

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Avaliação do impacto de diferentes variáveis no ensaio de
dissolução intrínseca de metronidazol

Michele Georges Issa

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz

São Paulo
2011

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

186a Issa, Michele Georges
Avaliação do impacto de diferentes variáveis no ensaio de
dissolução intrínseca de metronidazol / Michele Georges
Issa. -- São Paulo, 2011.
78p.

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

1. Medicamento : Tecnologia farmacêutica I. T. II. Ferraz,
Humberto Gomes, orientador.

615.4 CDD

Michele Georges Issa

Avaliação do impacto de diferentes variáveis no ensaio de dissolução
intrínseca de metronidazol

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz
orientador/presidente

1.º examinador

2.º examinador

São Paulo, _____ de _____.

Ao meu pai Georges,
que apesar de tão pouco tempo juntos,
tenho a alegria de carregar o seu nome em cada conquista.

À minha mãe Huguette,
pelo seu imenso esforço na minha criação e educação,
pelo seu amor e apoio incondicionais.

À minha irmã Marie e
aos meus sobrinhos Patricia, Felipe e Alexandre,
por sempre estarem ao meu lado.

Ao meu esposo Marcelo,
pela grande contribuição na conclusão desse trabalho e principalmente,
pelo seu amor e paciência durante esse período.

Obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz pelo exemplo, confiança e oportunidade de todo o aprendizado ao longo desses anos.

À Profa. Dra. Letícia Norma Carpentieri Rodrigues pela sua contribuição com as análises de difratometria de Raios X e infravermelho. Pela sua disponibilidade de sempre, amizade e confiança.

Ao Professor Dr. Roberto Guardani pela disponibilidade do equipamento Malvern Mastersizer e pelos seus ensinamentos sobre análise de tamanho de partícula.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Farmácia, da secretaria de Pós-Graduação e da Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela atenção sempre dispensada.

À Micro Service Ind. Química Ltda. pela matéria-prima gentilmente cedida para a realização desse trabalho.

Aos queridos Eremita Santos, Bruno Camardella e Cintia Alves pelo auxílio nas análises de microscopia óptica, pelo companheirismo e alegria.

Ao pós-doutorando José Eduardo Gonçalves pela disponibilidade e contribuição nas análises de microscopia óptica.

Ao Fagner Magalhães pela imensa ajuda no preparo dos meios de dissolução.

Aos colegas do grupo de pesquisa Leandro Giorgetti, Roxana Flores, Ana Paula Zerbini, Felipe Nambu, Ana Lucia Nobusa, Arthur Lopes Jr., Fábio Ikuno, Missael Silva e Vanessa Paiva pelas valiosas discussões e apoio.

Aos colegas e professores do Laboratório de Farmacotécnica Doralice Santos e Edgar Muniz, Profa. Dra. Vladi Consiglieri, Profa. Dra. Cristina Serra e Prof. André Baby pelo apoio e incentivo.

Aos colegas de pós-graduação Gabriele Ruas, André Dezzani, Thaisa Pereira, Robson Gama, Tatiana Balogh e Marize Gouveia pela convivência e amizade.

Aos meus amigos de Faculdade Ana Paula Darini, Camila Achur, Fernando Lopes, Camila Testa e Selma Oliveira pela torcida e apoio nas minhas escolhas.

Às amigas da Libbs, Patricia Kachan, Fabiana Moskovici, Sandra Rigoletto, Adriana Lara, Aline Arita e Fernanda Pereira pelo aprendizado e amizade.

Às amigas Olga Alexopoulus, Elaine Moraes e Katia Nami, pelos momentos compartilhados, pelas nossas longas conversas, pelo apoio e torcida para que tudo desse certo.

Aos amigos Patricia Rivas, Tércio Martins, Vivian Zague, Claudinéia Pinto, Andrea Takahashi e Janisse Miranda, pelo incentivo, carinho e alegrias em todos os momentos.

Às amigas Katherine Ruz, Daniella Pimentel e Adriana Duarte por me incentivarem a sempre seguir em frente.

Expresso meu profundo agradecimento a todos que de certa forma contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

ISSA, M. G. **Avaliação do impacto de diferentes variáveis no ensaio de dissolução intrínseca de metronidazol.** 2011. 78p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o impacto de diferentes variáveis no ensaio de dissolução intrínseca de metronidazol. Inicialmente, as amostras, com diferentes graus de micronização, foram submetidas à caracterização físico-química, sendo realizados ensaios de solubilidade, tamanho de partícula, análise térmica (DSC/ TG), infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), difratometria de raios X (DRX), análise de área superficial pelo método BET, microscopia óptica, densidade verdadeira e densidade compactada. Na sequência, foram realizados os ensaios de dissolução intrínseca segundo um planejamento experimental do tipo fatorial fracionado, sendo cada fator avaliado em três níveis. Para o delineamento, utilizou-se o programa Statistica 8.0. e os fatores estudados foram: velocidade de rotação, pressão utilizada na formação do compactado do fármaco, meio de dissolução e grau de micronização. Os resultados mostraram alteração nas propriedades reológicas do material conforme o aumento do grau de micronização, enquanto as demais propriedades não foram afetadas. Entre os fatores estudados no delineamento, a velocidade de rotação e o meio de dissolução, foram aqueles que exerceram influência significativa na dissolução intrínseca do metronidazol. Embora a solubilidade do fármaco não sofra influência do tamanho de partícula, valores superiores foram observados em HCl 0,1 M, meio em que também foram obtidas as mais elevadas velocidades de dissolução intrínseca (VDIs).

Palavras Chave: Sistema de Classificação Biofarmacêutica. Dissolução intrínseca. Metronidazol. Micronização. Solubilidade.

ABSTRACT

ISSA, M. G. **Evaluation of the impact of different variables in the intrinsic dissolution test for metronidazole.** 2011. 78p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The purpose of this study is to evaluate the impact of different variables in the intrinsic dissolution test of metronidazol. Initially, the samples, with different levels of micronization, underwent physicochemical characterization, whereby they were tested for solubility, particle size, thermal analysis (DSC/TG), Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, X-ray diffractometry (DRX), surface area analysis by the BET method, optical microscopy, true density and tapped density. Then, intrinsic dissolution tests were carried out according to fractional factorial experimental planning, with each factor being evaluated on three levels. The Statistica 8.0 software program was used for design, and the factors studied were: rotational velocity, pressure used in the formation of the compressed drug, dissolution medium and level of micronization. The results indicated alterations in the rheological properties of the material, as the level of micronization increased, while the remaining properties were unaffected. Among the factors studied in the design, the rotation speed and the dissolution medium were the factors that exercised the most significant influence on the intrinsic dissolution of metronidazol. Although the solubility of the drug is not influenced by particle size, higher values were observed in HCl 0.1 M, the medium in which the highest intrinsic dissolution rates (IDRs) were also obtained.

Keywords: Biopharmaceutics Classification System. Intrinsic dissolution. Metronidazol. Micronization. Solubility.

SUMÁRIO

Capítulo 1: Dissolução intrínseca como ferramenta para a avaliação da solubilidade de fármacos de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica	12
RESUMO.....	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA (SCB)	16
2.1. MÉTODOS UTILIZADOS PARA DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE E PERMEABILIDADE DE FÁRMACOS.....	21
2.1.1. Solubilidade.....	21
2.1.2. Permeabilidade.....	21
2.2. EXTENSÃO DO SCB	22
3. DISSOLUÇÃO INTRÍNSECA.....	23
3.1. APARATOS UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DA VDI	25
3.1.1. Sistema de disco rotativo	26
3.1.2. Sistema de disco fixo.....	26
3.2. CÁLCULO DA VDI E ANÁLISE DOS DADOS OBTIDOS NO ENSAIO.....	29
3.3. DETERMINAÇÃO DA CLASSE DA SOLUBILIDADE PELO VALOR DE VDI	30
3.4. SOLUBILIDADE <i>VERSUS</i> DISSOLUÇÃO INTRÍNSECA.....	32
4. CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
Capítulo 2: Influência da granulometria nas propriedades físico-químicas do metronidazol.....	39
RESUMO.....	40
1. INTRODUÇÃO	41
2. MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1. MATERIAL	42

2.1.1. Fármaco	42
2.2. MÉTODOS	43
2.2.1. Ensaio de solubilidade	43
2.2.2. Análise de tamanho de partícula	43
2.2.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	44
2.2.4. Análise termogravimétrica (TG) e termogravimetria derivada (DTG)	44
2.2.5. Infravermelho por transformada de Fourier (FTIV)	45
2.2.6. Difratometria de raios – x no estado sólido (DRX)	45
2.2.7. Análise de área superficial	45
2.2.8. Densidade verdadeira	45
2.2.9. Microscopia óptica	45
2.3.0. Avaliação do fluxo dos pós	46
2.3.0.1. Densidade compactada.....	46
2.3.0.2. Índice de compressibilidade (IC) razão de Hausner (RH)	46
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4. CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

Capítulo 3: Avaliação do impacto de diferentes variáveis na dissolução intrínseca de metronidazol	61
--	----

RESUMO	62
1. INTRODUÇÃO	63
2. MATERIAL E MÉTODOS	65
2.1. MATERIAL	65
2.1.1. Fármaco	65
2.2. MÉTODOS	65
2.2.1. Planejamento experimental	65

2.2.2. Dissolução intrínseca	67
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4. CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

ANEXOS

- I – Cópia do documento Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/ Doutorado**
- II – Currículo Lattes**
- III – Ficha de Aluno atualizada**

Capítulo 1

Dissolução intrínseca como ferramenta para a avaliação da solubilidade de fármacos de acordo com o sistema de classificação biofarmacêutica

RESUMO

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) é uma ferramenta criada para dividir os fármacos em diferentes grupos conforme as suas características de solubilidade e permeabilidade. Pela combinação desses fatores com parâmetros fisiológicos, é possível obter o panorama de absorção de um fármaco pelo trato gastrointestinal, contribuindo assim, para a redução de custos e tempo no processo de desenvolvimento de um medicamento, bem como na diminuição da exposição de indivíduos nos estudos *in vivo*. A obtenção da solubilidade é baseada na determinação do equilíbrio sob condições de pH fisiológico, enquanto que para a avaliação da permeabilidade, diferentes métodos podem ser empregados. Por outro lado, a velocidade de dissolução intrínseca (VDI), que é definida como a velocidade de dissolução de uma substância pura sob condições constantes de temperatura, pH e área superficial, entre outras, pode apresentar maior correlação com a dinâmica da dissolução *in vivo* do que o ensaio de solubilidade. O presente capítulo teve como finalidade abordar a utilização do ensaio de dissolução intrínseca como ferramenta na determinação da solubilidade de fármacos, no âmbito do Sistema de Classificação Biofarmacêutica.

1. INTRODUÇÃO

A biodisponibilidade de um determinado fármaco contido em sua forma farmacêutica é um aspecto de grande importância para o sucesso do tratamento, que depende de uma série de fatores, incluindo características físico-químicas da formulação e o estado fisiológico do trato gastrointestinal (ZHU; ZHOU; SEITZ, 2009).

Dentre os aspectos relevantes, destacam-se propriedades que envolvem o processo de absorção: biofarmacotécnicas (solubilidade, dissolução, estabilidade química, permeabilidade e efeito de primeira passagem), farmacocinéticas (depuração renal, meia-vida biológica, ligação a proteínas e volume de distribuição), farmacotécnicas (formulação e forma farmacêutica) e fisiológicas (pH, enzimas, motilidade intestinal e variabilidade inter-individual), que controlam a velocidade e a extensão do fármaco para alcançar o sítio de ação (DOKOUMETZIDIS; MACHERAS, 2006; PANCHAGNULA; THOMAS, 2000; PELKONEN; BOOBIS; GUNDERT-REMY, 2001).

Muitas indústrias farmacêuticas têm levado em consideração as propriedades de solubilidade e permeabilidade, além de parâmetros físico – químicos, na escolha de candidatos a novos fármacos. Essa avaliação é conhecida como uma triagem (“screening” biofarmacotécnico), na etapa inicial do desenvolvimento, que tem ajudado a diminuir o número de moléculas novas a serem trabalhadas nas etapas seguintes, com significativa redução de custos (LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004; PANCHAGNULA; THOMAS, 2000; VARMA *et al.*, 2004).

Para facilitar esse trabalho, em 1995 foi proposto o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), elaborado por Amidon e colaboradores. Esse sistema considera que a dissolução e permeabilidade intestinal da substância ativa, são os parâmetros fundamentais na velocidade e extensão da absorção. Os fármacos são organizados em quatro classes conforme as características solubilidade e permeabilidade (AMIDON *et al.*, 1995; LENNERNÄS; ABRAHAMSSON, 2005; LIPKA; AMIDON, 1999; LÖBENBERG; AMIDON, 2000).

Diferentes métodos podem ser utilizados para a avaliação da solubilidade, permeabilidade intestinal e dissolução *in vitro* na classificação de fármacos segundo

o SCB e alguns deles são recomendados pelo Food and Drug Administration (FDA) (LIPKA; AMIDON, 1999; UNITED STATES, 2000).

Para a determinação da solubilidade do fármaco, recomenda-se a avaliação do equilíbrio da solubilidade sob condição de pH fisiológico, ou seja, esse valor deve ser determinado à temperatura de 37 ± 1 °C, em diferentes soluções, variando-se a faixa de pH de 1,0 a 7,5. A classe da solubilidade é obtida calculando-se o volume de solução necessário para dissolver a maior dose do medicamento em todas as faixas de pH avaliadas (UNITED STATES, 2000).

O método utilizado é o da solubilidade de fase, onde um excesso de fármaco é colocado em contato direto com a solução. No entanto, levando-se em consideração que nas etapas iniciais de desenvolvimento, geralmente na etapa de pré-formulação, a quantidade de material disponível muitas vezes é restrita, a realização desse estudo pode ser inviabilizada (RAO; SANGHVI; ZHU,2009; STEELE, 2001).

Outro fator a ser considerado é a dificuldade na determinação correta da solubilidade, seja pelas variáveis experimentais, como variação de temperatura, filtração e quantidade de material ou fatores inerentes a própria substância, que podem afetar o resultado e gerar uma alta dispersão dos dados. Entre esses fatores, podem ser citados alterações de forma cristalina (solvatos, hidratos e polimorfos) ou formação de sal durante o ensaio (BAKA; COMER; TAKÁCS-NOVÁK, 2007; RAO; SANGHVI; ZHU,2009; YU *et al.*, 2004).

Uma alternativa que vem sendo discutida nos últimos anos para a determinação da solubilidade é o ensaio de dissolução intrínseca, onde a classe da solubilidade a qual certo fármaco pertence, seria determinada pelo valor da velocidade de dissolução intrínseca (VDI). Para a realização desse ensaio, a quantidade requerida de material é bem inferior em relação ao ensaio de solubilidade e possíveis interferências nos resultados por fatores como transição de forma cristalina ou formação de sal, podem ser verificadas pela presença de curvatura nos gráficos obtidos (SEHIC *et al.*,2010; STEELE, 2001; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009; YU *et al.*, 2002, 2004; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2009).

Sendo assim, o objetivo da presente revisão foi abordar a utilização do ensaio de dissolução intrínseca para avaliação da solubilidade de fármacos no contexto do Sistema de Classificação Biofarmacêutica.

2. SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA (SCB)

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica foi desenvolvido para promover a utilização do conhecimento científico na avaliação das substâncias ativas, como uma predição do comportamento *in vivo*, auxiliando as atividades das agências regulatórias na aprovação de medicamentos, bem como as indústrias farmacêuticas na obtenção de seus registros.

O objetivo principal do SCB foi a criação de uma ferramenta regulatória para a substituição de alguns ensaios de bioequivalência por testes de dissolução *in vitro*, possibilitando a redução dos custos e tempo no processo de desenvolvimento de um medicamento, além da exposição desnecessária de indivíduos nos estudos *in vivo*. Dados observados por Cook (2004) indicam que a utilização do SCB nas etapas de desenvolvimento pode refletir em considerável economia de recursos para as indústrias farmacêuticas (LENNERNÄS; ABRAHAMSSON, 2005; LIPKA; AMIDON, 1999).

Atualmente, o SCB tem sido empregado para a isenção de testes clínicos em formulações de uso oral, principalmente para aquelas de liberação imediata, enquanto que para formulações de liberação modificada, a sua utilização ainda vem sendo estudada (KU, 2008; LENNERNÄS; ABRAHAMSSON, 2005; LIPKA; AMIDON, 1999).

É importante considerar que a resposta clínica decorrente da administração oral de determinado medicamento, somente ocorrerá após uma série de eventos, sendo dessa forma um processo complexo, que pode ser afetado por fatores relacionados ou não ao indivíduo (KARALIS *et al.*, 2008; MARTINEZ; AMIDON, 2002).

Conforme observado na Figura 1, a dissolução é pré-requisito para a absorção de fármacos administrados por via oral e, conseqüentemente, para a sua resposta clínica. Sendo a dissolução evento dependente da solubilidade do fármaco e a absorção, dependente da permeabilidade intestinal, a união dessas propriedades resulta nos principais fatores que governam a velocidade e a extensão da absorção de um fármaco a partir de uma formulação sólida de administração oral, ou seja, a sua biodisponibilidade (AMIDON *et al.*, 1995; LIPKA; AMIDON, 1999; UNITED STATES, 2000; VARMA *et al.*, 2004).

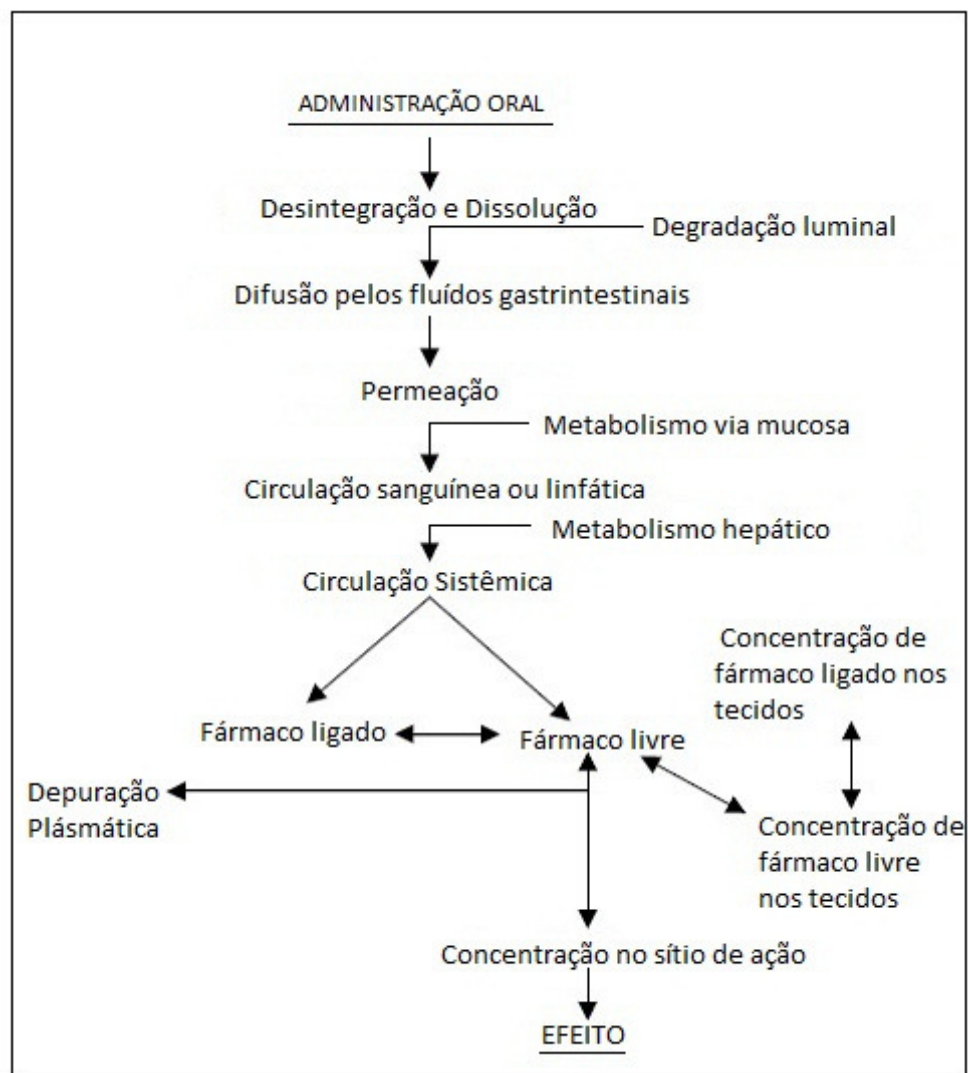


Figura 1 – Eventos que ocorrem desde a administração do medicamento até a ação do fármaco no sítio de ação (MARTINEZ; AMIDON, 2002).

