

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos  
Área de Produção e Controle Farmacêutico

Desenvolvimento de metodologia para avaliação do perfil de dissolução de comprimidos de atorvastatina cálcica 20 mg comercializados no Peru, Brasil e Bolívia

Eduard Diego Alonso Aroca Sevillano

Dissertação para obtenção do Título de Mestre  
Orientador: Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz

São Paulo  
2019

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos  
Área de Produção e Controle Farmacêutico

Desenvolvimento de metodologia para avaliação do perfil de dissolução de comprimidos de atorvastatina cálcica 20 mg comercializados no Peru, Brasil e Bolívia

Eduard Diego Alonso Aroca Sevillano

Versão Corrigida da dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

O presente trabalho foi realizado com apoio da coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz

São Paulo

2019

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

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

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

A769d Aroca sevellano, Eduard Diego Alonso  
Desenvolvimento de metodologia para avaliação do perfil de dissolução de comprimidos de atorvastatina cálcica 20 mg comercializados no Peru, Brasil e Bolívia / Eduard Diego Alonso Aroca sevellano. - São Paulo, 2019.  
93 p.

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

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

Eduard Diego Alonso Aroca Sevillano

Desenvolvimento de metodologia para avaliação do perfil de dissolução de comprimidos de atorvastatina cálcica 20 mg comercializados no Peru, Brasil e Bolívia

Comissão julgadora

Da

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz

orientador/presidente

---

1°. examinador

---

2°. examinador

---

3°. examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2019

## EPÍGRAFE

“Poco conocimiento hace que las personas se sientan orgullosas. Mucho conocimiento, que se sientan humildes”

Leonardo da Vinci

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

Elvira e Eduard,

Às minhas irmãs,

Marine, Marice, Lucero,

Sobrinho,

Gigo

Aos meus amigos e família.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por abençoar meu caminho e cuidar de mim...

Ao professor doutor Humberto Gomes Ferraz, pela orientação, confiança no meu trabalho e oportunidade de trabalhar em seu laboratório, que se tornou em aprendizagem e momentos importantes da minha vida, muito obrigado por tudo!

A minha mãe que sempre me apoio incondicionalmente, sem esperar nada em troca,

A meu tio, Robin, pelas conversas e, gestos de apoio,

À Dra. Michele Issa Georges, por tudo que aprendi com ela, dedicação, paciência e, valiosas contribuições nesse trabalho,

À Mg. Natalia Viera Souza, pelas dicas, conversas e sua amizade,

À Bruna e Mariana pelo apoio para este trabalho e amizade,

À nossa mãe do laboratório, Eremita, pelos ensinamentos,

Aos meus amigos, durante meu estágio e tempo de mestrando no laboratório DEINFAR, pelas risadas, roles, ajuda no meus ensaios, dicas e fidelidade em nossa amizade. Peço desculpas por não colocar seus nomes, é impossível listar todos aqui,

Aos meus amigos que conheci durante minha moradia no Brasil, momentos felizes, tristes, simplesmente são minha família,

Aos funcionários da universidade de São Paulo, David e Alexandre,

Ao programa de Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos e à CAPES e FIPFarma.

## RESUMO

AROCA, S. E. D. A. **Desenvolvimento de metodologia para avaliação do perfil de dissolução de comprimidos de atorvastatina cálcica 20 mg comercializados no Peru, Brasil e Bolívia.** 2019. 93p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O presente estudo teve por finalidade desenvolver uma metodologia de dissolução discriminativa para avaliar comprimidos contendo diferentes polimorfos de atorvastatina cálcica (ATR). Este trabalho é conformado por quatro capítulos, no qual o primeiro apresenta uma breve revisão de literatura sobre as características dos polimorfos da ATR, abordando-se informações mais relevantes sobre o ATR em relação ao polimorfismo e sua influência na biodisponibilidade. No segundo capítulo, apresenta-se a importância da caracterização dos polimorfismos e suas implicações para a ATR. As amostras de ATR foram identificadas por difração raio X e análise térmica e, posteriormente, demonstrou-se as diferenças entre quatro amostras comercializadas no mercado brasileiro relacionadas ao hábito cristalino, tamanho de partícula e solubilidade. No terceiro capítulo, demonstra-se o desenvolvimento do método de dissolução discriminativo para comprimidos contendo duas formas polimórficas da ATR. Para tanto, avaliou-se a solubilidade destas pelo método do equilíbrio e determinou-se as condições experimentais mais adequadas para o ensaio de dissolução por intermédio de planejamento fatorial completo do tipo  $2^3$ , sendo as variáveis independentes o meio de dissolução, a velocidade de agitação e as formas polimórficas (I e VIII). Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente através da análise de variância, dos gráficos de Pareto e de superfície de resposta. Concluiu-se que a velocidade de agitação e o meio de dissolução impactam os resultados, afetando a dissolução das formulações com os polimorfos avaliados. Assim, as condições selecionadas foram: 750 mL de meio água a 65 rpm. Após o desenvolvimento do método, este foi comparado com o da Food and Drug Administration (FDA) para comprimidos de atorvastatina cálcica. Ao final dos ensaios, o método desenvolvido mostrou-se adequado para apontar diferenças entre os polimorfos da ATR. No quarto capítulo, o método desenvolvido foi utilizado para avaliar o perfil de dissolução de comprimidos comercializados em três países sul-americanos: Brasil, Peru e Bolívia. As porcentagens de fármaco dissolvidas e a Eficiência de Dissolução foram as variáveis estudadas e, posteriormente, tratadas estatisticamente através da análise de componentes principais, sendo possível comparar o perfil de dissolução de sete formulações. Dessa forma, foi possível concluir que cinco formulações avaliadas (BR1, BR2 PE6, BR7 e BO3) possuíam a forma polimórfica VIII, enquanto duas formulações (BR5 e PE2) continham a forma polimórfica I. As demais, possivelmente, apresentam misturas ou outras formas polimórficas.

**Palavras-chaves:** Atorvastatina cálcica, polimorfismo, método de dissolução.



## ABSTRACT

AROCA, S. E. D. A. **Development of a methodology to evaluate the dissolution profile of atorvastatin calcium tablets 20 mg marketed in Peru, Brazil and Bolivia.** 2019. 93p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

This present study was aimed at developing a discriminative dissolution methodology to evaluate tablets containing different calcium atorvastatin (ATR) polymorphs. This paper consists of four chapters. The first chapter presents a brief literature review of the characteristics of ATR polymorphs, and addresses more relevant information about ATR in relation to polymorphism and its influence on bioavailability. The second chapter presents the importance of the characterization of polymorphs and their implications for ATR. The ATR samples were identified by X-ray diffraction and thermal analysis. Subsequently, the differences among the four samples marketed in the Brazilian market with relation to crystalline habit, particle size and solubility were demonstrated. The third chapter demonstrates the development of the discriminative dissolution method for tablets containing two polymorphic forms of ATR. For this, their solubilities were evaluated by the equilibrium method and the most suitable experimental conditions for the dissolution test were determined by means of complete factorial design of type  $2^3$ , and the independent variables were the dissolution medium, the stirring speed and polymorphic forms (I and VIII). The results obtained were statistically treated through analysis of variance, Pareto and response surface graphs. It was concluded that the stirring speed and the dissolution medium influenced the results, affecting the dissolution of the formulations with the evaluated polymorphs. Thus, the selected condition was 750 mL of water at 65 rpm. Following the development of the method, it was compared with that of the Food and Drug Administration (FDA) for atorvastatin calcium tablets. At the end of the tests, the developed method was adequate to point out differences between the ATR polymorphs. In the fourth chapter, the developed method was used to evaluate the dissolution profile of tablets marketed in three South American countries: Brazil, Peru and Bolivia. Dissolved drug percentages and Dissolution Efficiency were the studied variables and statistically treated by principal component analysis. Through this method, it was possible to compare the dissolution profile of seventeen formulations. Thus, it was possible to conclude that five formulations evaluated (BR1, BR2, PE6, PE7 e BO3) had the polymorphic form VIII, while two formulations (BR5 e PE2) contained the polymorphic form I. The others possibly have mixtures or other forms polymorphic.

**Keywords:** Atorvastatin calcium, polymorphism, dissolution method.

## SUMÁRIO

<b>Capítulo 1 O impacto do polimorfismo da atorvastatina cálcica na produção farmacêutica.....</b>	<b>12</b>
Resumo.....	13
1. Introdução .....	14
2. Atorvastatina cálcica.....	15
3. Polimorfismo .....	16
3.1 Antecedentes.....	18
4. Propriedades dos polimorfos.....	21
5. Polimorfismo e biodisponibilidade .....	23
6. A Relevância do estudo de polimorfismo na área farmacêutica .....	24
7. Considerações finais .....	25
8. Referências Bibliográficas .....	26
<b>Capítulo 2 Caracterização físico-química dos polimorfos da atorvastatina cálcica.....</b>	<b>31</b>
Resumo.....	32
1. Introdução .....	33
2. Material e métodos .....	34
2.1 Material.....	34
2.2 Difratomia de raios X por policristais (DRXP) pelo método em pó.....	34
2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	35
2.4 Tamanho de partícula .....	35
2.5 Solubilidade .....	35
2.6 Densidade verdadeira .....	36
2.7 Análise térmica.....	36
2.7.1 Termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTG) .....	36
2.7.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	36
3. Resultados e Discussão.....	37
3.1 Difratomia de raios X por policristais (DRPX) pelo método em pó.....	37
3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	39
3.3 Tamanho de partícula .....	40
3.4 Solubilidade .....	42
3.5 Densidade verdadeira .....	44
3.6 Análise térmica.....	44
3.6.1. Termogravimétrica (TG) e termogravimétrica derivada (DTG) .....	44
3.6.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	46

5. Referências Bibliográficas .....	52
<b>Capítulo 3 Desenvolvimento de método discriminativo para avaliação do perfil de dissolução de comprimidos contendo diferentes polimorfos de atorvastatina.....</b>	<b>55</b>
Resumo .....	56
1. Introdução .....	57
2. Material e métodos .....	59
2.1 Material.....	59
2.1.1 Amostras.....	59
2.1.2 Reagentes .....	59
2.2 Ensaio de solubilidade .....	59
2.3 Formulações de atorvastatina cálcica .....	60
2.4 Ensaio de dissolução .....	60
2.5 Tratamento estatístico.....	61
3. Resultados e Discussão.....	62
3.1 Ensaio de solubilidade .....	62
3.2 Ensaio de dissolução .....	64
4. Conclusão .....	75
5. Referências Bibliográficas .....	76
<b>Capítulo 4 Avaliação do perfil de dissolução das especialidades farmacêuticas de atorvastatina cálcica 20mg comercializadas no Peru, Brasil e Bolívia .....</b>	<b>78</b>
Resumo .....	79
1. Introdução .....	80
2.1 Material.....	82
2.1.1 Amostras.....	82
2.1.2 Reagentes .....	82
2.1.3 Especialidades farmacêuticas .....	82
2.2 Preparo das formulações de atorvastatina cálcica .....	83
2.3 Ensaio de dissolução .....	84
2.4 Análise de componentes principais .....	84
3. Resultados e Discussão.....	85
3.1 Ensaio de dissolução .....	85
3.2 Análise de componentes principais .....	88
4. Conclusões .....	91
5. Referências Bibliográficas .....	92

## **Capítulo 1**

### **O impacto do polimorfismo da atorvastatina cálcica na produção farmacêutica**

## Resumo

Um fármaco pode existir em mais de uma forma sólida, exibindo diferentes propriedades físico-químicas como reatividade química, solubilidade, dissolução, entre outras, este fenômeno é chamado polimorfismo. Os polimorfos de fármacos que apresentam baixa solubilidade, como a atorvastatina, podem conduzir a sérios problemas na sua biodisponibilidade e estabilidade, impactando na eficácia e segurança. A atorvastatina cálcica é um fármaco que apresenta mais de 30 formas cristalinas descritas na literatura científica e em patentes. Diante deste quadro, este trabalho tem como objetivo compilar as informações mais relevantes da atorvastatina cálcica, em relação ao polimorfismo e suas propriedades, assim como a sua influência na biodisponibilidade.

## 1. Introdução

Na área farmacêutica, o polimorfismo é definido como as diferentes formas em que um fármaco no estado sólido se apresenta e, segundo a Internacional Conference on Harmonization (ICH), categorizados em três diferentes classes: cristalinos ou amorfos. Um mesmo composto é capaz de apresentar diferentes propriedades físico-químicas, como a solubilidade, a velocidade de dissolução e as propriedades mecânicas. As diferenças nessas características têm impacto no processo de manufatura do medicamento e, conseqüentemente, afetam a estabilidade e a biodisponibilidade do produto final (HILFIKER, 2006; ICH, 1999; ARAUJO, 2012).

A atorvastatina cálcica (ATR) é um fármaco inibidor seletivo da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase (HMG CoA redutase), pertencente ao grupo das estatinas e que demonstra eficácia na prevenção de complicações cardiovasculares, sendo o produto de referência comercializado como Lipitor® (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

Devido ao destaque em vendas do Lipitor®, o desenvolvimento de uma nova molécula que obtenha o mesmo sucesso é perseguido pelas indústrias farmacêuticas, de maneira que mais de 30 formas polimórficas de ATR descritas em literatura científica (JUN, 2006; CANSEL, 2015).

Segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), a ATR pertence à classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade), o que torna a dissolução uma limitação na absorção do fármaco, podendo ocasionar a redução na quantidade de fármaco que alcança a corrente sanguínea e, ainda para esta classe de fármacos, poderia estabelecer-se uma correlação *in vivo-in vitro* (BCS Database-TSRC, Inc., 2018).

De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA), a avaliação do grau e da velocidade de absorção do fármaco depende de vários aspectos como a motilidade intestinal, a dissolução e a permeabilidade, sendo importante destacar os riscos associados às mudanças de formas polimórficas. Dessa maneira, é provável que as diferenças de solubilidade entre as formas polimórficas de fármacos como a ATR afetem a biodisponibilidade, bem como a bioequivalência do medicamento (HILFIKER, 2006, FDA, 2007).

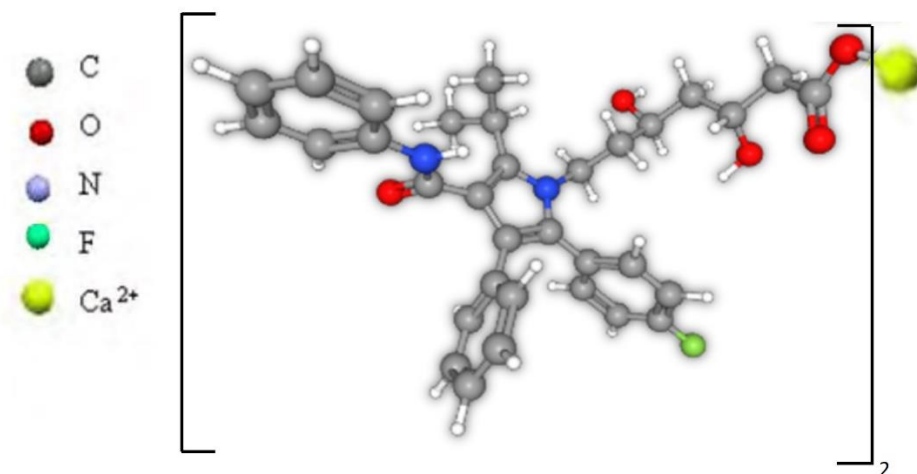
Devido à relevância do estudo de polimorfismos da atorvastatina cálcica, o presente trabalho tem como objetivo compilar informações pertinentes a este fármaco quanto ao polimorfismo e suas propriedades, assim como sua influência na biodisponibilidade.

## 2. Atorvastatina cálcica

A ATR é um fármaco derivado de estruturas de origem natural, como a lovastatina, a sinvastatina e a pravastatina (LAWS et al., 2004; KRACUN et al., 2009), que foi sintetizado durante os anos 80, devido ao interesse na pesquisa de novos inibidores da enzima HMG CoA redutase. A ATR pertence à patente US 4681893 e propriedade da Warner Lambert Company e foi sintetizada pelo químico Bruce D. Roth (ROTH, 2002) (US 4681893).

Trata-se de um pó cristalino esbranquiçado, cujo nome IUPAC é (3R, R) -7-[2-(4-fluorofenil) -3-fenil-4-(fenilcarbamoil)-5-propano-2-ilpirrol-1-il] -3,5 dihidroxi heptanoato de cálcio. Apresenta um peso molecular de 1209,4 g/mol, um ponto de fusão entre 159,2°C e 160,7°C e sua estrutura molecular pode ser observada na Figura 1 (OLIVEIRA; LACERDA; BONELLA, 2012; SHETE; PURI; KUMAR et al, 2010).

Figura 1. Molécula 3D da atorvastatina cálcica



Fonte: Pubchem

A ATR apresenta ainda uma constante de dissociação (pKa) igual a 4,46, sendo praticamente insolúvel em pH abaixo de 4,0, ligeiramente solúvel em água, tampão fosfato pH 7,4, acetonitrila e etanol e muito solúvel em metanol (SHETE; PURI; KUMAR et al, 2010).

A ATR pertence à classe de fármacos com característica hipolipemiantes, cujo mecanismo de ação consiste na inibição competitiva da HMG CoA redutase. Dentre os diversos efeitos colaterais relacionados às estatinas, a hiperglicemia reportada durante a utilização de doses maiores que 80 mg/dia, o aumento de peso, a diarreia, os espasmos musculares e os gases no estômago são frequentemente associados à ATR (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014, LAWS et al., 2004).

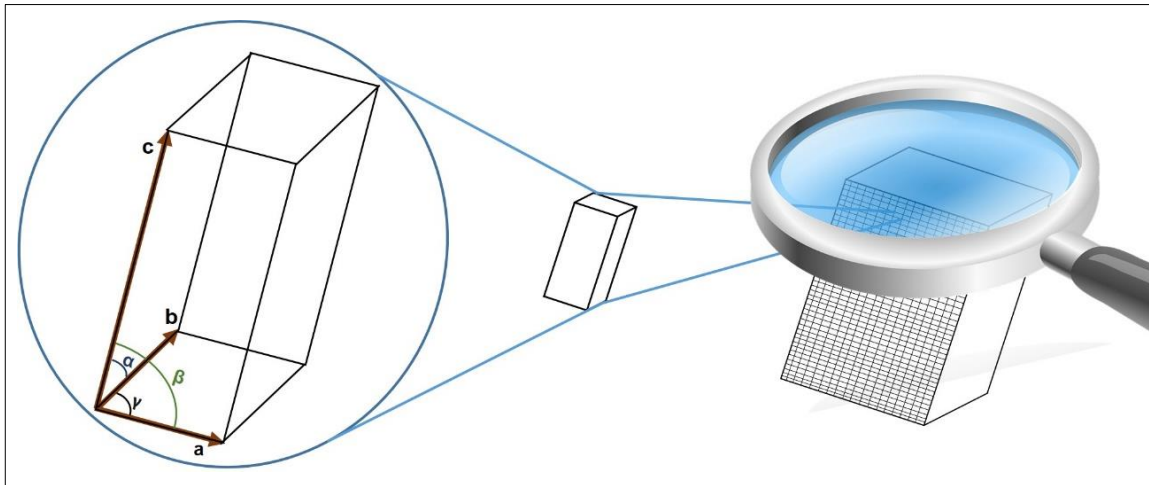
O produto referência de comprimidos de ATR, Lipitor<sup>®</sup>, é fabricado pela Pfizer. No ano de 2008, ele esteve no terceiro lugar em vendas da indústria farmacêutica brasileira, segundo a Associação Brasileira de produtos genéricos (LAWS et al., 2004). O Lipitor<sup>®</sup> foi o medicamento mais vendido no mundo no ano 2012, resultando em um lucro de 8 bilhões de dólares, devido a sua eficácia apresentada ao longo dos anos e, portanto, é um produto de alto interesse para a indústria farmacêutica (KRACUN et al., 2009; OLIVEIRA; LACERDA; BONELLA, 2012).

### **3. Polimorfismo**

Os compostos sólidos podem ser cristalinos ou amorfos. Um sólido cristalino apresenta um arranjo estrutural muito bem organizado, formado por celas unitárias. Estas são a menor unidade organizacional de um cristal, cujo volume pode ser definido com base na orientação dos vetores translacionais a, b, c (Figura 2). Em contrapartida, os sólidos amorfos apresentam uma conformação aleatória, sendo oposto a um cristal (HALEBLIAN & MCCRONE, 1969; HILFIKER, 2006) (Figura 2).



Figura 2. Cella unitária de um polimorfo



Fonte: Adaptado de SANDS, 1993

Entretanto, um material cristalino pode apresentar o fenômeno de polimorfismo, considerado como as diferentes formas ou arranjos espaciais que podem se apresentar em um sólido, mantendo sua identidade química (ARAUJO, 2012). Uma outra definição mais ampla de polimorfismo é “a ocorrência de diferentes formas cristalinas de um mesmo fármaco”, englobando os solvatos e amorfos (ICH, 1999; FDA, 2007).

As propriedades físico-químicas dos polimorfos em medicamentos podem ser afetadas pelas mudanças na estrutura do cristal, devido às diferentes orientações intermoleculares provocadas pelo tipo de ligações entre partículas. Desta forma, pode ser afetada a estabilidade do fármaco, influenciando negativamente na eficácia da terapia (RAO, 2011; SINGHAL, D.; CURATOLO, W., 2004).

É conhecida também a existência de pseudopolimorfos que são solvatos e, neste caso, a estrutura pode ser constituída por moléculas do solvente empregado durante o processo de cristalização, de forma que este passa a fazer parte da rede cristalina do sólido. Nos casos em que o retículo é composto por moléculas de água, recebe o nome de hidrato (BECKMAN, 2003).

O polimorfismo pode ser classificado com base na sua reversibilidade de transição de fases, segundo o ponto de vista termodinâmico: enantiotrópico e monotrópico. O sistema enantiotrópico existe quando a transição de fase de um composto sólido é reversível, ocorrendo abaixo da temperatura de fusão. Por outro lado, o sistema monotrópico é irreversível. Um exemplo termodinâmico, quando uma

forma cristalina instável busca sua estabilidade em uma pressão e temperatura controlada (ROCHA, 2010, BEZZON, 2013).

Uma busca na literatura indicou que a ATR apresenta mais de 30 formas cristalinas descritas em diferentes artigos e patentes, como a US 5969156, US6121461, WO 2001036384A1, US 2003/0212279, US 7342120, US 2008/0306282, US 7538136, descritos no Quadro 1.

Quadro 1. Patentes dos polimorfos da atorvastatina cálcica

Patentes	Proprietário	Inventores	Ano
US 5969156	Warner Lambert Company	Christopher A. Briggs	1999
US6121461	Warner Lambert Company	Ann T. McKenzie	2000
WO 2001036384A1	Teva Pharmaceutical Industries LTD	Ari Ayalon	2001
US 2003/0212279	Teva Pharmaceutical Industries LTD	Limor Tessler	2003
US 7342120	Teva Pharmaceutical Industries LTD	Judith Aronhime	2008
US 2008/0306282	Warner Lambert Company	Joseph F. Krzyzaniak	2008
US 7538136	Teva Pharmaceutical Industries LTD	Paul Adriaan Van Der Schaaf	2009

### 3.1 Antecedentes

Os primeiros relatos de polimorfismo foram atribuídos ao trabalho de Klaproth (1788), que observou como o carbonato de cálcio se cristalizou em calcita e aragonita. No século XIX, Humphrey Davy (1809) indicou a formação de grafite e diamante a partir do carbono, que se diferenciam unicamente na fase sólida. Não obstante, o termo polimorfismo foi utilizado oficialmente por Mirscherlich (1822) em uma investigação sobre os sulfatos isomórficos (HALEBLIAN & MCCRONE, 1969) (Figura3).

Em 1999 e 2000, respectivamente, as patentes US 5969156 e US 6121461 pertencentes à Warner Lambert Company, descreveram a obtenção de formas polimórficas de ATR. Na primeira, é referida à obtenção das formas I, II e IV, atribuindo-se três moléculas de água para a forma I. Na segunda, relata-se sobre a forma III. A caracterização dos cristais mencionados se deu através da difração de raios X pelo método de pó e ressonância magnética nuclear (NMR <sup>13</sup>C). Além disso, a mesma companhia sintetizou dez novas formas polimórficas descritas na patente US 2008/0306282.

A partir de 2001, a Teva Pharmaceutical Industries LTD obteve as patentes WO2001036384A1, US 7342120 B2 e US 7538136, nas quais descreveu o processo de síntese de diversas formas polimórficas da ATR.

A primeira relata a síntese da forma V, tanto no estado anidro quanto no estado hidratado, que possui melhor solubilidade do que a forma I. Na segunda patente, relata-se a descoberta das formas VI, VII, VIII, IX, X, XI e XII, além das maneiras de obtenção das formas I, II, IV, V e amorfa. A última patente, reporta as formas polimórficas X, A, B1, B2, C, D e E.

