B) e doze diferentes lotes de uma formulação de comprimidos de liberação imediata contendo 20 mg da simvastatina. Cada lote foi produzido com os mesmos componentes (simvastatina, celulose microcristalina, dióxido de silício coloidal e estearato de magnésio), variando o lote de simvastatina (A, B e C) e os tipos de celulose microcristalina utilizada (CMC101A, CMC102A, CMC101B e CMC102B). Os doze lotes dos comprimidos foram assim nomeados: SinvA-CMC101A, SinvA-CMC101B, SinvA-CMC102A, SinvA-CMC102B, SinvB-CMC101A, SinvB-CMC101B, SinvB-CMC102A, SinvB-CMC102B, SinvC-CMC101A, SinvC-CMC101B, SinvC-CMC102A, SinvC-CMC102B. Como base para os estudos de dissolução foi utilizado, também, um lote do medicamento referência da simvastatina de 20 mg definido pela ANVISA. A mistura dos componentes foi feita via seca em misturador em V e a compressão em uma máquina compressor rotativa. Os comprimidos foram acondicionados em embalagem impermeável. O solvente acetonitrila grau HPLC foi obtido no comércio local (Tedia®, Brasil). Água ultra-pura foi obtida utilizando um sistema de osmose reversa (Gehaka®, Brasil). Todos os outros reagentes químicos utilizados neste estudo foram de grau analítico.

4.2.2 Estudos termoanalíticos

4.2.2.1 *Calorimetria exploratória diferencial*

As curvas calorimétricas foram obtidas em um calorímetro de varredura diferencial (Shimadzu, modelo DSC-50) utilizando como porta amostra um porta amostra fechado de alumínio. O equipamento foi calibrado utilizando índio ($156,6 \pm 0,3$ °C) como padrão. O sinal de fluxo de calor foi calibrado pelo calor de fusão do índio ($28,59 \pm 0,3$ J/g). Os experimentos foram conduzidos com elevação da temperatura no intervalo de 25-250 °C na razão de 10 °C/min para a simvastatina, em

fluxo de nitrogênio de 50 mL/min. A massa da amostra foi de $2,0 \pm 0,1$ mg. Os dados DSC foram analisados utilizando o Software Tasys® da Shimadzu.

4.2.2.2 DSC acoplado a Sistema fotovisual (DSC-fotovisual)

Os dados DSC-Fotovisual foram obtidos em um calorímetro diferencial de varredura (Shimadzu, modelo DSC-50) acoplado a um sistema fotovisual, equipado com um microscópio (Olympus, modelo SZ-CTV60) e uma câmera (Sony, modelo VCC-520). As amostras foram colocadas em um porta amostra aberto de alumínio e aquecidas no intervalo de temperatura de 25-300 °C com taxa de aquecimento de 10 °C/min, nas mesmas condições de fluxo de nitrogênio do DSC convencional. As fotos foram capturadas com o Software Asymetrix DVP 4,0 em tempo real para observar as transições de fase nas amostras.

4.2.2.3 Termogravimetria (TG)

As curvas termogravimétricas dinâmicas para a celulose microcristalina foram obtidas em uma termobalança (Shimadzu, modelo TGA-50) utilizando porta amostra de alumina aberto. O aparelho foi calibrado com oxalato de cálcio monohidratado. Os experimentos foram conduzidos no intervalo de temperatura de 25-900 °C na razão de aquecimento de 10 °C/min em ar sintético e nitrogênio com fluxo de 20 e 50 mL/min, respectivamente. Para os comprimidos foram utilizadas as razões de 10, 20 e 40 C/min. A massa da amostra foi de $5,2 \pm 0,1$ mg. Os dados obtidos a partir dos comprimidos foram utilizados para determinação da energia de ativação (Ea) utilizando o modelo de Ozawa para os dados de TG dinâmica em atmosfera de ar sintético e nitrogênio. Os dados termogravimétricos foram analisados utilizando o Software Tasys® da Shimadzu.

4.2.3 Difração de raio-X (DRX)

A análise de difração de raios-X (DRX) dos pós da simvastatina e da celulose microcristalina foram obtidas em equipamento da Shimadzu (Modelo XRD 6000) utilizando 40 kV e 30 mA. As intensidades de difração foram medidas entre ângulos Bragg (2θ) de 5 a 70°. O índice de cristalinidade para a celulose microcristalina e

sinvastatina foi calculado utilizando a equação de Segal, Equação 4, através das medidas na intensidade máxima e no fundo amorfó (SINGH; PHILIPA; PATHAK, 2012; MEDINA; KUMAR, 2007).

$$\text{Índice de cristalinidade (\%)} = \left(\frac{I_{05} - I_{am}}{I_{05}} \right) * 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde: I_{05} e I_{am} indicam a intensidade máxima e mínima do pico correspondente a aproximadamente 22 e 18° para a celulose microcristalina, 17 e 8° para a sinvastatina.

4.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise das amostras realizada por microscopia eletrônica de varredura foi efetuada em equipamento Hitachi de bancada (Modelo TM-1000), com tensão de aceleração a 15000 V, corrente de emissão a 88,0 mA, distância de observação a 5750 µm e aumentos de 100, 200, 500 e 1000 x.

4.2.5 Quantificação do insumo farmacêutico ativo

O doseamento das amostras de sinvastatina foi feito por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando um sistema cromatográfico Shimadzu (Série Prominence) equipado com um sistema de bomba multisolvante (LC-20AT), sistema de injeção automático (SIL-20A), um sistema de degaseificação (DGU-20A₅), um forno para coluna (CTO-20A) e um detector UV-VIS com arranjo de diodos (SPD-M20A). A coluna utilizada foi uma Shimpack C18 (250 mm x 4,6 mm ID, com partículas de 5 µm). Foi utilizada também uma pré-coluna SecurityGuard Gemini C18 (4 mm x 3,0 mm ID) adquirida da Maxcrom Instrumentos Científicos Ltda (São Paulo, SP, BR). A temperatura do forno foi mantida a 45 °C e a fase móvel consistiu de mistura acetonitrila:tampão fosfato de sódio monobásico (65/35, V/V). A solução tampão foi preparada dissolvendo 3,9 g de fosfato de sódio monobásico em 1000 mL de água e o pH ajustado para 4,5 com hidróxido de sódio 50% (p/V) ou ácido fosfórico 85% (V/V). O volume de injeção foi de 10 µL, a velocidade de fluxo da fase móvel foi mantida constante a 1,5 mL/min e a detecção efetuada por espectrofotometria eletrônica no ultravioleta em comprimento de onda de 245 nm. As amostras foram preparadas na

concentração de 0,1 mg/mL. O software LC Solution® (Shimadzu, Japão) foi usado para controlar o equipamento na aquisição e análise dos dados.

4.2.6 Perfis de dissolução

4.2.6.1 Perfil de dissolução intrínseca

Para a determinação da velocidade de dissolução intrínseca foi utilizado um sistema de disco rotativo Wood da Vankel Industries, Inc. (Cary, NC). As matérias-primas foram colocadas, separadamente, na cavidade da matriz com diâmetro de 0,8 cm. A massa utilizada foi de 150 mg, a qual foi comprimida em uma prensa hidráulica utilizando a força de compressão de 10 kN por 2 minutos. O meio de dissolução utilizado para a simvastatina foi o meio descrito na USP35-NF30 (UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2012) para dissolução de comprimidos, o qual consiste de tampão fosfato de sódio monobásico 0,01 M com pH ajustado para 7,0 e contendo 0,5 % (m:V) de dodecil sulfato de sódio. O meio foi deaerado e mantido a temperatura de $37,0 \pm 0,5$ °C, a velocidade de rotação foi de 50 rpm, e o volume de meio utilizado foi de 900 mL. Cada alíquota de 5 mL retirada do meio foi filtrada utilizando filtros de 0,22 µm nos tempos de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos. A análise das amostras foi realizada em espectrofotômetro UV-Visível (Shimadzu, UVmini 1240) com leituras em 247 e 257 nm, sendo feita a diferença entre as leituras de absorbância entre os dois comprimentos A concentração do padrão analítico foi de 0,022 mg/mL e a leitura das amostras feita sem diluição.

A velocidade de dissolução intrínseca foi calculada utilizando a Equação 5 (YU et al., 2004).

$$j = \left[\left(\frac{V * \Delta C}{\Delta t} \right) * \left(\frac{1}{A} \right) \right] \quad \text{Equação 5}$$

Onde: j é a velocidade ou taxa de dissolução intrínseca (mg/cm²/min), V o volume do meio de dissolução (mL), A a área superficial do disco (cm²) e $\Delta C/\Delta t$ a velocidade de dissolução através do tempo (mg/mL/min).

4.2.6.2 Perfil de dissolução dos comprimidos

Para o estudo de dissolução da forma farmacêutica foram utilizados 12 comprimidos de cada um dos lotes. Foi usado um aparelho de dissolução da marca Nova Ética, equipado com seis cubas (Modelo 299). O meio de dissolução, volume do meio, volume de coleta, rotação, temperatura, concentração do padrão e comprimentos de onda da leitura foram os mesmos da dissolução intrínseca. Foi utilizado o aparato 2 (pá) e coletas foram realizadas nos tempos: 5, 10, 15, 20, 30 e 45 minutos, para obter o perfil de dissolução.

Os dados dos perfis de dissolução foram avaliados estatisticamente através de modelos dependente e independente. Para definição do modelo que representasse a liberação, foram aplicados diferentes modelos matemáticos (Tabela 1). O modelo que melhor descreveu o mecanismo de liberação da simvastatina dos comprimidos foi selecionado após a construção das curvas dos modelos citados e análise da regressão linear (COSTA; LOBO, 2001).

Tabela 1 - Modelos matemáticos utilizados na avaliação do perfil de dissolução dos comprimidos de simvastatina.

Modelo	Equação	Descrição
Zero ordem	$Q_t = Q_0 + k_0 t$	Q_t e Q_0 são as quantidades em % do insumo farmacêutico ativo nos tempos zero e t, respectivamente;
Primeira ordem	$\ln Q_t = \ln Q_0 + k_1 t$	k_0, k_1, k_H, k_s e k_E são as constantes de liberação conforme ordem zero, primeira, Higuchi, Hixson-Crowell e El-Yazigi ¹ , respectivamente.
Higuchi	$Q_t = k_H \sqrt{t}$	
Hixson-Crowell	$\sqrt[3]{Q_0} - \sqrt[3]{Q_t} = k_s t$	
El-Yazigi ¹	$100 - Q_t = 100 e^{-k_E t}$	

¹Forma simplificada do método proposto por El-Yazigi (1981), considerando que a desintegração ocorreu de forma muito rápida de modo que podemos desconsiderar a constante de desintegração.

Foi utilizado modelo independente através do fator de diferença (f_1) e de semelhança (f_2), calculados conforme as Equações 6 e 7, respectivamente, para comparação dos perfis de dissolução dos comprimidos.

$$f_1 = \left[\left(\sum_{i=1}^n |R_f - T_t| \right) / \left(\sum_{i=1}^n R_f \right) \right] * 100 \quad \text{Equação 6}$$

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) * \sum_{i=1}^n (R_f - T_t)^2 \right]^{-0.5} * 100 \right\} \quad \text{Equação 7}$$

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Caracterização do insumo farmacêutico ativo

A Figura 10(A-C) mostra a análise dos lotes Sinv-A, Sinv-B e Sinv-C utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foi observado diferenças entre as amostras Sinv-A e Sinv-B, que apresentaram aglomerados de partículas, em relação a amostra Sinv-C onde as partículas apresentam-se individualizadas.

A Figura 10(D) mostra difratogramas obtidos para as diferentes amostras. O percentual de cristalinidade não diferiu estatisticamente entre as amostras, no nível de confiança de 95%, pois o valor-p (0,06) obtido foi maior que o nível de significância considerado ($\alpha=0,05$). Os valores obtidos para Sinv-A, Sinv-B e Sinv-C foram de $96,09 \pm 0,13$, $96,02 \pm 0,2$ e $95,74 \pm 0,07\%$, respectivamente.

A análise das curvas calorimétricas das amostras Sinv-A, Sinv-B e Sinv-C na razão de aquecimento de $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ mostradas na Figura 10(E), revelou a existência de transição endotérmica no intervalo $130\text{-}142\text{ }^{\circ}\text{C}$ referente ao processo de fusão. Os valores para pico de fusão, energia de ativação e pureza determinados por DSC, e o doseamento determinado por CLAE-UV, são visualizados na Tabela 2.

A análise dos diferentes lotes em relação aos perfis de dissolução intrínseca demonstrou liberação linear em função do tempo, com coeficientes de correlação linear maior ou igual a 0,99. Os valores obtidos para os diferentes lotes foram: Sinv-A (0,99), Sinv-B (0,99) e Sinv-C (1,00). Quando comparados entre eles foi verificado diferença estatisticamente significativa com valor-p ($0,00 < 0,05$), sendo a Sinv-C diferente da Sinv-A e Sinv-B em relação a velocidade de dissolução intrínseca. Os valores médios calculados para os três diferentes lotes, entre os tempos de 20 e 50 minutos, em $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$ foram Sinv-A($11,94 \pm 0,61$), Sinv-B ($12,86 \pm 0,23$) e Sinv-C ($9,19 \pm 0,23$). Na Figura 10(F) são mostradas as curvas médias dos perfis de dissolução intrínseca dos diferentes lotes.

Na Figura 11 são mostradas fotos obtidas no DSC-Fotovisual, onde é possível confirmar que o pico endotérmico visualizado na faixa de $130\text{-}142\text{ }^{\circ}\text{C}$ corresponde a fusão do insumo farmacêutico ativo.

Figura 10 - Micrografias MEV (A, B e C), difratogramas (D), curvas calorimétricas (E) e curvas de dissolução intrínseca (F) dos diferentes lotes de simvastatina

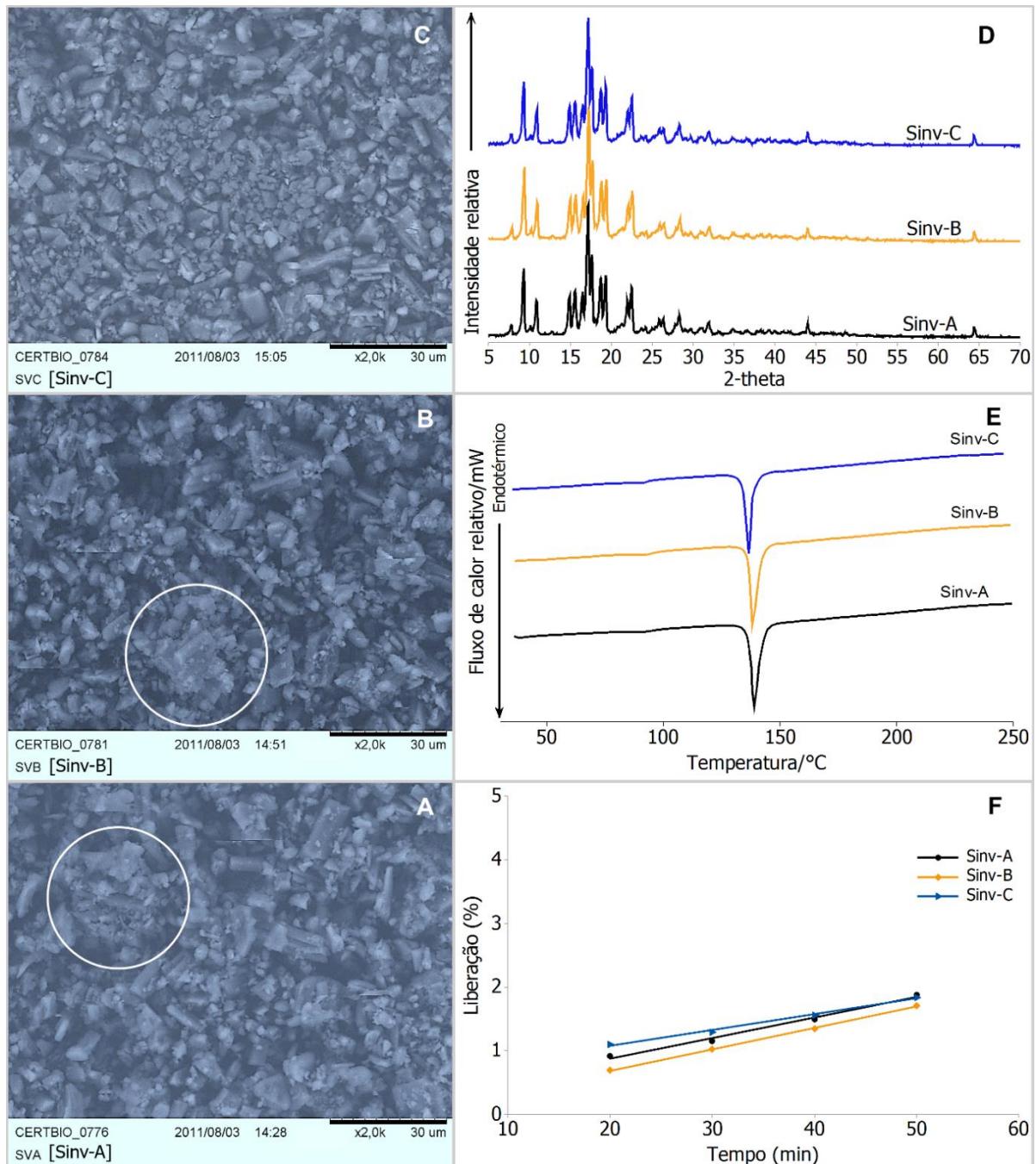


Tabela 2 - Parâmetros determinados por calorimetria exploratória diferencial e CLAE-UV para três diferentes lotes de simvastatina (média ± DP)

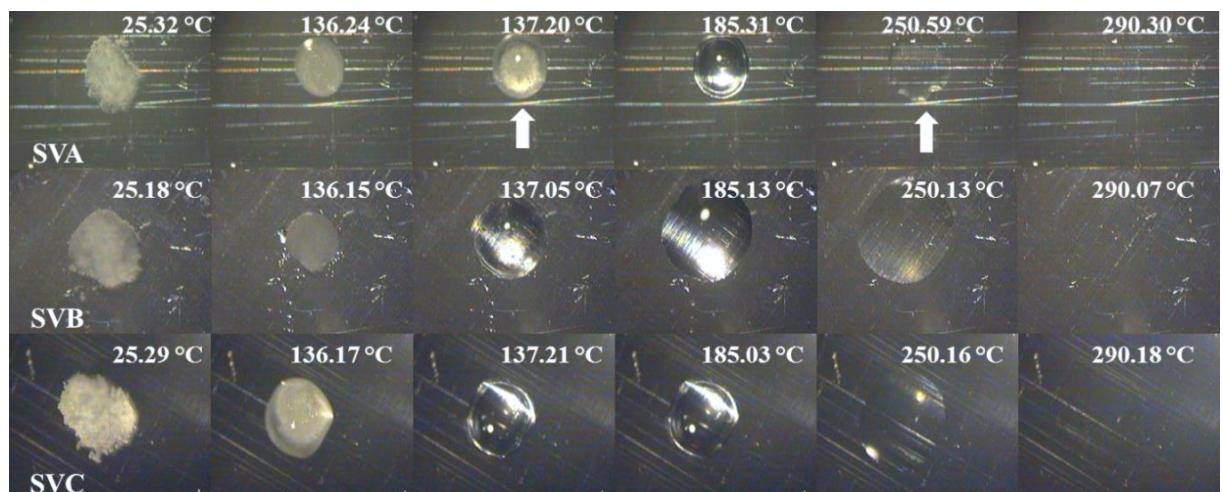
Amostra	Parâmetro			
	Pico de fusão (°C)	Energia de ativação (J/g)	Pureza	Doseamento %
Sinv-A	138,02 ¹ ± 0,07	76,09 ¹ ± 4,53	98,28 ¹ ± 0,24	99,98 ¹ ± 0,53
Sinv-B	137,87 ² ± 0,11	65,07 ² ± 2,51	98,58 ^{1,2} ± 0,20	100,20 ¹ ± 0,65
Sinv-C	137,76 ² ± 0,05	62,65 ² ± 3,55	98,77 ² ± 0,06	99,79 ¹ ± 0,58
valor-p	0,00	0,00	0,04	0,34

São considerados estatisticamente significativos valores para $p \leq 0,05$; Valores com índices diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa.

Foi visualizado também o comportamento diferente das amostras de simvastatina. A amostra Sinv-A apresentou um processo de fusão mais lento do que Sinv-B e Sinv-C na temperatura de aproximadamente 137 °C, o que pode ser correlacionado com os dados do DSC convencional onde foi verificado que o lote Sinv-A apresenta maior valor-para o pico e energia de fusão ($76,09 \pm 4,53$ e $138,02 \pm 0,07$, respectivamente), e menor valor de pureza ($98,28 \pm 0,24$) Tabela 2. O processo de decomposição da amostra Sinv-A na temperatura de 250 °C foi mais rápido do que Sinv-B e Sinv-C. O comportamento térmico diferente, demonstra que diferentes lotes de simvastatina matéria-prima farmacêutica podem apresentar diferentes qualidades físicas e consequentemente influenciar características tais como solubilidade e/ou estabilidade. O lote Sinv-A apresenta comportamento térmico, nos processos de fusão e decomposição, diferente dos lotes Sinv-B e Sinv-C.

Em relação ao doseamento não foi detectada diferença estatisticamente significativa ($valor-p > 0,05$), com nível de confiança de 95%.

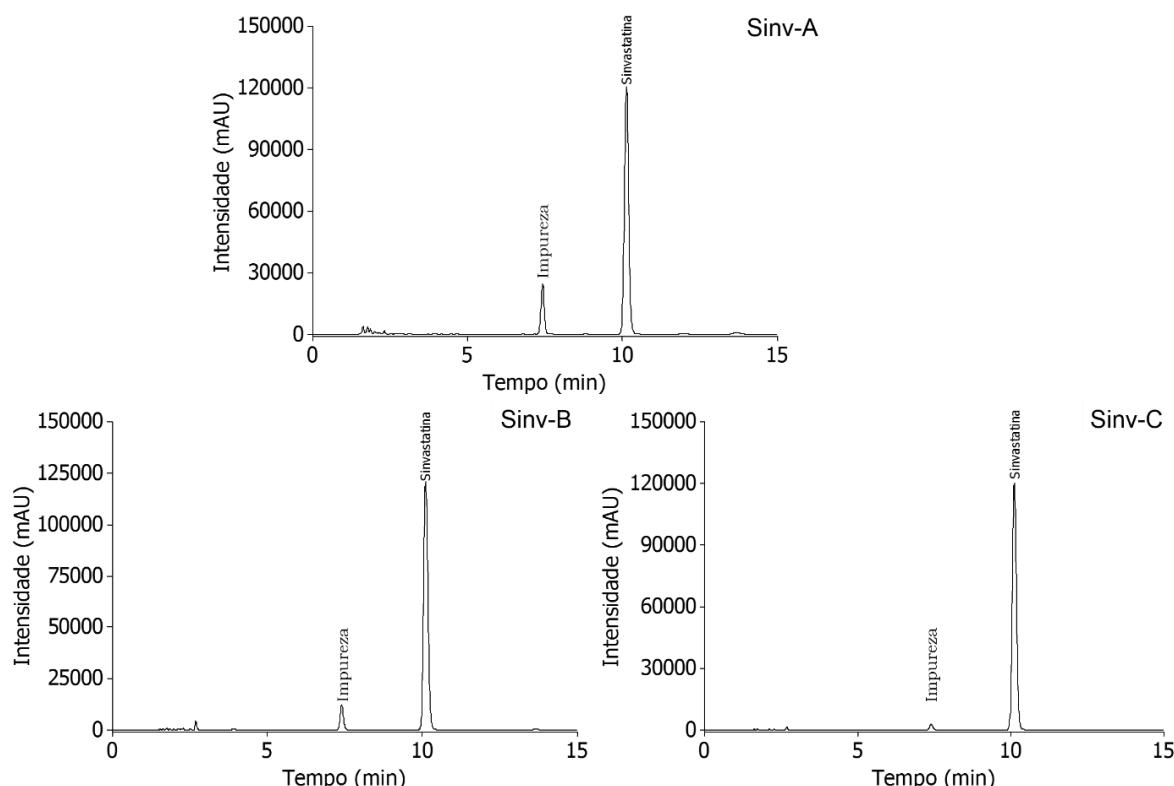
Figura 11 - DSC-Fotovisual das amostras Sinv-A, Sinv-B e Sinv-C na razão de aquecimento de 5 °C/min.



Na Figura 12, são mostrados cromatogramas das amostras onde é possível comprovar que o lote Sinv-A, apresenta picos de impureza e/ou produtos de degradação maiores que os lotes Sinv-B e Sinv-C. Estes dados estão de acordo com estudo realizado por Procópio et al. (2011), onde foi demonstrado diferença entre os lotes através da extração da cinética de degradação de Arrhenius, determinada por termogravimetria isotérmica, visto que para degradação de 2% da massa a temperatura ambiente, o lote Sinv-A (2,96 anos) apresentou menor tempo de

degradação que o lote Sinv-C (3,38 anos), podendo a influência na degradação está relacionada as impurezas presentes. Estes dados de degradação, determinados por termogravimetria isotérmica, condizem com o prazo de validade do insumo farmacêutico ativo definido pelo fabricante que é de 3 anos.

Figura 12 - Cromatogramas das amostras de simvastatina no doseamento: Sinv-A, Sinv-B e Sinv-C

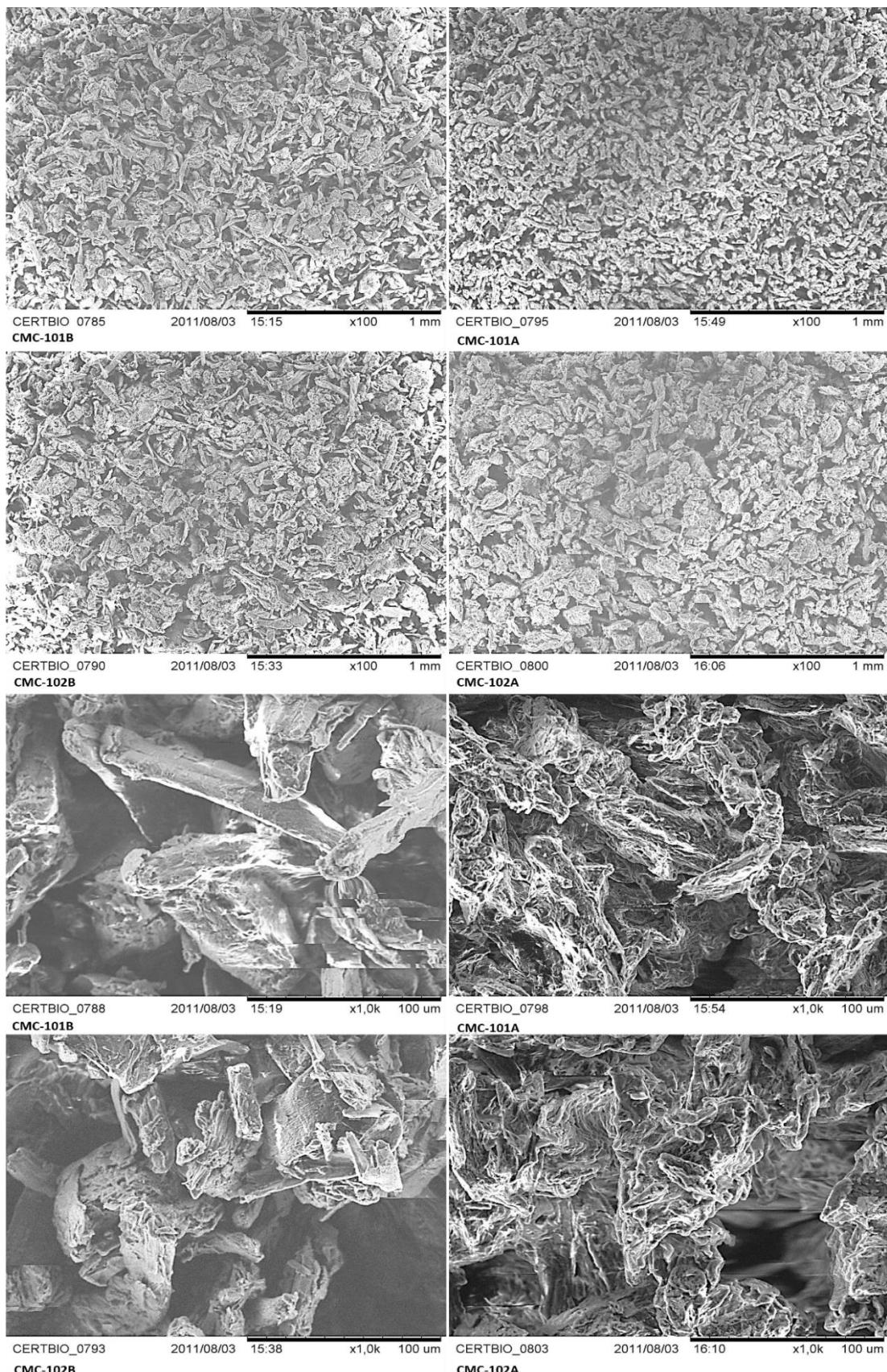


Os dados demonstram que há diferenças nas características físicas, cromatográficas, no comportamento térmico e na velocidade de dissolução intrínseca dos três lotes ($Sinv-A \neq Sinv-B \neq Sinv-C$).

4.3.2 Caracterização da celulose microcristalina

A Figura 13 mostra a análise dos quatro diferentes lotes de celulose microcristalina, CMC101 (CMC101A e CMC101B) e CMC102 (CMC102A e CMC102B), utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foi evidenciado diferenças entre as amostras em relação a uniformidade de tamanho bem como em relação as características de superfície. A amostra CMC101A apresenta maior uniformidade.

Figura 13 - Micrografias obtidas por microscopia electronica de varredura de quatro diferentes lotes de celulose microcristalina: CMC101 (CMC101A e CMC101B) e CMC102 (CMC102A e CMC102B)



Quando comparadas as amostras CMC101 e CMC102 do mesmo fabricante (CMC101A com CMC102A e CMC101B com CMC102B) foi observado que apenas as amostras do fabricante A apresentam nítida diferença de tamanho e distribuição entre as amostras. Em relação as características superficiais foi evidenciado que as amostras do fabricante B apresentam-se mais contínuas e compactas que para o fabricante A.

Os resultados anteriores são reforçados pela análise das curvas termogravimétricas visualizadas na Figura 14(A) e Figura 14(B) para as amostras CMC101 e CMC102, respectivamente.

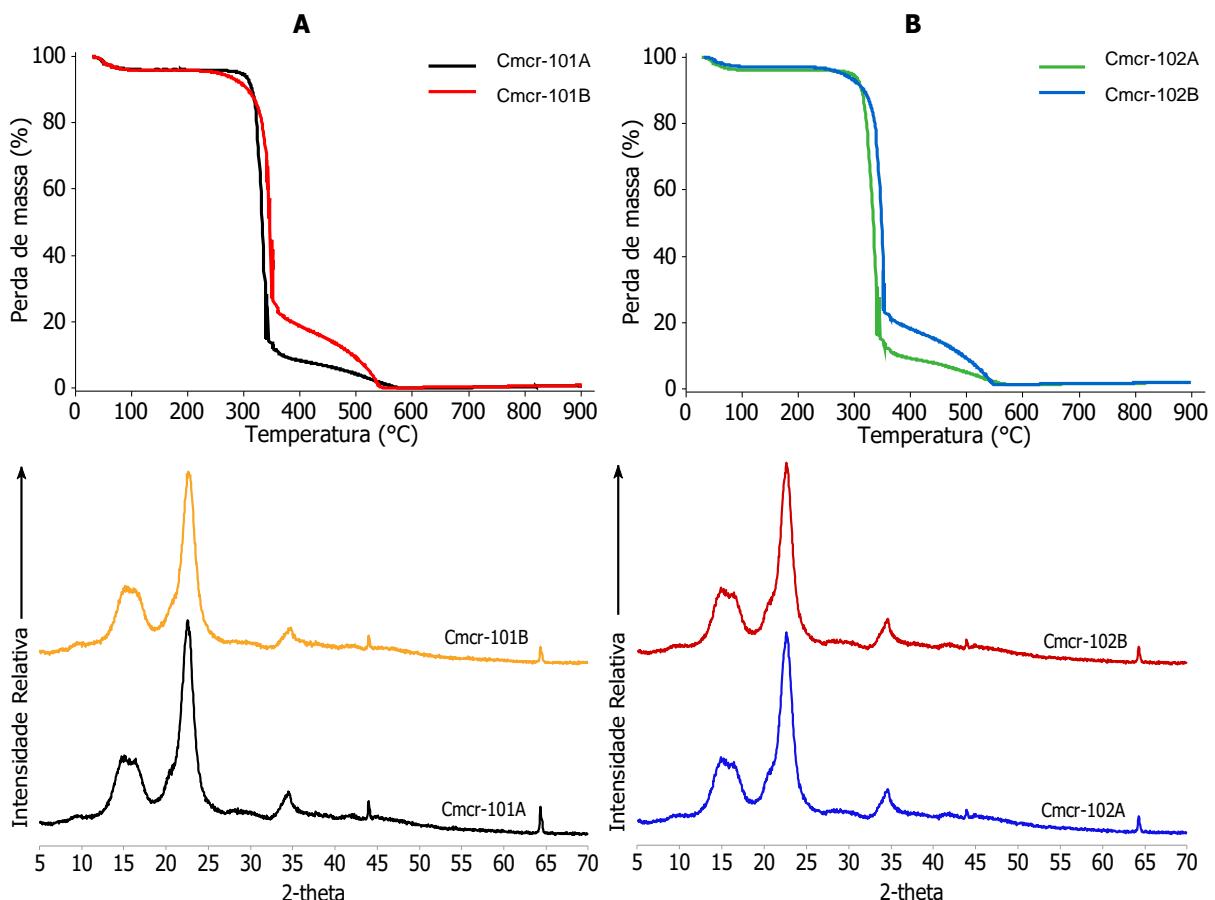
As amostras do fabricante B, que apresentam maior dispersão de tamanho de partícula, iniciam a perda de massa em temperatura inferior a das amostras do fabricante A (204,44; 229,49; 217,26 e 219,09 °C para CMC101B, CMC101A, CMC102B e CMC102A, respectivamente) em função das partículas de menor tamanho e com área superficial maior, porém as partículas maiores e mais compactas do fabricante B necessitariam de maior energia promovendo um desvio da curva para temperatura maior (359,78 °C; 346,19; 355,54 e 347,46 °C para CMC101B, CMC101A, CMC102B e CMC102A, respectivamente) e menor perda de massa na segunda etapa de degradação com valores em percentual de: 81,97 (CMC101A); 71,70 (CMC101B); 81,05 (CMC102A) e 74,21 (CMC102B).

Esse comportamento é mais evidente para as amostras CMC101 que na microscopia eletrônica de varredura apresentaram visualmente características de tamanho mais divergentes que as amostras CMC102.

A Figura 14(C) mostra os difratogramas dos quatro diferentes lotes de celulose microcristalina. A análise por DRX do pó não evidenciou diferenças cristalográficas entre as diferentes amostras.

Utilizando o método de Segal et al. (1959), os valores obtidos para o grau de cristalinidade foram os seguintes: CMC101A ($81,33 \pm 0,06\%$), CMC101B ($77,95 \pm 0,28\%$), CMC102A ($79,68 \pm 0,62\%$) e CMC102B ($80,78 \pm 0,78\%$). Estes valores de cristalinidade, avaliados estatisticamente através do teste *t* para comparar as CMC e CMC102 dos diferentes fabricantes demonstraram que existe diferença entre a CMC101A e CMC101B (valor-*p* = 0,001) e não existe entre a CMC102A e CMC102B (valor-*p* = 0,925). Estes valores reforçam as observações da microscopia eletrônica de varredura e termogravimétrica que evidenciaram maior semelhança entre as celuloses CMC102 que entre as CMC101 dos diferentes fabricantes.

Figura 14 - Curvas termogravimétricas (A e B) e difratogramas (C e D) de quatro diferentes lotes de celulose microcristalina: CMC101 (CMC101A e CMC101B) e CMC102 (CMC102A e CMC102B)



4.3.3 Caracterização da forma farmacêutica

Na Tabela 3 são visualizados os resultados obtidos para o peso médio, dureza, friabilidade, desintegração, doseamento, uniformidade de dose unitária e dissolução para os diferentes lotes dos comprimidos logo após a produção. Os resultados mostraram conformidade para todos os parâmetros.

O comportamento das celuloses isoladas manteve-se em relação aos parâmetros físico-químicos dos comprimidos formulados com as mesmas e analisados através da termogravimetria dinâmica. A relação entre as energias de ativação, sempre mostra maior diferença entre os lotes produzidos com CMC101 que entre os produzidos com a CMC102, a exemplo do que foi visualizado para as celuloses isoladas através da microscopia eletrônica de varredura, termogravimetria dinâmica e difração de Raios-X (item 4.3.2).