Baseado nesse conceito, no SCB são definidos três números adimensionais para caracterizar as substâncias e a combinação deles com os parâmetros físico-químicos e fisiológicos, representa o panorama da absorção de um fármaco pelo

trato gastrointestinal (AMIDON *et al.*, 1995; LIPKA; AMIDON, 1999; LÖBENBERG; AMIDON, 2000; VARMA *et al.*, 2004):

- ✓ Número de Dose (Do): Razão da concentração da dose pela solubilidade.

$$D_o = \frac{M / V_o}{C_s}$$

(Equação 1)

$M = dose$
 $V_o = volume \text{ de } \acute{a}gua \text{ ingerido para administração do medicamento (250 mL)}$
 $C_s = solubilidade$

- ✓ Número de Dissolução (Dn): Tempo necessário para dissolução.

$$D_n = \left(\frac{3D}{r^2} \right) \left(\frac{C_s}{\rho} \right) \langle T_{si} \rangle = \frac{\langle T_{si} \rangle}{T_{diss}}$$

(Equação 2)

$D = coeficiente \text{ de } difusão$
 $r = raio \text{ inicial da partícula do fármaco}$
 $C_s = solubilidade$
 $\rho = densidade$
 $T_{si} = tempo \text{ de trânsito intestinal}$
 $T_{diss} = tempo \text{ de dissolução}$

- ✓ Número de Absorção (An): Tempo necessário para absorção da dose administrada.

$$A_n = \frac{P_{eff}}{R} x \langle T_{si} \rangle = \frac{\langle T_{si} \rangle}{T_{abs}}$$

(Equação 3)

$P_{eff} = permeabilidade$
 $R = raio \text{ do intestino}$
 $T_{si} = tempo \text{ de trânsito intestinal}$
 $T_{abs} = tempo \text{ de absorção}$

Assim, para que a absorção do fármaco seja completa, esta deve apresentar $D_o < 1$, $D_n > 1$ e $A_n > 1$. Pela definição desses números, fica claro que a solubilidade e a permeabilidade são os parâmetros chave no controle da absorção e, no SCB, os fármacos são divididos em quatro classes (Figura 2) conforme a intensidade

(alta/baixa) dos parâmetros de solubilidade e permeabilidade (AMIDON *et al.*, 1995; MARTINEZ; AMIDON, 2002; VARMA *et al.*, 2004).

Para que um fármaco seja considerado de alta solubilidade, a sua maior dose deve ser solúvel em volume igual ou menor que 250 mL de um meio aquoso, em pH entre 1,0 e 7,5. O volume estimado de 250 mL é baseado nos protocolos de estudos de bioequivalência, que prescrevem a administração do medicamento a voluntários em jejum com um copo de água (UNITED STATES, 2000; YU *et al.*, 2002).

A classificação dos fármacos em relação à permeabilidade é baseada indiretamente na extensão da absorção em humanos, pela avaliação da fração da dose absorvida ou diretamente, pela medida de velocidade de transferência de massa através da membrana intestinal humana ou de membranas epiteliais. O fármaco é considerado de alta permeabilidade quando apresenta pelo menos 90% de absorção da dose administrada (UNITED STATES, 2000; YU *et al.*, 2002).

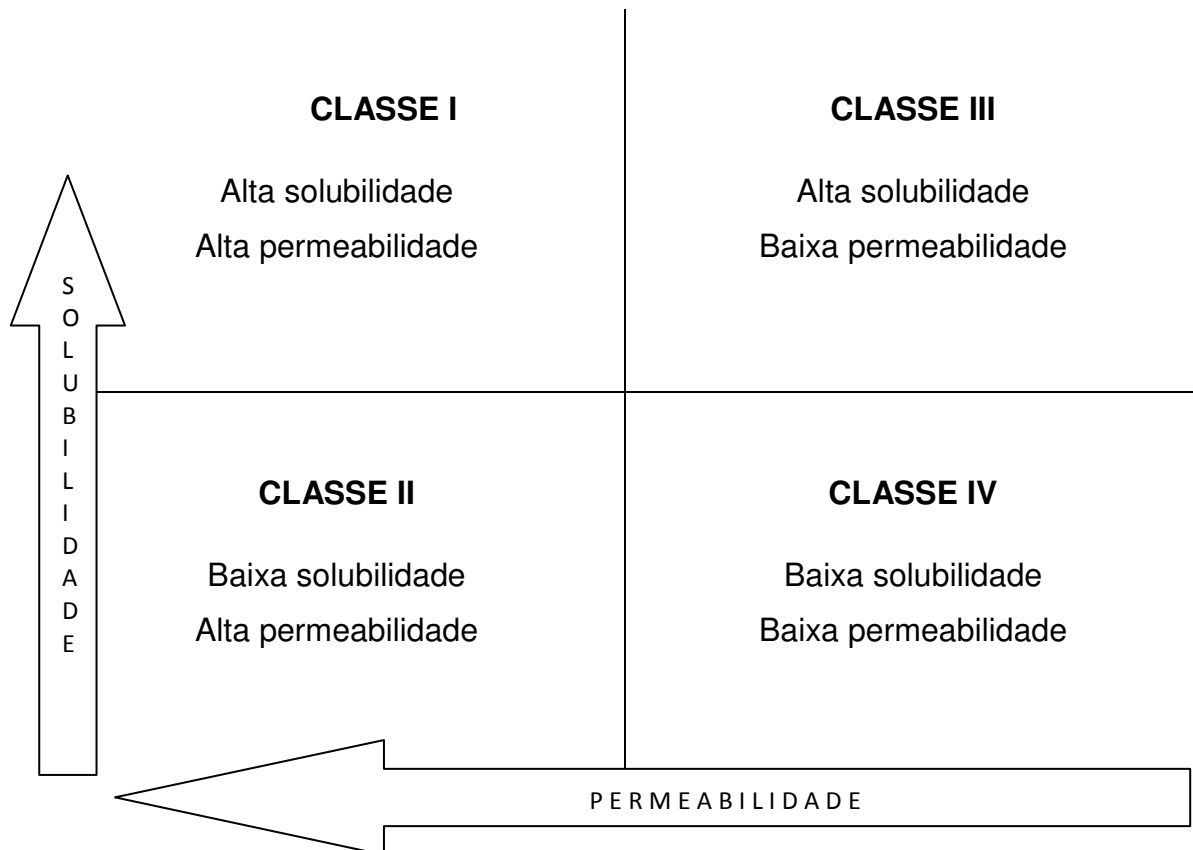


Figura 2 - Sistema de Classificação Biofarmacêutica (AMIDON *et al.*, 1995).

De acordo com a Figura 2, os fármacos podem ser divididos em quatro grupos, conforme a sua solubilidade e permeabilidade, apresentando cada um desses, características peculiares, conforme discutido a seguir.

- ✓ Classe I: Os fármacos dessa classe possuem boa permeabilidade, a menos que sejam instáveis no trato gastrointestinal ou sofram metabolismo de primeira passagem. Como também possuem boa solubilidade, o fator limitante para a sua absorção é o tempo de esvaziamento gástrico. As formas sólidas de liberação imediata que contêm fármacos com essas características, são potenciais candidatas à isenção de estudos de bioequivalência (AMIDON *et al.*, 1995; ASHFORD, 2002; LIPKA; AMIDON, 1999).
- ✓ Classe II: Apesar da boa permeabilidade, os fármacos pertencentes a essa classe, apresentam problemas de solubilidade e, dessa maneira, a dissolução torna-se o fator limitante para a absorção. A utilização de formulações bem delineadas ou ferramentas farmacotécnicas como a complexação do fármaco com ciclodextrinas ou redução do tamanho de partícula, entre outras, pode facilitar a dissolução e conseqüentemente a biodisponibilidade oral. No entanto, os ensaios de dissolução *in vitro* devem refletir ao máximo as características da dissolução *in vivo* (AMIDON *et al.*, 1995; ASHFORD, 2002).
- ✓ Classe III: É constituída por fármacos que apresentam boa solubilidade e permeabilidade reduzida, sendo esta última, considerada o fator limitante para a absorção. É importante que as formas farmacêuticas que contenham esse tipo de fármaco liberem-no de modo rápido, a fim de maximizar o tempo de contato com o epitélio intestinal, porém, a absorção poderá ser afetada pela influência de variáveis fisiológicas, tais como o tempo de residência intestinal e o conteúdo luminal (AMIDON *et al.*, 1995; ASHFORD, 2002).
- ✓ Classe IV: É a classe que mais desafia o trabalho dos pesquisadores, pois esses fármacos apresentam problemas de biodisponibilidade oral, uma

vez que tanto a solubilidade como a permeabilidade são reduzidas (AMIDON *et al.*, 1995; ASHFORD, 2002).

2.1. MÉTODOS UTILIZADOS PARA DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE E PERMEABILIDADE DE FÁRMACOS

2.1.1. Solubilidade

A avaliação da solubilidade para a classificação biofarmacêutica da substância, baseia-se na determinação do equilíbrio sob condições de pH fisiológico. O FDA sugere que a realização do ensaio ocorra em temperatura de 37 ± 1 °C em meios aquosos variando-se a faixa de pH de 1,0 a 7,5. O tradicional método de solubilidade de fase é o mais indicado, podendo ser substituído por outro, como por exemplo, a titulação, desde que seja capaz de fornecer o equilíbrio de solubilidade do fármaco (UNITED STATES, 2000; VARMA *et al.*, 2004; YU *et al.*, 2002).

2.1.2. Permeabilidade

Existem diferentes métodos que podem ser utilizados para a classificação das substâncias conforme a permeabilidade, sendo que alguns envolvem o estudo de parâmetros farmacocinéticos em humanos e outros a determinação da permeabilidade do trato gastrointestinal (UNITED STATES, 2000).

Conforme o FDA, entre os métodos empregados para o estudo farmacocinético, encontram-se o estudo de balanço de massas com a utilização de isótopos estáveis ou substâncias marcadoras e os estudos de biodisponibilidade absoluta, sendo a absorção do fármaco avaliada em comparação com a absorção de uma substância referência. Entre os métodos de permeabilidade intestinal estão: estudos de perfusão intestinal em humanos; estudos *in vivo* ou *in situ* de perfusão intestinal em modelos animais; estudos de permeação *in vitro* em tecido intestinal humano ou animal e estudos de permeação *in vitro* em monocamadas de células epiteliais (UNITED STATES, 2000).

Embora o estudo farmacocinético em humanos seja o padrão ouro para a determinação da permeabilidade, o seu uso na etapa de desenvolvimento não é viável, principalmente pela alta variabilidade, necessidade de administração através de uma formulação e pelos custos envolvidos. Dessa forma, os estudos de permeabilidade intestinal tornam-se uma alternativa interessante (VARMA *et al.*, 2004).

As técnicas *in vitro* baseadas na utilização de cultura de células têm sido muito exploradas nos últimos anos. Entre os tipos celulares, as da linha Caco-2 são as mais empregadas em razão da sua similaridade com as células intestinais e pela capacidade de expressão de transportadores e enzimas intestinais (JUNG *et al.*, 2006; VARMA *et al.*, 2004).

2.2. EXTENSÃO DO SCB

Desde a sua criação, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica tem sido objeto de diversos estudos e discussões da comunidade científica, e algumas sugestões foram propostas na tentativa de tornar a classificação menos restrita e com maior aplicação (YU *et al.*, 2002).

Em relação à avaliação da solubilidade, são sugeridas a alteração da faixa de avaliação do pH de 1,0 a 7,5 para 1,0 a 6,8, considerando que o pH de 7,5 corresponde ao da região do íleo onde o fármaco já chegaria dissolvido e a alteração do volume de 250 mL para 500 mL, sendo esse um volume médio, uma vez que o volume do intestino pode variar de 50 a 1100 mL (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006; YU *et al.*, 2002).

Para a permeabilidade, tem-se sugerido a alteração do valor de 90% para 85% para fármacos de alta permeabilidade, pois pela avaliação de diferentes fármacos considerados de alta absorção, a fração da dose absorvida determinada experimentalmente tem mostrado valores inferiores a 90% (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006; YU *et al.*, 2002).

Além dessas sugestões, novos métodos para a classificação das substâncias têm sido propostos, tais como o ensaio de dissolução intrínseca para a avaliação da solubilidade e a utilização de novos tipos celulares e membranas para avaliação da

permeabilidade intestinal, assim como a utilização de métodos computacionais ou *in silico* (DOKOUMETZIDIS; VALSAMI; MACHERAS, 2007; YAZDANIAN *et al.*, 2004; YU *et al.*, 2002).

Muito embora tais sugestões sejam alvo de discussões entre pesquisadores, o FDA ainda considera o sistema como ele foi proposto inicialmente, enquanto que a Organização Mundial da Saúde (OMS) já preconiza novos critérios de avaliação (BENET *et al.*, 2008; PAPADOPOULOU *et al.*, 2008; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

3. DISSOLUÇÃO INTRÍNSECA

Skinner e Kanfer (1992) sugeriram que os principais aspectos físico-químicos pertinentes para absorção de um fármaco seriam a velocidade de dissolução intrínseca e a solubilidade. Como esses dois parâmetros são altamente dependentes de pH, a influência dos mesmos na absorção poderia ser facilmente determinada por toda a faixa de pH do trato gastrointestinal.

Por dissolução intrínseca entende-se o comportamento de dissolução de uma substância ativa pura e a determinação da sua velocidade pode ser de grande importância durante o desenvolvimento de novas moléculas, uma vez que com pequenas quantidades de material é possível realizar o teste e prever potenciais problemas (AYRES *et al.*, 2007; STEELE, 2001; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009; VIEGAS, *et al.*, 2001).

Dessa maneira, a velocidade de dissolução intrínseca (VDI) é definida como a velocidade de dissolução de uma substância ativa pura, quando são mantidas constantes as condições de área superficial, temperatura, agitação, pH e força iônica do meio. Deste modo é possível obter dados acerca da pureza química e equivalência de fármacos provenientes de diferentes fontes. O conhecimento dessas informações está relacionado com a variabilidade de matérias-primas disponíveis no mercado, resultantes de distintos processos de síntese, principalmente nas etapas finais de cristalização e que podem acarretar em diferentes tamanhos de partícula,

graus de hidratação, hábitos e formas cristalinas para um mesmo fármaco (LEHTO *et al.*, 2008; SEHIC *et al.*, 2010; VIEGAS *et al.*, 2001; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2009).

A VDI pode ser obtida empregando-se um acessório específico para tal, onde o fármaco compactado é exposto a um meio de dissolução sob uma área superficial constante, e o seu valor é expresso em $\text{mg cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ (AZARMI; ROA; LÖBENBERG, 2007; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008; PELTONEN *et al.* 2003; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009).

As aplicações do ensaio de dissolução intrínseca estão relacionadas com a sua utilização como ferramenta na caracterização de fármacos no estado sólido, como a determinação de parâmetros termodinâmicos associados à transição de fases cristalinas, graus de hidratação, investigação do fenômeno de transferência de massa no processo de dissolução, avaliação da velocidade de dissolução de um fármaco em diferentes meios (variação de pH e/ou utilização de tensoativos) e a relação entre a velocidade de dissolução de uma substância ativa e a sua forma cristalina, entre outros (BARTOLOMEI *et al.*; 2006; YU *et al.*, 2004).

Entretanto, estudos recentes têm demonstrado a utilização da VDI para a determinação da solubilidade no âmbito do Sistema de Classificação Biofarmacêutica. Como esse ensaio não está relacionado a um equilíbrio e sim à velocidade, espera-se que haja uma correlação maior com a dinâmica da dissolução *in vivo* do que o ensaio de solubilidade. Em um ensaio de solubilidade convencional, onde uma quantidade de fármaco é mantida sob agitação e temperatura constantes até a saturação da solução, a determinação da real solubilidade do material pode ser comprometida, devido às possíveis ocorrências de recristalizações durante o ensaio, que podem provocar alteração de forma cristalina, formação de hidratos e solvatos (YAZDNIAN *et al.*, 2004; YU *et al.*, 2002, 2004; ZAKERI-MILANI, 2009).

Mudanças do material na superfície do compactado durante o ensaio de dissolução intrínseca também podem ocorrer como, por exemplo, a conversão de atorvastatina amorfa em sua forma cristalina (KIM *et al.*, 2008); a transformação do sal de diclofenaco em sua forma ácida (BARTOLOMEI *et al.*, 2006); a hidratação das formas anidras de carbamazepina e teofilina (LEHTO *et al.*, 2008; SEHIC *et al.*,

2010) e a conversão da rifampicina para o polimorfo mais estável (AGRAWAL, *et al.*, 2004).

No entanto, como a velocidade de dissolução intrínseca é determinada através da correlação entre os resultados de massa dissolvida por unidade de área e os tempos de coleta, é possível realizar um monitoramento durante o ensaio e pela análise do perfil obtido (presença de curvatura positiva ou negativa), determinar a solubilidade antes da ocorrência dessas transformações (YU *et al.*, 2004; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009).

Outro aspecto bastante vantajoso da dissolução intrínseca, é a utilização de pequenas quantidades de fármaco, o que facilita o seu emprego na avaliação da solubilidade durante a etapa de pré-formulação (moléculas novas), quando quantidades mínimas de fármaco são disponibilizadas para a realização dos ensaios (STEELE, 2001; WANG; FLANAGAM, 2009).

3.1. APARATOS UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DA VDI

Dois tipos de aparatos utilizados no ensaio de dissolução intrínseca são citados em farmacopéias: o sistema de disco fixo, descrito apenas na Farmacopéia Americana e o sistema de disco rotativo, conhecido como “Wood’s apparatus”, também descrito na USP e nas farmacopéias Européia e Britânica (BRITISH PHARMACOPEIA, 2009; EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2008; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009; VIEGAS *et al.*, 2001).

