UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Desenvolvimento de método para avaliação do perfil de dissolução de suspensões de mebendazol

Natalia Vieira de Souza

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz

São Paulo

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Desenvolvimento de método para avaliação do perfil de dissolução de suspensões de mebendazol

Natalia Vieira de Souza

Versão corrigida da dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S719d

Souza, Natalia Vieira de
Desenvolvimento de método para avaliação do perfil de dissolução de suspensões de mebendazol / Natalia Vieira de Souza. - São Paulo, 2018.
71 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Ferraz, Humberto Gomes

1. Farmacotécnica. I. T. II. Ferraz, Humberto Gomes, orientador.

Natalia Vieira de Souza

Desenvolvimento de método para avaliação do perfil de dissolução de suspensões de mebendazol

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz

orientador/presidente

_____

1º. examinador

_____

2º. examinador

_____

3º. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2018.

EPÍGRAFE

“Insanidade é continuar fazendo sempre a mesma coisa e esperar resultados diferentes”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre à frente de tudo em minha vida e por me levar em seus braços em todos os momentos;
A toda minha família, que sempre me apoiou em todas as minhas decisões mesmo as pareciam loucura, em especial a minha mãe Neide por todo apoio;
As minhas tias que sempre estiveram ao meu lado, Marilza, Mara, Meire e Silvana;
A minha avó Elita Vieira da Costa, simplesmente por tudo;
A minha plipli linda, Camila pelas travessuras neste período;
Aos meus irmãos Kelvin e Jéssica por tudo que aprendi com eles e por todo carinho;
A Dra. Michéle Issa, por tudo que fez e faz por mim desde que a conheci, por tudo que aprendi com ela e por sua dedicação e respeito ao nosso trabalho e claro, por sua amizade;
Ao Dr. Marcelo Duque, por todos ensinamentos e por sempre estar disposto a ajudar, independente de qualquer coisa e também por sua amizade;
Aos meus amigos do laboratório DEINFAR, Katherine, Jéfferson, Gabriela, Juliana, Diego, Rosmary, Wily pela ajuda em todo este projeto, pelas risadas e travessuras e por sua fidelidade em nossa amizade;
Ao professor Humberto, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório DEINFAR e pela dedicação em seu trabalho e auxílio quando precisávamos;
Ao Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos e ao CNPq, pela oportunidade da obtenção deste título.

A todos muito obrigada

RESUMO

SOUZA, N.V. **Desenvolvimento de método para avaliação do perfil de dissolução de suspensões de mebendazol.** 2018. 71p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Este trabalho teve por finalidade desenvolver um método para a caracterização do perfil de dissolução de suspensões de mebendazol (MBZ), discriminatório para as formas polimórficas do fármaco. Pertencendo a classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), além da baixa solubilidade, o MBZ é bastante crítico por apresentar-se comercialmente disponível em duas formas polimórficas (A e C) e misturas destas. Além disso, pouca informação é encontrada acerca de métodos de dissolução de suspensões. O material apresentado está dividido em três capítulos, sendo o primeiro deles uma revisão da literatura sobre a dissolução de suspensões de fármacos que apresentam polimorfismo. Neste capítulo é feita uma abordagem sobre questões relacionadas ao desenvolvimento de métodos, como inserção das amostras na cuba de dissolução, agitação, uso de tensoativos no meio e a quantificação do fármaco. No segundo capítulo é apresentado o desenvolvimento do método de dissolução, com ênfase no estudo da solubilidade das formas polimórficas A e C de MBZ e sua interação com tensoativos. Foram realizados ensaios de solubilidade pelo método do equilíbrio, cálculo de concentração micelar crítica para os tensoativos lauril sulfato de sódio e polissorbato 80, sendo ao final realizado delineamento experimental (DOE) para o desenvolvimento do método. Pela avaliação do DOE, o local de inserção da amostra não influencia a dissolução de MBZ, por outro lado, a presença de tensoativo, assim como a forma polimórfica empregada, exercem efeito nos resultados apresentados. A partir destas informações, o método indicado para avaliação das suspensões de MBZ com potencial discriminatório de suas formas polimórficas foi definido pela utilização do aparato 2 (pá) a 75 rpm, com 2 litros de HCl 0,1 M sem tensoativo, como meio de dissolução. No último capítulo, o método desenvolvido foi utilizado na avaliação de especialidades farmacêuticas adquiridas no Brasil e em alguns países da América Latina, sendo os respectivos perfis de dissolução, comparados por meio de uma análise multivariada de componentes principais, com formulações contendo o MBZ em diferentes proporções de polimorfos. A partir dos resultados, foi possível observar que grande parte das formulações comercializadas não apresentaram perfil de dissolução satisfatório, isso pode estar relacionado com a presença considerável de polimorfo A nas matérias-primas utilizadas, comprometendo assim a sua solubilidade.

Palavras-chave: Mebendazol. Dissolução de suspensões. Polimorfismo.

ABSTRACT

SOUZA, N. V. **Method development for dissolution profile evaluation of mebendazol suspensions.** 2018. 71p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The aim of this work was to develop a method for characterization of the dissolution profile of mebendazole (MBZ) suspensions, being discriminatory for the polymorphic forms of the drug. MBZ belongs to class II of the Biopharmaceutics Classification System (BCS), besides its low solubility, it is very critic, being commercially available in two polymorphic forms (A and C) and their mixtures. Moreover, there is low information about dissolution methods for suspensions. The text presented herein is divided into three chapters, the first chapter is a literature review about dissolution of suspensions containing drugs that present polymorphism. In this chapter is made a discussion about the variables of the method, as sample insertion in the dissolution vessel, rotation speed, use of surfactants in the dissolution medium and drug quantification. The development of the dissolution method, focused on the solubility study of MBZ polymorphic forms A and C and their interaction with surfactants is presented in the chapter 2. Some tests were performed: solubility using shake flask method, calculation of micellar critical concentration for the surfactants sodium lauryl sulphate and polysorbate 80, and an experimental design (DOE) was done for developing the method. By DOE evaluation, the sample insertion site does not influence on MBZ dissolution, but the presence of surfactant and the polymorphic form used, show effect on the results. Based on these information, the method indicated for evaluation of MBZ suspensions, with discriminatory power for its polymorphic forms was defined by using apparatus 2 (paddle) at 75 rpm and 2 L of 0.1M HCl without surfactant as dissolution medium. In chapter 3, the method developed was used to evaluate pharmaceutical suspensions from Brazil and from some countries of Latin America. The respective dissolution profiles were compared by means of multivariate analysis of principal components with formulations containing MBZ in different polymorphs ratios. From the results, it was possible to observe that a great part of the commercially available formulations do not presented a satisfactory dissolution profile, and this fact can be related to a considerable amount of the crystalline form A in the raw material, which compromises its solubility.

Keywords: Mebendazole. Dissolution of suspensions. Polymorphism.

SUMÁRIO

Capítulo 1 Dissolução de suspensões de fármacos que apresentam polimorfismo 10

Resumo 11

1 Introdução 12

2 Dissolução de suspensões 13

3 Fármacos de baixa solubilidade e a questão do polimorfismo 14

4 Desenvolvimento de métodos de dissolução para suspensões contendo fármacos com polimorfismo 16

4.1 Seleção do aparato e velocidade de agitação 17

4.2 Inserção da suspensão na cuba de dissolução 20

4.3 Meio de dissolução e volume do meio 21

5 Quantificação das suspensões 23

6. Conclusão 23

REFERÊNCIAS 23

Capítulo 2 - Desenvolvimento de método de dissolução discriminativo para polimorfos A e C de mebendazol em suspensões 27

Resumo 28

1 Introdução 29

2 Material e Métodos 30

2.1. Material 30

2.2. Ensaio de solubilidade 31

2.3 Método de quantificação 31

2.4. Determinação da concentração micelar crítica 32

2.5 Preparo das suspensões 33

2.5.1 Caracterização das suspensões 34

2.5.1.1 Determinação do teor 34

2.5.1.2 Determinação do pH 34

2.5.1.3 Determinação do volume de sedimentação 34

2.6 Avaliação do perfil de dissolução das suspensões utilizando método farmacopeico 34

2.6.1 Desenvolvimento do método de dissolução para suspensões 35

3 Resultados e Discussão 36

4 Conclusão 51

Referências 51

Capítulo 3 - Avaliação do perfil de dissolução de suspensões de mebendazol comercialmente disponíveis na América Latina 54

Resumo 55

1. Introdução 56

2. Material e Métodos 57

2.1. Material 57

2.2 Métodos 58

2.2.1 Caracterização da matéria-prima 58

2.2.1.1 Difratometria de Raios-X (DRX) 58

2.2.1.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) 58

2.2.1.3 Termogravimetria (TG) 59

2.2.1.4 Densidade Verdadeira 59

2.2.2 Produção das suspensões contendo misturas de polimorfos A e C 59

2.2.3 Ensaios de dissolução 60

2.2.4 Método de quantificação 60

2.2.5 Avaliação da interação da formulação (I) com o meio de dissolução 61

2.2.6 Análise de Componentes Principais (ACP) 61

3. Resultados e discussão 61

4. Conclusão 69

Referências Bibliográficas 69

Capítulo 1

Dissolução de suspensões de fármacos que apresentam polimorfismo

Resumo

As suspensões são formas farmacêuticas no qual o fármaco está insolúvel em veículo líquido. Estas formas são bastante utilizadas em populações pediátricas e geriátricas especialmente devido a facilidade de deglutição e flexibilidade de doses. Embora existam monografias de suspensões contidas em compêndios oficiais como a Farmacopeia Americana, poucas são as formulações que possuem descrito um ensaio de desempenho adequado para avaliar a qualidade desses produtos durante o período de estabilidade, no caso o ensaio de dissolução. Além disso, existe a necessidade de verificar se os ensaios disponíveis nesses compêndios, são capazes de identificar produtos que não possuem a qualidade necessária para promover o efeito terapêutico, eficácia e segurança do medicamento. O ensaio de dissolução, avalia a liberação do fármaco da forma farmacêutica, é uma ferramenta bastante empregada para formas farmacêuticas sólidas, no entanto, pouca informação é encontrada na literatura para suspensão, em que o processo de dissolução também é um fator limitante para esta forma farmacêutica. Para tanto, este capítulo trata de uma revisão da literatura com objetivo de abordar questões importantes e que devem ser consideras para o desenvolvimento de um método de dissolução para suspensões de fármacos de baixa solubilidade e que apresentam polimorfismo, já que este é um fator de grande impacto para que se obtenha um medicamento com qualidade adequada. Dentre os tópicos aqui inseridos estão a importância da diferença de solubilidade entre polimorfos, e condições que devem ser consideradas como velocidade de agitação, seleção do pH e volume de meio, utilização de tensoativos e também a importância de um método adequado de quantificação para suspensões.

1 Introdução

A administração de medicamentos é comumente realizada por via oral, e formas farmacêuticas, como comprimidos, cápsulas, soluções e suspensões são as mais empregadas. Destas, as suspensões são formas líquidas que se apresentam bastante vantajosas devido à flexibilidade de doses e facilidade de deglutição, sendo a preferida por populações pediátricas e geriátricas. Ademais, podem ser administradas em pessoas que se encontram inconscientes (WALSH et al., 2011; RIVERA-LEYVA et al., 2012).

Nas suspensões, o fármaco encontra-se insolúvel em um veículo aquoso, sendo consideradas análogas a comprimidos e cápsulas já desintegrados, essa é uma vantagem, uma vez que esta etapa do processo de liberação é inexistente. Contudo, isso não isenta o fármaco do processo de dissolução, sendo assim, esta é uma etapa limitante para sua absorção que é um requisito para que se alcance a biodisponibilidade (BREVEDAN; VIDAL, 2012; RIVERA-LEYVA et al., 2012; VIDAL et al., 2013).

Embora as agências regulatórias mundiais exijam teste de dissolução validado para suspensões, até o momento, há poucos trabalhos na literatura e monografias disponíveis (BREVEDAN; VIDAL, 2012; BASTOS et al., 2009; RIVERA-LEYVA et al., 2012).

Durante o período de vida útil das suspensões, os parâmetros comumente considerados, infelizmente, limitam-se a avaliação da reologia e características físico-químicas da suspensão. Uma vez que a estabilidade da suspensão é um fator crítico para a terapêutica farmacológica, pois pode ter impacto na biodisponibilidade do produto, o ensaio de dissolução é essencial para garantir que o perfil de liberação do fármaco permaneça inalterado dentro do prazo de validade estabelecido (BREVEDAN; VIDAL, 2012; VIDAL et al., 2008).

Outra questão muito importante e que pode causar variabilidade no desempenho da formulação é a existência de polimorfismo do fármaco utilizado. O polimorfismo é a capacidade de um composto químico existir em mais de uma forma cristalina. Durante o processo de produção ou armazenamento, pode ocorrer a conversão da forma cristalina mais solúvel para a mais estável, podendo ocasionar diferenças na velocidade de dissolução do fármaco (AYALA; SIESLER; CUFFINI, 2008; CHIENG; RADES; AALTONEN, 2011).

Considerando que nas suspensões são veiculados fármacos de baixa solubilidade, a caracterização da forma cristalina mais adequada para a formulação é fundamental para garantir a qualidade do produto. Esta deve ser realizada na etapa de desenvolvimento e monitorada durante o tempo de estabilidade de prateleira (BREVEDAN; VIDAL, 2012).

Dada a importância do ensaio de dissolução para suspensões, o objetivo deste capítulo é fazer uma abordagem sobre os de fatores que impactam neste processo e também condições que devem ser consideradas no desenvolvimento de um método de dissolução tendo em vista a questão do polimorfismo.

2 Dissolução de suspensões

O ensaio de dissolução, uma ferramenta simples e barata, é um teste realizado *in vitro* para avaliar a velocidade em que ocorre a liberação do fármaco da forma farmacêutica. É bastante utilizado hoje por indústrias farmacêuticas para garantir o controle de qualidade e otimização de formulações durante o desenvolvimento de novos produtos. Embora tenha sido inicialmente desenvolvido para avaliação de formas farmacêuticas sólidas orais de liberação convencional ou modificada, a aplicação deste ensaio se estende também para uma diversidade de novos produtos, tais como comprimidos de desintegração oral, comprimidos mastigáveis, gomas de mascar, filmes transdérmicos, supositórios, implantes, injetáveis e também para suspensões. Assim, tanto para o desenvolvimento de novos produtos, como para avaliação no controle de qualidade, o ensaio de dissolução é essencial para avaliar a qualidade de diferentes produtos, além de mostrar a diferença entre formulações (GRUNDY et al., 1997; BASTOS et al., 2009; RIVERA-LEYVA et al., 2012; SIEWERT et al., 2003; QURESHI, (s.d); SERRA; STORPIRTS, 2007; BONFILIO et al., 2012).

Suspensões são sistemas heterogêneos, no qual o fármaco está insolúvel e encontra-se disperso em um veículo líquido ou semissólido, assim a etapa de dissolução é fundamental para a avaliação do desempenho da formulação (BREVEDAN; VIDAL, 2012; GOES; KFURI, 2005).

A maior parte das monografias disponíveis não trazem o ensaio de dissolução para avaliação do desempenho fazendo menção apenas a uniformidade

de doses e volume dispensado, como avaliação de desempenho dessa forma farmacêutica (USP, 2016).

Além disso, durante o período de vida útil das suspensões, uma vez que sua estabilidade é um fator crítico para a terapêutica farmacológica, pois pode ter impacto na biodisponibilidade do produto, o ensaio de dissolução é essencial para garantir que o perfil de liberação do fármaco permaneça inalterado dentro do prazo de validade estabelecido (BREVEDAN; VIDAL, 2012; VIDAL et al., 2008).

Ao desenvolver um método de dissolução, é importante que o volume e pH do meio seja capaz de solubilizar toda a dose do medicamento avaliado. Para fármacos com baixa solubilidade isso se torna mais difícil de se alcançar, no entanto, o aumento do volume de meio, escolha do pH onde o fármaco é mais solúvel, bem como a necessidade da utilização de tensoativos podem corroborar para solucionar este problema, proporcionando condições de não saturação do fármaco durante o ensaio (GRUNDY et al., 1997).

Durante o desenvolvimento de método para avaliação do perfil de dissolução de suspensões, deve-se considerar parâmetros como volume e introdução da amostra na cuba, que deve ser precisa e reprodutível, assim como a velocidade de agitação, que é determinada com base na viscosidade da formulação. Essa velocidade de agitação, deve ser selecionada para que se obtenha discriminação entre lotes que possam apresentar diferentes perfis de liberação. Uma outra questão, trata-se da interação entre a formulação com o meio de dissolução, pois pode ocorrer o decaimento da velocidade de dissolução devido a excipientes, principalmente os agentes suspensores que podem reagir com o fármaco ou mesmo, com componentes do meio (AZAM; HAIDER, 2008; KUMAR; YAGNESH, 2016; SIEWERT et al., 2003).

3 Fármacos de baixa solubilidade e a questão do polimorfismo

A solubilidade do fármaco está diretamente relacionada a sua dissolução. Fármacos de baixa solubilidade, além de apresentarem dissolução mais lenta, o que também reflete *in vivo*, levam mais tempo e são mais onerosos desde o seu desenvolvimento até chegar ao mercado. Entretanto, embora seja mais complicado obter medicamentos com estas características, alguns estudos mostram que grande parte destes compostos apresentam baixa solubilidade, pertencendo as

classes II ou IV do sistema de classificação Biofarmacêutica (SCB) (BATCHELOR, 2013; DI; FISH; MANO, 2012).

Uma das formas de melhorar a biodisponibilidade é melhorar a dissolução desses fármacos com baixa solubilidade. Além disso, um fator que compromete a eficiência da formulação é a questão do polimorfismo. Esta é a capacidade de uma mesma molécula exibir diferentes arranjos entre elas, originando em diferentes formas cristalinas. Tal propriedade frequentemente traz alterações nas características físico-químicas, especialmente afetam a solubilidade e consequentemente o desempenho do medicamento e ainda pode influenciar no processo de produção (AYALA; SIESLER; CUFFINI, 2008; CHEN; LU, 2013; HONORATO et al., 2012; RAW et al., 2004; UNITED STATES, 2007).

Uma das formas de melhorar a solubilidade, é a utilização de formas metaestáveis. O polimorfo metaestável apresenta menor estabilidade e tende a se transformar na forma mais estável, assim como a forma amorfa, caso ambas não estejam estabilizadas. Em condições extremas como processos de produção em que é aplicado um estresse mecânico, e também variações de temperatura, não é difícil que estas formas menos estáveis se revertam para a forma cristalina mais estável. Essas formas, principalmente a amorfa, apresentam maior solubilidade em relação a forma cristalina mais estável. Portanto, quando utilizadas matérias-primas menos estáveis, devem ser monitorada durante o tempo de prateleira do produto. Devido a sua utilização, alguns requerimentos foram levantados pelo FDA (CHIENG; RADES; AALTONEN, 2011; BLAGDEN et al., 2007; KARMWAR et al., 2012; VIPPAGUNTA; BRITTAIN, GRANT, 2001).