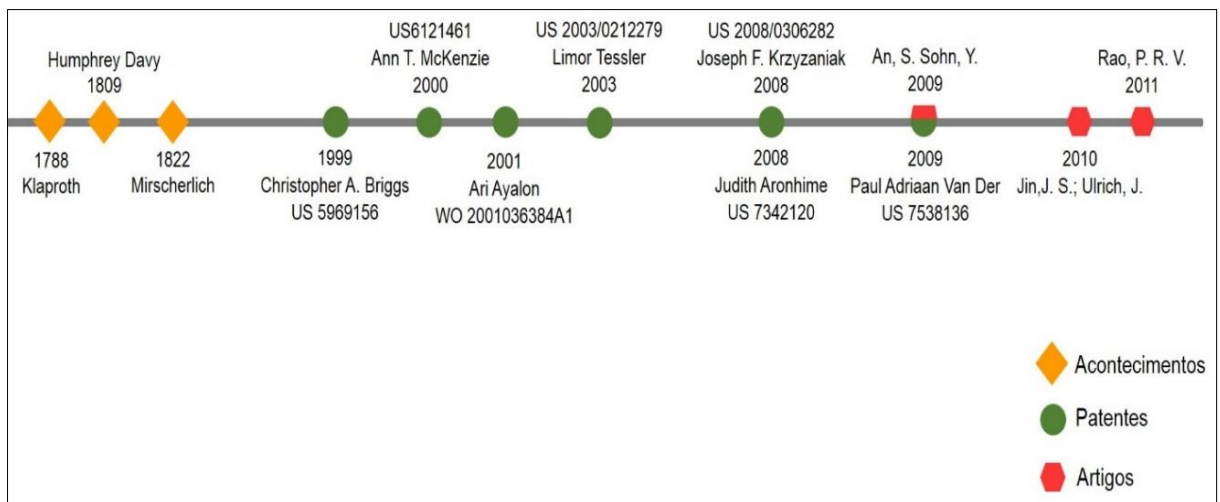
An (2009) obteve três formas cristalinas que foram caracterizadas por difratometria de raios X, calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG). Os autores, baseados nas diferenças obtidas entre os padrões e DSC, observaram que a amostra 3 se trata de uma nova forma cristalina, com boa estabilidade física após dois anos de armazenamento a temperatura ambiente.

Jin (2010) reporta dois novos solvatos cristalinos a partir da ATR amorfa, sintetizados utilizando N, N-Dimetilformamida (DMF) e etileno glicol (EG). Eles foram posteriormente caracterizados por difração de raios X, análise térmica e microscopia ótica de espectroscopia Raman com transformada de Fourier.

O trabalho de Rao (2011) relata um processo simples, eficiente, econômico e consistente, empregando etanol, ácido clorídrico, carvão ativado e técnicas de filtração para a obtenção de uma nova forma estável de ATR, caracterizada por difração de raios X. Este processo mostrou-se reprodutível e adequado.

Os acontecimentos sobre o polimorfismo, as patentes e os artigos sobre a ATR anteriormente mencionados estão representados em uma linha do tempo na Figura 3.

Figura 3. Linha de tempo dos acontecimentos sobre o polimorfismo, das patentes e artigos da atorvastatina cálcica



A cristalização a partir de solventes é um dos métodos mais utilizados na obtenção de formas polimórficas, empregando-se distintas temperaturas e diversos solventes. Dessa forma, é possível obter polimorfos, solvatos, hidratos ou amorfos que possivelmente possuem novas propriedades. No Quadro 2, é apresentado o processo de obtenção de formas polimórficas I, II, IV – XI, XIV, XVI e amorfo da ATR descritas na patente US 2003/0212279. Os processos de sínteses mais detalhados encontram-se na patente mencionada.

Quadro 2. Processos de obtenção de algumas formas polimórficas da atorvastatina cálcica

Polimorfos	Processo de Obtenção dos polimorfos da atorvastatina cálcica
I	A forma I pode ser obtida tratando qualquer cristal da ATR com água a temperatura até 100°C, por 16 horas. Os materiais de partida preferidos são os polimorfos V, VII, VIII, IX e X.
II	Produzida por aquecimento da forma XIV até 50°C, mantida a temperatura elevada durante 15 horas.
IV	Foi obtida suspendendo o cristal V da ATR em EtOH /OH a 50°C durante um período de tempo suficiente para causar a conversão. As misturas EtOH /OH preferidas contém cerca de 15% de OH.
V	O polimorfo V pode ser obtido por secagem da forma XII, em torno de 65°C durante 24 horas.
VI	A forma VI pode ser obtida dissolvendo qualquer outra forma da ATR, preferencialmente a forma cristalina I, em acetona e depois precipitando pela adição de um anti-solvente, preferivelmente água.
VII	Tratando as formas I ou V com EtOH, preferivelmente absoluto, à temperatura ambiente ou temperatura de refluxo durante um intervalo de 14 horas. Se o processo for realizado em EtOH em refluxo, a conversão está completa em cerca

	de 2,5 h. Se o procedimento for realizado em temperatura ambiente, é necessário um período mais longo.
VIII	Pode ser obtida a partir da forma V por tratamento com uma mistura de EtOH/OH, na proporção de 5:1 a uma temperatura aproximada de 80°C. Durante o aquecimento, o polimorfo V da ATR se dissolve gradualmente. Neste ponto, a suspensão deverá imediatamente resfriada à temperatura ambiente.
IX	Preparada suspendendo a forma VIII em etanol, preferencialmente etanol absoluto a temperatura ambiente durante um período, aproximado de 16 horas. Em seguida, a forma IX será recuperada da suspensão.
X	O polimorfo X pode ser preparado por tratamento da forma V ou I, suas misturas ou forma amorfa da ATR, com uma mistura de etanol e água, na proporção de 5:1, a temperatura de refluxo de preferência entorno de 1h.
XI	Pode ser obtida suspendendo a forma V da ATR em metiletilcetona ("MEK") à temperatura ambiente durante um período de tempo.
XIV	Em termos gerais, a XIV pode ser obtida a partir de uma suspensão de ATR em água.
XVI	A forma XVI pode ser produzida mantendo a XIV a uma temperatura entre 20 e 50°C, ou à temperatura ambiente. O cristal XIV será mantida nestas condições durante cerca de três horas.
Amorfo	O amorfo é preparado tratando qualquer outra forma da ATR com acetona a temperatura ambiente ou temperatura de refluxo, em torno 16 horas. Um material de partida preferido é a forma V.

Fonte: Patente N° US 2003/0212279, \*EtOH= Etanol

#### 4. Propriedades dos polimorfos

Os polimorfos apresentam diversas propriedades, sendo as mais relevantes para a indústria farmacêutica a solubilidade, a estrutura cristalina, a velocidade de dissolução, a estabilidade, a biodisponibilidade, a densidade, o ponto de fusão, a reologia, o escoamento do pó, entre outras (VIPAGUNTA; BRITAIN; GRANT, 2001).

O estudo do Shete (2010) avaliou as diferenças na molhabilidade e na velocidade de dissolução de estruturas cristalinas e amorfa da ATR. O autor reportou uma maior molhabilidade para o amorfo e uma velocidade de dissolução duas vezes maior do que a forma cristalina. Embora a forma amorfa do fármaco apresente maior solubilidade, a sua estabilidade é menor, pois a reatividade química das moléculas na rede cristalina aumenta, gerando resultados potenciais no efeito farmacológico.

Por outro lado, o estudo de Zerbini (2010) avaliou a velocidade de dissolução intrínseca (IDR) de três formas cristalinas da ATR, no qual a forma VIII apresentou maior velocidade de dissolução, seguida pelas formas VI e I. IDR é definida como a velocidade de dissolução de uma substância pura a determinadas condições de

avaliação. Desta maneira, a IDR apresenta maior correlação com a dinâmica de dissolução *in vivo* em comparação com o ensaio de solubilidade.

No Quadro 3 são apresentados as diferenças de cinco polimorfos da ATR (forma I – V). É observado que os valores dos picos de difração mais relevantes de cada polimorfo exibem diferenças entre os determinados ângulos de difração ( $2\theta$ ). As diferenças entre o d-espacamento (distância entre os planos dos átomos que dão origem aos picos de difração) e o valor da intensidade (intensidade relativa >25%) estão melhor detalhadas na patente mencionada. A ressonância magnética nuclear (NMR) mostra a posição do sinal em um espectro de NMR através do deslocamento químico (*chemical shift*), expresso em partes por milhão (ppm), no caso de substâncias aromáticas e metilenos.

Quadro 3. Padrões de difração ( $2\theta$ ) e deslocamentos químicos (NMR  $^{13}\text{C}$ ) dos polimorfos da atorvastatina cálcica

Polimorfos da atorvastatina cálcica	Padrão de difração	
	Picos de difração ( $2\theta$ )°	NMR $^{13}\text{C}$ (deslocamento químico)
I	9,150/9,470/10,266/10,560/11,853 /12,195/17,075/19,485/21,626/21,960/22,748/23,335/23,734/24,438/28,915/29,234	$\delta$ ppm: C12 ou C25 e C16 (182,8-159,3) Aromáticos (137,0-113,8) (73,1-64,9) Metilenos (47,4-21,3)
II	5,582/7,384/8,533/9,040/12,440(ampl) /15,771(ampl) /17,120-17,360/19,490/20,502/22,159-23,159(ampl) /29,504	$\delta$ ppm: C12 ou C25 e C16 (181-161) Aromáticos (140,5-114) (70,6-67,3) Metilenos (43,3-22,8)
III	4,123/4,993/5,768/7,670/8,451/15,962/16,619/17,731/18,267/18,870/19,480/19,484/20,294/21,105/21,670/23,318/24,405/24,967/25,397	$\delta$ ppm: C12 ou C25 e C16 (184,9-161,0) Aromáticos (140,5-114,9) (69,8-65,6) Metilenos (44,1-19,9)
IV	4,889/5,424/5,940/7,997/9,968/10,416/12,335/17,662/18,367/19,200/19,569/21,723/23,021/23,651/24,143	$\delta$ ppm: C12 ou C25 e C16 (186,4) Aromáticos (138,1-115,7) (71,5-63,5) Metilenos (46,5-17,9)
V	5,3 $\pm$ 0,2/8,3 $\pm$ 0,2/18-23/18 $\pm$ 0,2(máximo pico)	$\delta$ ppm: 63-73 (dois picos amplos) 42,3/41,8/40,4/25,9/21,9

Fonte: Adaptado de dados das patentes (US 6121461, US 5969156 e WO 01/36384 A1); \* $\delta$ : câmbio químico; ppm: partes por milhão; C12 ou 25, 16: carbono 12 ou 25, 16

A ATR pertence a uma grande variedade de fármacos que não têm a estrutura cristalina indexada ou determinada, o que dificulta sua comparação quantitativa, embora sua caracterização por difração de raios X seja descrita em patentes ou artigos. Nesse sentido, opta-se pela comparação qualitativa com difratogramas

encontrados na literatura, sendo a metodologia empregada pelos especialistas da área de difração nesses casos. Infelizmente, eventualmente encontra-se na literatura difratogramas com baixa qualidade e resolução, o que dificulta a avaliação qualitativa dos resultados. (ANTONIO, 2010).

## 5. Polimorfismo e biodisponibilidade

Os medicamentos, principalmente as formas farmacêuticas sólidas orais, compostos por fármacos que podem existir em mais de uma forma cristalina, podem sofrer um potencial efeito ou alteração na sua biodisponibilidade (BD). A influência do polimorfismo na BD se deve às propriedades intrínsecas do fármaco e aos processos de manufatura empregados na produção das formas farmacêuticas (HILFIKER, 2006; BERNSTEIN, 2002; ANTONIO, 2010).

Os polimorfos de princípios ativos com características de baixa solubilidade, entre eles a ATR, podem apresentar diferenças na sua BD, a qual abrange fatores farmacocinéticos, como a velocidade de dissolução, velocidade de absorção e concentração máxima *in vivo*, alterando a eficácia e segurança do produto farmacêutico (FDA, 2007, SINGHAL; CURATOLO, 2004).

A ATR apresenta uma baixa BD no organismo (12% - 14%) a partir de uma forma farmacêutica oral, ou seja, apenas essa pequena quantidade de fármaco é absorvida através do fenômeno da absorção e alcança a circulação sistêmica (SHAYANFAR; GRAVIMI; HAMISHEHKAR et al, 2013, SHETE, 2010).

No Quadro 4 são apresentados os fármacos que apresentam polimorfismo e sua influência na BD. Os fármacos são: carbamazepina, ritonavir, mebendazol, cloranfenicol, fenilbutazona e atorvastatina cálcica. As mudanças inadvertidas de forma polimórfica influenciam na velocidade de dissolução do fármaco, o que pode ocasionar uma possível alteração da eficácia do medicamento (HILFIKER, 2006).

Quadro 4. Fármacos que apresentaram problemas de biodisponibilidade em relação ao polimorfismo

Fármacos (grupo farmacológico)	Polimorfos	Problemas em relação à biodisponibilidade
Carbamazepina (Antiepilépticos)	Quatro formas polimórficas (I - IV)	Forma III > forma I (Velocidade de dissolução inicial). Forma I > forma III (AUC) (KOBAYASHI, 2000).
Ritonavir (Antirretroviral)	Cinco formas polimórficas Forma I e II foram mais caracterizadas	Vários lotes reprovaram nas especificações de dissolução, houve presença de mudança à forma polimórfica 50% menos solúvel (MORISSETTE, 2003).
Mebendazol (Anti-helmíntico)	Existem duas formas polimórficas	Solubilidade: Forma A < Forma C (SOUZA, 2018).
Cloranfenicol palmitato (Antibiótico)	Possui três formas polimórficas (A, B, C)	Forma B > forma A (Solubilidade) (KANENEWA, 1985).
Fenilbutazona (Antirreumático)	Existem formas polimórficas e solvatos. Formas anidras I e II mais estudadas	Formas anidras I e II exibem diferentes solubilidades (MATSUNAGA, 1976).
Atorvastatina cálcica (Hipolipemiante)	Mais de 30 formas polimórficas	ATR é instável, leva a baixa solubilidade. Forma de hidróxi-acida é convertida em lactona, 15 vezes menos solúvel (SHETE, 2010).

## 6. A relevância do estudo de polimorfismo na área farmacêutica

A indústria farmacêutica é a responsável pela produção e comercialização de medicamentos, garantindo produtos de alta qualidade, eficazes e seguros. Dentre os problemas mais relevantes na área farmacêutica, especificamente na área de desenvolvimento, o polimorfismo e sua influência na BD, na estabilidade e os efeitos na manufatura merecem destaque (HILFIKER, 2006; FDA, 2007; PRADO, 2015).

Os estudos relacionados ao polimorfismo e às características do fármaco podem ser uma grande vantagem durante a etapa de pré-formulação, permitindo obter conhecimento das suas propriedades. No caso da ATR, um fármaco que apresenta baixa solubilidade e polimorfismo, a utilização de uma forma cristalina mais solúvel, pode trazer melhoras na biodisponibilidade, mas, pode trazer problemas de instabilidade do medicamento e, conseqüentemente afetar na qualidade do produto (BERNSTEIN, 2002; SINGHAL; CURATOLO, 2004; AHJEL, 2009).

Outra característica dos fármacos em relação ao polimorfismo de relevância na área farmacêutica é o conhecimento sobre as propriedades mecânicas e a morfologia do fármaco, permite um melhor controle de pontos críticos, tais quais o fluxo do pó e



sua respectiva compressibilidade durante o processo de manufatura. Esses fatores auxiliam também na tomada de decisões para a otimização de estratégias na etapa de produção, evitando eventos inesperados que sejam capazes de afetar a estabilidade do produto e garantindo medicamentos de qualidade (RAO, 2011, HILFIKER, 2006; BERNSTEIN, 2002; MARTINS, 2010; BRITAIN, 2002).

Na área farmacêutica, desenvolver um medicamento utilizando fármacos que apresentam polimorfismo pode ser um grande desafio. Portanto, conhecer as características e propriedades físico-químicas deste fármaco pode facilitar o caminho e sucesso no desenvolvimento. Quanto maior o investimento e pesquisa na etapa de pré-formulação, menor a necessidade de uma futura investigação relacionada aos possíveis problemas do fármaco ou forma farmacêutica.

## **7. Considerações finais**

Esta revisão procurou compilar as informações mais relevantes da atorvastatina cálcica, abrangendo suas características físicas, o polimorfismo e suas propriedades, assim como a influência na sua biodisponibilidade. Embora tenham sido compreendidos os tópicos abordados nesse estudo, houve escassa informação bibliográfica específica sobre as propriedades dos polimorfos da ATR. É válido ressaltar que foram registradas muitas patentes sobre as formas cristalinas da ATR, no entanto, a descrição da caracterização dessas formas está incompleta, principalmente em relação às propriedades de solubilidade e dissolução.

## 8. Referências Bibliográficas

AHJEL, S. W.; LUPULEASA, D. Enhancement of solubility and dissolution rate of different forms of atorvastatin calcium in direct compression tablet formulas. **FARMACIA**. v. 57, n. 3, p. 291-300, 2009.

AN, S.; SOHN, Y. Crystal Forms of Atorvastatin. **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, n. 6, p. 933-936, 2009.

ANTONIO, G. S. Aplicação de difração de raios X por policristais e do método de rietveld de refinamento de estruturas cristalina no estudo de polimorfos cristalinos de fármacos: Introdução. 2010. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Química. São Paulo. 2010. 150 f. Dissertação (Doutorado em Química), **Instituto de Química**, Araraquara, São Paulo. 2010.

ARAUJO, G. L. B.; PITALUGA, A.; ANTONIO, S. G.; et al. Polimorfismo na produção de medicamentos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada**, v. 33, n. 1, p. 27-36, 2012.

ARONHIME, J.; LIDORHADAS, R.; NIDDAM, V.; et al. Crystal forms of atorvastatin hemi-calcium and processes for their preparations well as novel processes for preparing other forms. US 7342120 B2, 11 mar. 2008.

AYALON, A.; LEVINGER, M.; ROYTBLAT, S.; et al. Polymorphic form of atorvastatin calcium. WO 01/36384 A1, 25 may. 2001.

BERNSTEIN, J. Polymorphism in Molecular Crystals. 1th ed. Oxford University Press. p. 27, 244-248. 2002.

BCS Databse Search- TSRL, Inc. Disponível em <http://www.tsrlinc.net/results.cfm>. Acesso em 20/02/2018.

BECKMAN, W. Crystallization of Pharmaceutical Compounds-Polymorphs, Pseudo-Polymorphs and Particle Formation. **Eng. Life. Sci.**, v. 3, p. 113-120, 2003.

BEZZON, V. D. N. Definição de limites para a identificação e quantificação de polimorfos do fármaco finasterida por difração de raios X por policristais. 2013. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Química. São Paulo. 2013. 204 f. Dissertação (Mestrado em Química), **Instituto de Química**, Araraquara, São Paulo. 2013.

BRIGGS, C. A.; JENNINGS, R. A.; WADE, R.; et al Crystalline r- (r\*,r)-2-(4-difluorophenyl)-(3,6-dihydroxy-5-(1- methylethyl)-3-phenyl-4- (phenylamino) carbonyl-1h pyrrole-1-heptanoic acid hemi calcium salt (atorvastatin). US 5969156 06, 19 Oct. 1999.

BRITTAIN, H. G. Effects of Mechanical Processing on Phase Composition. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 91, n. 7, p.1573-1580, 2002.

CANSEL, K. O; OZGUR, E. et al. Development of a Suitable Dissolution Method for the Combined Tablet Formulation of Atorvastatin and Ezetimibe by RP-LC Method. **Current Drug Delivery**, 2015.

Food and Drug Administration (FDA). ANDAs. Pharmaceutical Solid Polymorphism chemistry, manufacturing, and controls information. **Guidance for industry**, USA, v. 72 n. 130, p. 37244-37245, 2007.

HALEBLIAN J.; MCCRONE, W. Pharmaceutical applications of polymorphism. **J Pharm Sci.**, v. 58, n. 8, p. 911-29, 1969.

HILFIKER, R. Polymorphism in the pharmaceutical industry. **Weinheim Wiley-VHC Verlag GmbH & Co. KGaA**, 1<sup>st</sup> ed. p. 1-40, 385-400, 2006.

International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Drugs for Human Use, Specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances Q6A, 1999. Disponível

em: <<http://www.ikev.org/haber/stabilite/kitap/40%201.12%20%20Stability%20Workshop%20ICH%20Q6A%20C%20.pdf>>. Acesso em: 25 Julho 2018.

JIN, J.; S.; ULRICH, J.; New Crystalline Solvates of Atorvastatin Calcium. **Chemical Engineering Technology**, v. 33, n. 5, p.839-844, 2010.

JUN, S.; MIKIO, I.; SUMINORI, K. Statins: Beneficial or Adverse for Glucose Metabolism. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 13, n. 3, p.123-129, 2006.

KANENEWA, N.; OTSUKA, M. Effect of grinding on the transformation of polymorphs of chloramphenicol palmitate. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 33, 1660–1668, 1985.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. Farmacologia Básica e Clínica. 12th ed. São Paulo. McGraw-Hill. p. 619-633. 2014.

KOBAYASHI, Y.; ITO, S.; ITAI, S.; YAMAMOTO, K. Physicochemical properties and bioavailability of carbamazepine polymorphs and dihydrate. **Int. J. Pharm.**, v. 193, p.137–146, 2000.

KRACUN, M.; KOCIJAN, A.; BASTARDA, A.; et al. Isolation and structure determination of oxidative degradation products of atorvastatin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, n. 5, p. 729-36, 2009.

KRZYZANIAK, J. F.; LAURENCE, G. M; PARK, A.; et al. Novel forms of r-(r\*,r)-2- (4-fluorophenyl)-beta. delta dihydroxy-5-(1-methylethyl)-3- phenyl-4-(phenylamino) carbonyl 1h-pyrrole-1-heptanoicacid calcium salt (2:1). US 2008/0306282, 11 dez. 2008.

LAWS, P. E.; SPARK, J. I.; COWLED, P. A.; FITRIDGE, R. A. The role of statins in vascular disease. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 27, p.6 -16, 2004.

MARTINS, T., F.; Aplicações Tecnológicas do Polimorfismo Farmacêutico. **Revista Processos Químicos**, p.15-17, 2010.

MCKENZIE, A. T.; LAFAYETTE, W. Form III crystalline r-(r,r)-2-(4- fluorophenyl)-b,8-dihydroxy-5-(1- methylethyl)-3-phenyl-4- (phenylamino) carbonyl-1h pyrrole-1-heptanoic acid calcium salt (2:1). US 6,121,461, 19 sep. 2000

MATSUNAGA, J.; NAMBU, N.; NAGAI, T. Physicochemical approach to biopharmaceutical phenomena. Polymorphism of phenylbutazone. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 24, p.1169–1172, 1976.

MORISSETTE, S. L. et al. Elucidation of crystal form diversity of the HIV protease inhibitor ritonavir by high-throughput crystallization. **PNAS**. v. 100, n. 5, p.2180-2184, 2003.

OLIVEIRA, M.A.; LACERDA, C.D.; BONELLA, A.F. Developing methods to compare tablet formulations of atorvastatin. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 4, p.801-810, 2012.

PRADO, L., D.; ROCHA, H., V., A. Estados Sólido na Indústria Farmacêutica. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p.2080-2112, 2015.

RAO, P., R., V., SOMANNAVAR Y. S.; Preparation of stable new polymorphic form of atorvastatin calcium. **Scholars Research Library**, v. 3, n. 5, p. 48-53. 2011.

ROCHA, C. F. W. Estudo de polimorfismo em medicamentos utilizando técnicas espectroscópicas aliadas a métodos quimiométricos: tipo de polimorfismo. 2010. Universidade de Campinas. Instituto de Química. São Paulo. 2010. 150 f. Dissertação (Doutorado em Química Analítica), **Instituto de Química**, Campinas, São Paulo. 2010.

ROTH, B., D.; The discovery and Development of Atorvastatin, a Potent Novel Hypolipidemic Agent. **Progress in Medicinal Chemistry**, v. 40, p. 1 – 20. 2002.

SANDS, D. E. Introduction to Crystallography. Dover Edition, United States of America. p.7-9. 1993

ROTH, B. D. Trans-6-2-(3- or 4-carboxamido-substituted pyrrol-1-yl) alkyl-4-hydroxypyran-2-one inhibitors of cholesterol synthesis. US 4,681,893, 21 jul, 1987.

SHAYANFAR, A.; GRAVIMI, H.; HAMISHEHKAR, H. et al, Coamorphous atorvastatin calcium to improve its physicochemical and pharmacokinetic properties. **J Pharm Pharm Sci**. v. 16, n. 4. p.577- 587, 2013.

SCHAAF, P. A. V.; BLATTER, F.; SZELAGIEWICZ, M.; et al. Crystalline forms of atorvastatin. US 7538136, 26 may. 2009.

SINGHAL, D.; CURATOLO, W. Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p.335-347, 2004.

SHETE, G.; PURI, V.; KUMAR, L.; BANSAL, A.K. Solid state characterization of commercial crystalline and amorphous atorvastatin calcium samples. **AAPS PharmSciTech**, v.11, p.598-609, 2010.

SOUZA, N. V. Desenvolvimento de método para avaliação do perfil de dissolução de suspensões de mebendazol. Ensaio de solubilidade. 2018. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2018.

TESSLER, L.; ARONHIME, J.; LIRON, R. L.; et al. Novel crystal forms of atorvastatin hemi-calcium and processes for their preparations well as novel processes for preparing other forms. US 20030212279, 13 nov. 2003.

VIPPAGUNTA, S. R.; BRITAIN, H. G.; GRANT, D. J. W. Crystalline solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n. 48, p.3-26, 2001.

WIERZBICKI, A. S.; POSTON, R.; FERRO, A. The lipid and non-lipid effects of statins. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 99, p.95 -112, 2003.

ZERBINI, A. P. A. Desenvolvimento de minicomprimidos contendo atorvastatina cálcica: Determinação da velocidade de dissolução intrínseca. 2010. 104f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2010.