A utilização do sistema de disco rotativo é mais comum, porém boa correlação dos resultados é observada em comparação com o sistema de disco fixo e até com outros sistemas não descritos em farmacopéias, mas já testados em alguns estudos para a determinação da velocidade de dissolução intrínseca, como o método da célula de fluxo e um aparato em miniatura (Mini-IDRTM) semelhante ao disco rotativo (BERGER *et al.*, 2007; LEHTO *et al.*, 2008; PELTONEN *et al.*, 2003; TSINMAN *et al.*, 2009; VIEGAS *et al.*, 2001).

Entre as características desses aparatos podem ser citadas (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009): a utilização em equipamentos de dissolução convencionais; possuem uma cavidade para a colocação do fármaco, sendo

necessário o uso de uma prensa para a formação do compactado; a superfície de exposição do fármaco é de geometria e dimensão conhecidas; os aparatos quando colocados no equipamento de dissolução, permitem que o compactado do fármaco fique exposto em um local de menor variabilidade hidrodinâmica.

A VDI sofre influência de vários fatores, que podem ser divididos em dois grupos: fatores internos e externos. Os fatores internos estão relacionados às propriedades do estado sólido do fármaco e os externos, com a área superficial, condição hidrodinâmica e composição do meio de dissolução, viscosidade, pH e força iônica do meio.

3.1.1. Sistema de disco rotativo

Esse sistema é composto por um punção de aço, matriz, haste, um anel de neoprene e a base de apoio (Figura 3a). A base possui três entradas de parafusos para a fixação da matriz e auxílio na fabricação do compactado. A matriz possui uma cavidade com diâmetro de 0,8 cm, onde o fármaco e o punção são inseridos e submetidos a uma pressão de compactação. Dessa maneira, após a separação da base, o material fica exposto na face da matriz que é acoplada na haste responsável pelo movimento (Figura 3b) (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009; VIEGAS *et al.*, 2001).

3.1.2. Sistema de disco fixo

O sistema possui um punção de aço, matriz, anel de neoprene, base de apoio e suporte (Figura 4a). O esquema de formação do compactado é semelhante ao aparato fixo, entretanto, nesse caso há necessidade de um suporte para sustentação da matriz e do punção sobre uma cuba de fundo plano, de modo que a área do fármaco fique fixa e exposta para cima, sendo o movimento rotacional de responsabilidade de uma pá do aparato dois (Figura 4b) (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009; VIEGAS *et al.*, 2001).

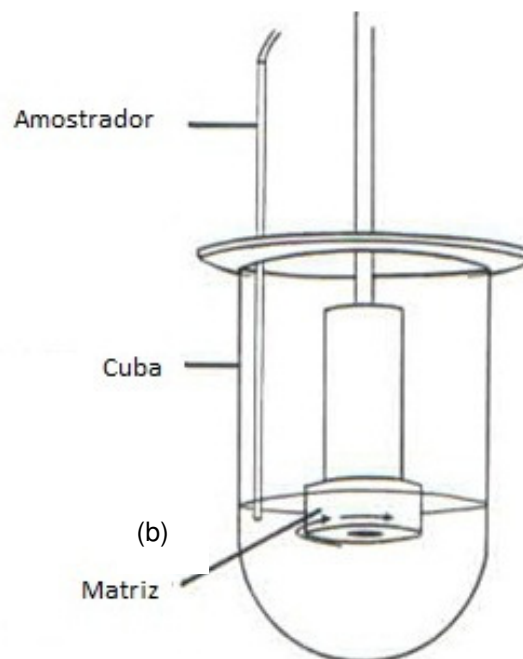
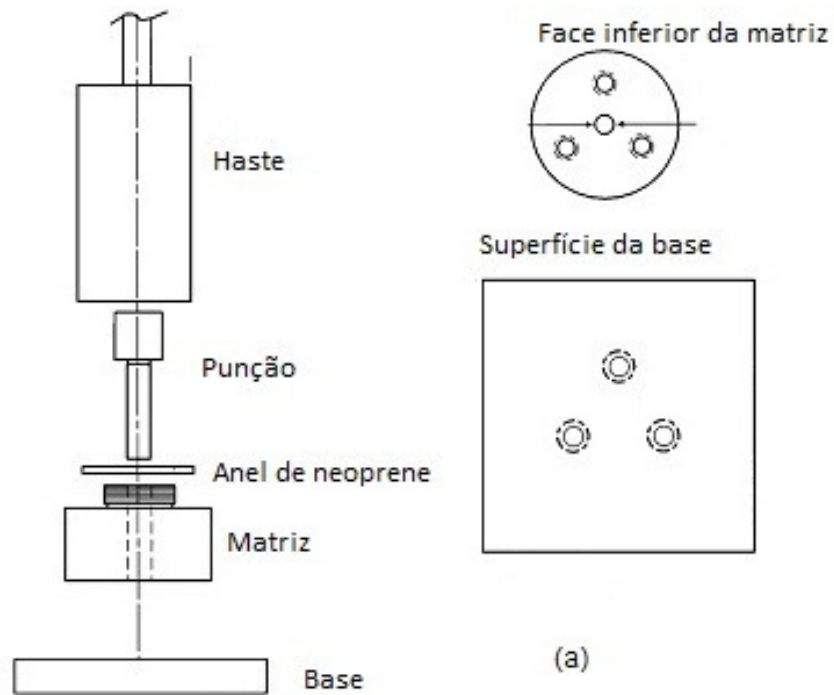


Figura 3 - Sistema de disco rotativo (aparato de Wood): (a) aparato desmontado e (b) configuração do sistema no equipamento de dissolução (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009; MAUGER, 1996).

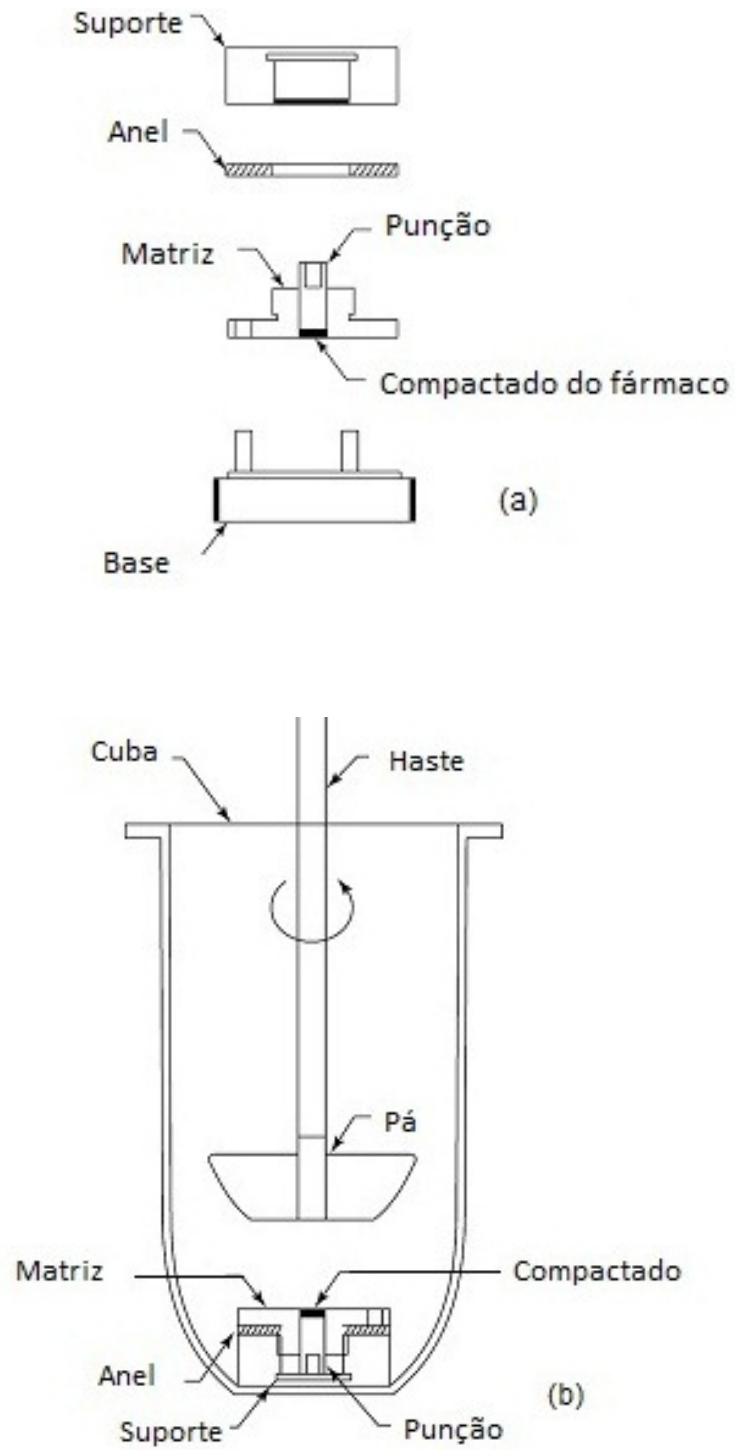


Figura 4 - Sistema de disco fixo: (a) aparelho desmontado e (b) configuração do sistema no equipamento de dissolução (USP, 2009).

3.2. CÁLCULO DA VDI E ANÁLISE DOS DADOS OBTIDOS NO ENSAIO

Para o cálculo da VDI, utiliza-se a equação derivada da equação de Noyes e Whitney, sendo retiradas desta equação, duas informações: a velocidade de dissolução, expressa geralmente pela massa de amostra dissolvida por unidade de tempo e o fluxo de dissolução, quando a área superficial é levada em consideração, expresso em velocidade de dissolução por unidade de área (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009; CARSTENSEN, 2001; YU *et al.*, 2004):

$$j = \frac{Vdc}{dt} \times \frac{1}{A} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde,

j = fluxo de dissolução ($\text{mg cm}^{-2} \text{s}^{-1}$)

V = volume do meio de dissolução (mL)

c = concentração do fármaco dissolvido no meio (mg mL^{-1})

A = área superficial da amostra (cm^2)

t = tempo (s)

Assim, quando o cálculo do fluxo de dissolução (j) é utilizado para um fármaco puro é mais comum chamá-lo de velocidade de dissolução intrínseca (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009).

Durante o ensaio, a quantidade cumulativa do fármaco dissolvida em cada intervalo de tempo deve ser corrigida considerando os volumes de amostragem retirados para leitura. Para o cálculo da VDI é necessário construir um gráfico da quantidade acumulada de fármaco dissolvido em função do tempo e, pela regressão linear dos pontos, com a obtenção da equação da reta, tem-se a velocidade de dissolução em unidade de massa por segundo, representada pelo valor do coeficiente angular. A velocidade de dissolução intrínseca é determinada dividindo-se esse valor pela área superficial do compactado em centímetros quadrados, sendo

reportada em unidade de massa $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009).

Vale lembrar que a maioria dos resultados de dissolução intrínseca encontrados na literatura é expressa em $\text{mg min}^{-1} \text{cm}^{-2}$, forma utilizada por muitos autores e indicada pela Farmacopeia Americana até 2008.

O gráfico obtido de quantidade de fármaco dissolvido em função do tempo pode apresentar curvatura (alteração da inclinação da reta) e, neste caso, deve-se considerar apenas a região linear inicial para o cálculo da velocidade de dissolução. A presença da curvatura positiva pode indicar algum problema experimental, enquanto que a negativa pode estar relacionada à transição da forma do cristal na superfície do compactado ou quando a saturação do meio de dissolução é inadvertidamente alcançada (LEHTO *et al.*, 2008; SEHIC *et al.*, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009).

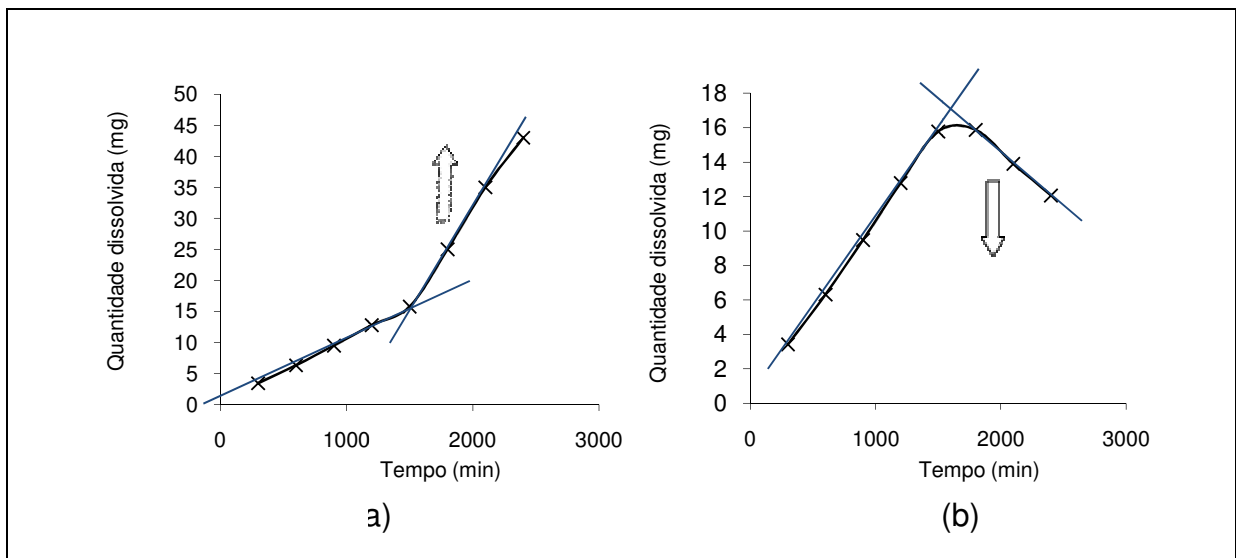


Figura 5: Curvaturas que podem aparecer no gráfico de velocidade de dissolução (a) positiva e (b) negativa.

3.3. DETERMINAÇÃO DA CLASSE DE SOLUBILIDADE A PARTIR DA VDI

Conforme mencionado anteriormente, estudos vêm sendo realizados para demonstrar a viabilidade da utilização da velocidade de dissolução intrínseca para a

determinação da classe de solubilidade no Sistema de Classificação Biofarmacêutica.

Yu e colaboradores (2004), determinaram que para fármacos onde é possível obter uma boa correlação entre a dissolução intrínseca e a solubilidade, o valor limítrofe para a divisão das classes seria $0,1 \text{ mg min}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ / $0,0017 \text{ mg cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, ou seja, fármacos com velocidade de dissolução intrínseca acima desse valor seriam considerados de alta solubilidade e velocidades abaixo desse limite, indicariam fármacos de baixa solubilidade.

Tabela 1 – Valores de VDI ($\text{mg min}^{-1} \text{ cm}^{-2}$) e classificação de solubilidade segundo o SCB de alguns fármacos conforme proposta de Yu e colaboradores (2000). Ensaio de dissolução intrínseca realizado com o sistema de disco rotativo, em 900 mL de tampão fosfato pH 6,8 sob velocidade de rotação 100 rpm.

Fármaco	VDI ($\text{mg min}^{-1} \text{ cm}^{-2}$)	Classificação de solubilidade conforme SCB
ranitidina	$43,1 \pm 0,1$	Alta
metoprolol	$27,0 \pm 0,4$	Alta
propranolol	$17,8 \pm 0,3$	Alta
nortriptilina	$6,5 \pm 0,2$	Alta
atenolol	$2,56 \pm 0,13$	Alta
nadolol	$1,44 \pm 0,04$	Alta
labetolol	$0,70 \pm 0,02$	Baixa
cetoprofeno	$0,57 \pm 0,03$	Baixa
furosemida	$0,50 \pm 0,02$	Baixa
naproxeno	$0,26 \pm 0,02$	Baixa
hidroclorotiazida	$0,11 \pm 0,01$	Baixa
piroxicam	$0,088 \pm 0,002$	Baixa
carbamazepina	$0,029 \pm 0,002$	Baixa
griseofulvina	$0,0022 \pm 0,0002$	Baixa

Recentemente, Zakeri-Milani e colaboradores (2009), em trabalho realizado com os mesmos fármacos e condições de ensaio empregados por Yu e colaboradores em 2000 (sistema rotativo, 900 mL de tampão fosfato pH 6,8 e 100 rpm), sugeriram o valor de $1 \text{ mg min}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ / $0,017 \text{ mg cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para ser tomado como base na divisão das classes de solubilidade.

Embora os valores limites indicados nos dois trabalhos sejam diferentes, provavelmente devido a diferenças nos aparatos utilizados (área superficial de fármaco exposto), a ordem de classificação das substâncias avaliadas foi a mesma. Dessa forma, para fármacos que não apresentam dose muito elevada ou muito baixa, onde não há discrepâncias entre os resultados de solubilidade e dissolução intrínseca, a VDI pode ser utilizada como ferramenta para a classificação da solubilidade (YU *et al.*, 2004; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2009).

3.4. SOLUBILIDADE *VERSUS* DISSOLUÇÃO INTRÍNSECA

Sendo a dissolução intrínseca uma alternativa viável para a determinação da classe de solubilidade, verifica-se que, conforme apresentado na Tabela 2, esse ensaio possui algumas vantagens em relação ao método da solubilidade de fase, principalmente em relação ao tempo, quantidade de material e manuseio das amostras.

Tabela 2 – Condições e fatores relacionados aos ensaios de solubilidade pelo método da solubilidade de fase e dissolução intrínseca.

Condições	Solubilidade	Dissolução intrínseca
Equipamento	Shaker (Incubadora)	Equipamento de dissolução
Aparatos	Frascos	Disco fixo/rotativo
Quantidade de material	Necessário para saturação	100 mg a 200 mg
Tempo	Até 72 h (até saturação)	De 30 min até 24h – até obtenção de uma reta.
Influência de redução da temperatura	Sim	Não
Necessidade de filtração ou centrifugação	Sim	Não
Possibilidade obtenção do resultado antes de uma transição de forma cristalina da amostra.	Não	Sim

4. CONCLUSÃO

Com a utilização do SCB na avaliação das características de solubilidade e permeabilidade dos fármacos é possível fazer uma predição do comportamento *in vivo* das substâncias, prevenindo assim, eventuais problemas de formulação e o gasto desnecessário com estudos de bioequivalência. Entre os métodos utilizados para a classificação, a obtenção da velocidade de dissolução intrínseca é uma ferramenta que vem ganhando destaque, onde, com quantidades mínimas de fármaco e menor tempo, pode-se determinar de modo mais preciso, a solubilidade das substâncias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AMIDON G. L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n.3, p. 413-420, 1995.

ASHFORD, M. Assessment of biopharmaceutical properties In: AULTON, M.E. **Pharmaceutics The Science of Dosage Form Design**, 2. ed. London: Churchill Livingstone, 2002. cap. 18, p. 253-274.

AYRES, C.; BURKE, W.; DICKINSON, P; KIRK, G.; PUGH R.; SHARMA-SINGH, G.; KITTLETY, R. Intrinsic dissolution rate determinations in early development and relevance to *in vivo* performance. **American Pharmaceutical Review**, v. 10, n. 1, p. 74-78, 2007.

AZARMI, S.; ROA, W.; LÖBENBERG, R. Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 12-21, 2007.

BAKA, E.; COMER, J. E. A.; TAKÁCS-NOVÁK, K. Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorotiazide as model compound. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, p. 335-341, 2008.

BARTOLOMEI, M.; BERTOCCHI, P.; ANTONIELLA, E; RODOMONTE, A. Physico-chemical characterisation and intrinsic dissolution studies of a new hydrate form of diclofenac sodium: comparison with anhydrous form. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p. 1105-1113, 2006.