Tabela 3 - Avaliação do peso médio, dureza, friabilidade, desintegração e uniformidade de dose dos diferentes lotes de comprimidos

Lote	Ensaios realizados e critério de aceitação						
	Peso médio (mg \pm %) 160 \pm 7,50	Dureza (kgf) \geq 3,0	Friabilidade (%) \leq 1,5	Desintegração (min) \leq 30	Doseamento (%) 90-110	UDU (VA) \leq 15	Dissolução (%) \geq 75
Sinv-A_CMC101A	156,75 (\pm 3,16)	5,46	0,04	0,37	98,10	7,07	100,17
Sinv-A_CMC101B	156,85 (\pm 2,36)	4,69	0,03	0,42	95,14	10,17	99,97
Sinv-A_CMC102A	164,60 (\pm 2,31)	7,11	0,02	0,38	100,51	7,64	101,97
Sinv-A_CMC102B	164,70 (\pm 1,71)	6,04	0,30	0,35	102,64	8,87	95,26
<hr/>							
Sinv-B_CMC101A	160,62 (\pm 1,50)	7,28	0,03	0,33	101,61	9,57	96,28
Sinv-B_CMC101B	165,07 (\pm 1,98)	6,88	0,04	0,38	101,36	4,50	94,07
Sinv-B_CMC102A	162,14 (\pm 1,44)	6,86	0,02	0,33	97,41	9,04	99,10
Sinv-B_CMC102B	165,03 (\pm 0,86)	6,4	0,04	0,37	104,70	4,08	97,75
<hr/>							
Sinv-C_CMC101A	162,40 (\pm 1,56)	7,5	0,25	0,38	99,37	7,82	95,68
Sinv-C_CMC101B	158,40 (\pm 1,74)	5,29	0,06	0,42	98,21	13,53	99,22
Sinv-C_CMC102A	162,80 (\pm 2,74)	7,21	0,06	0,33	102,57	8,27	98,78
Sinv-C_CMC102B	162,25 (\pm 3,35)	5,86	0,04	0,42	98,61	5,25	95,87

As relações encontradas foram Sinv-A_CMC101A/Sinv-A_CMC101B (1,24), Sinv-A_CMC102A/Sinv-A_CMC102B (0,06), Sinv-B_CMC101A/Sinv-B_CMC101B (1,48), Sinv-A_CMC102A/Sinv-A_CMC102B (0,41), Sinv-C_CMC101A/Sinv-C_CMC101B (0,21) e Sinv-C_CMC102A/Sinv-C_CMC102B (0,04).

Para avaliar a similaridade e o mecanismo de liberação do insumo farmacêutico ativo, foram aplicados modelos dependente e independente para avaliação de perfis de dissolução dos diferentes lotes conforme mostrado na Tabela 4.

Através do método modelo independente foi evidenciado não haver diferença significativa entre os perfis de dissolução dos lotes produzidos utilizando a celulose microcristalina CMC101 e o medicamento referência ($f_1 < 15$ e o $f_2 > 50$ para todos eles). Quanto aos lotes produzidos com a celulose CMC102, foi verificado que os comprimidos produzidos com celulose do fabricante A tendem a ter uma dissolução mais rápida que o comprimido referência sendo os valores do $f_2 < 50$ para os lotes Sinv-A_CMC102A ($f_2 = 38,35$) e Sinv-C_CMC102A ($f_2 = 42,27$) e o lote Sinv-B_CMC102A mesmo apresentando $f_2 > 50$ apresenta-o muito próximo do limite de similaridade ($f_2 = 50,54$).

Os lotes CMC101 comparados entre eles, quanto aos perfis de dissolução, não diferiram uns dos outros ($f_1 < 15$ e o $f_2 > 50$). Quanto aos CMC102, foi verificado diferença entre eles Sinv-A_CMC102A≠Sinv-A_CMC102B ($f_2 = 49,24$), Sinv-B_CMC102A≠Sinv-B_CMC102B (49,61) e Sinv-C_CMC102A≠Sinv-C_CMC102B ($f_2 = 49,04$).

Quando avaliados através dos diferentes modelos dependente, foi verificado que para todos os lotes, incluindo o referência, o modelo que mais se adequa para explicar o mecanismo de liberação foi o de El-Yazigi para os quais foram obtidos $r^2 \geq 0,99$. Foi verificado regressão estatisticamente significativa para todos eles, valor-p $\leq 0,05$ (nível de confiança de 95%).

Através do modelo matemático de El-Yazigi foi definida, graficamente, a equação $y = -0,0890x + 4,5834$, que representa o logarítmico natural do percentual remanescente do insumo farmacêutico ativo versus o tempo para o medicamento referência. Utilizando a equação $x = 100 - \text{Exp}^{(-0,089*t\text{tempo} + 4,5834)}$ foi definida a cada tempo qual seria o percentual teórico liberado pelo comprimido referência. Foram também definidas curvas teóricas de liberação correspondentes a 80% e 120%. Os dados experimentais dos diferentes lotes foram plotados no gráfico frente a curva

teórica do referência, onde é possível visualizar que para os pontos acima de 15 minutos todos os lotes CMC101 e CMC102B ficaram dentro da variação de $\pm 10\%$ (Figura 15).

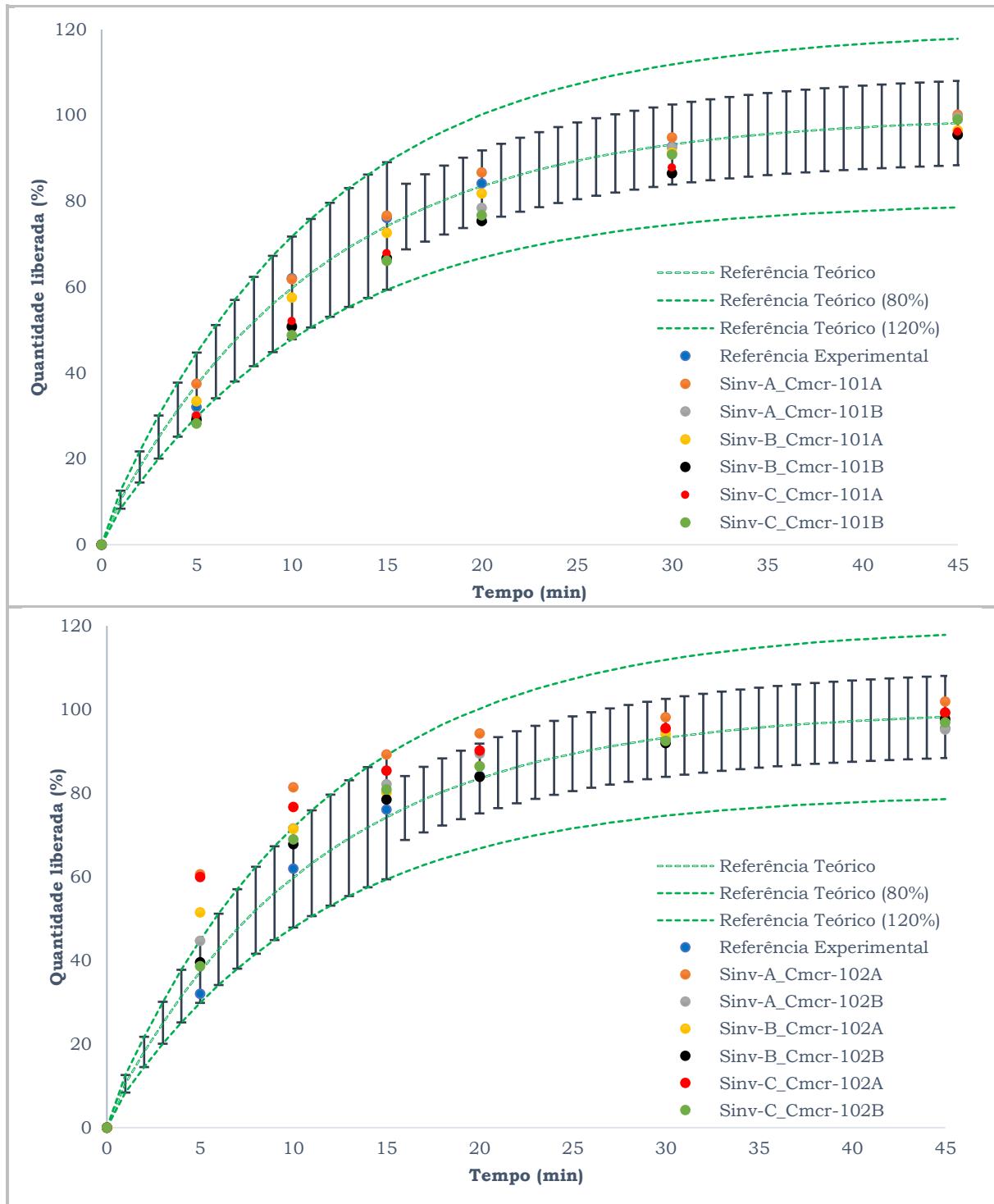
Tabela 4 – Resultados obtidos para determinação do mecanismo de liberação do insumo farmacêutico ativo das formulações usando métodos modelo dependente e independente

Lotes	Tempo zero						
	M0	M1	M2	M3	M4	f_1	f_2
Referência	0,84	0,77	0,79	0,84	1,00	-	-
Sinv-A_CMC101A	0,88	0,84	0,84	0,94	1,00	2,65	75,79
Sinv-A_CMC101B	0,92	0,80	0,88	0,97	1,00	6,68	56,34
Sinv-A_CMC102A	0,84	0,80	0,81	0,91	1,00	17,04	38,35
Sinv-A_CMC102B	0,80	0,76	0,78	0,88	0,99	7,81	55,34
Sinv-B_CMC101A	0,89	0,83	0,85	0,95	1,00	3,24	73,26
Sinv-B_CMC101B	0,94	0,87	0,89	0,98	1,00	8,13	55,40
Sinv-B_CMC102A	0,89	0,85	0,87	0,95	0,99	7,99	50,54
Sinv-B_CMC102B	0,86	0,79	0,82	0,93	0,99	3,52	68,58
Sinv-C_CMC101A	0,92	0,85	0,87	0,97	1,00	7,61	56,25
Sinv-C_CMC101B	0,92	0,85	0,88	0,97	1,00	8,47	52,81
Sinv-C_CMC102A	0,87	0,84	0,85	0,94	0,99	12,49	42,27
Sinv-C_CMC102B	0,77	0,71	0,73	0,85	0,99	4,37	66,49

Legenda: M0 (Ordem Zero), M1 (Primeira Ordem), M2 (Hixson-Crowell), M3 (Higuchi) e M4 (El-Yazigi). Parâmetros modelo independente f_1 (fator de diferença) e f_2 (fator de similaridade), calculados para todos os lotes tendo como referência lote do Zocor® 20 mg, medicamento referência definido pela ANVISA ($n=12$ para cada lote de comprimidos utilizado). Regressão estatisticamente significativa para valor-p $\leq 0,05$ (valor-p $< 0,001$ para todos os lotes).

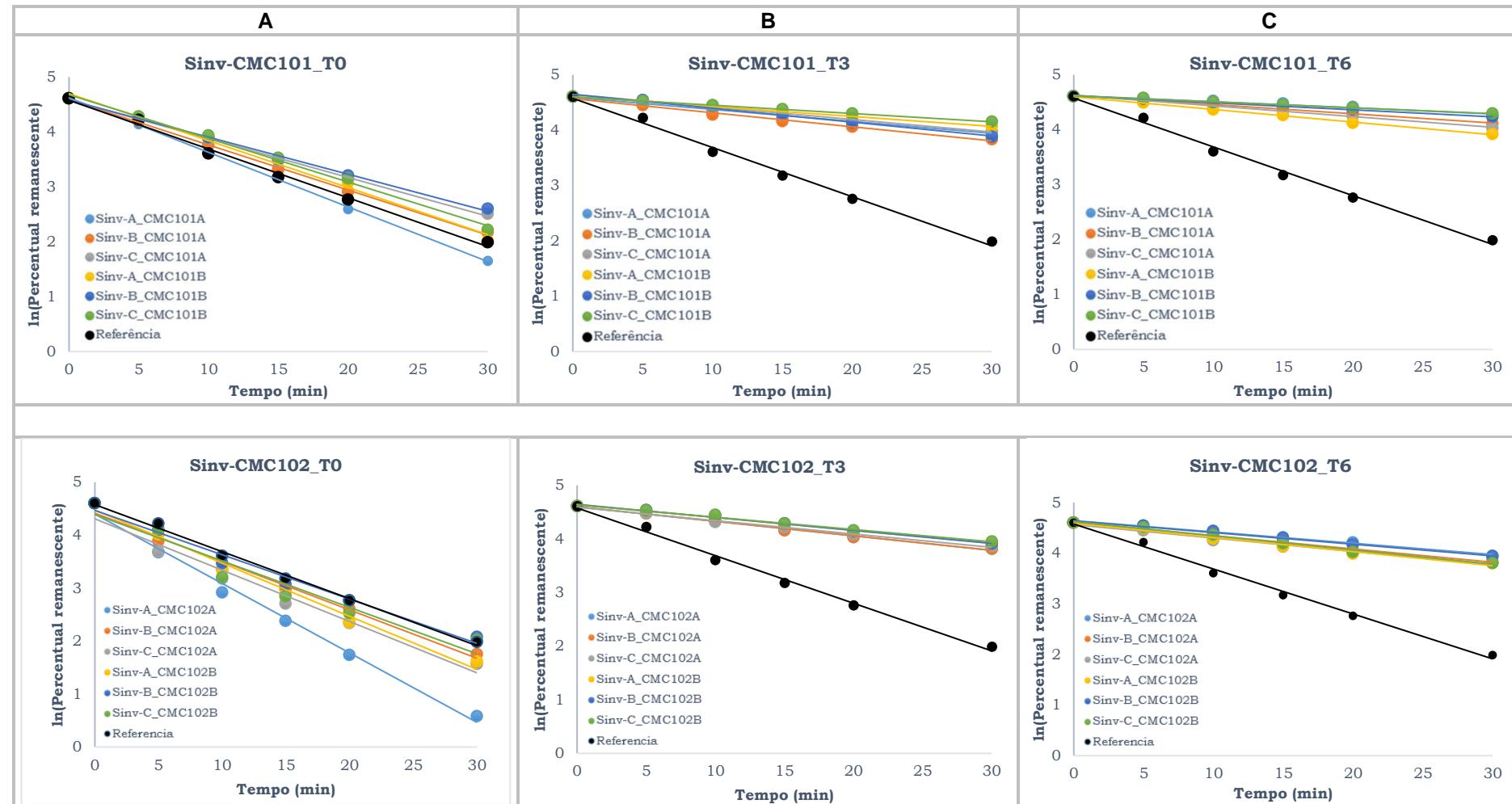
Todos os lote CMC101 e os CMC102B apresentam valores experimentais dentro da variações de $\pm 20\%$ para os pontos até 15 minutos, sendo eles semelhantes ao lote referência na determinação do fator de similaridade (f_2). Os lotes contendo CMC102A, e que diferiram quanto ao ($f_2 < 15$), apresentam valores experimentais de dissolução fora do limite superior da curva teórica do referência mostrando maior velocidade na dissolução, demonstrando diferenças no perfil de dissolução em função da origem da celulose e do tamanho de partícula.

Figura 15 – Curvas teóricas para o referência, calculadas conforme o modelo de El-Yazigi, e pontos experimentais do lote referência e lotes contendo celulose microcristalina CMC101 (CMC101A e CMC101B) e CMC102 (CMC102A e CMC102B)



Os lotes contendo CMC101 e CMC102, foram acondicionados a 40 °C e reavaliados três e seis meses após a produção. Para todos eles foi verificado modificações significativas na dissolução (Figura 16).

Figura 16 - Curvas médias do \ln do percentual remanescente, em função do tempo para todos os lotes ($n=12$ para cada lote)



Conforme mostrado na Figura 16 colunas B e C houve um retardo na liberação do insumo farmacêutico ativo, onde todos os lotes diferiram significativamente da liberação do medicamento referência ($f_1 > 15$ e o $f_2 < 50$). Modificações significativas foram também verificadas por Santos (2013) na avaliação da estabilidade desses lotes através de dados de estabilidade térmica obtidos por métodos convencionais e de termogravimetria isotérmica.

Correlacionando a relação dos dados térmicos com os de dissolução, foi verificado que os dados térmicos obtidos para os diferentes tempos do estudo de estabilidade (zero, três e seis meses), quando comparados com os resultados da dissolução evidenciaram uma correlação direta entre o tempo necessário para degradar 10% do insumo farmacêutico ativo a 30 °C com o percentual liberado pelos comprimidos.

Essa correlação foi verificada para todos os lotes de comprimidos de simvastatina com todas as celuloses microcristalina, apresentando coeficiente de correlação $r \geq 0,97$, exceto para os lotes, contendo a celulose CMC101B, que apresenta cristalinidade diferente das demais.

5 AVALIAÇÃO *IN VITRO*-*IN VIVO* DE COMPRIMIDOS DE LIBERAÇÃO IMEDIATA OBTIDOS UTILIZANDO INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO DA CLASSE BIOFARMACÊUTICA I E CELULOSE MICROCRISTALINA DE DIFERENTES ORIGENS

5.1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a indústria farmacêutica tem experimentado um enorme transformação. Houve avanços científicos significativos com o potencial de revolucionar o tratamento de doenças humanas. No entanto, ainda há uma demanda substancial de novos medicamentos para tratar necessidades médicas não atendidas (CAMEJO; CMCGRATH; HERINGS, 2011; HAN; DAVIS; WANG, 2011).

Grande parte das terapias atualmente utilizadas baseiam-se na administração sistêmica do insumo farmacêutico ativo. Todas as estratégias de entrega do fármaco apresentam vantagens e efeitos colaterais que são pensados para melhor atender às necessidades terapêuticas, minimizando o desconforto para o paciente (SAKAMOTO et al., 2010; ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE, 2009). Devido à sua facilidade de fabricação e alta aceitação pelo paciente, os comprimidos são a forma de dosagem sólida mais utilizada (GOOLE et al., 2010).

Tipicamente princípios ativos farmacêuticos não possuem as propriedades compressivas necessárias para obter um comprimido por si só, especialmente em termos de fluxo, de enchimento e as propriedades de compressão, de modo que excipientes são frequentemente adicionados à formulação para conferir uma qualidade adequada (GOWTHAMARAJAN et al., 2011; DIXIT; PUTHLI, 2009).

O Conselho Internacional Excipientes Farmacêuticos define como excipiente substâncias, diferente do princípio ativo na forma de dosagem acabada, que foram apropriadamente avaliados quanto à segurança e estão incluídos num sistema de entrega de droga, quer para auxiliar o processamento ou para auxiliar a fabricação, proteção, melhorar a estabilidade, a biodisponibilidade ou a aceitação do paciente, auxiliar na identificação do produto, ou aumentar quaisquer outros atributos de segurança global e eficácia do sistema de distribuição do fármaco durante o armazenamento ou uso (GOYANES; SOUTO; MARTÍNEZ-PACHECO, 2011; MARWAHA; SANDHU; MARWAHA, 2010; THE INTERNATIONAL

PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS COUNCIL AND PHARMACEUTICAL QUALITY GROUP, 2006; OSTERBERG; SEE, 2003).

A celulose microcristalina (CMC) é um dos mais importantes excipientes utilizado em farmácia, cosmética, alimentos e outras indústrias. Ela ocorre como um pó branco, inodoro, insípido, cristalino composto de partículas porosas obtidos por despolimerização parcial de celulose (O'NEIL et al., 2006). Vários fatores conhecidos por influenciar as propriedades físicas e mecânicas incluem a origem e a natureza da fonte de celulose, métodos de obtenção, e variáveis de processamento empregadas durante a sua fabricação (ADEL et al., 2011; ABDELBARY; ELSHAFEEY; ZIDAN, 2009; SHLIEOUT; ARNOLD; MÜLLER, 2001; DOELKER, 1993; LANDIN et al., 1993a; LANDIN et al., 1993b). A hidrólise da celulose para se obter a CMC pode ser realizada usando ácidos minerais, enzimas ou microrganismos. Embora os métodos enzimáticos sejam desejáveis porque a glicose, um subproduto útil, é criada, estes métodos são mais caros e obtem-se produtos CMC possuindo uma cristalinidade inferior. Assim, a hidrólise ácida é o método convencional de escolha para a fabricação de CMC (ADEL et al., 2011; EI-SAKHAWY; HASSAN, 2007; MEDINA, KUMAR, 2007).

Insumos farmacêuticos ativos (IFAs) sólidos administrados por via oral não estão imediatamente disponíveis para o sistema biológico, de modo que para serem absorvidos necessitam ser solubilizados. Durante o desenvolvimento da formulação, os testes de dissolução *in vitro* são utilizados como um guia para estimar a quantidade de IFA liberado por unidade de tempo num dado meio de dissolução. Testes de dissolução *in vitro* parecem ser os indicadores mais sensíveis e confiáveis de performances *in vivo*, oferecendo uma indicação significativa da disponibilidade fisiológica apesar de não ser garantia absoluta de biodisponibilidade adequada (CASCOME et al., 2011).

Para compostos administrados por via oral, o processo de circulação sistêmica do princípio ativo pode ser dividido em duas etapas gerais: dissolução e absorção. A dissolução é definida como o processo pelo qual uma substância sólida entra no solvente para produzir uma solução. Para determinar a taxa de dissolução de insumo farmacêutico ativos a partir de formas farmacêuticas sólidas, diversos processos físico-químicos para além da dissolução de substâncias químicas puras têm de ser consideradas, tais como a molhagem da superfície do sólido, o processo de solvatação do sólido, e a difusão em solução do granel (GRASSI et al., 2007).

O uso corrente do termo "compressão direta" é usada para definir o processo pelo qual os comprimidos são prensados diretamente a partir das misturas de pó de princípios ativos e excipientes adequados. Sem pré-tratamento das misturas de pó por granulação húmida ou seca (MINAKSHI; DEEPAK; RAKESH, 2010).

Um guia completo para a aplicação de isenção de estudos de biodisponibilidade e bioequivalência *in vivo* para formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata com base no sistema de classificação biofarmaceuticas e testes durante o processo de aprovação nos estágios iniciais da droga (ou certas mudanças pré ou pós-aprovação) foi apresentada recentemente. A investigação da bioequivalência é um pré-requisito essencial para reivindicar a mesma eficácia do genérico com um já comprovado e registrado com o produto de referência ou no que diz respeito a mudanças no processo de fabricação de mostrar que a eficácia não foi alterada (ALT et al., 2004).

O desenvolvimento e a formulação apropriados da forma farmacêutica requerem a consideração das características físicas, químicas, físico-químicas e biológicas de todas as matérias-primas utilizadas na elaboração do produto, bem como a anatomoefisiologia do local de administração e absorção (SAKAMOTO et al., 2010). Assim, o estudo de pré-formulação consiste no ponto de partida para a formulação de um medicamento de qualidade satisfatória.

De grande importância para a qualidade do medicamento é a qualificação dos fornecedores seja dos Insumos farmacêuticos ativos ativos ou dos excipientes utilizados na formulação, pois a diferença nos processos tecnológicos empregados bem como a fonte de obtenção das matérias-primas pode ser suficiente para interferir na qualidade do produto final, como por exemplo: Suzuky e Nacagami (1999), estudaram o efeito da cristalinidade da celulose microcristalina na compactabilidade e dissolução de comprimidos de paracetamol e verificaram que o perfil de liberação droga pode ser modificada em função da alteração do grau de cristalinidade da celulose microcristalina; Suzuky e Makino (1999), estudaram o efeito da celulose microcristalina e hidroxipropilmetylcelulose na biodisponibilidade de peptídeos via nasal; Rowe et al. (1994), estudaram o efeito da variação de lotes e da fonte de celulose microcristalina e verificaram a existência de diferenças na cristalinidade em magnitude que neutralizavam qualquer diferença no tamanho de partícula (como por exemplo entre a celulose microcristalina CMC101 e CMC102) ou da fonte; Landin et al. (1993a) avaliaram o efeito do país de origem sobre as propriedades da celulose microcristalina onde foi verificado diferenças significativas no teor de lignina,

hemicelulose, composição e teor de açúcares, presença ou ausência de celulose II, entalpia de imersão, granulometria e propriedades de fluxo; Landin et al. (1993b) estudaram a influência da fonte e do lote de celulose microcristalina no comportamento e estabilidade de formulações de comprimidos de prednisona e verificaram variação significativa nas propriedades mecânicas e na taxa de dissolução da prednisona com a granulometria e composição química da celulose microcristalina.

Justifica-se assim a realização do trabalho tendo como proposição realizar estudos de correlação in vitro-in vivo com produtos contendo o IFA fluconazol, através de diferentes modelos de dissolução e verificar se existe influência de diferentes fabricantes da celulose microcristalina na correlação in vitro-in vivo.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Reagentes, matérias-primas e formulações farmacêuticas

Foram utilizados três diferentes lotes do insumo farmacêutico ativo fluconazol (Fluc-A, Fluc-B e Fluc-C), lotes de celulose microcristalina de dois diferentes fabricantes (A e B) e duas formulações de comprimidos de liberação imediata do fluconazol (Fluc-TA e Fluc-TB). As formulações Fluc-TA e Fluc-TB foram desenvolvidas com o mesmo lote de fluconazol variando apenas o país de origem da celulose microcristalina. Foram utilizados os excipientes: celulose microcristalina CMC101A e CMC101B, estearato de magnésio e croscarmelose de sódio. O solvente acetonitrila grau HPLC foi obtido no comércio local (Tédia®, Brasil). Água ultra-pura foi obtida utilizando um sistema de osmose reversa (Gehaka, Brasil). Todos os outros reagentes químicos utilizados estudo foram de grau analítico.

5.2.2 Caracterização físico-química

5.2.2.1 *Calorimetria exploratória diferencial*

As curvas calorimétricas foram obtidas utilizando um calorímetro exploratório diferencial (Shimadzu, model DSC-50) as amostras foram acondicionadas em um porta amostra de alumínio. O calorímetro foi calibrado utilizando o ponto de fusão do zinco como padrão (156.6 ± 0.3 °C). O fluxo de calor foi calibrado utilizando a entalpia

de fusão do índio (28.59 ± 0.3 J g $^{-1}$). As curvas foram conduzidas na faixa de temperatura de 25-250 °C na razão de aquecimento de 2 °C min $^{-1}$ na atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL min $^{-1}$, para identificar diferenças polimórficas (MOURA et al., 2010; DESAI; SHAIKH; DHARWADKAR, 2003), com massas da amostras de 2.0 ± 0.1 mg. Os dados DSC foram analizados usando o software Tasys® Shimadzu.

5.2.3 Estudo de liberação do insumo farmacêutico ativo

5.2.3.1 Dissolução intrínseca

Aproximadamente 200 mg de cada amostra foi comprimida em um disco de 0,50 cm 2 (0,80 cm diâmetro) usando um prensa hidráulica, a uma pressão nominal de 25 kN por 3 min. O disco foi comprimido para proporcionar uma superfície plana em uma extremidade da matriz para liberação da amostra. Um recipiente de vidro de borosilicato foi preenchido com aproximadamente 900 mL de cada meio utilizado (tampão pH 1,1; 4,5 e 7,0). O recipiente foi aquecido em um banho de circulação para proporcionar temperatura média de dissolução de $37,0 \pm 0,5$ °C. O sistema de disco rotativo foi utilizado para os experimentos de dissolução intrínseca e a solução foi agitada a 100 rpm. Amostras de 2 mL foram retiradas de cada meio de dissolução em intervalos de tempo apropriados (5,0; 10,0; 15,0; 30,0 e 60,0 min) e filtrados através de um filtro de membrana (tamanho do poro de 0.45 µm). Um volume equivalente de meio (2 mL) foi adicionado ao meio de dissolução para compensar a perda na retirada da amostra. As alíquotas foram diluídas antes da análise por UV no comprimento de onda de 260 nm. A região linear do gráfico obtido da quantidade de amostra dissolvida em função do tempo foi utilizada para determinar as taxas de dissolução intrínseca usando a Equação 8, onde j é a taxa de dissolução intrínseca, expressa em ($\mu\text{g cm}^{-2}$ min $^{-1}$); V é o volume do meio de dissolução (mL); Δt é a diferença entre os tempos utilizados (min); ΔC é a variação da concentração (μg) no diferentes tempos utilizados; A é a área da superfície da amostra exposta ao meio de dissolução (cm 2).

$$j = \left[\left(\frac{V * \Delta C}{\Delta t} \right) * \left(\frac{1}{A} \right) \right] \quad \text{Equação 8}$$

5.2.3.2 Liberação do insumo farmacêutico ativo a partir dos comprimidos

As características de dissolução foram obtidas utilizando o aparato pá (Nova Ética, Modelo 299), baseado nas condições descritas na farmacopeia americana USP35/NF30 (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2012). O meio de dissolução foi água, volume de 500 mL, mantido a $37,0 \pm 0,5$ °C com rotação da pá a 50 rpm. Alíquotas de 2 mL foram retiradas do meio de dissolução em intervalos de tempo apropriados (2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 30,0 e 45,0 min) e filtrados através de filtros de membrana (tamanho do poro de 0,45 μm). O volume equivalente de (2 mL) de meio de dissolução foi adicionado para compensar a retirada da amostra. As amostras foram diluídas em quantidades apropriadas do meio de dissolução e analisadas para determinar a quantidade de fluconazol dissolvida, utilizando o UV, no comprimento de onda de 261 nm. De modo a esclarecer o mecanismo de liberação dos comprimidos, os dados de dissolução foram avaliados nos modelos de ordem zero, primeira ordem, Hixson-Crowell, Higuchi, El-Yazigi, fator de diferença (f_1) e fator de similaridade (f_2), utilizando as fórmulas da Tabela 2.1 (para os métodos modelo dependente), as Equações 2.3 e 2.4 para f_1 e f_2 , respectivamente. Foram avaliados, também, através de ANOVA univariada.

5.2.4 Estudo de biodisponibilidade

5.2.4.1 Animais

Foram utilizados coelhos machos Nova Zelândia (n=12), pesando entre 3,5-4,5 kg. Todos os animais foram alojados individualmente em gaiolas padrão, por aproximadamente 30 dias antes dos experimentos, submetidos a ciclos de 12 horas de claro/escuro, sendo alimentados diariamente com ração padrão com acesso livre a água potável.

5.2.4.2 Protocolo e procedimento *in vivo*

Os experimentos foram realizados apenas após a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa Animal – CEPA da Universidade Federal da Paraíba – UFPB (**Certificado N° 0308/11**), seguindo padrões definidos (BLOOD COLLECTION

GUIDELINES, 2011; JOSLIN, 2009; DIEHL et al., 2001). O estudo teve um delineamento experimental cruzado 2 x 2. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos (6 animais cada) e cada animal recebeu uma das formas de comprimidos: comprimidos de fluconazol de liberação imediata Fluc-TA e Fluc-TB. Após um período de seis semanas da administração da formulação inicial foi administrada a formulação alternada.

Os coelhos foram mantidos em jejum por 12 h antes da administração dos comprimidos com livre acesso a água. As formulações foram administradas por via oral e subsequentemente lavadas com 5 ml de água. Após a administração cerca de 2,0 ml de amostra de sangue foram coletadas através de artéria central da orelha utilizando scalp 21 G, com anestesia local com lidocaina-prilocaina 5% creme (EMLA®, AstraZeneca S.A) e transferidos para tubo contendo anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) em intervalos de tempo determinados (0,0; 1,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 6,5; 8,0; 24,0; 48,0; 72,0 e 120,0 h). O plasma foi separado por centrifugação (4000 rpm, 15 min) e armazenados a temperatura de -20 °C, por período máximo de uma semana, e descongelado apenas no momento da análise.

5.2.4.3 Análise do insumo farmacêutico ativo no plasma de coelho

5.2.4.3.1 Instrumentação e condições de operação

A quantificação do fluconazol nas amostra de plasma de coelhos foram analisados através de um cromatógrafo líquido de alta performance (CLAE) da Shimadzu (Prominence) equipado com um sistema de bombeamento de solvente LC-20AT, autoinjetor SIL-20A, um sistema de degaseificação DGU-20A₅, um forno CTO-20A e detector SPD-M20A diode array usando tinidazol como padrão interno. A coluna utilizada foi Phenomenex Gemini® C18 (150 mm x 4.6 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm), com pré-coluna SecurityGuard Gemini® C18 (4 mm x 3.0 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm) adquirido da Maxcrom Instrumentos Científicos Ltda (São Paulo, SP, BR) mantida a temperatura de 40 °C. A fase móvel consistiu de uma mistura de acetonitrila/água (20/80, v/v). O volume de injeção foi de 20 µL, com fluxo de fase móvel constante de 1,5 mL min⁻¹ e a detecção realizada por UV no

comprimento de onde de 260 nm. O software LC Solution® (Shimadzu, Japão) foi utilizado para o controle do equipamento, aquisição e análise dos dados.

5.2.4.3.2 Preparação das amostras

Alíquotas de 500 µL de plasma foram misturados a 50 µL de tinidazol (250 µg mL⁻¹) padrão interno e 25 µL de solução de ácido pérmanganico (1%). As amostras foram extraídas com 5 mL de acetato de etila em vortex sob agitação por 1 min, em seguida foram submetidas a centrifugação em rotação de 4000 rpm por 15 min para a precipitação de proteínas. Após a centrifugação, quatro mL do sobrenadante constituído de solvente orgânico foram transferidos para um tubo de ensaio e evaporado a temperatura de 80 °C. O resíduo foi reconstituído com 2000 µL de acetonitrila-água (20:80, v/v), agitou-se em vortex por 1 min, filtrou através de filtro de membrana PVDF 0,45 µm e uma alíquota de 20 µL foi injetada no sistema CLAE.

5.2.4.3.3 Validação do método

O método foi desenvolvido e validado de acordo com procedimentos padrão (BRASIL, 2012). A linearidade e o intervalo foram determinados a partir da construção da curva de calibração, obtidas em triplicatas em nove níveis de concentrações diferentes (0,5; 1,0; 2,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0; 20,0 µg mL⁻¹). A precisão foi verificada por repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada pela análise de cinco concentrações diferentes (0,5; 1,0; 5,0; 7,5 and 15,0 µg mL⁻¹) em sextuplicatas no mesmo dia. A precisão intermediária foi avaliada pela repetição das concentrações em três dias diferentes. A exatidão foi avaliada pela análise da variação das amostras em sextuplicatas intra e inter-dias em três dias diferentes nas mesmas concentrações utilizadas na precisão. O limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foi identificado como sendo a menor concentração do plasma da curva de calibração que pode ser medido com exatidão e precisão. A avaliação da estabilidade do insumo farmacêutico ativo nas soluções analíticas foi avaliado em concentrações conhecidas de 1,0 e 15,0 µg/ml (n = 6 para cada concentração). Os demais parâmetros seguiram conforme a resolução.

5.2.4.3.4 Análise farmacocinética

As características farmacocinéticas obtidas no plasma de coelhos após os dois tratamentos foram estimados para cada animal utilizando o PKSolver, um suplemento livre escrito em Visual Basic for Applications (VBA) para software Microsoft Excel, desenvolvido por Zhang et al. (2010). Foi usado o modelo de análise não compartimental. O C_{max} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e t_{max} (h) foram a concentração máxima do insumo farmacêutico ativo e tempo necessário para obtê-la, respectivamente, obtidos diretamente dos dados originais. A área sob a curva, ASC_{0-t} ($\mu\text{g mL}^{-1}\text{h}$) foi determinada como a área sob a curva da concentração plasmática em função do tempo até o último tempo analisado, calculada pelo método trapezoidal. A área sob a curva do tempo zero ao infinito, $ASC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}\text{h}$), foi calculada pela expressão $ASC_{0-\infty} = ASC_{0-t} + Ct / k$ onde C_t é a última concentração medida no tempo t , e k é a constante de eliminação final estimado por análise de regressão linear dos dados transformados (logN) da fase de eliminação no gráfico concentração-tempo. A meia vida plasmática ($t_{1/2}$) foi calculada por $t_{1/2} = 0,693/k$. A biodisponibilidade relativa foi calculada através da fórmula $f_{rel(B/A)} = (ASC_{Fluc-TB} / ASC_{Fluc-TA}) \times 100$.

5.2.5 Análise estatística

A comparação entre os perfis de dissolução foi feita através de ANOVA univariada, modelo independente fator de diferença (f_1) e fator de semelhança (f_2) calculados através das Equações 9 e 10, respectivamente. O fator de diferença calcula o percentual de diferença entre duas curvas em cada tempo e é uma medida do erro relativo entre as duas curvas:

Onde, n é o número de pontos do tempo, R_t é a quantidade dissolvida do lote de referência no tempo t , e T_t é a quantidade dissolvida do lote teste no tempo t .

O fator de similaridade é a transformação logarítmica recíproca da raiz quadrada da soma dos quadrados dos erros e é a medida da similaridade da porcentagem de dissolução entre as duas curvas, calculadas usando a equação Equação 9.

$$f_1 = \left[\left(\sum_{i=1}^n |R_f - T_t| \right) / \left(\sum_{i=1}^n R_f \right) \right] * 100 \quad \text{Equação 9}$$

$$f_2 = 50 * \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) * \sum_{i=1}^n (R_f - R_t)^2 \right]^{-0.5} * 100 \right\} \quad \text{Equação 10}$$

Geralmente, f_1 com valores até 15 (0-15) e f_2 com valores maiores que 50 (50-100) garantem igualdade ou equivalência entre as curvas.

A comparação de grupos de dados, na análise dos IFAs, foi feita através de ANOVA. Os dados da validação foram avaliados quanto a normalidade e a comparação entre grupos feita através de ANOVA. Os dados da linearidade foram avaliados através da análise de resíduos e ANOVA para verificar o ajuste do modelo.

Estatística descritiva foi obtida para todos os dados. Os parâmetros farmacocinéticos foram avaliados utilizando testes não paramétricos e para aqueles que demonstraram distribuição normal, avaliada através dos testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov, foram avaliados utilizando teste t student. Os parâmetros $C_{\text{máx}}$, ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ foram comparados seguindo um modelo não-compartimental para um desenho cruzado 2x2 levando em consideração os efeitos de período, sequência e formulação. Foram estabelecidos intervalos de confiança de 90% para as razões entre as médias aritmética e geométrica do $C_{\text{máx}}$, ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$, entre Fluc-TA e Fluc-TB. Foram utilizados os softwares Minitab 17® e o SPSS® 22.