## **Capítulo 2**

### **Caracterização físico-química dos polimorfos da atorvastatina cálcica**

## Resumo

O objetivo do presente estudo foi comparar e demonstrar a importância da caracterização físico-química em relação ao polimorfismo e destacar suas implicações para a atorvastatina cálcica. Para tanto, foram avaliadas quatro amostras do fármaco disponíveis no mercado brasileiro. Estas amostras foram caracterizadas por difração de raios X, microscopia eletrônica de varredura, tamanho de partícula, solubilidade, densidade verdadeira e análise térmica. Verificou-se que as amostras da atorvastatina cálcica analisadas eram a amorfa, polimorfo I, VIII e a última possui mistura de fases, evidenciadas na análise de difração de raios X, calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria. Através da análise das matérias-primas por microscopia eletrônica de varredura, observou-se a presença de diferentes hábitos cristalinos dos polimorfos I, VIII e mistura de fases da atorvastatina, sendo eles prismático, octaédrico e acicular, respectivamente. A forma amorfa, por sua vez, apresentou um formato irregular. Além disso, foi possível observar que a amostra do polimorfo VIII apresentou menor tamanho de partícula e, no ensaio de solubilidade, apresentou uma maior quantidade de fármaco dissolvido no tampão pH 6,8 em comparação com as demais. Outro fato, foi que as amostras cristalinas apresentaram maior densidade do que a amostra amorfa. Em conclusão, as amostras comerciais da atorvastatina cálcica exibiram diversos comportamentos que podem influenciar no desempenho durante a fabricação.



## 1. Introdução

A indústria farmacêutica brasileira vem crescendo consideravelmente nos últimos anos, sendo 11% só no ano de 2018 e com estimativa de subir duas posições no ranking mundial até o ano de 2023 (INTERFARMA, 2019). Outro indício do crescimento da indústria no Brasil é o resultado das importações dos insumos farmacêuticos, que alcançou sua máxima histórica em 2018 com quase U\$ 10 bilhões, indicando uma dependência do mercado externo (ABIQUIFI, 2019; TEIXEIRA, 2014).

Os medicamentos genéricos entraram no mercado brasileiro há 19 anos, após a promulgação da lei 9.787/99 em 1999 e, atualmente, têm uma cobertura para 90% das doenças. Em 2016, os medicamentos genéricos foram os mais vendidos, sendo o seu consumo de cerca de 32%, com previsão de aumento nos anos seguintes (BRASIL, 2017b). Em países como Estados Unidos, Reino Unido e China, o índice de consumo é superior a 70%. A expectativa do mercado brasileiro desses medicamentos é mais ampla para os próximos anos, uma vez que, a maior parte das patentes expira em 2019 (BRASIL, 2017c; INTERFARMA, 2019).

A resolução RDC 200/2017 estabelece vários requisitos para o registro de um medicamento genérico no Brasil. Dentre eles, encontra-se a documentação técnica da qualidade, no qual o solicitante deve apresentar um relatório com informações sobre as propriedades físico-químicas do ingrediente farmacêutico ativo, como a forma física, constante de dissociação (pKa), tamanho de partícula e o ponto de fusão (BRASIL, 2017a). Entretanto, levando em consideração que algumas indústrias dedicadas à produção de medicamentos genéricos procuram economizar recursos durante o desenvolvimento de produtos, cabe questionar se as informações apresentadas na documentação técnica de qualidade pelos fornecedores da matéria-prima são verificadas adequadamente pelos fabricantes.

A caracterização dos insumos farmacêuticos é rápida e de custo baixo, e permite obter informações relevantes, como suas propriedades físico-químicas. O conhecimento destas características é fundamental para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas, auxiliando durante a etapa de formulação e no processo de produção do medicamento, principalmente para fármacos que apresentam formas polimórficas (CARSTENSEN, 2001; NIAZI, 2007).

O polimorfismo em fármacos é considerado como a capacidade de o mesmo composto químico exibir no mínimo duas fases ou arranjos conformacionais (FDA, 2007). Dessa forma, alterações na forma polimórfica de matérias-primas utilizadas na produção de medicamentos, o hábito cristalino de diferentes polimorfos e tamanhos de partícula podem influenciar diretamente na solubilidade (GIORGETTI, 2012).

Levando em consideração o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), se os fármacos pertencem à classe II ou IV é porque apresentam baixa solubilidade e, conseqüentemente, a utilização de uma forma polimórfica diferente pode trazer impacto potencial na biodisponibilidade do medicamento. Portanto, as formas polimórficas dos fármacos devem ser detalhadamente estudadas e definidas, uma vez que, mudanças de fornecedores de matéria-prima são um contexto comum na indústria farmacêutica (GUPTA, 2006).

A atorvastatina cálcica (ATR) é um fármaco que possui polimorfismo e, atualmente, são descritas mais de 30 formas polimórficas em patentes e, algumas delas, disponíveis no mercado brasileiro. Isto torna relevante a caracterização do fármaco para controlar o seu processamento e compreender o seu comportamento, considerando que pertence à classe II do SCB (MOFFAT et al., 2004; DE OLIVEIRA, 2012, SHETE et al., 2010). Dessa forma, o objetivo do presente estudo é comparar e demonstrar a importância da caracterização físico-química em relação ao polimorfismo e destacar suas implicações para a ATR.

## **2. Material e métodos**

### **2.1 Material**

Amostras de atorvastatina cálcica cedidas gentilmente por laboratórios da indústria brasileira. Para o controle das amostras foram denominadas ATR1, ATR2, ATR3 e ATR4.

### **2.2 Difractometria de raios X (DRXP) pelo método em pó**

Os difratogramas das amostras foram obtidos utilizando difratômetro Bruker D8 Advance (Bruker, Massachusetts, USA). As amostras foram acondicionadas em porta-

amostra de acrílico com 20,0 mm de diâmetro, aplicando-se um intervalo angular entre 2-40° ( $2\theta$ ) para a coleta de dados, em temperatura ambiente.

### **2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A morfologia das amostras foi determinada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando o equipamento TM4000Plus (Hitachi High Technologies, Japão). As amostras foram colocadas e espalhadas em fita adesiva de carbono e, posteriormente, analisadas com tensão de aceleração 10,0 e 15,0 kV, em aumento de x800, x1000 e x1200.

### **2.4 Tamanho de partícula**

Para a determinação do tamanho de partícula das amostras, foi empregado o equipamento de difração de raios laser Granulometer Cilas 1090 (Cilas, Orleans, França). O princípio utilizado foi de Fraunhofer, através da via úmida para a amostra ATR1, ATR2 e ATR4 e pela via seca, a ATR3, já que está apresentou problemas de aglomeração durante o seu preparo para a via úmida.

Para a via úmida, preparou-se uma dispersão de cada amostra utilizando água, evitando aglomeração, que, em seguida, foi adicionada ao tanque do equipamento. Para a realização das medidas, os parâmetros aplicados foram de 320 rpm para o agitador mecânico e 120 rpm por 20 segundos para a bomba peristáltica; o ultrassom foi ativado em cada medida e, finalmente, a obscuração atingiu um intervalo de 15 – 20%. Para a análise pela via seca a amostra ATR3 foi inserida no porta-amostra e os parâmetros determinados foram: pressão de 500 mb, frequência e rpm 20Hz/20 com uma obscuração entre 15 – 18%.

### **2.5 Solubilidade**

A solubilidade foi determinada através do método do equilíbrio. Adicionou-se um excesso das amostras até a saturação de 20 mL de diferentes meios (HCl 0,1 M. tampão acetato pH 4,5, tampão fosfato pH 6,8 e água), preparados segundo a farmacopeia americana (USP41), em diferentes frascos fechados hermeticamente, em triplicata. As amostras foram submetidas a uma velocidade de rotação de 150 rpm

a 37± 2 °C em incubadora orbital TE – 420 (Tecnal, Piracicaba, Brasil), durante 72 horas. Ao final deste período, as amostras foram filtradas e quantificadas por espectrofotometria UV- vis a 244nm.

## **2.6 Densidade verdadeira**

A densidade verdadeira das amostras foi determinada em ultrapicnômetro de gás hélio, Ultrapycnometer 1000, (Quantachrome Corporation, Boyton Beach, FL Estados Unidos). Para cada ensaio pesou-se entre 1 e 2 gramas de material, que foram posteriormente transferidos para o porta-amostra do equipamento, permitindo a determinação do valor médio de densidade após a realização de 5 medições de volume com a purga de gás hélio.

## **2.7 Análise térmica**

### **2.7.1 Termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTG)**

As curvas de TG/DTG das amostras foram obtidas com o uso do equipamento TG/DTA 7200 (HITACHI, Tóquio, Japão). Previamente, calibrou-se o aparelho com oxalato de cálcio, em um cadinho de platina, no intervalo de temperatura de 30 a 900°C e razão de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>. Foram pesados cerca de 5 mg das amostras para a análise, sob atmosfera de nitrogênio de 100 mL.min<sup>-1</sup>. A análise foi realizada no intervalo de 30 a 600°C, a razão de aquecimento de 10°C min<sup>-1</sup>.

### **2.7.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

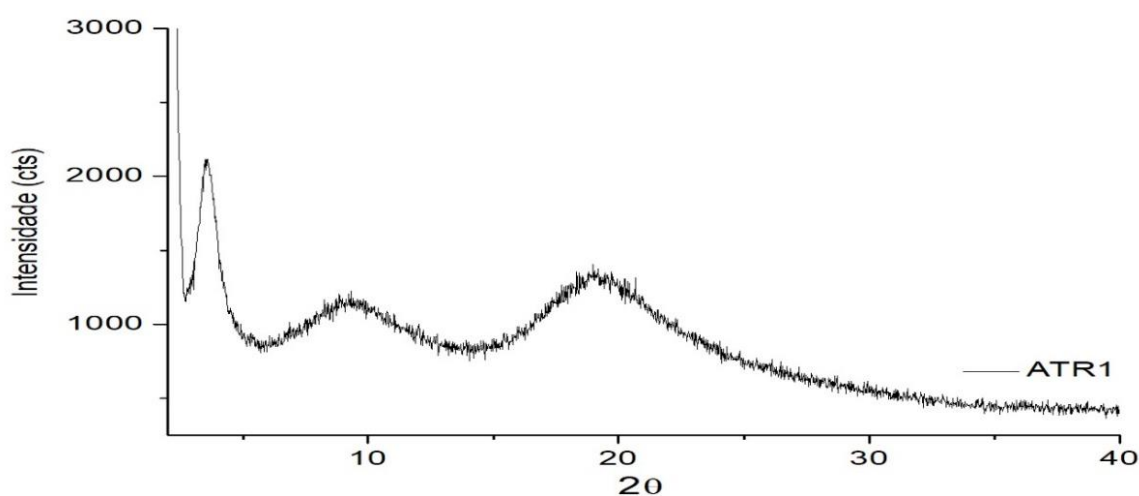
As curvas de DSC das amostras foram obtidas por meio do equipamento DSC 7020 (HITACHI, Tóquio, Japão). O equipamento foi calibrado com índio metálico padrão, sob razão de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>, em um intervalo de 50 a 200 °C. Foram pesados entre 1 a 2mg de amostra em um cadinho hermeticamente fechado, sob atmosfera de nitrogênio de 50mL min<sup>-1</sup>, a velocidade de aquecimento de 10°C min<sup>-1</sup>, no intervalo de 25 a 300 °C.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Difratomia de raios X (DRPX) pelo método em pó

Na Figura 1 é mostrado o difratograma obtido para a amostra ATR1. Os resultados apresentam ausência de picos bem definidos neste padrão, o que é indicador de uma estrutura amorfa, ratificada mais adiante através de análises complementares.

Figura 1. Difrátograma da amostra ATR1



Uma busca no banco de dados Cambridge Structural Database® de estruturas cristalinas para materiais orgânicos não resultou em estruturas determinadas para a ATR, embora seja reportada em patentes. Desta forma, a identificação das amostras analisadas baseia-se na análise qualitativa e comparativa com os difratogramas encontrados nas patentes US 5969156 e US 7342120. Nestas patentes são reportados polimorfos da ATR (forma I, II e IV) e (forma VI, VIII-XII, I, II, IV e amorfo), respectivamente.

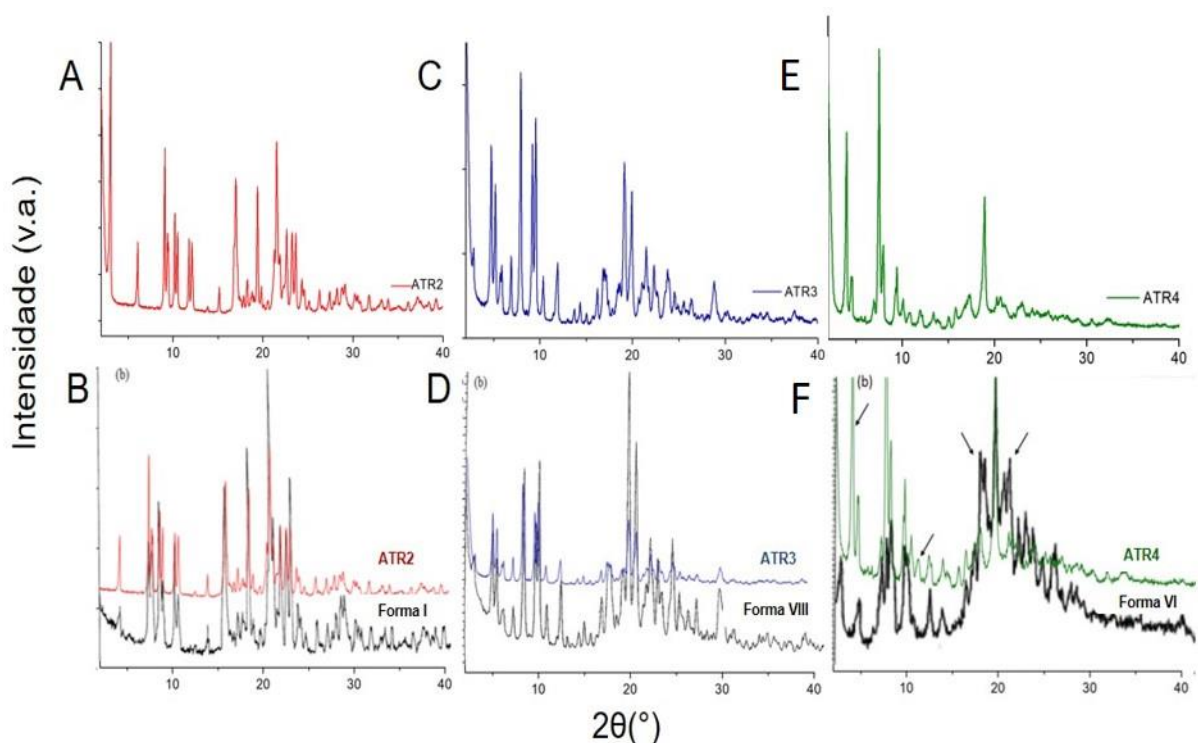
Nas Figuras 2 (A), (C) e (E) são apresentados os difratogramas das amostras ATR2, ATR3 e ATR4. Na Figura 2 (B) e (D), por sua vez, foram comparadas as estruturas medidas com os padrões encontrados na literatura citadas. Como pode ser visto, os picos de ambos padrões coincidem, mostrando que as fases encontradas nas amostras correspondem a forma I (ATR2) e forma VIII (ATR3).

Entretanto, não foi possível afirmar se a amostra ATR4 é monofásica ou polifásica. Nenhum padrão reportado na literatura coincide totalmente com a amostra medida. A baixa resolução dos dados apresentados nas patentes não oferece o

melhor modelo de comparação, pois apresentam baixa qualidade em termos de contagem e alto ruído.

Na Figura 2 (F), apresenta-se uma comparação entre o padrão obtido para a ATR4 e o padrão encontrado na patente US 7342120 que mais se aproxima, sendo este característico da forma VI. Porém, as setas indicam regiões que não coincidem entre os perfis. Dessa forma, pode-se sugerir com base somente nos padrões reportados que esta amostra pode ser uma mistura de fases polimórficas.

Figura 2. Difratogramas medidos das amostras A) ATR2 C) ATR3 E) ATR4 e, comparação qualitativa com os padrões da ATR B) forma I D) forma VIII F) forma VI encontrado na patente US 5969156 e US 7342120



No estudo de Kim e colaboradores (2008) foram apresentados resultados da caracterização de amostras de atorvastatina cálcica, entre elas (forma I), na qual é possível observar no difratograma picos característicos dessa forma polimórfica. Shete (2010), apresenta um estudo de seis amostras cristalinas da ATR por raios X e análise térmica, das quais cinco correspondiam à forma I. Por outro lado, Zhang (2009) utilizou uma amostra de ATR (forma I) com 99,4% de pureza, caracterizada por raios X e, a partir dela, sintetizou um amorfo, empregando hidroxipropilmetilcelulose mediante precipitação e processos de secagem.

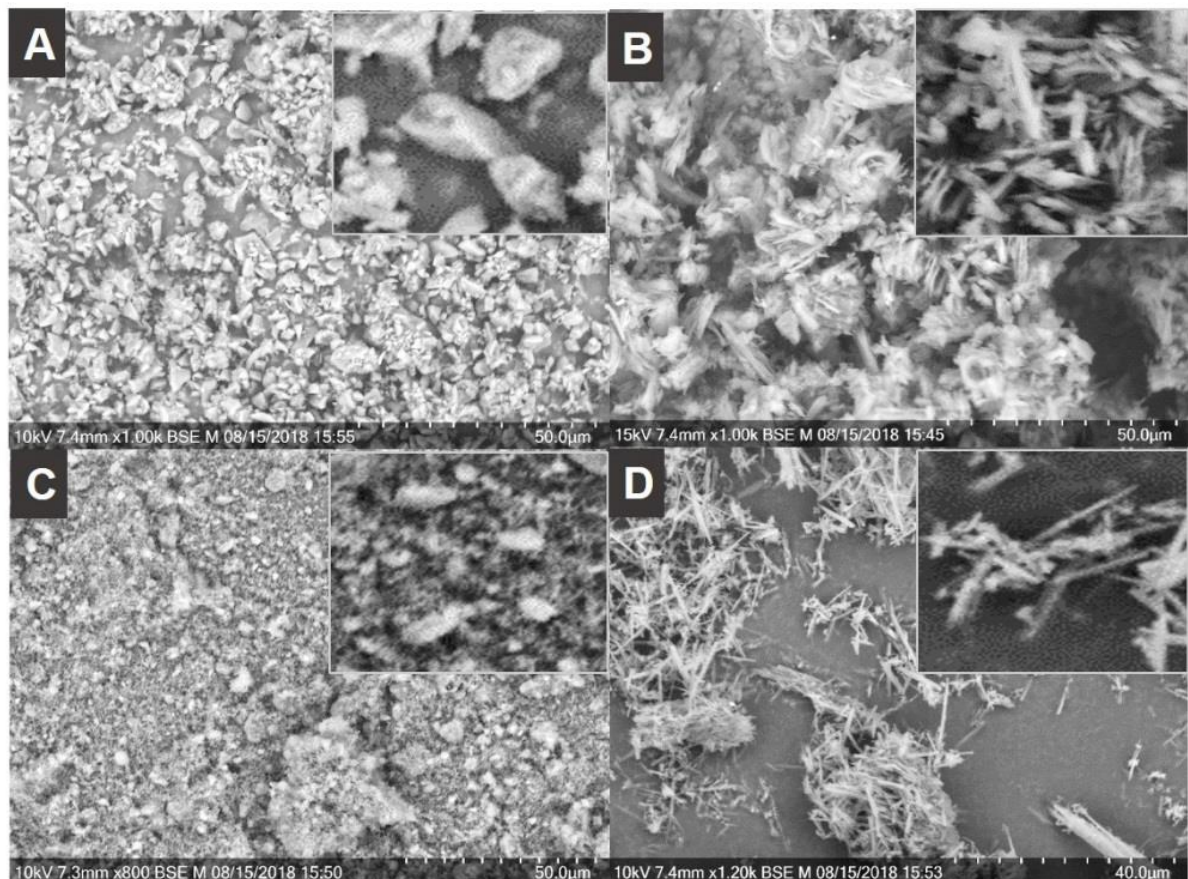
Os estudos expostos apresentam caracterização das amostras da ATR por difração de raios X, mas nenhum deles realizou uma comparação quantitativa, porque

a molécula não está disponível em uma base de dados que permitisse sua quantificação. Embora tenha-se executado uma comparação qualitativa dos polimorfos da ATR, existe ainda muito a ser estudado no sentido de quantificação das fases dos polimorfos da ATR, pois a realização de uma comparação quantitativa permite a caracterização mais ampla de um material mono ou multifásico.

### 3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise por MEV das amostras mostrou diferentes tipos de hábitos cristalinos. As Figura 3 (A), (B), (C) e (D), correspondem às ATR1, ATR2, ATR3 e ATR4, respectivamente. O formato irregular e os hábitos prismático, octaédrico e acicular, por essa ordem.

Figura 3. MEV das amostras A) ATR1 B) ATR2 C) ATR3 D) ATR4



Um estudo realizado por Shete (2010), focado na importância das formas físicas e caracterização do ingrediente farmacêutico ativo, mostrou, entre os resultados obtidos, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras

cristalinas (forma I) e amorfas da ATR, as quais exibiram hábitos aciculares e irregulares, respectivamente. Shivanand (2014), por sua vez, relata um estudo do aumento da solubilidade da atorvastatina cálcica, onde as amostras foram caracterizadas através do SEM e, o padrão da ATR utilizado apresentou um hábito octaédrico.

É relevante dizer que os polimorfos de um fármaco mantêm sua identidade química e as diferenças são apresentadas na organização dos empacotamentos na estrutura externa, resultando da interação de outros fatores, como grau de saturação, temperatura durante a cristalização e velocidade de crescimento das faces dos cristais. Embora o material sólido apresente um hábito distinto, não há garantia de que seja um polimorfo diferente (PFEFER, 1996).

Na figura 4 (D), a ATR4 apresenta partículas com forma de agulhas, as quais tendem a ter um fluxo pobre e, conseqüentemente, um índice de compressibilidade baixo em comparação com as outras amostras (ATR1 ATR2 ATR3) que mostraram hábitos octaédricos e irregular (PFEFER, 1996; PRADO, 2015). As diferenças nas propriedades mecânicas dos fármacos que apresentam polimorfismo poderiam estar relacionadas com o hábito do sólido, principalmente com os planos de deslizamento, ou seja, as regiões de menor interação entre planos adjacentes, permitindo que as camadas das moléculas possam deslizar-se, reduzindo o volume sob pressão (deformação plástica) e ajudando a compressão (LEWIS, 2015).

Dessa forma, o hábito cristalino e o formato de sólido podem influenciar em propriedades relevantes do fármaco, como já mencionado o fluxo. A avaliação do hábito pode auxiliar na tomada de decisões na seleção dos excipientes e processos que comprometam a estabilidade do polimorfo (PRADO, 2015).

### **3.3 Tamanho de partícula**

A avaliação da distribuição do tamanho de partícula das amostras foi diferente. Em ordem decrescente, o diâmetro aos 90 % da leitura ( $d_{90\%}$ ) da amostra foi de  $17,16 \pm 0,27 \mu\text{m}$  para a ATR2;  $13,73 \pm 0,45 \mu\text{m}$  para a ATR1;  $10,17 \pm 0,36 \mu\text{m}$  para a ATR 4 e, por último, a ATR2 com  $6,62 \pm 0,47 \mu\text{m}$ , sendo quem apresentou o menor tamanho. Durante o preparo da amostra para a análise do tamanho, a ATR3 apresentou aglomeração das partículas na via úmida e a aplicação de técnicas para



evitar esse fenômeno, como a ativação do ultrassom do equipamento, resultaram em partículas disgregadas, verificado pelo aumento da obscuração. Dessa forma, empregou-se a via seca para proceder com a análise dessa amostra.

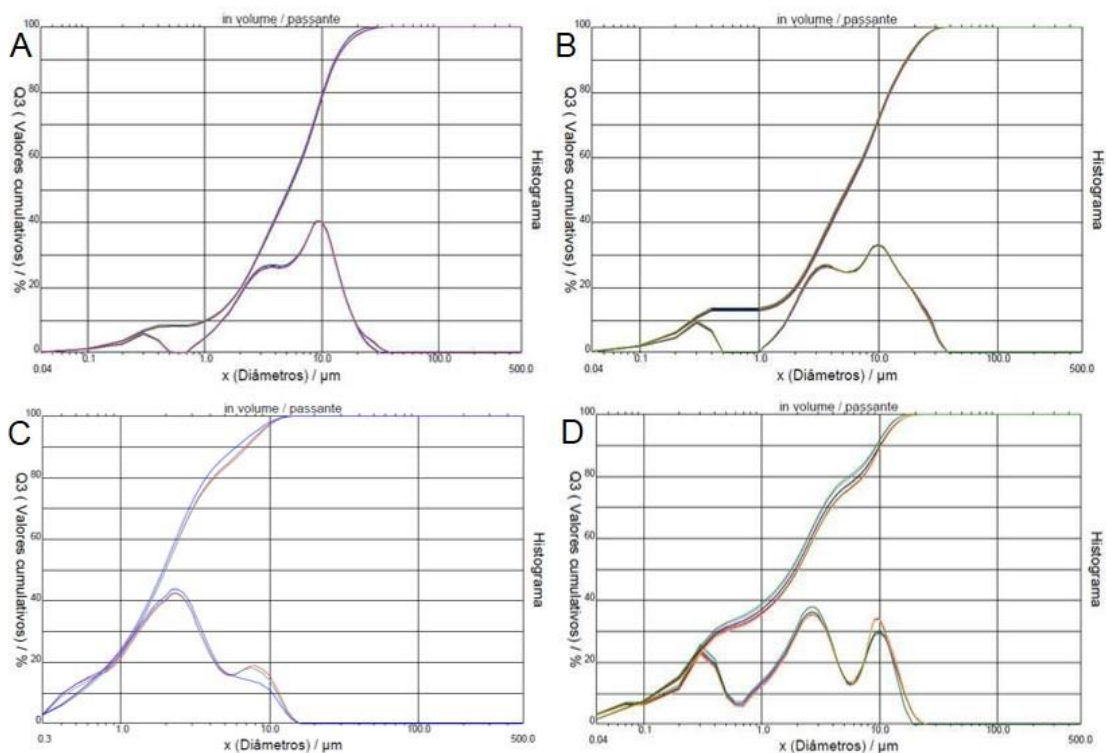
Tabela 1. Valores do diâmetro médio das amostras da ATR, d10% = diâmetro ao 10%

Amostra	d10% ( $\mu\text{m}$ )	d50% ( $\mu\text{m}$ )	d90% ( $\mu\text{m}$ )	Diâmetro Médio ( $\mu\text{m}$ )
ATR 1	0,99 $\pm$ 0,04	5,33 $\pm$ 0,08	13,73 $\pm$ 0,45	6,71 $\pm$ 0,28
ATR 2	0,27 $\pm$ 0,01	5,39 $\pm$ 0,13	17,16 $\pm$ 0,27	7,42 $\pm$ 0,13
ATR 3	0,52 $\pm$ 0,01	1,97 $\pm$ 0,04	6,62 $\pm$ 0,47	2,77 $\pm$ 0,10
ATR 4	0,13 $\pm$ 0,01	2,01 $\pm$ 0,10	10,17 $\pm$ 0,36	3,58 $\pm$ 0,20

n=6

Os histogramas representam a distribuição granulométrica dos pós das amostras avaliadas. A Figura 4 demonstra que a ATR3 apresenta uma distribuição das partículas mais uniforme, ao contrário da ATR4, que apresentou três populações distintas. Uma possível explicação para esse evento seria o hábito cristalino que cada uma apresenta.