BENET, L. Z.; AMIDON G. L.; BARENDS, D. M.; LENNERNÄS, H.; POLLI J. E.; SHAH V. P.; STAVCHANSKY, A.; YU, L. X. The use of BDDCS in classifying the permeability of marketed drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 52, n. 3, p. 483-488, 2008.

BERGER, C. M.; TSINMAN, O.; VOLOBOY, D.; LIPP, D.; STONES, S.; AVDEEF, A. Miniaturized intrinsic dissolution rate (Mini-IDRTM) measurement of griseofulvin and carbamazepine. **Dissolution Technologies**, p. 39-41, 2007.

BRITISH Pharmacopoeia, 2009. p. A310-A311.

CARSTENSEN, J. T. **Advanced Pharmaceutical Solids**, v. 110, New York: Marcel Dekker, Inc., 2001, cap. 13, p. 191-194.

DOKOUMETZIDIS, A.; MACHERAS, P. A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the biopharmaceutics classification system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 321, p. 1-11, 2006.

DOKOUMETZIDIS, A.; VALSAMI, G.; MACHERAS, P. Modelling and simulation in drug absorption processes. **Xenobiotica**, v. 37, n. 10-11, p. 1052-1065, 2007.

EUROPEAN Pharmacopoeia, 6. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2008. P. 309-311.

JUNG, S. J.; CHOI, S. O.; UM, S. Y.; KIM, J. I.; CHOO, H. Y. P.; CHOI, S. Y.; CHUNG, S. Y. Prediction of the permeability of drugs through study on quantitative structure-permeability relationship. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 469-475, 2006.

KARALIS, V.; MACHERAS, P.; PEER, A. V.; SHAH, V. P. Bioavailability and bioequivalence: Focus on physiological factors and variability. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 8, p. 1956-1962, 2008.

KIM, M.; JIN, S.; KIM, J.; PARK, H. J.; SONG, H.; NEUBERT, R. H. H., HWANG, S. Preparation, characterization and *in vivo* evaluation of amorphous atorvastatin calcium nanoparticles using supercritical antisolvent (SAS) process. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 454-465, 2008.

KU, M. S. Use of the biopharmaceutical classification system in early drug development. **The AAPS Journal**, v. 10, n. 1, p. 208-212, 2008.

LEHTO, P.; AALTONEN, J.; NIEMELÄ, P.; RANTANEN, J.; HIRVONEN, J.; TANNINEN, V. P.; PELTONEN, L. Simultaneous measurement of liquid-phase and solid-phase transformation kinetics in rotating disc and channel flow cell dissolution devices. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, p. 66-72, 2008.

LENNERNÄS, H. ABRAHAMSSON, B. The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, p. 273-285, 2005.

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.

LIPKA, E.; AMIDON, G. L.; Setting bioequivalence requirements for drug development based on preclinical data: optimizing oral drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 62, p. 41-49, 1999.

LÖBENBERG, R.; AMIDON, G.L. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 3-12, 2000.

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

MAUGER, J. W. Physicochemical and fluid mechanical factors related to dissolution testing. **Dissolution Technologies**, p. 7-19, 1996.

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

PAPADOPOULOU, V.; VALSAMI, G.; DOKOUMETZIDIS, A.; MACHERAS, P. Biopharmaceutics classification systems for new molecular entities (BCS-NMEs) and marketed drugs (BCD-MD): Theoretical basis and practical examples. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 361, p. 70-77, 2008.

PELKONEN, O.; BOOBIS, A.; GUNDERT-REMY, U. *In vitro* prediction of gastrointestinal absorption and bioavailability: an experts`meeting report. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 57, p. 621-629, 2001.

PELTONEN, L.; LILJEROTH, P.; HEIKKILÄ, T.; KONTTURI, K.; HIRVONEN, J. Dissolution testing of acetylsalicylic acid by a channel flow method-correlation to USP basket and intrinsic dissolution methods. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 19, p. 395-401, 2003.

RAO, V. M.; SANGHVI, R.; ZHU, H. Solubility of pharmaceutical solids In: YIHONG Q.; CHEN Y.; ZHANG. G. Z. Z.; LIU L.; PORTER, W. **Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice**, 1 ed., Burlington: Elsevier, 2009, cap. 1, p. 3-22.

SEHIC, S.; BETZ, G.; HADZIDEDIC, S.; EL-ARINI, S. K.; LEUENBERGER, H. Investigation of intrinsic dissolution behavior of different carbamazepine samples. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 386, p. 77-90, 2010.

SKINNER, M.; KANFER, I. Intrinsic dissolution rate and solubility studies on josamycin, a macrolide antibiotic, **International Journal of Pharmaceutics**, 88, 151-158, 1992.

STEELE, G. Preformulation predictions from small amounts of compound as an aid to candidate drug selection. In: GIBSON, M. **Pharmaceutical Preformulation and Formulation**. Florida: Taylor & Francis, 2001.

TSINMAN, K.; AVDEEF, A.; TSINMAN O.; VOLOBOY, D. Powder dissolution method for estimating rotating disk intrinsic dissolution rates of low solubility drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 9, p. 2093-2100, 2009.

UNITED States Pharmacopeia. 32. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2009. p. 549-552.

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, p. 1-13.

VARMA M. V. S.; KHANDAVILLI, S.; ASHOKRAJ, Y.; JAIN, A.; DHANIKULA, A.; SOOD, A.; THOMAS, N. S.; PILLAI, O.; SHARMA, P.; GANDHI, R.; AGRAWAL, S.; NAIR, V.; PANCHAGNULA, R. Biopharmaceutic classification system: a scientific framework for pharmacokinetic optimization in drug research. **Current drug Metabolism**, v. 5, p. 375-388, 2004.

VIEGAS, T. X.; CURATELLA, R. U.; WINKLE, L. L. V.; BRINKER, G., Measurement of intrinsic drug dissolution rates using two types of apparatus, **Pharmaceutical Technology**, v.6, p.44 – 53, 2001.

WANG, J.; FLANAGAN, D. R. Fundamentals of dissolution In: YIHONG Q.; CHEN Y.; ZHANG. G. Z. Z.; LIU L.; PORTER, W. **Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice**, 1 ed., Burlington: Elsevier, 2009, cap. 13, p. 309-316.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Proposal to waive *in vivo* bioequivalence requirements for WHO model list of essential medicines immediate-release, solid oral dosage forms. Geneva, 2006. WHO technical Report series, n. 937, p. 391-415.

YAZDANIAN, M.; BRIGGS, K.; JANKOVSKY, C.; HAWI, A. The “high solubility” definition of the current FDA guidance on biopharmaceutical classification system may be too strict for acidic drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 2, p. 293-299, 2004.

YU, L. X.; CARLIN A. S.; HUSSAIN, A. S. **Feasibility studies of intrinsic dissolution rate as an alternative method to determine BCS solubility membership**. In: AAPS annual meeting. American Association of Pharmaceutical Sciences, 2000.

YU, L. X.; AMIDON, G. L.; POLLI, J. E.; ZHAO, H.; MEHTA, M. U.; CONNER, D. P.; SHAH, V. P.; LESKO, L. J.; CHEN, M.; LEE, V. H. L.; HUSSAIN, A. S. Biopharmaceutics classification system: The scientific basis for biowaiver extensions. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 7, p. 921-925, 2002.

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

ZAKERI-MILANI, P.; BARZEGAR-JALALI, M.; AZIMI, M.; VALIZADEH, H. Biopharmaceutical classification of drugs using intrinsic dissolution rate (IDR) and rat intestinal permeability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.73, p. 102-106, 2009.

ZHU, H.; ZHOU, H.; SEITZ, K. Bioavailability and bioequivalence In: YIHONG Q.; CHEN Y.; ZHANG. G. Z. Z.; LIU L.; PORTER, W. **Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice**, 1 ed., Burlington: Elsevier, 2009, cap. 15, p. 341-361.

Capítulo 2

Influência da granulometria nas propriedades físico-químicas do metronidazol

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da micronização e, conseqüentemente, da distribuição granulométrica nas propriedades físico-químicas do metronidazol. Foram realizadas análises de solubilidade, tamanho de partícula, calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria e termogravimetria derivada (TG/DTG), infravermelho por transformada de Fourier (FTIV), difratometria de raios X (DRX), análise de área superficial pelo método BET, densidade verdadeira, microscopia óptica e caracterização do fluxo dos pós. Os resultados indicaram que a solubilidade do metronidazol não é alterada pela redução do tamanho de partícula e pelo aumento da área superficial, entretanto é influenciada pelo pH. As curvas termoanalíticas apresentaram dois eventos característicos, em 160 °C e 290 °C, correspondendo, respectivamente, à fusão e à degradação do metronidazol, não havendo alteração da forma cristalina. Para os demais ensaios, com exceção do índice de compressibilidade e razão de Hausner, que indicaram que o fluxo do material é prejudicado com o processo de micronização e a densidade compactada, não foram observadas diferenças entre as amostras analisadas.

1. INTRODUÇÃO

Apesar de muitos problemas que ocorrem na etapa de produção de uma forma farmacêutica estarem relacionados com o processo de fabricação e/ou excipientes empregados, grande parte deles também é influenciada pelas características físico-químicas do fármaco utilizado. Dessa forma, é de extrema importância a avaliação das propriedades físico-químicas do fármaco a ser manipulado, bem como o seu impacto no comportamento do produto final (CARSTENSEN, 2001).

A chamada etapa de pré-formulação proporciona o conhecimento detalhado das propriedades de uma determinada substância, o que é essencial para minimizar problemas de formulação nos estágios finais de desenvolvimento e, principalmente, reduzir custos com o fármaco e diminuir o tempo para o medicamento chegar ao mercado (NIAZI, 2007).

Tal conhecimento é fornecido pela investigação de uma série de informações como: solubilidade, dissolução intrínseca, ponto de fusão, polimorfismo, estabilidade, microscopia, densidade, tamanho de partícula, propriedades reológicas do pó e compatibilidade com excipientes (ALLEN JR., 2008; WELLS, 2002).

Por outro lado, a micronização é uma prática muito utilizada na indústria farmacêutica para a redução do tamanho das partículas de fármacos e homogeneização da granulometria do lote. Entretanto, algumas alterações no material podem ocorrer, como a perda da estabilidade da molécula e amorfização da amostra, pela energia envolvida no processo, bem com a alteração das características de fluxo do pó (CARSTENSEN, 2001; GOVINDARAJAN; SURYJANARAYANAN, 2006; KIM *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2008).

Além disso, observa-se na prática que com a redução do tamanho das partículas de um fármaco, é possível aumentar a sua solubilidade (ALLEN JR., 2008).

O metronidazol, cuja estrutura química é apresentada na Figura 1, é um fármaco antimicrobiano, empregado no combate às formas intestinais e extra-

intestinais de amebíase e tricomoníase, além de infecções bacterianas. É classificado como fármaco pertencente à classe I do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), ou seja, apresenta alta solubilidade e alta permeabilidade (IDKAIDEK; NAJIB, 2000; LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004).

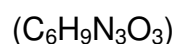
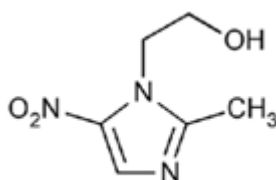


Figura 1 - Estrutura química do metronidazol (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009).

Em relação à forma cristalina, não é relatada a ocorrência de polimorfismo, sendo reconhecida a estrutura monoclinica para o metronidazol livre. No entanto, conforme a polaridade do solvente empregado na etapa de cristalização, três tipos distintos de hábito cristalino podem aparecer: acicular, prismático e isométrico (DI MARTINO *et al.*, 2007a).

Dessa forma, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a influência da micronização e, conseqüentemente, de diferentes granulometrias nas propriedades físico-químicas do metronidazol.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

2.1.1. Fármaco

A matéria-prima de grau farmacêutico, foi doada pela Micro Service Ind. Química Ltda., apresentando-se em três frações diferentes de tamanho de partícula: metronidazol base amostra bruta (não micronizada), metronidazol base micro 01 (amostra micronizada) e metronidazol base micro 02 (amostra submetida à dupla micronização).

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Ensaio de solubilidade

Para a avaliação da solubilidade das amostras de metronidazol utilizou-se o método da solubilidade de fase, onde um excesso do fármaco foi adicionado em 25 mL de meio para promover sua saturação. As amostras foram deixadas sob agitação a 150 rpm em incubadora orbital TE - 420 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) durante 72 horas em temperatura constante de 37 °C.

A quantificação do fármaco dissolvido em cada amostra foi realizada através da leitura em espectrofotômetro UV-Vis Cary 50 (Varian Inc. Palo Alto, CA, Estados Unidos) das absorbâncias das respectivas soluções filtradas e cálculo das concentrações obtidas pelas equações de reta geradas conforme as curvas analíticas construídas no mesmo equipamento. Para as soluções de HCl o comprimento utilizado foi de 275 nm, enquanto que para as demais soluções foi de 320 nm.

Cada amostra foi analisada em triplicata, sendo a solubilidade do fármaco avaliada em água (pH ~ 6,5) e nos meios HCl 0,1 M (pH ~ 0,9), HCl 0,01 M (pH ~ 2,0), tampão acetato pH 4,5, tampão fosfato pH 5,8, tampão fosfato pH 6,8 e tampão fosfato pH 7,2. Todas as soluções foram preparadas de acordo com a Farmacopéia Americana (UNITED STATES, 2000; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009).

2.2.2. Análise de tamanho de partícula

As análises foram realizadas em equipamento de difração de raios laser Malvern Mastersizer X (Malvern Instruments Ltd. Malvern, Worcestershire, Reino Unido) no módulo de via úmida. Para a condução das análises utilizou-se lente de 300 mm abrangendo a faixa de leitura de 1,2 µm a 600 µm e os resultados expressos por curvas de distribuição relativa dos valores obtidos.

O meio dispersante utilizado para a leitura e preparo das amostras foi uma solução aquosa saturada do fármaco. Antes da sua utilização, a solução foi filtrada para remoção do fármaco não solubilizado.

Todas as amostras foram preparadas da mesma maneira: pesando-se cerca de 1,5 gramas de metronidazol que foram colocados em 50 mL do meio dispersante e deixadas sob agitação durante cinco a dez minutos, seguida de trinta segundos de ultrassom, tempo suficiente para permitir a dispersão adequada das partículas.

2.2.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A caracterização por calorimetria exploratória diferencial foi realizada empregando-se a célula TA-2920 (TA-Instruments[®], New Castle, DE, Estados Unidos) previamente calibrada com índio metálico (ponto de fusão: 156,4 °C/ $\Delta H_{\text{fusão}}$: 28,50 J g⁻¹), no intervalo de temperatura de 25 °C a 320 °C. Cerca de 3,0 mg de amostra foram colocados em cadinho de alumínio hermeticamente fechado e submetidos à razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹ e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min⁻¹.

2.2.4. Análise termogravimétrica (TG) e termogravimetria derivada (DTG)

As curvas de TG/ DTG foram avaliadas utilizando-se cadinho de platina em analisador termogravimétrico 2950 (TA-Instruments[®], New Castle, DE, Estados Unidos) no intervalo de temperatura de 25 a 350 °C, razão de aquecimento 20 °C min⁻¹ e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 100 mL min⁻¹. A calibração do equipamento foi realizada com padrão de oxalato de cálcio sob razão de aquecimento de 20 °C min⁻¹ até 800 °C.

Para averiguar se há impacto da redução de tamanho de partícula sobre a estabilidade do metronidazol, realizou-se um estudo de cinética de degradação entre as amostras de tamanhos de partícula mais afastados, mais especificamente as amostras: bruta e micro 02. O método utilizado foi o não-isotérmico, também conhecido como método de Ozawa e descrito em CIDES *et al.* (2006), onde as amostras foram submetidas a diferentes razões de aquecimento que variaram de 2,5 °C min⁻¹ a 20,0 °C min⁻¹, sendo os valores dos picos de degradação resultantes de cada curva, utilizados nos cálculos para obtenção da energia de ativação das amostras (Ea).

Para a comparação das curvas obtidas adotou-se uma massa fixa, em torno de 14 mg, para todos os ensaios de cinética de degradação.

2.2.5. Infravermelho por transformada de Fourier (FTIV)

Os espectros de absorção na região de infravermelho foram registrados entre 400 cm^{-1} e 6000 cm^{-1} , em espectrofotômetro SCINCO S-1000 (Scinco, Seoul, Coréia do Sul), utilizando-se cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm. Para facilitar a comparação dos espectros, os resultados foram plotados em um único gráfico, com auxílio do software OriginPro 6.1.

2.2.6. Difratometria de raios – x no estado sólido (DRX)

Os difratogramas de raios – X de pó foram obtidos em um difratômetro Shimadzu, modelo XD-6000 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), operando-se nas condições de 40KV e 40 mA, com velocidade de varredura de 2° min^{-1} (em 2 theta), utilizando-se silício (Si) policristalino como padrão. Os resultados foram plotados e organizados com auxílio dos softwares “X-Pert” e OriginPro 6.1.

2.2.7. Análise de área superficial

A determinação da área superficial específica das amostras foi realizada em analisador de adsorção gasosa NOVA 2200e (Quantachrome Corporation, Boyton Beach, FL, Estados Unidos) pela metodologia de análise de superfície e porosidade de materiais sólidos (BET) sob atmosfera inerte de nitrogênio.

2.2.8. Densidade verdadeira

A densidade verdadeira das amostras foi obtida em picnômetro de gás Hélio Ultracycrometer 1000 (Quantachrome Corporation, Boyton Beach, FL, Estados Unidos), onde cerca de 1,5 a 3,0 gramas de cada amostra foram submetidas a cinco medições de volume e densidade, determinando-se ao final a densidade média.

2.2.9. Microscopia óptica

A morfologia dos cristais foi avaliada em microscópio óptico invertido Olympus CKX41(Olympus Imaging America Inc.), com iluminação proveniente de lâmpada de halogênio, sendo as imagens obtidas por meio de câmera digital Fujifilm FinePix S5100 (Fujifilm Corporation).

2.3.0. Avaliação do fluxo dos pós

A avaliação do comportamento de fluxo das amostras foi realizada pela determinação dos parâmetros densidade compactada, índice de compressibilidade (IC) e razão de Hausner (RH).

2.3.0.1. Densidade compactada

A densidade compactada (d_c) foi determinada conforme método descrito na Farmacopéia Americana (2009), onde 100 gramas de pó foram pesados e transferidos para proveta de 250 mL após a tamisação. Inicialmente obteve-se o volume aparente (V_o) e na sequência, os volumes após 500 batidas (V_{500}) e 1250 (V_{1250}), até não haver variação de mais de 2% entre os resultados inicial e final. Dessa maneira, a densidade compactada foi calculada utilizando-se a Equação 1 e o resultado expresso em g mL^{-1} .

$$d = \frac{\text{massa}}{v_f} \quad (\text{Equação 1})$$

2.3.0.2. Índice de compressibilidade (IC) e razão de Hausner (RH)

O índice de compressibilidade e a razão de Hausner foram calculados de acordo com a Farmacopéia Americana (2009), a partir dos valores de densidade aparente (d_o) e compactada (d_c), utilizando-se as Equações 2 e 3.

$$IC(\%) = \frac{d_c - d_o}{d_c} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

IC (%) = índice de compressibilidade

d_c = densidade após a compactação

d_o = densidade aparente

$$RH = \frac{d_f}{d_o} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

RH = Razão de Hausner

d_f = densidade após a compactação

d_o = densidade aparente

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 2 mostra a solubilidade do metronidazol frente aos meios utilizados, nas três faixas de tamanho de partícula disponíveis. Os resultados variaram de $12,7 \text{ mg mL}^{-1}$ a $32,3 \text{ mg mL}^{-1}$, sendo os maiores valores encontrados para as amostras analisadas em HCl 0,1 M, em conformidade com os dados literatura, que relatam que o fármaco é uma base fraca com solubilidade elevada em valores de pH menores que 2 (WU; FASSIHI, 2005). Os demais meios resultaram em valores bastante semelhantes entre si, com exceção da água que proporcionou solubilidade um pouco mais elevada.