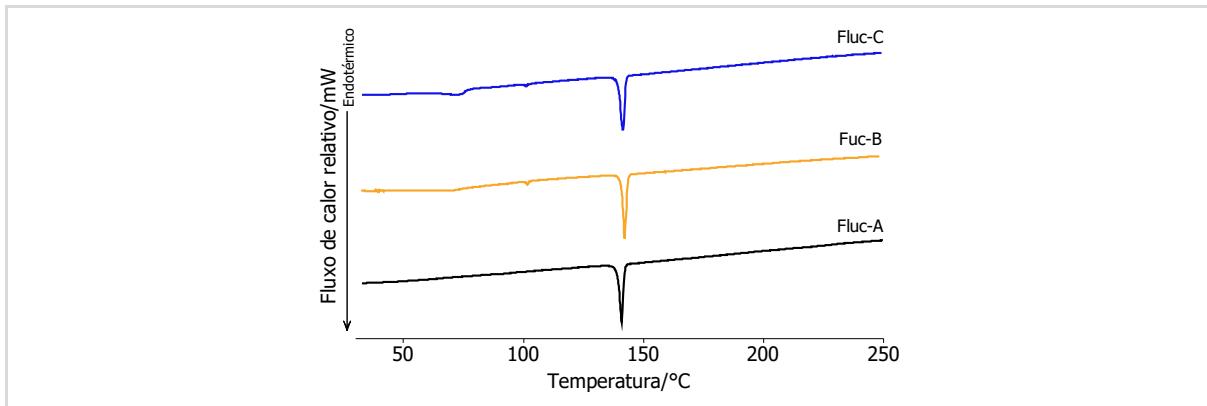
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Caracterização do insumo farmacêutico ativo

5.3.1.1 *Calorimetria exploratória diferencial, espectroscopia vibracional e doseamento*

A análise das curvas calorimétricas das amostras Fluc-A, Fluc-B e Fluc-C na razão de aquecimento de 2 °C/min mostradas na Figura 17, revelou a existência de transição endotérmica próximo de 140 °C referente ao processo de fusão.

Figura 17 - Curvas calorimétricas dos diferentes lotes de fluconazol



Os valores para pico de fusão, energia de ativação e pureza determinados por DSC, e o doseamento determinado por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrofotometria eletrônica no ultravioleta (CLAE-UV), são visualizados na Tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros determinados por calorimetria exploratória diferencial e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada espectrofotometria eletrônica no ultravioleta (CLAE-UV) para três diferentes lotes de fluconazol (Fluc-A, Fluc-B e Fluc-C) expressos em média \pm DP.

Amostra	Parâmetro			
	Pico de fusão (°C)	Energia de ativação (J/g)	Pureza	Doseamento %
Fluc-A	141,42 ¹ ±0,73	94,68 ¹ ±5,86	98,13 ¹ ±0,90	99,03 ¹ ± 0,68
Fluc-B	141,86 ¹ ±0,45	89,41 ¹ ±2,33	99,00 ¹ ±0,28	99,37 ¹ ± 0,70
Fluc-C	141,39 ¹ ±0,01	90,12 ¹ ±5,13	98,87 ¹ ±0,30	99,20 ¹ ± 0,51
Valor-p	0,51	0,17	0,22	0,68

São consideradas diferenças estatisticamente significativas para valor de $p \leq 0,05$; Valores com índices diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes lotes de fluconazol em relação aos parâmetros pico de fusão, energia de ativação, pureza e doseamento (valor-p > 0,05 para todos eles). Foi verificado, também que os diferentes lotes são formados por um mesmo tipo de cristal, pois apresentam pico único de fusão em 141,56±0,26 °C, valor que não difere dos valores 139,9; 141,6 e 139,7 °C encontrado por Park et al. (2010), Desai, Shaikh e Dharwadkar (2003) e Gu e Jiang (1995), e da onset de fusão de 138,4 °C encontrada em estudos prévios realizados para a forma polimórfica mais estável termicamente do fluconazol (polimorfo I) (MOURA et al., 2010; DESAI; SHAIKH; DHARWADKAR, 2003).

O primeiro relato de polimorfismo do fluconazol foi feito em 1995 por Gu e Jiang, que mostraram duas formas cristalinas diferentes para o insumo farmacêutico ativo (GU; JIANG, 1995). Outra forma polimórfica foi descrita em 2001 (DASH; ELMQUIST, 2001). Em estudo termoanalítico sobre as transformações polimórficas do fluconazol, Desai e colaboradores (DESAI; DHARWADKAR, 2009; DESAI; SHAIKH; DHARWADKAR, 2003) mostraram que ciclos de aquecimento/resfriamento e aplicação de pressão levam a mudanças entre as formas polimórficas do fluconazol. Obaidat, Alkhamis e Salem (2010) verificaram que forças mecânicas de compressão incluindo força de trituração manual aumentam, significativamente, a transformação da forma II para a forma I.

5.3.1.2 Dissolução intrínseca

O perfil de liberação intrínseca do fluconazol foi avaliado em três meios de pHs 1,1; 4,5 e pH 7,0. A análise nos diferentes meios, Figura 18(A), demonstrou liberação linear em função do tempo com $r^2 \geq 0,99$ nos três meios. Os valores obtidos foram: pH 1,1 (0,9991), pH 4,5 (0,9994) e pH 7,0 (0,9901). As Figuras 18(B e C) mostram, para os diferentes pHs, os valores médios com intervalo de confiança de 95% para o ponto de coleta de 60 minutos (expresso em percentual) e a velocidade de dissolução intrínseca (expresa em $\mu\text{g cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$), respectivamente.

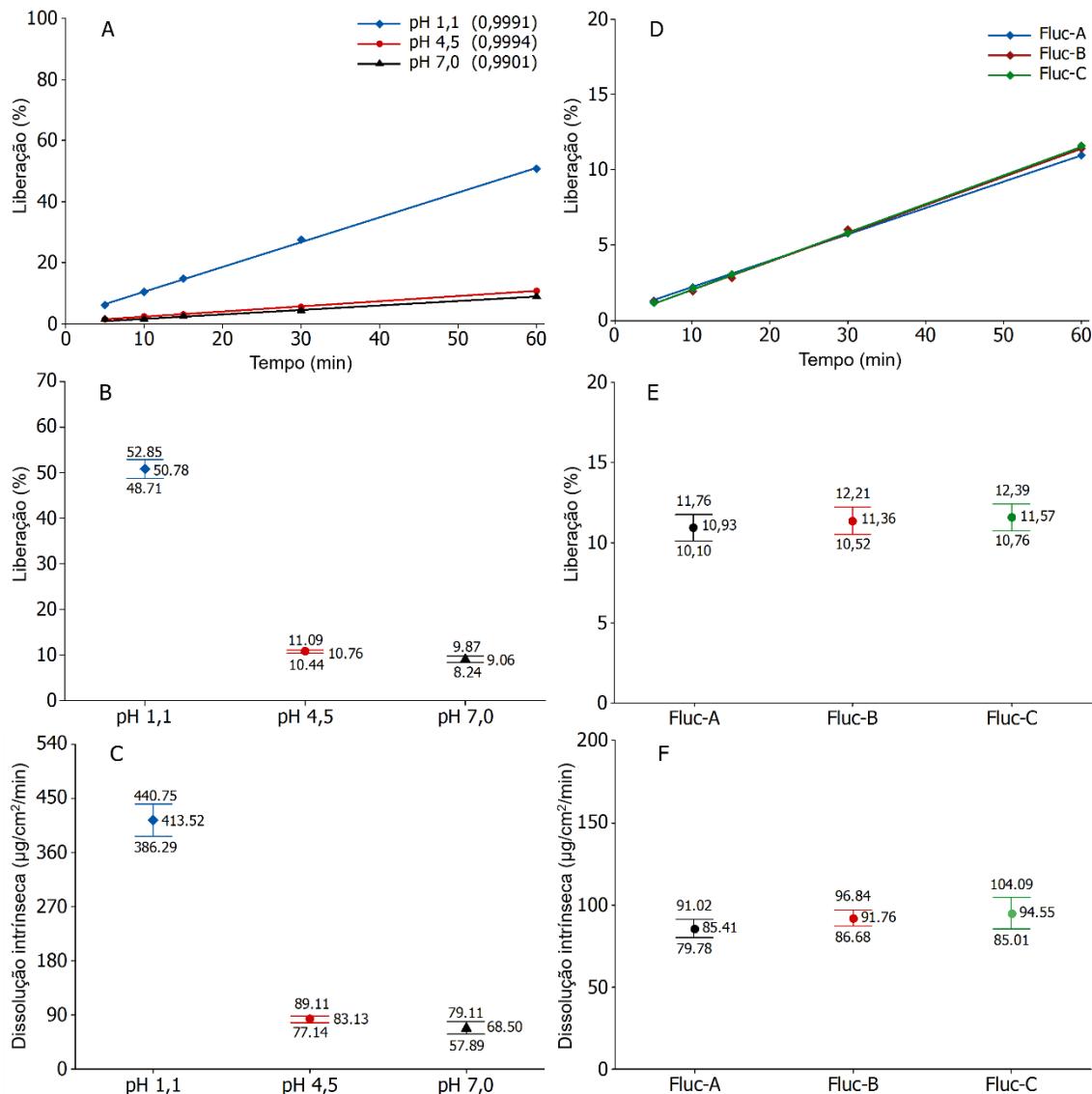
Quando considerada a velocidade de dissolução intrínseca foi verificado que o meio de pH 1,1 apresentou valores significativamente superiores aos outros dois meios para o percentual liberado no tempo de coleta de 60 minutos e na velocidade de dissolução intrínseca (valor-p < 0,05).

A maior velocidade de liberação do insumo farmacêutico ativo em valor de pH mais baixo pode ser explicada em função da maior proporção da fração ionizada em pH ácido em comparação com os pHs 4,5 e 7,0, pois o fluconazol corresponde a uma base fraca de pKa 3,7.

Utilizando o pH 4,5 foram analisados três diferentes lotes de fluconazol em relação ao perfil e velocidade de dissolução intrínseca. A Figura 18(D) mostra que os três diferentes lotes apresentaram liberação linear em função do tempo, com coeficientes de correlação de 1,000; 0,998 e 0,999 para Fluc-A, Fluc-B e Fluc-C, respectivamente.

Os valores calculados para a dissolução intrínseca dos três diferentes lotes de fluconazol em relação ao percentual liberado aos 60 minutos, Figura 18(E), e a velocidade de liberação em $\mu\text{g cm}^{-2} \text{min}^{-1}$, Figura 3.2(F), foram: Fluc-A ($10,93 \pm 0,33$ e $85,41 \pm 2,26$), Fluc-B ($11,36 \pm 0,34$ e $91,76 \pm 2,05$) e Fluc-C ($11,57 \pm 0,33$ e $94,55 \pm 3,84$). Os diferentes lotes quando comparados entre eles demonstraram não haver diferença estatisticamente significativa em relação ao percentual e a velocidade de dissolução intrínseca (valor-p = 0,09 e 0,06), respectivamente.

Figura 18 - Perfil de dissolução intrínseca (A) e valores médios com intervalo de confiança de 95% para a liberação no tempo de 60 minutos (B) e velocidade de liberação intrínseca (C) de um lote de fluconazol em três diferentes meios de dissolução. Perfil de dissolução intrínseca (D) e valores médios com intervalo de confiança de 95% para a liberação no tempo de 60 minutos (E) e velocidade de liberação intrínseca (F) de três diferentes lotes de fluconazol em meio de dissolução pH 4,5



Hee et al. (2010), Alkhamis, Obaidat e Nuseirat (2002), relatam que a forma polimórfica I dissolve mais lentamente se comparada à forma II, e que um pseudopolimorfo na forma de monohidrato dissolve ainda mais lentamente que o polimorfo I. Também é reportado indicações de que a forma polimórfica I apresenta biodisponibilidade inferior a do polimorfo III e mistura das formas I e III (50:50) (CHAROO et al., 2014; HERNANDEZ; RATHINAVELU, 2006). O perfil farmacocinético dos polimorfos I e III evidenciaram que o C_{max} e ASC do primeiro foi 60% menor que o do segundo (HERNANDEZ; RATHINAVELU, 2006).

Conforme Alkhamis, Obaidat e Nuseirat (2002), a ordem de solubilidade de diferentes formas do fluconazol, em água é: amorfó > solvatos contendo acetona 1/4 > forma polimórfica anidra II > forma polimórfica anidra I > solvatos contendo benzeno 1/7 > monohidratos.

5.3.2 Caracterização da forma farmacêutica e mecanismo de liberação do insumo farmacêutico ativo

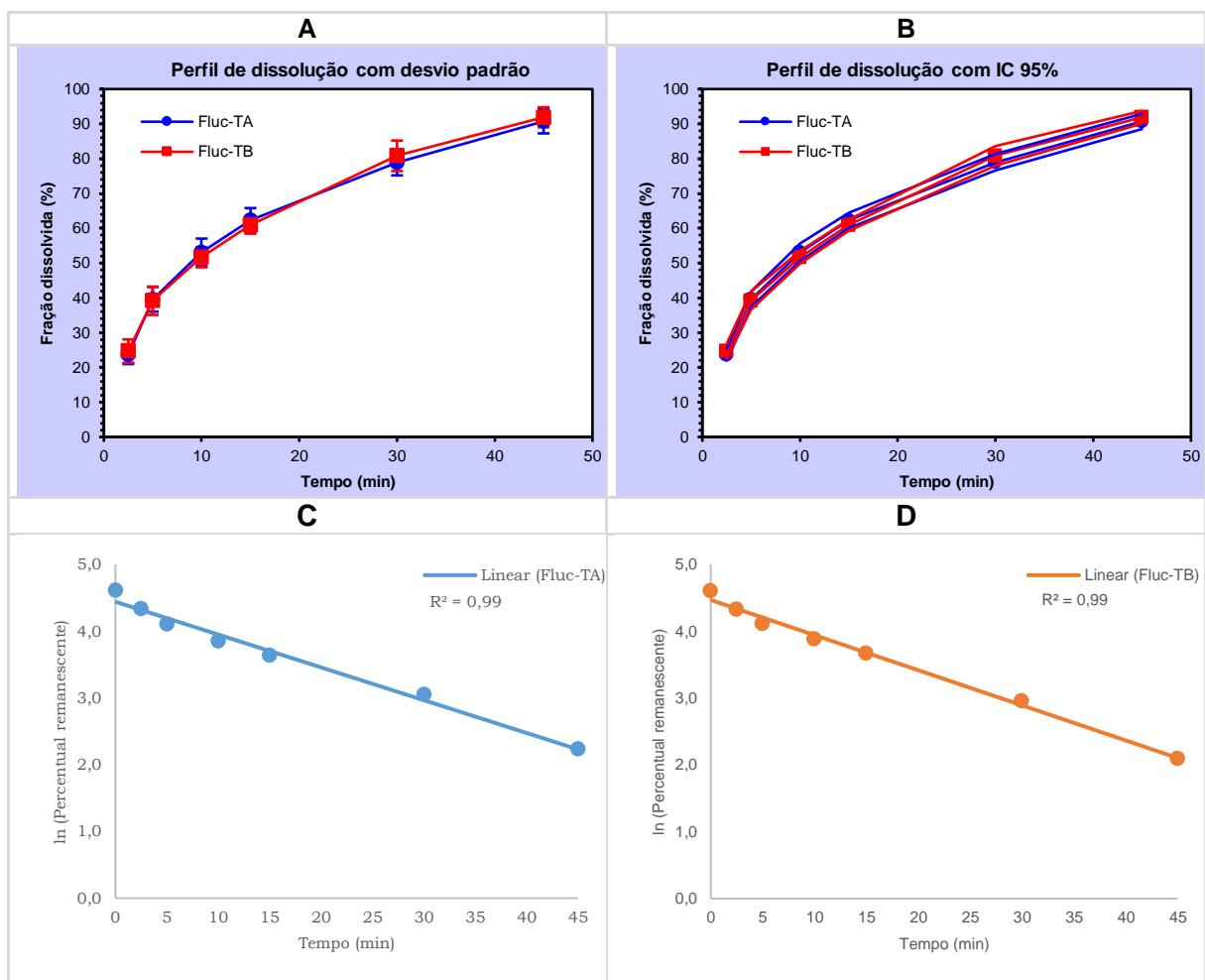
Na Tabela 6 são visualizados os resultados obtidos para o peso médio, dureza, friabilidade, desintegração, doseamento e uniformidade de dose para os comprimidos Fluc-TA e Fluc-TB. Os resultados mostraram conformidade com os critérios de aceitação de todos os parâmetros.

Tabela 6 - Avaliação do peso médio, dureza, friabilidade, desintegração e uniformidade de dose dos diferentes comprimidos

Parâmetro	Critério de aceitação	Fluc-TA	Fluc-TB
Peso médio (mg)	160 \pm 12	162,0 \pm 3,5	162,2 \pm 3,7
Dureza (kgf)	\geq 3,0	5,5 \pm 0,8	5,6 \pm 0,9
Friabilidade (%)	\leq 1,5	0,9	0,2
Desintegração (min)	\leq 30	6,2 \pm 1,0	4,5 \pm 3,1
Doseamento (%)	90-110	99,0 \pm 0,1	99,3 \pm 0,5
Uniformidade (VA)	\leq 15	7,2	8,5

Além dos testes anteriormente descritos, a dissolução é um dos ensaios mais amplamente utilizado na caracterização do insumo farmacêutico ativo e no controle de qualidade de formulações farmacêuticas. A Figura 19(A-D) mostra os perfis das curvas médias de liberação, os perfis médios com os respectivos intervalos de confiança de 95% e o logarítmico natural do percentual remanescente para as formulações Fluc-TA e Fluc-TB.

Figura 19 - Curvas médias de liberação com desvio padrão (A), curvas médias de liberação com intervalos de confiança de 95% (B), logarítmico natural do percentual remanescente (C-D), em função do tempo para as formulações Fluc-TA e Fluc-TB ($n=12$ para cada formulação)



Para avaliar a similaridade e o mecanismo de liberação do insumo farmacêutico ativo, foram aplicados modelos dependentes e independentes conforme mostrado na Tabela 7 e Tabela 8.

Os dados mostram que não houve diferença significativa entre os perfis de dissolução dos comprimidos de fluconazol, pois para todos os tempos o valor-p > 0,05 na análise univariada (Tabelas 3.3,), $f_1 < 15$ e $f_2 > 50$ (Tabela 3.4).

Tabela 7 – Resultados obtidos para comparação dos perfis de dissolução do fluconazol Fluc-TA e Fluc-TB, em água, através de análise univariada

ANOVA Univariada: 2,5min					
Fonte	SQ	GL	MQ	valor-F	¹ valor-p
Formulação	6,143707	1	6,143707	0,658042	0,425942
Resíduo	205,3997	22	9,336348		
Total	211,5434	23			
ANOVA Univariada: 5min					
Fonte	SQ	GL	MQ	valor-F	¹ valor-p
Formulação	1,041667	1	1,041667	0,071457	0,791717
Resíduo	320,7058	22	14,57754		
Total	321,7474	23			
ANOVA Univariada: 10min					
Fonte	SQ	GL	MQ	valor-F	¹ valor-p
Formulação	12,2449	1	12,2449	1,028571	0,321519
Resíduo	261,9048	22	11,90476		
Total	274,1497	23			
ANOVA Univariada: 15min					
Fonte	SQ	GL	MQ	valor-F	¹ valor-p
Formulação	10,28912	1	10,28912	1,097279	0,306237
Resíduo	206,2925	22	9,376933		
Total	216,5816	23			
ANOVA Univariada: 30min					
Fonte	SQ	GL	MQ	valor-F	¹ valor-p
Formulação	21,76871	1	21,76871	1,313433	0,264087
Resíduo	364,6259	22	16,5739		
Total	386,3946	23			
ANOVA Univariada: 45min					
Fonte	SQ	GL	MQ	valor-F	¹ valor-p
Formulação	8,503401	1	8,503401	0,843558	0,368342
Resíduo	221,7687	22	10,0804		
Total	230,2721	23			

¹Valores estatisticamente significativos para valor-p ≤ 0,05 (n =12 para cada condição).

Quando avaliados através dos diferentes modelo dependente, foi verificado que para as duas formulações o modelo que mais se adequa é o de El-Yazigi para o qual foi obtido $r^2 \geq 0,99$. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Porta, Yamamichi e Storpirtis (2002) utilizando cápsulas de fluconazol, onde foi verificado mecanismo de liberação *in vitro* conforme o modelo de liberação proposto por El-Yazigi (EL-YAZIGI, 1981).

Tabela 8 – Resultados obtidos para determinação do mecanismo de liberação do insumo farmacêutico ativo das formulações usando métodos modelo dependente e independente através dos fatores de diferença (f_1) e de similaridade (f_2) para Fluc-TA versus Fluc-TB

Modelo	Statística	Fluc-TA	Fluc-TB
Zero ordem	Valor- p^1	<0,01	<0,01
	r	0,90	0,92
	Equação	$y = 1,4257x + 32,502$	$y = 1,4701x + 31,865$
Primeira ordem	Valor- p^1	<0,01	<0,01
	r	0,75	0,79
	Equação	$y = 0,0259x + 3,5069$	$y = 0,0262x + 3,5047$
Hixson-Crowell	Valor- p^1	<0,01	<0,01
	r	0,81	0,84
	Equação	$y = 0,0324x + 3,2169$	$y = 0,033x + 3,2094$
Higuchi	Valor- p^1	<0,01	<0,01
	r	0,97	0,99
	Equação	$y = 12,53x + 9,9354$	$y = 12,837x + 8,9164$
El-Yazigi	Valor- p^1	<0,01	<0,01
	r	-0,99	-1,00
	Equação	$y = -0,047x + 4,3737$	$y = -0,0507x + 4,4118$
Modelo independente	f_1	2.08	-
	f_2	89.35	-

¹Valores estatisticamente significativos para valor- $p \leq 0,05$ ($n = 12$ para cada condição).

5.3.3 Estudo in vivo

5.3.3.1 Desenvolvimento e validação do método bioanalítico

Durante o desenvolvimento do método bioanalítico foram testados diferentes sistemas solvente (diclorometano e acetato de etila), volumes do solvente de extração, substância a ser utilizada como padrão interno e fase móvel. O acetato de etila foi definido como solvente para a extração líquido-líquido por apresentar melhor

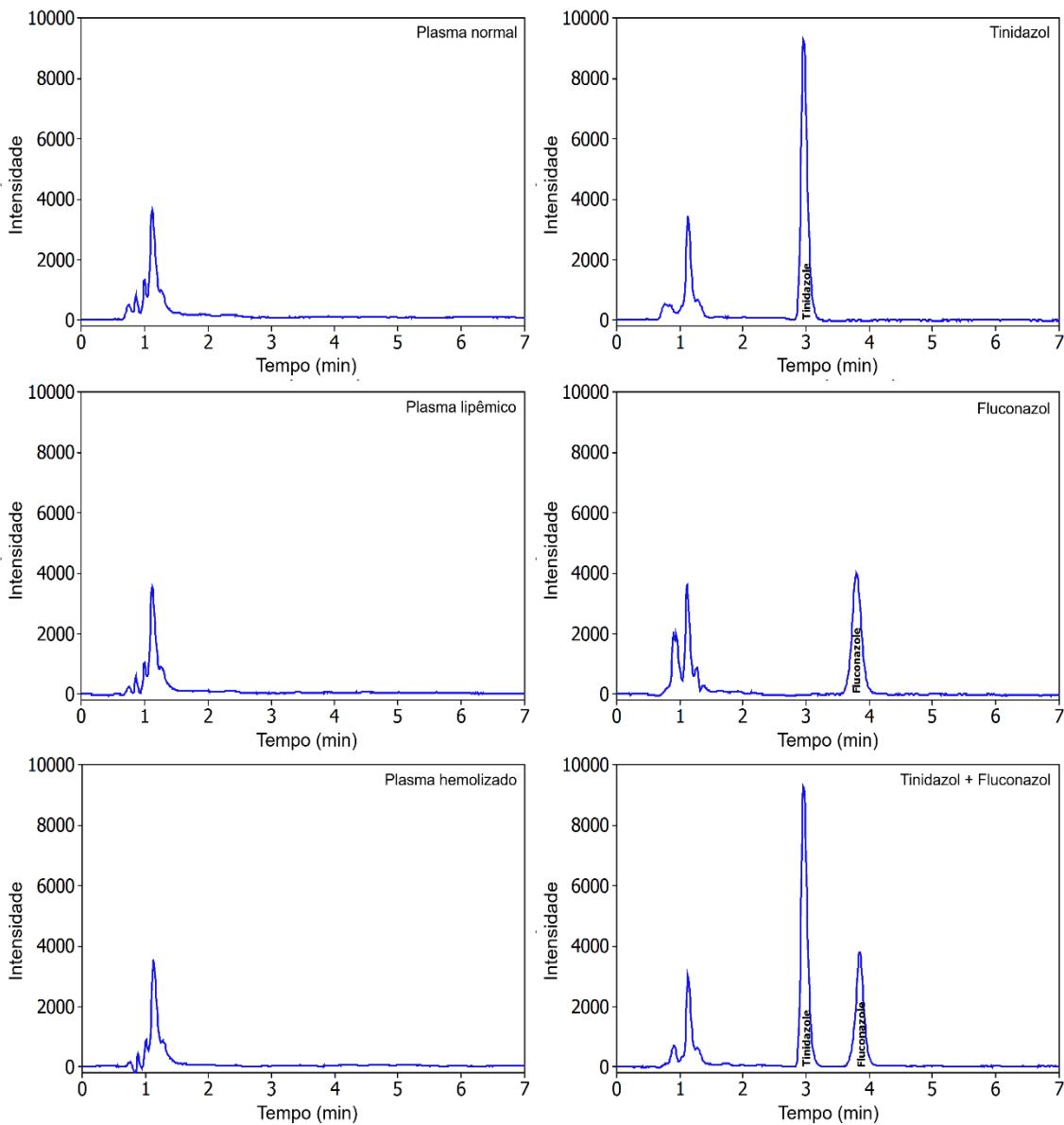
recuperação e tecnicamente ser mais adequado em função de ser a fase superior, facilitando o particionamento líquido-líquido. Quanto ao volume empregado, optou-se por utilizar 5,0 mL porque em função do volume de plasma utilizado (500 μ L) volumes menores testados (2,00 mL) não apresentou boa repetibilidade. Como padrão interno foi testado metronidazol, secnidazol e o tinidazol. O metronidazol apresenta tempo de retenção muito curto, representando problema por causa da interferência do plasma. Os outros dois apresentaram separação adequada do fluconazol e de picos interferentes do plasma. Optou-se pelo tinidazol, em função da melhor recuperação no acetato de etila, pois para o secnidazol a recuperação foi inferior a 75%, sem repetibilidade adequada. Para utilização como fase móvel foram utilizadas diferentes proporções de acetonitrila/água (25/75; 20/80 e 15/85: v/v). A proporção 20/80 foi selecionada para validação do método porque apresentou resolução, simetria e tempo de análise considerados satisfatórios, pois com proporções menores de acetonitrila o tempo de retenção foi considerado alto e proporções maiores de acetonitrila reduziam a resolução entre os picos.

A Figura 20 mostra os resultados obtidos para análise da especificidade/seletividade do método bioanalítico utilizado. Através da análise visual dos cromatogramas podemos observar que não houve presença de picos interferentes no tempo de retenção correspondente ao fluconazol e/ou ao tinidazol, tanto para amostras de plasma normal quanto para amostras hemolisadas ou lipêmicas, bem como após contaminação do plasma com os analitos isolados.

Na análise para pureza de pico (Figura 21) foram obtidos valores maiores ou iguais a 0,9998 para o tinidazol e fluconazol, o que demonstra não haver coeluição de substâncias e consequentemente comprova a seletividade do método nas condições empregadas.

Conforme definido na Resolução - RDC 27/2012 (BRASIL, 2012) e no European Medicines Agency (2011), os padrões de calibração são considerados aprovados, para construção das curvas, quando atenderem a dois critérios: o primeiro deles refere-se ao desvio máximo permitido para o Limite Inferior de Quantificação (LIQ), o qual deve ser $\pm 20\%$ em relação à concentração nominal; o segundo é relacionado aos demais níveis utilizados na curva de calibração para os quais o desvio máximo deve ser $\pm 15\%$.

Figura 20 - Cromatogramas obtidos após injeção de 20 μ L de amostras de plasma de coelhos normal, lipêmica, hemolisada, plasma adicionado com tinidazol (5 μ g/mL), fluconazol (10 μ g/mL) e tinidazol/fluconazol (5/10 μ g/mL)



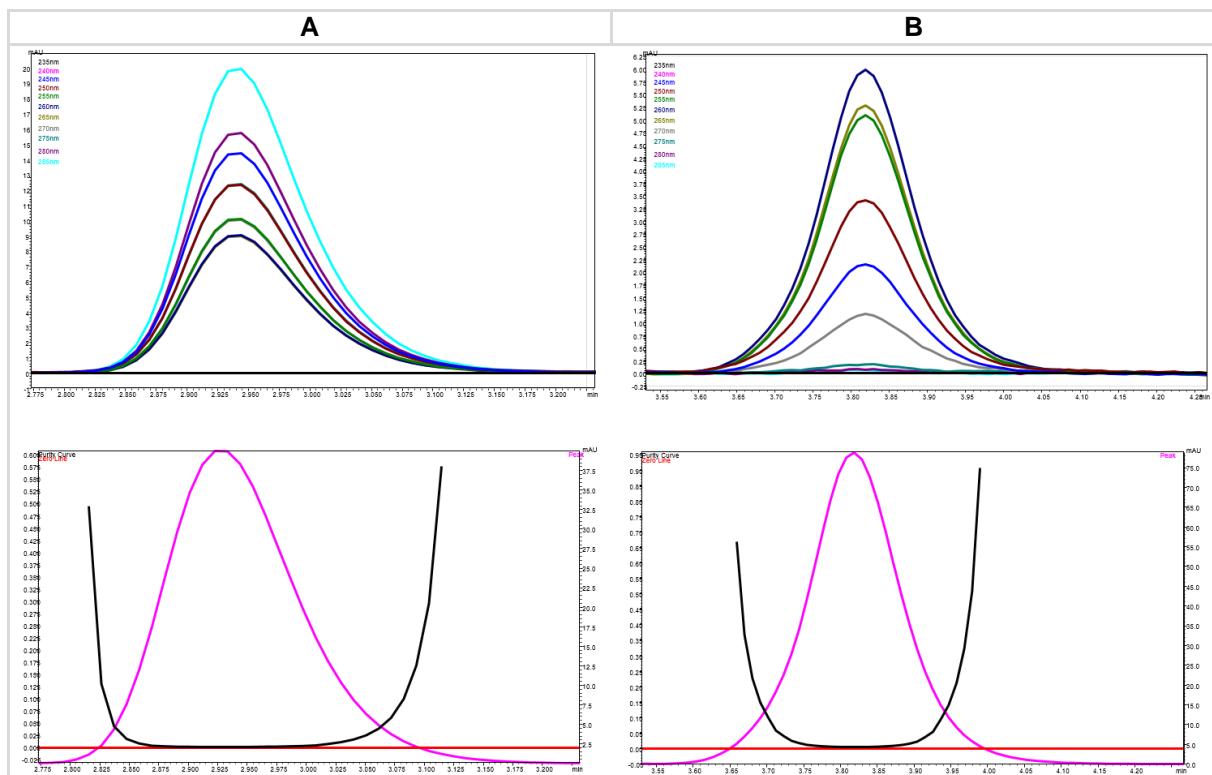
Estes critérios foram obedecidos, pois para o LIQ e para os demais níveis os maiores desvios em relação ao valor nominal foram de (9,08 e 8,89%), permitindo assim a construção e avaliação da linearidade do método através dos dados obtidos.

Os resultados obtidos, para as três curvas de calibração, pelo método dos mínimos quadrados mostrou a existência de correlação positiva significativa entre o aumento da razão da área de pico do fluconazol com o tinidazol (padrão interno) com coeficiente de correlação linear igual a 0,9986.

Para avaliar a aplicabilidade do modelo de ajuste linear, os resíduos foram avaliados quanto à normalidade conforme mostrado na Figura 22. Pela análise de

variância (Tabela 9) pode-se testar a validação do método e a significância estatística da curva ajustada. De acordo com os resultados, observou-se que os resíduos apresentam distribuição normal (valor-*p* = 0,15), a regressão é significativa (valor-*p* = 0,00) e não houve falta de ajustes para o modelo aplicado (valor-*p* = 0,15).

Figura 21 – Avaliação da pureza de pico para o fluconazol e tinidazol em plasma de coelhos



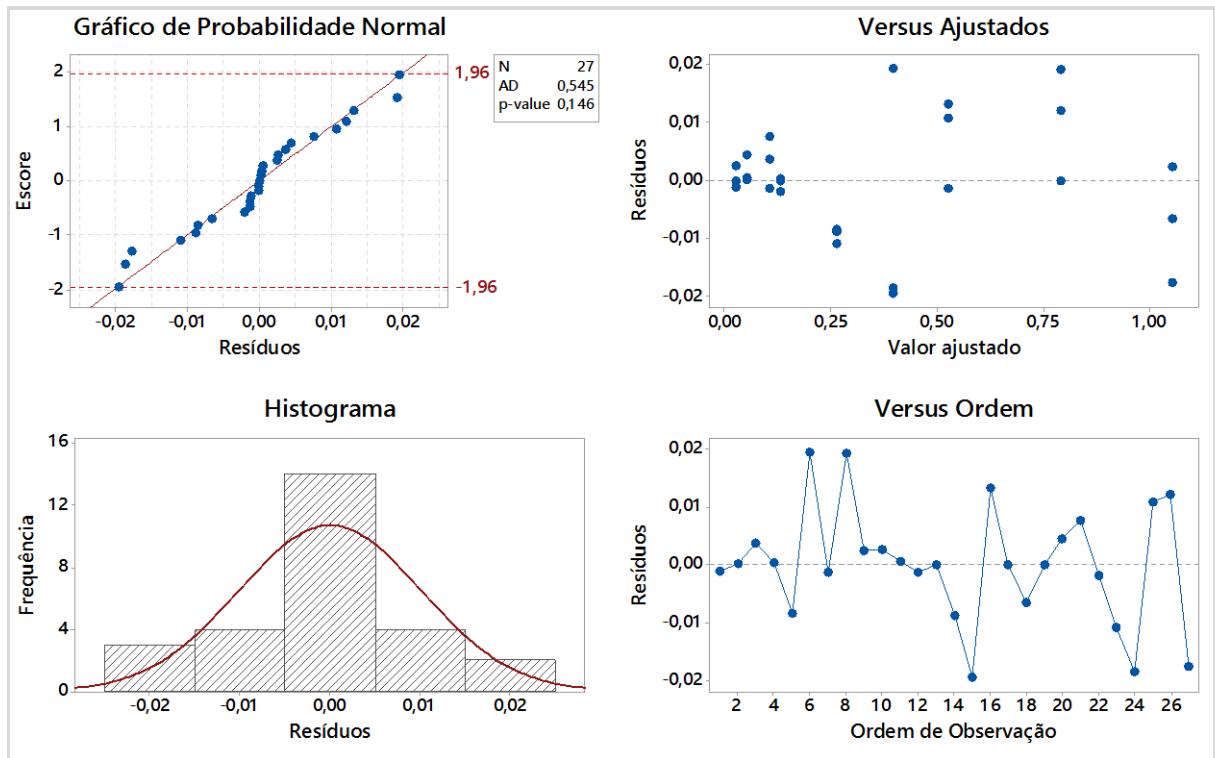
Desse modo, os parâmetros da reta, obtidos através do ajuste linear dos dados, são adequados para explicar o aumento de sinal do pico em função do aumento da concentração do analito nas soluções analisadas com intervalo de confiança de 95%.

Tabela 9 – Tratamento estatístico obtido por ANOVA fator único para a regressão linear do método para determinação de teor de fluconazol em plasma.

Fonte	GL	SQ	MQ	<i>F</i> _{calculado}	¹ Valor- <i>p</i>	<i>F</i> _{tabelado}
Modelo	1	3,08301	3,08301	29143,03	0,000	4,242
Resíduo	25	0,00264	0,00011	<i>Curva Linear</i>		
Falta de ajuste	7	0,00108	0,00015	1,78	0,154	2,577
Erro puro	18	0,00156	0,00009	<i>Não há falta de ajuste</i>		
Total	26	3,08566				

¹Valores estatisticamente significativos para valor-*p* ≤ 0,05 (n = 27).

Figura 22 - Gráfico da avaliação de normalidade dos resíduos da regressão linear do método para determinação de teor de fluconazol em plasma (n=27)



Diferenças estatisticamente significativas para valor-p ≤ 0,05 (n = 27).

A precisão do método foi avaliada em dois diferentes níveis, a repetibilidade que avalia as variações intra corrida e a precisão intermediária que avalia as variações intercorridas. Ambas foram avaliadas considerando cinco diferentes concentrações (0,5; 1,0; 5,0; 7,5 e 15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em três dias diferentes. Na Tabela 10 estão apresentados os resultados obtidos para a repetibilidade e a precisão intermediária do método bioanalítico proposto.

Os dados da precisão foram avaliados em relação a normalidade (Figura 23), onde foi verificado que os mesmos cumprem com esse requerimento (valor-p = 0,59), com nível de confiança de 95%.