Figura 4. Distribuição granulométrica das amostras A) ATR1 B) ATR2 C) ATR3 D) ATR4



O tamanho de partícula pode influenciar na solubilidade do fármaco, principalmente dos que apresentam baixa solubilidade e problemas de polimorfismo.

Dependendo do diâmetro das partículas, levando em consideração um material com dimensões proporcionais, a velocidade de dissolução pode ser afetada e, em consequência, a velocidade de absorção também. Nesse contexto, o efeito é capaz de modificar a biodisponibilidade (JOHNSON, 1996; KECK, 2006).

### 3.4 Solubilidade

Os resultados da solubilidade revelam que a amostra ATR1 (amorfo) foi mais solúvel em água. No entanto, um comportamento inesperado foi observado no meio tampão fosfato pH 6,8, no qual ATR1 apresentou uma menor solubilidade ( $0,313 \pm 0,026$  mg/mL) em comparação com a ATR3 (polimorfo VIII) ( $0,742 \pm 0,008$  mg/mL). Por outro lado, nos meios com pH inferior a 4,5, as amostras demonstraram ser menos solúveis com valores entre  $0,011 \pm 0,002$  a  $0,025 \pm 0,014$  mg/mL (Tabela 2).

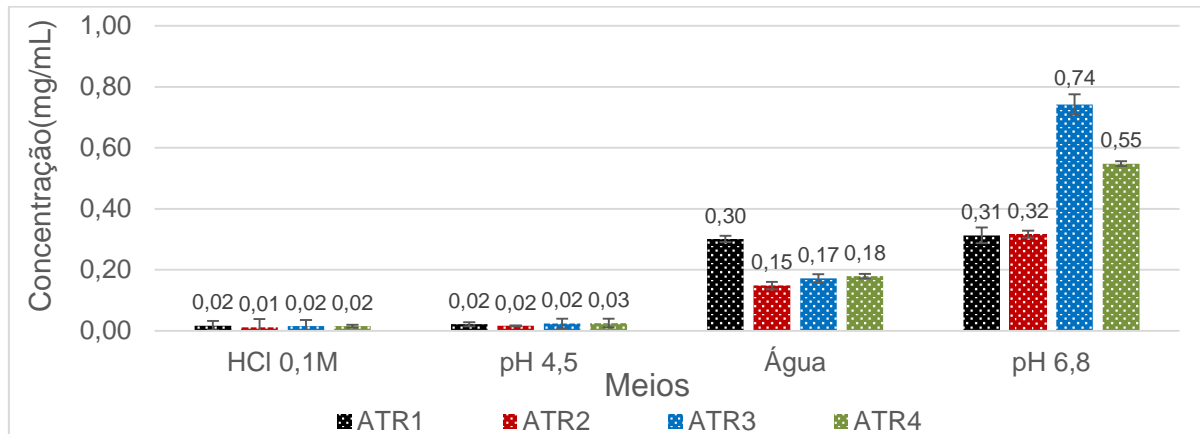
Tabela 2. Valores de solubilidade (mg/mL) das amostras ATR1, ATR2, ATR3 e ATR4 em diferentes meios

Amostras	HCl 0,1M	Tampão acetato pH 4,5	Água	Tampão fosfato pH 6,8
ATR1	$0,017 \pm 0,007$	$0,021 \pm 0,010$	$0,301 \pm 0,015$	$0,313 \pm 0,026$
ATR2	$0,011 \pm 0,002$	$0,016 \pm 0,012$	$0,148 \pm 0,028$	$0,317 \pm 0,012$
ATR3	$0,016 \pm 0,014$	$0,024 \pm 0,008$	$0,171 \pm 0,005$	$0,742 \pm 0,008$
ATR4	$0,015 \pm 0,016$	$0,025 \pm 0,014$	$0,179 \pm 0,020$	$0,548 \pm 0,033$

Desvios padrão ( $\pm$ DP), pH da água de osmose reversa: 6,25 – 6,8.

Observa-se que a solubilidade das amostras tende a aumentar conforme o pH do meio aumenta, sendo a constante de dissociação (pKa) da ATR igual a 4,46, ou seja, trata-se de um ácido fraco. Nesse sentido, a forma não ionizada do fármaco prevalece em meios como HCl 0,1M e tampão acetato pH 4,5, sendo praticamente insolúvel. Em contrapartida, as formas carregadas (ionizadas) são predominantes em água e tampão fosfato pH 6,8 (Figura 5) (MOFFAT et al., 2004; SHETE et al., 2010).

Figura 5. Solubilidade das amostras ATR1, ATR2, ATR3 e ATR4 avaliada nos diferentes meios estudados



As barras correspondem aos valores de desvio padrão, n=3, pH da água de osmose reversa: 6,25 – 6,8.

Devido às suas características físicas (capacidade tamponante), o meio tampão fosfato pH 6,8 permite observar as diferenças que as amostras avaliadas apresentam e a influência do tamanho de partícula. As amostras ATR1 e ATR2 ( $d_{90\%} = 13$  e  $17 \mu\text{m}$ , respectivamente), apresentam uma solubilidade semelhante, enquanto que as ATR3 e ATR4 ( $d_{90\%} = 6$  e  $10 \mu\text{m}$ , respectivamente), apresentam valores de solubilidade maiores. No meio que contém apenas água, mostra-se maior solubilidade para a ATR1 (amorfo), característico do polimorfismo, mas não a influência do tamanho de partícula.

Teoricamente, pode-se associar a estabilidade do fármaco com a solubilidade, de forma que quanto mais estável for o material, menor é sua solubilidade. Então, as amostras avaliadas apresentam estas características até o meio água. No entanto, a ATR1 (amorfa) apresentou menor solubilidade em tampão fosfato pH 6,8 em comparação com as formas cristalinas, sendo contraditório, de maneira que é importante considerar o estudo dessa amostra ATR1.

Por outro lado, existem técnicas para melhorar a solubilidade de um fármaco como relatado no trabalho de Shivanand (2014), por sua vez, expõe um aumento da solubilidade da atorvastatina cálcica mediante técnicas de complexação utilizando ciclodextrinas.

### 3.5 Densidade verdadeira

Os resultados obtidos para o ensaio de densidade verdadeira das amostras estão contidos na Tabela 3.

Tabela 3. Valores da densidade verdadeira das amostras da ATR

Amostras	Peso (g)	Media volume (mL)	Média densidade (g/ mL)
ATR1	2,061	1,475	1,397 ± 0,003
ATR2	2,008	1,413	1,421 ± 0,009
ATR3	1,185	0,792	1,496 ± 0,003
ATR4	1,375	0,934	1,472 ± 0,007

n=5

Lee (2014), no trabalho Practice Guide to pharmaceutical polymorph screening & selection, resume a relação da densidade com a estabilidade termodinâmica do fármaco. É possível concluir que quanto maior a densidade, mais estável a forma polimórfica. Desta forma, as amostras da ATR referentes às formas cristalinas (ATR2, ATR3 e ATR4) apresentaram maior estabilidade do que a amostra amorfa (ATR1).

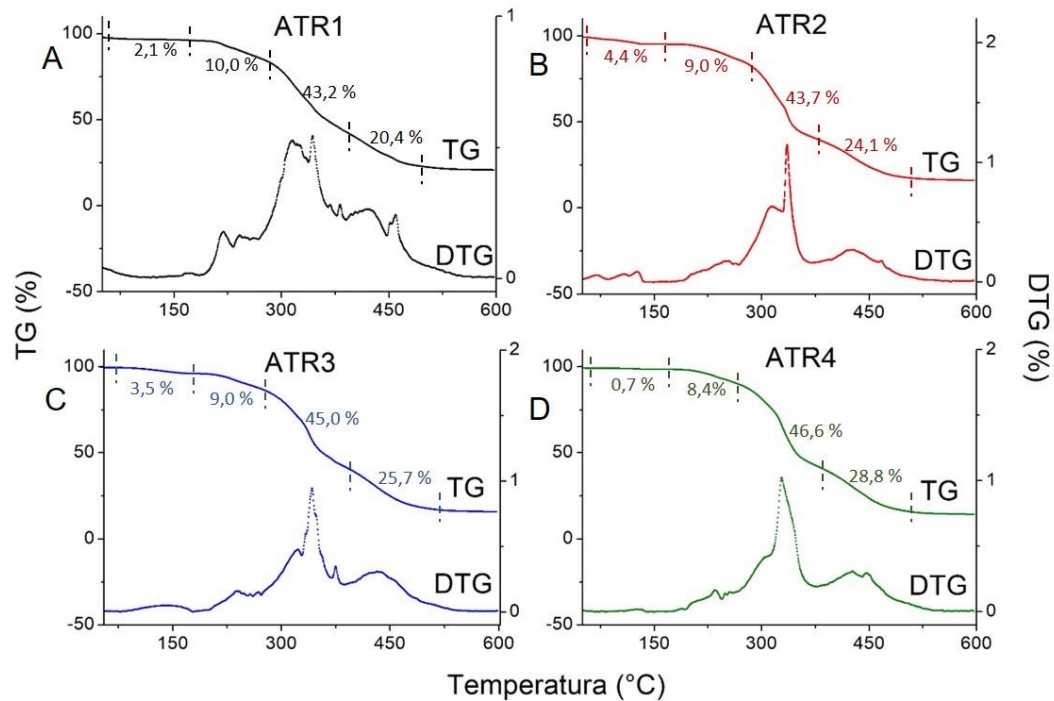
### 3.6 Análise térmica

#### 3.6.1. Termogravimétrica (TG) e termogravimétrica derivada (DTG)

Na Figura 7 (A), (B), (C) e (D) são apresentadas as curvas individuais de TG e DTG das amostras analisadas. Na Figura 7(A), correspondente à amostra ATR1, ocorreu uma perda de massa de 2,1% em torno de 100 °C. A Figura 7(B), por sua vez, representa a ATR2 e sua curva de TG apresentou um declínio. De modo paralelo, no intervalo de temperatura entre 50 e 150°C, sua curva de DTG mostra três picos, correspondentes à perda de massa de 4,4%, esses eventos das amostras mencionadas foram registrados por Kim e colaboradores (2008) e Zhang (2009).

Na sequência, a curva termogravimétrica referente à ATR3, mostra que a amostra perdeu 3,5% da massa até os 150 °C, aproximadamente (Figura 6(C)). Na curva de TG da ATR4, verificou-se uma perda de massa de 0,7% em torno das mesmas temperaturas das análises anteriores. Pode ser observado que, a maior perda de massa (70%) ocorreu para todas as amostras nas temperaturas a partir dos 200 °C.

Figura 6. Curvas de TG e DTG das amostras a) ATR1 B) ATR2 C) ATR3 D) ATR4



A Tabela 4 apresenta os dados termogravimétricos obtidos da degradação térmica das amostras ATR1, ATR2, ATR3 e ATR4.

Tabela 4. Valores da degradação por TG/DTG das amostras a) ATR1 B) ATR2 C) ATR3 D) ATR4

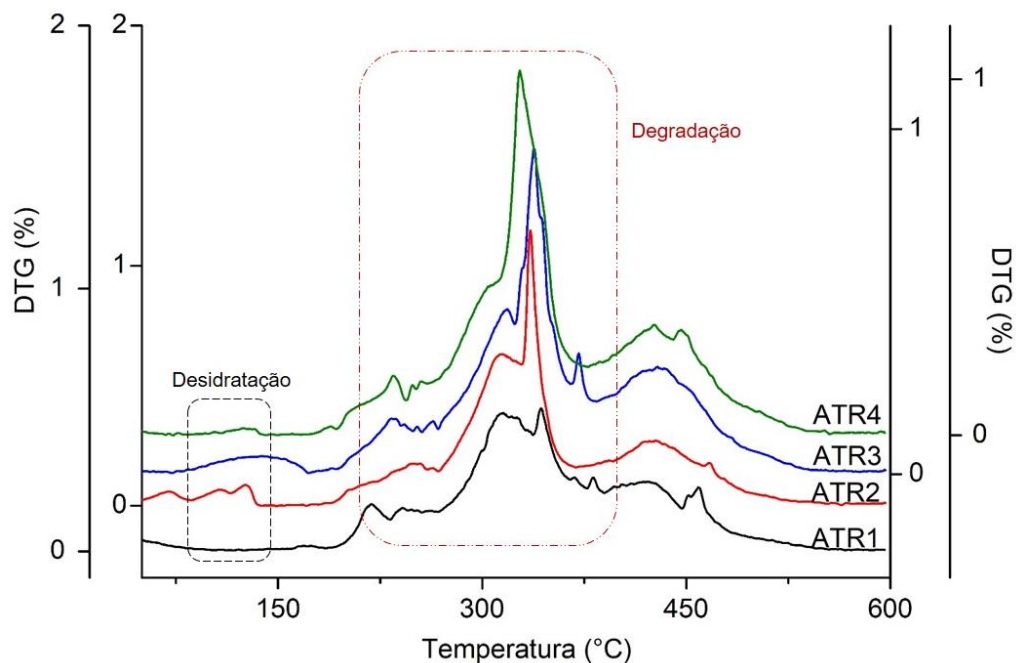
Amostras	Eventos Térmicos	Degradação $\Delta$ (%)			
		$m_1$	$m_2$	$m_3$	$m_4$
ATR1	$T^{\circ}_{\text{pico DTG}}$ (°C)	111,9	217,0	321,8	427,4
	Perda de massa (%)	2,1	10,0	43,2	20,4
ATR2	$T^{\circ}_{\text{pico DTG}}$ (°C)	104,6	252,7	336,7	425,9
	Perda de massa (%)	4,4	9,0	43,7	24,1
ATR3	$T^{\circ}_{\text{pico DTG}}$ (°C)	131,8	234,5	339,1	432,5
	Perda de massa (%)	3,5	9,0	45,0	25,7
ATR4	$T^{\circ}_{\text{pico DTG}}$ (°C)	123,1	235,2	329,5	434,1
	Perda de massa (%)	0,7	8,4	46,6	28,8

$\Delta m$  (%): variação porcentual da massa,  $T^{\circ}_{\text{pico DTG}}$ : Temperatura do pico DTG

As diferenças entre as curvas de TG das amostras analisadas são aparentemente mínimas, por isso, apresentou-se a comparação das curvas de DTG (Figura 7), na qual é possível observar as diferenças entre os eventos principais, como desidratação e degradação. As amostras (ATR2 e ATR3) indicam a maior perda de

moléculas de água (desidratação), correspondente à água adsorvida pelas amostras, possivelmente do ambiente. Por outro lado, na amostra ATR4, a perda de massa foi menor, sendo possível dizer que esta é menos higroscópica, de acordo com a curva de DTG. Por último, o evento da degradação ou decomposição foi entre 200 e 350°C, temperatura onde foi registrada a maior perda de massa de todas as amostras.

Figura 7. Comparação das curvas de DTG das amostras ATR1, ATR2, ATR3 e ATR4



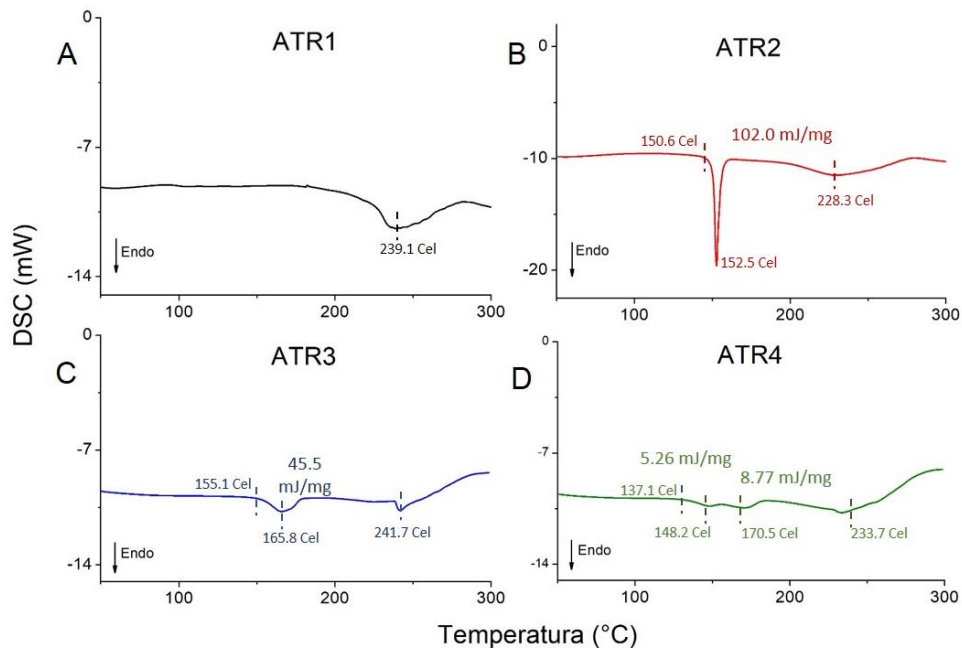
### 3.6.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas individuais de DSC das amostras de ATR estão apresentadas na Figura 8 (A), (B), (C) e (D). O gráfico 9 (A) indica uma amostra ATR1 (amorfo) com ausência do ponto de fusão (SILVA, 2016 apud Carvalho, 2012). A curva de DSC da ATR2 está representada na Figura 9 (B) e mostra o ponto de fusão a 150,6 °C (Onset) com uma entalpia de 102 mJ/mg, eventos semelhantes foram reportados por Zhang (2009) e Shete (2010).

A curva de DSC da ATR3 é apresentada na Figura 9 (C), no qual aparece o evento correspondente a fusão com uma entalpia de 45 mJ/mg, metade da energia utilizada em relação ao evento da ATR2, ainda assim na temperatura 155,1 °C. A Figura 9 (D), apresenta as curvas de DSC da ATR4, a qual possui dois eventos a

temperaturas de 135,3 e 155 °C, respectivamente. Os eventos térmicos a temperaturas maiores de 200 °C são correspondentes à decomposição das amostras analisadas, levando em consideração associando com as curvas de TG.

Figura 8. Curvas de DSC das amostras: a) ATR1 B) ATR2 C) ATR3 D) ATR4



A Tabela 5 apresenta os dados a partir do ensaio de DSC obtidos da fusão e degradação térmica das amostras ATR1, ATR2, ATR3 e ATR4.

Tabela 5. Eventos termogravimétricos das amostras a) ATR1 B) ATR2 C) ATR3 D) ATR4

Amostra	Eventos Térmicos	T° <sub>onset</sub> (°C)	T° <sub>pico</sub> (°C)	T° <sub>offset</sub> (°C)	Entalpia ( $\Delta H_{\text{fusão}}$ ) mJ/mg
ATR1	Degradação	227,3	239,1	269,8	
ATR2	Fusão	150,6	152,5	155,1	102,0
	Degradação	202,1	228,3	272,5	
ATR3	Fusão	155,1	165,8	175,3	45,5
	Degradação	239,5	241,7	245,3	
ATR4	Fusão	137,1	148,2	154,0	5,26
	Degradação	229,9	233,7	264,0	

T°<sub>onset</sub> (°C): Temperatura inicial, T°<sub>pico</sub> (°C): Temperatura do pico, T°<sub>offset</sub> (°C): Temperatura final

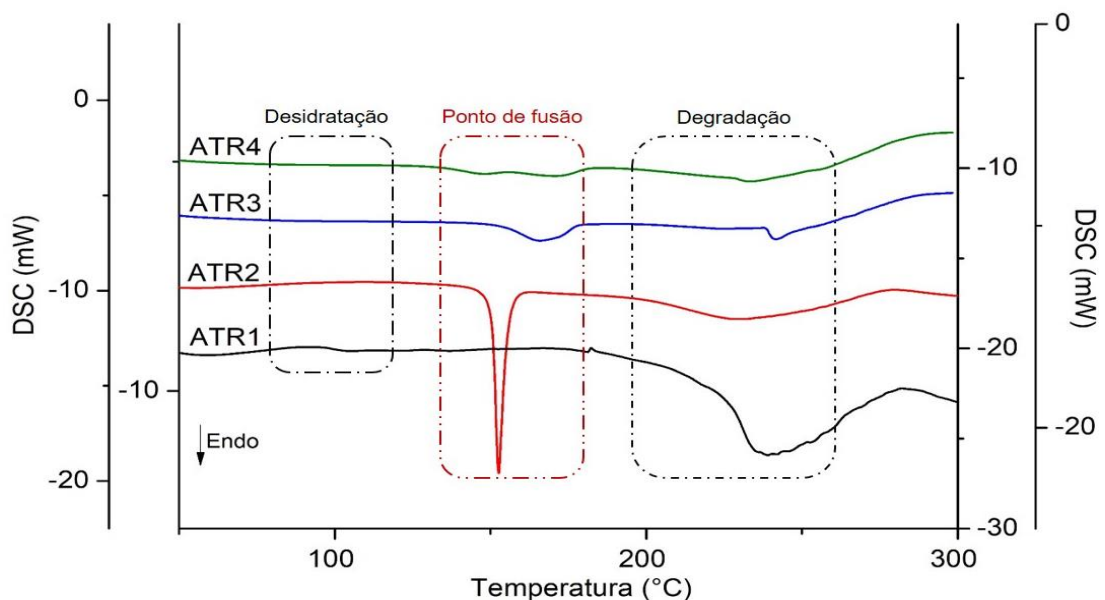
Segundo a literatura, um ponto de fusão da ATR pode ser observado no intervalo de 159 e 161 °C (SONJE, 2011; CHEMICALIZE, 2019). Embora a amostra ATR2 tenha apresentado um pico de fusão bem definido, este ocorreu um pouco antes à temperatura mencionada na literatura, o que pode ser explicado pelas diferentes condições do ensaio, como a atmosfera inerte e controlada.

Em contrapartida, o pico de fusão da amostra da ATR3 não foi bem definido e apresentou a metade da energia (entalpia) utilizada em relação da ATR2, isto poderia ter acontecido pela menor quantidade de massa utilizada no ensaio ou talvez pelas impurezas do material.

Em relação à amostra ATR4, observou-se dois eventos. O primeiro pode ser relacionado com a temperatura de transição vítrea em formas amorfas da ATR (SONJE, 2011) e o segundo evento referente à temperatura de ponto de fusão da forma cristalina do fármaco avaliado.

A Figura 9 apresenta a comparação das curvas de DSC das amostras estudadas.

