

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

Desenvolvimento de método de dissolução baseado no delineamento de experimentos (DOE) para forma farmacêutica de liberação imediata contendo estradiol

Maiely Bueno Milaré

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz

São Paulo
2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Desenvolvimento de método de dissolução baseado no delineamento de experimentos (DOE) para forma farmacêutica de liberação imediata contendo estradiol

Maiely Bueno Milaré

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr6018

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz

São Paulo

2020

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

M637d Milaré, Maiely Bueno
Desenvolvimento de método de dissolução baseado no delineamento de experimentos (DOE) para forma farmacêutica de liberação imediata contendo estradiol / Maiely Bueno Milaré. - São Paulo, 2020. 104 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia - Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos.
Orientador: Ferraz, Humberto Gomes

1. Ensaio de dissolução. 2. Desenvolvimento de métodos de dissolução. 3. estradiol. 4. Delineamento de experimentos. 5. Aparato USP IV. I. T. II.
Ferraz, Humberto Gomes, orientador.

Maiely Bueno Milaré

Desenvolvimento de método de dissolução baseado no delineamento de experimentos (DOE) para forma farmacêutica de liberação imediata contendo estradiol

Comissão Julgadora da Dissertação para Obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz
orientador/presidente

1ª examinadora: Profª Dra Bianca Ramos Pezzini

2ª. examinadora: Profª Dra Valentina Porta

3o. examinador: Profº Dr Marcelo Dutra Duque

4o. examinador: Profº Dr Humberto Gomes Ferraz

São Paulo, 18 de agosto de 2020.

Dedico esse trabalho...

Ao meu pai e meu melhor amigo, Antonio, que com muito carinho me incentivou e apoiou em todas as decisões, além de me fazer rir ao me ensinar os mais sábios conselhos e ditados;

À minha mãe, Magaly, que com amor me criou e me tornou uma mulher capaz de enfrentar qualquer adversidade, além de entender minha ausência em muitos momentos;

Às minhas irmãs, Paula e Debora, que sempre serão a minha força e a minha luz; sem vocês eu nem saberia existir;

Ao irmão que a vida me presenteou, Rafael e sua Poliana, que estiveram ao meu lado em cada degrau desse desafio, eu dedico e agradeço imensamente por tudo;

Aos meus entes mais queridos, que são a base da minha vida.

Agradecimentos

Ao Prof. Humberto Ferraz, pelas discussões e parceria nos desafios superados; sobretudo, pela confiança e ensinamentos que levarei para a vida toda;

À equipe do laboratório DEINFAR, pelo carinhoso auxílio em muitas etapas do meu mestrado;

Gratidão especial à Michele Issa, que, além de me ajudar em muitos momentos desse trabalho, se tornou referência de mulher guerreira e um exemplo de competência para mim;

A todos os meus amigos e amigas, que tiveram paciência e me suportaram nos meus piores dias e vibraram comigo em todos os momentos de superações e conquistas; seria impossível listar todos os nomes;

Ao time “Congresso”, cujas pessoas só me trazem bons momentos e saudades;

À Libbs Farmacêutica, pelo suporte ao trabalho concedido. Especialmente à gestão e equipe de Desenvolvimento Analítico, que me ajudaram em inúmeras situações e acreditaram no meu trabalho. Este mestrado contou com o auxílio financeiro da Libbs Farmacêutica Ltda através de contrato de prestação de serviços técnico-científicos firmado com a Fipfarma em 04 de maio de 2017.

“Nunca sabemos o quão forte somos até que ser forte seja a única escolha.”

Autor desconhecido.

“Para os homens é impossível, mas não para Deus, porque para Deus todas as coisas são possíveis.”

A Bíblia, Marcos 10:27.