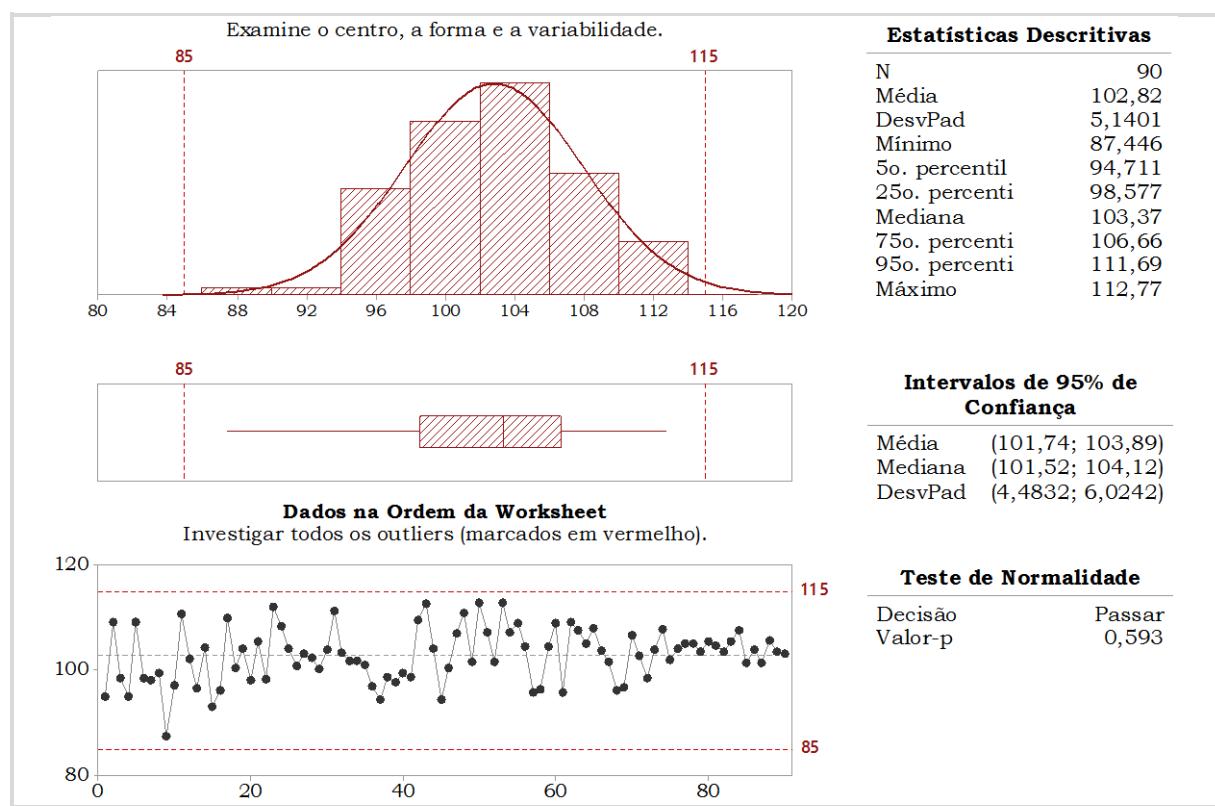
A partir da análise dos dados, podemos verificar que o método proposto cumpre com os parâmetros de precisão avaliados, pois para todas as concentrações, inclusive para o LIQ, o coeficiente de variação foi menor que 7,0%, sendo permitidas variações de até 15% para todos os níveis a exceção do LIQ onde são admitidas variações de até 20%, e valor-p > 0,05 para cada diferente concentração (o menor valor-p foi de 0,09). Além disso, através da análise de variância foi verificado que não houve diferença entre os diferentes níveis de concentração (valor-p = 0,14), com nível de confiança de 95%.

Tabela 10 – Repetibilidade e precisão intermediária, do método para determinação do teor de fluconazol em plasma

Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	Dia	¹Repetibilidade		²Precisão intermediária		
		Recuperação %	CV%	Recuperação %	CV%	*Valor-p
0,5	1	100,85	6,51			
	2	100,55	5,34	100,70	5,42	0,98
	3	100,70	5,38			
1,0	1	104,43	5,31			
	2	102,38	1,56	103,16	4,05	0,71
	3	102,65	4,66			
5,0	1	99,72	5,13			
	2	104,85	6,46	103,91	6,01	0,10
	3	107,16	4,72			
7,5	1	103,16	5,67			
	2	104,87	4,68	102,78	4,92	0,42
	3	100,33	4,01			
15,0	1	104,63	1,85			
	2	105,02	1,43	104,24	1,74	0,09
	3	103,08	1,58			

*Valores estatisticamente significativos para valor-p $\leq 0,05$ ($n = 18$ para cada concentração). ¹Valores médios obtidos a partir de $n = 6$ em cada dia. ²Valores médios obtidos a partir de $n = 18$ em cada concentração.

Figura 23 – Gráfico da avaliação de normalidade dos resultados obtidos na precisão método para determinação de teor de fluconazol em plasma ($n = 90$)



Diferenças estatisticamente significativas para valor-p $\leq 0,05$ ($n = 90$).

A exatidão também foi avaliada intra e interdia. As concentrações e dias utilizados foram os mesmos da precisão. Na Tabela 11 e Figura 24, são apresentados os resultados obtidos para a exatidão do método bioanalítico proposto.

Tabela 11 – Exatidão, do método para determinação de teor de fluconazol em plasma

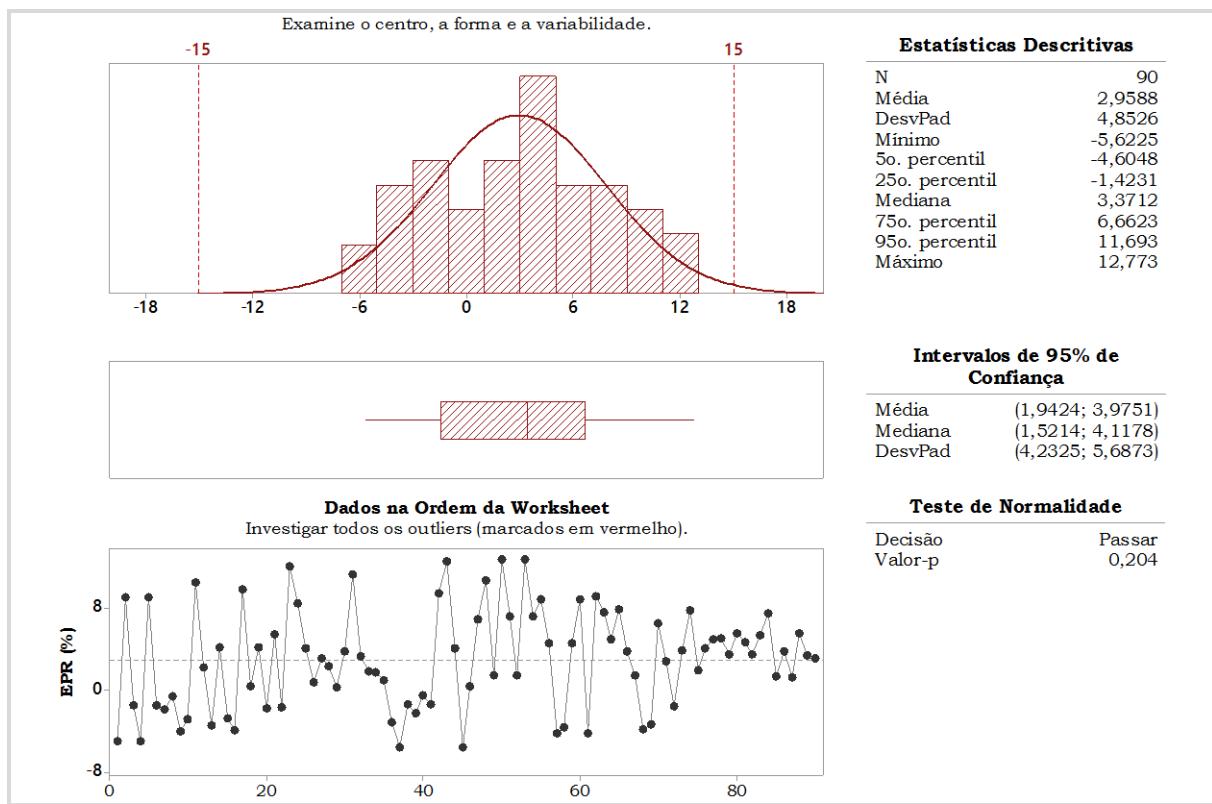
Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	Dia	¹ EPR Intra dia	² EPR Inter dia	Valor- <i>p</i> *
0,5	1	0,85		
	2	0,55	0,70	0,98
	3	0,70		
1,0	1	4,43		
	2	2,38	3,16	0,71
	3	2,65		
5,0	1	-0,28		
	2	4,85	3,91	0,10
	3	7,16		
7,5	1	3,16		
	2	4,87	2,78	0,42
	3	0,33		
15,0	1	4,63		
	2	5,02	4,24	0,09
	3	3,08		

*Valores estatisticamente significativos para Valor-*p* $\leq 0,05$ ($n = 18$ para cada concentração). ¹Valores médios obtidos a partir de $n = 6$ em cada dia. ²Valores médios obtidos a partir de $n = 18$ em cada concentração.

Os dados da exatidão foram avaliados em relação a normalidade (Figura 24), onde foi verificado que os mesmos cumprem com esse requerimento (valor-*p* = 0,20), com nível de confiança de 95%.

A partir da análise dos dados, podemos verificar que o método proposto cumpre com os parâmetros de exatidão avaliados, pois para todas as concentrações, inclusive para o LIQ, a maior variação no erro padrão relativo da média foi de 4,24%, com valores individuais máximo e mínimo de 12,77 e -5,62, respectivamente, sendo permitidas variações de até $\pm 15\%$ para todos os níveis a exceção do LIQ onde são admitidas variações de até $\pm 20\%$. Além disso, através da análise de variância foi verificado que não houve diferença entre os diferentes níveis (valor-*p* = 0,14), com nível de confiança de 95%.

Figura 24 - Gráfico da avaliação de normalidade dos resultados obtidos na exatidão método para determinação do teor de fluconazol em plasma (n=90)



Diferenças estatisticamente significativas para valor-p $\leq 0,05$ (n = 90).

Os dados da avaliação da estabilidade das soluções analíticas são mostrados na Tabela 12, onde é possível visualizar que não houve diferença estatisticamente significativa nos valores médios obtidos, dentro de 24 horas após preparo das mesmas, nas concentrações de 1,0 e 15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (valor-p $> 0,05$), com nível de significância de 95%.

Tabela 12 - Estabilidade das soluções analíticas, do método para determinação de teor de fluconazol em plasma

Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	Tempo (h)	¹ Repetibilidade		² Precisão intermediária		
		Percentual	CV %	Percentual	CV %	*Valor-p
1,0	0	103,24	4,03	102,62	3,06	0,37
	24	101,99	1,83			
15,0	0	104,27	2,36	103,90	1,77	0,55
	24	103,52	1,00			

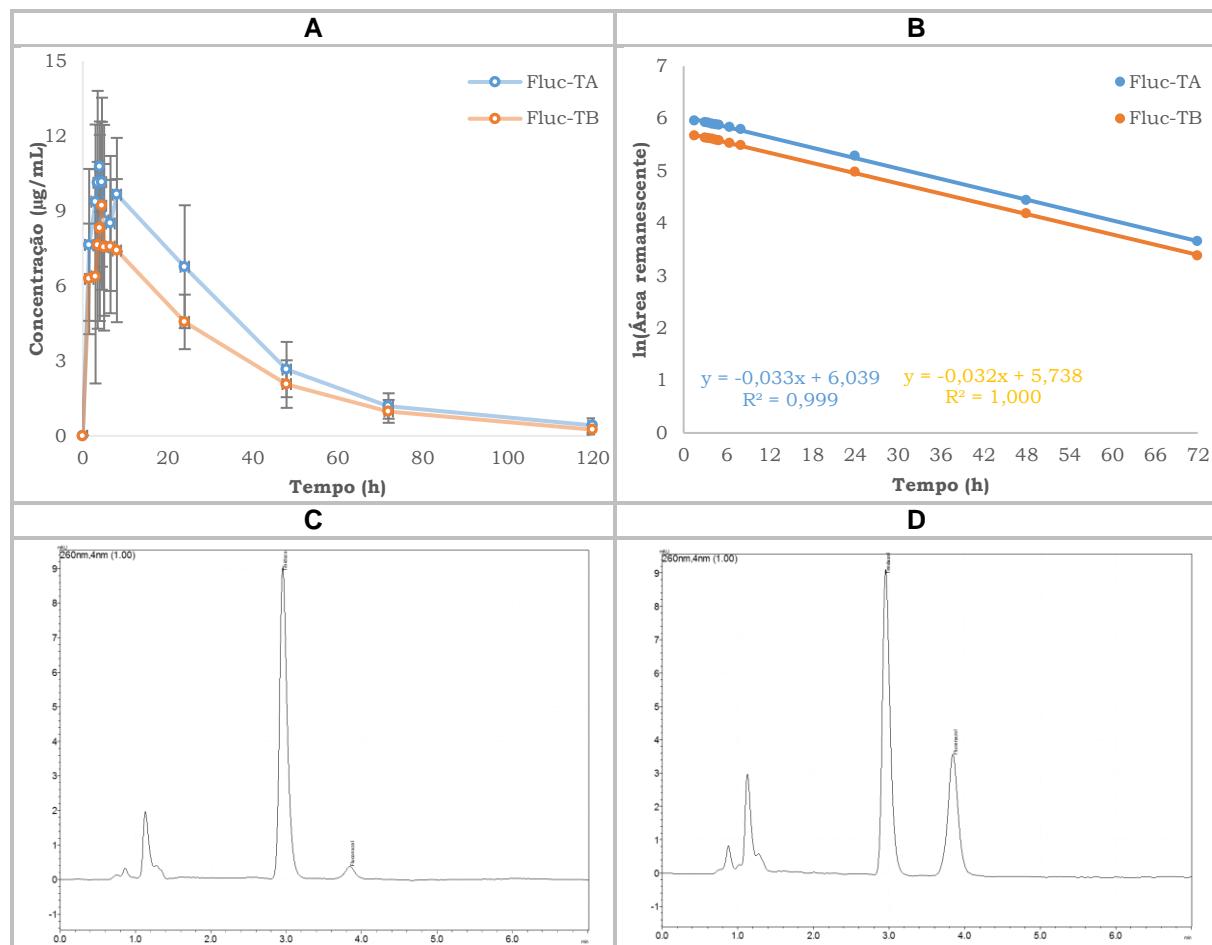
*Valores estatisticamente significativos para Valor-p $\leq 0,05$. ¹Valores médios obtidos a partir de n = 6 em cada tempo. ²Valores médios obtidos a partir de n = 12 em cada concentração.

Para os demais parâmetros da validação bioanalítica também foi verificado que os mesmos estavam dentro dos padrões estabelecidos no ICH Guidelines (2005) e Resolução RDC 27/12 da ANVISA (BRASIL, 20012), de modo que o método pode ser considerado adequado para realização de estudos de biodisponibilidade no plasma de coelho considerando as condições avaliadas.

5.3.3.2 Estudo de biodisponibilidade

A Figura 25 mostra as curvas médias de concentração plasmática versus tempo do fluconazol após a administração dos comprimidos contendo 50 mg de fluconazol (Fluc-TA e Fluc-TB) a coelhos Nova Zelândia, onde é possível visualizar diferenças entre os perfis plasmáticos.

Figura 25 – Concentração plasmática média versus tempo (A) \ln da área sob a curva remanescente versus tempo (B) após administração de comprimidos Fluc-TA e Fluc-TB contendo 50 mg de fluconazol em coelhos ($n = 12$) e cromatogramas representativos do fluconazol no plasma a 1 $\mu\text{g/mL}$ (C) e 10 $\mu\text{g/mL}$ (D)



A análise visual das curvas mostra diferenças na biodisponibilidade dos comprimidos em função da celulose utilizada na sua produção Figura 25(A). Na Figura 25(B) vemos que há paralelismo entre a área sob a curva dos dois lotes (coeficientes angulares -0,033 e -0,032 para as reta Fluc-TA e Fluc-TB), onde o Fluc-TA apresenta maior liberação que o Fluc-TB.

Foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade dos dados obtidos para C_{max} , t_{max} , $t_{1/2}$, ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} . Foi verificado que os parâmetros t_{max} e $t_{1/2}$ não apresentam distribuição normal (valor-p < 0,05), enquanto que os parâmetros C_{max} , ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} apresentam (valor-p > 0,05). Resultado mostrado na Tabela 13.

Tabela 13 - Estatística de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade dos parâmetros C_{max} , t_{max} , ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} encontrados para o Fluc-TA e Fluc-TB (n = 12)

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estatística	GL	Sig.	Estatística	GL	Sig.
C_{max} [Fluc-TA]	0,227	12	0,088	0,937	12	0,202
C_{max} [Fluc-TB]	0,197	12	0,200*	0,867	12	0,061
t_{max} [Fluc-TA]	0,235	12	0,065	0,850	12	0,037
t_{max} [Fluc-TB]	0,289	12	0,007	0,835	12	0,024
ASC_{0-t} [Fluc-TA]	0,184	12	0,200*	0,938	12	0,467
ASC_{0-t} [Fluc-TB]	0,203	12	0,184	0,927	12	0,352
ASC_{0-inf} [Fluc-TA]	0,162	12	0,200*	0,921	12	0,292
ASC_{0-inf} [Fluc-TB]	0,137	12	0,200*	0,939	12	0,490
$t_{1/2}$ [Fluc-TA]	0,230	12	0,079	0,824	12	0,018
$t_{1/2}$ [Fluc-TB]	0,350	12	0,000	0,691	12	0,001

* Este é um limite inferior da significância verdadeira. a. Correlação de Significância de Lilliefors

Os principais parâmetros farmacocinéticos médios com valores dos testes na análise estatística para comparação das formulações são mostrados na Tabela 14. A comparação de todos os parâmetros foi feita utilizando o teste não paramétrico de Wilcoxon, e para aqueles que apresentaram distribuição normal foi aplicado também o teste paramétrico (teste t de student bicaudal) para medidas repetidas.

A média \pm erro padrão do C_{max} para o Fluc-TA foi $12,28 \pm 0,77 \mu\text{g mL}^{-1}$, T_{max} $4,13 \pm 0,44$, ASC_{0-t} $394,07 \pm 29,50 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ h}$ e o $t_{1/2}$ $24,07 \pm 2,00 \text{ h}$. Estes resultados estão de acordo com relatos da literatura onde a descrição de que as concentrações

de fluconazol em plasma de coelho são mais elevadas que aquelas obtidas em humanos (LOUIE et al., 1998). As concentrações máxima, ASC_{0-t} , e $t_{1/2}$ do fluconazol (150 mg) em humanos relatada por Porta (1999) foram de $3,64 \mu\text{g mL}^{-1}$, $153,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ h e 29,99 h, respectivamente.

Tabela 14 - Parâmetros farmacocinéticos médios, em coelhos, após administração oral de um comprimido contendo 50 mg de fluconazol (n = 12)

Parameter	*Fluc-TA	*Fluc-TB	**Valor - p	***Valor - p
t_{\max} (h)	$4,13 \pm 0,44$	$4,33 \pm 0,43$	0,93	-
$t_{1/2}$ (h)	$24,07 \pm 2,00$	$27,40 \pm 5,01$	0,75	-
C_{\max} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	$12,37 \pm 0,73$	$9,88 \pm 1,06$	0,06	0,03
$ASC_{(0-t)}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$ h)	$394,11 \pm 29,48$	$294,20 \pm 21,76$	0,01	0,01
$ASC_{(0-\infty)}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$ h)	$410,41 \pm 29,92$	$308,19 \pm 21,50$	0,02	0,01

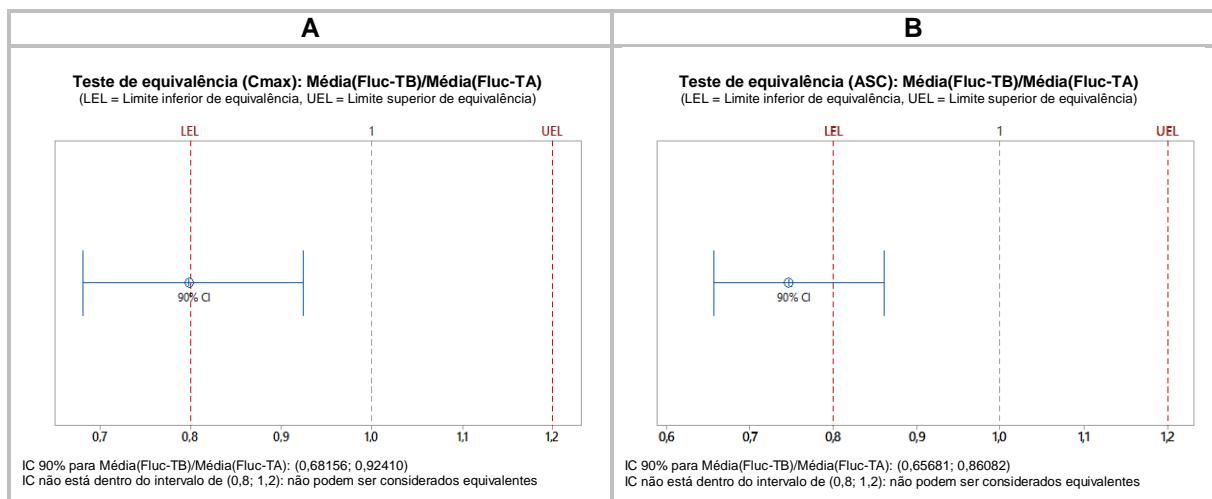
* Valores expressos como Média \pm erro padrão. **Valor-p $\leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo (teste não paramétrico). ***Valor-p $\leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo (teste paramétrico).

Os resultados mostram que as formulações são semelhantes em relação ao parâmetro médio t_{\max} e $t_{1/2}$, valor-p $> 0,05$, no teste não paramétrico. Em relação a $ASC_{(0-t)}$ e $ASC_{(0-\infty)}$ foi verificado que as diferenças encontradas foram estatisticamente significativas (valor-p $< 0,05$) nos dois testes. Para o C_{\max} foi verificado diferença quando aplicado o teste paramétrico.

A média aritmética (Figura 26A) e geométrica com seus respectivos intervalo de confiança (90%) para a razão do C_{\max} (C_{\max} Fluc-TB/ C_{\max} Fluc-TA) foi de 79,81 e 77,57% (médias), 68,16 e 66,66% (limite inferior) e 92,41 e 90,27% (limite superior), respectivamente. Para ASC_{0-t} a média aritmética (Figura 26B) e geométrica com seus respectivos intervalo de confiança (90%) da razão da ASC_{0-t} (ASC_{0-t} Fluc-TB/ ASC_{0-t} Fluc-TA) foi de 74,65 e 74,80% (médias), 65,68 e 62,95% (limite inferior) e 86,08 e 88,89% (Limite superior), respectivamente.

Como os intervalos de confiança da razão entre o C_{\max} e ASC_{0-t} do Fluc-TB/Fluc-TA apresentam limites inferior fora dos limites de equivalência (80 e 120) podemos considerar que eles diferem significativamente em relação a biodisponibilidade em coelhos.

Figura 26 – Intervalo de confiança de 90% para a razão Fluc-TB/Fluc-TA do Cmax(A) e ASC (B) obtidos após administração dos comprimidos Fluc-TA e Fluc-TB (50 mg de fluconazol) a coelhos (n = 12)



5.3.3.3 Correlação *In vitro*-*in vivo*

As diferenças verificadas entre as CMC (CMC101A e CMCB), através da microscopia eletrônica de varredura, da termogravimetria e difração de raio-x, descritas no 4.3.2, não resultou na obtenção de perfis de dissolução com diferenças significativas, como também aconteceu com a simvastatina. Quando administrados os comprimidos, entretanto, as diferenças entre as celuloses resultaram em perfis de biodisponibilidade diferentes, de modo que não foi possível estabelecer uma correlação entre os dados obtidos utilizando o método de dissolução e a absorção *in vivo*.

Sugere-se que essa diferença nas avaliações pode ser em função da dissolução ser realizada em condições que podem não refletir o ambiente após a administração. Na dissolução é utilizado um grande volume de líquido (água) comparado a quantidade utilizada para a administração no coelho (cinco mL) proporcionando concentrações acima da solubilidade aquosa do fluconazol, que conforme descrito varia entre 4,2 a 8,0 mg/mL dependendo do tipo de polimorfo e da temperatura (Park et al., 2010; Charoo et al., 2014), de modo que na administração sairia da condição *Sink* permitindo aparecer as diferenças de interação das celuloses com o insumo farmacêutico ativo.

Comportamento semelhante, foi descrito em estudo realizado por Bedor (2011) demonstrando que o único meio de dissolução que teve correlação da dissolução com a biodisponibilidade de comprimidos de efavirenz utilizava condições não *Sink*.

6 AVALIAÇÃO IN VITRO-IN VIVO DE COMPRIMIDOS DE LIBERAÇÃO IMEDIATA OBTIDOS UTILIZANDO INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO DA CLASSE BIOFARMACÊUTICA II E CELULOSE MICROCRISTALINA DE DIFERENTES ORIGENS

6.1 INTRODUÇÃO

Em todas as indústrias é evidente a importância do controle da qualidade para verificação da conformidade com os padrões estabelecidos, e está intimamente ligado ao fator econômico. Na indústria farmacêutica, a importância e o rigor com o controle da qualidade são bem maiores devido aos aspectos morais e éticos que estão relacionados com a produção de medicamentos.

A qualidade de um medicamento é dependente de vários fatores, incluindo as matérias-primas empregadas, de modo que a preocupação com a qualificação de fornecedores seja do insumo farmacêutico ativo ou dos excipientes utilizados na formulação, é justificada cientificamente pelo fato que diferenças nos processos tecnológicos empregados bem como a fonte de obtenção das matérias-primas pode ser suficiente para modificar suas características (THOORENS et al. 2014) e interferir na qualidade do produto final, seja *in vitro* e/ou *in vivo*.

Há vários relatos científicos de modificações, *in vitro*, nas características de diversos Insumos farmacêuticos ativos (IFAs) em formulações contendo celulose microcristalina (CMC), porém há escassez de estudos para avaliar sua influência *in vivo*.

Podczeck e Al-Muti (2010) avaliaram a influência de diferentes graus de celulose microcristalina e verificaram que presença de diferentes tamanhos de partícula da celulose microcristalina implicam em obtenção de comprimidos de camada dupla com características diferentes.

Laity et al. (2010) realizaram estudos para investigar estrutura intragrangular de celulose microcristalina e amido pré-gelatinizado.

Mihranyan et al. (2004) estudaram e verificaram diferenças na sorção de água da celulose microcristalina com diferentes graus de cristalinidade e de porosidade.

Chambin et al. (2004) verificaram a diferença de liberação da teofilina a partir de comprimidos obtidos utilizando diferentes derivados de celulose.

Steele et al. (2003) estudaram as características de adsorção de ativos em celulose microcristalina e celulose microcristalina silificada de diferentes fornecedores e diferentes lotes do mesmo fabricante e verificaram diferenças em relação ao fabricante e entre lotes do mesmo fabricante, concluindo que alteração na marca de CMC utilizada numa formulação pode ter um efeito significativo sobre a adsorção observada in vitro e, potencialmente, afetar a biodisponibilidade do IFA.

Suzuky e Nakagami (1999) estudaram o efeito da cristalinidade da celulose microcristalina na compactabilidade e dissolução de comprimidos de paracetamol e verificaram que o perfil de liberação do API pode ser modificado em função da alteração do grau de cristalinidade da celulose microcristalina.

O ibuprofeno é um antinflamatório não esteroidal, praticamente insolúvel em água, sendo classificado como classe II de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica.

Neste sentido, este trabalho objetivou avaliar a influência da celulose microcristalina (CMC), de diferentes origens, na cinética de liberação do insumo farmacêutico ativo ibuprofeno na forma farmacêutica comprimido visando estabelecer correlação in vitro-in vivo.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Reagentes, matérias-primas e formulações farmacêuticas

Foi utilizado um lote do insumo farmacêutico ativo ibuprofeno (Ibup-A), lotes de celulose microcristalina de dois diferentes fabricantes e duas formulações de comprimidos de liberação imediata do ibuprofeno (Ibup-TA e Ibup-TB). As formulações Ibup-TA e Ibup-TB foram desenvolvidas com o mesmo lote de ibuprofeno variando apenas o país de origem da celulose microcristalina. Foram utilizados os excipientes: CMC101A, CMC101B e croscarmelose de sódio. O solvente metanol grau HPLC foi obtido no comércio local (J.T.Baker). Água ultra-pura foi obtida utilizando um sistema de osmose reversa (Gehaka®, Brasil). Todos os outros reagentes químicos utilizados neste estudo foram de grau analítico.

6.2.2 Caracterização do insumo farmacêutico ativo

6.2.2.1 *Calorimetria exploratória diferencial*

As curvas calorimétricas foram obtidas utilizando um calorímetro exploratório diferencial (Shimadzu, model DSC-50) com as amostras acondicionadas em um porta amostra de alumínio. O calorímetro foi calibrado utilizando o ponto de fusão do zinco como padrão (156.6 ± 0.3 °C). O fluxo de calor foi calibrado utilizando a entalpia de fusão do índio (28.59 ± 0.3 J g⁻¹). As curvas foram conduzidas na faixa de temperatura de 25-450 °C na razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹ na atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL min⁻¹, para caracterização de diferenças polimórficas, com massas da amostras de 2.0 ± 0.1 mg. Os dados do DSC foram analizados usando o software Tasys® da Shimadzu.

6.2.2.2 *Termogravimetria dinâmica*

As curvas termogravimétricas dinâmicas foram obtidas em uma termobalança (Shimadzu, modelo TGA-50) utilizando porta amostra de alumina. O aparelho foi calibrado com oxalato de cálcio monohidratado. Os experimentos foram conduzidos no intervalo de temperatura de 25-550 °C na razão de aquecimento de 10 °C/min em ar sintético e nitrogênio com fluxo de 20 e 50 mL/min, respectivamente. A massa da amostra foi de $5,2 \pm 0,1$ mg. Os dados do DSC foram analizados usando o software Tasys® da Shimadzu.

6.2.2.3 *DSC acoplado a Sistema fotovisual (DSC-fotovisual)*

Os dados DSC-Fotovisual foram obtidos em um calorímetro diferencial de varredura (Shimadzu, modelo DSC-50) acoplado a um sistema fotovisual, equipado com um microscópio (Olympus, modelo SZ-CTV60) e uma câmera (Sony, modelo VCC-520). As amostras foram colocadas em um porta amostra aberto de alumínio e aquecidas no intervalo de temperatura de 25-250 °C com taxa de aquecimento de 10 °C/min, nas mesmas condições de fluxo de nitrogênio do DSC convencional. As fotos foram capturadas com o Software Asymetrix DVP 4,0 em tempo real para observar as transições de fase nas amostras.

6.2.2.4 Pirólise acoplada a Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa

Foi utilizado um pirolisador acoplado a um sistema de cromatografia gasosa (Shimadzu, GCMS-QP5050A), diretamente ligado a um espectrômetro de massas com detector de ionização eletrônica. A ionização dos componentes foi realizada por impacto eletrônico com energia de ionização de 70 eV. O espectrômetro foi operado no modo scan, varrendo uma faixa m/z 20-550. A temperatura da fonte de íons foi de 290°C. Foi utilizada uma coluna capilar com fase estacionária fenil:dimetilpolissiloxano (5:95), com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno. O programa de temperatura constou de dois segmentos: no primeiro a coluna foi aquecida a partir da temperatura inicial (100 °C) com uma taxa de aquecimento de 10°C/min até a temperatura final de 250 °C, e, no segundo foi mantida na temperatura isotérmica de 250 °C por 15 min. Hélio foi usado como gás de arraste com fluxo de 1 mL/min e razão de split de 1:5. A amostra correspondente a um cristal de ibuprofeno foi transferida para porta amostra de platina e introduzido no pirolisador à temperatura de 250° C.

6.2.3 Estudo de liberação do insumo farmacêutico ativo dos comprimidos

As características de dissolução foram obtidas utilizando o aparato pá (Nova Ética, Modelo 299), baseado no método descrito na farmacopeia americana USP35/NF30 (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2012). Foram utilizados dois meios de dissolução, o meio tampão fosfato pH 7,2 e água. Para ambos foi utilizado o volume de 900 mL, mantido a $37,0 \pm 0,5$ °C com rotação das pás a 50 rpm. Alíquotas de 2 mL foram retiradas do meio de dissolução em intervalos de tempo apropriados (5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 30,0; 45,0 e 60 minutos) e filtrados através de filtros de seringa (tamanho do poro de 0,45 µm). O volume equivalente de (2 mL) de meio de dissolução foi adicionado para compensar a retirada da amostra. As amostras foram diluídas em quantidades apropriadas do meio de dissolução e analisadas para determinar a quantidade de ibuprofeno dissolvida, utilizando o UV, no comprimento de onda de 221 nm. De modo a esclarecer o mecanismo de liberação dos comprimidos de ibuprofeno, os dados de dissolução foram avaliados nos modelos de ordem zero, primeira ordem, Hixson-Crowell, Higuchi, El-Yazigi, fator de diferença (f_1) e fator de similaridade (f_2),

utilizando as fórmulas da Tabela 2.1 (para os métodos modelo dependente), as Equações 2.3 e 2.4 para f_1 e f_2 , respectivamente, (para o modelo independente). Foi utilizada análise univariada e determinação ASC_{0-t} , para comparação dos perfis nos diferentes meios e comparar a relação de liberação.

6.2.4 Estudo de biodisponibilidade

6.2.4.1 *Animais*

Foram utilizados coelhos machos Nova Zelandia (n=12), pesando entre 3,5-4,5 kg. Todos os animais foram alojados individualmente em gaiolas padrão, por aproximadamente 30 dias antes dos experimentos submetidos a ciclos de 12 horas de claro/escuro, a temperatura ambiente da sala foi mantida a 22 ± 2 °C, sendo alimentados diariamente com ração padrão com acesso livre a água potável.

6.2.4.2 *Protocolo e procedimento in vivo*

Os experimentos foram realizados apenas após a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa Animal – CEPA da Universidade Federal da Paraíba – UFPB (**Certificado N° 0308/11**), seguindo padrões definidos (BLOOD COLLECTION GUIDELINES, 2011; JOSLIN, 2009; DIEHL et al., 2001). O estudo teve um delineamento experimental cruzado tipo 2 x 2. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos (6 animais cada) e cada animal recebeu uma das formas de comprimidos: comprimidos de ibuprofeno de liberação imediata Ibup-TA e Ibup-TB. Após um período de três semanas da administração da formulação inicial foi administrada a formulação alternada aos grupos.

Os coelhos foram mantidos em jejum por 12 h antes da administração dos comprimidos com livre acesso a água. As formulações foram administradas por via oral e subsequentemente lavadas com 5 ml de água. Após a administração cerca de 1,0 ml de amostra de sangue foi coletada através da artéria central da orelha utilizando scalp 21 G, com anestesia local com lidocaina-prilocaina 5% creme (EMLA®, AstraZeneca S.A) e transferidos para tubo contendo anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) em intervalos de tempo determinados (0,00; 0,50;

0,75; 1,00; 1,50; 3,00; 4,50; 6,00; 9,00 e 12,0 h). O plasma foi separado por centrifugação (4000 rpm, 15 min) e refrigerado a temperatura de -20 °C, por período máximo de uma semana, e descongelado apenas quando foi realizada a análise cromatográfica.

6.2.4.3 Análise do insumo farmacêutico ativo no plasma do coelho

6.2.4.3.1 Instrumentação e condições de operação

A quantificação do ibuprofeno nas amostra de plasma de coelhos foram analisados através de um cromatógrafo líquido de alta performance (CLAE) da Shimadzu equipado com um sistema de bombeamento de solvente LC-10AT, injetor manual, um sistema de degaseificação DGU-14A, um forno CTO-20A e detector SPD-10A UV-VIS usando indometacina como padrão interno. A coluna utilizada foi Phenomenex luna® C18 (250 mm x 4.6 mm d.i. preenchida com partículas 5 µm), com pré-coluna SecurityGuard Gemini® C18 (4 mm x 3.0 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm) adquirido da Maxcrom Instrumentos Científicos Ltda (São Paulo, SP, BR) mantida a temperatura de 40 °C. A fase móvel consistiu de uma mistura de ácido fosfórico/água/metanol (5/250/750, v/v). O volume de injeção foi de 20 µL, com fluxo de fase móvel de 1,2 mL min⁻¹. A detecção foi realizada na faixa ultravioleta do espectro eletromagnético a 220 nm. O software Class VP® (Shimadzu, Japan) foi utilizado para o controle dos parâmetros do CLAE e para a aquisição e análise dos dados.

6.2.4.3.2 Preparação das amostras

Alíquotas de 200 µL de plasma foram misturadas com 100 µL de ácido perclórico (1%), 100 µL de indometacina (50.0 µg mL⁻¹) como padrão interno e o volume completado para 2 mL com acetonitrila. As amostras foram agitadas em vortex por 1 minuto seguido de centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos para precipitar as proteínas. Após centrifugação a camada sobrenadante foi filtrada através de filtro de seringa PTFE com poros de 0,45 µm. Alíquotas de 20 µL foram injetadas no sistema cromatográfico.

6.2.4.3.3 Validação do método

O método foi desenvolvido e validado de acordo com procedimentos padrão (BRASIL, 2012). A linearidade e o intervalo foram determinados a partir da construção da curva de calibração, obtidas em triplicatas em oito níveis de concentrações diferentes (0,05; 0,10; 0,50; 1,00; 2,50; 5,00; 6,25 e 7,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A precisão foi verificada para repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada pela análise de cinco concentrações diferentes (0,05; 0,10; 1,00; 5,00 e 6,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em sextuplicatas no mesmo dia. A precisão intermediária foi avaliada pela repetição das concentrações em três dias diferentes. A exatidão foi avaliada pela análise da variação das amostras em sextuplicantas intra e inter-dias em três dias diferentes nas mesmas concentrações utilizadas na precisão. O limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foi identificado como sendo a menor concentração do plasma da curva de calibração que pode ser medida com exatidão, precisão e repetibilidade. A avaliação da estabilidade do insumo farmacêutico ativo nas soluções analíticas e modificações de parâmetros foi avaliado em concentrações conhecidas de 1,0 $\mu\text{g/ml}$ ($n = 3$ para cada condição). Os demais parâmetros seguiram conforme a resolução.