Figura 9. Comparação dos eventos de DSC das amostras ATR1, ATR2, ATR3 e ATR4



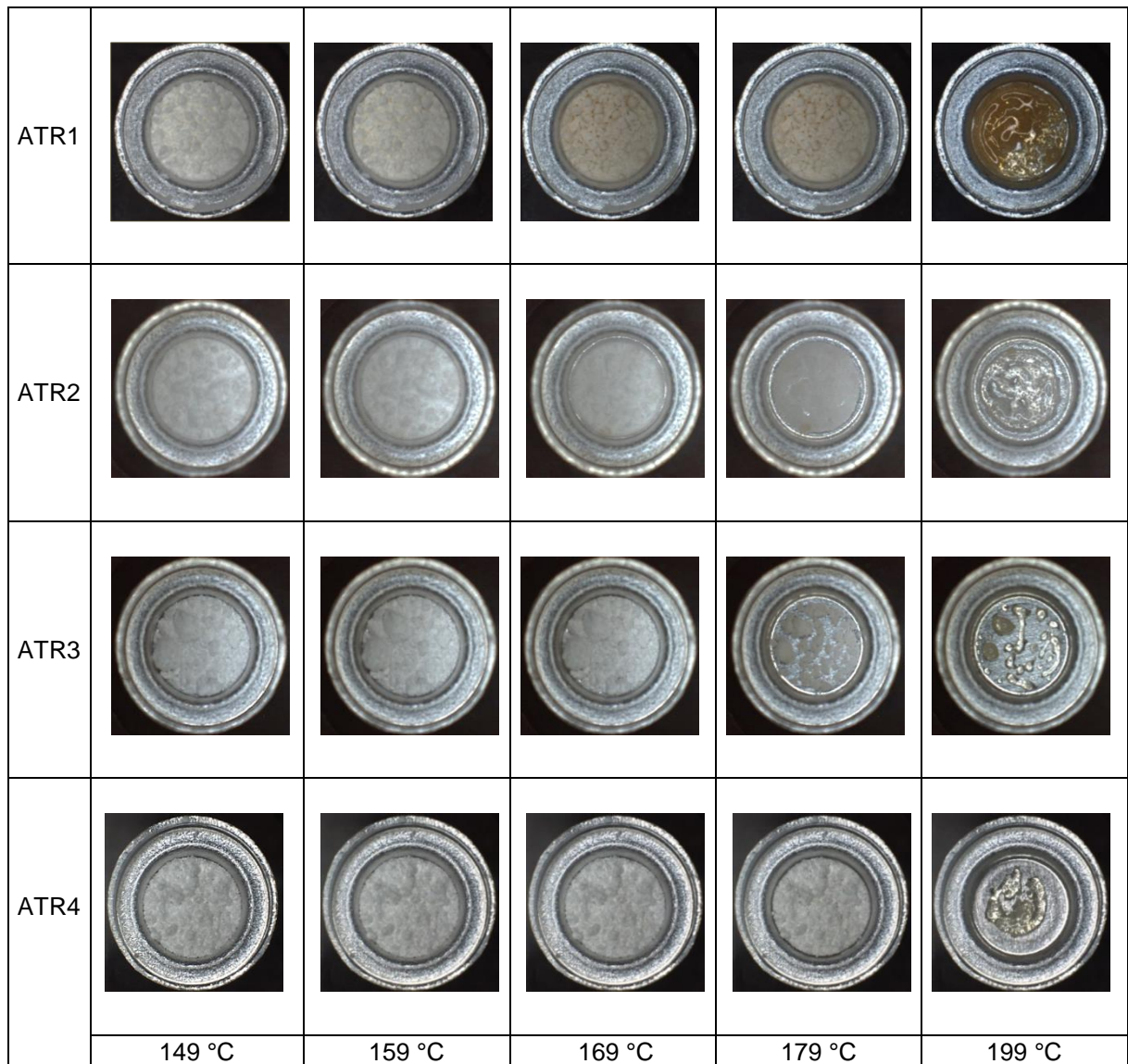
Na Figura 10 é apresentado a visão real das amostras a partir da análise de DSC. As condições que foram executadas são mais semelhantes a um ensaio feito por TG, devido ao fato de que o cadinho é exposto (sem tampa) à lente da câmera.

Dessa forma, a amostra ATR1 (amorfo) apresenta indícios de ser mais instável, já que à temperatura de 169 °C, observa-se uma mudança em sua aparência física,



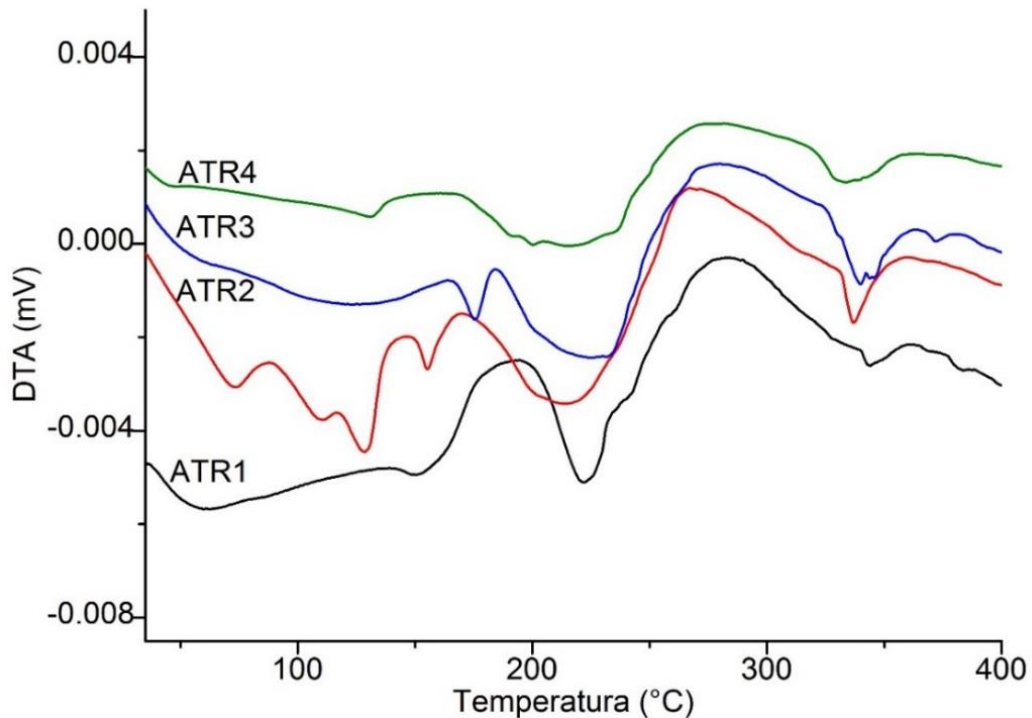
em comparação com as demais amostras ATR2, ATR3 e ATR4. Por outro lado, as amostras ATR2 e ATR4 parecem ser mais estáveis. Levando em consideração que a ATR3 (polimorfo VIII) apresentou um menor tamanho de partícula, evidencia-se um comportamento diferente às demais, a partir da análise de DSC.

Figura 10. Real view das amostras ATR1, ATR2, ATR3 e ATR4 a partir do DSC, entre as temperaturas 149-199 °C



A Figura 11 apresenta as curvas de DTA das amostras ATR1, ATR2, ATR3 e ATR4 a partir do ensaio de TG. As curvas de DSC das amostras da ATR no real view foram idênticos às curvas de DTA, já que, as condições da exposição das amostras ao sistema de aquecimento do equipamento de DSC e TG, nesse caso são semelhantes.

Figura 11. Comparação das curvas de DTA das amostras ATR1, ATR2, ATR3 e ATR4



Os estudos mencionados sobre os eventos em relação às curvas de TG da ATR, da forma I, reportam que a perda de massa aparece em forma escalonada entre 50 e 140 °C, pertencentes a eventos de desidratação. Referente às curvas de DSC, o ponto de fusão é manifestado a temperaturas de 140 e 170 °C. Para a ATR2, os eventos mencionados tanto de TG e DSC, como o ponto de fusão foi de 150,6 °C, ratificando que essa amostra corresponde à forma I.

Segundo os resultados discutidos e os estudos comparados, também é possível concluir que a degradação da amostra, por sua vez, ocorre a temperaturas maiores que 190 °C, esse evento esteve presente em todas as amostras da ATR. Infelizmente, não foi possível fazer uma comparação dos eventos térmicos antecedentes à decomposição das amostras ATR3 e ATR4, devido à ausência de informação na literatura.

#### **4. Conclusões**

A caracterização físico-química de polimorfismos de medicamentos é de extrema importância, pois ajuda a entender o comportamento da matéria-prima e suas condições de manuseio e, deveria ser parte da qualificação dos fabricantes. Como cada polimorfo apresenta propriedades físico-químicas únicas, sua caracterização é fundamental para poder otimizar o desenvolvimento de produtos farmacêuticos eficazes, seguros e de qualidade.

De acordo com as comparações dos resultados obtidos, as amostras comerciais de ATR disponíveis no mercado brasileiro exibiram diferentes comportamentos, conforme a caracterização físico-química feita, podendo influenciar no desempenho do produto final.

Além disso, a solubilidade das amostras dos polimorfos avaliados é diretamente influenciada pelos diferentes pH do meio, sendo um fator importante para a ATR, uma vez que, ela possui uso farmacológico e, conseqüentemente, sua eficácia e absorção dependem da concentração do produto final.

## 5. Referências Bibliográficas

ABIQUIFI, Associação brasileira da indústria de insumos farmacêuticos. Informação sobre o mercado. São Paulo, 10 de jul. de 2019. Disponível em: <http://abiquifi.org.br/mercado>.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Concessão e renovação do registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos. 2017a. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3836387/RDC\\_200\\_2017\\_COMP.pdf/3b8c3b31-24cb-4951-a2d8-8e6e2a48702f](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3836387/RDC_200_2017_COMP.pdf/3b8c3b31-24cb-4951-a2d8-8e6e2a48702f). Acesso em: Agosto 2019

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Genérico é medicamento mais comercializado. 2017b. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset\\_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/generico-e-tipo-de-medicamento-mais-vendido-no-brasil/219201/pop\\_up?\\_101\\_INSTANCE\\_FXrpx9qY7FbU\\_viewMode=print&\\_101\\_INSTANCE\\_FXrpx9qY7FbU\\_languageId=pt\\_BR](http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/generico-e-tipo-de-medicamento-mais-vendido-no-brasil/219201/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageId=pt_BR). Acesso em: agosto 2019

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Registro de medicamentos genéricos faz 18 anos. 2017c. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset\\_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/registro-de-medicamentos-genericos-faz-18-anos/219201/pop\\_up?\\_101\\_INSTANCE\\_FXrpx9qY7FbU\\_viewMode=print&\\_101\\_INSTANCE\\_FXrpx9qY7FbU\\_languageId=pt\\_BR](http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/registro-de-medicamentos-genericos-faz-18-anos/219201/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageId=pt_BR). Acesso em: Agosto 2019

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

CHEMICALIZE. Disponível em: <https://chemicalize.com/#/calculation>. Acesso em 15/02/2019.

FDA. Food and Drug Administration. ANDAs. Pharmaceutical Solid Polymorphism chemistry, manufacturing, and controls information. **Guidance for industry**, USA, v. 72 n. 130, p. 37244-37245, 2007.

GIORGETTI, L. Desenvolvimento e caracterização de minicomprimidos contendo belsilato de anlodipino. 2012. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2012.

GUPTA, P. K. Pharmaceutical testing, analysis and control: dissolution. In: REMINGTON. The science and practice of pharmacy. 21ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. v. 4 n. 35. p.672-690, 2006.

INTERFARMA, **Associação da indústria farmacêutica e pesquisa**. Revista 2019. São Paulo, 19 de jul. de 2019. Disponível em: <https://www.interfarma.org.br/guia/guia-2019/>.

JOHNSON, K. C.; SWINDELL, A. Guidance in the setting of drug particle size specifications to minimize variability in absorption. **Pharmaceutical research**. v. 13, n.12, 2006.

KECK, C. M.; MULLER, R. H. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenization. **European Journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**. v. 62, p.3-16, 2006.

KIM J.; KIM M.; PARK H. J. et al. Physicochemical properties and oral bioavailability of amorphous atorvastatin hemi-calcium using spray-drying and SAS process. **International Journal of Pharmaceutics**. p.211-219, 2008.

KIM, M. S.; JIN, S. J.; KIM, J. S. et al. 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.

LEE E. H. Practice Guide to pharmaceutical polymorph screening & selection. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**. p.163-175, 2014.

LEWIS, A.; SECKLER, M.; KRAMER, H.; VAN ROSMALEN, G.; Industrial Crystallization: Fundamentals and Applications. Cambridge University Press: Cambridge, 2015.

NIAZI, S. K. Handbook of pre-formulation: **Chemical, Biological and botanical Drugs**, New York: Inform Healthcare USA, Inc., v. 1, cap.3, p. 57-86, 2007.

OLIVEIRA, M.A.; LACERDA, C.D.; BONELLA, A.F. Developing methods to compare tablet formulations of atorvastatin. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.48, n.4, p. 801-810, 2012.

PFEFER, G.; BOISTELLE, R. Control of Molecular Crystals Morphology. **Chemical Engineering Research and Design**, p. 74, 744, 1996

PRADO, L. D.; ROCHA, H. V. A. Estado solido na indústria farmacêutica: Uma breve revisão. Ver. **Virtual Quim.** v.7, n 6, p. 2091 – 2093, 2015.

SHETE, G.; PURI, V.; KUMAR, L.; BANSAL, A.K. Solid state characterization of commercial crystalline and amorphous atorvastatin calcium samples. **AAPS PharmSciTech**, v.11, p. 598-609, 2010.

SHIVANAND S.; JAGADEVAPPA P. Design, characterization and evaluation of inclusion complexes of poorly soluble atorvastatin calcium. **Unique Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences**. v. 2, n. 2, p. 88-96, 2014.

SILVA, P. E.; PEREIRA, V. A. M. et al. Compatibility study between atorvastatin and excipients using DSC and FTIR. **J. Therm Anal. Calorim.** v.123, p. 933-939, 2016.

SONJE, V. M.; KUMAR, L. et al. Effect of counter ions on the properties of amorphous atorvastatin salts. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 44, p.462-470, 2011.

TEXEIRA, A. A indústria farmacêutica no Brasil: um estudo de impacto socioeconômico dos medicamentos genéricos. *Industria farmacêutica no Brasil. Medicamentos genéricos.* 2014. Monografia (Faculdade de Ciências e Letras) **Universidade Estadual Paulista**, São Paulo, 2014.

ZHANG H.; WANG J. X.; ZHANG Z. B. et al. Micronization of atorvastatin calcium by antisolvent precipitation process. **International Journal of Pharmaceutics**. p. 106 - 113, 2009.

### **Capítulo 3**

**Desenvolvimento de método discriminativo para avaliação do perfil de dissolução de comprimidos contendo diferentes polimorfos de atorvastatina**

## Resumo

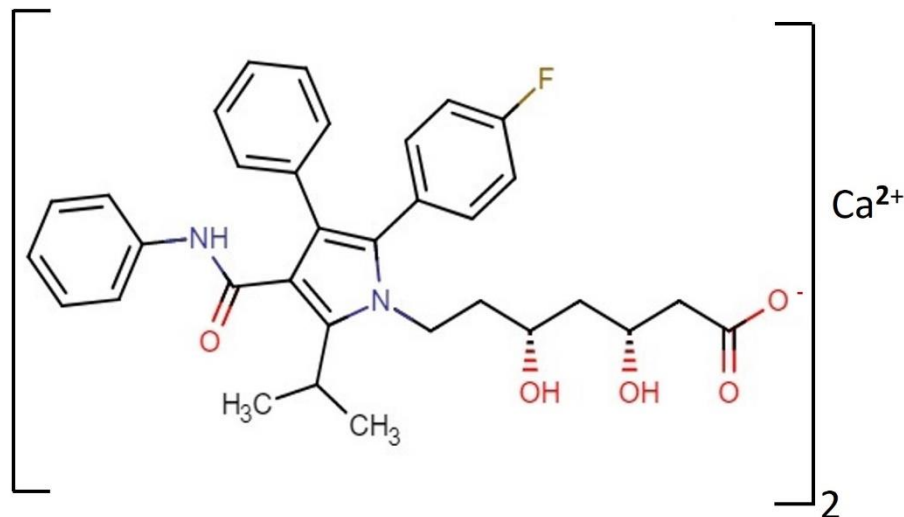
O objetivo do presente trabalho é desenvolver um método discriminativo para avaliação do perfil de dissolução de comprimidos contendo diferentes polimorfos de atorvastatina cálcica. Para tanto, identificou-se os polimorfos I e VIII do fármaco por difratometria de raios X (Capítulo 2) e avaliou-se suas respectivas solubilidades pelo método do equilíbrio (*shake flask*). As condições experimentais mais adequadas para o ensaio de dissolução foram obtidas por intermédio de planejamento fatorial completo do tipo  $2^3$ , gerando 8 ensaios, sendo as variáveis independentes estudadas: o meio de dissolução, velocidade de agitação e os polimorfos (I e VIII); e os parâmetros constantes: o aparato 2 (pá), temperatura de meio de dissolução  $37\text{ °C} \pm 0,5$  e o volume do meio de 750 mL. Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente por intermédio da análise de variância, gráficos de Pareto e superfície de resposta. Foi possível concluir que a velocidade de agitação e o meio de dissolução apresentaram impacto nos resultados, afetando na dissolução dos comprimidos contendo os polimorfos avaliados. Assim, as condições selecionadas foram: 750 mL de meio água a 65 rpm e, após o desenvolvimento do método, este foi comparado com o método da Food na Drug Administration (FDA) para comprimidos de atorvastatina cálcica. Dessa forma, foi possível concluir que o método desenvolvido mostrou-se adequado para apontar diferenças entre os polimorfos da atorvastatina cálcica.



## 1. Introdução

A atorvastatina cálcica (ATR) é um fármaco pertencente ao grupo das estatinas e é empregada frequentemente na terapia para diminuir os níveis de colesterol plasmático e prevenir doenças cardiovasculares. Ela atua na inibição da 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase), enzima que catalisa a conversão a mevalonato, metabólito na biossíntese de colesterol. Disponível na forma de comprimidos sob várias apresentações (10 mg a 80 mg) e de histórico terapêutico bastante eficaz, é um dos fármacos mais comercializados atualmente (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

Figura 1. Estrutura química da atorvastatina cálcica



Fonte: Adaptado da Chemicalize

Segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), a ATR pertence à classe II, apresentando baixa solubilidade e alta permeabilidade, o que torna a dissolução uma etapa limitante para o processo de absorção do fármaco (BCS Database-TSRC, Inc., 2018). Aliado a este fato, a ATR possui pelo menos trinta formas cristalinas e algumas delas estão descritas em patentes: US 5969156 (forma I, II e IV), US 6121461 (forma III), WO01/36384 (forma V), EP136362 e US 7342120 (forma VI a XII) (LEE, 2014; RAW, 2004; VIPPGUNTA; BRITTAIN; GRANT, 2001; SHETE, 2010, SKORDA, 2008).

O polimorfismo na área farmacêutica é considerado como a mudança ou distintos arranjos cristalinos que podem ter uma forma sólida, mantendo sua

identidade química. O estudo dos fármacos que apresentam o fenômeno de polimorfismo deve ser aprofundado para prever possíveis problemas, entre eles as trocas de formas polimórficas que podem influenciar nas propriedades biofarmacêuticas do princípio ativo.

Um método de dissolução discriminativo pode detectar pequenos desvios na etapa de produção durante os estágios de formulação, sendo relevante para garantir a uniformidade do produto avaliado, garantindo a qualidade contínua do medicamento (OLIVEIRA; LACERDA; BONELLA, 2012).

Uma metodologia de dissolução bem desenvolvida e um ensaio de dissolução bem projetado permite que as variáveis analíticas envolvidas não interfiram nos resultados e que as possíveis diferenças observadas possam ser atribuídas diretamente às formulações avaliadas. Dessa forma, é possível desenvolver uma alternativa que auxilie na avaliação de uma especialidade farmacêutica (MACHADO, 2014; RODRIGUES; WATANABE; FERRAZ, 2008).

O ensaio de dissolução é uma ferramenta importante para acompanhar o desempenho das formulações que contêm polimorfos de um fármaco, pois modificações em seus perfis de dissolução podem indicar a ocorrência de troca de uma forma polimórfica por outra. Entretanto, há escassa informação sobre métodos de dissolução discriminativos para polimorfos (GRAY, 2006; PITA; PRATES; FERRAZ 2004; CANSEL; OZGUR et al., 2015).

Para desenvolver um método de dissolução que possa distinguir as diferenças existentes entre as formulações, é importante avaliar a solubilidade do fármaco e demonstrar que as condições de estudo selecionadas através de um delineamento experimental são apropriadas e baseadas nas características do fármaco (HAWLEY, 2013).

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver uma metodologia de dissolução discriminativa que possa avaliar o perfil de dissolução de formulações contendo diferentes polimorfos da atorvastatina cálcica.

## **2. Material e métodos**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Amostras**

Foram utilizadas duas amostras de ATR, polimorfo I e VIII, cedidas gentilmente por laboratórios da indústria brasileira. Os excipientes utilizados na formulação dos comprimidos foram: celulose microcristalina (Avicel PH 102 – FMC Corporation, Pensilvânia, USA), crospovidona (Kollidon CL-M, BASF, Ludwigshafen am Rhein, Alemanha), dióxido de silício coloidal (Aerosil 200, Henrifarma, São Paulo, Brasil) e estearato de magnésio (EMS, São Paulo, Brasil).

#### **2.1.2 Reagentes**

Os reagentes e solventes utilizados foram: ácido clorídrico (HCl) P.A 37% (Casa Americana, São Paulo, Brasil), acetato de sódio anidro (Casa Americana, São Paulo, Brasil), ácido acético glacial (LabSynth Produtos para Laboratórios Ltda., São Paulo, Brasil), fosfato de potássio monobásico (LabSynth Produtos para Laboratórios Ltda., São Paulo, Brasil), hidróxido de sódio (LabSynth Produtos para Laboratórios Ltda., São Paulo, Brasil) e água ultrapurificada obtida por meio do sistema de purificação de água Milipore (Milipore SAS, Molsheim, França).

### **2.2 Ensaio de solubilidade**

Para o ensaio de solubilidade foi empregado o método do equilíbrio (*Shake Flask*). Para isso, adicionou-se quantidade suficiente de matéria-prima dos polimorfos I e VIII da ATR para a saturação de 20 mL de diferentes meios (água; ácido clorídrico 0,1M; tampão acetato pH 4,5; tampão fosfato pH 6,8) preparados segundo a farmacopeia americana (USP38). O ensaio foi feito em triplicata para cada forma polimórfica. Na sequência, as amostras foram mantidas durante 72 horas sob uma velocidade de rotação de 150 rpm a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  em incubadora orbital TE – 420 (Tecnal, Piracicaba, Brasil). Em seguida, alíquotas foram retiradas com auxílio de uma seringa e, posteriormente, filtradas em filtro previamente selecionado (PVDF 25 mm de diâmetro e 0,45  $\mu\text{m}$  de tamanho de poro). Após o ensaio, avaliou-se o pH de cada frasco em pHmetro PG2000 (GEHAKA, São Paulo, Brasil).

A quantificação da atorvastatina cálcica foi feita através de espectroscopia UV-Vis em equipamento Evolution 201 (ThermoFisher SCIENTIFIC, Massachusetts, USA), no comprimento de onda de 244 nm.

### 2.3 Formulações de atorvastatina cálcica

Foram produzidas duas formulações (A e B), cada qual contendo um polimorfo, por compressão direta em prensa hidráulica (American Lab) com punção de 8 mm. Após pesagem dos componentes das formulações, estes foram passados pelo tamis e misturados de acordo com as quantidades indicadas na Tabela 1.

Tabela 1. Componente das formulações da ATR

COMPONENTES	A (mg)	B (mg)	Concentração (%)
Atorvastatina cálcica polimorfo I	20	---	8
Atorvastatina cálcica polimorfo VIII	---	20	8
Celulose microcristalina 102	212,5	212,5	85
Crospovidona	12,5	12,5	5
Dióxido de Silício Coloidal	2,5	2,5	1
Estearato de magnésio	2,5	2,5	1

Quantidade expressa em miligramas e porcentagem, para um comprimido de 250 mg equivalente a 20 mg de ATR

Todas as formulações foram preparadas nas mesmas condições, aplicando-se uma pressão de 1000 psi durante 40 segundos para garantir dureza adequada. As formulações A (polimorfo I) e B (polimorfo VIII) foram utilizadas nos ensaios de dissolução para o desenvolvimento do método.

### 2.4 Ensaios de dissolução

Realizou-se um delineamento experimental do tipo fatorial completo  $2^3$ , utilizando-se o programa Statistica<sup>®</sup> 13.0 (Statsoft, Inc.), no qual foram estipulados três fatores independentes (meio de dissolução, velocidade de agitação e o polimorfo), conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Variáveis independentes e níveis empregados no delineamento experimental completo para os ensaios de dissolução

FATORES	NÍVEIS	
	INFERIOR	SUPERIOR
Meio de dissolução	Água	Tampão fosfato pH 6,8
Velocidade de agitação (rpm)	50	75
Polimorfo	I	VIII

Os fatores anteriormente citados originaram 8 experimentos, descritos na Tabela 3, provenientes do planejamento fatorial completo, que foram realizados em triplicata.

Tabela 3. Planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> e descrição dos ensaios de dissolução

Ordem Padrão	Meio de dissolução	Velocidade de agitação (rpm)	Polimorfo
1	Água	50	I
2	Tampão fosfato pH 6,8	50	I
3	Água	75	I
4	Tampão fosfato pH 6,8	75	I
5	Água	50	VIII
6	Tampão fosfato pH 6,8	50	VIII
7	Água	75	VIII
8	Tampão fosfato pH 6,8	75	VIII

Os ensaios de dissolução foram executados em equipamento 708-DS *Dissolution Apparatus* (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA), mantendo constantes os seguintes parâmetros: aparato 2 (pá), temperatura de meio de dissolução 37°C e o volume do meio de 750 mL. Os tempos de coleta foram de 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos. A quantificação do fármaco foi realizada por método espectrofotométrico UV-Vis, conforme o item 2.2.

## 2.5 Tratamento estatístico

Para avaliação dos resultados, as respostas empregadas no delineamento experimental foram as porcentagens de fármaco dissolvido nos tempos de 5, 30 e 45 min e a Eficiência da Dissolução (Q5%, Q30%, Q45% e ED, respectivamente). Foi

utilizado o suplemento DDSolver da Microsoft Excel e, na sequência, foram realizados cálculos estatísticos como análise de variância (ANOVA), gráficos de Pareto e superfície de resposta elaborada em programa Minitab 17 (Statistic Software, Ink) e Statistica 13.0 (Statsoft, Inc).

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Ensaio de solubilidade

A Tabela 4 apresenta os resultados da solubilidade dos polimorfos I e VIII, evidenciando que a diferença dos valores de solubilidade em água foi de 13,45% (0,171 e 0,148 mg/mL, respectivamente). Por outro lado, em meio tampão fosfato pH 6,8, determinou-se uma diferença de 42,72% entre a solubilidade dos polimorfos mencionados, sendo de 0,742 e 0,317 mg/mL.