RESUMO

MILARÉ, M. B. **Desenvolvimento de método de dissolução baseado no delineamento de experimentos (DoE) para forma farmacêutica de liberação imediata contendo estradiol.** 2020. 104f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Apesar dos ensaios *in vitro* não poderem substituir totalmente a avaliação da biodisponibilidade do fármaco, o ensaio de dissolução é uma ferramenta importante no desenvolvimento de formulações e deve apresentar caráter discriminativo para avaliação da qualidade do medicamento para o qual foi desenvolvido. O objetivo do trabalho foi abordar os principais aspectos envolvidos no desenvolvimento de ensaios de dissolução, especificamente para o fármaco estradiol, através de desenvolvimento convencional (por meio de tentativa e erro) e utilizando o delineamento de experimentos (DoE) com a finalidade de entender se há possibilidade de reduzir o número de testes aplicados durante o desenvolvimento analítico e obtenção de métodos capazes de discriminar diferenças nas formulações contendo estradiol. Ainda, complementarmente, foi desenvolvido um método de dissolução utilizando o aparato IV com foco em adquirir um método com caráter discriminativo satisfatório. Por outro lado, hormônios são substâncias químicas que circulam por todo o corpo humano atuando como mensageiros, sendo que os estrógenos são os hormônios femininos mais relevantes. Usualmente, nos produtos farmacêuticos para contracepção ou reposição hormonal, os fármacos estão em uma concentração bastante baixa, portanto, requerem certos cuidados analíticos como um método capaz de determinar as menores concentrações com seletividade e demais parâmetros de validação satisfatórios, avaliação crítica dos filtros e seu impacto na dissolução, bem como a avaliação da adsorção do ativo com outros componentes plásticos, como por exemplo, seringas e cânulas de coleta. Diante deste quadro, o desenvolvimento das condições ideais de dissolução para comprimidos revestidos contendo estradiol, por duas abordagens distintas e três aparatos, apresentaram resultado satisfatório, uma vez que, o método de dissolução foi considerado adequado por apresentar caráter discriminativo para o produto em análise, sendo que o uso da ferramenta de planejamento de experimentos permite otimizar o tempo na rotina através de um número menor de testes necessários para definição dessas condições.

Palavras-chaves: “ensaios de dissolução”, “desenvolvimento de métodos de dissolução”, “hormônios sexuais”, “estradiol”, “delineamento de experimentos”, “aparato IV”.

ABSTRACT

MILARÉ, M. B. **Development of dissolution method based on design of experiments (DoE) for immediate release pharmaceutical dosage form containing estradiol**. 2020. 104p. Dissertation (Master) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2020.

Although *in vitro* assays cannot completely replace the evaluation of the bioavailability of the drug, the dissolution assay is an important tool in the development of formulations and must have a discriminatory character to assess the quality of the drug for which it was developed. The objective of this work was to approach the main aspects involved in the development of dissolution tests, specifically for the drug estradiol, through conventional development (trial and error) and using the design of experiments (*DoE*) to understand if reduces the number of tests applied during analytical development is possible and obtaining methods capable of discriminating differences in formulations containing estradiol. In addition, a dissolution method was developed using the apparatus IV focusing to obtain a satisfactory discriminatory method. Still, hormones are chemicals that circulate throughout the body acting as messengers, and estrogens are the most relevant female hormones. Usually, in pharmaceutical products for contraception or hormone replacement therapy, drugs substances are in a very low concentration, therefore, they require certain analytical care as a method capable of determining the lowest concentrations with selectivity and other satisfactory validation parameters, critical evaluation of the filters and their impact on dissolution, as well as the evaluation of the adsorption with other plastic components, such as syringes and collection cannulas. In view of this situation, the development of ideal dissolution conditions for coated tablets containing estradiol, using two different approaches and three apparatus, presented a satisfactory result, since the dissolution method was considered adequate because it ensures a discriminatory character for the product under analysis, where the use of the design of experiments optimize the time in the routine through a smaller number of tests necessary to define these conditions.