Diversas técnicas são utilizadas para investigar a presença e tipo de polimorfismo, dentre essas técnicas podem ser citadas a difração de raios-x, microscopia, análise térmica como utilização de calorimetria diferencial exploratória e análise termogravimétrica, e também espectroscopia incluindo Infravermelho, Raman, RMN entre outras (GARBUIO et al, 2014; RAW et al., 2004).

Um teste adequado para acompanhar o desempenho de formulações, especialmente as que contém fármacos que apresentam polimorfismo, é o ensaio de dissolução. Alterações no perfil de dissolução destas formulações durante o período de estabilidade podem ocorrer devido a transição de formas polimórficas e isso pode refletir em ensaios *in vivo*. (RAW et al., 2004; VIPPAGUNTA; BRITTAIN, GRANT, 2001).

Além disso, o ensaio de dissolução, geralmente pode fornecer um controle adequado das alterações da proporção de polimorfos para fármacos pouco solúveis que podem influenciar a biodisponibilidade do medicamento. Isso pode ser observado em um estudo realizado por Freitas e colaboradores, onde eles citam que a diferença de solubilidade entre os polimorfos de meloxicam, é refletida nos perfis de dissolução (RAW et al., 2004; HASSAN; BUNACIU; FLESCHIN, 2002; FREITAS et al., 2017).

Um método de dissolução discriminatório é o mais adequado especialmente do ponto de vista da qualidade, dado que, alterações no desempenho entre os produtos será apontado por meio deste ensaio (UNITED STATES, 2000)

4 Desenvolvimento de métodos de dissolução para suspensões contendo fármacos com polimorfismo

As formas polimórficas podem se diferenciar em suas características físico-químicas, nos quais podem ser citadas diferenças no ponto de fusão, densidade verdadeira, solubilidade e velocidade de dissolução. Estas diferenças de propriedades podem impactar no desempenho *in vitro* podendo afetar diretamente a biodisponibilidade *in vivo,* além da eficácia do medicamento (CHIENG; RADES; AALTONEN, 2011; VIPPAGUNTA; BRITTAIN, GRANT, 2001).

Visto que formas polimórficas podem frequentemente influenciar a solubilidade e dissolução do fármaco, o ensaio de dissolução que seja discriminatório para estes polimorfos encontrados, torna-se essencial especialmente para fármacos de baixa solubilidade de forma que se possa garantir a estabilidade da formulação. Além disso, a interação da formulação com o meio de dissolução deve ser avaliada durante o desenvolvimento do método, pois a presença de excipientes incompatíveis seja com o fármaco ou com o meio, pode impactar na biodisponibilidade (BONFILIO et al., 2012; FREITAS et al., 2017; VIDAL et al., 2013).

Portanto, as condições adotadas, tais como velocidade de agitação, pH do meio, necessidade da utilização de tensoativos devem ser minuciosamente selecionadas para se obter um método adequado, capaz de proporcionar condições de não saturação, de forma que seja detectada as diferenças entre formulações durante o desenvolvimento de novos produtos e também no controle de qualidade (SIEWERT et al., 2003).

4.1 Seleção do aparato e velocidade de agitação

Como indicado pela USP, dos ensaios de dissolução realizado para suspensões, muitos deles são realizados utilizando o aparato 2, assim como também é para cápsulas e comprimidos, considerando que as suspensões são forma desintegradas destas (BROWN et al., 2011; NICKERSON et al., 2016; RIVERA-LEYVA et al., 2012).

A velocidade de rotação pode ser ajustada com a viscosidade da suspensão. Uma rotação mais elevada é adotada para suspensões mais viscosas, enquanto que para suspensões de menor viscosidade, rotações mais baixas são preferíveis, desta forma permitindo que o método tenha o máximo de poder discriminatório entre as formulações afim de detectar desempenho inadequado que possa ser refletido *in vivo*. Geralmente, para suspensões são utilizadas as velocidades de 25, 50 e 75 rpm, no entanto, existem métodos que aplicam uma velocidade mais alta ou mesmo diferenças entre essas citadas (BROWN et al., 2011; NICKERSON et al., 2016).

Existem poucas monografias de suspensões contidas na farmacopeia americana, no entanto, há uma planilha do FDA que contém 104 medicamentos em suspensão, destes alguns não têm método definido, outros são para suspensões extemporâneas ou que já estão referenciados na farmacopeia. Sendo assim, 76 suspensões apresentam método de dissolução no FDA. Abaixo seguem alguns exemplos exibindo as velocidades de rotação adotadas nos ensaios aplicados para estas suspensões, assim como o aparato selecionado (Tabela 1) (USP, 2016):

Tabela 1 - Condições de ensaios de dissolução contidas em monografias de suspensões da farmacopeia americana (USP 39)

Ativo	Aparato	Agitação	Meio de dissolução	Volume	Tempo	Especificação	Quantificação
cefdinir	pá	50 rpm	Tampão fosfato pH 6,8	900 mL	30 min	80%	Espectrofotometria
axetil cefuroxima – método 1	pá	50 rpm	Tampão fosfato pH 7,0	900 mL	30 min	75%	Espectrofotometria
axetil cefuroxima – método 2	pá	55 rpm	Tampão ácido clorídrico	900 mL	45 min	75%	Espectrofotometria
acetato de megestrel -teste 1 e 2	pá	25 rpm	Lauril sulfato de sódio 0,5%	900 mL	30 min	80%	Espectrofotometria
acetato de megestrel -teste 3	pá	50 rpm	Lauril sulfato de sódio 0,5% - desgaseificado	900 mL	30 min	80%	Espectrofotometria
fenitoína	pá	35 rpm	Tris (hydroximetil)amino metano/ Lauril sulfato de sódio pH 7,5 - desgaseificado	900 mL	60 min	80%	CLAE
ibuprofeno	pá	50 rpm	Tampão fosfato 0,01 M pH 7,2	900 mL	60 min	80%	CLAE
meloxicam	pá	25 rpm	Tampão fosfato pH 7,5	900 mL	15 min	75%	Espectrofotometria
micofenolato de mofetila	pá	40 rpm	HCl 0,1 M	900 mL	20 min	80%	Espectrofotometria
nevirapina	pá	25 rpm	HCl 0,1 M	900 mL	45 min	80%	CLAE
oxcarbazepina	pá	75 rpm	Lauril sulfato de sódio 1,0%	890 mL	30 min	80%	CLAE

É possível verificar nesta tabela, que as velocidades de agitação diferem entre as suspensões, e que não seguem um padrão definido, no entanto, permanecem entre 25 e 75 rpm. Dos 76 métodos encontrados, 71 sugerem o aparato 2, 4 sugerem a utilização do aparato 4 e 1 deles, ambos os aparatos podem ser utilizados (FDA, 2017).

Tabela 2 - Condições de ensaios de dissolução utilizando aparato 4 para suspensões, contidas no FDA

Fármaco	Forma farmacêutica	aparato	Fluxo	Meio de dissolução	Volume
acetato de betametasona/ fosfato de betametasona	Suspensão injetável	IV – sistema aberto	8 mL/min	0,05% LSS pH 3,0	**
ciprofloxacino	Suspensão injetável	IV- sistema fechado celula 22 mm + esferas de vidro – amostragem 100 µL	6mL/min	5,0 mM tampão acetato pH 4,5	480 mL
acetato de medroxiprogesterona	Suspensão injetável	IV – sistema fechado célula 22,6 mm + 13 g de esferas de vidro 1mm	17 mL/min	0,5% LSS em água	**
acetato de metilprednisolona	Suspensão injetável	IV – sistema aberto		0,55% LSS	**
pamoato de olanzepina	Suspensão intramuscular – liberação estendida	IV – célula 22,6 mm	3 mL/min	1% LSS em Tampão fosfato pH 6,8	**

Na Tabela 2 encontra-se as suspensões no qual é utilizado aparato 4 para o ensaio de dissolução (FDA, 2017).

A maioria dos ensaios de dissolução contidos no FDA para suspensões, utiliza-se aparato 2. É importante observar que nenhuma dessas suspensões na Tabela 2, é administrada por via oral, mas tratam-se de suspensões injetáveis (FDA, 2017).

Para o aparato 4 são mencionadas as razões de fluxo de meio de dissolução que variam entre 3 mL min^{-1} a 17 ml min^{-1}, conforme apresentado na Tabela 1. É possível observar que para a formulação de liberação estendida é sugerido um fluxo mais baixo (FDA, 2017).

Em alguns casos, especialmente para fármacos de baixa solubilidade, uma velocidade de rotação baixa, é insuficiente para homogeneizar a formulação no meio durante o ensaio, por outro lado, adotar uma velocidade de rotação muito alta, pode comprometer o poder discriminatório do ensaio. Alguns estudos como o realizado por Costa e colaboradores relatam a diferença nos perfis de dissolução de fármacos com baixa solubilidade, com variadas velocidades de rotação estudada nos ensaios (COSTA et al., 2015).

Dos 72 métodos sugeridos para aparato 2, as rotações variam de 25 a 200 rpm, sendo a maioria (39 metodos) mencionada a velocidade de 50 rpm, seguido de 25 rpm (12 métodos) e 75 rpm (8 métodos) (FDA, 2017).

Duas suspensões utilizam a velocidade de rotação de 100 rpm, sendo uma delas de liberação retardada e outra de liberação imediata. Uma outra suspensão utiliza rotação de 200 rpm com duração do ensaio de 72 horas (FDA, 2017).

Tabela 3 - Diferentes velocidades de rotação empregadas no ensaio de dissolução para suspensões contidas no FDA, 2017

Fármaco	Forma farmacêutica	aparato	velocidade	Meio de dissolução	Volume
ciprofloxacino	Suspensão oral	pá	100 rpm	Tampão acetato 0,05 mM + 0,025% lauril éter de polioxietileno pH 4,5	900 mL
pamoato de triptorrelina	Suspensão injetável	pá	200 rpm	Água: metanol (95:5)	500 mL
acetil sulfisoxazol	Suspensão oral	pá	30 rpm	1% lauril sulfato de sódio em HCl 0,1 N	900 mL
nistatina	Suspensão oral	pá	25, 50 e 75 rpm	0,1% e 0,2% de Lauril sulfato de sódio em água	900 mL
famotidina	Suspensão oral	pá	25 e 50 rpm	Tampão fosfato 0,1 M pH 4,5	900 mL

A Tabela 3 apresenta alguns exemplos interessantes de variação das rotações. Nota-se que existem métodos em que a velocidade de rotação não afeta o perfil de dissolução, podendo ser empregadas várias rotações para o ensaio da mesma suspensão (FDA, 2017).

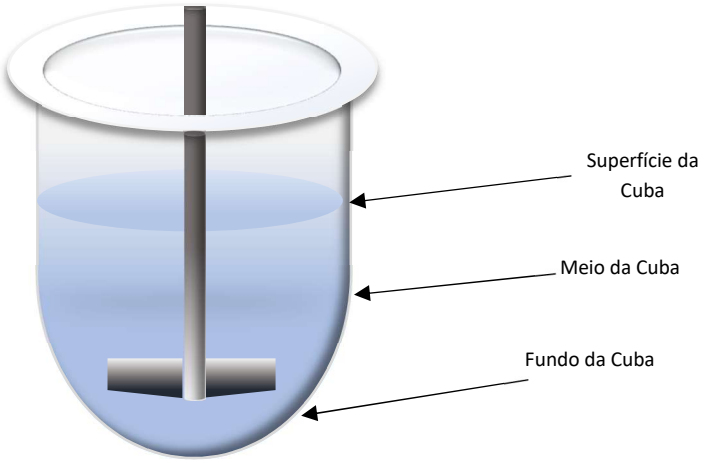
Contudo, vale ressaltar que estas condições devem ser definidas durante o desenvolvimento do método para cada produto.

4.2 Inserção da suspensão na cuba de dissolução

A técnica de inserção das amostras pode diferir de um produto para o outro, pois alguns parâmetros como densidade, viscosidade e outras influências da formulação como o agente suspensor utilizado, podem variar entre elas (BROWN et al., 2011)

A amostra inserida deve ser representativa do produto, homogeneizada adequadamente, conforme a indicação descrita no produto, de forma que o desvio padrão entre elas seja mínimo. Além disso, o local de inserção pode variar conforme as características da formulação, podendo ser colocadas no fundo, no meio ou até na superfície da cuba de dissolução (Figura 1) (NICKERSON et al., 2016).

Figura 1 - Cuba de dissolução com diferentes locais de inserção de amostra



Alguns acessórios também podem ser utilizados para inserção da amostra, como os insert cup ou copo de inserção. Este é um acessório no qual a suspensão é adicionada dentro dele e em seguida colocado dentro da cuba. No entanto, deve ser avaliado se isto pode afetar o perfil de dissolução (AGILENT, 2017).

Figura 2 - Acessório para inserção da suspensão na cuba de dissolução. Adaptado de Agilent (2017)

Seja por peso ou volume, a amostra deve refletir uma dose típica do produto, no entanto, é preferível inserir uma dose parcial a ter que utilizar tensoativos no meio. Uma atenção especial deve ser tomada ao inserir amostras na cuba de dissolução, estas devem ser padronizadas quando a frequência e tempo de mistura, de modo que, mantenha a reprodutibilidade (BROWN et al., 2011; SIEWERT et al., 2003).

4.3 Meio de dissolução e volume do meio

A escolha do meio de dissolução deve ser baseada no ensaio de solubilidade. O ideal é manter condições de não saturação durante o ensaio, no entanto, não é requisito obrigatório (UNITED STATES, 1997). Para fármacos de baixa solubilidade aquosa, a seleção do meio torna-se mais difícil uma vez que, o

meio de dissolução deve apresentar poder discriminatório para diferentes formulações, além de avaliar quando há existências de polimorfismo do fármaco em questão (BONFILIO et al., 2012)

Em geral, o volume de meio utilizado para os ensaios são 500, 900 e 1000. Como foi citado anteriormente, é preferível aumentar o volume do meio e/ou utilizar uma dose parcial do medicamento para o ensaio *in vitro*, ao ter que adicionar tensoativos. Contudo, nem sempre isso é possível, tendo muitas vezes de ser adicionado um agente que diminua a tensão superficial, pois sua utilização é uma das principais formas para aumentar a solubilidade de tais fármacos (UNITED STATES, 1997; NICKERSON et al., 2016).

Os meios mais comumente empregados são: ácido clorídrico diluído, tampões na faixa de pH de 3 a 6,8. Quanto aos tensoativos, polissorbato 80 (de 0,2% a 1,2%) e lauril sulfato de sódio (de 0,05% a 1%) são os mais citados. Na Tabela abaixo são mencionados alguns métodos com tensoativos diferentes, como os tensoativos catiônicos cloreto de benzalcônio e o brometo de hexadeciltrimetil amônio (Tabela 4) (FDA, 2017).

Tabela 4 – Diferentes tensoativos empregados nos ensaios de dissolução para suspensões contidas no FDA, 2017

Fármaco	Forma farmacêutica	aparato	velocidade	Meio de dissolução	Volume
dantrolene sódico	Suspensão intravenosa	pá	50 rpm	0,5% de cloreto de benzalcônio em água.	900 mL
nitazoxanida	Suspensão oral	pá	100 rpm	Tampão fosfato pH 7,5 + 6% de brometo de hexadeciltrimetil amônio	900 mL
palmitato de paliperidona	Suspensão intramuscular de liberação estendida	pá	50 rpm	0,489% de polissorbato 20 em HCl 0,001 N	900 mL
pamoato de triptorrelina	Suspensão intramuscular de liberação estendida	pá	75 rpm	50 mL de metanol em 950 mL de água	950 mL
fluconazol	Suspensão	pá	50 rpm	Água desgaseificada	900 mL
clobazam	Suspensão oral	pá	75 rpm	HCl 0,1 M desgaseificado	900 mL

Alguns estudos citam a utilização de tensoativos endógenos para obter um meio biorrelevante, no entanto, devido ao custo mais elevado, esses tensoativos

são substituídos pelos sintéticos, especialmente lauril sulfato de sódio e polissorbato 80, em pequenas concentrações, de modo que haja discriminação entre diferentes formulações ou diferentes lotes (NICKERSON et al., 2016).

Ainda em relação ao meio, na Tabela 4, a deaeração é citada em alguns exemplos, devendo ser verificada a necessidade durante o desenvolvimento do método (UNITED STATES, 2017).

5 Quantificação das suspensões

A grande maioria de fármacos em suspensões são quantificados por espectrofotometria seguida da quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), isto é apresentado em alguns exemplos que constam na Tabela 1, onde de 11 métodos, 7 são por espectrofotometria (USP,2016).

Comparando com as formas sólidas, a estabilidade das suspensões está mais propícia a sofrer alterações de estabilidade. Isso porque pode ocorrer alterações do pH, temperatura e reações químicas. Por isso, é importante acompanhar estes processos durante o tempo de vida útil da formulação. Além disso, excipientes contidos em formulações líquidas, muitas vezes podem interferir no processo de quantificação, como por exemplo os parabenos, que apresentam uma área considerável que só é possível visualizar pelo método cromatográfico, que nestes casos é o mais recomendável (CAMPBELL et al., 2012).

6. Conclusão

O fato de nas suspensões o fármaco está no estado sólido, a dissolução é um ensaio essencial para avaliar a qualidade das formulações. Para fármacos que possuem polimorfismo, a solubilidade das diferentes formas cristalinas deve ser conhecida e o ensaio desenvolvido com base nesta informação, de modo que este possa discriminar formulações com diferentes perfis de dissolução.

REFERÊNCIAS

AGILENT, INSERT CUP. Disponível em: https://www.agilent.com/search/?Ntt=insert%20cup. Acesso em: 14 de novembro de 2017.

AYALA, A. P.; SIESLER, H. W.; CUFFINI, S. L. Polymorphism incidence in commercial tablets of mebendazole : a vibrational spectroscopy investigation. **Journal of Raman Spectroscopy**, March, p. 1150–1157, 2008.

AZAM, M. G; HAIDER, S. S. Evaluation of Dissolution Behavior of Paracetamol Suspensions, **Daka University Journal of Pharmacentical Sciences**, v. 7, n. 1, p.53-58, 2008.

BASTOS, L. et al. Development and Validation of a Discriminative Dissolution Test for Nimesulide Suspensions. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 4, 2009.

BATCHELOR, H.; KENDALL, R.; DESSET-BRETHES, S.; RAINER, A.; ERNEST, T.B. Application of in vitro biopharmaceutical methods in development of immediate release oral dosage forms intended for paediatric petients. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2013.

BLAGDEN, N.; DA MATAS, M.; GAVAN, P. T.; YORK, P. Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, p. 617-630, 2007.

BONFILIO, R. et al. A Discriminating Dissolution Method for Glimepiride Polymorphs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.101, n.2, p.794-804, 2012.