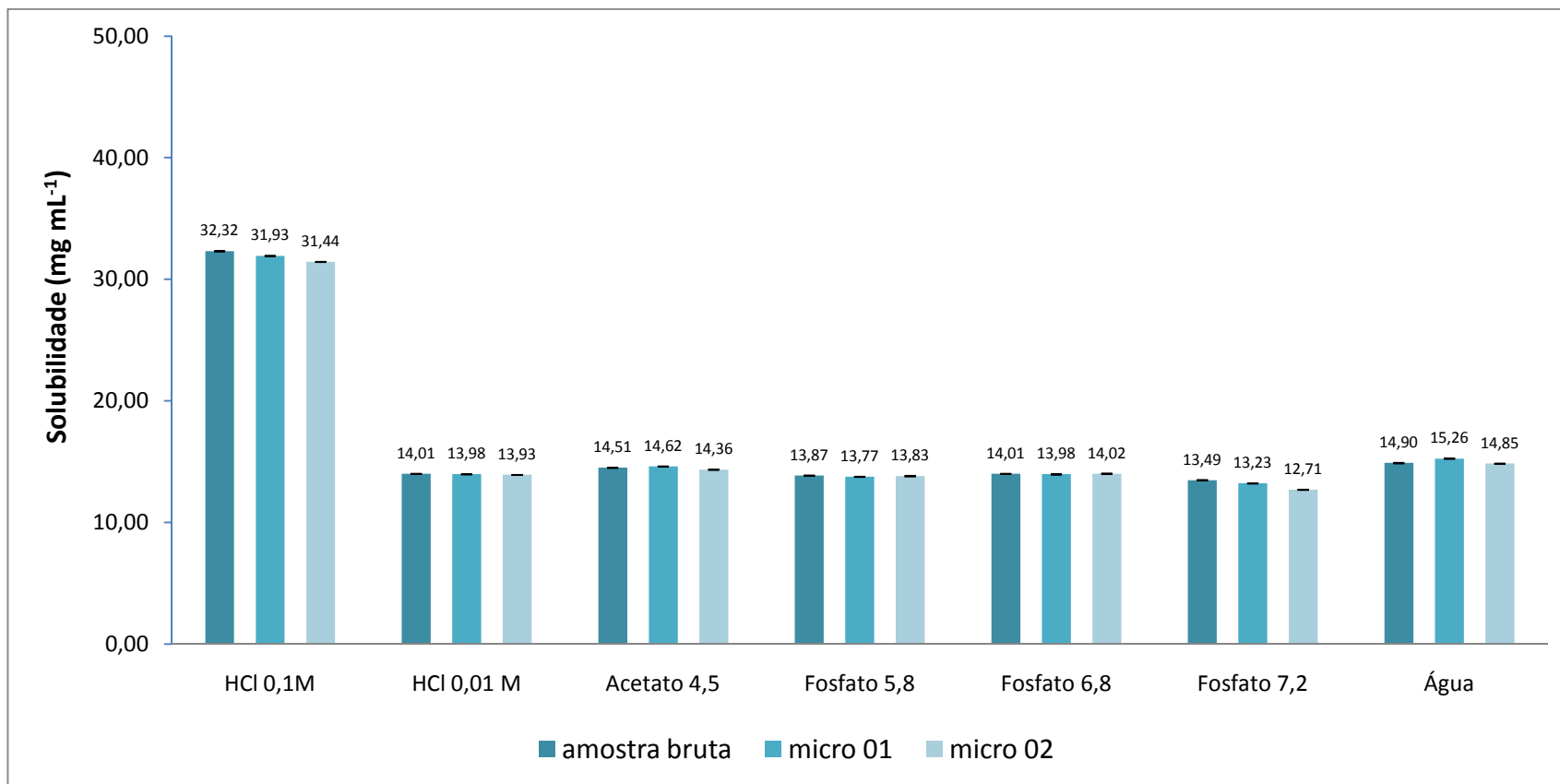


Figura 2 - Solubilidade (mg mL⁻¹) das amostras de metronidazol nos diferentes meios estudados.

Em geral, com a redução do tamanho de partícula, observa-se um aumento da solubilidade do fármaco, seja pelo aumento da área superficial exposta ao solvente, melhorando dessa forma a interação sólido-líquido ou pela descaracterização da forma cristalina, ocasionada pela amorfização do material no processo de micronização. Pela comparação dos valores de solubilidade das amostras do metronidazol em todos os meios, para os diferentes tamanhos de partícula, verificou-se que não há influência da micronização na solubilidade desse fármaco. De fato, a redução do tamanho de partícula é capaz de impactar, de modo significativo, na solubilidade de fármacos pouco solúveis, mas, como aqui demonstrado, não promove efeito em uma substância de alta solubilidade como o metronidazol (ALLEN JR., 2008; FLORENCE; ATTWOOD, 2003; LINDENBERG; KOOP; DRESSMAN, 2004).

De acordo com a distribuição de tamanho de partícula obtida (Figura 3), confirmou-se que as amostras encontram-se em três faixas granulométricas distintas e que as suas amplitudes diminuem conforme o aumento do grau de micronização.

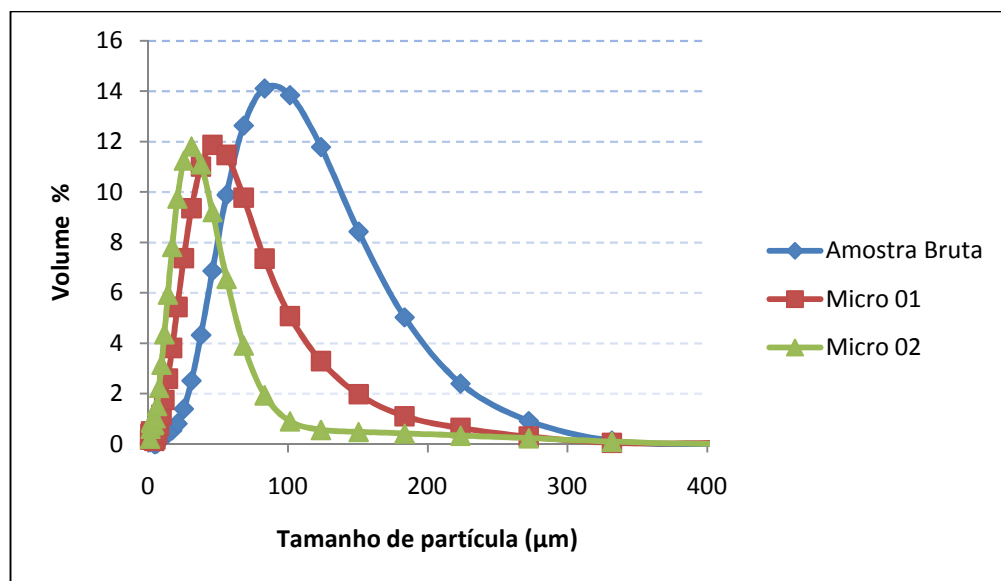


Figura 3 - Distribuição de tamanho de partícula para as três amostras obtidas pelo método de dispersão líquida em equipamento de difração de raios laser.

Porém, ao observar os valores de diâmetros a 10 %, 50 %, 90 % e tamanho médio das partículas (Tabela 1), altos valores de desvio padrão foram encontrados para as repetições da amostra micro 01. Tal resultado pode estar relacionado com o

grau de micronização, uma vez que a amostra bruta apresenta uma faixa mais ampla distribuição granulométrica, com a primeira micronização, pode ter ocorrido a formação de partículas de tamanhos bem variados, que, após a segunda redução, apresentaram uma distribuição mais homogênea, com a diminuição da amplitude da curva e dos valores de desvio padrão.

Tabela 1 – Diâmetros a 10 %, 50 % , 90% e tamanho médio das partículas obtidos na análise realizada em equipamento de difração de raios laser. Os valores são expressos em média (μm) \pm desvio padrão de duas determinações.

Amostra	d (0.1)	d (0.5)	d (0.9)	Tamanho médio
Bruta	38,5 \pm 0,8	83,8 \pm 1,0	169,1 \pm 0,8	102,9 \pm 0,2
Micro 01	19,7 \pm 3,0	49,1 \pm 8,1	72,6 \pm 18,9	49,60 \pm 6,0
Micro 02	8,7 \pm 0,8	26,7 \pm 1,4	58,0 \pm 2,2	35,1 \pm 1,2

As curvas de DSC, TG e DTG (Figura 4) indicaram que não houve alteração no comportamento térmico do fármaco após a micronização. Na DSC, as curvas apresentaram dois eventos bem característicos: o primeiro, endotérmico, relacionado à fusão do metronidazol em torno de 160 °C e o segundo exotérmico, relacionado à sua decomposição em torno de 290 °C, representado pela perda de massa nas curvas de TG/DTG. Na Tabela 2 são apresentados os valores numéricos que comprovam o comportamento semelhante entre as amostras.

Os resultados de resíduo e início da perda de massa (Tonset de degradação) da TG mostrados na Tabela 3, indicam que houve diminuição dessas temperaturas para as amostras micro 01 e micro 02 quando comparadas à curva da amostra bruta, bem como a diminuição de resíduo final da amostra micro 02, indicando dessa forma, uma possível influência da micronização no processo de degradação. Para a avaliação dessa hipótese, realizou-se o estudo da cinética de degradação pelo método não-isotérmico (método de Ozawa) para as amostras mais distintas em tamanho de partícula: amostra bruta e micro 02, sendo as curvas de TG apresentadas na Figura 5 e os valores de temperatura de início de degradação (Tonset) e pico máximo obtidos, mostrados na Tabela 4 .

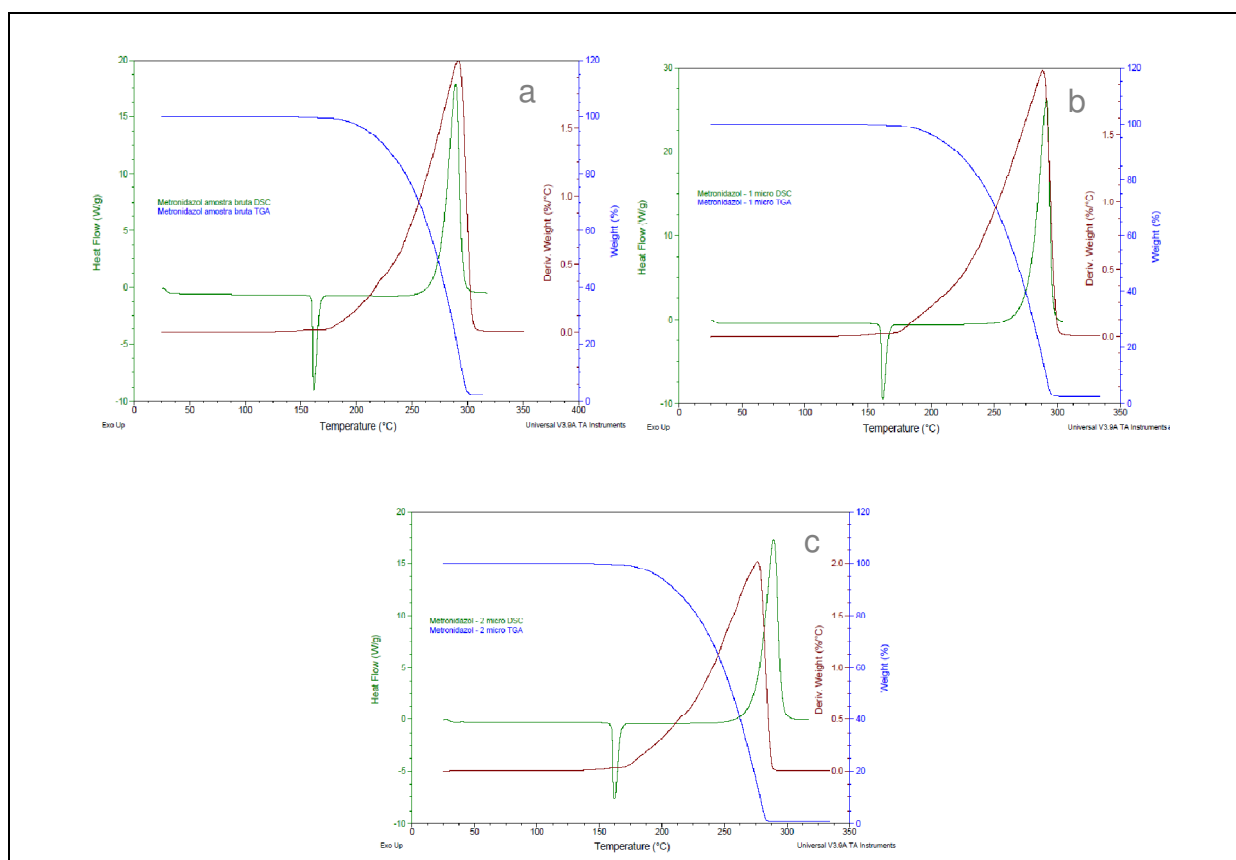


Figura 4 - Curvas de DSC e TG/DTG de metronidazol das amostras bruta (a), micro 01 (b) e micro 02 (c) obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio e razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ na temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $320\text{ }^{\circ}\text{C}$ (DSC) e $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ na temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ (TG/DTG).

Tabela 2 - Resultados de Tonset ($^{\circ}\text{C}$), pico máximo de fusão ($^{\circ}\text{C}$) e pico máximo de degradação ($^{\circ}\text{C}$) obtidos pela análise das curvas de DSC.

Amostra	Tonset	Pico máx.	Degradação
bruta	160,15	161,70	289,18
micro 01	160,09	161,73	291,46
micro 02	160,11	162,52	289,39

Tabela 3 - Resultados de Tonset ($^{\circ}\text{C}$), resíduo e pico máximo de perda de massa ($^{\circ}\text{C}$) obtidos a partir das curvas de TG/DTG das três amostras.

Amostra	Massa (mg)	Tonset	Resíduo (%)	Pico máximo
bruta	20,701	231,88	2,056	292,09
micro 01	18,101	222,53	2,280	288,47
micro 02	13,171	213,63	0,633	276,74

Tabela 4 - Valores de Tonset de degradação ($^{\circ}\text{C}$) e pico máximo ($^{\circ}\text{C}$) obtidos no estudo de cinética de degradação.

Amostra	bruta		micro 02	
Razão de aquecimento ($^{\circ}\text{C min}^{-1}$)	Tonset	Pico máximo	Tonset	Pico máximo
2,5	175,39	219,55	181,32	216,65
5	187,79	236,30	186,88	234,40
7,5	196,07	250,13	191,89	244,14
10	206,26	259,19	205,28	259,64
15	206,26	272,56	213,18	268,88
20	219,84	279,63	218,11	278,54

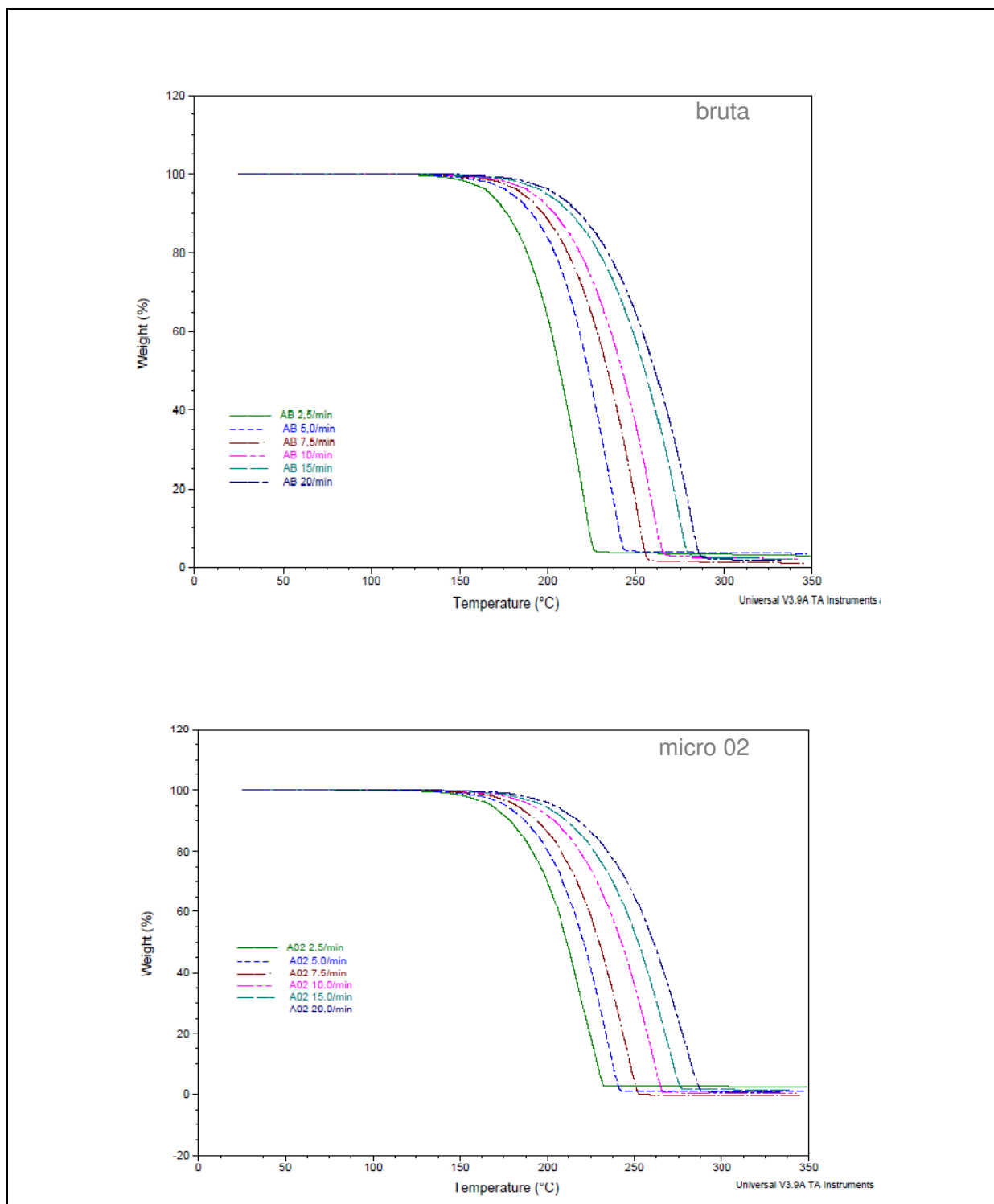


Figura 5 - Curvas de TG das amostras submetida a diferentes razões de aquecimento, de 25 °C a 350 °C sob atmosfera inerte de nitrogênio – fluxo de 100 mL min⁻¹.