Keywords: "Dissolution tests", "dissolution methods development", "sex hormones", "estradiol", "design of experiments", "apparatus IV".

SUMÁRIO

PARTE I: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE DISSOLUÇÃO PARA MEDICAMENTOS SÓLIDOS ORAIS CONTENDO ESTRADIOL	12
1. INTRODUÇÃO	14
2. MECANISMO DE AÇÃO DOS HORMÔNIOS	15
3. CLASSIFICAÇÃO DOS HORMÔNIOS.....	16
3.1. Breve introdução aos hormônios	16
3.2. Hormônios sexuais.....	17
4. MENOPAUSA, REPOSIÇÃO HORMONAL E ESTRADIOL.....	20
4.1. Menopausa	20
4.2. Reposição hormonal.....	21
4.3. Estradiol	21
5. MÉTODOS DE DISSOLUÇÃO PARA MEDICAMENTOS SÓLIDOS ORAIS CONTENDO FÁRMACOS HORMONAIS.....	24
5.1. Aspectos gerais.....	24
5.2. Aparatos.....	26
5.3. Meios de dissolução	30
5.4. Solubilidade.....	31
5.5. <i>Sink conditions</i>	32
5.6. Baixa solubilidade dos fármacos e tensoativos.....	33
5.7. Interação de hormônios com filtros.....	36
6. CONCLUSÃO.....	38
7. REFERÊNCIAS	39
PARTE II: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO NOS APARATOS (usp) I, II E IV PARA COMPRIMIDOS CONTENDO 1 MG DE ESTRADIOL.....	48
1. INTRODUÇÃO	50
1.1. Informações sobre o fármaco	51
1.2. Informações sobre o medicamento.....	52

2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
2.1. Materiais.....	53
2.2. Métodos	54
2.3. Preparo das soluções.....	55
2.3.1. Preparo de HCl 0,1N	56
2.3.2. Preparo de tampão acetato pH 4,5.....	56
2.3.3. Preparo de tampão fosfato pH 6,8.....	56
2.3.4. Preparo do diluente e fase móvel	57
2.3.5. Preparo da solução padrão	57
2.4. Teste de filtros e estabilidade da solução	57
2.5. Ensaio de solubilidade.....	58
2.6. Determinação das <i>sink conditions</i>	59
2.7. Método de dissolução para comprimidos de estradiol	59
2.7.1. Tentativa e erro com aparato I e II.....	59
2.7.2. Método com planejamento experimental (<i>DoE</i>) com aparato I e II	60
2.7.3. Ensaio complementares	62
2.7.4. Método com planejamento experimental (<i>DoE</i>) com aparato IV	62
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
3.1. Avaliação dos filtros e estabilidade das soluções	64
3.2. Solubilidade do estradiol hemi-hidratado	65
3.3. Cálculo da <i>sink condition</i> para estradiol hemi-hidratado	68
3.4. Desenvolvimento do método de dissolução pelo aparato I e II	69
3.4.1. Método convencional.....	69
3.4.2. Planejamento experimental fatorial fracionado	84
3.5. Desenvolvimento do método de dissolução pelo aparato IV utilizando planejamento experimental fatorial completo	92
3.5.1. Análise de variância Q% 30 minutos	95
3.5.2. Análise de variância ED% 60 minutos	96
4. CONCLUSÃO.....	100
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

**PARTE I: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE
DISSOLUÇÃO PARA MEDICAMENTOS SÓLIDOS
ORAIS CONTENDO ESTRADIOL**