BREVEDAN, M. I. V; VIDAL, N. L. G. Dissolution Stability of Cephalexin Extemporaneous Suspensions During an Accelerated Stability Study. n. August, p. 23–27, 2012.

BROWN, C. K. et al. Meeting Report : FIP / AAPS Joint Workshop Report : Dissolution / In Vitro Release Testing of Novel / Special Dosage Forms. **AAPS PharmSciTech**, 2011.

CAMPBELL, G. A. et al. Evaluating the taste masking effectiveness of various flavors in a stable formulated pediatric suspension and solution using the Astree™ electronic tongue. **Powder Technology**, v. 224, p. 109–123, 2012.

CHEN, J.; LU, T. New Crystalline Forms of Mebendazole with n -Alkyl Carboxylic Acids : Neutral and Ionic Status. Chinese Journal of Chemistry, v. 31 p. 635–640, 2013.

CHIENG, N.; RADES, T.; AALTONEN, J. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis An overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 4, p. 618–644, 2011.

COSTA, M. A. B. et al. Development, characterization and evaluation of the dissolution profile of sulfasalazine suspensions. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 2, p. 449-459, 2015.

DI, L.; FISH, P. V; MANO, T. Bridging solubility between drug discovery and development. **Drug Discovery Today**, v. 17, May, 2012.

FDA. U.S. Food and Drug Administration. Dissolution Methods . Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_getallData.cfm. Acesso em: 20 novembro 2017.

FREITAS, J. T.J. et al. Analysis of polymorphic contamination in meloxicam raw materials and its effects on the physical quality of drug product. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 109, p. 347-358, 2017.

GARBUIO, A. et al. Evaluation and study of mebendazole polymorphs present in raw materials and tablets available in the Brazilian pharmaceutical market. **Journal Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 11, p. 1–7, 2014.

GOES, A. M.; KFURI, C. R. Desenvolvimento e Pesquisa de Suspensão Pediátrica de Hidróxido de Alumínio. **Investigação**, v. 5, n. 1-6, p. 139-144, 2005.

GRUNDY, J. S. et al. Studies on dissolution testing of the nifedipine gastrointestinal therapeutic system. I. Description of a two-phase in vitro dissolution test. **Journal of Controlled Release**, v. 48, n. 1, p. 1–8, 1997.

HASSAN,Y. A.; BUNACIU, A. A.; FLESCHIN, S. Analysis of Mebendazole Polymorphs by Fourier Transform IR Spectrometry Using Chemometric Methods. **Biopolymers (Biospectroscopy)**, v. 67, p.56-60, 2002.

HONORATO, S. B. et al. Polymorphism evaluation in generic tablets containing mebendazole by dissolution tests. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 2, p. 220–227, 2012.

KARMWAR, P. et al. Effect of different preparation methods on the dissolution behavior of amorphous indomethacin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, p. 459-464, 2012.

KUMAR, R. S.; YAGNESH, N. S. Pharmaceutical suspensions: patient compliance oral dosage forms. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.5, n. 12, p. 1471-1537, 2016.

NICKERSON, B; GUO, M. X.; NORRIS, K. J.; ZHANG, L. Dissolution of Pharmaceutical Suspensions In: Gregory K. Webster; Robert G. Bell; J. Derek Jackson. (Org.). **Poorly Soluble Drugs: Dissolution and Drug Release**. 1ed.: Pan Stanford Publishing, 2016, v. 1, p. 419-447.

QURESHI, S. A. Development and Validation of Drug Dissolution Methods – A Rational and Systematic Approach., **American Pharmaceutical Review** p. 1–4, [s.d.].

RAW, A. S. et al. Regulatory considerations of pharmaceutical solid polymorphism in Abbreviated New Drug Applications (ANDAs). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 397–414, 2004

RIVERA-LEYVA, J.C. et al. Comparative studies on the dissolution profiles of oral ibuprofen suspension and commercial tablets using biopharmaceutical classification system criteria. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 74, n. 4, p. 312-318, 2012.

SERRA, C. H.; STORPIRTIS, S. Comparação de perfis de dissolução da cefalexina através de estudos de cinética e eficiência de dissolução (ED %). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 43, 2007.**

SIEWERT, M. et al. FIP/AAPS guidelines to dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms. **Dissolution Technologies** , v. 10, n. 1, p. 6-15, 2003.

VIDAL, N. L. G. et al. Dissolution Stability Study of Cefadroxil Extemporaneous Suspensions,**Dissolution Technologies**, August, p. 29–36, 2008.

VIDAL, N. L. G. et al. Comparative Dissolution Studies of Albendazole Oral Suspensions for Veterinary Use. **Dissolution Technologies**, n. November, p. 27–30, 2013.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and drug Administration. Guidance for industry:. Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. Rockville:FDA, 1997

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and drug Administration. Guidance for industry: Waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. Rockville:FDA, 2000

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and drug Administration. Guidance for industry:. ANDAs: Pharmaceutical Solid Polymorphism. Rockville:FDA, 2007

UNITED States Pharmacopeia. 39. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2016.

VIPPGUNTA, S. R.; BRITTAIN, H. G.; GRANT, D. J. W. Crystalline solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 1, p. 3–26, 2001.

WALSH, J. et al. Delivery devices for the administration of paediatric formulations : Overview of current practice , challenges and recent developments. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 415, n. 1–2, p. 221–231, 2011.

Capítulo 2

Desenvolvimento de método de dissolução discriminativo para polimorfos A e C de mebendazol em suspensões

Resumo

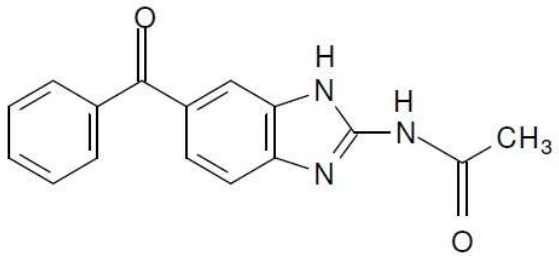
O mebendazol (MBZ), é um fármaco que apresenta polimorfismo e pertence à classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, sendo, portanto, de baixa solubilidade. Além da apresentação comprimidos, é disponibilizado sob a forma de suspensão, entretanto, neste caso, não há método de dissolução mencionado na literatura. Nesse sentido, o objetivo do presente capítulo foi desenvolver um método de dissolução para suspensões de MBZ discriminativo para as suas formas cristalinas. Inicialmente, foi determinada a solubilidade dos polimorfos em HCl 0,1 M, HCl 0,01 M, fluido gástrico simulado sem enzima pH 1,2, soluções tampão pH 3,0, 4,5, 5,8, 6,8, água ultrapurificada e em soluções contendo HCl 0,1 M com lauril sulfato de sódio (0,1 % a 0,5 %) e HCl 0,1 M com polissorbato 80 nas mesmas concentrações. Na sequência, a concentração micelar crítica foi calculada utilizando o programa de computador DDDPlus™ (Simulations Plus Inc.). Por meio de delineamento experimental, o método de dissolução foi desenvolvido, sendo avaliados a influência da solubilidade dos polimorfos e a presença dos tensoativos em diferentes condições de dissolução. O ensaio conduzido em aparato 2 a 75 rpm, empregando 2 litros de HCl 0,1 M sem uso de tensoativo foi o método capaz de diferenciar os polimorfos nas suspensões.

1 Introdução

Suspensões são consideradas formas farmacêuticas líquidas nas quais o fármaco no estado sólido é uniformemente distribuído em um veículo (GOES; KFURI, 2005; MANOHARAN; BASARKAR; SINGH, 2010). Podem ser utilizadas em diferentes vias de administração, tendo grande importância para via oral, principalmente, como uma alternativa à administração de comprimidos para crianças e idosos (CAMPBELL et al., 2012; GOES; KFURI, 2005; MANOHARAN; BASARKAR; SINGH, 2010; RIVERA-LEYVA et al., 2012).

Dentre os fármacos veiculados em suspensão, encontra-se o mebendazol (MBZ), conhecido quimicamente como metill-5-benzoil benzimidazol-2-carbamato, cuja estrutura química está representada na Figura 1 e pertencente à classe dos benzimidazóis (AGATONOVIC-KUSTRIN et al., 2008). Sendo um anti-helmíntico de amplo espectro é bastante utilizado para o tratamento de *Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Strongyloides stercoralis* e *Taenia spp.* (ABOUL-ENEIN; BUNACIU; FLESCHIN, 2002, GARCIA-RODRIGUEZ et al., 2011).

Figura 1 - Estrutura química do mebendazol (fonte: próprio autor)



Segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica – SCB, o MBZ é considerado um fármaco de classe II, apresentando baixa solubilidade e alta permeabilidade (CARLERT et al., 2012).

Além da baixa solubilidade, o MBZ possui polimorfismo sendo relatadas na literatura, três formas cristalinas, e duas delas, as formas A e C, são as mais encontradas, podendo apresentar-se de modo isolado ou misturadas. A forma C é a mais solúvel, sendo a mais indicada para a utilização em medicamentos (HIMMELREICH, RAWSON E WATSON, 1977; LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004).

Diversos trabalhos (FROEHLICH; GASPAROTTO, 2005: HONORATO et al., 2012; SWANEPOEL, et al., 2003) demonstraram que há diferenças no perfil de dissolução de comprimidos de MBZ, em função da(s) forma(s) cristalina(s) presente(s) na matéria-prima, entretanto, não há estudos para suspensões.

A utilização de ensaios de dissolução para suspensões ainda é pouco explorada, e os métodos descritos nas Farmacopeias Americana (2016) e Brasileira (2010), além da agência regulatória americana (*Food and Drug Administration* – FDA, 2017), para dissolução de comprimidos de MBZ, não possuem poder discriminativo entre os polimorfos A e C, devido à excessiva quantidade de tensoativo. Considerando que nas suspensões o fármaco encontra-se disperso, o que torna a etapa de dissolução fundamental para a ação do medicamento, o objetivo desse capítulo é desenvolver um método de dissolução para suspensões de mebendazol que seja capaz de diferenciar seus polimorfos.

2 Material e Métodos

2.1. Material

Mebendazol, polimorfos A (100%) e C (99,9%), gentilmente cedidos pelas indústrias Genix – Indústria Farmacêutica Ltda. e Eurofarma Laboratórios S.A, Brasil. Foram utilizados os solventes e reagentes: acetonitrila (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), ácido clorídrico (HCl) P.A. 37% (Casa Americana, São Paulo, SP, Brasil), cloreto de sódio, citrato de sódio anidro, fosfato de potássio monobásico e acetato de potássio (LabSynth Produtos para Laboratórios Ltda., Diadema, SP, Brasil), lauril sulfato de sódio e polissorbato 80 (Casa Americana, São Paulo, SP, Brasil), todos com grau analítico de pureza. A água ultrapurificada foi obtida por meio do sistema de purificação de água Millipore (Millipore SAS, Molsheim, França).

Os materiais utilizados na formulação das suspensões foram: carboximetilcelulose (Denver Especialidades Químicas Ltda., Cotia, SP, Brasil); celulose microcristalina (Blanver Farmoquímica Ltda., Taboão da Serra, SP, Brasil); sacarina sódica (Valdequimica Produtos Químicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil); lauril sulfato de sódio (LSS) (Casa Americana, São Paulo, SP, Brasil); metilparabeno (PharmaSpecial Especialidades Químicas e Farmacêuticas Ltda., Itapevi, SP, Brasil); propilparabeno (Embrafarma Produtos Químicos e

Farmacêuticos Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e propilenoglicol (LabSynth Produtos para Laboratórios Ltda., Diadema, SP, Brasil).

2.2. Ensaio de solubilidade

O ensaio de solubilidade foi realizado empregando-se o método do equilíbrio (SILVA et al., 2016). Excesso do fármaco, mebendazol polimorfo A e polimorfo C, foi individualmente depositado em frascos de vidro contendo 10 mL de cada meio: HCl 0,1 M, HCl 0,01M, fluido gástrico simulado sem enzima (FGSwe) pH 1,2, tampão citrato de sódio pH 3,0, tampão acetato de sódio pH 4,5, tampão fosfato de potássio pH 5,8, tampão fosfato de potássio pH 6,8, água ultrapurificada, HCl 0,1 M com diferentes concentrações de lauril sulfato de sódio (0,1 a 0,5%) e HCl 0,1 M com diferentes concentrações de polissorbato 80 (0,1 a 0,5%), até atingir a saturação, sendo esta observada a partir da precipitação do fármaco no meio. Tais meios foram preparados conforme descrito na Farmacopeia Americana (USP 39).

Os frascos contendo o fármaco (polimorfo A ou C) e os meios descritos, foram incubados a 37 °C sob agitação constante de 150 rpm em incubadora orbital TE-420 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) por 72 horas. O pH das soluções nos frascos foi determinado antes e após a adição dos tensoativos utilizando pHmetro PG2000 (Gehaka, São Paulo, SP, Brasil).

Após o término do período de 72 h, cada amostra foi cuidadosamente filtrada utilizando filtro de seringa de membrana de celulose regenerada Sartorius Minisart RC 25 (Sartorius AG, Goettingen, Alemanha) com diâmetro de poro de 0,45 µm, desprezando-se um volume inicial de 3 mL de cada amostra, sendo os 2 mL seguintes inseridos em *vials* para posterior quantificação do fármaco.

2.3 Método de quantificação

A quantificação do fármaco solubilizado foi realizada empregando equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência HITACHI ELITE LaChrome L-2000 (VWR Hitachi, Tokyo, Japão); bomba HITACHI ELITE LaChrome L-2130 (VWR Hitachi, Tokyo, Japão), detector HITACHI ELITE LaChrome Diode array L-2455 (VWR Hitachi, Tokyo, Japão) e o programa EZChrom Elite para o processamento dos dados. O método foi desenvolvido empregando coluna LiChroCart C18 (125-4 mm x 4,6 mm x 5 µm – Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) como fase estacionária e, como fase móvel, 60% de tampão fosfato de potássio

0,05M pH 4,5 e 40% de acetonitrila, com fluxo de 0,6 mL min^{-1}, todos os reagentes em grau analítico.

O volume de injeção foi de 20 µL e a detecção realizada em 248 nm na temperatura de 25 ºC. As áreas dos picos foram quantificadas por meio de uma curva analítica realizada nas mesmas condições de análise, sendo utilizados para solubilização do fármaco, 50% de acetonitrila e 50% de HCl 0,1 M.

2.4. Determinação da concentração micelar crítica

O programa de computador DDDPlus™ versão 5.0 (Simulations Plus Inc., Lancaster, CA, EUA) foi utilizado para calcular a concentração micelar crítica (CMC) dos tensoativos lauril sulfato de sódio (LSS) e polissorbato 80 (PSB 80) nas soluções de HCl 0,1 M empregadas no ensaio de solubilidade.

Foram criadas duas bases de dados no programa - Mebendazol A (MBZ A) e Mebendazol C (MBZ C). Em cada base foram adicionados os dados de solubilidade de cada forma polimórfica (MBZ A ou MBZ C) nos meios HCl 0,1 M contendo LSS (0,1% a 0,5%) e HCl 0,1 M contendo PSB 80 (0,1% a 0,5%) como arquivos de solubilidade de tensoativo. Além disso, tais meios foram criados (definidos) no programa como meios de dissolução na aba Método de dissolução. Os dados utilizados no programa encontram-se descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados de entrada dos meios empregados no ensaio de solubilidade das formas A e C do mebendazol utilizados no DDDPlus™

Composição dos meios utilizados	**HCl 0,1 M + LSS***	**HCl 0,1 M + PSB 80****
Concentração de HCl	0,1M	0,1M
Concentração do tensoativo (% e M)	0,1% (0,00347 M)	0,1% (0,00076 M)
	0,2% (0,00693 M)	0,2% (0,00153 M)
	0,3% (0,01040 M)	0,3% (0,00229 M)
	0,4% (0,01387 M)	0,4% (0,00305 M)
	0,5% (0,01734 M)	0,5% (0,00382 M)

Peso molecular do tensoativo (g mol^{-1})	288,4	1310
Concentração micelar crítica teórica (M)	0,008 M	0,000012 M
Número de agregação	55	60
Fator de aumento de solubilidade	1	1

* Lauril sulfato de sódio; ** Polissorbato 80

Foi realizado um ajuste (*fit*) entre os valores de solubilidade experimental de cada forma polimórfica nos meios com tensoativos (HCl 0,1 M + LSS 0,1% a 0,5% e HCl 0,1 M + PSB 80 0,1% a 0,5%) e os dados correspondentes de cada tensoativo descritos na Tabela 1. Dessa forma, o programa calculou a concentração micelar crítica real e o fator de aumento de solubilidade (*solubility enhancement factor*) de acordo com os dados experimentais.

2.5 Preparo das suspensões

Foram preparadas duas formulações (FA e FC) de suspensão de mebendazol, contendo os polimorfos A e C, respectivamente. A formulação descrita encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Formulações das suspensões de mebendazol

Componente	**Concentração (%)**	**Concentração (%)**
Mebendazol Polimorfo A	2	0
Mebendazol Polimorfo C	0	2
Celulose Microcristalina	1,0	1,0
Carboximetilcelulose Sódica	0,7	0,7
Propilenoglicol	10	10
Metilparabeno	0,18	0,18
Propilparabeno	0,02	0,02

Sacarina sódica	0,1	0,1
Lauril sulfato de sódio	0,02	0,02
Água Purificada q.s.p.	100	100

2.5.1 Caracterização das suspensões

2.5.1.1 Determinação do teor

Em um balão volumétrico de 100 mL foi inserido 95 mL de uma solução contendo 50 % de acetonitrila e 50 % de HCl 0,1 M. Em seguida, uma alíquota de suspensão correspondente a 10 mg do fármaco (500 µL) foi inserida neste balão e pesada em balança analítica (Shimadzu® AUW 220D Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Após completado o volume, a solução foi deixada em ultrassom por 30 minutos e depois as amostras (em triplicata) foram filtradas com filtro de celulose regenerada 0,2 µm Sartorius Minisart RC (Sartorius AG, Goettingen, Germany) previamente saturados e quantificadas pelo método desenvolvido em HPLC, conforme descrito no item 2.3.

2.5.1.2 Determinação do pH

O pH de cada formulação foi determinado inserindo-se o eletrodo diretamente nas suspensões, utilizando pHmetro PG2000 (GEHAKA®, São Paulo, SP, Brasil).

2.5.1.3 Determinação do volume de sedimentação

O volume de sedimentação foi avaliado por meio da introdução de 100 mL de cada suspensão em proveta de mesmo volume, sendo medidas a altura do sedimento (Hs) e a altura do líquido (Hl). Essas medidas foram realizadas até a ausência de variação da Hs. O volume de sedimentação é dado pela relação Hs/Hl (GARAD et al., 2010).