6.2.4.3.4 Análise farmacocinética

As características farmacocinéticas obtidas no plasma de coelhos após os dois tratamentos foram estimados para cada animal utilizando o PKSolver, um suplemento livre escrito em Visual Basic for Applications (VBA) para software Microsoft Excel, desenvolvido por Zhang et al. (2010). Foi usado o modelo de análise não compartimental. O C_{max} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e t_{max} (h) foram a concentração máxima do insumo farmacêutico ativo e tempo necessário para obtê-la, respectivamente, obtidos diretamente dos dados originais. A área sob a curva, ASC_{0-t} ($\mu\text{g mL}^{-1}\text{h}$) foi determinada como a área sob a curva da concentração plasmática em função do tempo até o último tempo analisado, calculada pelo método trapazoidal. A área sob a curva do tempo zero ao infinito, $ASC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}\text{h}$), foi calculada pela expressão $ASC_{0-\infty} = ASC_{0-t} + Ct / k$ onde C_t é a última concentração medida no tempo t , e k é a constante de eliminação final estimado por análise de regressão linear dos dados

transformados (logN) da fase de eliminação no gráfico concentração-tempo. A meia vida plasmática ($t_{1/2}$) foi calculada por $t_{1/2} = 0,693/k$. A biodisponibilidade relativa foi calculada através da fórmula $f_{rel(B/A)} = (ASC_{Fluc-TB} / ASC_{Fluc-TA}) \times 100$.

6.2.5 Análise estatística

A comparação entre os perfis de dissolução foi feita através de ANOVA univariada, modelo independente fator de diferença (f_1) e fator de semelhança (f_2) calculados através das Equações 4.1. e 4.2, respectivamente. O fator de diferença calcula o percentual de diferença entre duas curvas em cada tempo e é uma medida do erro relativo entre as duas curvas (Equação 1):

Onde, n é o número de pontos do tempo t , R_f é a quantidade dissolvida do lote de referência no tempo t , e T_t é a quantidade dissolvida do lote teste no tempo t .

O fator de similaridade é a transformação logarítmica recíproca da raiz quadrada da soma dos quadrados dos erros e é a medida da similaridade da porcentagem de dissolução entre as duas curvas, calculadas usando a equação Equação 11.

$$f_1 = \left[\left(\sum_{i=1}^n |R_f - T_t| \right) / \left(\sum_{i=1}^n R_f \right) \right] * 100 \quad \text{Equação 11}$$

$$f_2 = 50 * \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) * \sum_{i=1}^n (R_f - T_t)^2 \right]^{-0.5} * 100 \right\} \quad \text{Equação 12}$$

Geralmente, f_1 com valores até 15 (0-15) e f_2 com valores maiores que 50 (50-100) garantem igualdade ou equivalência entre as curvas.

Os dados da validação foram avaliados quanto a normalidade e a comparação entre grupos feita através de ANOVA. Os dados da linearidade foram avaliados através da análise de resíduos e ANOVA para verificar o ajuste do modelo.

Estatística descritiva foi obtida para todos os dados. Os parâmetros farmacocinéticos foram avaliados utilizando testes não paramétricos e para aqueles que demonstraram distribuição normal, avaliada através dos testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov, foram avaliados utilizando teste t student. Os parâmetros $C_{máx}$, ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} foram comparados seguindo um modelo não compartimental para um desenho cruzado 2x2 levando em consideração os efeitos de período, sequência e formulação. Foram estabelecidos intervalos de confiaça de 90% para as razões entre as médias aritmética e geométrica do $C_{máx}$, ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} , entre Fluc-TA

(considerado como referência) e Fluc-TB (considerado como teste). Foram utilizados os softwares Minitab 17® e o SPSS® 22.

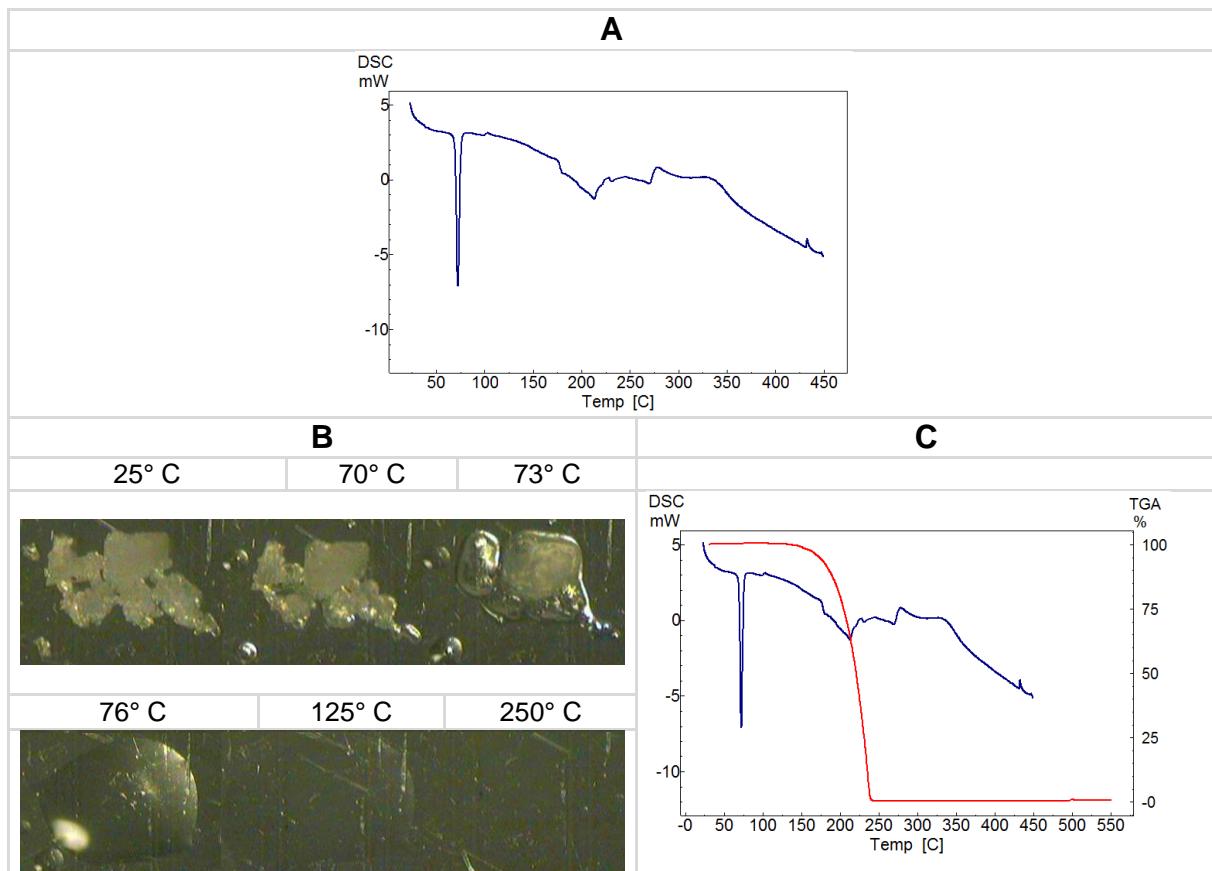
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Caracterização do insumo farmacêutico ativo

6.3.1.1 *Calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria e DSC-fotovisual*

A análise das curvas calorimétricas na razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, mostrada na Figura 27A revelou a existência de duas transições endotérmicas.

Figura 27 - Curva calorimétrica (A), imagens de DSC-fotovisual (B) e curva termogravimétrica (C) do ibuprofeno



A primeira, mais estreita e definida no intervalo de 70-76 °C com pico em $73,16\pm0,67$ °C corresponde ao processo de fusão do ibuprofeno, confirmado através do DSC-fotovisual que mostra o início, meio e fim da fusão nessa faixa de temperatura

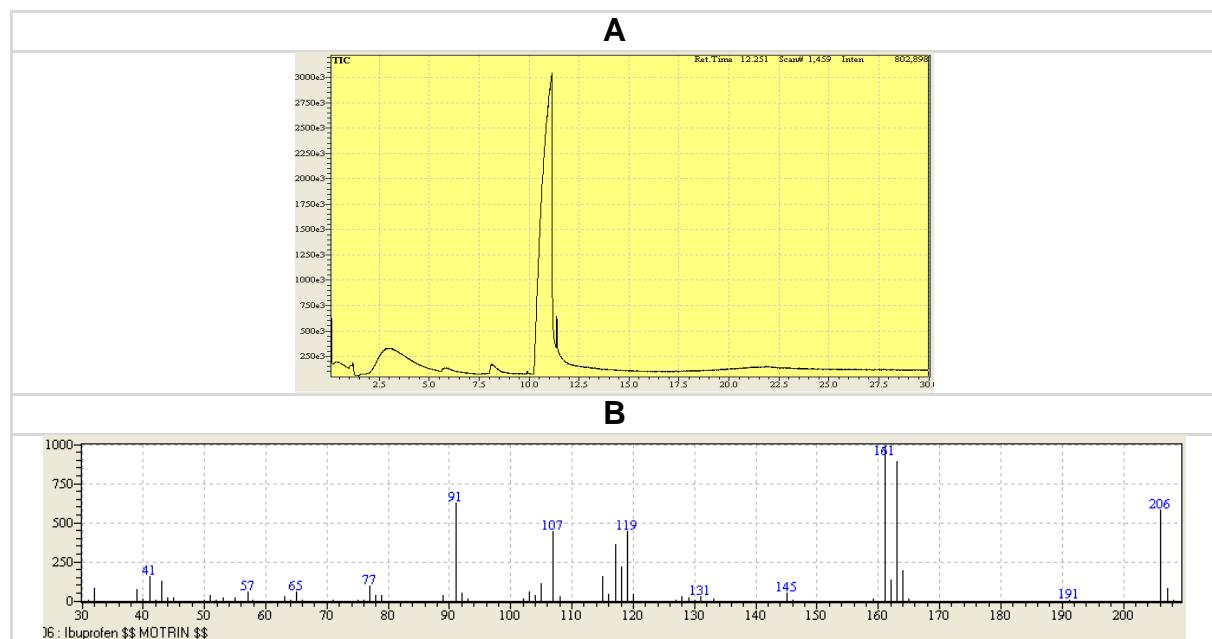
(Figura 27B). A segunda, com pico em 212° C, coincide com a perda de massa do ibuprofeno na termogravimetria dinâmica (Figura 27C) com início em aproximadamente 125 °C e fim em 245 °C.

A perda de massa em uma única etapa associado a observação no DSC fotovisual da rápida perda de todo o conteúdo, é sugestivo de que a perda de massa ocorreu por vaporização direta da molécula de ibuprofeno.

6.3.1.2 Pirólise acoplada cromatografia gasosa/espectrometria de massa

Foi utilizado pirólise acoplada a cromatografia gasosa/espectrometria de massa para verificar se a perda de massa ocorreu realmente por vaporização ou degradação. O pirograma mostrado na Figura 28A mostra um pico, em aproximadamente 11 minutos, identificado através do espectro de massa (Figura 28B) como sendo o ibuprofeno, confirmando a perda por vaporização observado no DSC-fotovisual e na termogravimetria dinâmica em uma única etapa.

Figura 28 – Pirogramas (A) e espectro de massa (B) obtido a 250°C para o ibuprofeno



6.3.2 Caracterização da forma farmacêutica e mecanismo de liberação do insumo farmacêutico ativo

Na Tabela 15 são visualizados os resultados obtidos para o peso médio, dureza, friabilidade, desintegração, doseamento e uniformidade de dose para os comprimidos

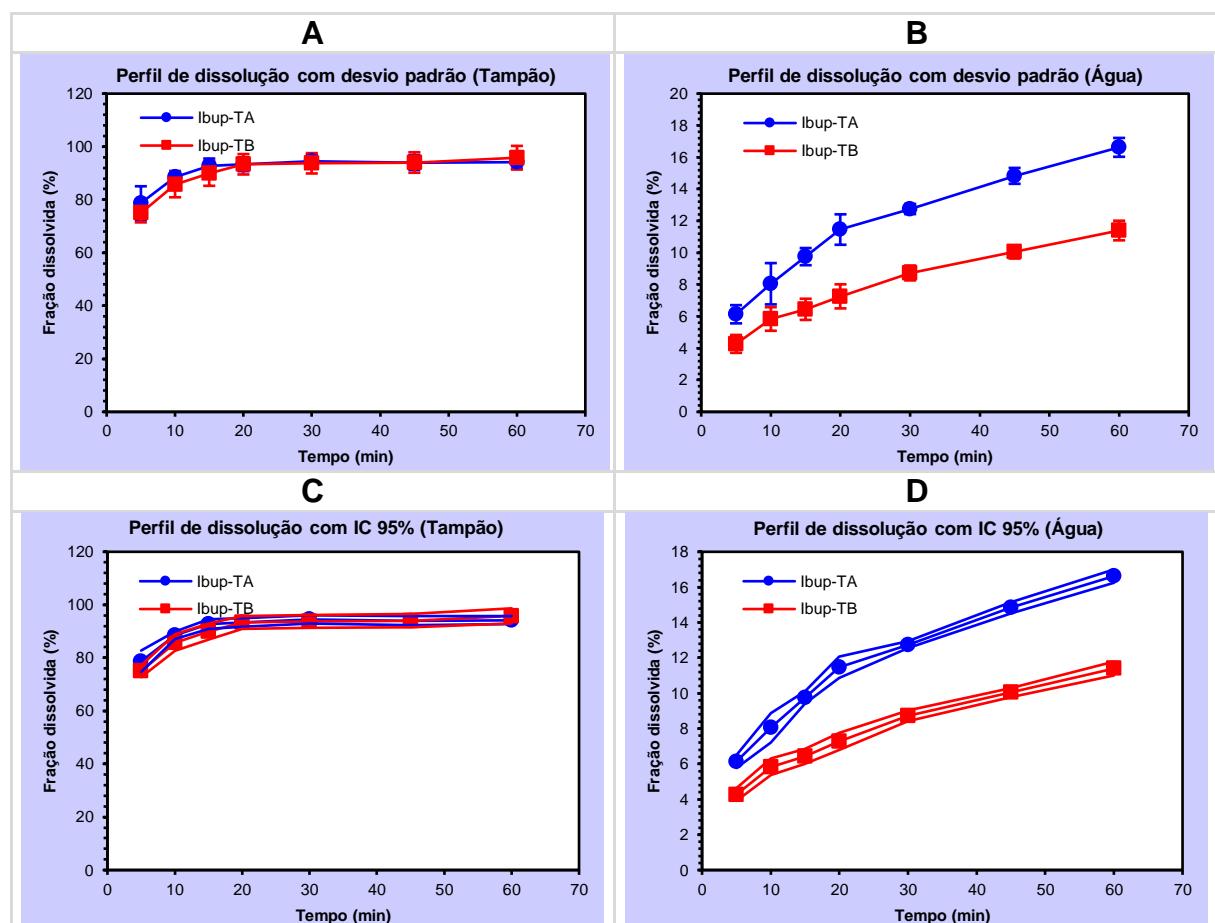
Ibup-TA e Ibup-TB. Os resultados mostraram conformidade com os critérios de aceitação de todos os parâmetros.

Tabela 15 - Avaliação do peso médio, dureza, friabilidade, desintegração e uniformidade de dose dos diferentes comprimidos

Parâmetro	Critério de aceitação	Ibup-TA	Ibup-TB
Peso médio (mg)	300 ± 15	$305,8 \pm 5,7$	$304,5 \pm 4,5$
Dureza (kgf)	$\geq 3,0$	$6,8 \pm 0,7$	$5,4 \pm 1,0$
Friabilidade (%)	$\leq 1,5$	0,9	0,2
Desintegração (min)	≤ 30	$0,9 \pm 0,6$	$0,8 \pm 0,7$
Doseamento (%)	90-110	$98,2 \pm 1,2$	$99,1 \pm 1,1$
Uniformidade de dose (VA)	≤ 15	4,7	6,3

A Figura 29(A-B) mostra os perfis das curvas médias de liberação % em função do tempo, com intervalo de confiança de 95%, nos meios de dissolução tampão fosfato pH 7,2 e água para os comprimidos Ibup-TA e Ibup-TB.

Figura 29 - Curvas médias de liberação do Ibup-TA e Ibup-TB com desvio padrão para tampão fosfato pH 7,2 (A) e água (B). Curvas médias de liberação do Ibup-TA e Ibup-TB com intervalos de confiança de 95% para tampão fosfato pH 7,2 (C) e água (D), (n=12 para cada formulação)

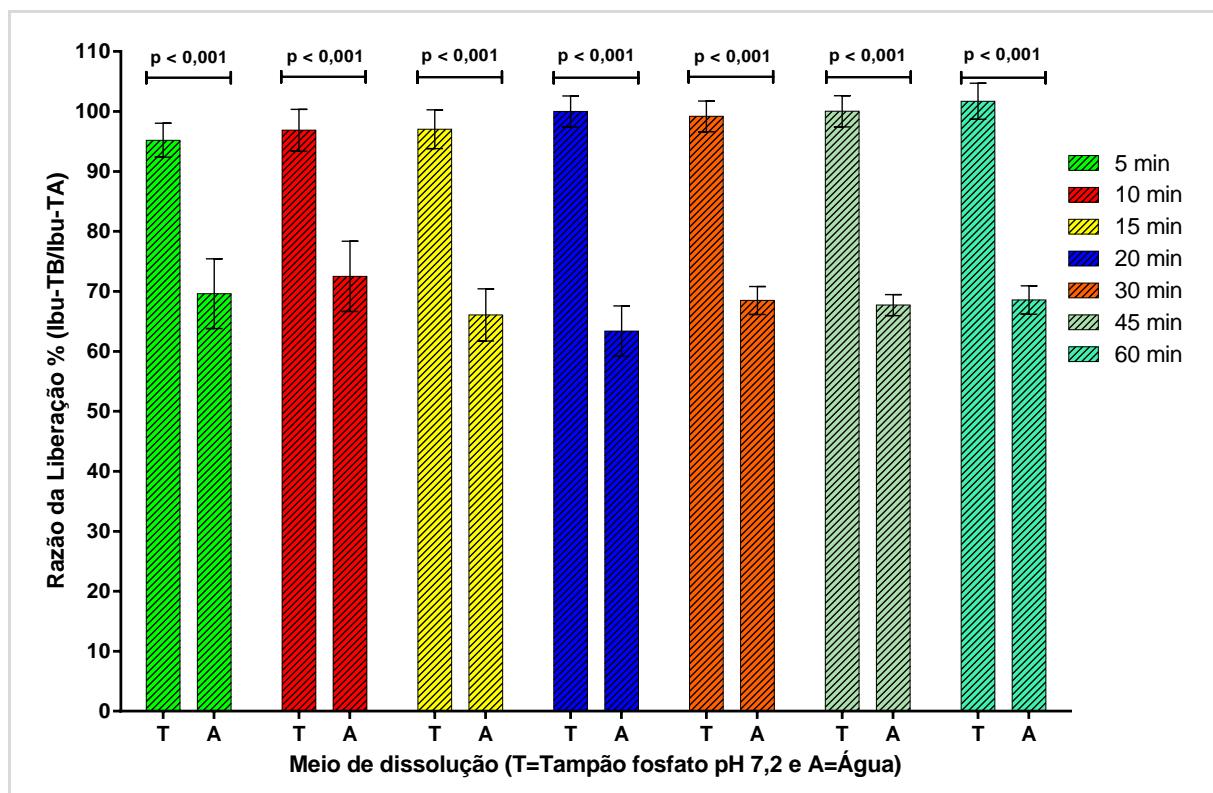


A Figura 30 mostra a relação (% dissolvido até o tempo t do Ibup-TB/Ibup-TA) entre os valores médios de cada tempo nos meios tampão fosfato pH 7,2 e água, com intervalo de confiança de 95%, onde é possível observar capacidade discriminante na água e não no tampão fosfato.

Estes dados estão de acordo com o que é relatado na literatura que mostra maior poder discriminante para a água e meios com pH ácido para o ibuprofeno, que tem sua solubilidade pH dependente (POTTHAST et al., 2005).

A média geométrica com respectivos intervalos de confiança de 90% para a relação na água e tampão fosfato pH 7,2 foi de 69,4 e 95,39% (média), 63,31 e 91,16% (limite inferior), 76,07 e 99,82% (limite superior), respectivamente.

Figura 30 – Razão entre o resultado obtido Ibup-TB/Ibup-TA para o valor médio ASC_{0-t} nos meios tampão fosfato pH 7,2 e água ($n=12$ comprimidos de cada lote em cada tempo)



Para avaliar a similaridade e o mecanismo de liberação do insumo farmacêutico ativo dos comprimidos, em tampão fosfato pH 7,2 e água, foram aplicados modelos dependente e independente conforme Tabelas 16, 17 e 18.

Os dados mostram que não houve diferença significativa entre os perfis de dissolução no tampão fosfato pH 7,2, pois para todos os tempos o valor-p > 0,05 na análise univariada (Tabelas 16), $f_1 < 15$ e $f_2 > 50$ (17). Para a água foi demonstrado

diferença, sendo em todos os tempos o valor-p < 0,05 na análise univariada (Tabelas 16), $f_1 > 15$ e $f_2 > 50$ (Tabelas 18).

Quando avaliados através dos diferentes modelos dependentes, foi verificado que para as duas formulações o modelo que mais se adequa, para explicar a liberação na água, é o de Higuchi para os quais foram obtidos $r^2 \geq 0,99$. No tampão fosfato pH 7,2 nenhum dos modelos testados apresentou $r^2 > 0,75$ demonstrando diferença na cinética de liberação conforme o meio.

Tabela 16 – Resultados obtidos para comparação dos perfis de dissolução do ibuprofeno Ibup-TA e Ibup-TB, em tampão fosfato pH 7,2 e água, através de análise univariada

Tampão fosfato pH 7,2						Água					
ANOVA Univariada: 5min						ANOVA Univariada: 5min					
Fonte	SQ	GL	MQ	valor-F	valor-p	Fonte	SQ	GL	MQ	valor-F	valor-p
Formulação	85,32	1	85,32	3,25	0,09	Formulação	20,82	1,00	20,82	64,61	0,00
Resíduo	577,58	22	26,25			Resíduo	7,09	22,0	0,32		
Total	662,92	23				Total	27,91	23,0			
ANOVA Univariada: 10min						ANOVA Univariada: 10min					
Fonte	SQ	GL	MQ	valor-F	valor-p	Fonte	SQ	GL	MQ	valor-F	valor-p
Formulação	46,14	1	46,14	3,22	0,09	Formulação	29,41	1,00	29,41	26,31	0,00
Resíduo	315,54	22	14,34			Resíduo	24,59	22,0	1,12		
Total	361,67	23				Total	54,00	23,0			
ANOVA Univariada: 15min						ANOVA Univariada: 15min					
Fonte	SQ	GL	MQ	valor-F	valor-p	Fonte	SQ	GL	MQ	valor-F	valor-p
Formulação	44,63	1	44,63	2,95	0,10	Formulação	65,82	1,00	65,82	179,76	0,00
Resíduo	332,58	22	15,12			Resíduo	8,06	22,0	0,37		
Total	377,21	23				Total	73,88	23,0			
ANOVA Univariada: 20min						ANOVA Univariada: 20min					
Fonte	SQ	GL	MQ	valor-F	valor-p	Fonte	SQ	GL	MQ	valor-F	valor-p
Formulação	0,000994	1	0,0009	9,26E-05	0,99	Formulação	105,73	1,00	105,73	141,99	0,00
Resíduo	236,15	22	10,73			Resíduo	16,38	22,0	0,74		
Total	236,1549	23				Total	122,11	23,0			
ANOVA Univariada: 30min						ANOVA Univariada: 30min					
Fonte	SQ	GL	MQ	valor-F	valor-p	Fonte	SQ	GL	MQ	valor-F	valor-p
Formulação	3,51	1	3,51	0,34	0,57	Formulação	96,88	1,00	96,88	607,47	0,00
Resíduo	227,40	22	10,34			Resíduo	3,51	22,0	0,16		
Total	230,91	23				Total	100,39	23,0			
ANOVA Univariada: 45min						ANOVA Univariada: 45min					
Fonte	SQ	GL	MQ	valor-F	valor-p	Fonte	SQ	GL	MQ	valor-F	valor-p
Formulação	0,001814	1	0,0018	0,000161	0,99	Formulação	137,49	1,00	137,49	660,36	0,00
Resíduo	248,43	22	11,29			Resíduo	4,58	22,0	0,21		
Total	248,44	23				Total	142,07	23,0			
ANOVA Univariada: 60min						ANOVA Univariada: 60min					
Fonte	SQ	GL	MQ	valor-F	valor-p	Fonte	SQ	GL	MQ	valor-F	valor-p
Formulação	15,81	1	15,81	1,22	0,28	Formulação	163,95	1,00	163,95	448,53	0,00
Resíduo	286,09	22	13,00			Resíduo	8,04	22,0	0,37		
Total	301,91	23				Total	171,99	23,0			

¹Valores estatisticamente significativos para valor-p $\leq 0,05$ (n=12 comprimidos de cada lote em cada tempo).

Tabela 17 – Resultados obtidos para determinação do mecanismo de liberação do insumo farmacêutico ativo das formulações usando métodos modelo dependente e independente através dos fatores de diferença (f_1) e de similaridade (f_2) para Ibup-TA versus Ibup-TB (meio de dissolução tampão fosfato)

Modelo	Estatística	Ibup-TA	Ibup-TB
Ordem zero	Valor- p^1	<0,01	<0,01
	r^2	0,42	0,56
	Equação	$y = 0,1866x + 85,93$	$y = 0,2745x + 82,405$
Primeira ordem	Valor- p^1	<0,01	<0,01
	r^2	0,41	0,54
	Equação	$y = 0,0021x + 4,4512$	$y = 0,0032x + 4,4094$
Hixson-Crowell	Valor- p^1	<0,01	<0,01
	r^2	0,42	0,55
	Equação	$y = 0,0032x + 4,4105$	$y = 0,0047x + 4,3494$
El-Yazigi	Valor- p^1	<0,01	<0,01
	r^2	0,51	0,75
	Equação	$y = -0,0177x + 2,5577$	$y = -0,0266x + 2,8649$
Higuchi	Valor- p^1	<0,01	<0,01
	r^2	0,57	0,70
	Equação	$y = 2,2065x + 80,247$	$y = 3,1251x + 74,627$
Modelo independente	f_1	1,84	-
	f_2	81,19	-

¹Valores estatisticamente significativos para valor- $p \leq 0,05$ ($n = 12$ para cada condição).

Tabela 18 – Resultados obtidos para determinação do mecanismo de liberação do insumo farmacêutico ativo das formulações usando métodos modelo dependente e independente através dos fatores de diferença (f_1) e de similaridade (f_2) para Ibup-TA versus Ibup-TB (meio de dissolução água)

Modelo	Estatística	Ibup-TA	Ibup-TB
Ordem zero	Valor- p^1	<0,01	<0,01
	r^2	0,94	0,96
	Equação	$y = 0,1803x + 6,6072$	$y = 0,1226x + 4,4717$
Primeira ordem	Valor- p^1	<0,01	<0,01
	r^2	0,85	0,89
	Equação	$y = 0,0162x + 1,9528$	$y = 0,016x + 1,5732$
Hixson-Crowell	Valor- p^1	<0,01	<0,01
	r^2	0,89	0,92
	Equação	$y = 0,012x + 1,9079$	$y = 0,0104x + 1,6795$
El-Yazigi	Valor- p^1	<0,01	<0,01
	r^2	-0,95	-0,97
	Equação	$y = -0,002x + 4,5378$	$y = -0,0013x + 4,5599$
Higuchi	Valor- p^1	<0,01	<0,01
	r^2	0,99	1,00
	Equação	$y = 1,8843x + 2,3075$	$y = 1,2699x + 1,6035$
Modelo independente	f_1	32,18	-
	f_2	70,04	-

¹Valores estatisticamente significativos para valor- $p \leq 0,05$ ($n = 12$ para cada condição).

6.3.3 Estudo in vivo

6.3.3.1 Desenvolvimento e validação do método bioanalítico

Durante o desenvolvimento do método bioanalítico foram testados diferentes sistemas solvante (dichlorometano, acetato de etila e acetonitrila), substância a ser utilizada como padrão interno e fase móvel. Optou-se pela precipitação das proteínas e injeção direta porque foi a que apresentou maior recuperação e reprodutibilidade, além de não utilizar aquecimento para secagem da amostra contendo ibuprofeno que tem ponto de fusão entre nas proximidades de 73 °C, conforme mostrado na calorimetria exploratória diferencial. Como padrão interno foi testado indometacina e nimesulida. Optou-se pela indometacina em função da melhor separação do pico em relação ao ibuprofeno e picos interferentes do plasma, pois os demais apresentavam tempos de retenção muito curtos.

Para utilização como fase móvel foi testado acetonitrila e metanol como fase orgânica, com ácido e sem ácido. A proporção mistura ácido fosfórico/água/metanol (5/250/750: v/v) foi a que apresentou melhor performance, pois sem ácido começou a formação de calda no pico do ibuprofeno e utilizando acetonitrila as substâncias testadas como padrão interno saiam na área dos picos do plasma.

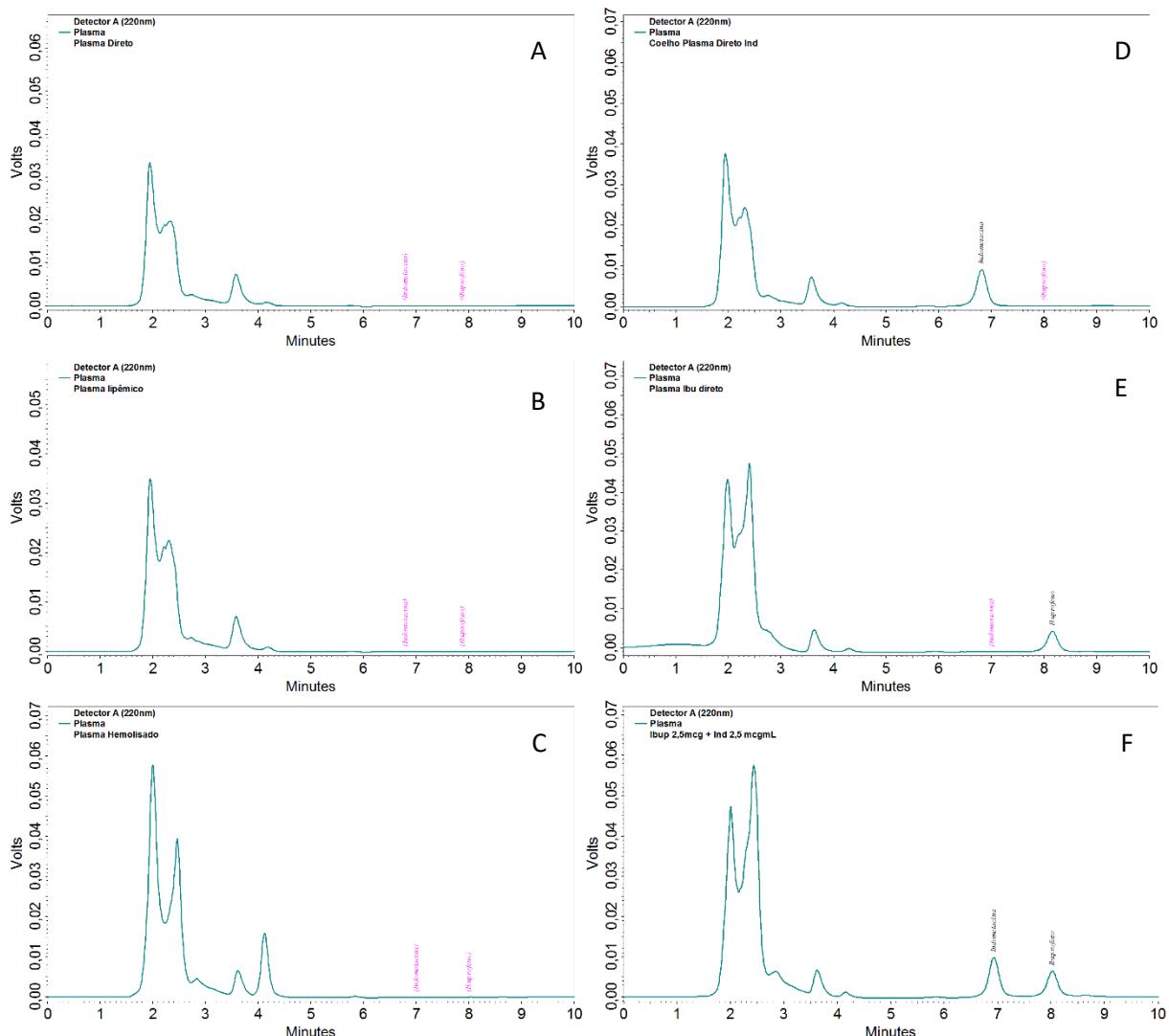
Foram testadas colunas Hypersil®, Gemini NX® e Luna®, todas com empacotamento octadecilsilano. Optou-se pela Luna® em função de ser a que apresentou menor tempo de análise e melhor separação entre os picos do ibuprofeno e indometacina entre eles e os possíveis picos interferentes do plasma.

A Figura 31 mostra os resultados obtidos para análise da especificidade/seletividade do método bioanalítico utilizado. Através da análise visual dos cromatogramas podemos observar que não houve presença de picos interferentes no tempo de retenção correspondente ao ibuprofeno e/ou a indometacina, tanto para amostras de plasma normal quanto para amostras hemolisadas ou lipêmicas, bem como após contaminação do plasma com os analitos isolados.

Conforme definido na Resolução - RDC 27/2012 (BRASIL, 2012) e no European Medicines Agency (2011), os padrões de calibração são considerados aprovados, para construção das curvas, quando atenderem a dois critérios: o primeiro deles refere-se ao desvio máximo permitido para o Limite Inferior de Quantificação

(LIQ), o qual deve ser menor ou igual a 20% (vinte por cento) em relação à concentração nominal; o segundo é relacionado aos demais níveis utilizados na curva de calibração para os quais o desvio máximo deve ser menor ou igual a 15% (quinze por cento).

Figura 31 - Cromatogramas obtidos após injeção de 20 μ L de amostras de plasma de coelhos normal (A), lipêmica (B), hemolisada (C), plasma adicionado com indometacina (2,5 μ g/mL) (D), ibuprofeno (2,5 μ g/mL) (E) e indometacina/ibuprofeno (2,5/2,5 μ g/mL) (F).

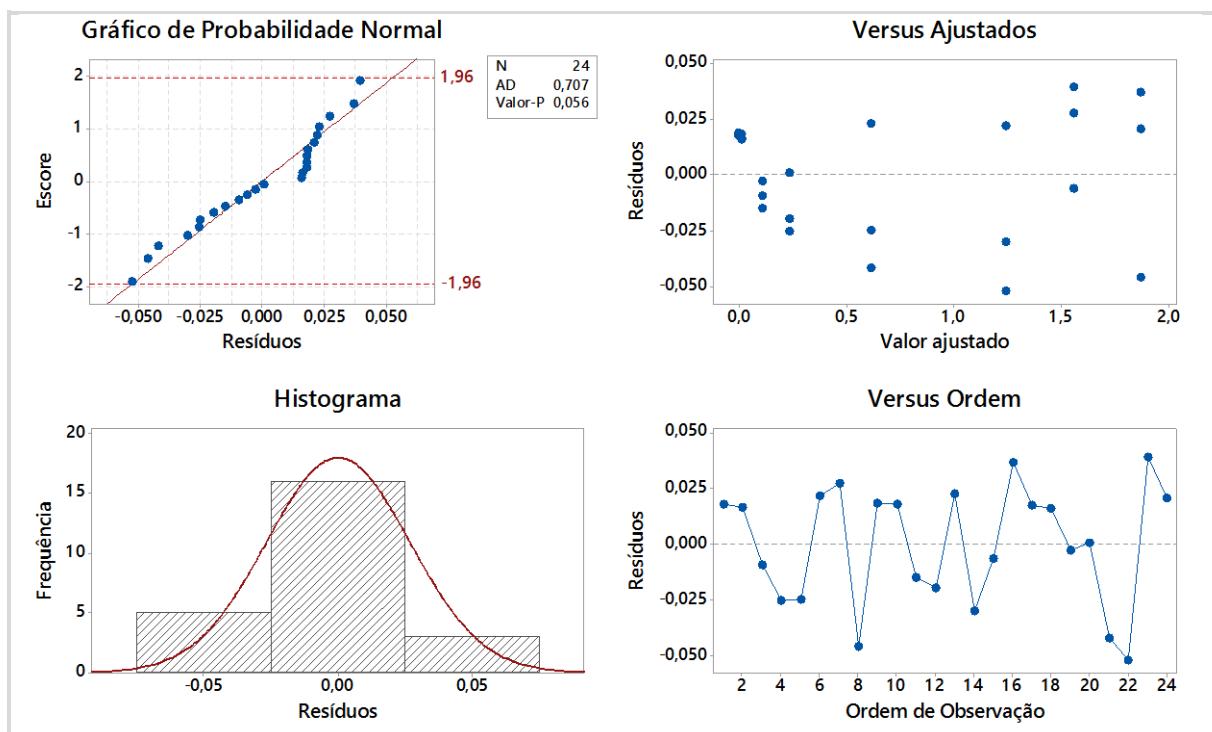


Estes critérios foram obedecidos, pois para o LIQ e para os demais níveis os maiores desvios em relação ao valor nominal, em módulo, foram de (12,8 e 11,4%), permitindo assim a construção e avaliação da linearidade do método através dos dados obtidos.

Os resultados obtidos, para as três curvas de calibração, pelo método dos mínimos quadrados mostrou a existência de correlação positiva significativa entre o aumento da razão da área de pico do ibuprofeno/indometacina (padrão interno) com coeficiente de correlação linear igual a 0,9983.

Para avaliar a aplicabilidade do modelo de ajuste linear, os resíduos foram avaliados quanto à normalidade conforme mostrado na Figura 32 e pela análise de variância (Tabela 19) pôde-se testar a linearidade do método e a significância estatística da curva ajustada.

Figura 32 - Gráfico da avaliação de normalidade dos resíduos da regressão linear do método para determinação de teor de ibuprofeno em plasma (n=24)



Diferenças estatisticamente significativas para valor-p $\leq 0,05$ (n = 24).