Tabela 4. Solubilidade dos polimorfos da ATR em diferentes meios

Meios	Polimorfo I (mg/mL)	Polimorfo VIII (mg/mL)
HCl 0,1M	0,011 ± 0,002	0,016 ± 0,014
Tampão acetato pH 4,5	0,016 ± 0,012	0,024 ± 0,008
Água	0,148 ± 0,028	0,171 ± 0,005
Tampão fosfato pH 6,8	0,317 ± 0,012	0,742 ± 0,008

Desvios padrão ( $\pm$ DP) e n=3, pH da água de osmose reversa: 6,25 – 6,8.

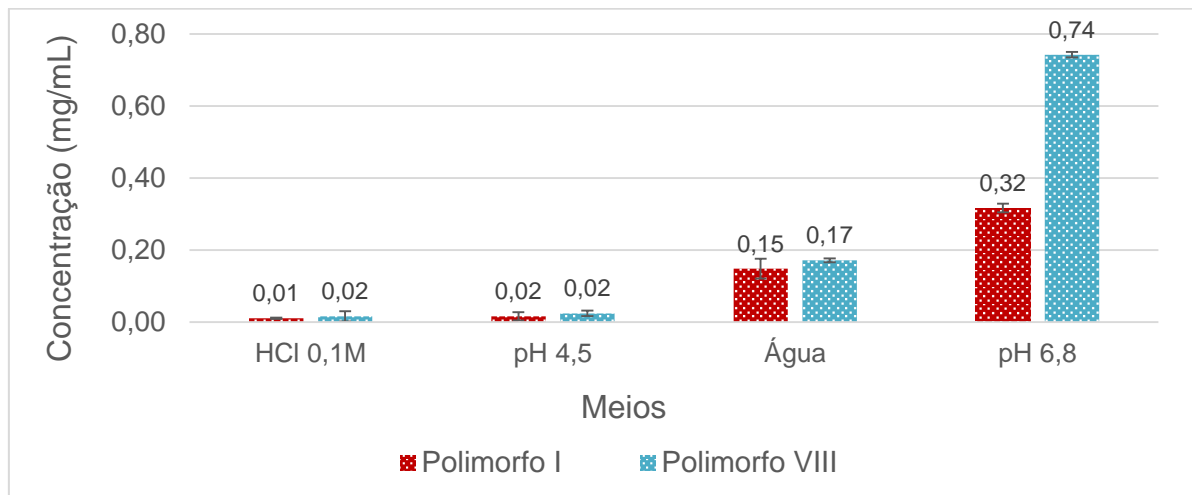
Schönherr (2015), analisou 34 fármacos com foco em valores de pKa, solubilidade e perfis de pH por Sirius T3. O grupo de fármacos antilipidêmicos compreendia cinco compostos da classe das estatinas, entre eles a rosuvastatina, fluvastatina e atorvastatina. O valor médio do pKa foi de 4,5, correspondente ao grupo do ácido carboxílico da classe de fármacos mencionados. O estudo apresentou também perfis de pH (rosuvastatina e fluvastatina), cujas curvas indicavam baixa solubilidade em pH ácido e alta solubilidade em pH alcalino. Além disso, também foi relatado que a ATR formava soluções gelatinosas e sua solubilidade foi indeterminada.

A molécula de ATR apresenta pKa de 4,46 e o perfil de solubilidade de seus polimorfos indica uma tendência de as formas carregadas serem encontradas

predominantemente em água e tampão fosfato pH 6,8. Em contrapartida, o fármaco não ionizado prevalece no meio avaliado HCl 0,1M e em tampão acetato pH 4,5, como observado na Figura 2 (SIEGER, 2017; SCHONHERR, 2015).

Baseado na equação de Henderson-Hasselbalch “ $\text{pH} = \text{pKa} + \log[\text{A}^-] / [\text{HA}]$ ”, pode-se inferir que:  $\text{pH} > \text{pKa} = [\text{A}^-] / [\text{HA}] = > 1$ ; e  $\text{pH} < \text{pKa} = [\text{A}^-] / [\text{HA}] = < 1$ . Nesse sentido, por apresentar um pKa de 4,46, a ATR estará predominantemente na forma ionizada [A] em meios cujo  $\text{pH} > 4,46$ . Por outro lado, a forma não ionizada [HA] será majoritária em meios com  $\text{pH} < 4,46$  (SCHONHERR, 2015).

Figura 2. Solubilidade (mg/mL) dos polimorfos I e VIII da ATR



As barras correspondem aos valores de desvio padrão, n=3, pH da água de osmose reversa: 6,25 – 6,8.

Paralelamente, foi aplicada a análise de variância para um fator nos resultados do ensaio da solubilidade. Assumiu-se igualdade de médias para a análise, observando-se que existe diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre as solubilidades dos polimorfos I e VIII da ATR (Tabela 5).

Tabela 5. ANOVA para os valores de solubilidade dos polimorfos da ATR

Fator	GL	SQ	MQ	Valor F	Valor p
<b>Meios</b>	7	1328786	189827	748927	<b>0,001</b>
<b>Erro</b>	16	406	25		
<b>Total</b>	23	1329192			

GL: grau de liberdade; SQ: soma de quadrados;  
MQ: media dos quadrados,  $p < 0,05$  = significativo

Na sequência, aplicou-se o teste de Tukey e realizou-se comparações emparelhadas, nas quais as médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes. Para tanto, o programa Minitab 17 fez um agrupamento de cinco conjuntos (A, B, C, D e E). Os grupos foram organizados a partir do valor da média dos resultados da solubilidade dos polimorfos, indicados na Tabela 6.

Os polimorfos avaliados no meio HCl 0,1 M e tampão acetato pH 4,5 pertencem ao grupo E e apresentam valores abaixo  $< 0,025$  mg / mL de solubilidade. Em contrapartida, os grupos A, B, C e D mostram valores de solubilidade  $> 0,148$  mg/mL (Tabela 6).

Tabela 6. Teste Tukey aplicado aos valores de solubilidade dos polimorfos da ATR

Polimorfos	Meios	N	Média (mg/mL)	Agrupamento
VIII	Tampão fosfato pH 6,8	3	0,742	A
I	Tampão fosfato pH 6,8	3	0,316	B
VIII	Água	3	0,171	C
I	Água	3	0,148	D
VIII	Tampão acetato pH 4,5	3	0,023	E
I	Tampão acetato pH 4,5	3	0,016	E
VIII	HCl 0,1M	3	0,015	E
I	HCl 0,1M	3	0,010	E

Intervalo de confiança 95%

A partir dos resultados da solubilidade e sua avaliação estatística, dois meios foram selecionados para continuar com o desenvolvimento da metodologia de dissolução, sendo eles os meios água e tampão fosfato pH 6,8, sem adição de tensoativo. O volume de dissolução de 750 mL, nas condições avaliadas, é capaz de solubilizar a dose de 20 mg do fármaco, quantidade presente nas formulações. Em relação ao teste de filtro, o filtro PVDF 25 mm com saturação de 4mL demonstrou um melhor desempenho para a realização do ensaio.

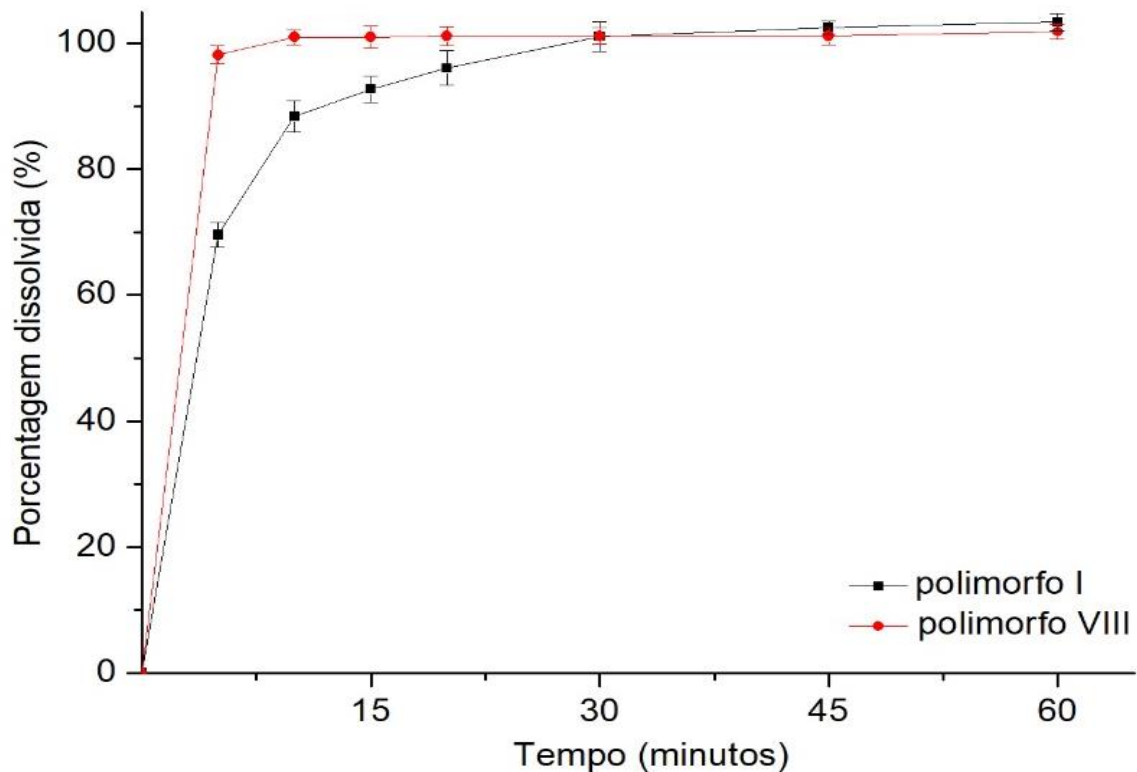
### 3.2 Ensaio de dissolução

Na Figura 3 é apresentado o perfil de dissolução dos comprimidos contendo os polimorfos da ATR, empregando o método FDA. Nestas condições não foi possível



diferenciar completamente as formulações contendo as formas cristalinas I e VIII, provavelmente pelos parâmetros empregados no ensaio, especialmente o meio tampão fosfato pH 6,8, no qual os polimorfos são bastante solúveis.

Figura 3. Perfis de dissolução dos comprimidos contendo os polimorfos I e VIII da ATR, em meio tampão fosfato pH 6,8, utilizando-se aparato II (pá), volume do meio 900 mL a 75 rpm. (Método da Food and Drug Administration, FDA, 2004)



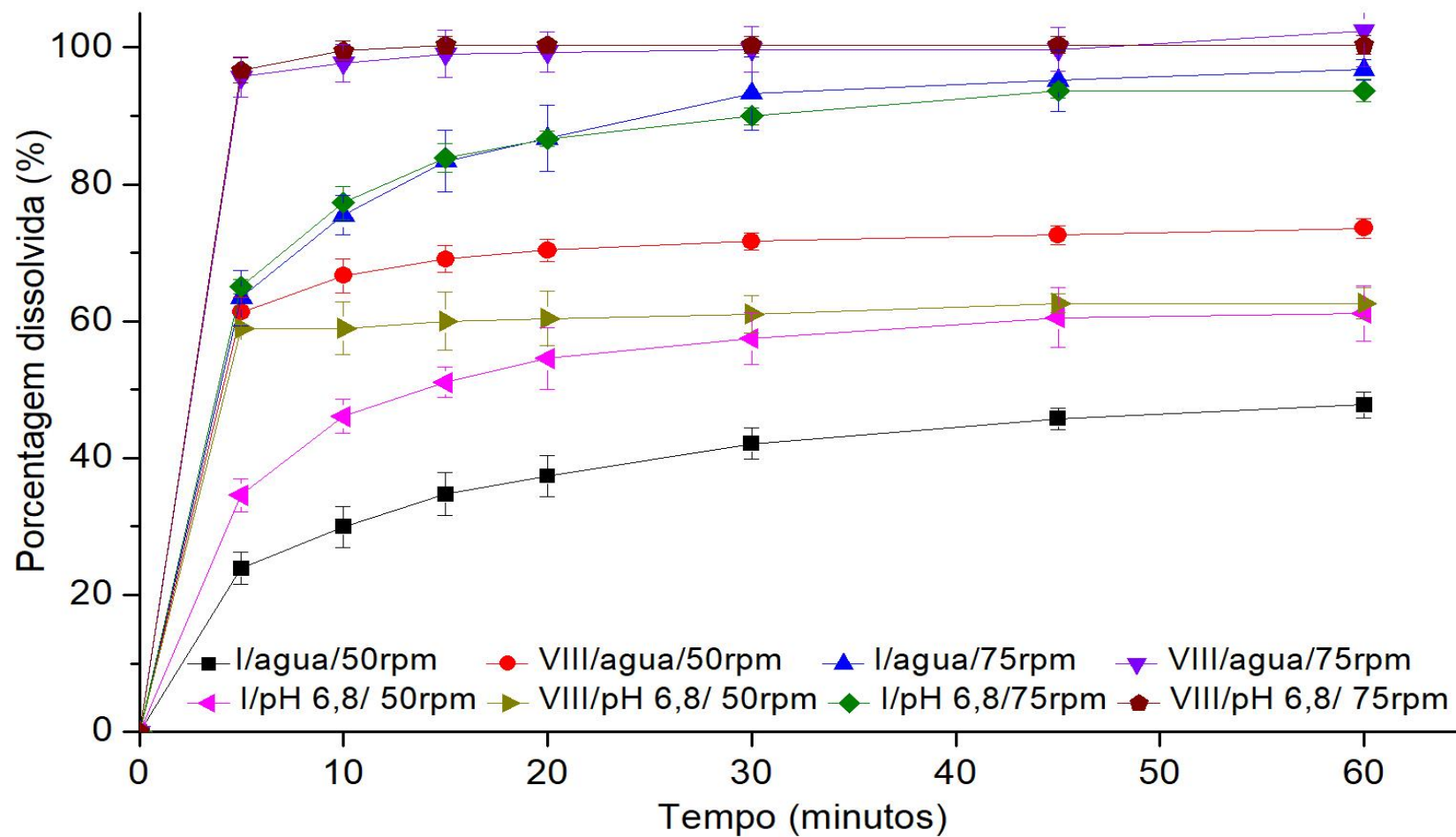
Para o desenvolvimento da metodologia de dissolução, foram executados oito experimentos a partir do planejamento fatorial completo descrito no item 2.4. Os perfis de dissolução das formulações contendo os polimorfos da ATR apresentaram alterações conforme os parâmetros dos ensaios foram alterados. A 50 rpm, a porcentagem dissolvida no tempo final do ensaio para o polimorfo I foi aproximadamente de 47% e, do polimorfo VIII, de 73% no meio água. Por outro lado, o polimorfo I liberou 61% e o polimorfo VIII 62% no tampão fosfato pH 6,8 (Figura 4).

Durante os ensaios, surgiu a formação do cone após a desintegração dos comprimidos no fundo das cubas, resultando em baixas quantidades de fármaco dissolvidas, devido à ineficiência da agitação e ao aprisionamento do fármaco pelos excipientes, sendo a formação do cone típico quando utilizamos o aparato 2 (pá). Nestas condições, os perfis de dissolução das formulações contendo os polimorfos I

e VIII, no meio água, mostraram maior diferença nas porcentagens dissolvidas. Entretanto, não atingiram as especificações farmacopeicas de mínimo o 85% em 30 minutos.

Modificando a velocidade de agitação para 75 rpm, em água, a quantidade de fármaco dissolvido do polimorfo I aos 60 minutos foi de 96% e, para o polimorfo VIII, de 102%. Em tampão fosfato pH 6,8, o polimorfo I e VIII apresentaram 93% e 100% de liberação, respectivamente (Figura 4). De fato, a hidrodinâmica formada pela agitação nas cubas evitou a formação do cone, aumentando a exposição das partículas do comprimido no meio de dissolução, favorecendo a eficácia do processo.

Figura 4. Perfis de dissolução dos comprimidos contendo os polimorfos I e VIII da ATR, meio água e tampão fosfato pH 6,8, utilizando-se aparato 2 (pá), volume do meio 750 mL a 50 e 75 rpm



Além disso, foi calculada a Eficiência da Dissolução (ED), empregando o suplemento Ddsolver da Microsoft Excel. A ED das formulações foi maior segundo a velocidade de agitação ia aumentado, dado que a quantidade de fármaco dissolvida era mais rápida ao começo da dissolução (Figura 7). As formulações que continham o polimorfo I, avaliadas tanto em água como tampão fosfato pH 6,8, a 75 rpm, apresentaram uma ED menor em comparação com as formulações do polimorfo VIII, devido a velocidade de dissolução deste polimorfo ser maior (Tabela 7).

Tabela 7. Valores da ED para as formulações contendo os polimorfos I e VIII

Meio	rpm	Polimorfo	ED (%)	Meio	rpm	Polimorfo	ED (%)
Água	50	I	38,23	Tampão pH 6,8	50	I	52,53
		VIII	67,48			VIII	53,10
	75	I	84,69		75	I	83,53
		VIII	95,20			VIII	94,99

Posteriormente, os resultados obtidos a partir do delineamento experimental foram tratados com ANOVA. As variáveis estudadas foram a porcentagem de fármaco dissolvida em diferentes tempos de coleta, entre elas, Q5%, Q30%, Q45% e a ED.

Na Tabela 8 são apresentados os valores da ANOVA para cada variável analisada e pode-se observar também que os coeficientes de determinação ajustados ( $R_{adj}$ ) foram adequados para descrever os dados do modelo selecionado, sem interações de componentes. Dentre as variáveis estudadas, a velocidade de agitação se mostrou mais relevante, uma vez que apresentou impacto em todas as condições avaliadas.

Nas variáveis Q30% e Q45%, o meio de dissolução e o polimorfo não têm impacto, dado que nesses tempos a quantidade de fármaco dissolvida é semelhante, fato evidenciado nos perfis das formulações que contém os polimorfos (Figura 7). Entretanto, o valor da ED das formulações avaliadas foi influenciado pelo tipo de polimorfo e pela velocidade de dissolução.

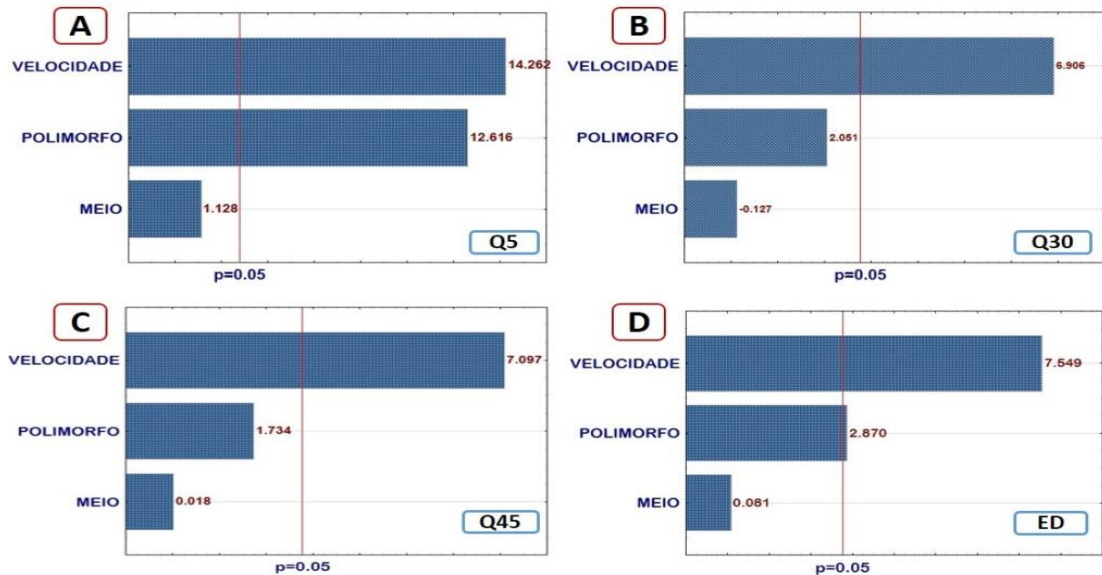
Tabela 8. ANOVA para os valores das variáveis independentes (meio, velocidade e polimorfo) e as respostas, Q5% Q30% Q45% e ED

Fator	SQ	GL	MQ	Valor F	Valor p
<b>Q5 R<sub>adj</sub> = 0,980</b>					
MEIO	15,823	1	15,823	1,269	0,323
<b>VELOCIDADE</b>	<b>2536,3</b>	<b>1</b>	<b>2536,251</b>	<b>203,416</b>	<b>0,001</b>
<b>POLIMORFO</b>	<b>1984,7</b>	<b>1</b>	<b>1984,721</b>	<b>159,182</b>	<b>0,001</b>
Erro	49,873	4	12,468		
<b>Total SQ</b>	<b>4586,7</b>	<b>7</b>			
<b>Q30 R<sub>adj</sub> = 0,874</b>					
MEIO	0,98	1	0,98	0,016	0,905
<b>VELOCIDADE</b>	<b>2895,605</b>	<b>1</b>	<b>2895,605</b>	<b>47,697</b>	<b>0,002</b>
POLIMORFO	255,38	1	255,38	4,207	0,111
Erro	242,835	4	60,709		
<b>Total SQ</b>	<b>3394,8</b>	<b>7</b>	<b>0,98</b>		
<b>Q45 R<sub>adj</sub> = 0,878</b>					
MEIO	0,02	1	0,02	0	0,986
<b>VELOCIDADE</b>	<b>2805</b>	<b>1</b>	<b>2805,005</b>	<b>50,38</b>	<b>0,002</b>
POLIMORFO	255,38	1	167,445	3,007	0,157
Erro	167,45	4	55,667		
<b>Total SQ</b>	<b>3195,2</b>	<b>7</b>			
<b>ED R<sub>adj</sub> = 0,898</b>					
MEIO	0,3	1	0,3	0,007	0,939
<b>VELOCIDADE</b>	<b>2594,521</b>	<b>1</b>	<b>2594,521</b>	<b>56,989</b>	<b>0,002</b>
<b>POLIMORFO</b>	<b>375,243</b>	<b>1</b>	<b>375,243</b>	<b>8,242</b>	<b>0,045</b>
Erro	182,107	4	45,527		
<b>Total SQ</b>	<b>3152,171</b>	<b>7</b>			

GL: grau de liberdade; SQ: soma de quadrados; MQ: media dos quadrados,  $p < 0,05$  = significativo  
Em negrito resultados com  $p < 0,05$

De outro ponto de vista, no gráfico de Pareto (Figura 5), também é possível concluir que a velocidade de agitação foi fundamental para o desenvolvimento do método de dissolução, tendo significância na porcentagem do fármaco dissolvida. Por outro lado, há influência do polimorfo nas variáveis Q5% e ED, mas não nas variáveis Q30% e Q45%. Tal fato ratifica que a diferença entre as velocidade de dissolução dos polimorfos é dependente da velocidade de agitação.

Figura 5. Gráficos de Pareto correspondentes às variáveis independentes (meio, velocidade e polimorfo) e como variáveis dependente as quantidades de fármaco dissolvida A) Q5% B) Q30% C) Q45% e D) ED



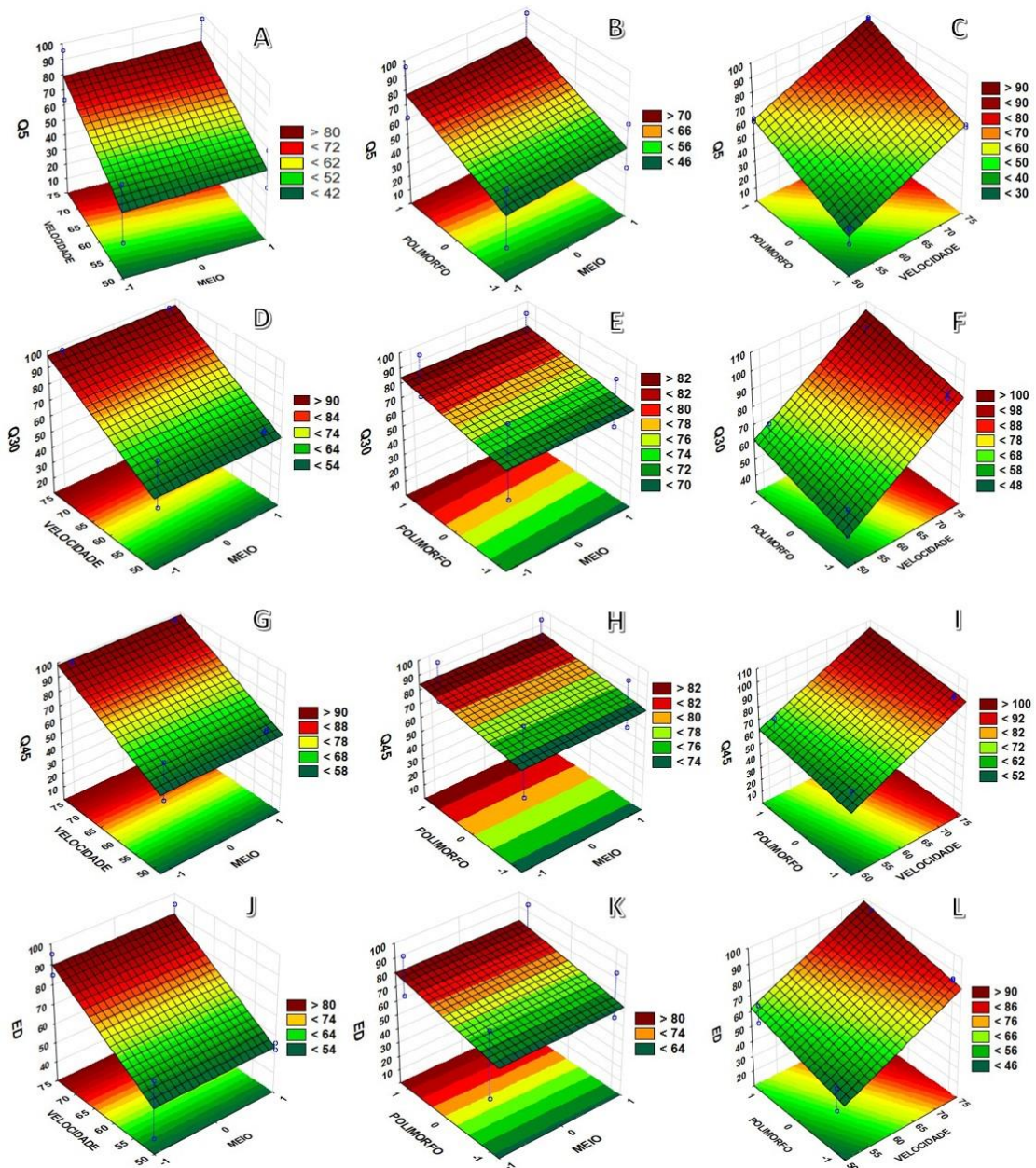
Simultaneamente, foi construído o gráfico de superfície de resposta associando as variáveis: porcentagem de fármaco dissolvido (Q5% Q30% Q45% e ED), o meio de dissolução e a velocidade de agitação.