2.6 Avaliação do perfil de dissolução das suspensões utilizando método farmacopeico

Previamente ao desenvolvimento do método de dissolução, um ensaio de dissolução de acordo com o método farmacopeico (USP, 2016) para comprimidos de mebendazol (com exceção do tempo de coleta, que foi reduzido de duas para

uma hora) foi realizado para as duas suspensões, afim de demonstrar a falta de poder discriminatório do método para os diferentes polimorfos.

O método consiste nas seguintes condições (Tabela 3):

Tabela 3 - Condições empregadas nos ensaios de dissolução das formulações de suspensões de mebendazol adaptado do método descrito para comprimidos da Farmacopeia Americana (USP, 2016)

Aparato	2 (pá)
Volume de meio	900 mL
Meio	HCl 0,1 M + LSS 1%
Velocidade de agitação	75 rpm
Temperatura	37 °C

2.6.1 Desenvolvimento do método de dissolução para suspensões

O desenvolvimento do método de dissolução foi realizado por meio de um planejamento fatorial completo do tipo 2^3, utilizando o programa Statistica® 13.0 (Statsoft, Inc.), conforme apresentado na Tabela 4, no qual as variáveis independentes e seus níveis foram: polimorfo (A ou C), concentração de tensoativo (LSS) (0 ou 0,4%) e local de inserção da amostra na cuba (fundo ou meio).

Os ensaios de dissolução foram executados conforme descrito nas Tabelas 4 e 5. As melhores condições (concentração de tensoativo e local de inserção da amostra na cuba) foram selecionadas por meio da avaliação da resposta porcentagem de fármaco dissolvido em diferentes tempos.

Tabela 4 - Planejamento fatorial do tipo 2^3 completo das variáveis empregadas no desenvolvimento do ensaio de dissolução das formulações de suspensões de mebendazol

Corrida	**Ordem de Ensaio**	**Polimorfo**	**Concentração Tensoativo (%)**	**Local de Inserção da amostra**
1	E2	A	0,0	Fundo
2	E6	C	0,0	Fundo
3	E4	A	0,4	Fundo
4	E8	C	0,4	Fundo
5	E1	A	0,0	Meio
6	E5	C	0,0	Meio
7	E3	A	0,4	Meio
8	E7	C	0,4	Meio

Tabela 5 - Condições empregadas nos ensaios de dissolução das formulações de suspensões de mebendazol

Aparato	2 (pá)
Volume de meio	2 litros
Velocidade de agitação	75 rpm
Temperatura	37 °C
Tempos de coleta	2, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 min

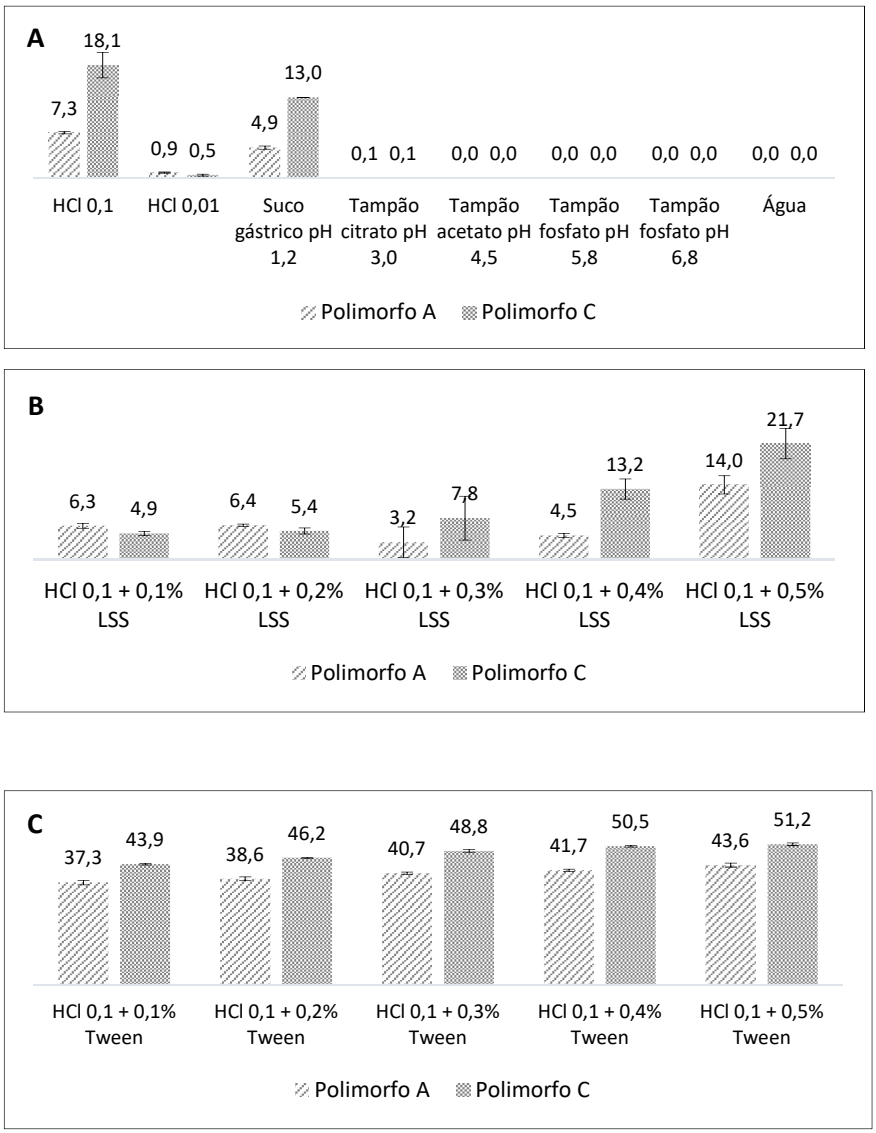
Os ensaios de dissolução foram conduzidos em equipamento 708-DS (Agilent, Technologies, EUA). A quantificação foi realizada conforme descrito no item 2.3.

Os resultados utilizados como respostas para a avaliação do delineamento experimental foram o percentual de fármaco dissolvido nos tempos de 5 min ($Q\%_{5min}$), 20 min ($Q\%_{20min}$) e 60 min ($Q\%_{60min}$). Os valores dessas variáveis dependentes foram inseridos no programa Statistica® 13.0 (Dell Inc., Tulsa, Estados Unidos), sendo realizada análise de variância de um fator.

3 Resultados e Discussão

Após a realização do ensaio de solubilidade do mebendazol (formas A e C) nos meios HCl 0,1 M, HCl 0,01M, fluido gástrico simulado sem enzima pH 1,2, tampão citrato pH 3,0, tampão acetato pH 4,5, tampão fosfato pH 5,8, tampão fosfato pH 6,8 e água ultrapurificada, verificou-se que o HCl 0,1M foi aquele no qual tanto a forma A como a forma C apresentaram maior solubilidade (Figura 2A). Assim, este meio foi selecionado para a avaliação da solubilidade dos polimorfos na presença de diferentes concentrações dos tensoativos LSS nas concentrações de 0,1 a 0,5% e PSB 80 nas mesmas concentrações, conforme mostrado na Figura 2B e 2C, respectivamente.

Figura 2 - Solubilidade do MBZ A e MBZ C em mg/250 mL em diferentes condições. (A) diferentes valores de pH, (B) HCl 0,1 M com adição de LSS de 0,1 a 0,5% e (C) HCl 0,1 M com adição de PSB 80 de 0,1 a 0,5%. Os resultados são apresentados pela média e desvio padrão de três determinações

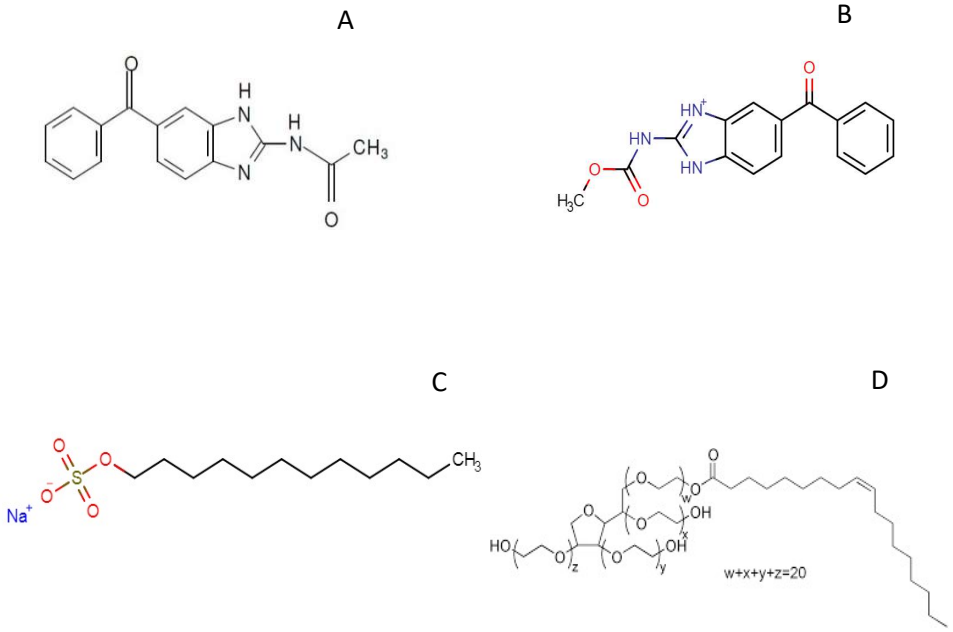


A Figura 2B mostra uma diminuição da solubilidade do fármaco na presença do tensoativo aniônico LSS quando comparado ao meio contendo somente HCl 0,1 M (Figura 2A) e nota-se, também, que isso não ocorre quando o PSB 80 é utilizado (Figura 2C).

Geralmente, fármacos carregados com cargas opostas ao tensoativo, tendem a ser solubilizados mais facilmente que os fármacos que possuem mesma carga ou que não possuem. No entanto, existem casos em que pode ocorrer uma complexação entre fármaco e tensoativo, ocasionando a formação de um sal insolúvel (JAIN; RAN; YALKOWSKYL, 2004).

No caso do MBZ (Figura 3A), uma base fraca que em meio ácido se dissocia em carga protonada/positiva (Figura 3B), a presença de um tensoativo aniônico como o LSS (Figura 3C), interage com a carga positiva do fármaco, formando um sal menos solúvel, resultando na diminuição da solubilidade quando em baixas concentrações do tensoativo. Conforme evidenciado nos resultados de solubilidade, o mebendazol é bastante sensível a pequenas variações de pH, dessa forma, verificou-se que, a adição de ambos os tensoativos LSS e PSB 80, não modificou as condições iniciais de pH do meio, mantendo-se entre 0,96 e 1,0, antes e após a adição dos tensoativos.

Figura 3 - Estruturas moleculares: (A) mebendazol, (B) mebendazol dissociado em pH ácido, (C) lauril sulfato de sódio, (D) polissorbato 80



Assim como Zhao e colaboradores (2004) estudaram a interação de LSS com cápsulas de gelatina em meio ácido, há outros estudos que evidenciam claramente a interação do LSS com fármacos de característica de base fraca, resultando em diminuição da solubilidade (BHATTACHAR, et al., 2011).

Trata-se de um fato importante a ser analisado quando se pensa na adição de tensoativos como o LSS em meios de dissolução em casos de fármacos de baixa solubilidade. Em geral isso é feito para que sejam obtidas condições *sink*, e manter o mesmo volume de meio de dissolução. No entanto, no caso de bases fracas como o mebendazol, foi possível observar a influência negativa do LSS na solubilidade do fármaco.

No DDDPlus™, as concentrações do tensoativo devem ser inseridas como molaridade. Dessa forma, o programa faz a conversão da unidade (porcentagem para molaridade), conforme apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 - Concentração dos tensoativos LSS e PSB 80 em meio HCl 0,1 M em porcentagem e molaridade

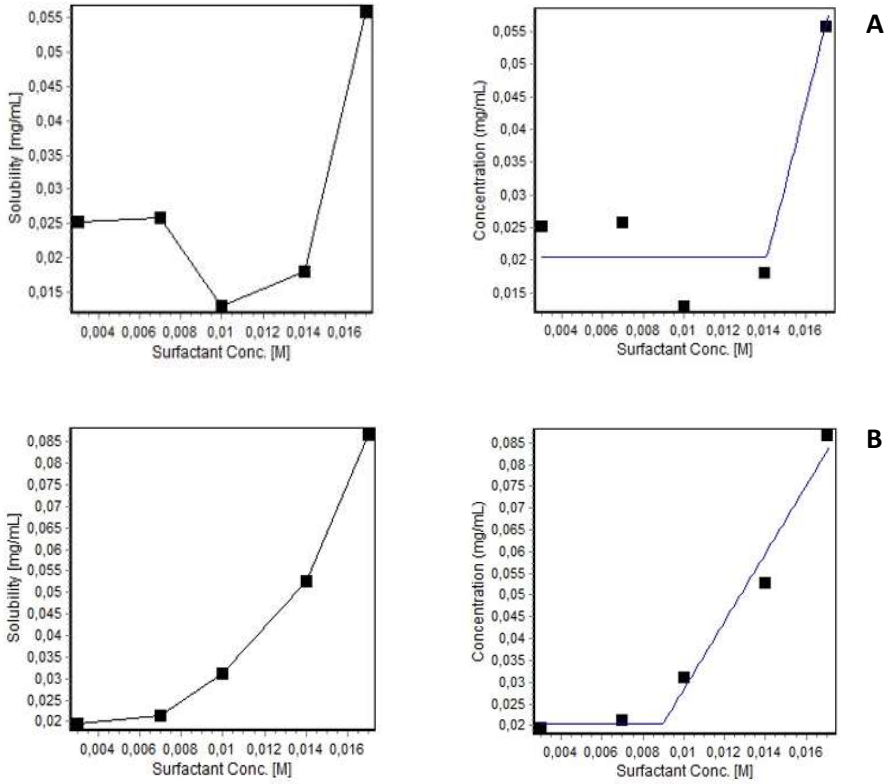
Concentração do tensoativo (%)	**LSS (Mol L^{-1})**	**PSB 80 (Mol L^{-1})**
0,1	0,00347	0,00076
0,2	0,00693	0,00153
0,3	0,01040	0,00229
0,4	0,01387	0,00305
0,5	0,01734	0,00382

O programa DDDPlus™ utiliza os dados experimentais de solubilidade para calcular a CMC real de acordo com os valores de concentração do tensoativo empregado (SIMULATIONS PLUS, 2016). Com base nos resultados calculados pelo DDDPlus™, a CMC do LSS em meio aquoso muda com a presença de cada polimorfo de MBZ, que passa a ser de 0,008 M, valor calculado pelo programa e também encontrado na literatura para o LSS (JAIN; RAN; YALKOWSKYL, 2004), para 0,0141 M quando há a presença de polimorfo A, e 0,009 M para o polimorfo C, sendo este último um valor muito próximo da CMC quando o fármaco não está presente na solução.

A partir do momento em que a CMC é alcançada, o LSS é capaz de solubilizar tanto o fármaco livre ionizado quanto o complexo insolúvel formado, e essa solubilidade é aumentada linearmente com adição de concentrações do tensoativo acima da CMC (JAIN; RAN; YALKOWSKYL, 2004).

O gráfico gerado pelo programa DDDPlus™ (Figura 4), mostra exatamente a concentração em molaridade do tensoativo LSS em que se inicia o aumento da solubilidade, sendo a partir de 0,5% de LSS (concentração maior que 0,0141 M) de LSS para o polimorfo A (Figura 4A) e 0,3% de LSS (concentração maior que 0,009 M) de LSS para o polimorfo C (Figura 4B).

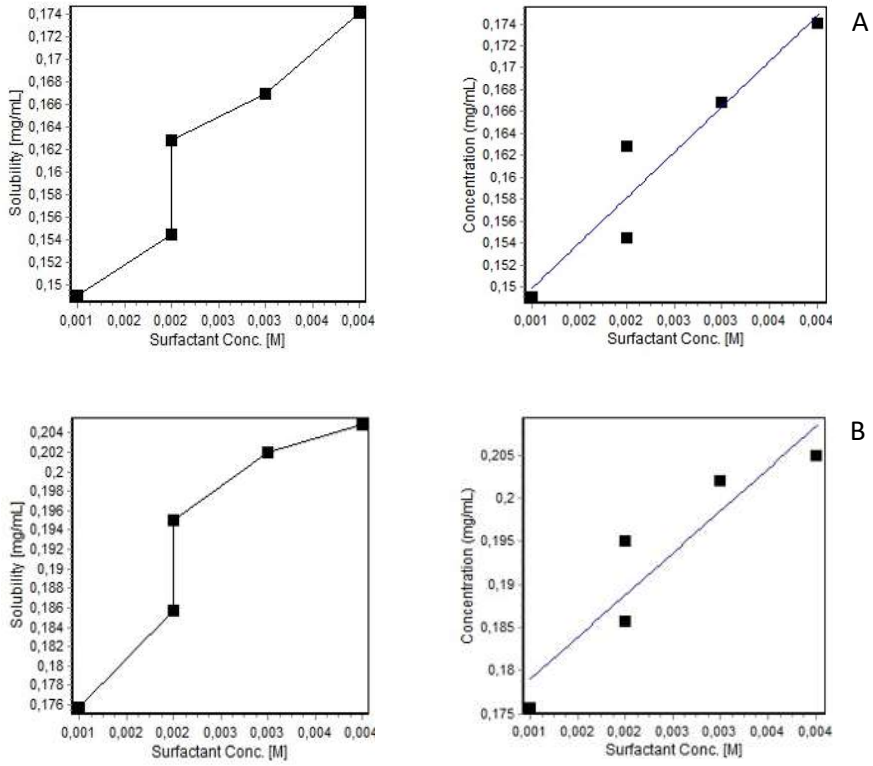
Figura 4 - *Fit* dos resultados de solubilidade: (A) CMC atingida com 0,5% de LSS na presença de polimorfo A; (B) CMC atingida com 0,3% de LSS na presença de polimorfo C



A CMC do PSB em meio aquoso calculada pelo DDDPlus™ foi 1,2 x 10^{-5} M para o polimorfo A e 0,001 M para o polimorfo C. Após utilizar os dados experimentais de solubilidade de ambos polimorfos em HCl 0,1 M com PBS, os valores reais de CMC calculados foram 0,001 M para os dois polimorfos. Dessa forma, é possível observar o aumento da CMC real em relação à teórica para o polimorfo A e a manutenção do mesmo valor para o polimorfo C.

Assim, ao utilizar o tensoativo PSB 80 nas mesmas concentrações que o LSS, de 0,1% a 0,5%, no meio HCl 0,1 M (molaridade apresentada na Tabela 6), o aumento da solubilidade é observado de forma gradual para os dois polimorfos, MBZ A (Figura 5A) e MBZ C (Figura 5B), desde a menor concentração (0,001 M), demonstrando já ter alcançado a CMC do tensoativo utilizado.