Os valores de E_a obtidos foram de 33 kJ mol⁻¹ para a amostra bruta e 31,9 kJ mol⁻¹ para a amostra micronizada. Observa-se, deste modo, que não há diferenças de energia de ativação entre as amostras e, conseqüentemente, não há influência da micronização na estabilidade do metronidazol. As diferenças mostradas na

Tabela 3, provavelmente estão relacionadas às diferentes massas empregadas em cada corrida.

O espectro vibracional (FTIV) obtido para as três amostras de metronidazol são apresentados na Figura 6. Pela comparação, verificou-se que o processo de micronização não gerou alteração nas bandas de absorção do fármaco.

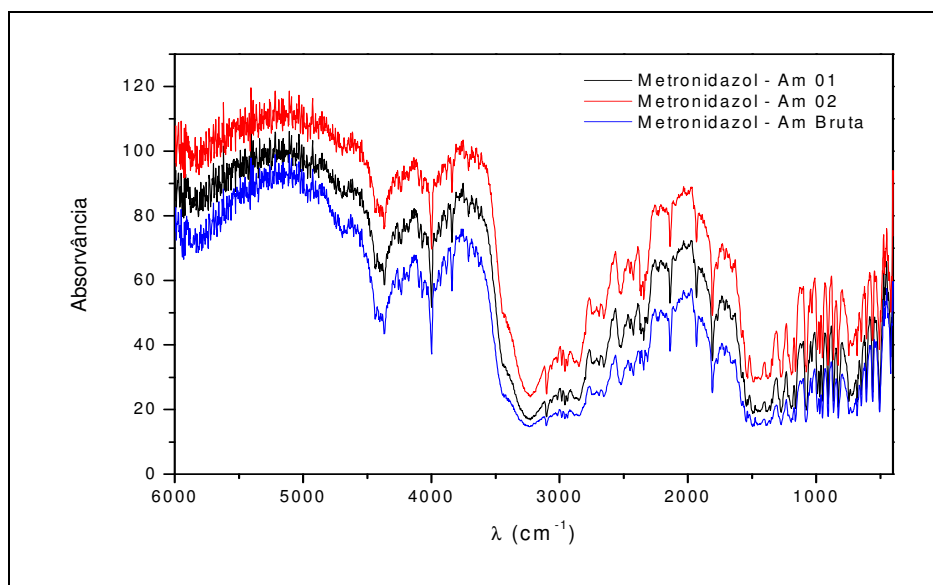


Figura 6 - Espectros de IV obtidos para as amostras de metronidazol. Varreduras realizadas na faixa de 400 a 6000 cm^{-1} em equipamento FTIR – SCINCO S-1000.

Na Figura 7 são apresentados os difratogramas das amostras estudadas e do padrão do cristal monoclinico do metronidazol. Segundo análise dos difratogramas obtidos com auxílio do programa “X- Pert” (Figura 8), verificou-se que as amostras avaliadas apresentaram reflexões semelhantes ao cristal monoclinico de metronidazol. Conforme dados da literatura, não há informações sobre a ocorrência de polimorfismo para o fármaco, sendo a forma monoclinica a única reconhecida (DI MARTINO *et al.*, 2007a).

Assim, o que se verifica é que a estrutura cristalina é mantida e não há amorfização do fármaco após a micronização, fato também evidenciado pelas curvas de DSC (Figura 4).

Pela comparação das intensidades de reflexão entre as amostras de diferentes granulometrias (Figura 8), verifica-se que os picos são preservados, porém a intensidade é menor para as amostras micronizadas, principalmente para a primeira reflexão (em torno de 12°). Entretanto, tal fato pode ser atribuído à granulometria menos uniforme da amostra bruta em relação às demais (maior amplitude de faixa granulométrica), que pode gerar um efeito de orientação preferencial no preparo da amostra, que é minimizado com a redução de tamanho de partícula (CAMPBELL ROBERTS et al.,2002).

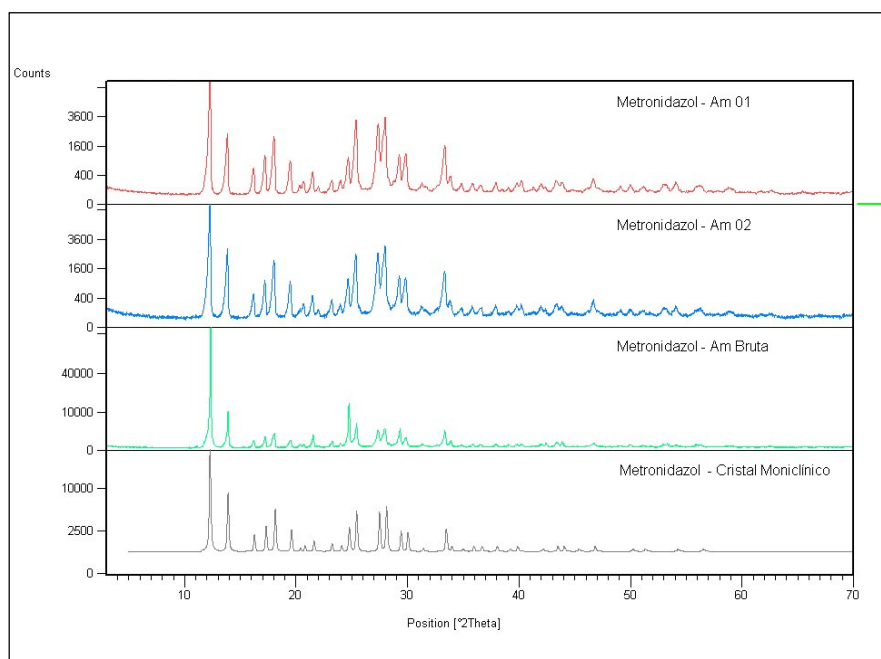


Figura 7 - Difratoograma das amostras analisadas plotadas com o difratoograma do cristal monoclinico de metronidazol presente na base de dados do programa “X-Pert”.

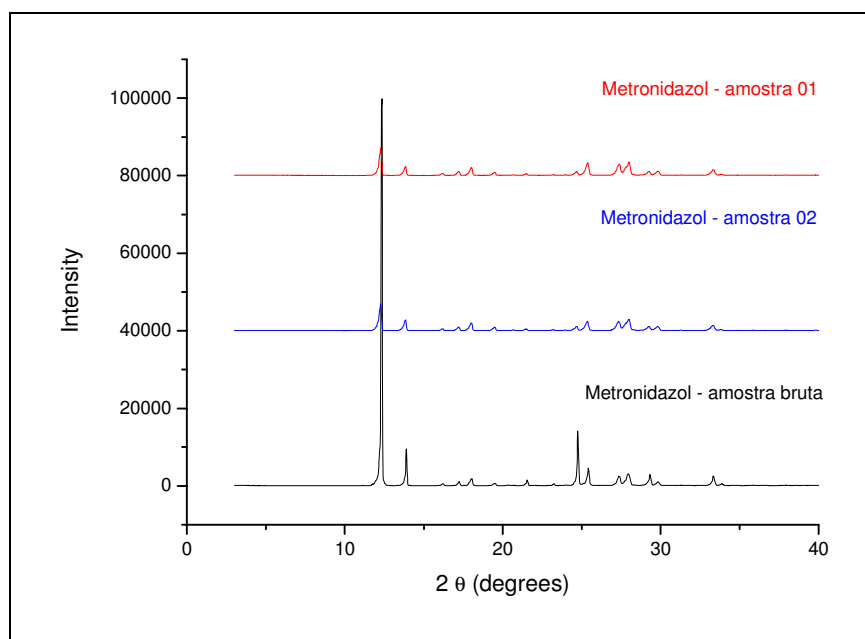


Figura 8 - Difratograma das três amostras analisadas, plotadas em planilha do OriginPro 6.1., evidenciando picos mais pronunciados para a amostra bruta.

Na Tabela 5 são apresentados os resultados obtidos na análise de área superficial e densidade verdadeira. Verifica-se que, com aumento do grau de micronização do metronidazol, e conseqüentemente redução do tamanho das partículas, ocorre aumento dos valores de área superficial, volume e tamanho de poro. Por outro lado, tal fato parece não mostrar influência sobre a densidade verdadeira do pó.

Tabela 5 - Resultados de área superficial, volume e tamanho de poro e densidade verdadeira, sendo os três primeiros obtidos em analisador de área superficial sob atmosfera de nitrogênio e o último em picnômetro de gás Hélio. Os resultados de densidade são apresentados pelos valores médios e desvio padrão de três determinações.

Amostra	AS _{BET} (m ² g ⁻¹)	V poro (cm ³ g ⁻¹)	Tamanho poro (nm)	Densidade verdadeira (g mL ⁻¹)
bruta	0,827	1,322E-03	3,196	1,4765 ± 0,01
micro 01	1,070	2,371E-03	4,429	1,4787 ± 0,00
micro 02	1,441	4,483E-03	6,220	1,4739 ± 0,01

Com as imagens obtidas a partir da visualização por microscopia óptica das amostras (Figura 9) foi possível visualizar o impacto do grau de micronização na redução do tamanho das partículas e na homogeneidade granulométrica do fármaco.

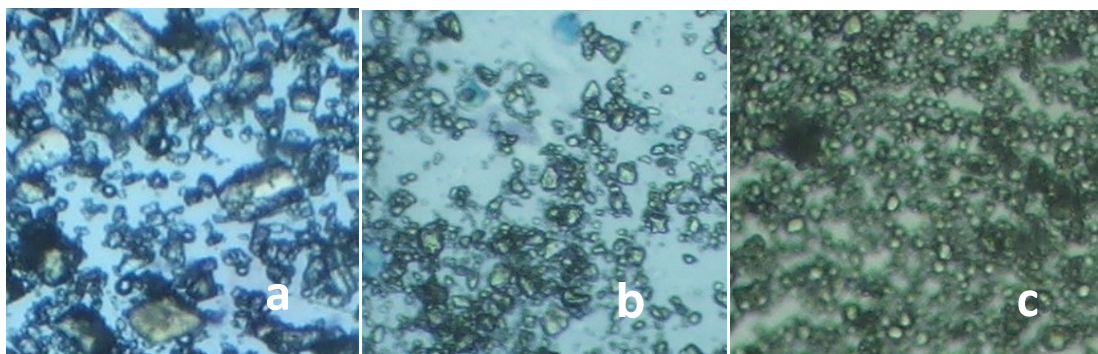


Figura 9 – Imagens obtidas na microscopia óptica pelo aumento de 10x: a – amostra bruta, b – amostra micro 01, c – amostra micro 02.

Outro aspecto importante a ser considerado é o comportamento reológico de um pó, que pode ser afetado por diversos parâmetros, entre os quais, o tamanho das partículas (CARSTENSEN, 2001). O metronidazol é conhecido por ser um fármaco de difícil compressão (DI MARTINO *et al.*, 2007b), sendo tal fato comprovado pelos valores de IC e RH encontrados para a amostra bruta, 26,55 % e 1,36 respectivamente. Segundo a Farmacopéia Americana (2009), pós que apresentam IC entre 26 e 31 % e RH entre 1,35 e 1,45 são caracterizados pobres em fluxo e valores acima dessas faixas, prejudicam ainda mais este comportamento. Dessa forma, conforme observado na Figura 10, a redução do tamanho das partículas prejudica o fluxo do metronidazol, como observado pelo aumento do índice de compressibilidade e da razão de Hausner.

Em relação aos dados de densidade compactada, também apresentados na Figura 10, verificou-se que a amostra micro 02, de granulometria mais reduzida, é aquela que apresenta o menor valor, podendo assim, ocupar maior volume em relação às demais amostras.

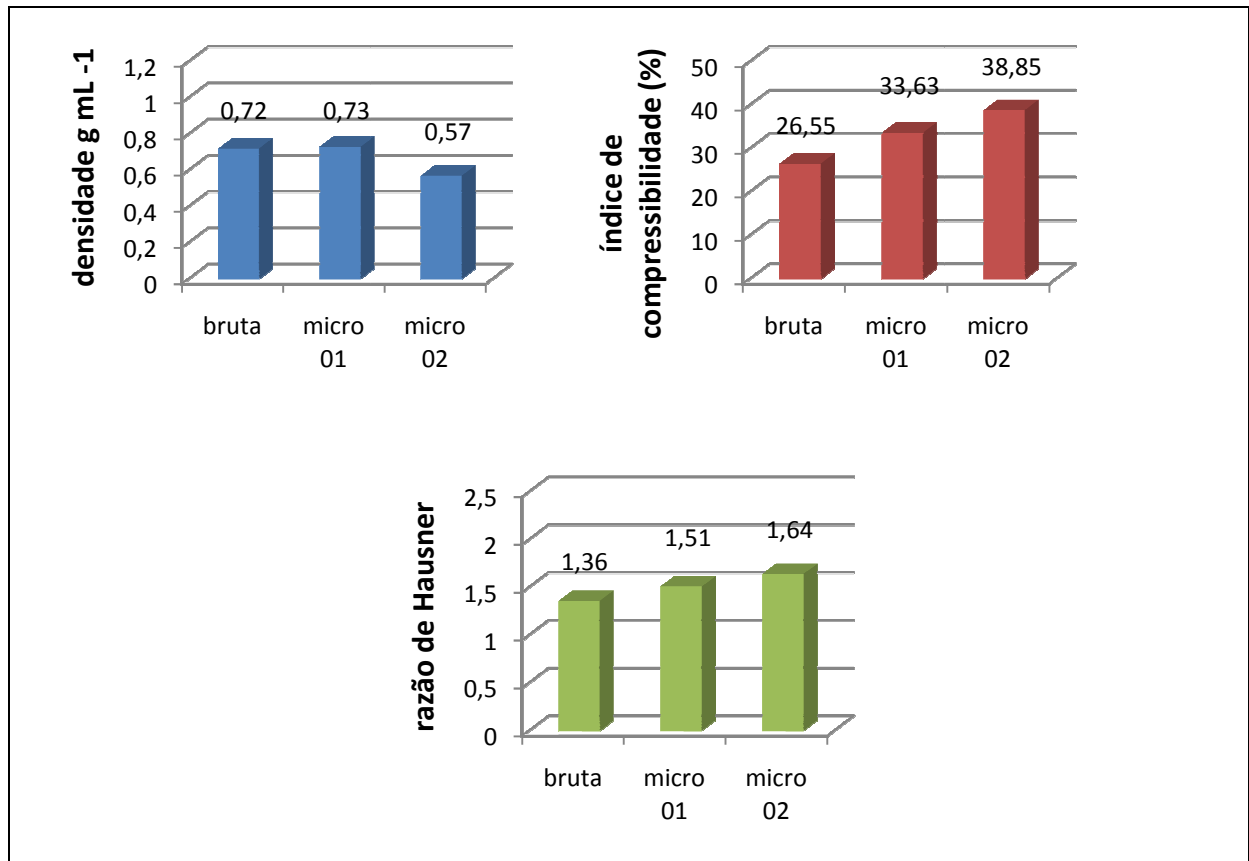


Figura 10 – Resultados densidade compactada, índice de compressibilidade e razão de Hausner para as amostras de metronidazol.

Pelos resultados apresentados, verificou-se que o processo de micronização tem influência nas propriedades reológicas do metronidazol, sendo assim, a redução das partículas desse fármaco para a produção de formas sólidas deve ser avaliada, uma vez que tal processo pode intensificar os problemas no momento da fabricação.

4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, o que se observa é que embora ocorra um aumento da área superficial, não há alteração da solubilidade do metronidazol pela redução do tamanho de partícula. O processo de micronização não gerou alteração de forma cristalina, nem a perda da estabilidade do fármaco. Por outro lado, na avaliação das propriedades reológicas, pôde-se verificar que o fluxo do metronidazol é prejudicado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN JR., L. V. Dosage form design and development. **Clinical Therapeutics**, v. 30, n. 11, p. 2102-2111, 2008.

CARSTENSEN, J.T. **Advanced Pharmaceutical Solids**. New York: Marcel Dekker, Inc. 2001.

CIDES, L. C. S., ARAÚJO, A. A. S., SANTOS – FILHO, M., MATOS, J. R. Thermal behaviour, compatibility study and decomposition kinetics of glimepiride under isothermal and non-isothermal conditions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 84, 2, p. 441-445, 2006.

DI MARTINO, P.; CENSI, R.; MALAJ, L.; CAPSONI, D.; MASSAROTTI, V.; MARTELLI, S. Influence of solvent and crystallization method on the crystal habit of metronidazole. **Crystallography and Research Technology**, v. 42, n.8, p. 800-806, 2007a.

DI MARTINO, P.; CENSI, R.; MALAJ, L.; MARTELLI, S.; JOIRIS, E.; BHARTÉLEMY, C. Influence of metronidazole particle properties on granules prepared in a high-shear mixer-granulator. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 33, p. 121-131, 2007b.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Physicochemical Principles of Pharmacy**. London: The MacMillan Press, 2003. cap. 1, p. 51-56.

GOVINDARAJAN, R.; SURYANARAYANAN, R. Processing-induced phase transformations and their implications on pharmaceutical product quality In: HILFIKER, R. **Polymorphism in the Pharmaceutical Industry**, 1 ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2006. cap. 13, p. 333-364.

IDKAIDEK, N, M.; NAJIB, N. M. Enhancement of oral absorption of metronidazole suspension in humans, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 213-216 (2000).

KIM, M.; LEE,S.; PARK, J.; WOO, J.; HWANG,S. Micronization of cilostazol using supercritical antisolvent (SAS) process: Effect of process parameters, **Powder Technology**, v. 177, p. 64-70, 2007.

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.

LIU, L.X.; MARZIANO, I.; BENTHAM, A.C.; LITSTER, J. D.; WHITE, E. T.; HOWES, T. Effect of particle properties on the flowability of ibuprofen powders, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 362, p. 109-117, 2008.

NIAZI, S. K. **Handbook of preformulation: Chemical, Biological and Botanical Drugs**, New York: Informa Healthcare USA, Inc., 2007. vol.1, cap. 3, p. 57-86.

CAMPBELL ROBERTS, S. N.; WILLIAMS, A. C.; GRIMSEY, I. M.; BOOTH, S. W. Quantitative analysis of mannitol polymorphs. X-ray powder diffractometry-exploring preferred orientation effects, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p. 1149-1159, 2002.

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, p. 1-13.

UNITED States Pharmacopeia. 32. ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2009.

WELLS, J. Pharmaceutical Preformulation In: AULTON, M.E. **Pharmaceutics The Science of Dosage Form Design**, 2. ed. London: Churchill Livingstone, 2002. cap. 8, p. 113-138.

WU, Y.; FASSIHI, R. Stability of metronidazole, tetracycline HCl and famotidine alone and in combination. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 290, p. 1-13, 2005.

Capítulo 3

Avaliação do impacto de diferentes variáveis na dissolução intrínseca de metronidazol

RESUMO

A dissolução intrínseca é uma ferramenta que permite a obtenção da dissolução do fármaco puro, independente dos efeitos inerentes aos demais componentes de uma formulação ou tipo de forma farmacêutica. O objetivo desse trabalho foi avaliar o impacto de diferentes variáveis na dissolução intrínseca de metronidazol, fármaco antimicrobiano que possui solubilidade e permeabilidade elevadas. Os ensaios, bem como a seleção das variáveis independentes, foram realizados conforme um delineamento experimental do tipo fatorial fracionado. De acordo com análise estatística realizada, as variáveis que apresentam impacto na velocidade de dissolução intrínseca (VDI) do fármaco são a velocidade de rotação e o meio de dissolução, enquanto o tamanho de partícula e a pressão utilizada na formação do compactado, demonstraram não apresentar influência nos resultados.