Os resíduos apresentaram distribuição normal (valor-p = 0,06), a regressão é significativa (valor-p = 0,00) e não houve falta de ajustes para o modelo aplicado (valor-p = 0,25).

Desse modo, os parâmetros da reta, obtidos através do ajuste linear dos dados, são adequados para explicar o aumento de sinal (área) do pico em função do aumento da concentração do analito nas soluções analisadas com intervalo de confiança de 95%.

Tabela 19 – Tratamento estatístico obtido por ANOVA fator único para a regressão linear do método para determinação do teor de ibuprofeno em plasma

Fonte	GL	SQ	MQ	$F_{calulado}$	¹ valor-p	$F_{tabelado}$
Modelo	1	11,9147	11,9147	15972,60	0,000	4,301
Resíduo	22	0,0164	0,0007	<i>Curva Linear</i>		
Falta de ajuste	6	0,0058	0,0010	1,47	0,250	2,741
Erro puro	16	0,0106	0,0007	<i>Não há falta de ajuste</i>		
Total	23	11,9311				

¹Valores estatisticamente significativos para Valor-p ≤ 0,05 (n = 24).

A precisão do método foi avaliada em dois diferentes níveis, a repetibilidade que avalia as variações intra corrida e a precisão intermediária que avalia as variações itercorridas. Ambas foram avaliadas considerando cinco diferentes concentrações (0,05; 0,10; 1,00; 5,00 e 6,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em três dias diferentes. Na Tabela 20 estão apresentados os resultados obtidos para a repetibilidade e a precisão intermediária do método bioanalíticos proposto.

Tabela 20 – Repetibilidade e precisão intermediária, do método para determinação de teor de ibuprofeno em plasma

Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	Dia	¹ Repetibilidade		² Precisão intermediária		
		Recuperação %	CV%	Recuperação %	CV %	*Valor-p
0,05	1	101,05	8,62			
	2	96,59	7,20	98,10	8,02	0,57
	3	96,65	8,68			
0,10	1	96,79	4,50			
	2	97,83	5,18	96,19	4,73	0,33
	3	93,96	4,28			
1,00	1	97,30	4,40			
	2	97,36	3,05	97,84	3,47	0,60
	3	98,87	3,22			
5,00	1	96,23	3,21			
	2	96,05	3,03	96,72	3,11	0,62
	3	97,89	3,28			
6,25	1	100,20	2,25			
	2	96,15	2,16	99,30	3,79	0,06
	3	101,55	4,39			

^{**}Valores estatisticamente significativos para valor-p ≤ 0,05 (n = 18 para cada concentração).

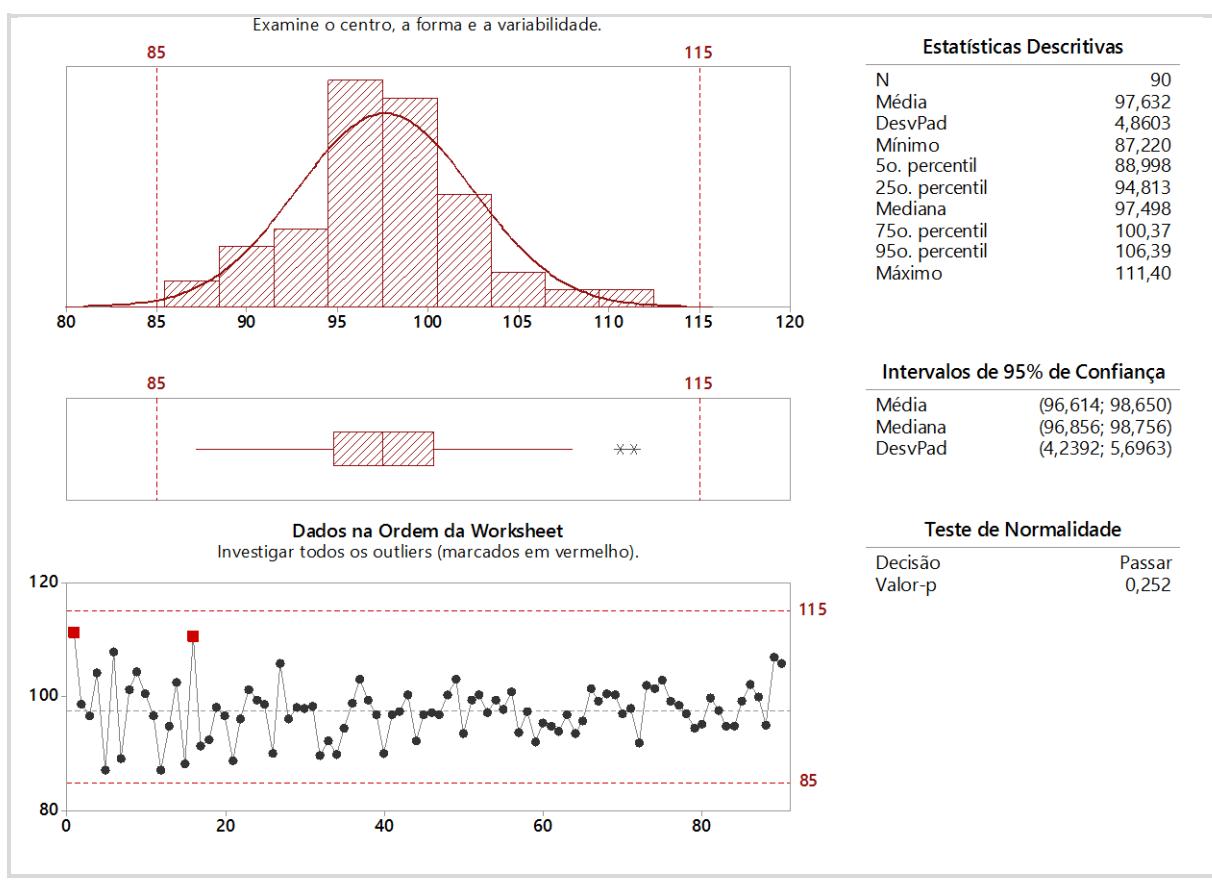
¹Valores médios obtidos a partir de n = 6 em cada dia. ²Valores médios obtidos a partir de n = 18 em cada concentração.

Os dados da precisão foram avaliados em relação a normalidade (Figura 33), onde foi verificado que os mesmos cumprem com esse requerimento (valor-p = 0,25), com nível de confiança de 95%.

Foi verificado que dois valores foram considerados como possíveis *outliers*. Estes foram avaliados utilizando testes específicos para tal e foi verificado que mesmo apresentando valores maiores que a maioria não representam outliers verdadeiros, podendo ser considerados na distribuição normal (valor-*p* encontrado foi $\geq 0,35$).

O método proposto cumpre com os parâmetros de precisão avaliados, pois para todas as concentrações, inclusive para o LIQ, o coeficiente de variação foi menor que 9,0%, sendo permitidas variações de até 15% para todos os níveis a exceção do LIQ onde são admitidas variações de até 20%, e valor-*p* $> 0,05$ para cada diferente concentração (o menor valor-*p* foi de 0,06). Além disso, através da análise de variância foi verificado que não houve diferença entre os diferentes níveis (valor-*p* = 0,44), com nível de confiança de 95%.

Figura 33 – Gráfico da avaliação de normalidade dos resultados obtidos na precisão do método para determinação de teor de ibuprofeno em plasma ($n = 90$).

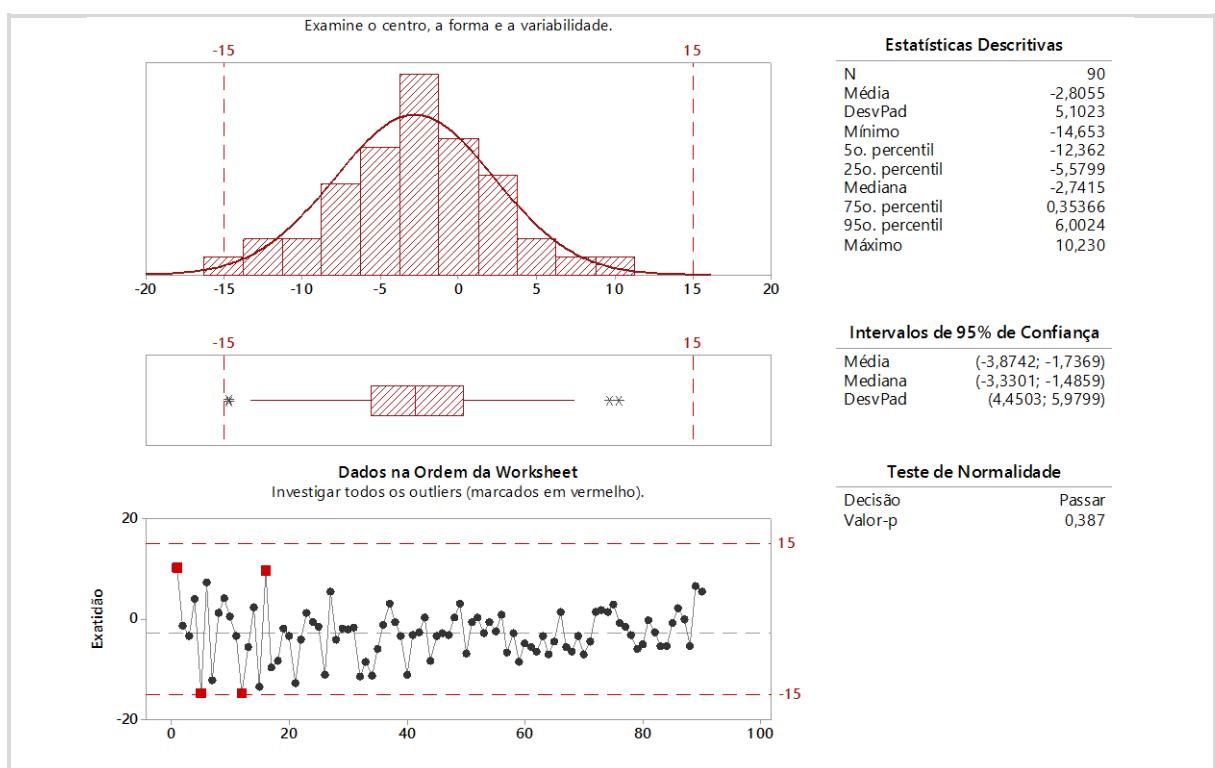


A exatidão também foi avaliada intra e interdia. As concentrações e dias utilizados foram os mesmos da precisão. Na Tabela 21 e Figura 34, são apresentados os resultados obtidos para a exatidão do método bioanalítico proposto.

Os dados da exatidão foram avaliados em relação a normalidade (Figura 34), onde foi verificado que os mesmos cumprem com esse requerimento (valor-*p* = 0,39), com nível de confiança de 95%.

Foi verificado que quatro valores foram considerados como possíveis outliers. Estes foram avaliados utilizando testes específicos para tal e foi verificado que mesmo apresentando valores maiores que a maioria não representam outliers verdadeiros, podendo ser considerados na distribuição normal (valor-*p* encontrado foi $\geq 0,85$).

Figura 34 – Gráfico da avaliação de normalidade dos resultados obtidos na exatidão método para determinação de teor de ibuprofeno em plasma (n=90)



Diferenças estatisticamente significativas para valor-*p* $\leq 0,05$ (n = 90).

A partir da análise dos dados, podemos verificar que o método proposto cumpre com os parâmetros de exatidão avaliados, pois para todas as concentrações, inclusive para o LIQ, a maior variação no erro padrão relativo da média foi de -6,59%, com valores individuais máximo e mínimo de 10,23 e -14,65, respectivamente, sendo permitidas variações de até $\pm 15\%$ para todos os níveis a exceção do LIQ onde são admitidas variações de até $\pm 20\%$, e valor-*p* $> 0,05$ para cada diferente concentração (o menor valor-*p* foi de 0,06). Além disso, através da análise de variância foi verificado que não houve diferença entre os diferentes níveis (valor-*p* = 0,48), com nível de confiança de 95%.

Os dados da avaliação de modificações em parâmetros do método são mostrados na Tabela 22, onde é possível visualizar que não houve diferença estatisticamente significativa nos valores médios obtidos (valor-p > 0,05), com nível de significância de 95%.

Para os demais parâmetros da validação bioanalítica também foi verificado que os mesmos estavam dentro dos padrões estabelecidos no ICH Guidelines (2005) e Resolução RDC 27/12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 20012), de modo que o método pode ser considerado adequado para realização de estudos de biodisponibilidade no plasma de coelho considerando as condições avaliadas.

Tabela 21 – Exatidão do método para determinação do teor de ibuprofeno em plasma

Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	Dia	EPR Intra dia	EPR Inter dia	*Valor-p
0,05	1	0,40		
	2	-3,99	-2,56	0,59
	3	-4,08		
0,10	1	-3,50		
	2	-2,45	-4,18	0,34
	3	-6,59		
1,00	1	-2,95		
	2	-2,80	-2,32	0,62
	3	-1,23		
5,00	1	-4,01		
	2	-4,18	-3,48	0,63
	3	-2,25		
6,25	1	0,16		
	2	-4,04	-0,84	0,06
	3	1,37		

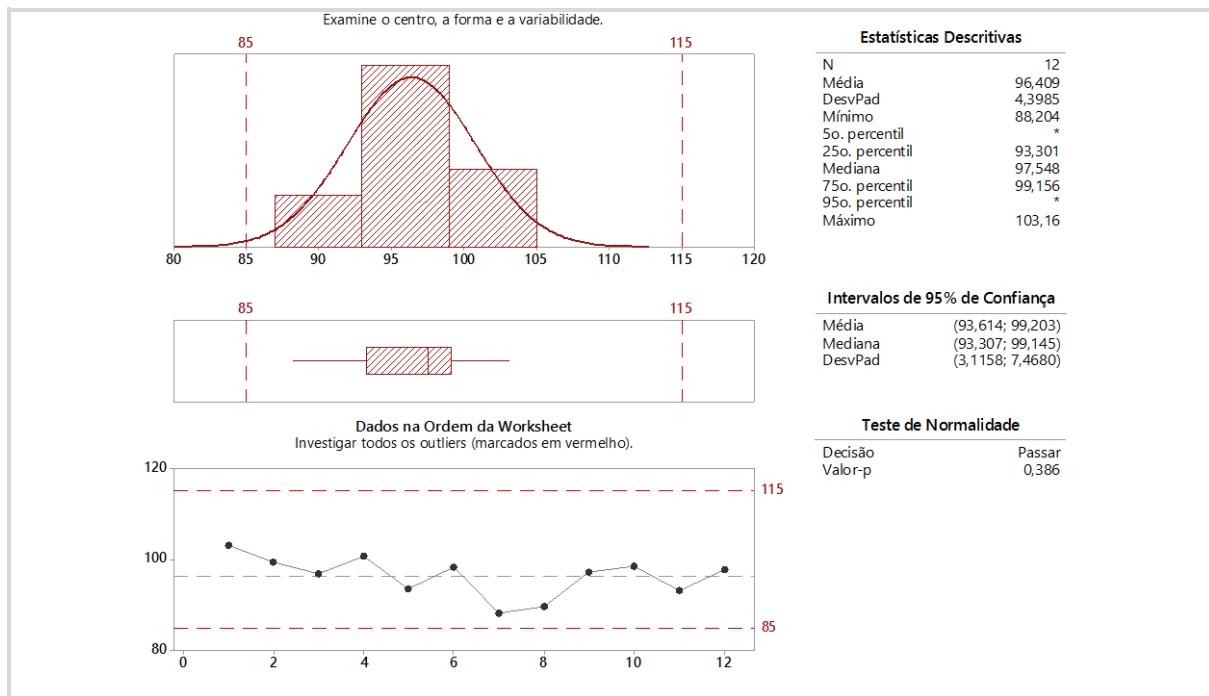
¹Valores estatisticamente significativos para valor-p ≤ 0,05 (n = 18 para cada concentração). ²Valores médios obtidos a partir de n = 6 em cada dia. ³Valores médios obtidos a partir de n = 18 em cada concentração.

Tabela 22 – Robustez do método para determinação de teor de ibuprofeno em plasma (concentration 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$)

Condição	¹ Intracondição		² Intercondição		*Valor-p
	Recuperação %	CV%	Recuperação %	CV%	
Método proposto*	99,79	3,18			
Filtro PVDF	97,57	3,69			
Sem ácido	91,78	5,31	96,41	4,56	0,14
24 h após a preparação	96,49	2,99			

¹Valores estatisticamente significativos para valor-p ≤ 0,05 (n = 12 para todas as condições). ²Valores médios obtidos a partir de n = 3 em cada condição. *Preparo da amostra utilizando ácido (100 μL), filtro PTFE (0,45 μm) e analisada imediatamente após a preparação.

Figura 35 – Gráfico da avaliação de normalidade dos resultados obtidos na avaliação da robustez do método para determinação de teor de ibuprofeno em plasma (n=12)

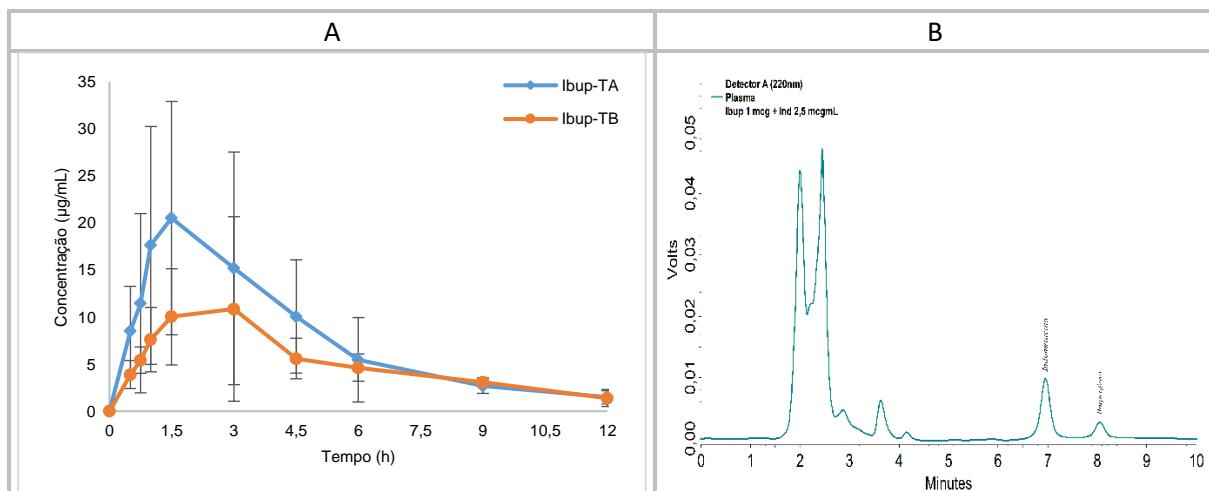


Diferenças estatisticamente significativas para valor-p ≤ 0,05 (n = 12).

6.3.4 Estudo de biodisponibilidade

A Figura 36 mostra curvas médias de concentração plasmática *versus* tempo do ibuprofeno após a administração de comprimidos Ibup-TA e Ibup-TB a coelhos Nova Zelândia, onde é possível visualizar diferenças entre os perfis plasmáticos.

Figura 36 – Curva média da concentração plasmática *versus* tempo (A) após administração dos comprimidos Ibup-TA e Ibup-TB contendo 100 mg de ibuprofeno em coelhos e cromatograma representativo da quantificação plasmática (B) (n = 12)



Foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade dos dados obtidos para C_{max} , t_{max} , $t_{1/2}$, ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} . Foi verificado que os parâmetros t_{max} , C_{max} e $t_{1/2}$ não apresentam distribuição normal (valor-p < 0,05), enquanto que os parâmetros ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} apresentam (valor-p > 0,05). Resultado mostrado na Tabela 23.

Tabela 23 – Estatística de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade dos parâmetros C_{max} , t_{max} , ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} encontrados para o Ibup-TA e Ibup-TB (n = 12)

Parâmetro	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estatística	GL	Sig.	Estatística	GL	Sig.
C_{max} [Ibup-TA]	0,141	12	0,200	0,940	12	0,492
C_{max} [Ibup-TB]	0,318	12	0,001	0,752	12	0,003
t_{max} [Ibup-TA]	0,282	12	0,009	0,775	12	0,005
t_{max} [Ibup-TB]	0,293	12	0,005	0,835	12	0,024
ASC_{0-t} [Ibup-TA]	0,218	12	0,120	0,920	12	0,283
ASC_{0-t} [Ibup-TB]	0,175	12	0,200	0,890	12	0,120
ASC_{0-inf} [Ibup-TA]	0,193	12	0,200	0,930	12	0,384
ASC_{0-inf} [Ibup-TB]	0,143	12	0,200	0,940	12	0,495
$t_{1/2}$ [Ibup-TA]	0,277	12	0,012	0,813	12	0,013
$t_{1/2}$ [Ibup-TB]	0,202	12	0,192	0,906	12	0,188

*Este é um limite inferior da significância verdadeira. a. Correlação de Significância de Lilliefors

Os principais parâmetros farmacocinéticos médios com valores dos testes na análise estatística para comparação das formulações são mostrados na Tabela 24. A comparação de todos os parâmetros foi feita utilizando o teste não paramétrico de Wilcoxon, e para aqueles que apresentaram distribuição normal foi aplicado também o teste paramétrico (teste t de Student) para medidas repetidas.

Tabela 24 – Parâmetros farmacocinéticos médios, em coelhos, após administração oral de 2 (dois) comprimidos contendo 100 mg de ibuprofeno (n = 12)

Parameter	¹ Ibup-TA	² Ibup-TB	*Valor - p	**Valor - p
t_{max} (h)	$1,40 \pm 0,23$	$2,13 \pm 0,33$	0,064	-
$t_{1/2}$ (h)	$3,07 \pm 0,37$	$4,06 \pm 0,42$	0,034	-
C_{max} (μ g mL ⁻¹)	$26,27 \pm 3,45$	$14,40 \pm 2,49$	0,010	-
$AUC_{(0-t)}$ (μ g mL ⁻¹ h)	$93,05 \pm 11,50$	$60,40 \pm 4,81$	0,019	0,015
$AUC_{(0-\infty)}$ (μ g mL ⁻¹ h)	$101,18 \pm 10,79$	$72,93 \pm 4,45$	0,028	0,029

* Diferença estatisticamente significativa para valor-p ≤ 0,05 (teste não paramétrico). Diferença estatisticamente significativa para valor-p ≤ 0,05. ¹⁻²Valores expressos como Média ± erro padrão.

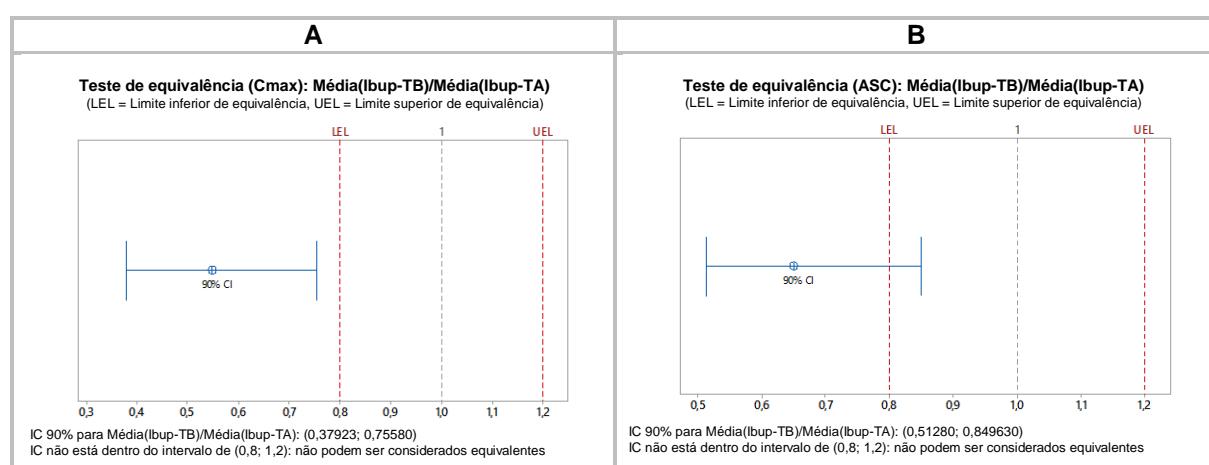
Os resultados mostram que as formulações são semelhantes em relação ao parâmetro t_{max} , no teste não paramétrico. Em relação ao C_{max} , $AUC_{(0-t)}$ e $AUC_{(0-\infty)}$ foi

verificado que as diferenças encontradas foram estatisticamente significativas (valor-p < 0,05) nos dois testes. Em relação a $t_{1/2}$ foi verificado que as diferenças encontradas foram estatisticamente significativas (valor-p < 0,05), no teste não paramétrico.

A média ± erro padrão do Cmáx para o Ibup-TA foi $26,46 \pm 3,46 \mu\text{g mL}^{-1}$, $T_{\max} 1,31 \pm 0,18$, $ASC_{0-t} 96,79 \pm 10,86 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ h}$ e o $t_{1/2} 3,08 \pm 0,37 \text{ h}$. Estes resultados assemelham-se outros estudos realizados. Em estudo publicado por Kondal e Garg (2003) o Cmáx, T_{\max} , ASC_{0-t} e $t_{1/2}$ encontrados após administração de 56 mg/kg de ibuprofeno administrado via oral, foi de $24,85 \mu\text{g mL}^{-1}$, 1,18 h, $75,14 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ h}$ e 1,81 h, respectivamente. Após administração intravenosa de 100 mg de ibuprofeno a coelhos de 2,5-3,5 kg a ASC e k_e foi de ($79,5 \pm 23 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e $2,53 \pm 0,81 \text{ h}$) e ($87,9 \pm 39,8 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e $2,16 \pm 1,01 \text{ h}$), para as formas R e S, respectivamente, (LIN et al., 2004). Em estudo realizado por Staziak et al. (2010), utilizando injeção intramuscular de 25 mg/kg em coelhos, encontrou ASC_{0-t} , de $48,4 \pm 25,1 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ h}$.

A média aritmética (Figura 37A) e geométrica com seus respectivos intervalo de confiança (90%) para a razão do Cmáx ($C_{\max} \text{ Ibup-TB}/C_{\max} \text{ Ibup-TA}$) foi de 54,81 e 52,88% (médias), 37,92 e 41,41% (limite inferior) e 75,58 e 67,51% (limite superior), respectivamente. Para ASC_{0-t} a média aritmética (Figura 37B) e geométrica com seus respectivos intervalo de confiança (90%) da razão da ASC_{0-t} ($ASC_{0-t} \text{ Ibup-TB}/ASC_{0-t} \text{ Ibup-TA}$) foi de 64,91 e 63,68% (médias), 51,28 e 52,78% (limite inferior) e 84,96 e 76,83% (limite superior), respectivamente.

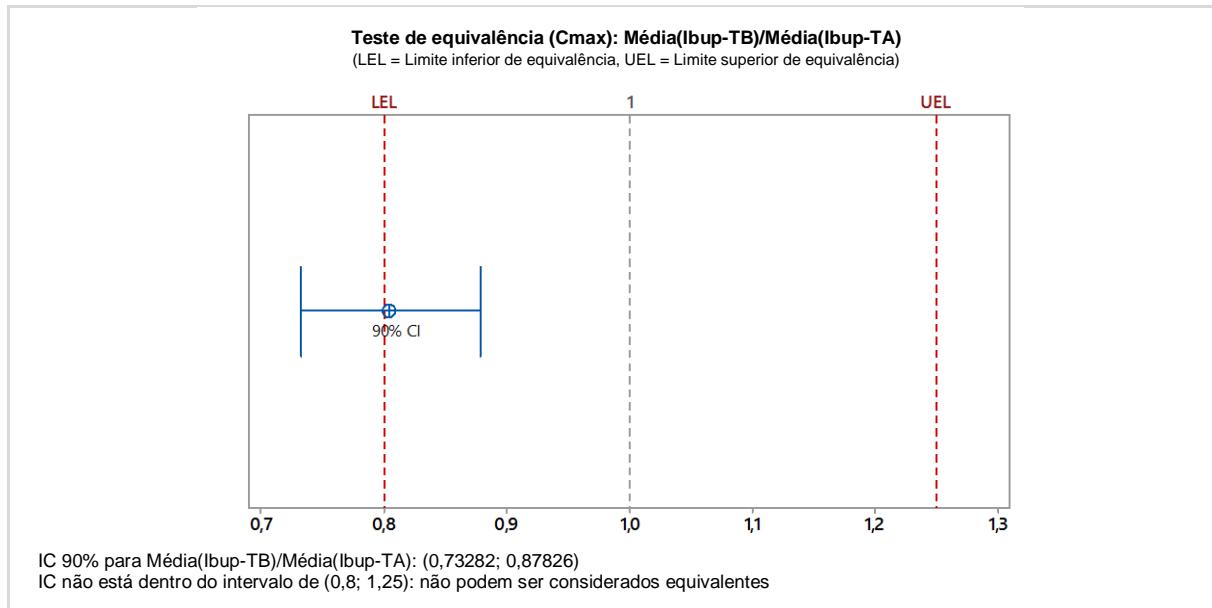
Figura 37 – Intervalo de confiança de 90% para a razão Ibup-TB/Ibup-TA do Cmax (A) e ASC (B) obtidos após administração dos comprimidos Ibup-TA e Ibup-TB (2 x 100 mg de ibuprofeno) (n = 12)



Para o Cmáx, em função de não ter apresentado distribuição normal, foi avaliado o intervalo de confiança dos dados com transformação logarítmica. A Figura 38 mostra

que a relação do $C_{max}(\text{Ibup-TB})/C_{max}(\text{Ibup-TA})$ foi de 80,38%, limite inferior (73,28%) limite superior (87,83%).

Figura 38 – Intervalo de confiança de 90% para a razão $\ln(\text{Ibup-TB}/\text{Ibup-TA})$ do C_{max} (A) obtidos após administração dos comprimidos Ibup-TA e Ibup-TB (2 x 100 mg de ibuprofeno) (n = 12)



Como os intervalos de confiança da razão entre o C_{max} e ASC_{0-t} do Ibup-TB/Ibup-TA apresentam limites inferior fora dos limites de equivalência (80 e 120 para dados originais) e (80 e 125 para dados transformados) podemos considerar que eles diferem significativamente em relação a biodisponibilidade em coelhos. A biodisponibilidade relativa do Ibup-TB em relação ao Ibup-TA, calculada através da razão entre as áreas sob a curva, foi de 64,91%.

6.3.5 Correlação *in vitro*-*in vivo*

As Figuras 39 e 40 mostram os resultados obtidos para avaliação da correlação *in vitro/in vivo* entre os percentuais liberados nos tempos de dissolução 30, 45 e 60 minutos, nos meios de dissolução água e tampão fosfato pH 7,2, com a área sob a curva de biodisponibilidade nos respectivos tempos.

As diferenças verificadas entre as CMC (CMC101A e CMC101B), através da microscopia eletrônica de varredura, da termogravimetria e difração de raio-x, descritas no Capítulo 2, não resultou na obtenção de perfis de dissolução com diferenças significativas utilizando o meio de dissolução farmacopéico, a exemplo do

que aconteceu com a simvastatina e o fluconazol. Utilizando as mesmas condições do método farmacopéico com exceção do meio utilizado que foi substituído por água, foi verificado relação com os dados de diferença entre as celuloses.

Figura 39 – Correlação *in vitro/in vivo* entre as áreas sob a curva da biodisponibilidade e os percentuais liberados em água nos tempos de 30, 45 e 60 minutos

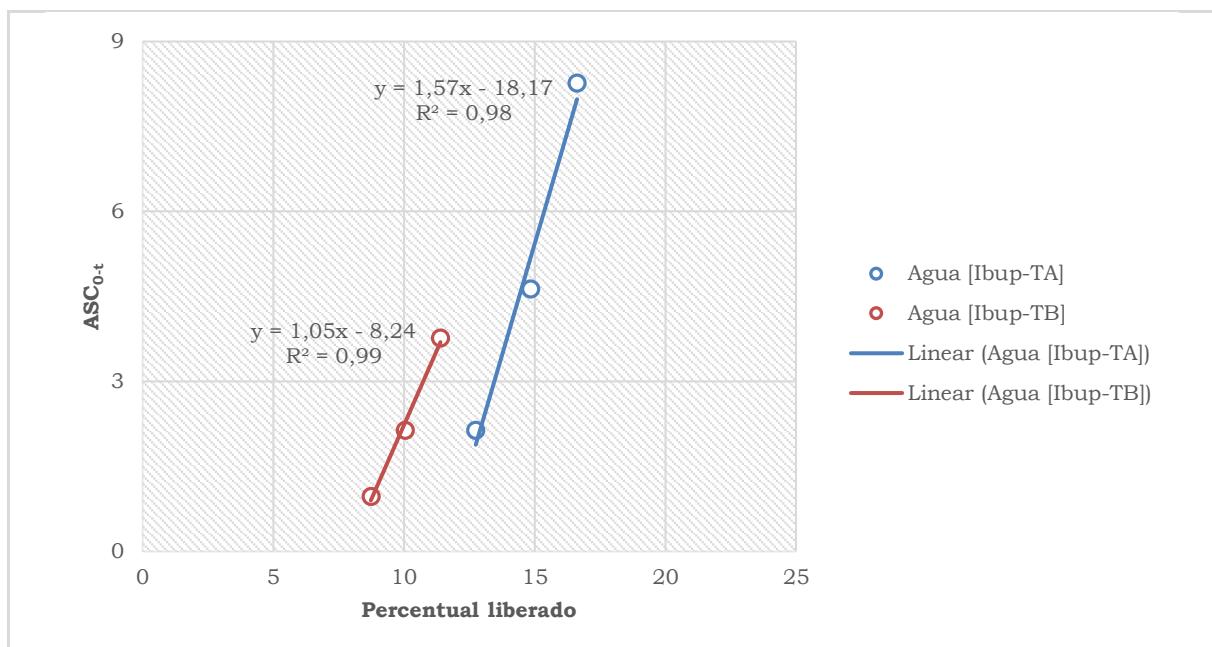
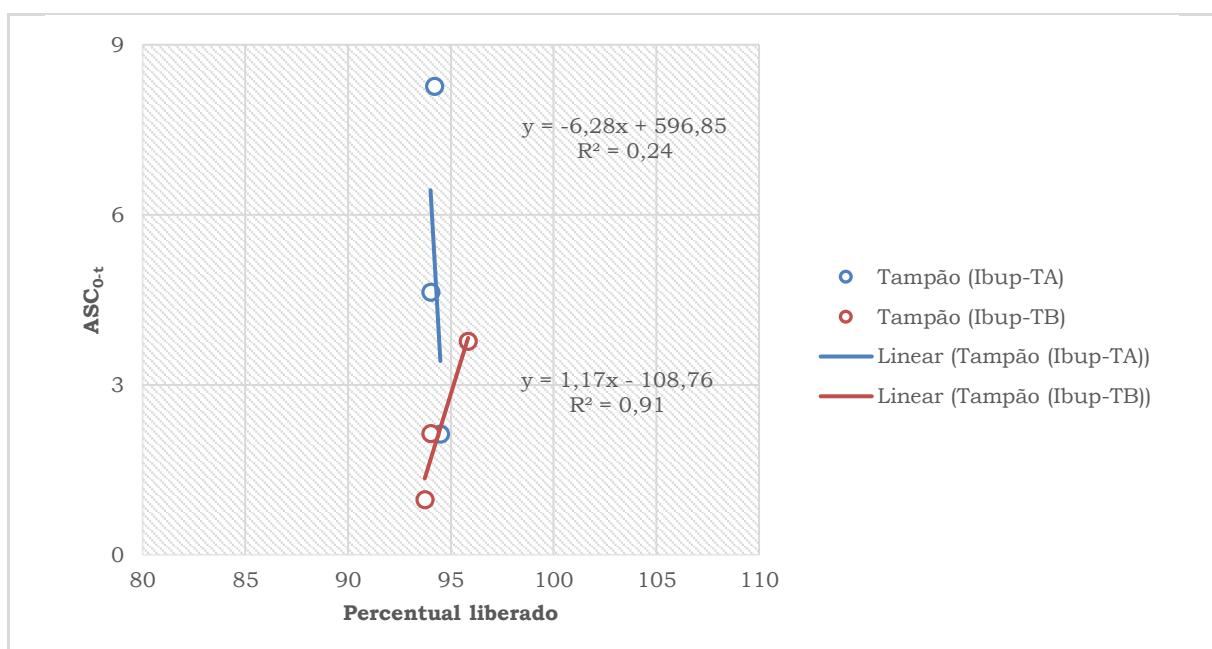


Figura 40 – Correlação *in vitro/in vivo* entre as áreas sob a curva da biodisponibilidade e os percentuais liberados em tampão fosfato pH 7,2 nos tempos de 30, 45 e 60 minutos



Quando administrados os comprimidos aos coelhos, as diferenças entre as celuloses resultaram em perfis de biodisponibilidade diferentes, de modo que houve correlação estabelecida *in vitro/in vivo* entre os dados obtidos utilizando e dissolução em água e não com o meio tampão fosfato pH 7,2, conforme mostrado nas Figuras 39 e 40.

Estes resultados reforçam o que foi sugerido para explicar a não correlação *in vitro/in vivo* do fluconazol, e que foi descrito no estudo realizado por Bedor (2011) demonstrando que o único meio de dissolução que teve correlação da dissolução com a biodisponibilidade de comprimidos de efavirenz utilizava condição não *Sink*.

7 CONCLUSÃO

Foi verificado diferenças entre as celuloses microcristalinas em função da origem.

Foi evidenciado também que as diferenças encontradas influenciaram nas características de estabilidade e dissolução dos comprimidos de simvastatina produzidos com elas.