Figura 5 - *Fit* dos resultados de solubilidade nas concentrações de 0,1% a 0,5% de PSB 80: (A) solubilidade do polimorfo A; (B) solubilidade do polimorfo C



Os valores de solubilidade dos polimorfos A e C do mebendazol nos meios HCl 0,1 M, HCl 0,1 M com adição de LSS de 0,1 a 0,5% e HCl 0,1 M com adição PSB 80 também nas concentrações de 0,1 a 0,5%, apresentados nas Figuras 2d e 2c, foram comparados por meio de análise de variância de um fator (*one-way* ANOVA) empregando o programa de computador Statistica 13.0 (Dell Inc., Tulsa, OK, EUA). Foi observada diferença significativa entre tais valores ($p = 4,28 \times 10^{-45}$), considerando $p < 0,05$.

Tendo em vista que o valor de p foi significativo para os resultados de solubilidade, foi realizado o teste de Tukey (Tabela 7) para verificar diferenças entre as médias e classificá-las em grupos afim de selecionar o meio em que a solubilidade dos polimorfos A e C estejam em grupos diferentes para que o método de dissolução possa ser discriminativo, conforme mostrado abaixo:

Tabela 7 - Agrupamento das médias de solubilidade (mg 250 mL^{-1}) do MBZ polimorfos A e C em diferentes meios obtido empregando teste de Tukey

Meio	Polimorfo	Solubilidade mg 250 mL^{-1}	Grupos	1	2	3	4	5	6	7	8	9
HCl 0,1 M	A	7,307	1	****								
	C	18,087	3, 4			****	****					
HCl 0,1 M + 0,1% LSS	A	6,333	1	****								
	C	4,877	1	****								
HCl 0,1 M + 0,2% LSS	A	6,440	1	****								
	C	4,443	1	****								
HCl 0,1 M + 0,3% LSS	A	3,237	1	****								
	C	7,770	1	****								
HCl 0,1 M + 0,4% LSS	A	4,527	1	****								
	C	13,183	2		****							
HCl 0,1 M + 0,5% LSS	A	13,957	2, 3		****	****						
	C	21,667	4				****					
HCl 0,1 M + 0,1% PSB 80	A	37,267	5					****				
	C	43,930	6, 7						****	****		
HCl 0,1 M + 0,2% PSB 80	A	38,630	5					****				
	C	46,430	7, 8							****	****	
HCl 0,1 M + 0,3% PSB 80	A	40,690	5, 6					****	****			
	C	48,770	8, 9								****	****
HCl 0,1 M + 0,4% PSB 80	A	41,717	5, 6					****	****			
	C	50,490	8, 9								****	****
HCl 0,1 M + 0,5% PSB 80	A	43,523	6, 7						****	****		
	C	51,220	9									****

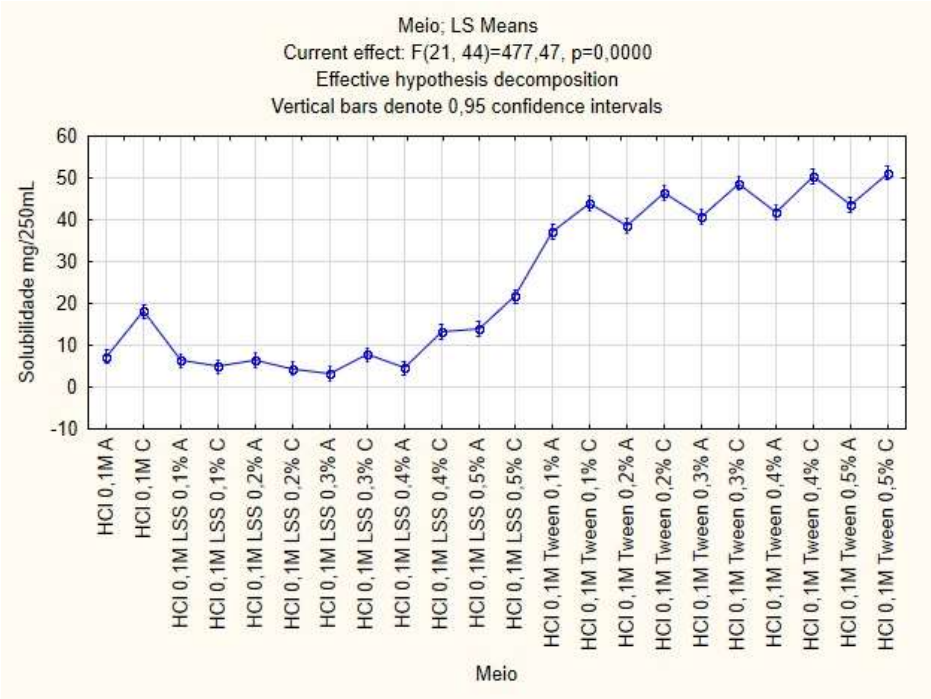
O teste de Tukey permitiu agrupar as médias dos valores de solubilidade de acordo com suas semelhanças e diferenças num intervalo de confiança de 95%. Assim, essas médias são comparadas duas a duas, mostrando a proximidade dos resultados classificando-as em grupos.

Na Tabela 7, é possível verificar que os meios HCl 0,1 M e HCl 0,1 M + 0,4% de LSS são aqueles em que ocorre a separação dos polimorfos pela diferença de solubilidade mais pronunciada entre eles, pois nestes meios, o polimorfo A fica em grupo diferente do polimorfo C. Já para os meios HCl 0,1 M com LSS entre 0,1 e 0,3%, ambos os polimorfos permanecem no mesmo grupo, indicando que não existe diferença significativa entre as suas solubilidades.

Nos meios HCl 0,1 M + 0,5% de LSS e os demais meios contendo PSB 80, os polimorfos ficam em grupos distintos, o que poderia sugerir a capacidade discriminativa desses meios para as formas A e C de MBZ. No entanto, de acordo os valores de solubilidade obtidos, a dose de 100 mg seria totalmente solubilizada no meio de dissolução, independente do polimorfo utilizado.

Essas diferenças apresentadas no teste de Tukey são observadas também no gráfico das médias (Figura 6), onde é possível visualizar as diferenças entre a solubilidade dos polimorfo A e C.

Figura 6 - Gráfico das médias para os resultados de solubilidade de MBZ polimorfos A e C em diferentes meios



A partir da avaliação estatística dos resultados de solubilidade, dois meios foram selecionados para prosseguir com o desenvolvimento do método de dissolução, sendo estes, HCl 0,1 M e HCl 0,1 M com adição de 0,4% de LSS, para ambos polimorfos.

Dada a baixa solubilidade do MBZ, um volume maior de meio é necessário para atingir a condição de não saturação para o polimorfo C, dessa forma, os resultados de solubilidade mostram que o volume de meio de 2 litros nas condições citadas acima, é capaz de solubilizar completamente a dose de 100 de mg do polimorfo C, e não favorecer a solubilização do polimorfo A, conforme mostra a Tabela 8.

Tabela 8 - Solubilidade do mebendazol em meios HCl 0,1 M e HCl 0,1 M com adição de 0,4% de LSS, em volume de 2000 mL

Polimorfo	**Solubilidade em HCl 0,1 M (mg/ 2000 mL)**	**Solubilidade em HCl 0,1 M + 0,4% LSS (mg/ 2000 mL)**
A	58,47 ± 1,46	26,20 ± 3,17
C	144,70 ± 16,17	105,45 ± 15,07

Selecionado o meio de dissolução, foram preparadas duas suspensões e caracterizadas quanto ao teor, pH e volume de sedimentação (Tabela 9), de modo que fosse assegurado que não houvessem diferenças em suas características, mas que somente o polimorfo fosse a variável da formulação.

Tabela 9 - Caracterização das suspensões de mebendazol, médias de n=3 para resultados de teor

Formulação	**Teor ± DP (*)**	**pH**	**Volume de Sedimentação (mL)**
FA - Polimorfo A	104,00 ± 0,40	6,5	0,8
FC - Polimorfo C	104,00 ± 0,16	6,5	0,9

*DP = desvio-padrão.

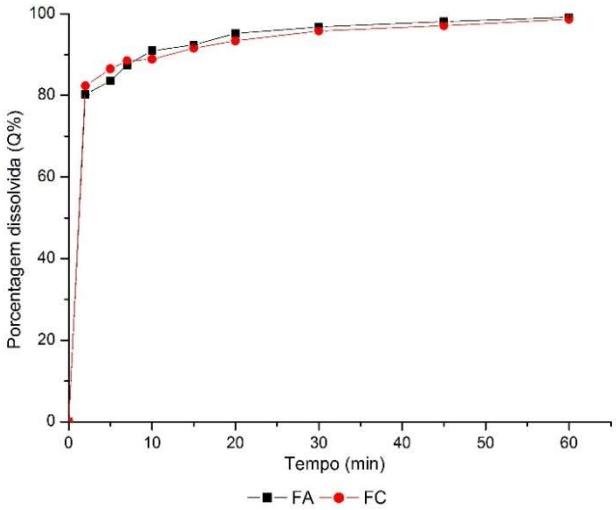
Nos resultados de caracterização, ambas as formulações (contendo polimorfo A ou C) apresentaram valores muito próximos.

Para seleção da velocidade de rotação, ensaios de dissolução prévios ao planejamento experimental foram realizados com as rotações de 25, 50 e 75 rpm. Durante esses ensaios, observou-se formação de cone quando utilizadas

rotações mais baixas, 25 e 50 rpm, sendo selecionada a rotação de 75 rpm como condição fixa para o desenvolvimento do método.

Utilizando o método farmacopeico para dissolução de comprimidos de mebendazol, não foi possível diferenciar as formulações de suspensão contendo polimorfos A e C devido à grande quantidade de tensoativo (LSS 1,0 %) empregada no meio de dissolução (Figura 7).

Figura 7 - Perfil de dissolução das suspensões contendo polimorfos A (FA) e C (FC) de MBZ em 900 mL de meio HCl 0,1 M contendo 1,0 % de LSS (método farmacopeico, USP, 2016)



Para o desenvolvimento do método, foram realizados oito experimentos delineados por meio de planejamento estatístico descrito no item 2.6.1 e Tabela 4, todos realizados a 75 rpm e adotando-se 2 litros como volume de meio de HCl 0,1 M (com e sem LSS). Os resultados dos percentuais de fármaco dissolvido são apresentados na Tabela 10.

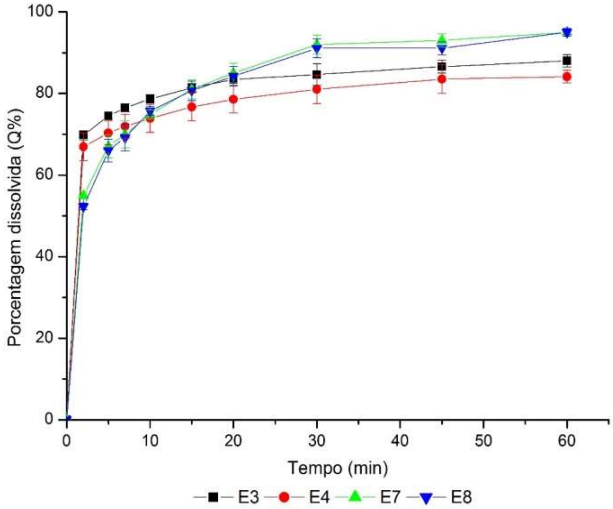
Tabela 10 - Porcentagens de fármaco dissolvido nos tempos de 5 min ($Q\%_{5min}$), 20 min ($Q\%_{20min}$) e 60 min ($Q\%_{60\ min}$). Valores apresentados pela média e desvio padrão de três determinações

Ensaio	Polimorfo	Concentração de LSS (%)	Local de Inserção da amostra	$Q\%_{5min}$	$Q\%_{20min}$	$Q\%_{60min}$
E2	A	0,0	Fundo	14,8 ± 1,2	18,6 ± 0,6	20,9 ± 1,5
E6	C	0,0	Fundo	74,7 ± 2,8	90,0 ± 2,4	98,5 ± 0,9
E4	A	0,4	Fundo	70,3 ± 2,9	78,6 ± 3,3	84,1 ± 1,5
E8	C	0,4	Fundo	66,0 ± 2,8	84,2 ± 2,4	95,0 ± 0,9
E1	A	0,0	Meio	13,1 ± 1,2	15,9 ± 0,9	19,0 ± 0,6
E5	C	0,0	Meio	77,7 ± 2,0	93,5 ± 1,9	99,3 ± 2,3
E3	A	0,4	Meio	74,4 ± 0,6	83,4 ± 1,4	88,0 ± 1,5
E7	C	0,4	Meio	67,0 ± 2,8	85,0 ± 2,4	95,0 ± 0,9

A ausência de tensoativos no meio de dissolução para separação de polimorfos de mebendazol foi descrita por SWANEPOEL e colaboradores (2003). Embora ocorra a separação dos mesmos, esse meio não permite a solubilização total da dose (100 mg) e sequer consegue atingir a especificação farmacopeica, a qual preconiza 75% de liberação do fármaco em duas horas, no ensaio de dissolução para comprimidos de mebendazol.

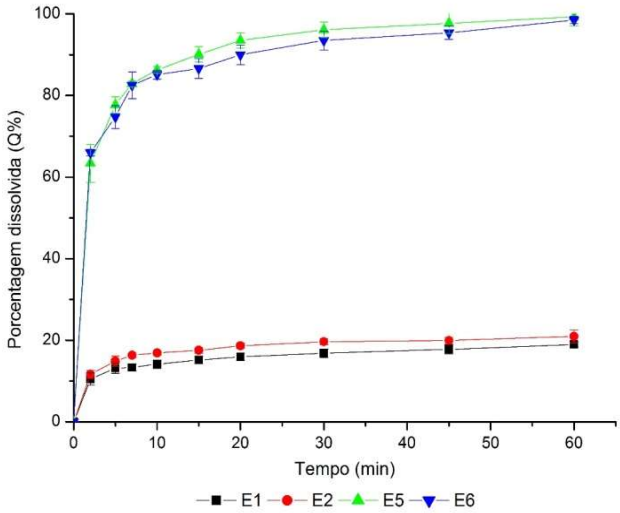
Os ensaios de dissolução realizados de acordo com o planejamento experimental empregado, indicaram que o meio HCl 0,1 M + 0,4% de LSS, mostrou-se inadequado para ser utilizado no ensaio de dissolução discriminativo para polimorfos de MBZ nas suspensões. Na Figura 8 é possível visualizar a proximidade entre os resultados dos ensaios E3 e E4, que são formulações produzidas com polimorfo A, dos ensaios E7 e E8, formulações produzidas com polimorfo C.

Figura 8 - Perfil de dissolução das suspensões contendo polimorfos A ou C em meio HCl 0,1 M contendo 0,4% de LSS e inserção da amostra em diferentes locais da cuba. E3 – polimorfo A (inserção no meio), E4 – polimorfo A (inserção no fundo), E7 – polimorfo C (inserção no meio) e E8 – polimorfo C (inserção no fundo)



Por outro lado, o meio HCl 0,1 M no volume de 2 litros, sem a adição de tensoativo, mostrou-se capaz de separar os polimorfos A e C e proporcionar condições de não saturação do meio para a dissolução de suspensões contendo polimorfos C do MBZ (Figura 9).

Figura 9 - Perfil de dissolução das suspensões contendo polimorfos A ou C em meio HCl 0,1 M, sem adição de LSS e inserção em diferentes locais da cuba. E1 – polimorfo A (inserção no meio), E2 – polimorfo A (inserção no fundo), E5 – polimorfo C (inserção no meio) e E6 – polimorfo C (inserção no fundo)



Por meio da análise de variância, foi possível verificar quais os fatores que influenciam de modo significativo a dissolução das suspensões de MBZ. De acordo com os dados apresentados nas Tabelas 11, 12 e 13, fica evidente que

as porcentagens dissolvidas não são alteradas pelo local de inserção da suspensão na cuba de dissolução, uma vez que o valor de p (0,5704) foi maior que o nível de significância de 95%.

Por outro lado, a forma polimórfica e a presença de tensoativo no meio e sobretudo, a interação destes, influenciaram os resultados, uma vez que os valores de p, considerando um nível de significância de 95% ficaram abaixo de 0,05 (Tabelas 11, 12 e 13). Além disso, os coeficientes de determinação ajustados ($R^2_{ajustado}$) obtidos foram muito próximos de 1, indicando que o modelo é adequado para a análise (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

Tabela 11 - Análise de variância (ANOVA) para os dados de porcentagem de fármaco dissolvido para suspensão de mebendazol em 5 minutos de ensaio ($Q\%_{5min}$). Os resultados com valor de p< 0,05 são considerados significativos

Efeito	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	p
(1) Polimorfo	**1584,845**	**1**	**1584,845**	**198,1056**	**0,045155**
(2) Tensoativo	1185,845	1	1185,845	148,2306	0,052172
(3) Inserção	5,120	1	5,120	0,6400	0,570447
(1)*(2)	**2318,805**	**1**	**2318,805**	**289,8506**	**0,037350**
(1)*(3)	0,320	1	0,320	0,0400	0,874334
(2)*(3)	2,000	1	2,000	0,2500	0,704833
Erro	8,000	1	8,000		
Total SS	5104,935	7			

Porcentagem de variação explicada ($R^2_{ajustado}$) = 98,90

Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) para os dados de porcentagem de fármaco dissolvido para suspensão de mebendazol em 20 minutos de ensaio ($Q\%_{20min}$). Os resultados com valor de p< 0,05 são considerados significativos

Efeito	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	p
(1) Polimorfo	**2719,531**	**1**	**2719,531**	**6026,662**	**0,008200**
(2) Tensoativo	**1851,361**	**1**	**1851,361**	**4102,740**	**0,009938**
(3) Inserção	0,551	1	0,551	1,222	0,468195
(1)*(2)	**2221,111**	**1**	**2221,111**	**4922,130**	**0,009073**
(1)*(3)	4,961	1	4,961	10,994	0,186474
(2)*(3)	22,781	1	22,781	50,485	0,089014
Erro	0,451	1	0,451		
Total SS	6820,749				