A Figura 6 (C) apresenta a relação entre duas variáveis, polimorfo e velocidade, tendo em consideração que, conforme aumenta-se a velocidade (de 50 para 75 rpm) e altera-se o polimorfo, nesse caso do I para a VIII, a quantidade de fármaco dissolvido aumenta, ficando clara a atuação dos dois fatores nos resultados durante o início do ensaio de dissolução.

A Figura 6 (B), (E), (H) e (K) associa as variáveis polimorfo e meio de dissolução, evidenciando uma maior quantidade de fármaco dissolvida para o polimorfo VIII, independentemente do meio utilizado para o ensaio.

Na Figura 6 (F), (I) e (L), a elevação do eixo referente à Q% não depende do polimorfo, mas sim da variável velocidade. Em contrapartida, a Figura 6 (A), (D), (G) e (J) mostra maior resposta (Q%) com o maior nível de velocidade, 75 rpm, independente de qual fosse o meio de dissolução.

Figura 6. Gráficos de superfície de resposta na análise das variáveis independentes (meio, velocidade e polimorfo) e as quantidades de fármaco dissolvida Q5% Q30% Q45% e ED



Q5% comparando, A) velocidade e meio B) polimorfo e meio C) polimorfo e velocidade; Q30% comparando, D) velocidade e meio E) polimorfo e meio F) polimorfo e velocidade; Q45% comparando, G) velocidade e meio H) polimorfo e meio I) polimorfo e velocidade; ED comparando, J) velocidade e meio K) polimorfo e meio L) polimorfo e velocidade. As regiões verde, amarela e vermelha representam da mínima à máxima quantidade de fármaco dissolvida segundo o tempo avaliado (Q%)

O meio de dissolução tampão fosfato pH 6,8 teve pouca interferência nos resultados, enquanto que a água mostrou maior condição para diferenciar os perfis de dissolução dos polimorfos.

Baseado na análise dos resultados do planejamento fatorial completo (Tabela 3), elaborou-se uma nova análise estatística com o objetivo de estimar ou prever diferenças entre os perfis de dissolução a partir das variáveis que tiveram impacto, entre elas a velocidade de agitação e meio de dissolução, e, assim, visar as melhores condições do método que possa discriminar os polimorfos avaliados.

Nas Tabelas 9 e 10 são apresentadas as previsões das diferenças das porcentagens dissolvidas das formulações que contêm os polimorfos VIII e I, durante Q20%, Q30% e Q60%, no meio de dissolução água e tampão fosfato pH 6,8, respectivamente. Além disso, também foi possível indicar as diferenças entre as quantidades de fármaco dissolvidas dos polimorfos em diferentes tempos e velocidades de agitação.

Tabela 9. Estimativa da diferença das porcentagens dissolvida das formulações contendo os polimorfos às Q20%, Q30% e Q60%, no meio de dissolução água, a partir do Statistica 13.0

Rotação (rpm)	Diferença (VIII - I) Q20%	Diferença (VIII - I) Q30%	Diferença (VIII - I) Q60%
50	36,70	32,80	29,90
55	31,90	27,60	29,90
60	27,10	21,40	19,90
<b>65</b>	<b>22,30</b>	<b>17,10</b>	<b>14,00</b>
70	17,50	11,90	9,90
75	12,70	6,70	4,00

Tabela 10. Estimativa da diferença das porcentagens dissolvida das formulações contendo os polimorfos às Q20%, Q30% e Q60%, no meio de dissolução tampão pH 6,8, a partir do Statistica 13.0

Rotação (rpm)	Diferença (VIII - I) Q20%	Diferença (VIII - I) Q30%	Diferença (VIII - I) Q60%
50	10,78	10,29	3,50
55	11,47	10,51	4,10
60	12,16	10,72	4,70
<b>65</b>	<b>12,85</b>	<b>10,93</b>	<b>5,30</b>
70	13,54	11,14	5,93
75	14,23	11,35	6,95

No meio de dissolução água (Tabela 9), observa-se que em menores velocidades de agitação, a diferença calculada entre a porcentagem dissolvida das formulações que contêm os polimorfos é maior. Este resultado é conveniente, porque os perfis de dissolução ficaram mais distantes, sendo, portanto, discriminativos. Por outro lado, no meio de dissolução tampão fosfato pH 6,8 (Tabela 10), mesmo que a



velocidade de agitação aumente ou diminua, a diferença entre os perfis de dissolução é mínima e os perfis das formulações que contêm os polimorfos estarão mais próximos, minimizando seu caráter discriminativo.

Para selecionar a velocidade de agitação, considerou-se que seria importante atingir as especificações de liberação imediata e mostrar diferenças entre os polimorfos. Nesse contexto, a velocidade mais adequada foi de 65 rpm, no meio água. Estas condições são capazes de diferenciar os perfis nas Q20%, Q30%, Q60%, em 22%, 17% e 14%(diferença de porcentagens dissolvida das formulações contendo os polimorfos), respectivamente (Tabela 9).

Na Tabela 11 apresenta-se a avaliação da significância dos fatores estudados para três respostas avaliadas, sendo elas Q20%, Q30% e Q60%, e a estimativa do coeficiente de regressão pelas variáveis e as interações delas. Desta forma, é possível obter a equação que explique o modelo e o impacto dos fatores na quantidade de fármaco dissolvida (os polimorfos da ATR). Conforme a equação 2, o meio não tem influência na porcentagem dissolvida das formulações que contém os polimorfos (diferença Q30%). Não obstante, nas equações 1 e 3 é provado que a rotação, o meio e a interação delas tem impacto na liberação da ATR durante Q20% e Q60%.

Tabela 11. Teste de significância para os coeficientes de regressão

	Fatores de interação	Valor do p	Coefficientes	Erros Padrão	Limite de confiança -95%	Limite de confiança +95%
<b>Q 20%</b> <b>R<sub>adj</sub> = 0,828</b>	Intercepto	<b>0,001</b>	<b>18,606</b>	1,341	15,514	21,699
	Rotação	<b>0,005</b>	<b>-5,138</b>	1,341	-8,231	-2,046
	Meio	<b>0,011</b>	<b>-4,355</b>	1,341	-7,447	-1,263
	Rotação x Meio	<b>0,006</b>	<b>4,903</b>	1,341	1,811	7,995
<b>Q 30%</b> <b>R<sub>adj</sub> = 0,799</b>	Intercepto	<b>0,001</b>	<b>15,762</b>	1,507	11,811	18,762
	Rotação	<b>0,003</b>	<b>-6,237</b>	1,507	-9,713	-2,761
	Meio	0,067	-3,184	1,507	-6,659	0,291
	Rotação x Meio	<b>0,012</b>	<b>4,834</b>	1,507	1,357	8,309
<b>Q60%</b> <b>R<sub>adj</sub> = 0,886</b>	Intercepto	<b>0,001</b>	<b>11,221</b>	1,098	8,687	13,753
	Rotação	<b>0,001</b>	<b>-5,503</b>	1,098	-8,035	-2,971
	Meio	<b>0,003</b>	<b>-4,425</b>	1,098	-6,958	-1,892
	Rotação x Meio	<b>0,001</b>	<b>5,019</b>	1,098	2,486	7,551

\*Em negrito resultados com  $p < 0,05$

$$Q20\% = 18,606 - 5,138 (\text{rotação}) - 4,355 (\text{meio}) + 4,903 (\text{rotação e meio}) \quad (\text{Equação 1})$$

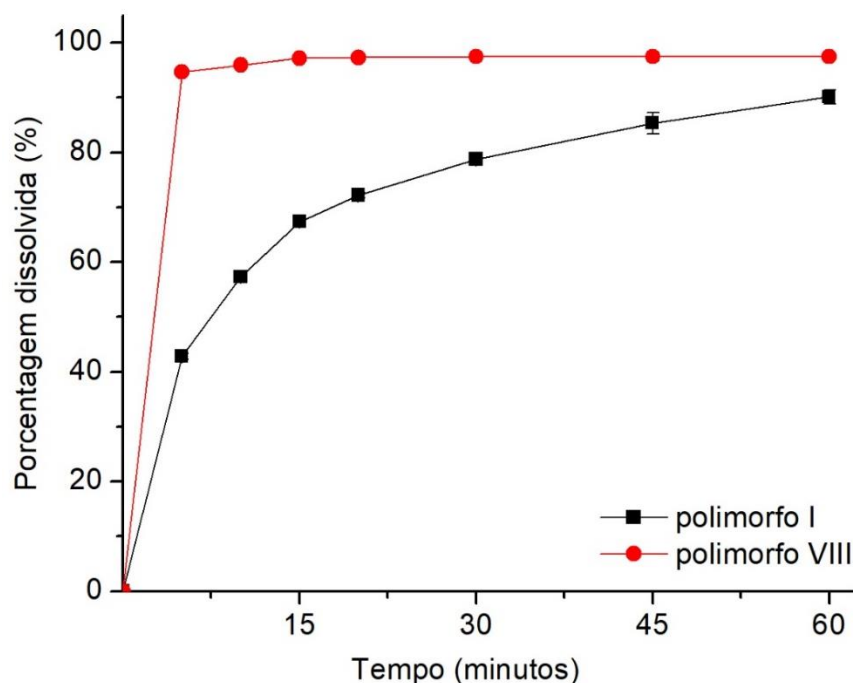
$$Q30\% = 15,762 - 6,237 (\text{rotação}) + 4,834 (\text{rotação e meio}) \quad (\text{Equação 2})$$

$$Q60\% = 11,221 - 5,503 (\text{rotação}) - 4,425 (\text{meio}) + 5,019 (\text{rotação e meio}) \quad (\text{Equação 3})$$

Dessa forma, a metodologia de dissolução desenvolvida mostra-se capaz de diferenciar adequadamente os perfis das formulações de comprimidos contendo os polimorfos de ATR, em comparação com o método da FDA. Além disso, é capaz de atingir as condições estipuladas para comprimidos de liberação imediata, sendo uma alternativa para avaliar e discriminar as formulações que contém os polimorfos I e VIII da ATR.

A Figura 7 apresenta os perfis de dissolução das formulações que contém os polimorfos da ATR. A formulação do polimorfo I mostra um perfil de dissolução com a liberação mais controlada ao longo do ensaio e, no tempo final, liberou aproximadamente um 90%. Em contrapartida, a formulação com o polimorfo VIII apresenta dois estágios marcados: o primeiro nos 5 minutos libera uma quantidade >80%, em seguida, o restante do fármaco da forma farmacêutica.

Figura 7. Perfis de dissolução das formulações contendo os polimorfos I, VIII da ATR, meio de dissolução água, utilizando-se aparato II (pá), volume do meio 750 mL a 65 rpm



Por meio da análise t-student realizada em DDSolver, é possível verificar a diferença entre os perfis de dissolução das formulações avaliadas. De acordo com a Tabela 12, fica comprovado que há diferença estatisticamente significativa entre as Q% que compõem o perfil de dissolução dos polimorfos da ATR, dado que o valor de  $p < 0,05$ .

Tabela 12. Teste t-student para os valores dos perfis de dissolução das formulações contendo os polimorfos I e VIII, empregando o suplemento estatístico DDSolver

Tempo (min)	Media (Forma VIII) Q(%)	Desvio Padrão	Media (Forma I) Q(%)	Desvio Padrão	Diferença Medias	Valor p
5	94.690	0.397	42.814	0.562	51.876	<b>0.001</b>
10	95.882	0.000	57.310	0.346	38.572	<b>0.001</b>
15	97.162	0.339	67.375	0.748	29.787	<b>0.001</b>
20	97.292	0.515	72.165	0.451	25.127	<b>0.001</b>
30	97.449	0.171	78.730	0.674	18.718	<b>0.001</b>
45	97.449	0.727	85.273	2.130	12.175	<b>0.001</b>
60	97.449	0.496	90.115	1.365	7.334	<b>0.001</b>

#### 4. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que o método de dissolução desenvolvido para comprimidos contendo diferentes polimorfos de atorvastatina, caracterizado por 750 mL de meio água, aparato 2 (pá) e velocidade de rotação das pás de 65 rpm, é discriminativo e, portanto, capaz de diferenciar os polimorfos I e VII da ATR.

Levando em consideração que existem mais de 30 formas polimórficas do fármaco estudado, é necessário desenvolver novos métodos de dissolução capazes de diferenciá-los. Uma vez que o método desenvolvido neste trabalho foi bem-sucedido e discriminativo especificamente para os polimorfos I e VIII, ele pode ser utilizado como uma diretriz para o desenvolvimento de novas metodologias de desempenho com a finalidade de diferenciar polimorfos, inclusive de outros fármacos.

## 5. Referências Bibliográficas

BCS Database Search- TSRL, Inc. Disponível em: <http://www.tsrlinc.net/results.cfm>. Acesso em 20/02/2018.

CHEMICALIZE. Disponível em: <https://chemicalize.com/#/calculation>. Acesso em 05/05/2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, 24 de julho de 2017. Guia para validação de métodos analíticos, 2017.

CANSEL, K. O; OZGUR, E. et al. Development of a Suitable Dissolution Method for the Combined Tablet Formulation of Atorvastatin and Ezetimibe by RP-LC Method. **Article in Current Drug Delivery**, 2015.

GRAY, V. Challenges to the Dissolution Test Including Equipment Calibration. **Pharmaceutical Technology**, v 2006, n.1, p. 6-9, 2006.

HAWLEY, M. Stage Appropriate Dissolution Methods in Formulation Development. **American Pharmaceutical Review**, 2013.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. FARMACOLOGIA BASICA E CLINICA. 12th ed. São Paulo. McGRAW-HILL. p. 619-633, 2014.

LEE, E. H. A practical guide to pharmaceutical polymorph screening & selection. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, p.163-175, 2014.

MACHADO, J. C. et al. Development and Validation of a Discriminative Dissolution Method for Atorvastatin Calcium Tablets using in vivo Data by LC and UV Methods. **AAPS PharmSciTech**, 2014.

OLIVEIRA, M.A.; LACERDA, C.D.; BONELLA, A.F. Developing methods to compare tablet formulations of atorvastatin. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.48, n.4, p. 801-810, 2012.

PITA, N. O. G.; PRATES, É. DE C.; FERRAZ, H. G. Avaliação do perfil de dissolução de comprimidos de ciprofloxacino 250 mg comercializados como similares no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 309–315, 2004.

POPY, A. F.; DEWAN, I.; PARVIN, N. M. Evaluation of in vitro equivalence for tablets containing the poorly water soluble compound atorvastatin. **Dissolution Technologies**. 2012.

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

RODRIGUES, L. N. C.; WATANABE, S. P.; FERRAZ, H. G. Perfil de dissolução in vitro de comprimidos de primaquina disponíveis para tratamento de malária no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 1, p. 41–45, 2008.

SCHONHERR, D.; WOLLATZ, U.; HAZNAR, D. Characterisation of selected active agents regarding pKa values, solubility concentrations and pH profiles by Sirius T3. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.92, p.155-170, 2015.

SHETE, G.; PURI, V.; KUMAR, L.; BANSAL, A.K. Solid state characterization of comercial crystalline and amorphous atorvastatin calcium samples. **AAPS PharmaSciTech**, v.11, p. 598-609, 2010.

SIEGER, P.; CUI, Y.; SCHEUERER, S. pH-dependent solubility and permeability profiles: A useful tool for prediction of oral bioavailability. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 105, p. 82-90. 2017.

SKORDA, D.; KONTOYANNIS, C.G. Identification and quantitative determination of atorvastatin calcium polymorph in tablets using FT-Raman spectroscopy. **Talanta**, v.74, p. 1066-1070, 2008.

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

## **Capítulo 4**

**Avaliação do perfil de dissolução das especialidades farmacêuticas de atorvastatina cálcica 20mg comercializadas no Peru, Brasil e Bolívia**

## Resumo

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o perfil de dissolução de dezessete formulações de comprimidos de atorvastatina cálcica 20 mg, comercializados em três países sul-americanos: Brasil, Peru e Bolívia. Para tanto, empregou-se um método de dissolução discriminativo, desenvolvido para diferenciar os polimorfos I e VIII da atorvastatina cálcica, sendo as condições do ensaio: 750 mL de água desgasificada, aparato II (pá), a 65 rpm. Resultados obtidos (porcentagens de fármaco dissolvido e Eficiência de Dissolução) foram tratados estatisticamente, através da análise de componentes principais, possibilitando a avaliação dos perfis de dissolução das formulações que, possivelmente, continham os polimorfos anteriormente mencionados. Dessa forma, foi possível concluir que cinco formulações avaliadas (BR1, BR2, PE6, PE7 e BO3) possuíam a forma polimórfica VIII, enquanto duas formulações (BR5 e PE2) continham a forma polimórfica I. As demais, possivelmente, apresentam misturas ou outras formas polimórficas. Portanto, demonstra-se também a importância de verificar se a informação técnica da matéria-prima utilizada realmente condiz com o desejado.

## 1. Introdução

O registro de um medicamento no sistema de vigilância sanitária em um país pode abranger desde a fiscalização na pesquisa clínica até a regulamentação publicitária, sendo cada país independente em estabelecer suas leis. Nesse sentido, as autoridades reguladoras nacionais (ARN) foram criadas com a finalidade de garantir produtos farmacêuticos de alta qualidade, seguros e eficazes para a sociedade, assegurando também a intercambialidade entre medicamentos com equivalência terapêutica (ET) (OMS, 2011, RUMEL, 2006, BRASIL, 2017).

A ET compreende os ensaios clínicos, a comprovação da bioequivalência (biodisponibilidade relativa) e o teste *in vitro* (equivalência farmacêutica). Dessa forma, a aceitação de um registro de medicamento pela agência reguladora responsável pode ser respaldada pela demonstração da sua eficácia, segurança e qualidade do produto farmacêutico. Dentre as agências reguladoras e precursoras temos a Food and Drug Administration (FDA) e a Agencia Europea de Avaliação de Medicamentos (EMA) (RUMEL, 2006; SOARES, 2015).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) lançou a resolução – RDC Nº 31, no ano 2010. Esta dispõe que, para registro de um medicamento similar ou genérico, é necessário realizar os estudos de equivalência farmacêutica e de perfil de dissolução comparativo em relação ao medicamento de referência (produto inovador), além da biodisponibilidade relativa, a fim de garantir a intercambialidade e, portanto, a qualidade dos medicamentos (BRASIL, 2010).

No Peru, a DIGEMID, do espanhol Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas, é a máxima autoridade técnica normativa, cujo principal objetivo é garantir que a população tenha acesso a medicamentos seguros, eficazes e de qualidade. Em 2018, foi aprovado o decreto supremo 024-2018-S.A, promulgado pelo Ministério da Saúde, que consiste em um regulamento da intercambialidade de medicamentos. Este dispõe de estudos de equivalência terapêutica *in vivo*, como a bioequivalência, e *in vitro*, baseado no sistema de classificação Biofarmacêutica (SCB) para demonstrar a eficácia e segurança do medicamento (MINS/DIGEMID, 2018).

Na Bolívia, a Unidad de Medicamentos y Tecnologia em Salud (UNIMED), é o órgão fiscalizador no âmbito farmacêutico, cuja função é garantir o acesso ao



medicamento de maneira universal e equitativa, assegurando a qualidade e seu uso racional. Segundo a lei D.S 25235 de novembro de 1998, para registrar um medicamento é necessária demonstração da segurança e eficácia através de estudos científicos (UNIMED, 1998).

Seguindo a legislação vigente em cada país, a ARN é responsável por garantir a qualidade de produtos farmacêuticos, através de ensaios de qualidade capazes de garantir a veracidade dos dados acerca de novos produtos (SANDRI; SETA; LUIZA, 2013; OMS, 2011). Entre os testes de qualidade, destaca-se o ensaio de dissolução, utilizado para avaliar o desempenho da forma farmacêutica que pode ser caracterizado, em especial, para medicamentos que contêm fármacos que apresentam baixa solubilidade de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SKORDA; KONTOYANNIS, 2008; SHETE, 2010; OLIVEIRA; LACERDA; BONELLA, 2012).

Dentre os fármacos de baixa solubilidade, encontra-se a atorvastatina cálcica (ATR), utilizada na prevenção de doenças cardiovasculares e dislipidêmicas (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014), cuja biodisponibilidade pode ser prejudicada, dado que a dissolução é uma etapa limitante para a absorção. Outro fato relevante é que esse fármaco apresenta mais de trinta formas polimórficas descritas em patentes e artigos. Dependendo do polimorfo utilizado, os resultados terapêuticos podem ser afetados (BLAGDEN, 2007; FROELICH; GASPAROTTO, 2005, OLIVEIRA, 2012).

Dessa forma, para garantir a obtenção de um produto desejável e de qualidade, é necessário levar em consideração a informação técnica da matéria-prima proveniente dos fornecedores, além de caracterizar o perfil de dissolução, a fim de detectar diferenças entre o desempenho de produtos, especialmente daqueles que contêm fármacos que apresentam baixa solubilidade e problemas de polimorfismo (RODRIGUES, 2008). O objetivo do presente trabalho é avaliar o perfil de dissolução das especialidades farmacêuticas de atorvastatina cálcica comercializadas no Peru, Brasil e Bolívia, empregando um método discriminativo para os polimorfos I e VIII.

## **2. Material e métodos**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Amostras**

Utilizou-se duas amostras de ATR, polimorfo I e VIII, fornecidas por laboratórios brasileiros. Para a produção das formulações contendo estes polimorfos, os excipientes utilizados foram: celulose microcristalina (Avicel PH 102 – FMC Corporation, Pensilvânia, USA), crospovidona (Kollidon CL-M, BASF, Ludwigshafen am Rhein, Alemanha), dióxido de silício coloidal (Aerosil 200, Henrifarma, São Paulo, Brasil) e estearato de magnésio (EMS, São Paulo, Brasil).

#### **2.1.2 Reagentes**

Os reagentes usados foram: ácido clorídrico (HCl) P.A 37% (Casa Americana, São Paulo, Brasil), acetato de sódio anidro (Casa Americana, São Paulo, Brasil), ácido acético glacial (LabSynth Produtos para Laboratórios Ltda., São Paulo, Brasil), fosfato de potássio monobásico (LabSynth Produtos para Laboratórios Ltda., São Paulo, Brasil), hidróxido de sódio (LabSynth Produtos para Laboratórios Ltda., São Paulo, Brasil) e água ultrapurificada obtida por meio do sistema de purificação de água Milipore (Milipore SAS, Molsheim, França).

#### **2.1.3 Especialidades farmacêuticas**

Os comprimidos foram adquiridos em drogarias autorizadas pelas autoridades sanitárias de cada país. Os produtos do mercado brasileiro são representados pelas siglas BR1 – BR7; os comprimidos comercializados no Peru, pelas siglas PE1 – PE7 e, BO1 – BO3 são comprimidos da Bolívia. Todos os comprimidos são provenientes de laboratórios diferentes. As formas farmacêuticas possuem um registro sanitário vigente e declaram conter 20 mg de atorvastatina cálcica por comprimido.

Quadro 1. Comprimidos de ATR 20 mg avaliados nesse estudo e comercializados no Brasil, Peru e Bolívia

Laboratório	Lote	Denominação
Brasileiro	L547020	BR1
	L1815091	BR2
	L0K1275	BR3
	108084	BR4
	L573775	BR5
	L517778	BR6
	HX5607	BR7
Peruano	1095587	PE1
	1040418	PE2
	JR1601	PE3
	BT1711172C	PE4
	7GC2789C	PE5
	1109926	PE6
	X27810	PE7
Boliviano	ORO127A	BO1
	205178	BO2
	LO010	BO3

## 2.2 Preparo das formulações de atorvastatina cálcica

As formulações A e B contendo os polimorfos I e VIII, respectivamente, foram obtidas por compressão direta em prensa hidráulica, empregando punção de 8 mm. As quantidades dos componentes das formulações estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Componente das formulações da ATR

Componentes	Concentração (%)	A (mg)	B (mg)
Atorvastatina cálcica polimorfo I	8	20	---
Atorvastatina cálcica polimorfo VIII	8	---	20
Celulose microcristalina 102	85	212,5	212,5
Crospovidona	5	12,5	12,5
Dióxido de Silício Coloidal	1	2,5	2,5
Estearato de magnésio	1	2,5	2,5

Para um comprimido de 250 mg, equivalente a 20 mg de ATR

Posteriormente, os componentes foram passados em tamis malha 600  $\mu\text{m}$ , misturados e preparados sob as mesmas condições. As formulações A e B foram produzidas com a finalidade de se obter perfis de dissolução, utilizados como base na comparação dos produtos sul-americanos.