1. INTRODUÇÃO

O ensaio de dissolução intrínseca consiste na avaliação da dissolução de um fármaco puro, mantendo constantes condições como área superficial, temperatura, velocidade de rotação, pH e força iônica do meio. É uma ferramenta que permite a avaliação do fármaco, independente dos efeitos inerentes à formulação de um medicamento ou a sua forma farmacêutica (AULTON, 2002; TENHO *et al.*, 2007; VIEGAS *et al.*, 2001).

A velocidade de dissolução de uma substância pura pode ser afetada por fatores intrínsecos e extrínsecos ao fármaco, sendo os primeiros relacionados às propriedades do estado sólido como polimorfismo, amorfismo, solvatação, tamanho de partícula e área superficial específica. Entre os extrínsecos podem ser citados aqueles relativos ao meio de dissolução (tampão, utilização de tensoativo, temperatura, viscosidade e força iônica do meio), bem como a área superficial e condições hidrodinâmicas (STEELE, 2001; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009).

No ensaio de dissolução intrínseca, o fármaco é compactado em uma matriz, de modo que a sua área superficial exposta ao meio seja sempre constante, e, assim, os efeitos relacionados ao tamanho de partícula, podem ser minimizados. Entretanto, estudos sugerem que, dependendo do tipo de hábito cristalino do fármaco, a compactação deste pode ser mais organizada ou não (texturização de acordo com a orientação preferencial do cristal), podendo gerar diferenças de velocidade de dissolução intrínseca (VDI). O processo de micronização pode acarretar em diminuição da texturização do fármaco, gerando um comportamento direcional aleatório dos cristais no compactado com a presença de arestas, o que pode resultar em dissolução mais rápida do fármaco (VIEGAS *et al.*, 2001; TENHO *et al.*, 2007).

Embora muitos estudos já tenham sido relatados na literatura, poucos são aqueles que discorrem sobre a influência das condições empregadas no ensaio e o impacto das variáveis utilizadas na velocidade de dissolução intrínseca (VDI).

Entre as aplicações desse tipo de ensaio podem ser mencionadas a sua utilização como ferramenta na caracterização de fármacos no estado sólido e a avaliação da velocidade de dissolução de um fármaco em diferentes meios (BARTOLOMEI *et al.*; 2006; PEREIRA *et al.*, 2007; YU *et al.*, 2004).

Recentemente discute-se sobre a utilização do ensaio de dissolução intrínseca para a determinação da solubilidade de fármacos, uma vez que para a determinação da VDI, a quantidade requerida de material é bem inferior em relação ao ensaio de solubilidade convencional e possíveis alterações na estrutura cristalina do material podem ser detectadas (SEHIC *et al.*, 2010; STEELE, 2001; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009; YU *et al.*, 2002, 2004; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2009).

O metronidazol, cuja estrutura química é apresentada na Figura 1, é um fármaco antimicrobiano de classe I no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) – alta solubilidade e alta permeabilidade. Embora pertencente à classe I, é um fármaco pH dependente, com solubilidade aumentada em pH abaixo de 2 (IDKAIDEK; NAJIB, 2000; LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004; WU; FASSIHI, 2005).

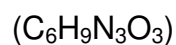
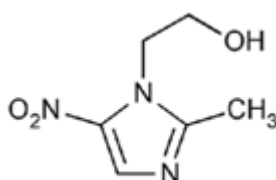


Figura 1 - Estrutura química do metronidazol (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009).

Dessa forma, o metronidazol mostra-se um modelo interessante, sendo o objetivo do presente trabalho, avaliar o impacto de diferentes variáveis no ensaio de dissolução intrínseca para um fármaco de alta solubilidade.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

2.1.1. Fármaco

A matéria-prima utilizada foi doada pela Micro Service Ind. Química Ltda., apresentando-se em três frações diferentes de tamanho de partícula: metronidazol base amostra bruta (não micronizada) , metronidazol base micro 01 (amostra micronizada) e metronidazol base micro 02 (amostra submetida à dupla micronização).

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Planejamento experimental

Para o desenvolvimento do método e avaliação das variáveis no ensaio de dissolução intrínseca do metronidazol, realizou-se um delineamento experimental do tipo fatorial contemplando quatro fatores em três níveis (Tabela 1), sendo o volume de meio mantido constante (900 mL).

Tabela 1 - Variáveis empregadas no planejamento experimental fatorial e os diferentes níveis estudados.

Fatores	Níveis		
Pressão de compactação (psi)	1000	2000	3000
Velocidade de rotação (rpm)	50	75	100
Meio de dissolução	HCl 0,1 M (101)	Água (102)	Tp. Fosfato pH 7.2 (103)
Grau de micronização	0	1	2

O planejamento fatorial do tipo 3⁴ indicou a necessidade de executar 81 experimentos. Dessa forma, buscou-se, por um delineamento fracionado, otimizar o estudo, com a diminuição do número de experimentos. Sendo o fatorial da série 3^k, pela avaliação das variáveis em três níveis, o seu fracionamento pode ser realizado para 1/3, 1/9, 1/27 (MONTGOMERY, 2001). Nesse caso, optou-se pela redução em

1/3, totalizando 27 experimentos, o que foi possível com a utilização do programa Statistica 8.0 (Tabela 2).

Tabela 2 - Fatorial fracionado 1/3 de 3^4 (3^{4-1}), resultando em 27 experimentos que foram distribuídos aleatoriamente pelo programa Statistica 8.0.

Ordem dos ensaios	$3^{(4-1)}$ fatorial fracionado, 1 bloco, 27 experimentos			
	Pressão de compactação	Velocidade de rotação	Meio de dissolução	Grau de micronização
27	3000	100	Fosfato 7,2	0
21	3000	50	Fosfato 7,2	2
22	3000	75	HCl 0,1 M	0
10	2000	50	HCl 0,1 M	2
23	3000	75	Água	2
3	1000	50	Fosfato 7,2	1
25	3000	100	HCl 0,1 M	2
7	1000	100	HCl 0,1 M	1
18	2000	100	Fosfato 7,2	1
17	2000	100	Água	2
16	2000	100	HCl 0,1 M	0
12	2000	50	Fosfato 7,2	0
14	2000	75	Água	0
13	2000	75	HCl 0,1 M	1
5	1000	75	Água	1
11	2000	50	Água	1
9	1000	100	Fosfato 7,2	2
24	3000	75	Fosfato 7,2	1
1	1000	50	HCl 0,1 M	0
8	1000	100	Água	0
15	2000	75	Fosfato 7,2	2
2	1000	50	Água	2
20	3000	50	Água	0
4	1000	75	HCl 0,1 M	2
6	1000	75	Fosfato 7,2	0
19	3000	50	HCl 0,1 M	1
26	3000	100	Água	1

2.2.2. Dissolução intrínseca

Para a realização dos ensaios, utilizou-se aparatos de disco rotativo Varian[®] (Varian Inc. Palo Alto, CA, Estados Unidos), acoplados ao equipamento de dissolução VK 7010 (Varian Inc. Palo Alto, CA, Estados Unidos), onde cerca de 200 mg de cada amostra foram pesados e compactados com auxílio de uma prensa hidráulica (American Lab., Charqueada, SP, Brasil). O volume de meio de dissolução foi fixado em 900 mL, sendo os ensaios realizados em triplicata, com os intervalos de coleta a cada 5 minutos, totalizando 40 minutos de experimento. A quantidade de fármaco liberada foi obtida pela leitura das alíquotas em espectrofotômetro UV-VIS Cary 50 (Varian Inc. Palo Alto, CA, Estados Unidos), no aplicativo "Simple reads". Para realização dos cálculos utilizou-se as equações de reta geradas pelas curvas analíticas previamente construídas em 275 nm (para HCl) e 320 nm (para os demais meios utilizados).

Os resultados foram expressos pelos valores de velocidade de dissolução intrínseca (VDI). Para os cálculos, realizados conforme a farmacopeia americana (USP 2009), foi construído um gráfico da quantidade de fármaco dissolvida (mg) *versus* o tempo (segundos) e através da regressão linear, obteve-se o valor da velocidade de dissolução do fármaco pela inclinação da reta em mg s^{-1} . Dividindo esses resultados pelo valor da área superficial de fármaco exposta na matriz ($0,5 \text{ cm}^2$), chegou-se aos valores de velocidade de dissolução intrínseca (VDI) do metronidazol em $\text{mg cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. A avaliação do impacto das variáveis estudadas foi realizada pelo tratamento estatístico dos dados com a utilização do programa Statistica 8.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 3 e na Figura 2 são apresentados os resultados obtidos para os 27 experimentos realizados. Conforme os valores de coeficientes de determinação (R^2) obtidos, verificou-se que há linearidade entre os resultados de velocidade de dissolução do metronidazol, não sendo observadas alterações nesse perfil ao longo dos experimentos.

Tabela 3 - Valores de velocidade de dissolução (VD), coeficiente de determinação (R^2), velocidade de dissolução intrínseca (VDI) obtidos e as condições utilizadas em cada experimento.

Odem de execução	Experimento	VD (mg/s)	R^2	VDI (mg/cm ² /s)	Amostra	Pressão de compactação (psi)	Rotação (rpm)	Meio de dissolução
1	27	0,0127	0,9998	0,0254	Bruta	3000	100	Tp. Fosfato pH 7.2
2	21	0,0095	0,9994	0,0190	Micro02	3000	50	Tp. Fosfato pH 7.2
3	22	0,0437	0,9993	0,0874	Bruta	3000	75	HCl 0,1M
4	10	0,0372	0,9987	0,0744	Micro02	2000	50	HCl 0,1M
5	23	0,0127	0,9996	0,0254	Micro02	3000	75	Água
6	3	0,0096	0,9980	0,0192	Micro01	1000	50	Tp. Fosfato pH 7.2
7	25	0,0525	0,9995	0,1050	Micro02	3000	100	HCl 0,1M
8	7	0,0500	0,9991	0,1000	Micro01	1000	100	HCl 0,1M
9	18	0,0136	0,9996	0,0272	Micro01	2000	100	Tp. Fosfato pH 7.2
10	17	0,0146	0,9997	0,0292	Micro02	2000	100	Água
11	16	0,0536	0,9996	0,1072	Bruta	2000	100	HCl 0,1M
12	12	0,0097	0,9997	0,0194	Bruta	2000	50	Tp. Fosfato pH 7.2
13	14	0,0128	0,9992	0,0256	Bruta	2000	75	Água
14	13	0,0448	0,9998	0,0896	Micro01	2000	75	HCl 0,1M
15	5	0,0126	0,9994	0,0252	Micro01	1000	75	Água
16	11	0,0105	0,9996	0,0210	Micro01	2000	50	Água
17	9	0,0134	0,9996	0,0268	Micro02	1000	100	Tp. Fosfato pH 7.2
18	24	0,0119	0,9996	0,0238	Micro01	3000	75	Tp. Fosfato pH 7.2
19	1	0,0376	0,9994	0,0752	Bruta	1000	50	HCl 0,1M
20	8	0,0147	0,9997	0,0294	Bruta	1000	100	Água
21	15	0,0119	0,9997	0,0238	Micro02	2000	75	Tp. Fosfato pH 7.2
22	2	0,0104	0,9993	0,0208	Micro02	1000	50	Água
23	20	0,0102	0,9970	0,0204	Bruta	3000	50	Água
24	4	0,0437	0,9989	0,0874	Micro02	1000	75	HCl 0,1M
25	6	0,0116	0,9996	0,0232	Bruta	1000	75	Tp. Fosfato pH 7.2
26	19	0,0397	0,9991	0,0794	Micro01	3000	50	HCl 0,1M
27	26	0,0146	0,9993	0,0292	Micro01	3000	100	Água

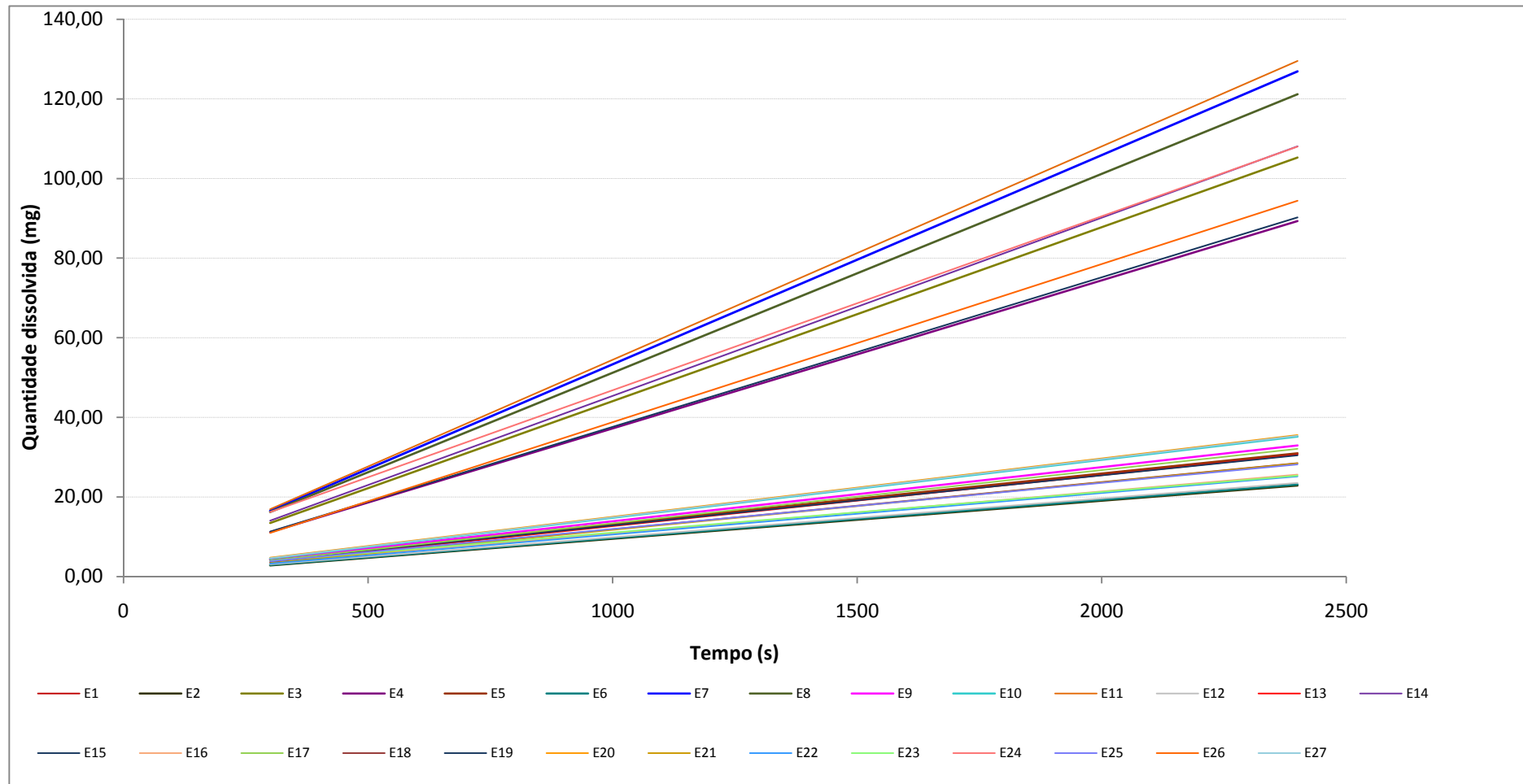


Figura 2 - Regressão linear dos pontos de quantidade dissolvida (mg) pelos tempos de coleta (s) para obtenção da velocidade de dissolução (VD).

A análise de variância das interações principais (Tabela 4) e o gráfico de Pareto (Figura 3) indicaram que, dentre os fatores estudados, a velocidade de rotação e o meio de dissolução, demonstraram impacto significativo na VDI do metronidazol. Tal observação também foi evidenciada em trabalho realizado por Yu e colaboradores (2004), na avaliação da dissolução intrínseca de diferentes fármacos.

Tabela 4 - Análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos de VDI – os resultados em vermelho são considerados significativos ($p < 0,05$).

Efeito	Teste de significância para VDI ($\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)				
	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	p
Intercepto	0,056911	1	0,056911	2304,175	0,000000
Velocidade de rotação (rpm)	0,000948	2	0,000474	19,193	0,000034
Pressão de compactação (psi)	0,000006	2	0,000003	0,128	0,880700
Meio de dissolução	0,025682	2	0,012841	519,889	0,000000
Micronizações	0,000000	2	0,000000	0,009	0,991226
Erro	0,000445	18	0,000025		

Porcentagem de variação explicada (R^2_{ajustado}) = 97,63.

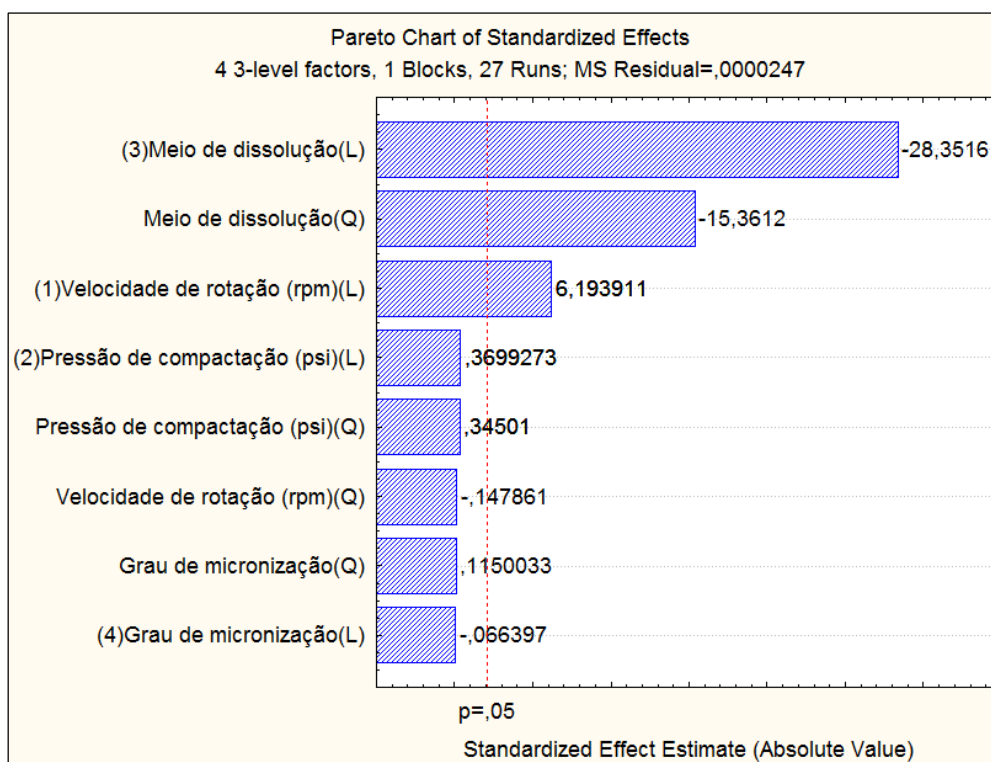


Figura 3 – Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis sobre a VDI do metronidazol (ANOVA) – os resultados à direita da linha vermelha são considerados significativos.