Porcentagem de variação explicada ($R^2_{ajustado}$) = 99,99

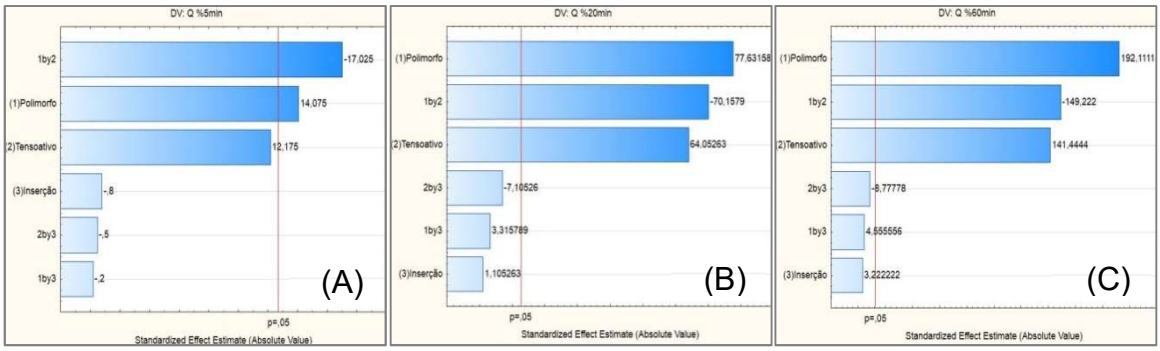
Tabela 13. Análise de variância (ANOVA) para os dados de porcentagem de fármaco dissolvido para suspensão de mebendazol em 60 minutos de ensaio ($Q\%_{60min}$). Os resultados com valor de $p < 0,05$ são considerados significativos

Efeito	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	p
(1) Polimorfo	**3736,801**	**1**	**3736,801**	**36906,68**	**0,003314**
(2) Tensoativo	**2025,661**	**1**	**2025,661**	**20006,53**	**0,004501**
(3) Inserção	1,051	1	1,051	10,38	0,191572
(1)*(2)	**2254,561**	**1**	**2254,561**	**22267,27**	**0,004266**
(1)*(3)	2,101	1	2,101	20,75	0,137564
(2)*(3)	7,801	1	7,801	77,05	0,072215
Erro	0,101	1	0,101		
Total SS	8028,079	7			

Porcentagem de variação explicada ($R^2_{ajustado}$) = 99,99

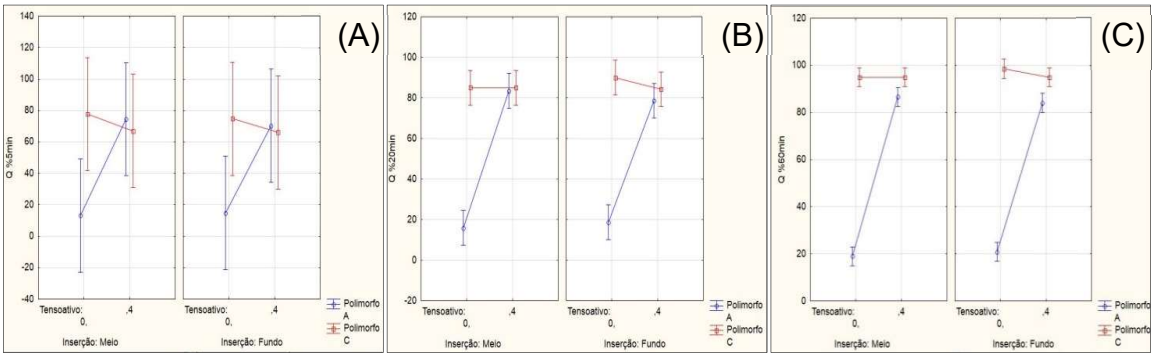
Nos gráficos de Pareto (Figura 10 – A, B e C), as barras que ultrapassam a direita da linha vermelha são considerados valores significativos, com valor de $p < 0,05$ (CALADO; MONTGOMERY, 2003). Sem dúvida, a forma polimórfica presente na suspensão influencia o resultado da dissolução, corroborando com os resultados de solubilidade. Ainda, a avaliação da combinação do polimorfo com a presença de tensoativo no meio de dissolução, mostrou-se fundamental para o desenvolvimento do método.

Figura 10 - Gráfico de Pareto para (A) $Q\%_{5min}$, (B) $Q\%_{20min}$ e (C) $Q\%_{60min}$



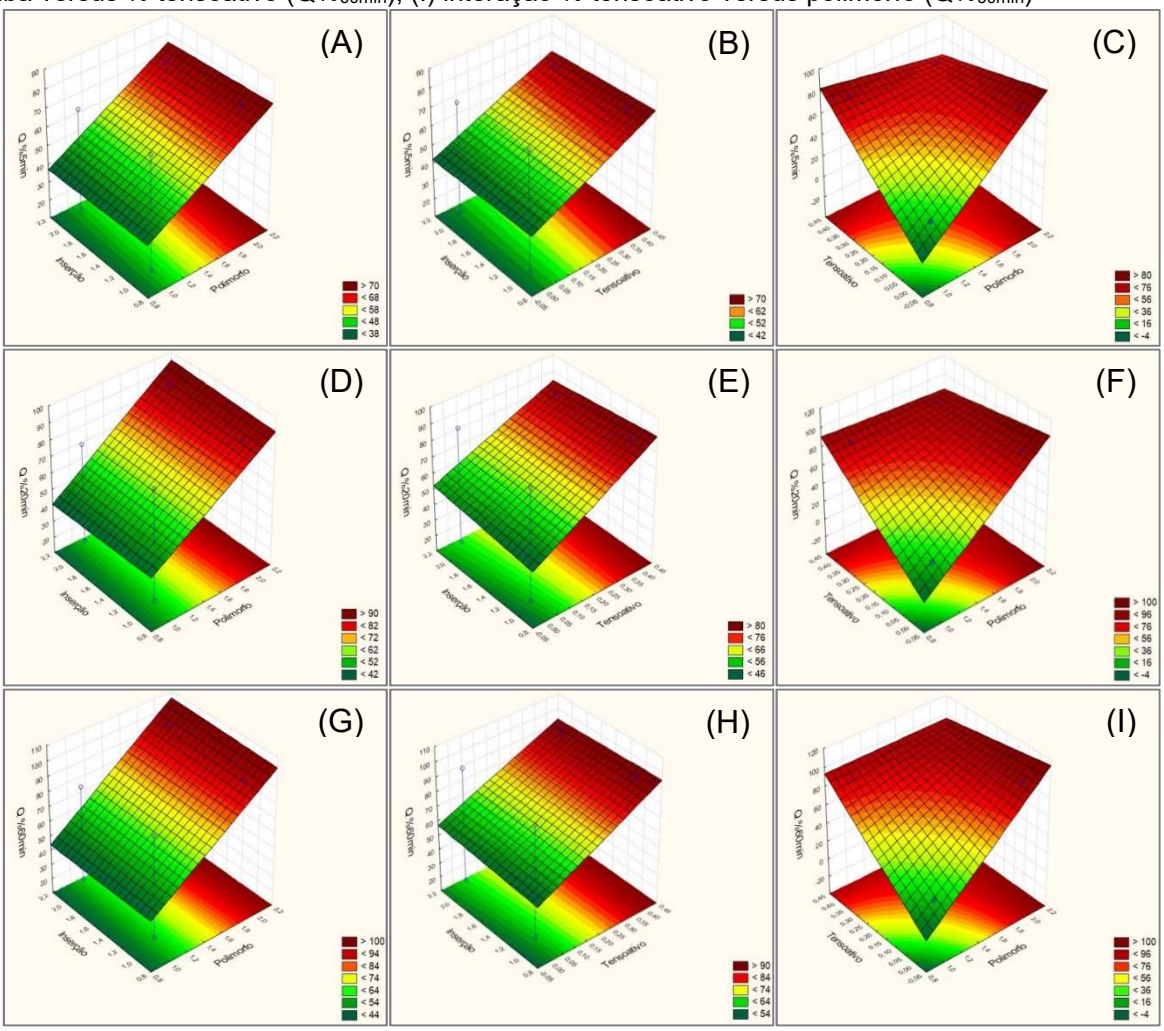
O gráfico das médias (Figura 11) permite visualizar a distância entre as porcentagens dissolvidas entre os diferentes polimorfos para os tempos de 20 e 60 minutos quando na ausência de tensoativo, enquanto que, na utilização de tensoativo, as respostas são bastante próximas, impossibilitando sua discriminação. Contudo, no tempo de 5 minutos, tanto com a presença quanto com a ausência de tensoativo, os valores ficam próximos, indicando que nos primeiros 5 minutos de ensaio não é possível a separação dos polimorfos.

Figura 11 - Gráfico das médias dos ensaios de dissolução para (A) Q%$_{5min}$, (B) Q%$_{20min}$ e (C) Q%$_{60min}$



Nos gráficos de superfície de respostas (Figura 12), a interação entre a concentração de tensoativo e o tipo de polimorfo fica bastante evidenciada, de modo a influenciar a porcentagem de fármaco dissolvido.

Figura 12 - Superfície de resposta para (A) interação inserção na cuba versus polimorfo (Q%$_{5min}$), (B) interação inserção na cuba versus % tensoativo (Q%$_{5min}$), (C) interação % tensoativo versus polimorfo (Q%$_{5min}$), (D) interação inserção na cuba versus polimorfo (Q%$_{20min}$), (E) interação inserção na cuba versus % tensoativo (Q%$_{20min}$), (F) interação % tensoativo versus polimorfo (Q%$_{20min}$), (G) interação inserção na cuba versus polimorfo (Q%$_{60min}$), (H) interação inserção na cuba versus % tensoativo (Q%$_{60min}$), (I) interação % tensoativo versus polimorfo (Q%$_{60min}$)



A Figura 12 (C, F, I), apresenta a relação entre as duas variáveis, tensoativo e polimorfo, de forma que fica clara a atuação dos dois fatores nos resultados de dissolução.

A Figura 12 (A, D, G), mostra maior resposta com o aumento do nível de polimorfo de maior solubilidade, polimorfo C, assim como na Figura 12 (B, E, H) nota-se que esta elevação também é dependente da concentração do tensoativo no meio, conforme apontado pelo paralelismo das cores, que se eleva com o aumento do nível dessas variáveis.

A partir destes resultados, o método de dissolução que se apresentou mais adequado para as suspensões de mebendazol, possibilitando diferenciar formulações, principalmente em relação aos seus polimorfos, com condições de não saturação para formulações que contenham a forma mais solúvel (polimorfo C), é aquele que não utiliza tensoativo. Além disso, para suspensões de mebendazol, os resultados mostraram-se independentes do local de inserção da amostra na cuba de dissolução.

4 Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, um ensaio de dissolução conduzido em aparato 2 (pá), na velocidade de agitação de 75 rpm, utilizando 2 litros de meio HCl 0,1 M sem o uso de tensoativo, é o método mais adequado para avaliação de suspensões de MBZ, com potencial de discriminação entre os seus polimorfos. Quanto ao local de inserção da amostra, as posições meio e fundo mostraram-se semelhantes, indicando que ambos os locais de inserção podem ser aplicados no método.

Referências

ABOUL-ENEIN, H. Y.; BUNACIU, A. A.; FLESCHIN, S. Analysis of mebendazole polymorphs by fourier transform IR spectrometry using chemometric methods. **Biopolymers (Biospectroscopy)**, v. 67, p. 56–60, 2002.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, volume 1. 5ª Ed. Brasilia,2010.

AGATONOVIC-KUSTRIN, S.; GLASS, B. D.; MANGAN, M.; SMITHSON, J. Analysing the crystal purity of mebendazole raw material and its stability in a suspension formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 361, p. 245-250, 2008.

BHATTACHAR, S. N.; RISLEY, D. S.; WERAWATGANONE, P.; ABURUB, A. Weak bases and formation of a less soluble lauryl sulfate salt/complex in sodium lauryl sulfate (SLS) containing media. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 412, p. 95-98, 2011.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. **Planejamento de Experimentos usando o Statistica**. Rio de Janeiro: E-Papers Serviços Editoriais, 2003, 260p.

CAMPBELL, G. A. et al. Evaluating the taste masking effectiveness of various flavors in a stable formulated pediatric suspension and solution using the Astree^{TM} electronic tongue. **Powder Technology**, v. 224, p. 109–123, 2012.

CARLERT, S.; ÅKESSON, P.; JERNDAL, G.; LINDFORS, L.; LENNERNÄS, H.; ABRAHAMSSON B. In vivo dog intestinal precipitation of mebendazole: a basic BCS class II drug. **Molecular Pharmaceutics**, v.9, n.10, p.2903-2911, 2012.

FDA. U.S. Food and Drug Administration. Dissolution Methods . Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_getallData.cfm. Acesso em: 20 novembro 2017.

FROEHLICH, P. E.; GASPAROTTO, F. S. Mebendazol: identificação das formas polimórficas em diferentes matérias-primas e medicamentos (referência e genéricos) disponíveis no mercado nacional. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada,** v. 26, n.3, 2005.

GARAD, S.; WANG, J.; JOSHI, Y.; PANICUCCI, R. Preclinical development for suspensions In: KULSHRESHTHA, A. K.; SINGH, O. N.; WALL, G. M. **Pharmaceutical Suspensions: From Formulation Development to Manufacturing**, New York: Springer/ AAPS Press, 2010, cap. 5, p. 127-176.

GARCIA-RODRIGUEZ, J.J.G. et al. Changed crystallinity of mebendazole solid dispersion: Improved anthelmintic activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, p. 23-28, 2011.

GOES, A. M.; KFURI, C. R. Desenvolvimento e pesquisa de suspensão pediátrica de hidróxido de alumínio. **Investigação**, v. 5, n. 1-6, p. 139-144, 2005.

HIMMELREICH, M.; RAWSON, B.J.; WATSON, T.R. Polymorphic forms of mebendazole. **Australian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.6, p.123-125, 1977.

HONORATO, S. B. et al. Polymorphism evaluation in generic tablets containing mebendazole by dissolution tests. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 2, p. 220–227, 2012.

JAIN, A.; RAN, Y.; YALKOWSKYL, S. H. Effect of Ph-Sodium Lauryl Sulfate Combination on Solubilization of PG-300995 (an Anti-HIV Agent): A technical Note. **AAPS PharmSciTech**, v.45, n 5 (3), p. 1-3, 2004.

KARMWAR, P. et al. Effect of different preparation methods on the dissolution behavior of amorphous indomethacin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, p. 459-464, 2012.

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.

MANOHARAN; C.; BASARKAR, A.; SINGH, J. Various pharmaceutical disperse systems In: KULSHRESHTHA, A. K.; SINGH, O. N.; WALL, G. M. **Pharmaceutical Suspensions: From Formulation Development to Manufacturing**, New York: Springer/ AAPS Press, 2010, cap. 1, p. 1-37.

RIVERA-LEYVA, J.C. et al. Comparative studies on the dissolution profiles of oral ibuprofen suspension and commercial tablets using biopharmaceutical classification system criteria. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 74, n. 4, p. 312-318, 2012.

SIMULATIONS PLUS, DDDPlus™ version 5.0 Manual, California, USA, 2016.

SWANEPOEL, E.; LIEBENBERG, W.; DE VILLIERS, M. M. Quality evaluation of generic drugs by dissolution test: changing the USP dissolution medium to distinguish between active and non-active mebendazole polymorphs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 55, n. 3, p. 345–349, 2003.

UNITED States Pharmacopeia. 39. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2016.

VIPPGUNTA, S. R.; BRITTAIN, H. G.; GRANT, D. J. W. Crystalline solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 1, p. 3–26, 2001.

ZHAO, F.; MALAYEV, V.; RAO, V.; HUSSAIN, M. Effect of Sodium Lauryl Sulfate in Dissolution Media on Dissolution of Hard Gelatin Capsule Shells. **Pharmaceutical Research**, v.21, n. 1, p. 144-148, 2004.

Capítulo 3

Avaliação do perfil de dissolução de suspensões de mebendazol comercialmente disponíveis na América Latina

Resumo

Dada as vantagens oferecidas, muitos fármacos são disponibilizados para a terapêutica na forma de suspensão, servindo como uma opção interessante para a administração de medicamentos em crianças. Apesar das peculiaridades dessa forma farmacêutica, poucas são as monografias e literatura disponível acerca do desenvolvimento de métodos e avaliação do perfil de dissolução de suspensões. O mebendazol (MBZ) fármaco anti-helmíntico de amplo espectro, bastante utilizado em crianças, apresentando-se principalmente, sob duas formas cristalinas (A e C) que diferem quanto à solubilidade. Embora o polimorfo C, seja aquele recomendado para utilização, estudos demonstram que o perfil de dissolução de comprimidos é comprometido pela presença do polimorfo A em formulações. Considerando a importância da avaliação do perfil de dissolução de suspensões e a ausência de estudos para formulações de MBZ, o objetivo deste capítulo foi avaliar o perfil de dissolução de especialidades farmacêuticas comercializadas em países da América Latina empregando um método de dissolução discriminativo. Para isso foram analisadas amostras de países como Brasil, Peru, Bolívia e Argentina, e paralelamente, formulações de suspensões contendo diferentes porcentagens de polimorfos A e C. Com base nos resultados, apenas duas formulações de um total de dez amostras, apresentaram perfil de dissolução satisfatório, fato que chama a atenção para a qualidade das suspensões de MBZ comercializadas na América Latina.

1. Introdução

Flexibilidade de doses e facilidade de deglutição são características que fazem das suspensões uma importante ferramenta para a administração de fármacos de baixa solubilidade em crianças (CAMPBELL et al., 2012; GOES; KFURI, 2005; MANOHARAN; BASARKAR; SINGH, 2010; RIVERA-LEYVA et al., 2012).

Por outro lado, tendo em vista que as suspensões são sistemas termodinamicamente instáveis, fatores como composição do veículo, tamanho de partícula da fase dispersa, sedimentação/redispersão, assim como o tempo e condições de armazenamento, se não estiverem bem trabalhados, podem influenciar a liberação da substância ativa e comprometer o desempenho da formulação (AZAM; HAIDER, 2008; KUMAR; YAGNESH, 2016; MANOHARAN; BASARKAR; SINGH, 2010).

Assim, do mesmo modo que os comprimidos, as suspensões devem ter o seu perfil de dissolução caracterizado, entretanto, há poucas monografias farmacopeicas disponíveis, além de escassa informação na literatura a respeito do desenvolvimento de métodos e condições de ensaio (SOARES et al., 2015).

O mebendazol (MBZ) é um fármaco anti-helmíntico de amplo espectro, apresentando ação contra nematoides, além de atividade larvicida e ovicida. É empregado no tratamento da ascaridíase, enterobíase, tricuríase, ancilostomíase e teníase, atuando por inibição da formação dos microtúbulos citoplasmáticos dos helmintos ou mesmo por destruição dos mesmos, além da inibição da captação de glicose (MARTINDALE, 2009; GEARY et al., 2010). Encontra-se comercialmente disponível sob as formas de comprimidos de liberação imediata contendo 100 mg, 500 mg e suspensões de uso oral na dosagem de 100 mg/5 mL (FDA, 2017; KACHRIMANIS; RONTOGIANNI; MALAMATARIS, 2010; KOROKOLVAS; FRANÇA, 2009;).

Trata-se de um fármaco de grande importância na terapia anti-helmíntica, principalmente em países que possuem regiões com condições precárias de saneamento básico. Segundo a Organização Panamericana de Saúde (OPAS), estima-se que nas Américas cerca de 46 milhões de crianças em idade pré-escolar e escolar encontram-se em risco de infecção por helmintos (WHO, 2014). A OPAS e a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomendam a

administração em massa de medicamentos contendo o albendazol ou o mebendazol a crianças nessa faixa etária que vivam em áreas de risco (WHO, 2014).