### 2.3 Ensaio de dissolução

Executou-se os ensaios de dissolução em equipamento 708-DS Dissolution Apparatus (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA). A quantificação do fármaco foi realizada por método espectrofotométrico UV-Vis. As condições empregadas no ensaio estão descritas no Quadro 2.

Quadro 2. Condições de ensaio de dissolução discriminativo para comprimidos de ATR 20mg

Condições	Descrição
Comprimento de onda	244 nm
Velocidade de agitação	65 rpm
Sistema de agitação	Aparato 2 (pá)
Meio	Água desgasificada
Volume de meio	750 mL
Temperatura de meio de dissolução	$37 \pm 0,5$ °C
Duração do ensaio	60 minutos
Amostragem	5,10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos

Além do método detalhado acima, foi utilizado o método de dissolução para comprimidos de ATR da FDA publicado em 2004, com a finalidade de comparar as metodologias. Após compilação dos resultados, foram construídos os perfis de dissolução (porcentagem de fármaco dissolvida em função do tempo) e, além disso, foi calculada a Eficiência da Dissolução (ED), empregando o suplemento estatístico DDsolver.

### 2.4 Análise de componentes principais

Os resultados obtidos foram tratados com a análise multivariada através da análise de componentes principais, utilizando o programa Statistica 13.0 (Dell Inc.,

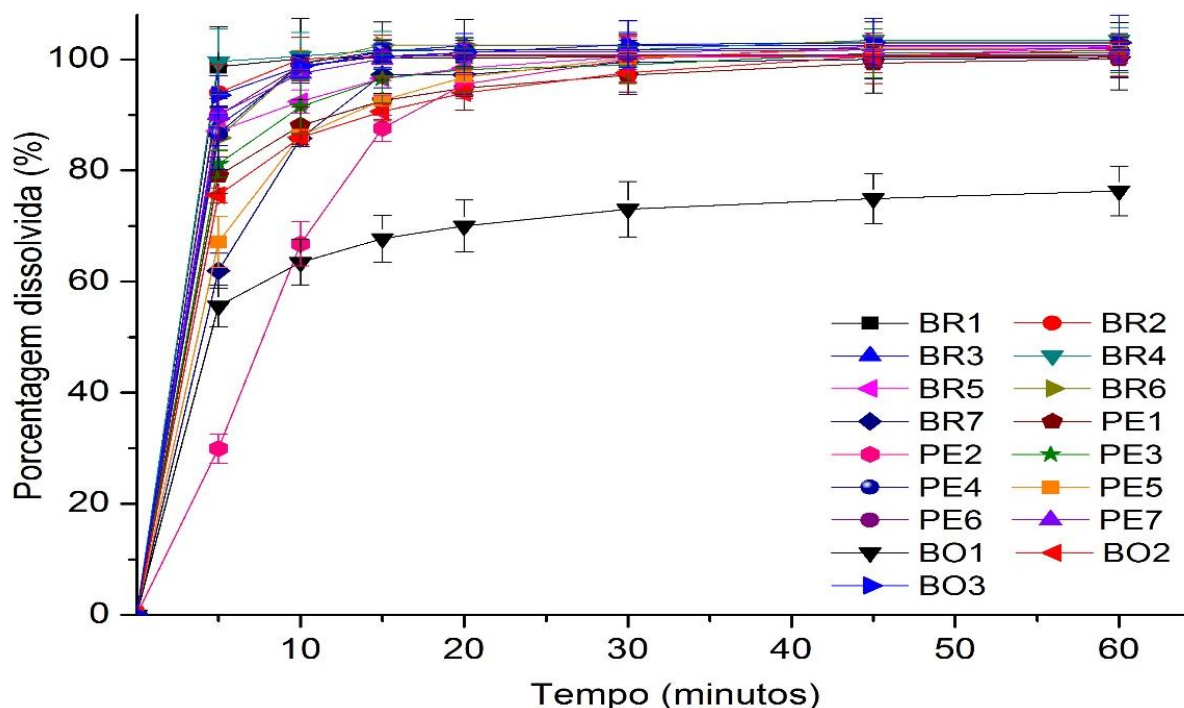
Tulsa, Estados Unidos). As variáveis utilizadas foram as porcentagens do fármaco dissolvida (Q%) durante o tempo de amostragem descrito no Quadro 2 (Q5%, Q10%, Q15%, Q20%, Q30%, Q45% e Q60%) e a ED.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Ensaios de dissolução

Na Figura 1, são apresentados os perfis de dissolução das formulações estudadas, utilizando-se o método da FDA para comprimidos de ATR. Observa-se uma rápida liberação do fármaco das formulações aos 5 minutos do ensaio, devido à velocidade de agitação e o meio de dissolução empregado. Entretanto, o produto boliviano aqui denominado BO1 não atingiu a liberação total do fármaco, sendo menor que 80%.

Figura 1. Perfis de dissolução dos comprimidos comerciais de ATR do mercado brasileiro, peruano e boliviano, meio tampão fosfato pH 6,8, utilizando-se aparato II (pá), volume do meio 900 mL a 75 rpm. (Método da Food and Drug Administration, FDA, 2004)



Na Figura 2, são apresentados os perfis de dissolução das formulações, empregando o método desenvolvido para discriminar os polimorfos da ATR. A Figura 2A mostra os perfis dos produtos brasileiros, e é nominal observar que as formulações

BR1, BR2, BR3, BR4, BR6 e BR7 apresentaram quantidades de fármaco dissolvida maiores que 80% em 5 minutos, característico do perfil da formulação que contém o polimorfo VIII. Dessa forma, esses produtos são possíveis candidatos a apresentar o polimorfo mencionado.

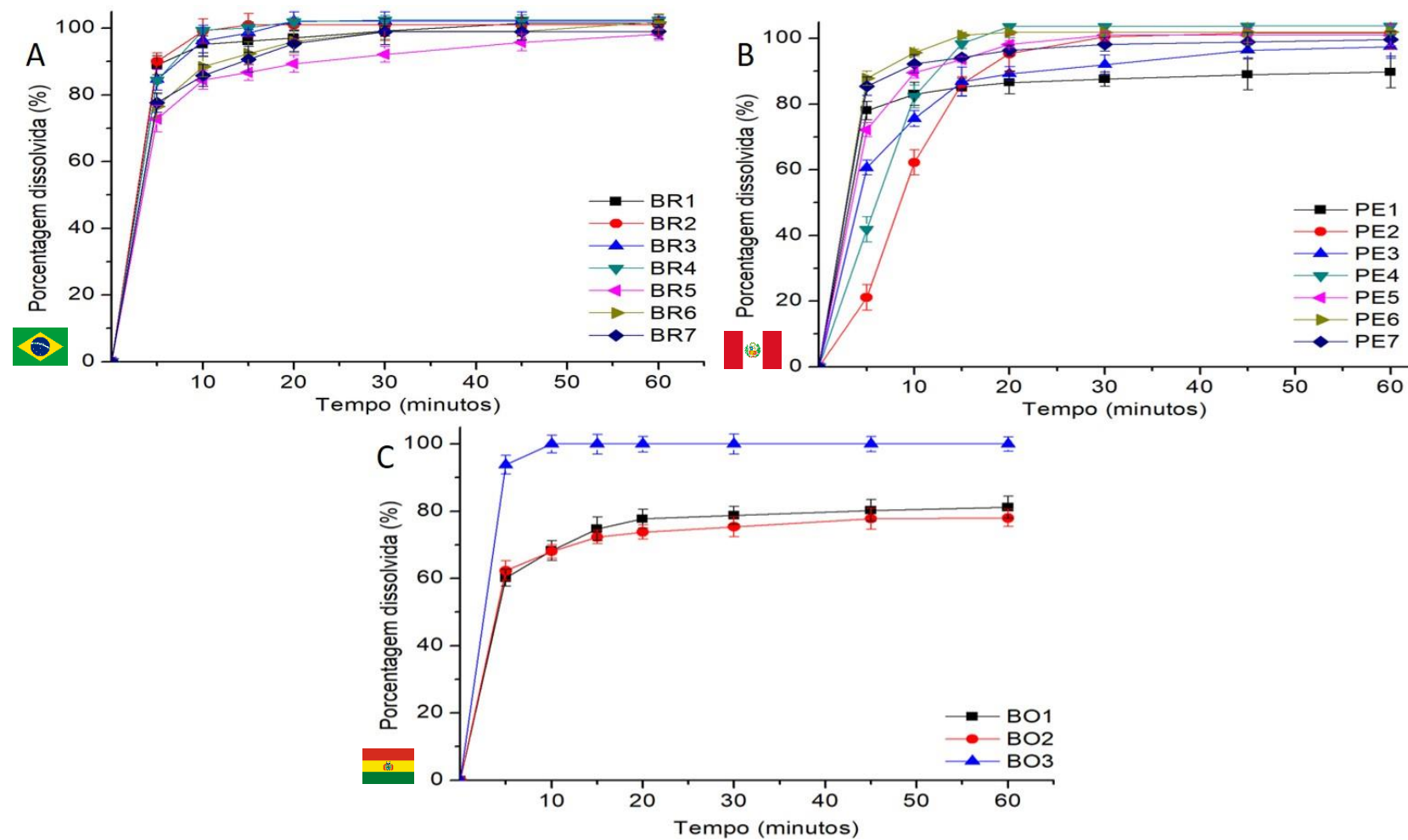
Em contrapartida, o produto denominado BR5 apresenta uma porcentagem dissolvida do fármaco de aproximadamente 70% aos 5 minutos e, na sequência, liberou os 15% restantes até os 30 minutos. Nesse caso, o produto apresentou um desempenho distinto, refletido no perfil e sendo diferente aos perfis avaliados dos polimorfos I e VIII.

Na Figura 2B, são exibidos os perfis de dissolução dos produtos peruanos. PE1, PE5, PE6 e PE7 mostraram uma quantidade de fármaco dissolvida maior que 70% durante os primeiros 5 minutos de ensaio e, em seguida, liberaram o restante de fármaco da formulação. No entanto, PE1 mostrou porcentagem de fármaco dissolvida menor que 90% aos 60 minutos, sendo diferente às características apresentadas nos perfis dos polimorfos I e VIII.

Por outro lado, PE2 mostrou uma porcentagem de fármaco dissolvida menor (20% - 60%) durante os dois primeiros pontos de amostragem (5 e 10 minutos), o perfil de dissolução está com características semelhantes ao da formulação que contém o polimorfo I.

Os perfis de dissolução das formulações do mercado boliviano são apresentados na Figura 2C, sendo que BO3 apresenta um perfil com características aproximadas ao perfil do polimorfo VIII (> 85%) em 5 minutos. Por outro lado, BO1 apresentou uma porcentagem de fármaco dissolvida menor a 80%.

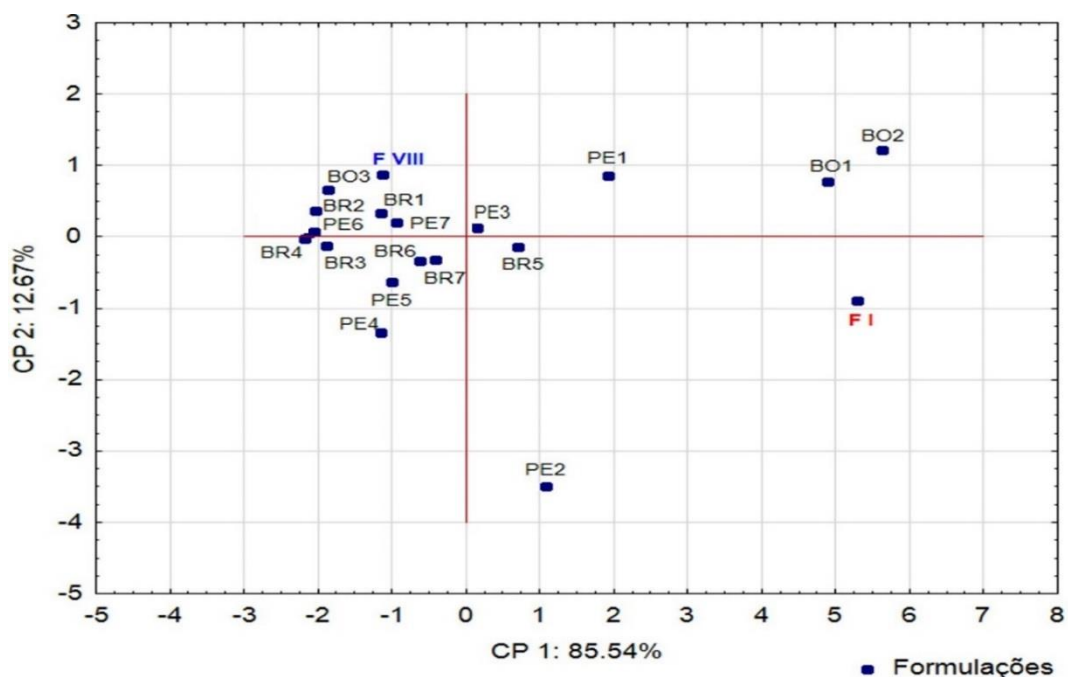
Figura 2. Perfis de dissolução dos produtos do mercado brasileiro (A), peruano (B) e boliviano (C) no meio de dissolução água, utilizando-se aparato II (pá), volume do meio 750 mL, a 65 rpm



### 3.2 Análise de componentes principais

Na Figura 3, são apresentadas as comparações das formulações estudadas, empregando a ferramenta estatística de análise de componentes principais. Dessa forma, observa-se que BO3, BR2, BR1, PE6 e PE7 estão próximas ao quadrante onde foi indicada a formulação que contém o polimorfo VIII. De outra parte, as formulações BR5 e PE2 pertencem ao quadrante onde está localizada a formulação que continha o polimorfo I., portanto, os dados indicam que essas formulações avaliadas apresentam um perfil equivalente aos perfis das formulações que continham os polimorfos mencionados nas suas composições.

Figura 3. Gráfico bidimensional dos componentes CP1 e CP2 na comparação das especialidades farmacêuticas do mercado brasileiro, peruano, boliviano e as formulações contendo aos polimorfos I e VIII

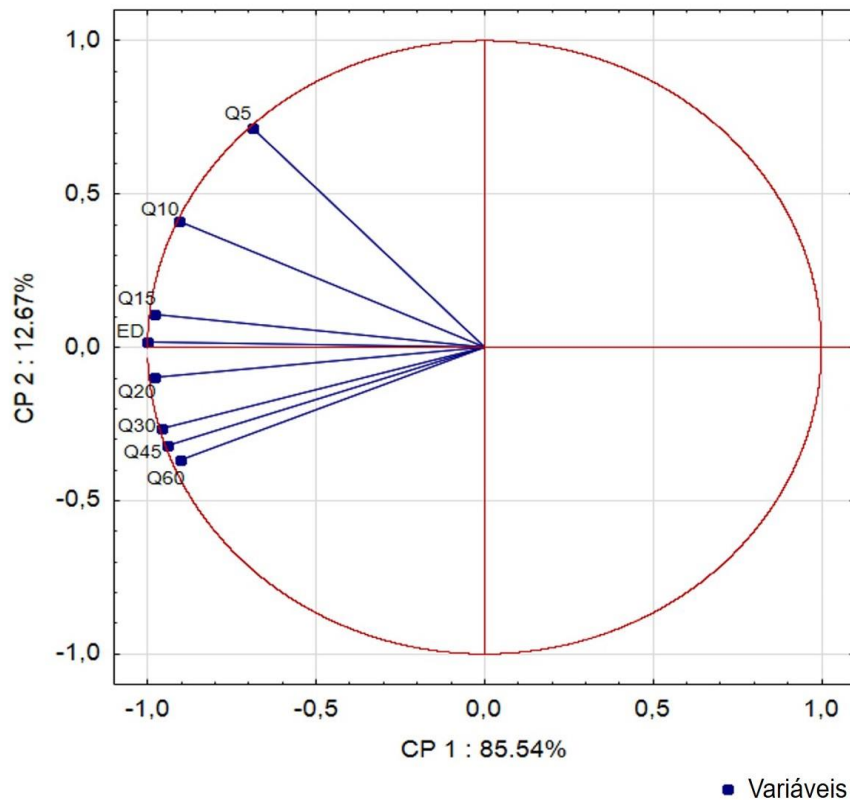


As formulações BR4, BR3, BR6, BR7, PE5, PE4, PE3, PE1, BO1 e BO2 apresentaram perfis afastados dos quadrantes que continham os polimorfos da ATR (VIII e I). Dessa forma, é possível dizer que as formulações mencionadas poderiam conter outros polimorfos ou talvez misturas deles. Por outro lado, a partir da análise estatística feita, é possível dizer que apresentam diferenças e que as desigualdades são provenientes das variáveis estudadas (Q5, Q10, Q15, Q20, Q30, Q45, Q60 e ED). A Figura 4 apresenta o gráfico bidimensional dos fatores CP1 e CP2, o qual indica que



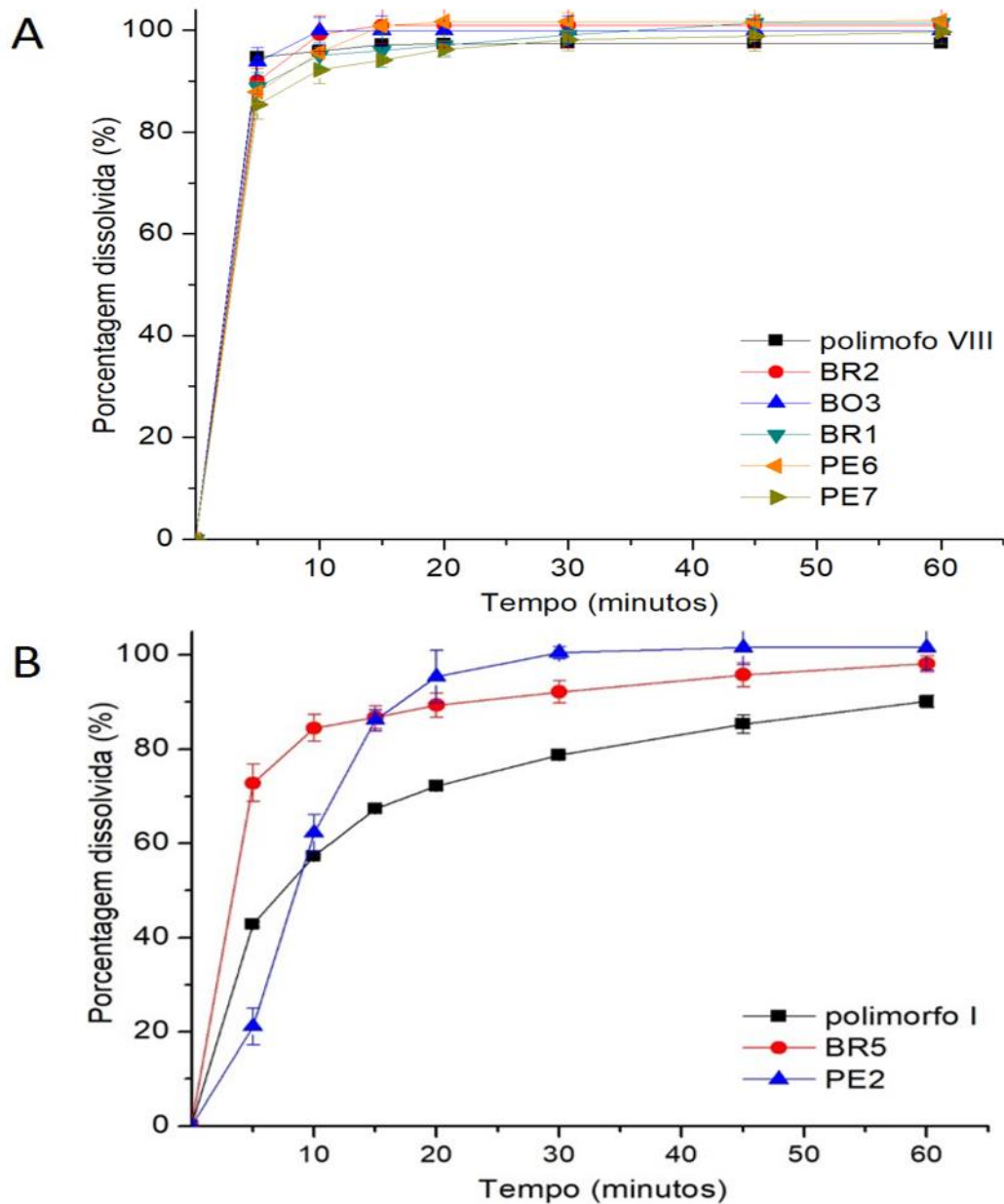
as variáveis Q5, Q10, Q15 e ED influenciaram nas diferenças dos perfis de dissolução das formulações, fato evidenciado no quadrante referente ao fator CP2.

Figura 4. Gráfico bidimensional dos fatores CP1 e CP2 na comparação das variáveis Q5% - Q60% e ED das especialidades farmacêuticas do mercado brasileiro, peruano e boliviano



A partir dos resultados da análise estatística foram plotados novamente os perfis dos produtos sul-americanos, a fim de observar as semelhanças em relação ao perfil de dissolução com as formulações que contém os polímeros VIII e I. A Figura 5A, apresenta a comparação dos perfis B03, BR2, BR1, PE6 e PE7 versus a formulação que contém a polímero VIII. Na sequência, a Figura 5B, mostra os perfis BR5 e PE2 versus a formulação que continha a forma I.

Figura 5. Perfis de dissolução da comparação das especialidades farmacêuticas avaliadas versus as formulações contendo os polimorfos VIII (A) e I (B) da ATR, a partir da análise de componentes principais, meio de dissolução água, utilizando-se aparato II (pá), volume do meio 750 mL a 65 rpm



A formulação que contém o polimorfo I da ATR apresenta um perfil com aproximadamente 40% de fármaco dissolvido em 5 minutos, em seguida, cerca de 30% entre 10 – 30 minutos e, 20% restantes até os 60 minutos. Em contrapartida, o perfil da formulação que contém o polimorfo VIII apresenta dois estágios de liberação, o primeiro é uma quantidade de fármaco dissolvido maior a 85% em 5 minutos, e o segundo, entre 10 – 15% até o final do tempo do ensaio.

#### **4. Conclusões**

De acordo com os resultados obtidos, a partir do método aqui empregado, foi possível discriminar as formas polimórficas I e VIII da ATR presentes nas formulações estudadas, em relação ao perfil de dissolução. Após a análise multivariada, empregando a técnica de análise de componentes principais aos dados obtidos do desempenho das especialidades farmacêuticas sul-americanas, duas formulações (BR5 e PE2) correspondem ao polimorfo I e cinco (BR1, BR2, PE6, PE7 e BO3) ao polimorfo VIII da ATR, mostrando os perfis de dissolução dos produtos avaliados equivalentes aos perfis das formulações que continham os polimorfos. As demais, possivelmente, apresentam misturas ou outras formas polimórficas. Dessa forma, demonstra-se também a importância de verificar se a informação técnica da matéria-prima utilizada realmente condiz com o desejado.

## 5. Referências Bibliográficas

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC nº 31, de 11 de agosto de 2010. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa)**, p. 36 – 38, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. RDC nº 200, de 26 de dezembro de 2017. Dispõe sobre os critérios para a concessão e renovação do registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências.

FDA. Food and Drug Administration. Method of dissolution. Acesso em: 29/06/2019. Disponível em: [https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp\\_SearchResults.cfm](https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_SearchResults.cfm)

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

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. FARMACOLOGIA BÁSICA E CLÍNICA. 12th ed. São Paulo. **McGraw-Hill**. p. 619-633. 2014.

MACHADO, J. C. et al. Development and Validation of a Discriminative Dissolution Method for Atorvastatin Calcium Tablets using in vivo Data by LC and UV Methods. **AAPS PharmSciTech**, 2014.

MINSA, Ministerio de Salud. Reglamento que regula la intercambiabilidad de medicamentos. Decreto Supremo N° 024-2018-S.A. p. 1–19, 2018.

OLIVEIRA, M.A.; LACERDA, C.D.; BONELLA, A.F. Developing methods to compare tablet formulations of atorvastatin. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.48, n.4, p. 801-810, 2012.

OMS. Medicines: International Cooperation and Harmonization. Organização Mundial da Saúde; 2011.

RODRIGUES, L. N. C.; WATANABE, S. P.; FERRAZ, H. G. Perfil de dissolução in vitro de comprimidos de primaquina disponíveis para tratamento de malária no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 1, p. 41–45, 2008.

RUMEL, D.; NISHIOKA, S. A.; SANTOS, A. A. M. Intercambialidade de medicamentos: abordagem clínica e o ponto de vista do consumidor. *Rev. Saúde Pública*. v.40, n.5, p. 921-927. 2006.

SANDRI, M. M. S; DE SETA, M. H.; LUIZA, V. L. Autoridades reguladoras de medicamentos sul-americanas: uma análise a partir de regras organizacionais. *Rev Panam Salud Publica*, v. 34, n. 3, p. 169-175, 2013.

SHETE, G.; PURI, V.; KUMAR, L.; BANSAL, A.K. Solid state characterization of commercial crystalline and amorphous atorvastatin calcium samples. **AAPS PharmaSciTech**, v.11, p. 598-609, 2010.

SKORDA, D.; KONTOYANNIS, C.G. Identification and quantitative determination of atorvastatin calcium polymorph in tablets using FT-Raman spectroscopy. **Talanta**, v.74, p. 1066-1070, 2008.

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

UNIMED. Unidad de medicamento y tecnología en salud. Reglamento a la ley del medicamento. Decreto Supremo N° 25235. p.1-25,1998.