Os comprimidos contendo Fluc e CMC101 dos diferentes fabricantes apresentaram liberação conforme o modelo matemático de El-Yazigi, não diferiram quanto aos perfis de dissolução *in vitro* em água, no entanto apresentaram diferença na biodisponibilidade, de modo que não houve estabelecimento de correlação dos dados *in vitro/in vivo* no meio estudado.

Houve diferença na liberação e absorção do ibuprofeno, a partir dos comprimidos, em função da celulose microcristalina utilizada para sua produção.

A correlação entre os dados *in vitro/in vivo* só foi possível utilizando um meio de dissolução mais restritivo na liberação do insumo farmacêutico ativo ibuprofeno.

REFERÊNCIAS

- ABDELBARY, A.; ELSHAFEEY, A. H.; ZIDAN, G. Comparative effects of different cellulosic-based directly compressed orodispersible tablets on oral bioavailability of famotidine. *Carbohydrate Polymers*, v. 77, p. 799–806, 2009.
- ADEL, A. M.; EL-WAHABB, Z. H. A.; IBRAHIMA, A. A.; AL-SHEMYA, M. T.; Characterization of microcrystalline cellulose prepared from lignocellulosic materials. Part II: Physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, p. 83, p. 676-687, 2011.
- ALEEM, O.; KUCHEKAR, B.; PORE, Y.; LATE, S.. Effect of β -cyclodextrin and hydroxypropyl β -cyclodextrin complexation on physicochemical properties and antimicrobial activity of cefdinir. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 47, p. 535-540, 2008.
- ALKHAMIS, K. A.; OBAIDAT, A. A.; NUSEIRAT, A. F. Solid-State Characterization of Fluconazole. *Pharmaceutical Development and Technology*, v. 7, n. 4, p. 491–503, 2002.
- ALT, A.; POTTHAST, H.; MOESSINGER, J.; SICKMÜLLERD, B.; OESER, H. Biopharmaceutical characterization of sotalol-containing oral immediate release drug products. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 58, p. 145–150, 2004.
- AMEUR, H.; BOUZIT, M. 3D hydrodynamics and shear rates' variability in the United States Pharmacopeia Paddle Dissolution Apparatus. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 452, n. 1-2, p. 42-51, 2013.
- AMIDON, G. L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R.. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research*, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.
- ANSEL, H. C.; ALLEN, L.; POPOVICH, N. *Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- ARMSTRONG, N. A. Functionality related test for excipients. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 155, p. 1-5, 1997.
- AULTON, M. E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 677p.
- AYUB, A. C.; GOMES, A. D. M.; LIMA, M. V. C.; VIANNA-SOARES, C. D.; FERREIRA, L. A. M... Topical Delivery of Fluconazole: In Vitro Skin Penetration and Permeation Using Emulsions as Dosage Forms. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 33, n. 3, p. 273-280, 2007.
- BEDOR, D. C. G. *Avaliação biofarmacotécnica do Efavirenz um fármaco classe II (SCB)*. 2011. 184f. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 2011.

BLOOD COLLECTION GUIDELINES. *Blood Collection Guidelines of Institutional Animal Care and Use Committee of Iowa State University*. Disponível em: <http://www.compliance.iastate.edu/iacuc/policies/docs/blood-collection-guidelines.pdf>. Acesso em: 29 Fev. 2011.

BONAMICI, D. *Sistema de Classificação Biofarmacêutica e Bioisenções*. 2009. 171f. Monografia (Dissertação de Mestrado) – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Conceitos Técnicos*. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/conceito.htm#1.2>. Acessado em: 7 de dezembro de 2016.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. Resolução-RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. *Diário Oficial da União - D.O.U.*; Seção 1, p. 93-95, Poder Executivo, 22 de maio de 2012.

_____. *Vocabulário Controlado de Formas Farmacêuticas, Vias de Administração e Embalagens de Medicamentos*. 1. ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011. 58 p.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução - RDC nº 31, de 11 de agosto de 2010. Dispõe sobre a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo. *Diário Oficial da União - D.O.U.*; Poder Executivo, de 12 de agosto de 2010. pp. 36-38.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. Resolução-RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. *Diário Oficial da União - D.O.U.*; Seção 1, Poder Executivo, 19 de abril de 2010, p. 94-110.

_____. Resolução RE n.482, de 19 de março de 2002. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Guia de correlação para estudos in vitro – in vivo (CIVIV). *Diário Oficial da União*, Brasilia, n. 1, 20 mar. 2002. Seção 1, pag. 116.

_____. Congresso Nacional. Lei nº 9787, de 10 de fevereiro de 1999b. Altera a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. *Diário Oficial da União-D.O.U.*; Poder Executivo, de 11 de fevereiro de 1999a.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. Resolução-RE nº 391, de 09 de agosto de 1999a. Aprova o Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos. *Diário Oficial da União - D.O.U.*; Poder Executivo, de 10 de agosto de 1999b.

BRITISH PHARMACOPOEIA. London: United Kigdon, 2009.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. (Org.). As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman. 12. ed. Rio de Janeiro: CMCGraw -Hill, 2012. 2112 p.

BROWN, M. E.; GALLAGHER, P. K. (Eds.). *Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry: recent advances, techniques and applications*. 1. ed. New York: Elsevier Science, 2008. Volume 5. 780 p.

BUSHRA, R.; ASLAM, N. An Overview of Clinical Pharmacology of Ibuprofen. *Oman Medical Journal*, v. 25, n. 3, p. 155-1661, 2010.

CAMEJO, R. R.; CMCGRATH, C.; HERINGS, R.. A dynamic perspective on pharmaceutical competition, drug development and cost effectiveness. *Health Policy*, v. 100, p. 18-24, 2011.

CAMPOS, D. R.; STORPIRTIS, S.; GAI, M. N.; GONÇALVES, J. E. Aplicação da farmaconinética aos estudos de correlação de dados *in vitro* – *in vivo*. In: STORPIRTIS, S.; GAI, M. N.; CAMPOS, D. R.; GONCALVES, J. E. *Farmacocinética: básica e aplicada*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. Cap. 20, p. 155-161.

CARDOT, J. M.; BEYSSAC, E.; ALRIC, M. *In vitro – in vivo correlation: importance of dissolution in IVIVC. Dissolutions Technologies*, v. 14, n. 1, p. 15-19, 2007

CARDOT, J. M.; DAVIT, B. M. *In vitro-in vivo correlations: trick and traps*. *AAPS Journal*, v. 14, n. 3, p. 491-499, 2012.

CHAMBIN, O.; CHAMPION, D.; DEBRAY, C.; ROCHAT-GONTHIERA, M. H. M.; MESTE, L.; POURCELOT, Y.. Effects of different cellulose derivatives on drug release mechanism studied at a preformulação stage. *Journal of Controlled Release*, v. 95, p. 101-108, 2004.

CHAPMAN, M. J.; GOFF, W. L.; GUERIN, M.; KONTUSH, A. Cholesteryl ester transfer protein: at the heart of the action of lipid-modulating therapy with statins, fibrates, niacin, and cholesteryl ester transfer protein inhibitors. *European Heart Journal*, v. 31, p. 149-164, 2010.

CHAROO, N.; CRISTOFOLLETTI, R.; GRAHAM, A.; LARTEY, P.; ABRAHAMSSON, B.; GROOT, D. W.; KOPP, S.; LANGGUTH, P.; POLL, J.; SHAH, V. P.; DRESSMAN, J. Biowaiver Monograph for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms: Fluconazole. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 103, p. 3843–3858, 2014.

CHENG, S. Z. D.; LI, C. Y.; CALHOUN, B. H.; ZHU, L.; ZHOU, W. W.. Thermal analysis: the next two decades. *Thermochimica Acta*. v. 355, p. 59-68, 2000.

CIDES, L. C. S.; ARAÚJO, A. A. S.; SANTOS-FILHO, M.; MATOS, J. DO R. Thermal behaviour, compatibility study and decomposition kinetics of glimepiride under isothermal and non-isothermal conditions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 84, p. 441-445, 2006.

CORTI, G.; CAPASSO, G.; MAESTRELLI, F.; CIRRI, M.; MURA, P.. Physical-chemical characterization of binary systems of metformin hydrochloride with triacetyl-

β -cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 45, p. 480-486, 2007.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S.. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 13, p. 123-133, 2001.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S.. Formas farmacêuticas de liberação modificada. *Revista Portuguesa de Farmácia*, v. 59, n. 4, p. 181-190, 1999.

CPMP/QWP/604/96. *Note for Guidance on Quality of Modified Release Products*. London: 2000. 16 p.

CRAIG, M. Q. D.; READING, M. *Thermal Analysis of Pharmaceuticals*. 1. ed. New York: CRC Press, 2007. 416 p.

DAILEY, J. W.. Pharmaceutical: flowchart used for drug development. Encyclopaedia Britannica Online. Disponível em: <http://www.britannica.com/EBchecked/media/96136/Flowchart-of-research-and-discovery-processes-used-for-drug-development>. Acessado em: 15 de maio de 2011.

DASH, A. K.; ELMQUIST, W. F. Fluconazole. In: BRITTAIN, H. G. *Analytical profiles of drug substances and excipients*. San Diego: Academic Press, 2001. v. 27, pp 67-113.

DAVIDSON, M. H.; TOTH, P. P.. Comparative effects of lipid-lowering therapies. *Progress in Cardiovascular Diseases*, v. 42, n. 2, p. 73-104, 2004.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. *Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras*. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. 60 p.

DESAI, S. R.; SHAIKH, M. M.; DHARWADKAR, S. R. Thermoanalytical study of polymorphic transformation in Fluconazole drug. *Thermochimica Acta*, v. 399, p. 81-89, 2003.

DIEHL, K. H.; HULL, R.; MORTON, D.; PFISTER, R.; RABEMAMPIANINA, Y.; SMITH, D.; VIDAL, J. M.; VAN DE VORSTENBOSCH, C.. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology*, v. 21, n. 1, p. 15-23, 2001.

DIXIT, R. P.; PUTHLI, S. P. Oral strip technology: overview and future potential. *Journal of Controlled Release*, v. 139, p. 94-107, 2009.

DOELKER, E., Comparative compaction properties of various microcrystalline cellulose types and generic products. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 19, p. 2399-2471, 1993.

DUGGAN, K. C.; HERMANSON, D. J.; MUSEE, J., PRUSAKIEWICZ, J. J.; SCHEIB, J. L.; CARTER, B. D.; BANERJEE, S.; OATES, J. A.; MARNETT, L. J. (R)-profens are substrate-selective inhibitors of endocannabinoid oxygenation by COX-2. *Nature Chemical Biology*, v. 7, n. 11, p. 803-9, 2011.

- DUNNE, A.; O'HARA, T.; DEVANE, J. A new approach to modeling the relationship between *in vitro* and *in vivo* drug dissolution/absorption. *Statistics in Medicine*, v. 18, n. 14, p. 1865-1877, 1999.
- EEC-DIRECTIVE-75/318. *Quality of prolonged release oral solid dosage forms*. London: 1992. 7 p.
- EK, R.; WORMALD, P.; OSTELIUS, J.; IVERSEN, T.; NYSTRÖM C.. Crystallinity index of microcrystalline cellulose particles compressed into tablets. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 125, p. 257-264, 1995.
- EL-SAKHAWY, M.; HASSAN, M. L. Physical and mechanical properties of microcrystalline cellulose prepared from agricultural residues. *Carbohydrate Polymers*, v. 67, p. 1-10, 2007.
- EL-YAZIGI, A. Disintegration: dissolution analysis of percent dissolved - time data. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 70, n. 5, p. 535-537, 1981.
- EMAMI, J. In vitro-in vivo correlation: from theory to application. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, v. 9, n. 2, p. 169-189, 2006.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). 2011. Assessment report pursuant to Article 30 of Directive 2001/83/EC, as amended. Diflucan and associated names. Procedure no: EMEA/H/A-30/1156. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Referrals_document/Diflucan_30/WC500121953.pdf. Acesso em: 22 dez. 2013.
- EVANS, A. M. Comparative pharmacology of S(+)-ibuprofen and (RS)-ibuprofen. *Clinical Rheumatology*, v. 20, n. 1, p. 9-14, 2001.
- FANDARUFF, C.; ARAYA-SIBAJA, A. M.; PEREIRA, R. N.; HOFFMEISTER, C. R. D.; ROCHA, H. V. A.; SILVA, M. A. S. Thermal behavior and decomposition kinetics of efavirenz under isothermal and non-isothermal conditions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 115, p. 2351-2356, 2014.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5^a edição. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa, 2010a. Volume 1, 546 p. Volume 2, 2899 p.
- _____. 4. ed. São Paulo: Atheneu Editora LTDA, 1988. 392 p. Parte I.
- FATHIMA, N.; MAMATHA, T.; QURESHI, H. K.; ANITHA, N.; RAO, J. V. Drug-excipient interaction and its importance in dosage form development. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 1, n. 6; p. 66-71, 2011.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for Industry. Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. Scale-up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls, In vitro Dissolution Testing and In vivo Bioequivalence Documentation. US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, USA. 1995. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/guidance/CMC5.pdf>. Acesso em: 20 May 2011.

_____. Zocor®. Disponível em:
http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/019766s078lbl.pdf.
 Acesso em: 22 Set. 2010.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, USA. 2000. Disponível em:
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070246.pdf>. Acesso em: 20 May 2011.

_____. *Guidance for Industry*. Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms. Rockville: Food and Drug Administration, 1997. 17 p.

_____. *Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms*. Rockville: Food and Drug Administration, 1997.

GALLETI, S. R.. Introdução a microscopia eletrônica. *Biológico*, v. 65, n. 1/2, p. 33-5, 2003.

GARBACZ, G.; GOLKE, B.; WEDEMEYER, R.-S.; AXELL, M.; SÖDERLIND, E.; ABRAHAMSSON, B.; WEITSCHIES, W.. Comparison of dissolution profiles obtained from nifedipine extended release once a day products using different dissolution test apparatuses. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 38, p. 147-155, 2009.

GHOSH, A.; BHAUMIK, U. K.; BOSE, U. M., GOWDA, V., CHATTERJEE, B., CHAKRABARTY, U. S. PAL, T. P. Extended release dosage form of glipizide: Developments and validation of a level A in vitro-in vivo correlation. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 31, n. 10, p. 1946-1951, 2008.

GIBSON, M.. *Pharmaceutical PreFormulação And Formulação: a practical guide from candidate drug selection to commercial dosage form*. 1. ed. New York: Interpharm/ CRC, 2004. 610 p.

GOOLE, J.; LINDLEY, D. J.; ROTH, W.; CARL, S. M.; AMIGHI, K.; KAUFFMANN, J. M.; KNIPP, G. T. The effects of excipients on transporter mediated absorption, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 393, p. 17-31, 2010.

GOWTHAMARAJAN, K.; G. KUMAR, K. P.; GAIKWAD, N. B.; SURESH, B. Preliminary study of *Anacardium occidentale* gum as binder in Formulação of paracetamol tablets. *Carbohydrate Polymers*, v. 83, p. 506-511, 2011.

GOYANES, A.; SOUTO, C.; MARTÍNEZ-PACHECO, R. Co-processed CMCC-Eudragit® E excipients for extrusion-spheronization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 79, n. 3, p. 658-663, 2011.

GRASSI, G.; COLOMBO, I.; GRASSI, M.; LAPASIN, R. *Understanding Drug Release and Absorption Mechanisms: a physical and mathematical approach*. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2007.

GU, X. J.; JIANG, W. Characterization of polymorphic forms of fluconazole using Fourier-transform raman spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 84, p.1438-1441, 1995.

GUPTA, E.; BARENDs, D. M.; YAMASHITA, E.; LENTZ, K. A.; HARMSZE, A. M.; SHAH, V. P.; DRESSMAN, J. B.; LIPPER, R. A.. Review of global regulations concerning biowaivers for immediate release solid oral dosage forms. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 29, p. 315-324, 2006.

HAHN, B. H.; GROSSMAN, J.; ANSELL, B. J.; SKAGGS, B. J.; CMCMAHON, M.. Altered lipoprotein metabolism in chronic inflammatory states: proinflammatory high-density lipoprotein and accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, v. 10, n. 4, p. 1-12, 2008.

HAN, C.; DAVIS, C. B.; WANG, B.. *Evaluation of drug candidates for preclinical development: pharmacokinetics, metabolism, pharmaceutics, and Toxicology*. 1. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010.

HANSON, R.; GRAY, V. *Handbook of dissolution testing*. 3. ed., Delaware: Dissolution Technologies, Incorporated, 2004.p. 199.

HARDMAN, J. G.; GILMAN, A. G.; DIVINE, J. G.; NIEBUHR, B. R.; RICHMOND, S.; SEIN, P. G.; WILLIAMS, J. H. Effect of ibuprofen use on muscle soreness, damage, and performance: a preliminary investigation. *Medicine and Science Sports Exercise*, v. 25, p. 9-17, 1993.

HERNANDEZ, M. A.; RATHINAVELU, A. Administration and absorption of drugs. In *Basic pharmacology: Understanding drug actions and reactions*. Florida: CRC Press, 2006. Capítulo 5. pp 93-110.

HOFER, A. P. B.. Sinvastatina. In: *Fundamentos farmacológicos-clínicos dos medicamentos de uso corrente*. 1. ed. Rio de Janeiro: ENSP, 2002.

ICH Harmonised Tripartite Guideline. Pharmaceutical Development, Q8(R2), Step 4 (2009).

JIANG, T.; HAN, N.; ZHAO, B.; XIE, Y.; WANG, S. Enhanced dissolution rate and oral bioavailability of simvastatin nanocrystal prepared by sonoprecipitation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 30, n. 10, p. 1230-1239, 2012.

JOHNSON, B. F., GREER, H.; MACCRERIE, J.; BYE, C.; FOWLE, A. Rate dissolution of digoxin tablets as a predictor of absorption. *Lancet*, v. 301, n. 7818, p. 1473-1475, 1973.

JORGE, P. A. R.; ALMEIDA, E. A. de; OZAKI, M. R., JORGE, M; CARNEIRO, A. Efeitos da Atorvastatina, Fluvastatina, Pravastatina e Simvastatina Sobre a Função Endotelial, a Peroxidação Lipídica e a Aterosclerose Aórtica em Coelhos Hipercolesterolêmicos. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 84, n. 4, p. 314-319, 2005.

JOSLIN, J. O. Blood Collection Techniques in Exotic Small Mammals. *Journal of Exotic Pet Medicine*, v. 18, n. 2, p. 117-139, 2009.

KAKRAN, M.; SAHOO, N. G.; LI, L. Dissolution enhancement of quercetin through nanofabrication, complexation, and solid dispersion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 88, p. 121-130, 2011.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. *Farmacologia básica e clínica*. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

KLEIN, S.; SHAH, V. P. A Standardized Mini Paddle Apparatus as an Alternative to the Standard Paddle. *AAPS PharmSciTech*, v. 9, n. 4, p. 1179-1184, 2008.

KLEVAN, I.; NORDSTRÖM, J.; THO, I.; ALDERBORN, G.. A protocol for the classification of powder compression characteristics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 80, p. 209-216, 2012.

KLEVAN, I.; NORDSTRÖM, J.; THO, I.; ALDERBORN, G.. A statistical approach to evaluate the potential use of compression parameters for classification of pharmaceutical powder materials. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 75, p. 425-435, 2010.

KONDAL, A; GARG, S. K. Influence of acidic beverage (Coca-Cola) on pharmacokinetics of ibuprofen in healthy rabbits. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 4, p. 1322-1344, 2003.

KRYSIAK, R.; ABUZEK, K.; OKOPIEŃ, B. Effect of atorvastatin and fenofibric acid on adipokine release from visceral and subcutaneous adipose tissue of patients with mixed dyslipidemia and normolipidemic subjects. *Pharmacological Reports*, v. 61, p. 1134-1145, 2009.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L.. *Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica*. 1. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

LAITY, P.; CASSIDY, A.; SKEPPER, J.; JONES, B.; CAMERON, R.. Investigation into the intragranular structures of microcrystalline cellulose and pre-gelatinised starch. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 74, p. 377-387, 2010.

LANDIN, M.; MARTINEZ-PACHECO, R.; GOMEZ-AMOZA, J. L.; SOUTO, C.; CONCHEIRO, A.; ROWE, R.C. Effect of country of origin on the properties of microcrystalline cellulose. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 91, p. 123-131, 1993a.

LANDIN, M.; MARTINEZ-PACHECO, R.; GOMEZ-AMOZA, J. L.; SOUTO, C.; CONCHEIRO, A.; ROWE, R. C. Effect of batch variation and Fonte of pulp on the properties of microcrystalline cellulose. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 91, p. 133-141, 1993b.

LANDIN, M.; PACHECO, R. M.; AMOZA, J. L. G.; SOUTO, S.; CONCHEIRO, A.; ROWE, R. C.. Influence of microcrystalline cellulose Fonte and batch variation on the tabletting behaviour and stability of prednisone Formulações. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 91, n. 2-3, p. 143-149, 1993c.

LEHTO, P.; KORTEJÄRVI, H.; LIIMATAINEN, A.; OJALA, K.; KANGAS, H.; HIRVONEN, J.; TANNINEN, V. P.; PELTONEN, L.. Use of conventional surfactant media as surrogates for FaSSIF in simulating in vivo dissolution of SCB class II drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 78, p. 531-538, 2011.

LEVY, G.; LEONARDS, J. R; POCKNAL, J. A. Development of in vitro dissolution test which correlation quantitatively with dissolution rate-limited drug absorption in man. *Journal Pharmaceutical Science*, v. 54, p. 1719-1722, 1965.

LI, Z.; HE, X.; GAO, X.; XU, Y. Y.; WANG, Y.; GU, H.; J. I. R.; SUN, S. Study on dissolution and absorption of four dosage forms of isosorbide mononitrate: Level A in vitro-in vivo correlation. *European Journal os Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 79, p. 364-371, 2011.

LIN, W.; HAYAKAWA, T.; YANAGIUMOTO, H.; KUZUBA, M.; OBARA, T.; DING, G.; CUI, F.; INOTSUME, N. Pharmacokinetic interaction of ibuprofen enantiomers in rabbits. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 56, p. 317-321, 2004.

LINDENBAUM, J., BUTTER, V.P., MORPHY, J.E., CRESSWELL, R.M. Correlation os digoxin tablet dissolution rate with biological availability. *Lancet*, vol. 301, n. 7814, p.1215-1217, 1973.

LIM, S. G.; SAWYERR, A. M.; HUDSON, M.; SERCOMBE, J.; POUNDER, R. E.. Short report: the absorption of fluconazole and itraconazole under conditions of low intragastric acidity. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v. 7, n. 3, p. 317-321, 1993.

LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J. B.. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 58, p. 265-278, 2004.

LOUIE, A.; LIU, Q. F.; DRUSANO, G. L.; LIU, W.; MAYERS, M.; ANAISSE, E.; MILLER, M. H. Pharmacokinetic studies of fluconazole in rabbits characterizing doses which achieve peak levels in serum and area under the concentration-time curve values which mimic those of high-dose fluconazole in humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, n. 6, p. 1512-1514, 1998.

MACÊDO, R. O.; NASCIMENTO, T. G.. Quality control of thiabendazole pre-Formulação and tablets by TG and DSC coupled to the photovisual system. *Thermochimica Acta*, v. 392-393, p. 85-92, 2002.

MACÊDO, R. O. Controle de Qualidade de Formas Farmacêuticas Sólidas Através de Dados Termogravimétricos. *Tese do concurso para professor titular, apresentado ao DCF/CCS/UFPB*. João Pessoa, novembro de 1996.

MALISKA, A. M. *Microscopia eletrônica de varredura e microanálise*. Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina, 2008. 98 p.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F.. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de insumo farmacêutico ativos em formas farmacêuticas de liberação

modificada. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002.

MANNHEIMER, W. A. *Microscopia dos Materiais*: uma introdução. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais, 2002. 223 p.

MARCOLONGO, R. Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perpectivas na área farmacêutica. 2003. 127f. Monografia (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2003.

MARTÍN, J.; BUCHBERGER, W.; ALONSO, E.; HIMMELSBACH, M.; APARICIO, I.. Comparison of different extraction methods for the determination of statin drugs in wastewater and river water by HPLC/Q-TOF-MS. *Talanta*, v. 85, p. 607-615, 2011.

MARTINEZ, M. N.; AMIDON, G. L. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. *Journal of Clinical Pharmacology*, v. 42, 620-643, 2002.

MARWAHA, M.; SANDHU, D.; MARWAHA, R. K. Coprocessing of excipients: a review on excipient development for improved tabletting performance. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, v. 2, p. 41-47, 2010.

MEDINA, M. L. R.; KUMAR, V. Comparative evaluation of powder and tabletting properties of low and high degree of polymerization cellulose I and cellulose II excipients. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 337, p. 202–209, 2007.

MENEGOLA, J.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S.. Dissolution test for citalopram in tablets and comparison of in vitro dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 67, p. 524-530, 2007.

MIHRANYAN, A.; LLAGOSTERA, A. P.; KARMHAG, R.; STRØMME, M.; EK, R.. Moisture sorption by cellulose powders of varying crystallinity. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 269, p. 433-442, 2004.

MINAKSHI, M.; DEEPAK, S.; RAKESH, K. M. Coprocessing of excipients: a review on excipient development for improved tabletting performance. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, v. 2, n. 3, p. 41-47, 2010.

MOURA, E. A.; CORREIA, L. P.; PINTO, M. F.; PROCÓPIO, J. V. V.; SOUZA, F. S.; MACEDO, R. O. Thermal characterization of the solid state and raw material fluconazole by thermal analysis and pyrolysis coupled to GC/MS. *Jounal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 100, p. 289–293, 2010.

NAGATANI, T.; SAITO S.; SATO, M.; YAMADA, M.. Development of an ultra high resolution scanning electron microscope by means of a field emission Fonte and in-lens system. *Scanning Microscopy*, v. 11, p. 901-909, 1987.

NISSEN, S. E.; TUZCU, E. M.; SCHOENHAGEN, P.; CROWE, T.; SASIELA, W. J.; TSAI, J.; ORAZEM, J.; MAGORIEN, R. D.; O'SHAUGHNESSY, C.; GANZ, P.. Statin Therapy, LDL Cholesterol, C-Reactive Protein, and Coronary Artery Disease. *The new england journal of medicine*, v. 352, n. 1, p. 29-38, 2005.

MEDINA, M. L. R.; KUMAR, V. Comparative evaluation of powder and tableting properties of low and high degree of polymerization cellulose I and cellulose II excipients. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 337, p. 202–209, 2007.

MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D. *Análise térmica de materiais*. São Paulo: Ed. leitora, 2002.

MOURÃO, S.C.; SILVA, C.; BRESOLIN, T.M.B.; SERRA, C.H.R.; PORTA, V. Dissolution parameters for sodium diclofenac – containing hypromellose matrix tablet. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 386, n. 1/2, p. 201-207, 2010.

OBAIDAT, R. M.; ALKHAMIS, K. A.; SALEM, M. S. Kinetics of transformation of fluconazole polymorph II to I . Determination of factors affecting kinetics of solid-state transformation of fluconazole polymorph II to polymorph I using diffuse reflectance Fourier transform spectroscopy. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 36, n. 5, p. 570-580, 2010.

O'NEIL, M. J.; HECKELMAN, P. E.; Koch, C. B.; Roman, K. J. (Editors), The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 14. ed. New Jersey: Merck & Co, 2006.

OSTERBERG, R. E.; SEE, N. A. Toxicity of Excipients: a Food and Drug Administration perspective. *International Journal of Toxicology*, v. 22, p. 377-380, 2003.

OZAWA, T.. Thermal analysis - Review and prospect. *Thermochimica Acta*, v. 355, p. 35-42, 2000.

OCHOA, L., IGARTUA, M., HERNANDEZ, R.M., ANGELES, M.A., GASCON, A>R>, PEDRAZ, J.L. IN vivo evaluation of two new sustained release Formulações elaborated by one-step melt granulation: Level A in vitro-in vivo correlation. *European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics*, v. 75, p. 232-237, 2010.

PARK, H. J.; MIN-SOO, K.; KIM, J. S.; CHO, W.; PARK, J.; CHA, K. H.; KANG, Y. S.; HWANG, S. J. Solid-State Carbon NMR Characterization and Investigation of Intrinsic Dissolution Behavior of Fluconazole Polymorphs, Anhydrate Forms I and II. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v. 58, n. 9, p. 1243-1247, 2010.

PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de insumo farmacêutico ativos. *Química Nova*, v. 30, p. 171-177, 2007.

PIFFERI, G.; SANTORO, P.; PEDRANI, M.. Quality and functionality of excipients. // *Farmaco*, v. 54, p. 1-14, 1999.

PITARRESI, G.; PIERRO, P.; GIAMMONA, G.; IEMMA, F.; MUZZALUPO, R.; PICCI, N. Drug release from α , β -poly(N-2-hydroxyethyl)-DL-aspartamide-based microparticles. *Biomaterials*, v. 25, p. 4333-4343, 2004.

PODCZECK, F.; AL-MUTI, E.. The tensile strength of bilayered tablets made from different grades of microcrystalline celulose. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 41, p. 483-488, 2010.

PORTA, V.; SCHURAMM, S.G.; Kano, E.K.; KOONO, E.E.; ARMANDO, Y.P.; FUKUDA, K.; SERRA, C.H.S. HPLC-UV determination of metformin in human plasma for application in pharmacokinetics and bioequivalence studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 46, n. 1, p. 143-147, 2008.

PORTA, Valentina; YAMAMICHI, Érika; STORPIRTIS, Sílvia. Avaliação biofarmacêutica in vitro de cápsulas de fluconazol. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 38, n. 3, p. 333-343, 2002.

POTTHAST, H.; DRESSMAN, J. B.; JUNGINGER, H. E.; MIDHA, K. K.; OESER, H.; SHAH, V. P.; VOGELPOEL, H.; BAREND, D. M. Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Ibuprofen. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 94, n. 10, 2121-2131, 2005.

QIU Y.; CHE, Y.; ZHANG, G. G. Z.; LIU, L.; PORTER, W. R. (Eds). Developing solid oral dosage forms: pharmaceutical theory and practice. Amsterdam: Elsevier; London: Academic Press, 2009. 907p.

RICHARDSON, K.; COOPER, K.; MARRIOTT, M. S.; TARBIT, M. H.; TROKE, P. F.; WUHITTLE, P. J. Discovery of fluconazole, a novel antifungal agent. *Reviews of Infectious Diseases*, v. 12, p. 267-271, 1990.

RODRIGUES, P. O.; CARDOSO, T. F. M.; SILVA, M. A. S.; MATOS, J. DO R. Aplicação de técnicas termoanalíticas na caracterização, determinação da pureza e cinética de degradação da zidovudina (AZT). *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v. 24, p. 383-387, 2005.

ROWE, R. C.; CMCKILLOP, A. G.; BRAY, D.. The effect of batch and Fonte variation on the crystallinity of microcrystalline cellulose. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 101, n. 1-2, p. 169-172, 1994.

SAKAMOTO, J. H.; VEN, A. L. V.; GODIN, B.; BLANCO, E.; SERDA, R. E.; GRATTONI, A.; ZIEMYS, A.; BOUAMRANI, A.; HUT, T.; RANGANATHAN, S. I.; ROSA, E.; MARTINEZ, J. O.; SMID, C. A.; BUCHANAN, R. M.; LEE, S. Y.; SRINIVASAN, S.; LANDRY, M.; MEYN, A.; TASCIOTTI, E.; LIU, X.; DECUZZI, P.; FERRARI, M. Enabling individualized therapy through nanotechnology. *Pharmacological Research*, v. 62, p. 57-89, 2010.

SHLIEOUT, G., ARNOLD, K., MÜLLER, G., Powder and mechanical properties of microcrystalline cellulose with different degrees of polymerization. *AAPS Pharmaceutical Science Technology*, v. 3, p. 1-10, 2001.

SINGH, H.; PHILIP, B.; PATHAK, K. Preparation, Characterization and Pharmacodynamic Evaluation of Fused Dispersions of Simvastatin using PEO-PPO Block Copolymer. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, v. 11, n. 2, p. 433-445, 2012.

SOULIMAN, S.; BLANQUET, S.; BEYSSAC, E.; CARDOT, J. A level A in vitro/in vivo correlation in fasted and fed states using different methods: Applied to solid immediate release oral dosage form. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 27, p. 72-79, 2006.

SOUZA, N. A. B. *Estudo de Polimorfismo em Diferentes Matérias-Primas Ativas*. 2005. Xf. Monografia (Dissertação de Mestrado) – Mestrado em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2005.

STEELE, D. F.; EDGE, S.; TOBYN, M. J.; MORETON, R. C.; STANIFORTH, J. N. Adsorption of an Amine Drug onto Microcrystalline Cellulose and Silicified Microcrystalline Cellulose Samples. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 29, n. 4, p. 475-487, 2003.

STORPIRITS, S.; GAI, M. N. ; CAMPOS, D. R.; GONÇALVES, J. E. *Farmacocinética Básica e Aplicada*. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan/GEN, 2011. 222 p.

STRYDOM, S. J.; OTTO, D. P.; LIEBENBERG, W.; LVOV, Y. M.; VILLIERS, M. M.. Preparation and characterization of directly compactible layer-by-layer nanocoated cellulose. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 404, p. 57-65, 2011.

SUZUKI, T.; NAKAGAMI, H. Effect of crystallinity of microcrystalline cellulose on the compactability and dissolution of tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 47, p. 225–230, 1999a.

SUZUKI, Y.; MAKINO, Y. Mucosal drug delivery using cellulose derivatives as a functional polymer. *Journal of Controlled Release*, v. 62, p. 101-107, 1999b.

THE INTERNATIONAL PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS Council and Pharmaceutical Quality Group, PQG-Good Manufacturing Practices Guide for Pharmaceutical Excipients, 2006.

THOORENS, G.; KRIER, F.; LECLERCQ, B.; CARLIN, B.; EVRARD, B. Microcrystalline cellulose, a direct compression binder in a quality by design environment: a review. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 473, p. 64-72, 2014

TSUME, Y.; LANGGUTH, P.; GARCIA-ARIETA, A.; AMIDON, G. L. In silico prediction of drug dissolution and absorption with variation in intestinal pH for SCB class II weak acid drugs: ibuprofen and ketoprofen. *Biopharmaceutical and Drug Disposition*, v. 33, p. 366-377, 2012.

TUBIC-GROZDANIS, M.; HILFINGER, J. M.; AMIDON, G. L.; KIM, J. S.; KIJEK, P.; STAUBACH, P.; LANGGUTH, P.. Pharmacokinetics of the CYP 3A Substrate Simvastatin following Administration of Delayed Versus Immediate Release Oral Dosage Forms. *Pharmaceutical Research*, v. 25, n. 7, p. 1591-1600, 2008.

STRYDOM, S. J.; OTTO, D. P.; LIEBENBERG, W.; LVOV, Y. M.; VILLIERS, M. M.. Preparation and characterization of directly compactible layer-by-layer nanocoated cellulose. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 404, p. 57-65, 2011.

STULZER, H. K.; RODRIGUES, P. O.; CARDOSO, T. M.; MATOS, J. S. R.; SILVA, M. A. S. Compatibility studies between captopril and pharmaceutical excipients used in tablets Formulações. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 91, p. 323-328, 2008.

SUZUKY, T.; NAKAGAMI, H. Effect of crystallinity of microcrystalline cellulose on the compactability and dissolution of tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 47, p. 225–230, 1999a.

SUZUKY, Y.; MAKINO, Y. Mucosal drug delivery using cellulose derivatives as a functional polymer. *Journal of Controlled Release*, v. 62, p. 101-107, 1999b.

THOORENS, G.; KRIER, F.; LECLERCQ, B.; CARLIN, B.; EVRARD, B. Microcrystalline cellulose, a direct compression binder in a quality by design environment: a review. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 473, p. 64-72, 2014.

TOLEDO, A. C. O.; DUARTE, M. do R.; NAKASHIMA, T. Caracterização Morfo-anatômica das Folhas de *Symphytum officinale* L. (Boraginaceae). *Acta Farmaceutical Bonaerense*, v. 23, n. 3, p. 359-364, 2004.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. National Formulary. USP35/NF30. Volumen 2, First Supplement. Rockville, MD: United States Pharmacopeia, 2012. pp. 3607-3608.

_____. National Formulary. USP34-NF29. Washington, Dc: Pharmacopeial Convention, 2012.

_____. 18. ed. Washington, Dc: Pharmacopeial Convention, 1970.

VAUGHAN C. J.; GOTTO A. M.. Update on statins: 2003. *Journal of the American Heart Association*, v. 35, p. 1-10, 2004.

VEHOVEC, T.; GARTNER, A.; PLANINĚK, O.; OBREZA, A. Influence of different types of commercially available microcrystalline cellulose on degradation of perindopril erbumine and enalapril maleate in binary mixtures. *Acta Pharmaceutica*, v. 62, p. 515-528, 2012.

VOLPE, D.A. Application of method suitability for drug permeability classification. *APPS Journal*, v. 12, n. 4, p. 670-678, 2010.

WAGNER, J. G.; CHRISTENSEN, M.; SAKMAR, E.; BLAIR, D.; YATES, J. D., WILLIS, P. W.; SEDMAN, A. J.; STOLL, R. G. Equivalence lack in digoxin plasma levels. *JAMA*, vol. 224, n.2, p. 1999-204, 1973.

WANG, J.; CAI, Z.. Investigation of inclusion complex of miconazole nitrate with β -cyclodextrin. *Carbohydrate Polymers*, v. 72, p. 255-260, 2008.

YASIR, M.; ASIF, M.; AMMEDUZAFAR, CHAUHAN, I.; SINGH, A. P. In *vitro-in vivo* correlation: a review. *Drug Invention Today*, v. 2, n. 6, p. 282-286, 2010.

YOSHINARI, M.; MATSUZAKA, K.; HASHIMOTO, S.; ISHIHARA, K.; INOUE, T.; ODA, Y.; IDE, T.; TANAKA, T.. Controlled Release of Simvastatin Acid using Cyclodextrin Inclusion System. *Dental materials journal*, v. 26, n. 3, p. 451-456, 2007.