Um fenômeno apresentado por muitos fármacos e que pode ter impacto na biodisponibilidade, principalmente nos casos em que o fármaco é de baixa solubilidade, é o polimorfismo. Nesses, diferentes resultados terapêuticos podem ser observados, dado que fármacos com essa característica podem apresentar variação na sua dissolução, conforme a forma cristalina utilizada, resultando em baixa eficácia do medicamento, particularmente, quando é administrado pela via oral e na forma sólida (AGATONOVIC-KUSTRIN et al., 2008; AGRAWAL et. al, 2004; BLAGDEN et al., 2007; FROELICH; GASPAROTTO, 2005).

O MBZ se enquadra nesta classe, sendo encontrados principalmente, dois polimorfos, as formas A e C, que apresentam diferenças de solubilidade. A forma C é a mais indicada para utilização. Em matérias-primas que apresentem misturas desses polimorfos e que a concentração de A seja superior a 30%, pode haver comprometimento da ação do medicamento, dada pela menor solubilidade desta forma cristalina, o que influencia negativamente a dissolução do fármaco (BRITS; LIENBENBERG; DE VILLIERS, 2009; HIMMELREICH; RAWSON; WATSON, 1977; LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004).

Dada à ausência de método disponível para a avaliação de suspensões de MBZ e, considerando a importância na caracterização do perfil de dissolução deste tipo de forma farmacêutica e ainda, que é a apresentação de escolha para administração em crianças, o objetivo desse capítulo foi avaliar o perfil de dissolução de suspensões de mebendazol comercializadas em países da América Latina empregando um método de dissolução discriminativo para as duas formas polimórficas do mebendazol.

2. Material e Métodos

2.1. Material

Mebendazol, polimorfos A (100%) e C (99,9%), gentilmente cedidos pelas indústrias Genix – Indústria Farmacêutica Ltda. e Eurofarma Laboratórios S.A, Brasil. Suspensões de mebendazol (100 mg/ 5 mL) foram adquiridas em drogarias, sendo 6 delas do Brasil (S1 a S5 e S11), 2 do Peru (S9 e S10), 2 da Bolívia (S7 e S8) e 1 da Argentina (S6). Foram utilizados os solventes e

reagentes: acetonitrila (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), ácido clorídrico (HCl) P.A. 37% (Casa Americana, São Paulo, SP, Brasil), fosfato de potássio monobásico (LabSynth Produtos para Laboratórios Ltda.., Diadema, SP, Brasil) e lauril sulfato de sódio (Casa Americana, São Paulo, SP, Brasil), todos com grau analítico de pureza. A água ultrapurificada foi obtida por meio do sistema de purificação de água Millipore (Millipore SAS, Molsheim, França).

Para as suspensões produzidas no laboratório, foram utilizados os materiais, carboximetilcelulose sódica (Denver Especialidades Químicas LTDA.); celulose microcristalina 101 (Blanver Farmoquímica LTDA., Taboão da Serra, SP, Brasil); sacarina sódica (Valdequimica Produtos Químicos LTDA., São Paulo, SP, Brasil); lauril sulfato de sódio (LSS) (Casa Americana, São Paulo, SP, Brasil); metilparabeno (PharmaSpecial Especialidades Químicas e Farmacêuticas LTDA., Itapevi, SP, Brasil); propilparabeno (Embrafarma Produtos Químicos e Farmacêuticos LTDA., São Paulo, SP, Brasil) e propilenoglicol (LabSynth Produtos para Laboratórios LTDA., Diadema, SP, Brasil).

2.2 Métodos

2.2.1 Caracterização da matéria-prima

Para caracterização da matéria-prima, mebendazol polimorfos A e C, foram realizados os ensaios de difratometria de raios X, calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria e densidade verdadeira.

2.2.1.1 Difratometria de Raios-X (DRX)

A difratometria de raios-X foi realizada em equipamento de ânodo rotatório de cobre, marca Rigaku, modelo RINT2000 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). As condições empregadas foram de 40 KV e 70 mA, com medida contínua de 0,02 graus, detector linear D/teX Ultra – Rigaku, fenda de divergência de 0,25° e abertura horizontal da fenda de divergência 5 mm. Após o refinamento dos resultados, a quantificação das estruturas cristalinas foi realizada pelo método de Rietveld.

2.2.1.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise de DSC foi realizada em equipamento DSC Extar 7020 (Seiko Instruments, Japão), previamente calibrado com padrão índio (ponto de fusão

156,4 °C e ΔH de fusão 28,5 J g^{-1}). Foi acondicionada massa em torno de dois miligramas em cadinho de alumínio hermético e submetidas a temperatura de 25 °C a 350 °C, sob razão de aquecimento de 10 °C min^{-1} e atmosfera inerte de nitrogênio com vazão de 50 mL min^{-1}.

2.2.1.3 Termogravimetria (TG)

Para a termogravimetria massas em torno de dois miligramas foram colocados em cadinho de platina e analisados em equipamento Exstar TG/DTA 7200 Series (Seiko Instruments, Japão). Razão de aquecimento de 10 °C min^{-1} na faixa de temperatura de 25 °C a 600 °C, em atmosfera inerte de nitrogênio com vazão de 100 mL min^{-1}.

2.2.1.4 Densidade Verdadeira

A densidade verdadeira das amostras foi obtida utilizando equipamento Ultrapycnometer 1000 (Quantachrome Instruments®, Boynton Beach, Estados Unidos). Cerca de 1,5 g dos materiais foram pesados e inseridos em porta amostra com volume nominal de 10,8 cm^3. Previamente, foi realizada purga do gás He e equilíbrio da pressão interna no equipamento. Em seguida, foram obtidas cinco medições de cada amostra e determinado o valor médio de densidade com base nos resultados das três melhores análises.

2.2.2 Produção das suspensões contendo misturas de polimorfos A e C

Foram produzidas 11 formulações (F1 a F11) de suspensão de mebendazol (100 mL), contendo diferentes concentrações de polimorfos A e C, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Formulação das suspensões de mebendazol. As quantidades de cada componente estão expressas em porcentagem

Componente	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11
Mebendazol Polimorfo A	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0
Mebendazol Polimorfo C	2,0	1,8	1,6	1,4	1,2	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0,0
Celulose Microcristalina	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Carboximetilcelulose Sódica	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
Propilenoglicol	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Metilparabeno	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Propilparabeno	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Sacarina sódica	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Lauril sulfato de sódio	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Água Purificada q.s.p.	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

2.2.3 Ensaios de dissolução

Para a avaliação das suspensões de mebendazol produzidas e das suspensões comercializadas na América Latina, utilizou-se um método discriminativo para os polimorfos, conforme mencionado no capítulo anterior (Tabela 2).

Tabela 2 - Condições de ensaio de dissolução aplicada para avaliação das suspensões de mebendazol

Aparato	2 (pá)
Volume de meio	2000 mL
Meio	HCl 0,1 M
Velocidade de agitação	75 rpm
Temperatura	37 °C
Tempos de coleta	2, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos

2.2.4 Método de quantificação

A quantidade de fármaco dissolvido nos ensaios de dissolução foi obtida pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE, utilizando equipamento HITACHI ELITE LaChrome L-2000 (VWR Hitachi, Tokyo, Japão); bomba HITACHI ELITE LaChrome L-2130 (VWR Hitachi, Tokyo, Japão), detector HITACHI ELITE LaChrome Diode array L-2455 (VWR Hitachi, Tokyo, Japão) e para processamento de dados utilizou-se o programa EZChrom Elite. Para a análise utilizou-se 60% de tampão fosfato de potássio 0,05M pH 4,5 e 40% de acetonitrila como fase móvel em grau analítico, com fluxo de 0,6 mL min^{-1}, e coluna LiChroCart C18 (125-4 mm x 4,6 mm x 5 µm – Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) como fase estacionária.

A temperatura de 25 ºC foi mantida durante a análise, cujo volume de injeção da amostra foi de 20 µL e detecção realizada em comprimento de onda de 248 nm, com tempo de retenção de 6,1 min. Para fins de quantificação, uma curva analítica foi preparada a partir de uma solução mãe contendo 15 mg de fármaco dissolvidos em 100 mL de uma solução constituída por 50% de acetonitrila e 50% de HCl 0,1 M. Essa solução foi diluída e soluções na faixa de 10 a 140 µg mL^{-1} foram obtidas e quantificadas nas mesmas condições de análise das amostras.

2.2.5 Avaliação da interação da formulação (I) com o meio de dissolução

Acompanhamento visual no momento da inserção das amostras nas cubas de dissolução foi realizado de modo a verificar uma possível interação das formulações com o meio de dissolução. Alíquotas das amostras foram inseridas em tubos de ensaio contendo o meio de dissolução para obtenção de imagens em câmera fotográfica.

2.2.6 Análise de Componentes Principais (ACP)

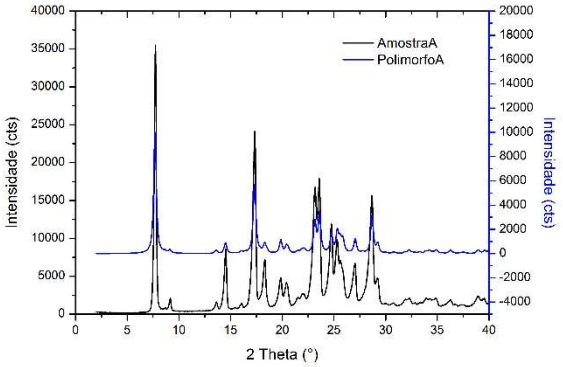
Para a realização da análise multivariada foi utilizada a técnica de análise de componentes principais (ACP), utilizando o programa Statistica 13.0 (Dell Inc., Tulsa, Estados Unidos), tendo sido adotadas como variáveis de entrada, as porcentagens de fármaco dissolvido nos respectivos tempos de coleta, entre 2 e 60 minutos ($Q\%_{2min}$ a $Q\%_{60min}$), o valor de eficiência de dissolução (ED) e a presença ou ausência de interação da formulação com o meio de dissolução. Previamente à análise dos dados, foi realizada a padronização dos valores e selecionadas as variáveis latentes ortogonais (Componentes Principais-CP) que apresentaram os maiores autovalores, para a criação dos gráficos bidimensionais, de modo a reter a maior quantidade de informação das variáveis originais (entrada).

3. Resultados e discussão

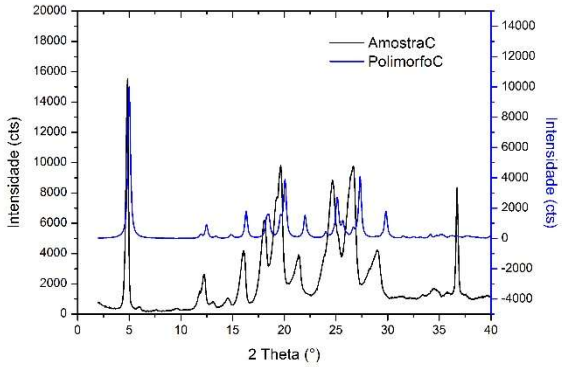
Para a execução deste trabalho, a caracterização das formas cristalinas de MBZ presentes nas amostras foi de fundamental importância, de modo que tais matérias-primas, pudessem servir de padrão para comparação com as especialidades farmacêuticas avaliadas. Inicialmente procedeu-se com a difratometria de raios-x, e pela utilização do método de Rietveld, foram detectados 99,9% de polimorfo C, e a presença de um pequeno pico, no qual corresponde a 0,1% em massa da forma cristalina A, na amostra denominada como C. Para a segunda amostra, 100% de polimorfo A foi observado, sendo a mesma identificada como A. Para a avaliação das amostras foram utilizados como base os difratogramas constantes no banco de dados *ConQuest – The Cambridge Crystallographic Data Centre* (CCDC), com os códigos CSD TUXPEJ para a forma A (FERREIRA et al., 2010) e CSD YULGIW para a forma C (MARTINS et al., 2009).

Na Figura 1, é possível observar a presença de picos característicos de cada forma cristalina, para o polimorfo C em torno de 4,9° e para o polimorfo A, em torno de 7,7° (DE VILLIERS, 2005).

Figura 1 - Difratogramas - Amostra A e Polimorfo A – CSD TUXPEJ (a), Amostra C e Polimorfo C – CSD YULGIW (b).



(a)

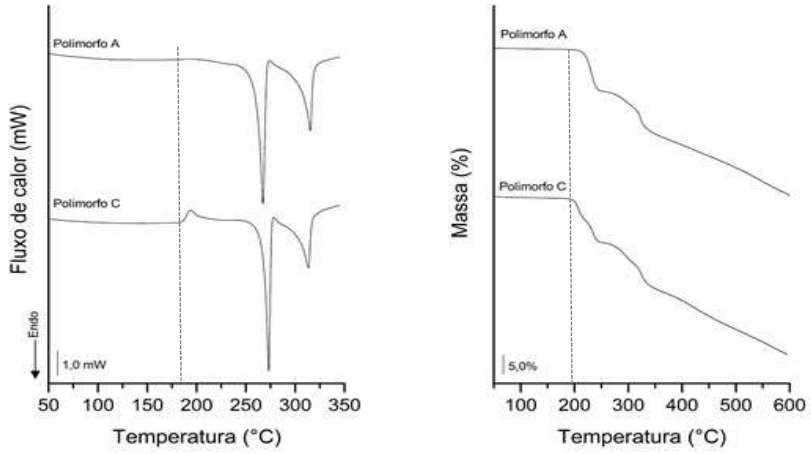


(b)

Na Figura 2, são apresentadas as curvas de DSC e TG das amostras de MBZ, nas quais é possível observar que a diferença entre as elas, está na presença de um evento exotérmico em 193,9 °C para a forma C. Segundo De Villiers e colaboradores (2005), que analisaram amostras de MBZ pela técnica de difração de raios X com variação de temperatura, ocorre a transformação da forma C em A entre 200 a 225 °C. Fato também observado por Swanepoel e colaboradores (2003), que detectaram um pequeno evento a 195 °C para o polimorfo C e transformação desta forma na faixa mencionada. Na sequência, em ambas as curvas, são observados dois eventos endotérmicos, o primeiro nas temperaturas de 273,0 °C e 267,1 °C (amostras C e A, respectivamente) que correspondem à fusão da forma cristalina A (SWANEPOEL et al., 2003) e o último, que está relacionado à decomposição do fármaco, que ocorre acima de 300 °C (KUMAR et al., 2008).

Para a TG, verifica-se que todos os eventos são acompanhados de perda de massa e, para a amostra C, o primeiro evento é antecipado, ocorrendo logo após a transição polimórfica.

Figura 2 - Curvas de DSC e TG dos polimorfos A (amostra A) e C (amostra C) de mebendazol

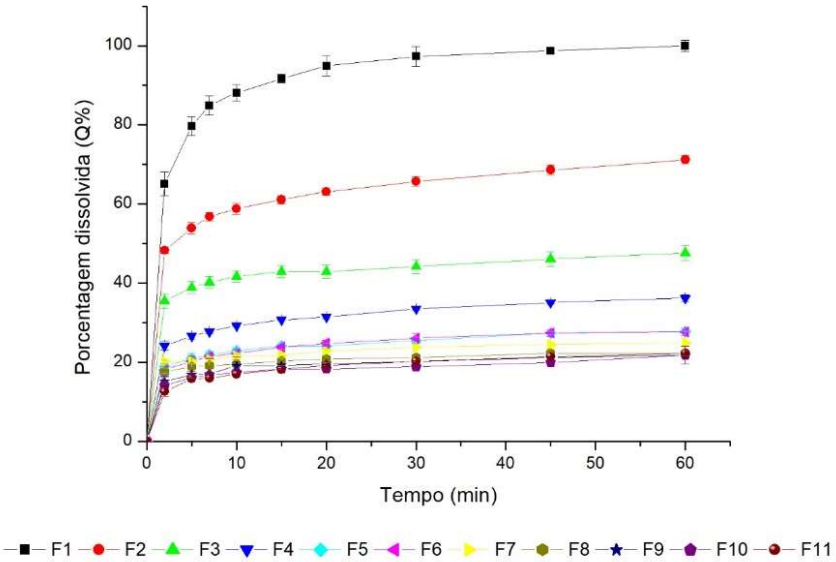


De acordo com os valores de densidade verdadeira obtidos, 1,47 g mL^{-1} ± 0,01 (amostra A) e 1,47 g mL^{-1} ± 0,01 (amostra C) , é possível observar o maior valor de densidade para o polimorfo A, que é a forma cristalina mais estável. Diferentes formas cristalinas podem apresentar variações em suas propriedades físico-químicas, como ponto de fusão, solubilidade, densidade, assim como outras propriedades (CHIENG; RADES; AALTONEN, 2011; VIPPGUNTA; BRITTAIN; GRANT, 2001).

Pela regra de Burger, utilizada na caracterização de transições cristalinas, quando a forma de menor solubilidade é sempre mais estável e de maior densidade, há a existência de um sistema monotrópico, com transição da forma de menor estabilidade para a maior de modo irreversível e com evento exotérmico (GIRON, 1995), como apresentado no primeiro evento da amostra C na curva de DSC.

Confirmada a presença das formas cristalinas A e C isoladamente, nas matérias-primas de MBZ, procedeu-se com a elaboração de misturas entre estes polimorfos para a produção das suspensões, assim como os respectivos ensaios de dissolução (Figura 3).

Figura 3 - Perfis de dissolução das formulações preparadas com misturas dos polimorfos A e C de MBZ em 2000 mL de meio HCl 0,1 M, aparato 2, 75 rpm a 37 °C. F1 e F11, correspondem à 100% de forma C e 100% de forma A, respectivamente. Os dados são apresentados pela media e desvio padrão de três determinações

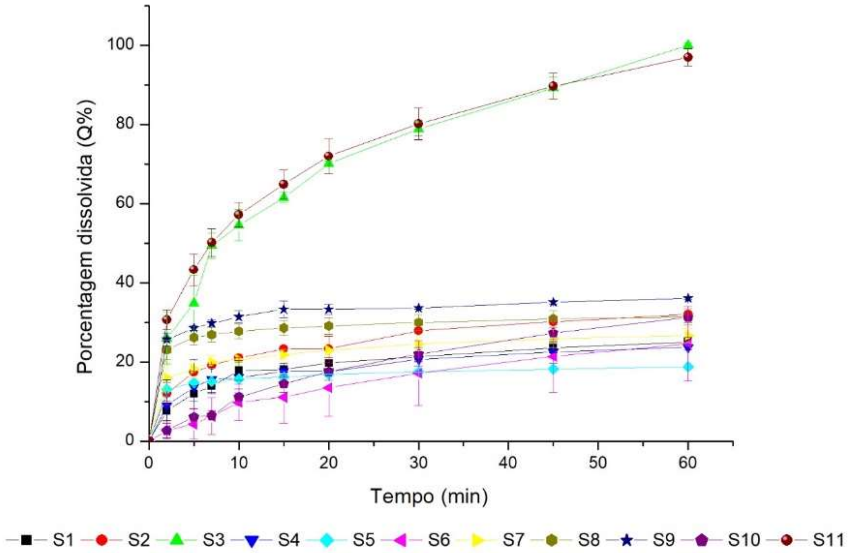


Ao avaliar os perfis da Figura 3, é possível notar que há diferenças na liberação do fármaco, conforme a porcentagem de polimorfo A na matéria-prima. Duas observações são importantes: a primeira de que o método utilizado foi capaz de separar as amostras e a segunda, na medida em que a quantidade de polimorfo A aumenta na formulação, a dissolução do MBZ diminui consideravelmente.