Tabela 5 – Estimativas por ponto, por intervalo e teste de significância para os coeficientes.

Fatores Interações	e	p	Coeficientes	Erros Padrão	Limite de Confiança - 95%	Limite de Confiança + 95%
Intercepto		0,000000	0,045911	0,000956	0,043902	0,047921
Velocidade de rotação L		0,000008	0,007256	0,001171	0,004795	0,009717
Velocidade de rotação Q		0,884096	-0,000150	0,001014	-0,002281	0,001981
Pressão de compactação L		0,715753	0,000433	0,001171	-0,002028	0,002894
Pressão de compactação Q		0,734086	0,000350	0,001014	-0,001781	0,002481
Meio de dissolução L		0,000000	-0,033211	0,001171	-0,035672	-0,030750
Meio de dissolução Q		0,000000	-0,015583	0,001014	-0,017715	-0,013452
Micronizações L		0,947794	-0,000078	0,001171	-0,002539	0,002383
Micronizações Q		0,909716	0,000117	0,001014	-0,002015	0,002248

Em vermelho - resultados com $p < 0,05$.

$$VDI_{\text{metronidazol}} = 0,045911 + 0,007256 \text{ velocidade de rotação} - 0,033211 \text{ meio de dissolução} - 0,015583 (\text{meio de dissolução})^2 \quad (\text{Equação 1})$$

Nos gráficos de superfície de resposta (Figura 5), é feita a comparação da influência de dois fatores sobre a variável dependente (VDI). Pode-se verificar que os gráficos que contemplam a variável meio de dissolução apresentam curvatura.

As interpretações desses gráficos de superfície, assim como dos gráficos de contorno obtidos (Figura 6) são apresentadas na Tabela 6.

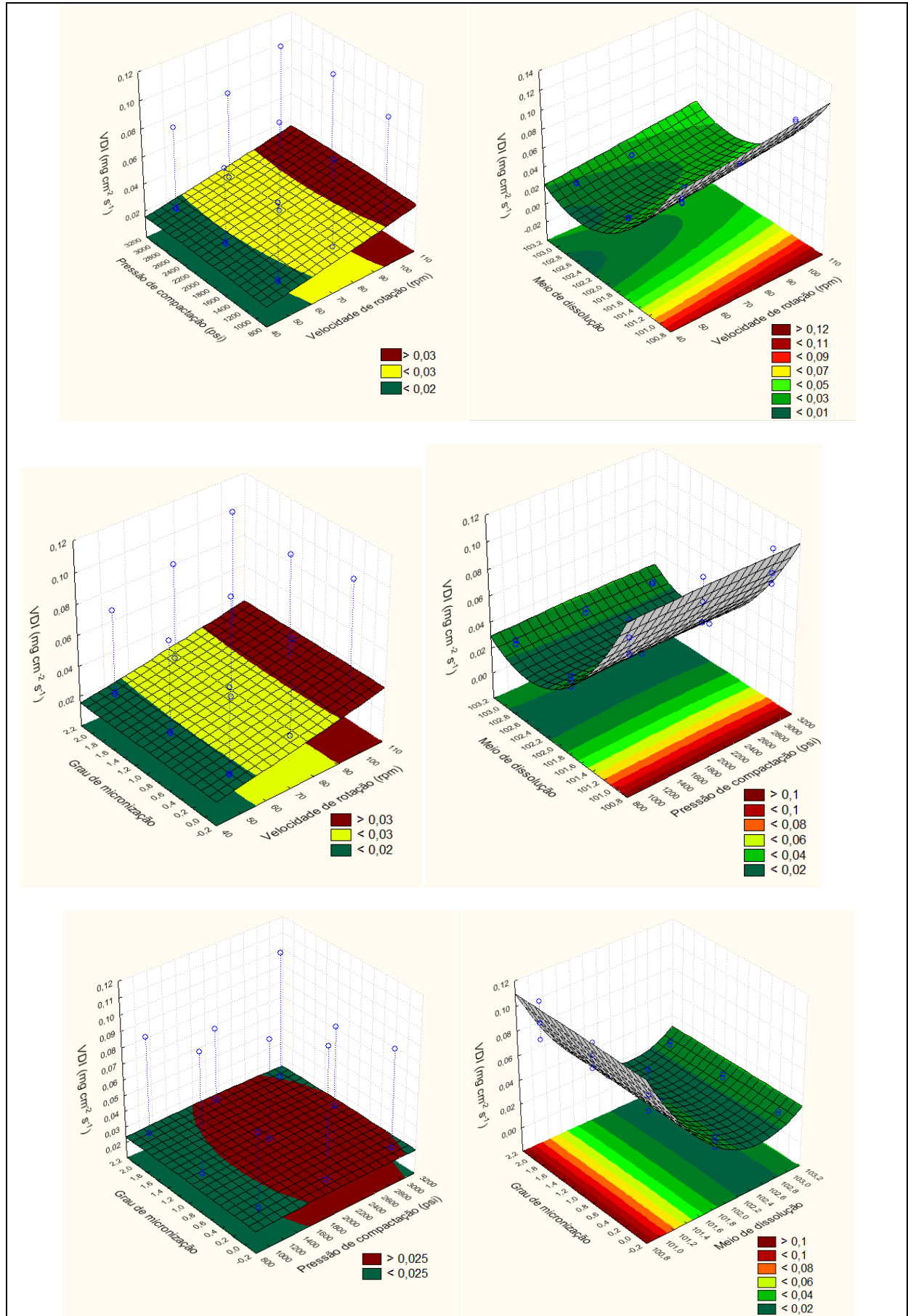


Figura 5 - Superfícies de resposta para a VDI ($\text{mg cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) em função dos fatores estudados.

Tabela 6 – Interpretação dos gráficos de superfície de resposta e contorno obtidos para a VDI em função das variáveis independentes.

Variáveis	Interpretação
Pressão de compactação X Velocidade de rotação	A VDI é influenciada apenas pela velocidade de rotação, uma vez que diferentes pressões de compactação levam a resultados semelhantes.
Meio de dissolução X Velocidade de rotação	O aumento da rotação para níveis mais altos induz a valores mais elevados de VDI em qualquer um dos meios utilizados, principalmente no nível mais baixo de meio de dissolução, o HCl 0,1M.
Grau de micronização X Velocidade de rotação	A variável grau de micronização não demonstra impacto na VDI do fármaco, que é alterada apenas com a mudança da rotação empregada.
Meio de dissolução X Pressão de compactação	Quanto maior o nível do meio de dissolução é produzido um efeito redutivo na VDI do fármaco, que não se altera pela variação da pressão de compactação.
Grau de micronização X Pressão de compactação	Embora a variável pressão de compactação não tenha influência significativa na resposta, observa-se alteração na VDI de acordo com o nível utilizado.
Grau de micronização X Meio de dissolução	Como nos gráficos anteriores o grau de micronização não tem efeito sobre a VDI do fármaco, que sofre grande influência do meio de dissolução.

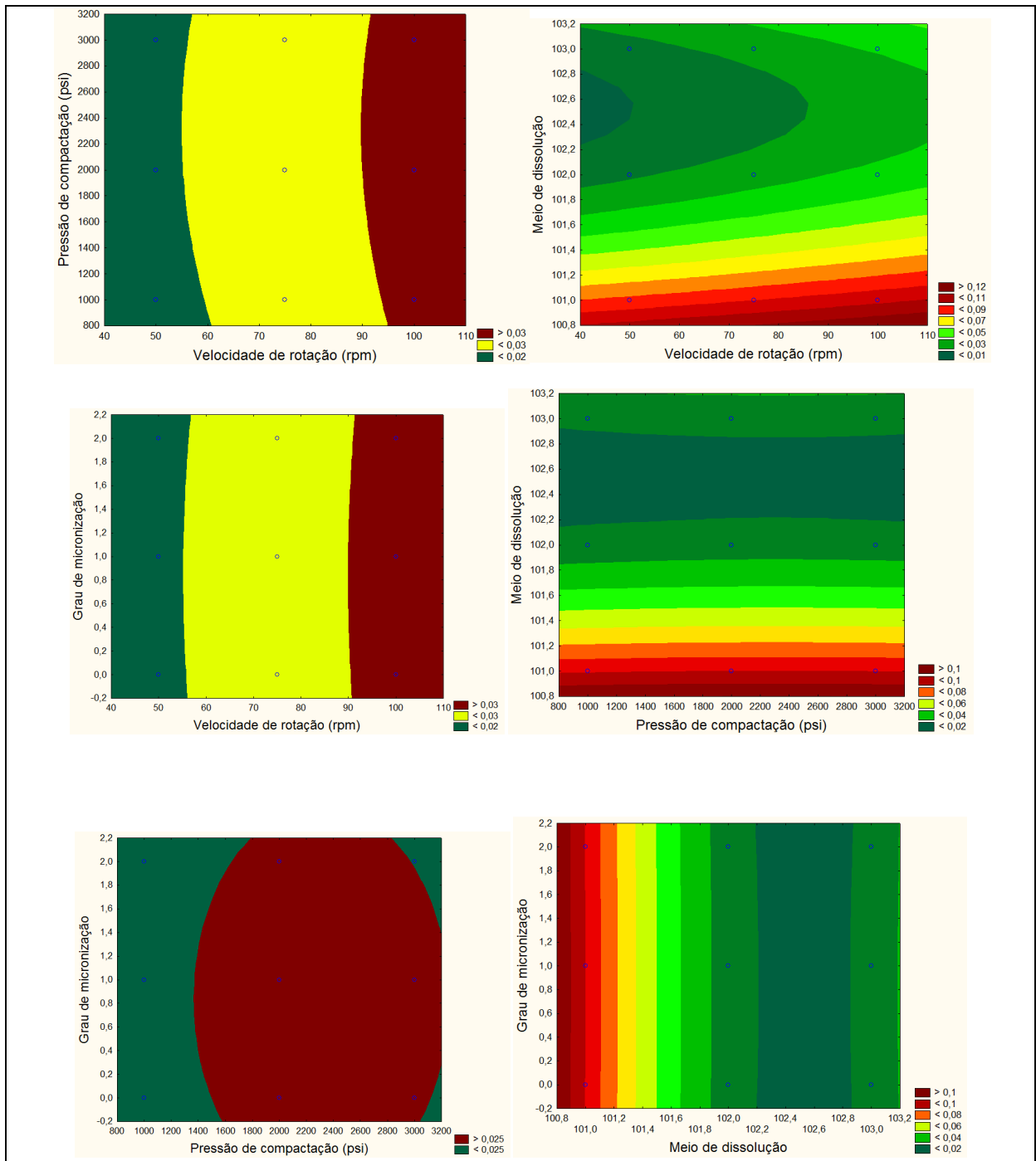


Figura 6 – Curvas de contorno para a VDI ($\text{mg cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) em função dos fatores estudados.

Na Figura 7 são apresentados os gráficos das médias de VDI em função dos níveis das variáveis estudadas. Como apresentado nos gráficos de superfície de resposta e contorno, o meio de dissolução é aquela que apresenta o maior impacto na dissolução intrínseca do metronidazol, sendo encontrados valores bem distintos de VDI entre o nível mais baixo utilizado no delineamento (HCl 0,1M) e os demais

níveis empregados (água e tampão fosfato pH 7,2), fato explicado pela maior solubilidade do metronidazol em pH abaixo de 2 (WU; FASSIHI, 2005).

Segundo os resultados já apresentados, a outra variável que tem impacto significativo na dissolução intrínseca do fármaco, porém em menor intensidade, é a velocidade de rotação, uma vez que, embora as médias de VDI em cada nível (50, 75 e 100 rpm) sejam diferentes, os resultados são muito próximos e valores iguais de VDI podem ser obtidos com rotações diferentes.

Em relação à pressão de compactação e ao grau de micronização, verifica-se resultados muito próximos entre os níveis estudados, bem como uma falta de tendência, que demonstra a falta de influência significativa na dissolução intrínseca do metronidazol.

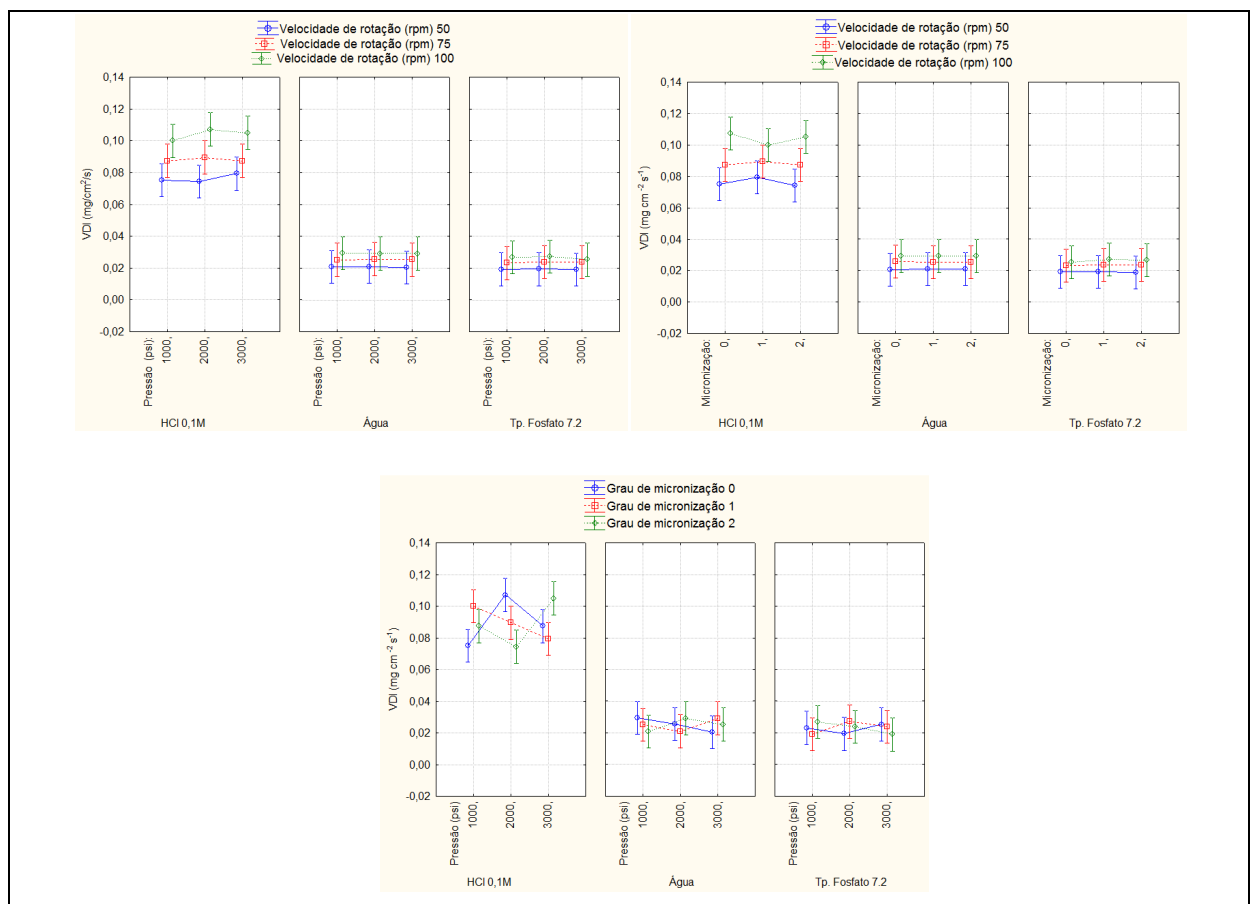


Figura 7 - Gráfico das médias de VDI obtidas entre os níveis dos fatores avaliados.

Apesar de não apresentar impacto, as pressões utilizadas possibilitaram a manutenção da área superficial constante do compactado durante todo o ensaio. Dessa forma, qualquer uma delas (1000, 2000 e 3000 psi) pode ser empregada na realização do ensaio.

4. CONCLUSÃO

As variáveis pressão de compactação e grau de micronização, que representa o tamanho de partícula do fármaco, não têm influência na dissolução intrínseca de metronidazol, sendo a VDI dependente apenas do meio de dissolução e da rotação empregados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AULTON, M. E. Dissolution and solubility In: **Pharmaceutics The Science of Dosage Form Design**, 2. ed. London: Churchill Livingstone, 2002. cap. 1, p. 32-47.

BARTOLOMEI, M.; BERTOCCHI, P.; ANTONIELLA, E; RODOMONTE, A. Physico-chemical characterisation and intrinsic dissolution studies of a new hydrate form of diclofenac sodium: comparison with anhydrous form. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p. 1105-1113, 2006.

IDKAIDEK, N, M.; NAJIB, N. M. Enhancement of oral absorption of metronidazole suspension in humans, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 213-216 (2000).

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.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**, 5 ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2001. cap. 9, p.363-382.

PEREIRA, B. G.; FONTE-BOA, F. D.; RESENDE, J. A. L. C.; PINHEIRO, C. B.; FERNANDES, N. G.; YOSHIDA, M. I.; VIANNA-SOARES, C. D. Pseudopolymorphs and Intrinsic Dissolution of Nevirapine, **Crystal Growth & Design**, v.7, n.10, p. 2016-2023, 2007.

SEHIC, S.; BETZ, G.; HADZIDEDIC, S.; EL-ARINI, S. K.; LEUENBERGER, H. Investigation of intrinsic dissolution behavior of different carbamazepine samples. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 386, p. 77-90, 2010.

STEELE, G. Preformulation predictions from small amounts of compound as an aid to candidate drug selection. In: GIBSON, M. **Pharmaceutical Preformulation and Formulation**. Florida: Taylor & Francis, 2001.

TENHO, M.; AALTONEN, J.; HEINANEN, P.; PELTONEN, L.; LEHTO, V. Effect of texture on the intrinsic dissolution behavior of acetylsalicylic acid and tolbutamide compacts. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, p. 857-864, 2007.

UNITED States Pharmacopeia. 32. ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2009.

VIEGAS, T. X.; CURATELLA, R. U.; WINKLE, L. L. V.; BRINKER, G., Measurement of intrinsic drug dissolution rates using two types of apparatus, **Pharmaceutical Technology**, v.6, p.44 – 53, 2001.

WANG J.; FLANAGAN D. R. Fundamentals of dissolution In: YIHONG Q.; CHEN Y.; ZHANG. G. Z. Z.; LIU L.; PORTER, W. **Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice**, 1 ed., Burlington: Elsevier, 2009, cap. 13, p. 309-316.

WU, Y.; FASSIHI, R. Stability of metronidazole, tetracycline HCl and famotidine alone and in combination. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 290, p. 1-13, 2005.

YU, L. X.; AMIDON, G. L.; POLLI, J. E.; ZHAO, H.; MEHTA, M. U.; CONNER, D. P.; SHAH, V. P.; LESKO, L. J.; CHEN, M.; LEE, V. H. L.; HUSSAIN, A. S. Biopharmaceutics classification system: The scientific basis for biowaiver extensions. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 7, p. 921-925, 2002.

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

ZAKERI-MILANI, P.; BARZEGAR-JALALI, M.; AZIMI, M.; VALIZADEH, H. Biopharmaceutical classification of drugs using intrinsic dissolution rate (IDR) and rat intestinal permeability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.73, p. 102-106, 2009.