YU, X. L.; CARLINA, A. S.; AMIDON, G. L.; HUSSAINA, A. S. Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 270, p. 221-227, 2004.

YUZBASIOGLU, D.; UNAL, F.; YILMAZ, S.; AKSOY, H.; ÇELIK, M.. Genotoxicity testing of fluconazole *in vivo* an *in vitro*. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 649, p. 155-160, 2008.

ZHANG, G. G. Z.; LAW, D.; SCHMITT, E. A.; QIU, Y.. Phase transformation considerations during process development and manufacture of solid oral dosage forms. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 371-390, 2004.

ZHANGA, Y.; HUOA, M.; ZHOUA, J.; XIE, S. PKSolver: an add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, v. 99, n. 3, p. 306–314, 2010.

ZHU, Y.; CHE, L.; HE, H.; JIA, Y.; ZHANG, J.; LI, X. Highly efficient nanomedicines assembled via polymer–drug multiple interactions: Tissue-selective delivery carriers. *Journal of Controlled Release*, v. 152, p. 317-324, 2011.

APENDICE A – Artigo publicado no Journal of Thermal Analysis and Calorimetry

J Therm Anal Calorim (2011) 106:665–670
DOI 10.1007/s10973-010-1274-y

Application of thermal analysis and pyrolysis coupled to GC/MS in the qualification of simvastatin pharmaceutical raw material

José Valdilânio Virgulino Procópio · Valmir Gomes de Souza ·
Rodrigo Albuquerque da Costa · Lidiane Pinto Correia ·
Fábio Santos de Souza · Rui Oliveira Macêdo

CBRATEC7 Conference Special Issue
© Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary 2011

Abstract The simvastatin (SV) is nowadays produced semi-synthetically from lovastatin. It's one of the statins most commonly used to treat several forms of hypercholesterolemia. This study aimed to apply the thermal characterization of the SV raw material using thermoanalytical techniques and its degradation products by Pyrolysis coupled to Gas chromatography/Mass spectrometry (Pyr-GC/MS). It was studied three samples of SV (SVA, SVB, and SVC). The results showed thermal behavior differences of the samples during the melting process transition and the activation energies (E_a) of the thermal decomposition, which were correlated to the thermal stability of them. The first decomposition step of Pyr-GC/MS showed two new compounds of m/z 284 and 207, in proportions dependents according to the pyrolysis temperature.

Keywords Simvastatin · Thermal analysis · Pyrolysis · Thermal kinetics

Introduction

The Fig. 1 shows the chemical structure of SV that is nowadays produced semi-synthetically from lovastatin.

It's one of the statins most commonly used to treat several forms of hypercholesterolemia [1, 2].

The thermal analysis is applied to any technique which involves a measurement of a material's specific property while the temperature is controlled (either changed or maintained) and monitored [3].

Thermal analytical methods prove to be as rapid and reproducible methods that can be used, alone or combined with other techniques, with different purposes in the pharmaceutical industry, for example: study of the characterization and thermal decomposition of drugs [4–7], in the development of solid pharmaceutical forms [8, 9].

This study aimed to apply the thermal analysis (Termogravimetry (TG), Differential scanning calorimetry (DSC) and Differential scanning calorimetry coupled to Photovisual system (DSC-Photovisual)) and Pyrolysis coupled to Gas chromatography/Mass spectrometry (Pyr-GC/MS) to characterize the pharmaceutical raw material simvastatin.

Experimental

Samples

It was used three different SV samples (SVA, SVB, and SVC). All gases utilized were chromatographic grade.

Thermal analysis studies

The calorimetry curves were recorded with a differential scanning calorimeter (Shimadzu, model DSC-50) using a

J. V. V. Procópio · V. G. de Souza · F. S. de Souza ·
R. O. Macêdo
Department of Pharmaceutical Sciences, Unified Laboratories of
Pharmaceutical Development and Assays, Federal University of
Paraíba, Campus I, University City, João Pessoa, PB 58059-970,
Brazil

J. V. V. Procópio (✉) · R. A. da Costa ·
L. P. Correia · F. S. de Souza · R. O. Macêdo
Department of Pharmaceutical Sciences, Postgraduate Program
in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco,
University City, Artur de Sá Avenue, Recife, PE 50740-521,
Brazil
e-mail: procopiojvv@yahoo.com.br

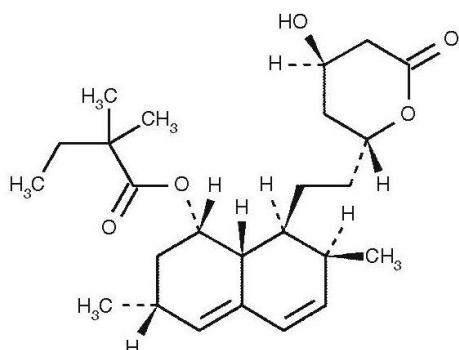


Fig. 1 Chemical structure of simvastatin

closed aluminum crucible. The apparatus was calibrated using indium (156.6 ± 0.3 °C) as standard. The heat flow signal was calibrated by melting heat of indium (28.59 ± 0.3 J g⁻¹). Rising temperature experiments were conducted in the temperature range 25–250 °C at heating rates of 2, 5, 10, 20, and 40 °C min⁻¹ in dry nitrogen flow 50 mL min⁻¹ with a sample mass in the 2.0 ± 0.1 mg. The DSC data were analyzed using the Tasys software from Shimadzu.

DSC-Photovisual data were recorded with a differential scanning calorimeter (Shimadzu, model DSC-50) coupled to a photovisual system, equipped with a microscope (Olympus, model SZ-CTV60) and a camera (Sony, model VCC-520). The samples were placed into an opened aluminum crucible and heated in the temperature range 25–300 °C at heating rate of 10 °C min⁻¹ under the same conditions of nitrogen flow from conventional DSC. The pictures were taken by Asymetrix DVP 4.0 program at real time to observe the phase transitions in the samples.

The dynamic thermogravimetric curves were recorded with a thermobalance (Shimadzu, model TGA-50) using alumina crucible. The apparatus was calibrated with calcium oxalate monohydrate. Rising temperature experiments were conducted in the temperature range 25–900 °C at heating rates of 10, 20, and 40 °C min⁻¹ in synthetic air and nitrogen flow 20 and 50 mL min⁻¹, respectively, with a sample mass in the 5.2 ± 0.1 mg. The isothermal curves were obtained in the same equipment under the same conditions of air and mass from dynamic thermogravimetric curves. The temperatures used for isothermal studies were: 165, 175, 185, 195, and 205 °C. The isothermal TG data were analyzed using the Tasys software from Shimadzu. The reaction order (*n*) and activation energy (*E*_a) were determined using the Ozawa's model for the TG dynamic data in the synthetic air and nitrogen atmosphere [10]. The kinetic parameters of decomposition were

calculated using the Arrhenius's equation on the basis of TG isothermal data [11].

The reaction order was made by graphic method using the following relations: order zero $\Delta m/\Delta t$, first order $\Delta \ln m/\Delta t$ and second order $\Delta(1/m)/\Delta t$.

The reaction rate constant of order zero was obtained using the classical Arrhenius's equation $k = (m_0 - m_t)t^{-1}$, where, m_0 (initial mass) and m_t (mass at time *t*).

The curves *k* versus *T* were adjusted to an exponential equation, from which it was possible to extrapolate back to room temperature and hence determine the rate constant at temperature 30 °C.

The time required for decomposition of 2% of the initial mass in isothermal decomposition was determinate using the equation $m_{100} - m_{98} = k_{30}t$

The correlation of the activation energy determined by the Ozawa's model and the extrapolated constant (30 °C) obtained by the Arrhenius's equation was determinate by plotting k_{30} versus *E*_a.

Pyrolysis coupled to Gas chromatography/Mass spectrometry (Pyr-GC/MS)

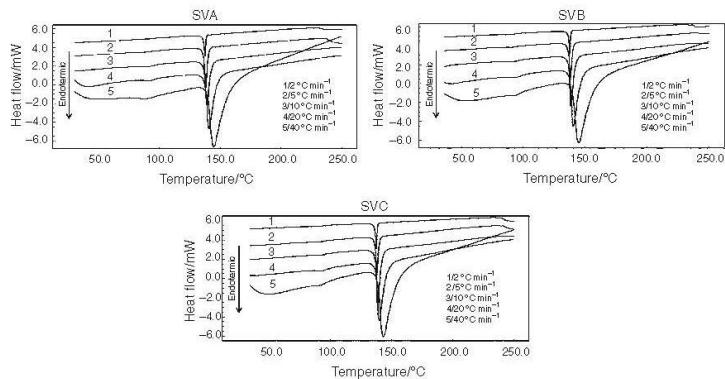
Pyrolysis studies were conducted at pyrolyzer coupled to a gas chromatograph system (Shimadzu, GCMS-QP5050A), directly interfaced with a mass spectrometer with electron ionization source. The fragmentation was performed by electronic impact with ionization energy of 70 eV. The spectrometer was operated in SCAN mode, scanning a range mass of *m/z* 50–550. The temperature of the ion source was 290 °C. It was used a capillary column with stationary phase phenyl:dimethylpolysiloxane (5:95), with 30 m length, 0.25 mm internal diameter, and 0.25 μm particle size. The temperature program consisted of two segments: first, the column was rising temperature segment with a heating rate of 15 °C min⁻¹ up to the final temperature of 290 °C, and second, an isothermal segment with the probe held at the final temperature for 10 min. Helium was used as carrier gas at a flow rate of 1 mL min⁻¹ with split ratio of 1:5. The samples corresponds to a little simvastatin crystal put in platinum crucible and introduced to the pyrolyzer at the temperatures of 200, 250, 300, 400, and 550 °C, separately for each experiment.

Results and discussion

Thermal analysis studies

The analysis of DSC curves of the samples SVA, SVB, and SVC in the heating rates of 2, 5, 10, 20, and 40 °C min⁻¹

Fig. 2 DSC curves of SVA, SVB, and SVC samples in the heating rates of 2, 5, 10, 20, and $40\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$



shown in Fig. 2 revealed the existence of two endothermic transitions in the range 25–250 °C. The first phase transition in the temperature range 90–100 °C corresponds to the water volatilization. The second in the range 130–160 °C at heating rates of 2–20 °C min⁻¹ is due to the melting process. In the heating rate of 40 °C min⁻¹ it is observed an enlargement in the endothermal peak correspondingly to the simvastatin fusion. Such fact can be explained by occurrence of the thermal processes of fusion and decomposition simultaneously, where in the temperature onset begin the melting process and before temperature endset start thermal decomposition process with mass loss.

Figure 3 shows the pictures obtained in the DSC-Photovisual where is possible to visualize different behavior between simvastatin raw materials. The SVA presented a process of fusion more slow than SVB and SVC in the temperature about 137 °C. The total volatilization process of sample SVA in temperature below 250 °C was faster than SVB and SVC. The different thermal behavior suggests that the simvastatin pharmaceutical raw material from different manufacturers presents different physical qualities. The SVA is different than SVB and SVC.

Figure 4 shows the dynamic thermogravimetric curves of the samples SVA, SVB, and SVC in the heating rates 10, 20, and $40\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ and DSC curve at a heating rate of $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. The DSC curve shows the melting point of simvastatin occurring about 137 °C, while the TG curves show different behavior between heating rates for each sample of simvastatin. In the heating rate of $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ can be verified three consecutive steps of mass loss in all samples studied. With increasing of heating rate it is observed a displacement in the temperatures of thermal decomposition associated with the tendency to form a unique step.

TG data was used to calculate kinetics parameters of activation energy (*Ea*) and reaction order (*n*) using Ozawa's model. The results obtained for different samples

showed a kinetic process with zero order reaction for all samples in first and main step of decomposition. The activation energy values were different among the samples, where SVA presented *Ea* about 73.10 kJ mol⁻¹, while SVB and SVC showed values about 98.67 and 99.67 kJ mol⁻¹, respectively.

Isothermal TG data was used to determine kinetic parameters using Arrhenius's equation. The reaction order was obtained by graphic method and its linear correlation presented similar values for zero, first and second order. The decision about reaction order of simvastatin thermal decomposition was resulting of the comparison between TG dynamic and TG isothermal data after to compare the results of Arrhenius and Ozawa models. The reaction order chosen was zero order. The rate constants were calculated from TG isothermal data using Arrhenius's equation for reaction of zero order.

The correlation of the activation energy determined by the Ozawa's model and the extrapolated constant (30 °C) obtained by the Arrhenius's equation showed inversely linear correlation, Fig. 5a, where the SVC sample with the higher activation energy of dynamical thermal decomposition (99.67 kJ mol⁻¹) showed the lesser reaction constant of isothermal decomposition with value of k_{30} ($1.88 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$), whereas the SVA sample had lesser activation energy of dynamical thermal decomposition (73.10 kJ mol⁻¹) and showed the higher reaction constant of isothermal decomposition k_{30} ($2.14 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$).

Using the Arrhenius equation for zero order reaction was obtained the time required for decomposition of 2% of the initial mass in isothermal decomposition and correlated with activation energies in dynamical thermal decomposition for those samples, Fig. 5b. The SVC sample with the higher activation energy of decomposition would require 3.38 years while the SVA would need only 2.96 years. These results validate the model for analysis and differentiation among samples of SV, where the kinetic process for

Fig. 3 DSC-Photovisual of SVA, SVB, and SVC samples in the heating rate of $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$

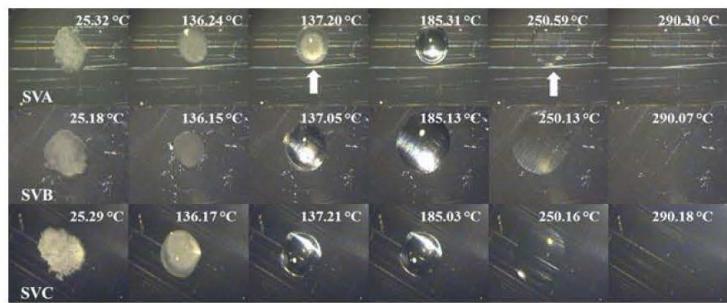


Fig. 4 Dynamic thermogravimetric curves of SVA, SVB, and SVC samples on different heating rates 10, 20, and $40\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ and DSC heating rate of $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$

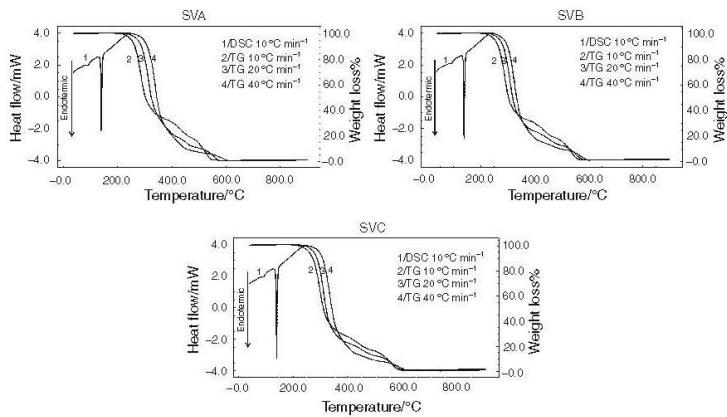
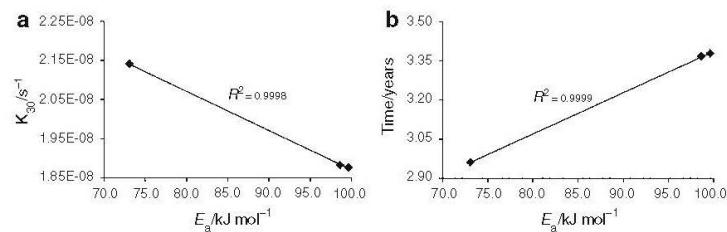


Fig. 5 Correlation between the average kinetic energy of degradation for each sample, and their extrapolated constant at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ in (a) and the time required for mass loss of 2% in (b)



reaction of zero order presented good correlation between Ozawa and Arrhenius models.

Pyrolysis coupled to Gas chromatography/Mass spectrometry (Pyr-GC/MS)

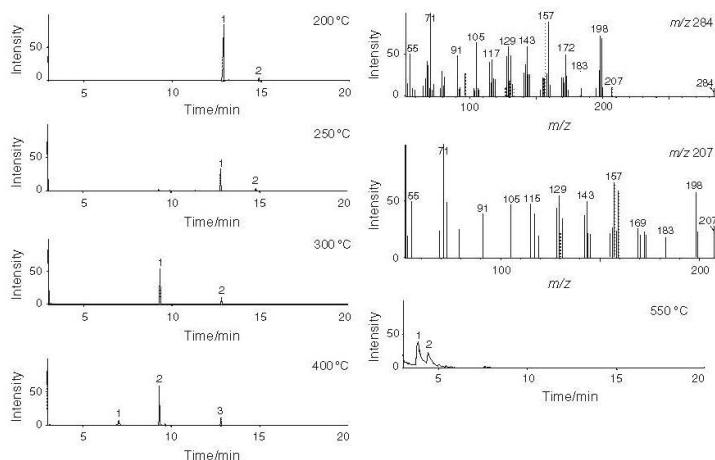
Figure 6 shows pyrograms obtained at temperatures of 200, 250, 300, 400, and $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ where was possible to identify the fragmentation of SV in the thermal decomposition. Any peak of SV molecular ion at m/z 418 was founded in the spectra. This fact means that SV was decomposed in all temperatures used in this study.

The temperatures of 200 and $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ corresponding to the first stage of dynamical thermal decomposition showed

the formation of two compounds in different proportions if 200 or $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ was applied into pyrolyzer. At the temperature of $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, Fig. 6, the peak 1 in pyrogram corresponding to the fragment of a m/z 284 which presented 95.67% of relative area. The second peak in pyrogram was identified as a fragment of a m/z 207 corresponding to the 4.33% of relative area. At the temperature of $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ the peaks 1 and 2 attributed to the same fragments at the temperature of $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ changed in the proportion of them, the peaks 1 and 2 presented 87.52 and 12.48% of relative areas.

The mass loss in the pyrolyzer corresponding to the two fragments calculated in relation to the molecular weight of the SV (m/z 418.57) using the equation 1:

Fig. 6 Pyrograms obtained for SV, at a temperatures of 200, 250, 300, 400 e 550 °C, showing the degradation products of the drug thermal decomposition process; 200 and 250 °C (1) m/z 284, (2) m/z 207; 300 °C (1) m/z 240, (2) m/z 207; 400 °C (1) m/z 238, (2) m/z 240, (3) m/z 207; 550 °C (1) m/z 142, (2) m/z 156



$$\text{Mass loss (\%)} = \left\{ \left[\left(\frac{284}{418.57} \right) (\% \text{peak1}) \right] + \left[\left(\frac{207}{418.57} \right) (\% \text{peak2}) \right] \right\} \quad (1)$$

It presented 67.14% at a temperature of 200 °C and 65.64% at a temperature of 250 °C. These values were compared with that obtained in the first stage of dynamical thermal decomposition in termogravimetric curves for three batches of SV which presented a mass loss average of 64.16% at a heating rate of 10 °C min⁻¹.

At the temperatures higher of 300 °C, corresponding to the other steps of thermal decomposition in TG curves, the fragment m/z 284 was not detected showing a difference on pyrolytic fragments. At 300 °C the peaks 1 and 2 were identified as m/z 240 and 207 with 75.94 and 24.06% of relative areas. At the 400 °C three peaks were observed in pyrogram where peak 1 was identified as a new compound with m/z 238 responsible for 19.66% of relative area. The peaks 2 and 3 were similar that founded at 300 °C, respectively m/z 240 and 207 with relative areas of 60.03 and 20.31%. At 550 °C, the pyrogram in Fig. 6 shows peaks 1 and 2 which were identified, respectively, as a new compounds with m/z 142 and 156 presenting relative areas of 65.28 and 34.72%.

The values obtained showed a good correlation between the reaction mechanisms of thermal decomposition products obtained in the thermogravimetry and pyrolyzer.

The comparison between thermal decomposition into pyrolyzer with formation of two new compounds at 200 °C can be compared with kinetic behavior of simvastatin analyzed with dynamic thermogravimetric data. It was difficult to decide the reaction order, because in the first step of decomposition, it wasn't observed the direct

dependency degradation of simvastatin, but the simultaneous formation of two compounds.

Conclusions

The results DSC and DSC-Photovisual showed differences in the thermal behavior of the samples in the phase transitions of melting and volatilization processes.

The kinetics parameters obtained by dynamical and isothermal termogravimetric data showed that simvastatin mass loss obey a kinetic process for a reaction of zero order. The activation energies were directly correlated with thermal decomposition constants with all samples.

Pyr-GC/MS data showed a good correlation between the mass losses of pyrolyzer process with dynamical thermal decomposition in the thermogravimetry.

The identification of new compounds in the pyrograms with m/z 284 and 207 in first step of the thermal decomposition allowed to confirm the complexity in the interpretation about reaction order in isothermal decomposition of simvastatin.

Acknowledgements The authors thank financing Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) for the technical and financial support.

References

1. British Pharmacopoeia. London: United Kingdom, 2009.
2. Metcalfe CD, Miao XS. Determination of cholesterol-lowering statin drugs in aqueous samples using liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2003;998:133–41.

3. Cheng SZD, Li CY, Calhoun BH, Zhu L, Zhou WW. Thermal analysis: the next two decades. *Thermochim Acta*. 2000;355: 59–68.
4. Moura EA, Correia LP, Pinto MF, Procópio JVV, de Souza FS, Macêdo RO. Thermal characterization of the solid state and raw material fluconazole by thermal analysis and pyrolysis coupled to GC/EM. *J Therm Anal Calorim*. 2010;100:289–93.
5. da Silva RMF, de Medeiros FPM, Nascimento TG, Macêdo RO, Neto PJR. Thermal characterization of indinavir sulfate using TG, DSC, and DSC-photovisual. *J Therm Anal Calorim*. 2009;95(3): 1–4.
6. Shulga O, Dunn J. A simultaneous TG–DTA study of the thermal decomposition of 2-hydroxybenzoic acid, 2-carboxyphenyl ester (salsalate). *Thermochim Acta*. 2004;410:15–21.
7. Chawla G, Gupta P, Thilagavathi R, Chakraborti AK, Bansal AK. Characterization of solid-state forms of celecoxib. *Euro J Pharm Sci*. 2003;20:305–17.
8. Medeiros AFD, Santos AFO, de Souza FS, Júnior IDB, Valdilano J, Procópio JVV, de Santana DP, Macêdo RO. Thermal studies of pre-formulates of metronidazole obtained by spray drying technique. *J Therm Anal Calorim*. 2007;89(3):775–81.
9. Medeiros AFD, Santos AFO, de Souza FS, Procópio JVV, Pinto MF, Macêdo RO. Thermal stability of paracetamol and its pre-formulates obtained by spray drying. *J Therm Anal Calorim*. 2007;88(2):377–82.
10. Macêdo RO, Nascimento TG. Quality control of thiabendazole pre-formulation and tablets by TG and DSC coupled to the photovisual system. *Thermochim Acta*. 2002;393:85–92.
11. Gomes APB, Correia LP, Simões MOS, Macêdo RO. Development of thermogravimetric method to quantitative determination of mebendazole. *J Therm Anal Calorim*. 2007;87(3):919–25.

APENDICE B – Artigo publicado no Latin American Journal of Pharmacy



Latin American Journal of Pharmacy
(formerly *Acta Farmacéutica Bonaerense*)
Lat. Am. J. Pharm. **32** (6): 927-30 (2013)

Short communication
Received: April 7, 2013
Revised version: May 5, 2013
Accepted: May 11, 2013

Ozawa Kinetic Model Application for Physical Quality Differentiation of Simvastatin Raw Material

Ana F.O. SANTOS ^{1,2}, José V.V. PROCÓPIO ^{1,2 *}, Elisana A. de MOURA ^{1,2},
Lidiane P. CORREIA ^{1,2}, Márcia F. PINTO ^{1,2} & Rui O. MACÊDO ^{1,2}

¹ *Pharmaceutical Sciences Department, Federal University of Pernambuco, Artur de Sá Avenue, University City, Zip. 50740-521, Recife, PE, Brazil*

² *Unified Laboratory of Pharmaceutical Development and Assay, Federal University of Paraíba, Campus I, Zip. 58059-900, João Pessoa, PB, Brazil*

SUMMARY. The kinetic study using thermogravimetry is an efficient method to determine possible decomposition reaction order of drugs in solid state. The aim of this study was to obtain kinetic parameters by Ozawa method in different batches of simvastatin and models of data treatment. Kinetic data showed values of reaction order changing between the batches of simvastatin, in the heating rates and in the models of data treatment. This work allowed to development a new interpretation of kinetic parameters calculated by Ozawa method different from those published in the literature. The reaction order calculated with three batches of simvastatin showed differences between them.

INTRODUCTION

Simvastatin is one of the statins most commonly used to treat several forms of hypercholesterolemia, derived of fermentation product of *Aspergillus terreus*. It is a white crystalline powder, non-hygroscopic, and insoluble in water with molecular weight 418.57 g/mol and octanol/water partition coefficient (log P) equal to 4.68. The melting occurs between 135-138 °C and absorbs in the ultraviolet region in acetonitrile with maximum wavelengths at 231, 238, and 247 nm ¹⁻³.

Thermogravimetry is an analytical, quantitative and comparative method, capable of producing fast and reproducible results. It can be used in the quality control of drugs, with a view to the improvement of the final product and for the determination of drug quality, via technological parameters ⁴⁻⁷.

Several studies have presented the reaction order and the kinetic energy of simvastatin, but variances in results have been observed, suggesting that is necessary the application of statistical models and greater interpretation of decomposition steps observed using thermogravimetry and Ozawa dynamic method ⁸⁻¹⁰.

The kinetic of Ozawa obtained from the dynamic TG data has been employed to evaluate the kinetic parameters: activation energy (Ea) frequency factor (A) and order-reaction (n), using the decomposed fraction (alpha) between the start and end of the step of decomposition ¹¹.

Non-isothermal kinetics are also very useful beside thermal analysis, because many natural processes proceed non-isothermally, for instance, in industrial processes, as well as in practical processes ¹².

The aim of this study was to obtain kinetic parameters (reaction order and activation energy) by Ozawa method of different batches of simvastatin and models of data treatment.

MATERIAL AND METHODS

Samples

Three batches of simvastatin raw materials, obtained from India, were used (SVA, SVB and SVC).

Thermal Analysis

The thermogravimetric dynamic curves of simvastatin were performed in a thermobalance Shimadzu, model TGA-50H, at a heating rate of

KEY WORDS: Kinetic parameters, Ozawa method, Quality control of drugs, Reaction order, Simvastatin.

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

10, 20 and 40 °C/min temperature range 25-900 °C in atmosphere of synthetic air and nitrogen with flow of 20 and 50 mL/min, respectively. The mass used was 5.20 (± 0.01) mg which was put in an alumina crucible. The instrument was calibrated using calcium oxalate monohydrate.

Kinetic parameters

The kinetic parameters activation energy (Ea) and reaction order (n) were determined using TGA Kinetic Analysis Program (Ozawa method) of the TASYS Software Shimadzu.

The models of tangent and first derivative curve to data treatment were used to determine the temperature range (initial and end) of principal event in the different heating rates to obtain the percentage of correspondent mass losses.

Pyrolysis coupled to Gas chromatography/Mass spectrometry (Pyr-GC/MS)

Pyrolysis studies were conducted at pyrolyzer coupled to a gas chromatograph system (Shimadzu, GCMS-QP5050A) directly interfaced with a mass spectrometer with electron ionization source. The fragmentation was performed by electronic impact with ionization energy of 70 eV. The spectrometer was operated in SCAN mode scanning a range mass of 50-550 m/z . The temperature of the ion source was 290 °C. It was used a capillary column with stationary phase phenyl:dimethylpolysiloxane (5:95), with 30 m length, 0.25 mm internal diameter and 0.25 μ m film thickness. The temperature program consisted of two segments: first the column was rising temperature segment with a heating rate of 15 °C/min up to the final temperature of 290

°C and second an isothermal segment with the probe held at the final temperature for 10 min. Helium was used as carrier gas at a flow rate of 1 mL/min with split ratio of 1:5. The samples correspond to a little simvastatin crystal put in platinum crucible and introduced to the pyrolyzer at the temperatures of 200, 250, 300, and 400 °C separately for each experiment.

RESULTS AND DISCUSSION

The reaction order of SVA, SVB and SVC showed different values using models of data treatment by tangent and first derivative curve methods (Table 1). Additionally some changes in the reaction order values between the simvastatin batches in the same model of data treatment were observed. Table 1 presents different values of reaction order for SVA and SVB in the heating rate of 40 °C/min when compared with heating rates of 10 and 20 °C/min by tangent method. The simvastatin batch (SVC) presented same reaction order value for three heating rates ($n = 2$). Table 1 shows the values obtained by first derivative method evidencing kinetic processes of zero order to SVA and SVB simvastatin batches. SVC presented a process of second order in 10 °C/min and zero order in 20 °C/min. The data of SVB and SVC obtained in 40 °C/min did not allow to calculate the reaction order.

The activation energy of SVA, SVB and SVC showed similar values when calculated by tangent and first derivative curve (Table 2). Additionally, some changes in the activation energy values between the simvastatin batches in the same model of data treatment were observed. The temperature interval used to calculate activation energy was different between tangent and first derivative methods. Table 2 presents

Sample	Tangent		First derivative		
	Heating rate (°C/min)	T (°C)	Reaction order	T (°C)	Reaction order
SVA	10	253.47-306.06	1	185.07-344.31	0
	20	281.08-350.86	1	200.00-365.58	0
	40	309.66-394.00	0	226.64-362.50	0
SVB	10	255.28-320.28	2	193.73-354.20	0
	20	275.71-361.08	2	200.10-365.13	0
	40	299.08-355.84	1	201.11-422.07	*
SVC	10	273.66-327.39	2	185.07-336.11	2
	20	278.23-328.63	2	203.36-365.18	0
	40	299.33-403.50	2	211.03-431.11	*

Table 1. Reaction order of SVA, SVB and SVC using Ozawa method. *The software TASYS showed that is not possible to calculate kinetic parameters in this condition.

Sample	Heating rate (°C/min)	Tangent		First derivate	
		T (°C)	Ea (kJ/mol)	T (°C)	Ea (kJ/mol)
SVA	10	253.47-306.06	86.4	185.07-344.31	87.1
	20	281.08-350.86	88.3	200.00-365.58	88.7
	40	309.66-394.00	95.3	226.64-362.50	88.7
SVB	10	255.28-320.28	112.1	193.73-354.20	113.2
	20	275.71-361.08	113.2	200.10-365.13	115.2
	40	299.08-355.84	114.7	201.11-422.07	*
SVC	10	273.66-327.39	108.9	185.07-336.11	107.1
	20	278.23-328.63	109.2	203.36-365.18	108.4
	40	299.33-403.50	109.5	211.03-431.11	*

Table 2. Activation energy of SVA, SVB and SVC using Ozawa method. *The software TASYS showed that is not possible to calculate kinetic parameters in this condition.

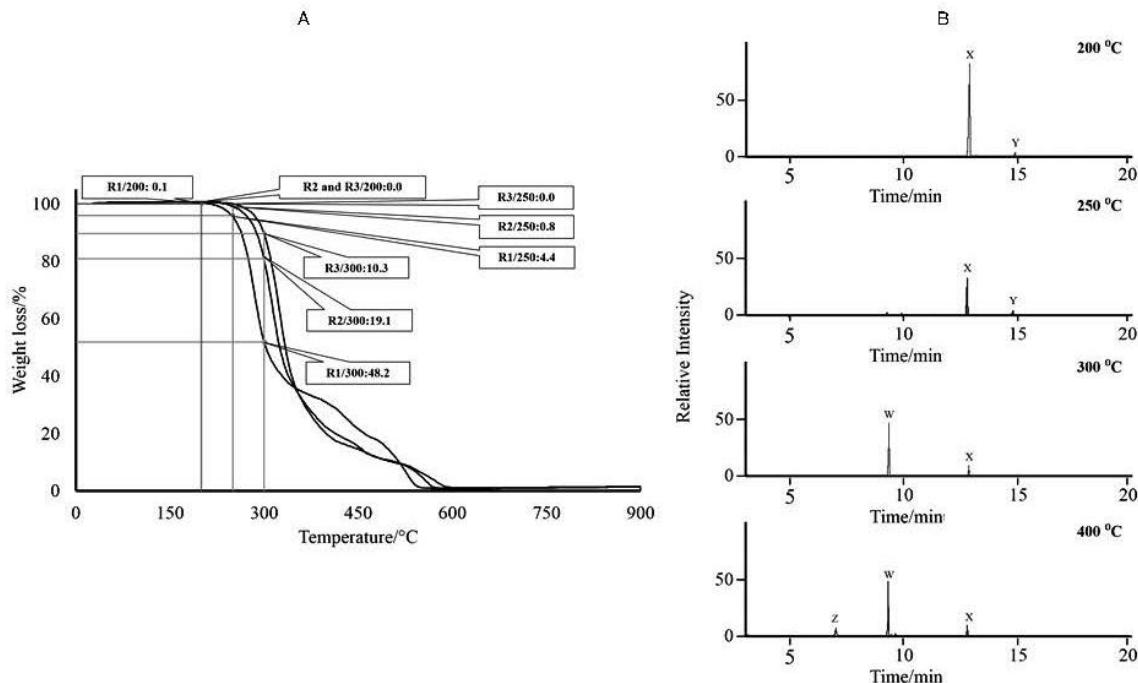


Figure 1. TG curves of simvastatin at heating rates 10, 20, and 40 °C/min. (A) and pyrograms of simvastatin obtained at temperatures 200, 250, 300, 400 °C (B). Heat rate/Temperature (°C): Weight loss (%), where R1, R2 and R3 correspond to 10, 20, and 40 °C/min, respectively.

the following order of activation energy: SVB>SVC>SVA.

TG curves (Fig. 1A) showed different mass losses at temperatures of 200, 250, and 300 °C in the heating rate of 10, 20, and 40 °C/min. According to TG curve in 10 °C/min the simvastatin lost 0.1, 4.4, and 48.2%, respectively at temperatures of 200, 250, and 300 °C. TG curve in 20 °C/min the simvastatin lost 0.0, 0.8, and 19.1%, respectively, at temperatures of 200, 250, and 300 °C. TG curve in 40 °C/min the simvas-

tatin lost 0.0, 0.0, and 10.3%, respectively, at temperatures of 200, 250, and 300 °C, respectively.

Pyrograms obtained for SV at temperatures of 200, 250, 300, and 400 °C (Fig. 1B), showing the degradation products X *m/z* 284 and Y *m/z* 207 at 200 and 250 °C with different intensities, and at 300 °C the products X *m/z* 284 and W *m/z* 240. At the temperature of 400 °C the products X *m/z* 284, W *m/z* 240 and Z *m/z* 238 were obtained. The degradation products X and Y

undergo transformation at temperatures higher than 300 °C, evidencing successive reactions.

Procópio *et al.*⁹ using pyrolysis can identify potential degradation products at different temperatures (200, 250, 300, and 400 °C) corresponding to the first degradation stage.

The data of pyrolysis correlated with thermogravimetric dynamic curve demonstrating that the linear increase at lower temperatures (200–250 °C) is related to the formation of two major degradation products X and Y observed at the two temperatures but in different proportions, as previously observed by Procópio *et al.*⁹.

The peak Y was not observed and the new degradation product, identified for peak W, was observed when used temperature of 300 °C. This qualitative change in degradation products shows that kinetic process of simvastatin thermal decomposition obey the reaction of second order according evidenced by tangent method (Table 1). The use of first derivative curve method to calculate the kinetic parameters by means of the Ozawa method is not valid in this case of simvastatin.

The different values of reaction order obtained by tangent method for these three batches of simvastatin showed a good application of the Ozawa method in the differentiation between different batches of pharmaceutical raw material.

CONCLUSION

TG data obtained by tangent method to calculate kinetic parameters by using the Ozawa method allowed differentiating the quality between batches of simvastatin.

Acknowledgements. The authors thank financing of CAPES/CNPq/ANVISA-MS/FINEP and FACEPE for the technical and financial support.

REFERENCES

1. Oliveira M.A.D., M.I. Yoshida, C.L. Gomes, W.N. Mussel, C.D. Vianna-Soares & G.A. Pi-anetti (2010) *Quím. Nova* **33**: 1653-7.
2. British Pharmacopoeia (2012) Volumes I & II (Version 16.0). The Stationery Office. London, UK.
3. Metcalfe C.D. & X.S. Miao (2003) *J. Chromatogr. A* **998**: 133-41.
4. Felix S.F., C.C.L. da Silva, L. Angnes & R.J. Matos (2009) *J. Thermal Anal. Calorim.* **95**: 877-80.
5. Macedo R.O., C.F.S. Aragao, T.G. do Nascimento & A.M.C. Macedo (1999) *J. Thermal Anal. Calorim.* **56**: 1323-7.
6. Macedo R.O., A.G. de Souza & A.M.C. Macedo (1997) *J. Thermal Anal. Calorim.* **49**: 937-41.
7. Tita D., A. Fulias & B. Tita (2011) *J. Thermal Anal. Calorim.* **105**: 501-8.
8. Ozawa T. (1965) *Bull. Chem. Soc. Japan* **38**: 1881-6.
9. Procópio J.V.V., V.G. Souza, R.A. Costa, L.P. Correia, F.S. Souza & R.O. Macêdo (2011) *J. Thermal Anal. Calorim.* **106**: 665-70.
10. Sousa M.A.F., M.M. Conceição, M.C.D. Silva, L.E.B. Soledade & A.G. Souza (2007) *J. Thermal Anal. Calorim.* **87**: 859-63.
11. Böer T.M., J.V.V. Procópio, T.G. do Nascimento & R.O. Macêdo (2013) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **73**: 18-23.
12. Ozawa T. (1986) *Thermochim. Acta* **100**: 109-18.