Em estudo realizado por Ren e colaboradores (1987), verificou-se que quando o MBZ utilizado é 100% polimorfo A, ou quando esta forma está acima de 30%, a atividade terapêutica do MBZ não é observada, possivelmente pela diminuição da solubilidade da matéria-prima, havendo impacto na dissolução. Outra questão importante, é a de que o método recomendado pela Farmacopeia Americana, para a avaliação de comprimidos, que leva 1% de lauril sulfato de sódio em HCl 0,1M como meio de dissolução, não é capaz de identificar amostras que tenham quantidades inadequadas da forma C, que é a mais indicada do ponto de vista terapêutico (DE VILLIERS et al., 2005).

Tendo em vista, estas observações, especialidades farmacêuticas na forma de suspensão, foram avaliadas pelo mesmo método empregado nas formulações contendo as misturas de polimorfos (Figura 4).

Figura 4 - Perfis de dissolução das suspensões comerciais de MBZ em 2000 mL de meio HCl 0,1 M, aparato 2, 75 rpm a 37 °C. Os dados são apresentados pela media e desvio padrão de três determinações.



Pode-se notar que as formulações apresentam dificuldades na liberação do fármaco, e que grande parte delas, pode conter quantidade considerável de polimorfo A, tal observação é bastante evidente quando comparadas as EDs das misturas (Figura 5) e das especialidades farmacêuticas avaliadas (Figura 6). As amostras S3 e S11, são as únicas que apresentaram ED acima de 70% e se aproximaram da formulação 100% forma C.

Figura 5 - Eficiência de Dissolução (ED) das das formulações preparadas com misturas de polimorfos. São apresentados os valores médios e desvio padrão de três determinações.

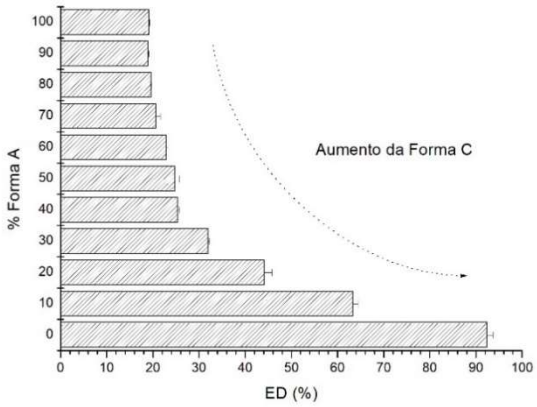
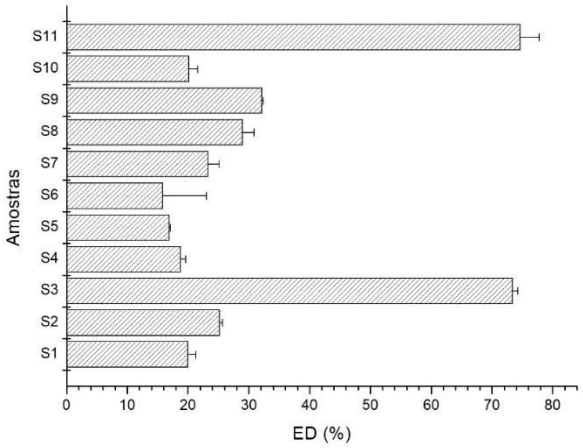
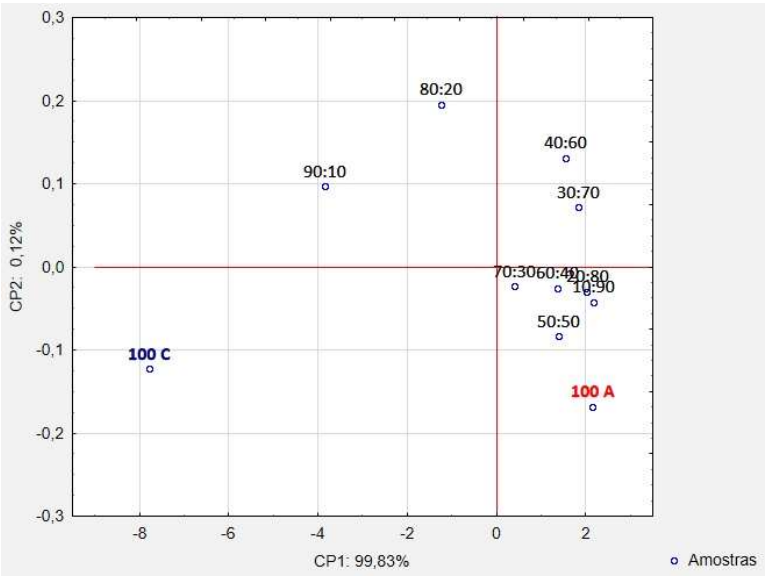


Figura 6 - Eficiência de Dissolução (ED) das especialidades farmacêuticas avaliadas. São apresentados os valores médios e desvio padrão de três determinações.



Para melhor comparação, os dados de porcentagem dissolvida ($Q\%_{2min}$ – $Q\%_{60\ min}$) e eficiência de dissolução, foram utilizados como variáveis de entrada na análise estatística multivariada. Na Figura 7 é apresentado o gráfico bidimensional para a análise das suspensões contendo as misturas de polimorfo. A somatória da quantidade de informação retida das variáveis originais é de 99,95%, havendo maior influência da CP1 (99,83%), que foi a grande responsável pela distribuição das amostras. Verifica-se que a partir de 30% de polimorfo A na formulação de suspensão, a dissolução se comporta de forma parecida com a amostra contendo 100% de forma A.

Figura 7 - Gráfico bidimensional das variáveis CP1 e CP2 na comparação das suspensões contendo misturas de polimorfos C e A



Na Figura 8, quando foram comparadas as especialidades farmacêuticas, a quantidade da informação retida nas variáveis originais foi de 97,30%, também havendo maior contribuição da CP1 (87,16%). Neste caso, verifica-se que as amostras se dividem em três grupos e que aquelas que apresentam melhor comportamento de dissolução estão situadas à esquerda, S3 e S11, ambas comercializadas no Brasil. As demais são colocadas mais à direita, o que indica liberação mais baixa.

As amostras S1 e S6, apresentaram interação de algum de seus componentes da formulação (Figura 9), com o meio de dissolução, dessa maneira, estão separadas pela CP2. É provável que algum componente do veículo dessas formulações sofra influência do pH ácido. Como comparativo, são mostradas as imagens das amostras S3 e S4, que se assemelharam às demais, não havendo indícios de interação.

Figura 8 - Gráfico bidimensional das variáveis CP1 e CP2 na comparação das especialidades farmacêuticas comercializadas na américa latina

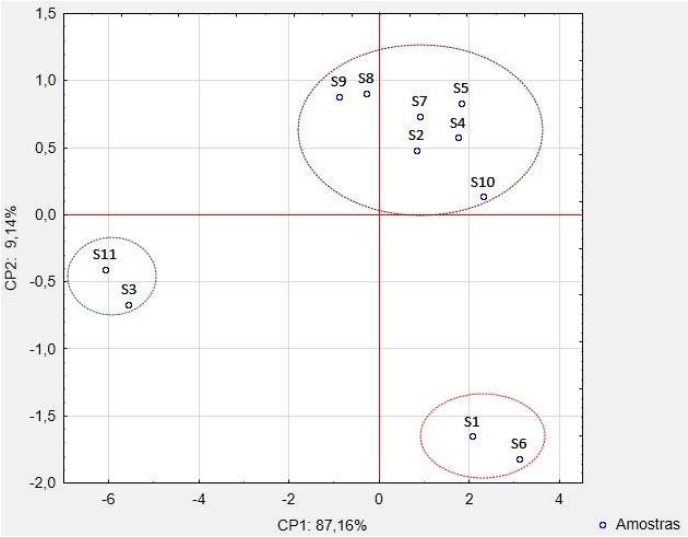
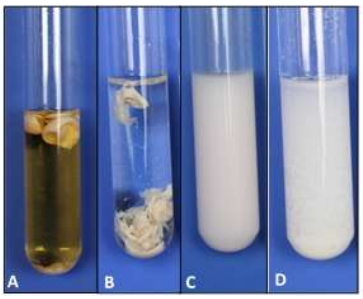
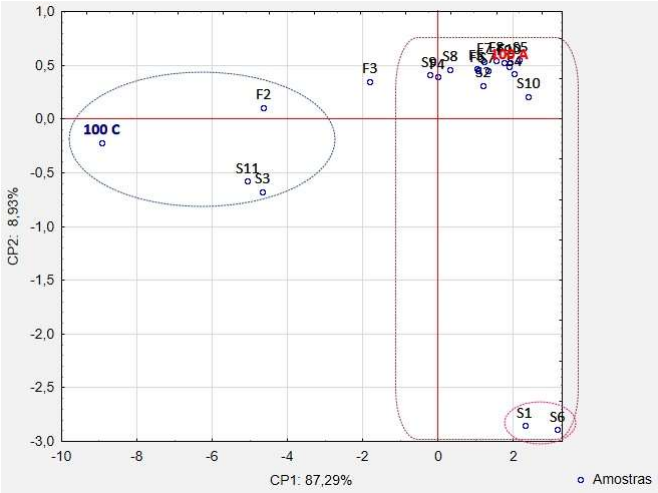


Figura 9 – Interação das formulações de suspensão com o meio de dissolução HCl 0,1 M. Em A: S1; B:S6; C: S3 e D: S4.



Na Figura 10, são colocadas todas as amostras analisadas, sendo possível observar que as amostras S3 e S11 estão próximas à formulação F2 que contém 90% de forma C em sua formulação, as demais, parecem conter mais de 30% do Polimorfo A em sua composição, havendo assim, um comprometimento da solubilidade do MBZ, o que contribui para os baixos perfis de dissolução.

Figura 10 - Gráfico bidimensional das variáveis CP1 e CP2 na comparação de todas as formulações analisadas



Como pode ser observado na Tabela 3, que apresenta a correlação de cada variável original com as componentes principais utilizadas, verifica-se que o fator interação (I) é aquele que apresenta correlação de 94% com a CP2 e negativa, separando assim, as amostras S1 e S6 para o quadrante inferior direito. Tal observação, indica que a baixa dissolução destas amostras, pode estar relacionada com a interação com o meio HCl 0,1 M, ou com a quantidade de polimorfo A presente nas suspensões, uma vez que o desempenho de dissolução tem correlação negativa com a CP1, acima de 90% para os fatores de porcentagem dissolvida e ED, direcionando as amostras para a direita do gráfico bidimensional.

Esses resultados trazem uma grande preocupação com o desempenho apresentado pelas suspensões de MBZ e a importância da utilização de um método de dissolução que seja capaz de separar as amostras de acordo com as formas cristalinas presentes na matéria-prima. Liebenberg e colaboradores (1998), chamaram a atenção para a etapa de pré-formulação e a importância da

escolha de amostras que contenham polimorfo C, quando avaliaram comprimidos de MBZ disponíveis na África do Sul. Em trabalho semelhante realizado por Honorato e colaboradores (2012), pela avaliação de comprimidos, e dissolução de misturas de polimorfos (pós), verificou-se problemas de dissolução em grande parte das amostras analisadas.

Tabela 3. Correlação entre as variáveis originais e as componentes principais (CP1 e CP2)

Variável original	CP1	CP2
Q% 2 min	-0,92	0,17
Q% 5 min	-0,96	0,10
Q% 7 min	-0,99	0,04
Q% 10 min	-0,99	-0,01
Q% 15 min	-0,99	-0,03
Q% 20 min	-0,99	-0,06
Q% 30 min	-0,99	-0,1
Q% 45 min	-0,97	-0,13
Q% 60 min	-0,95	-0,15
ED	-0,99	-0,08
I	0,29	-0,94

Com o trabalho aqui realizado, observa-se que essa constatação também é válida para formulações de suspensão, que é a forma farmacêutica mais utilizada por pacientes infantis.

4. Conclusão

Com o método utilizado, foi possível discriminar as formulações quanto ao perfil de dissolução. Ao realizar a análise multivariada dos dados das amostras avaliadas e compará-las com o desempenho de suspensões contendo quantidades conhecidas de polimorfos A e C de mebendazol, verificou-se que a maioria das formulações testadas apresentaram perfil de dissolução inadequado, o que pode ser resultado da presença considerável de polimorfo A nas matérias-primas utilizadas. Tais resultados levam à preocupação acerca da qualidade das suspensões de MBZ comercializadas na América Latina.

Referências Bibliográficas

AGATONOVIC-KUSTRIN, S.; GLASS, B. D.; MANGAN, M.; SMITHSON, J. Analysing the crystal purity of mebendazole raw material and its stability in a suspension formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 361, p. 245-250, 2008.

AGRAWAL, S.; YASVANTH, A.; BHARATAM, P. V.; PILLAI, O.; PACHANGNULA, R. Solid-state characterization of rifampicin samples and its biopharmaceutic relevance. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 22, p. 127-144, 2004.

AZAM, M. G; HAIDER, S. S. Evaluation of Dissolution Behavior of Paracetamol Suspensions, **Daka University Journal of Pharmacentical Sciences**, v. 7, n. 1, p.53-58, 2008.

BLAGDEN, N.; DA MATAS, M.; GAVAN, P. T.; YORK, P. Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, p. 617-630, 2007.

BRITS, M.; LIEBENBERG, W.; VILLIERS, M.M. Characterization of Polymorph Transformations That Decrease the Stability of Tablets Containing the WHO Essential Drug Mebendazole. **Jounal of Pharmaceutical Sciences**, Vol. 99, n. 3, p. 1138-1151, 2010.

CAMPBELL, G. A. et al. Evaluating the taste masking effectiveness of various flavors in a stable formulated pediatric suspension and solution using the Astree™ electronic tongue. **Powder Technology**, v. 224, p. 109–123, 2012.

CHIENG, N.; RADES, T.; AALTONEN, J.; An overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, p. 618-644, 2011.

DE VILLIERS, M.M.; TERBLANCHE, R.J.; LIEBENBERG, W.; SWANEPOEL, E.; DEKKER, T.G.; SONG, M. Variable temperature X-ray powder diffraction analysis of de crystal transformation of the pharmaceutically preferred polymorphism C of mebendazole. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.38, p.435-441, 2005.

FDA. U.S. Food and Drug Administration. Dissolution Methods . Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_getallData.cfm. Acesso em: 20 novembro 2017.

FERREIRA, F. F.; ANTONIO, S. G.; ROSA, P.C. P.; PAIVA-SANTOS, C. O. Crystal Structure Determination of Mebendazole Form A Using High-Resolution Synchrotron X-Ray Powder Diffraction Data. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.99, n.4, p.1734-1744, 2010.

FROEHLICH, P. E.; GASPAROTTO, F. S. Mebendazol: identificação das formas polimórficas em diferentes matérias-primas e medicamentos (referência e genéricos) disponíveis no mercado nacional. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada,** v. 26, n.3, 2005.

GEARY, T. G. et al. Unresolved issues in anthelmintic pharmacology for helminthiases of humans. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 1, p. 1–13, 2010.

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

GOES, A. M.; KFURI, C. R. Desenvolvimento e pesquisa de suspensão pediátrica de hidróxido de alumínio. **Investigação**, v. 5, n. 1-6, p. 139-144, 2005.

HIMMELREICH, M.; RAWSON, B.J.; WATSON, T.R. Polymorphic forms of mebendazole. **Australian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.6, p.123-125, 1977.

HONORATO, S. B. et al. Polymorphism evaluation in generic tablets containing mebendazole by dissolution tests. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 2, p. 220–227, 2012.

KACHRIMANIS, K.; RONTOGIANNI, M.; MALAMATARIS, S. Simultaneous quantitative analysis of mebendazole polymorphs A–C in powder mi xtures by DRIFTS spectroscopy and ANN modeling. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.51, p. 512-520, 2010.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. A. C. Dicionário Terapêutico Guanabara, 2008.

KUMAR, R. S.; YAGNESH, N. S. Pharmaceutical suspensions: patient compliance oral dosage forms. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.5, n. 12, p. 1471-1537, 2016.

KUMAR, S.; CHAWLA, M.; SOBHIA, M. E.; BANSAL, A. K. Characterization of solid-states forms of mebendazole. **Pharmazie**, v. 63, p. 136-143, 2008.

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.

MANOHARAN; C.; BASARKAR, A.; SINGH, J. Various pharmaceutical disperse systems In: KULSHRESHTHA, A. K.; SINGH, O. N.; WALL, G. M. **Pharmaceutical Suspensions: From Formulation Development to Manufacturing**, New York: Springer/ AAPS Press, 2010, cap. 1, p. 1-37.

MARTINDALE. The Extra Pharmacopoeia, 36th ed. United Kingdon: Pharmaceutical Press, 2009.

MARTINS, F. T.; NEVES, P. P.; ELLENA, J.; CAMÍ, G. E.; BRUSAU, E. V.; NARDA, G. E. Intermolecular contacts influencing the conformational and geometric features of the pharmaceutically preferred mebendazole polymorph C. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.98, n.7, p. 2336 - 2346 , 2009.

RIVERA-LEYVA, J.C. et al. Comparative studies on the dissolution profiles of oral ibuprofen suspension and commercial tablets using biopharmaceutical classification system criteria. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 74, n. 4, p. 312-318, 2012.

SOARES, T. P.; SOUZA, J.; ROSA, L. S.; BARCELLOS, N. M. S.; MARINHO, F. D. M. Oral drug suspensions: Is *in vitro* dissolution testing relevant in predicting the *in vivo* performance? **Pharmaceut Regulatory Affairs**, 4:3, 2015.

SWANEPOEL, E.; LIEBENBERG, W.; DEVARAKONDA, W.; DE VILLIERS, M. M. Developing a discriminating dissolution test for three mebendazole polymorph based on solubility differences. **Pharmazie**, v. 58, p. 117-121, 2003.

VIPPGUNTA, S. R.; BRITTAIN, H. G.; GRANT, D. J. W. Crystalline solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 1, p. 3–26, 2001.

WHO, World Health Organization. **Soil-transmitted helminth infections**. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs366/en/. Acesso em 12/10/2015.