RESUMO

O desenvolvimento de um novo método de dissolução com caráter discriminativo é sempre desafiador dadas as particularidades de cada fármaco, formulação e processo. O primeiro capítulo deste trabalho teve como objetivo principal revisar a literatura sobre os desafios no desenvolvimento de métodos de dissolução, especialmente para hormônios sexuais, com principal foco no estradiol devido a sua relevância e predominância na clínica atual, seja utilizado isoladamente ou em associação à outras drogas. Este hormônio regula muitas funções na mulher e, na menopausa, sua reposição é altamente indicada para reduzir riscos de problemas musculares e esqueléticos, alguns tipos de câncer e sintomas genitais e urinários. Por tratar-se de um ensaio de grande importância nos controles de qualidade das indústrias farmacêuticas e, em pesquisas de desenvolvimento galênico, principalmente com o intuito de prever o desempenho do medicamento *in vivo* há mais de 100 anos, são muitas as referências que relatam o emprego de métodos de dissolução. Além disso, as principais agências regulatórias na área sanitária possuem guias para descrever quais são as etapas que devem ser avaliadas e requerimentos esperados em um método de dissolução para garantia da qualidade lote a lote de um medicamento comercializado. Portanto, foram compiladas as principais abordagens da literatura a respeito dos parâmetros e pontos críticos para o desenvolvimento de um método de dissolução para fármaco hormonal de baixa dosagem.

1. INTRODUÇÃO

O ensaio de dissolução é utilizado para avaliar formulações farmacêuticas desde 1960 com o intuito de prever o desempenho do medicamento *in vivo* e sua importância é reconhecida há mais de 100 anos (DUMONT et al, 2007; KOSTEWICZ et al, 2014). O desenvolvimento de um método de dissolução específico para cada formulação em avaliação, bem como a garantia de seu caráter discriminativo, é recomendado pelos principais órgãos reguladores em vigilância sanitária do mundo todo (BRASIL, 2010a; EMA, 2017; FDA, 1997).

Apesar dos ensaios *in vitro* não poderem substituir totalmente a avaliação da biodisponibilidade do fármaco, o ensaio de dissolução é uma ferramenta importante no desenvolvimento da formulação e para controle de qualidade do produto acabado (GITE et al, 2016). Fármacos de alta solubilidade, em formulações de liberação imediata, são candidatos à bioequivalência, ou seja, os ensaios de dissolução podem substituir estudos *in vivo*, proporcionando menor tempo para que o medicamento esteja disponível para a população e diminuindo a exposição de voluntários à estudos de bioequivalência/ biodisponibilidade relativa (BRASIL, 2011; FDA, 2017; EMA, 2020).

O capítulo geral <711> da Farmacopeia Americana (USP-NF, 2020a) traz as principais recomendações para que os ensaios de dissolução previstos em suas monografias sejam atendidos, como por exemplo, dimensão das cubas; posicionamento e centralização dos aparatos no equipamento de dissolução considerando, especialmente, os aparatos I e II (cestos e pás, respectivamente); quantidade e tipo de enzima aplicável aos meios de dissolução de acordo com o pH para as formas farmacêuticas de cápsulas gelatinosas; os procedimentos para condução do teste e; os critérios de aceitação para liberação das formas farmacêuticas no controle de qualidade.

Tais informações também são previstas pelo capítulo 5.1.5 da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019), indicando que os parâmetros a serem avaliados, critérios de aceitação e principais cuidados nos ensaios de dissolução, para a rotina de controle de qualidade, são harmonizados.

Contudo, o desenvolvimento de um novo método de dissolução com caráter discriminativo, é sempre desafiador, dadas as particularidades de cada fármaco, formulação e processo. Visando uma padronização e uma orientação sobre o desenvolvimento desses métodos, as principais agências sanitárias vêm constantemente atualizando seus guias sobre dissolução, bem como os

capítulos das farmacopeias que também tratam desse tema (BRASIL, 2010; BRASIL, 2018; EMA, 2017; FDA, 1997; USP-NF, 2020b).

A Farmacopeia Americana traz no capítulo geral <1092> orientações detalhadas para auxiliar no desenvolvimento de métodos de dissolução (USP-NF, 2020b). Essas recomendações têm como objetivo auxiliar o desenvolvimento coerente de um novo método de dissolução, porém, de uma forma geral, não entrando em detalhes sobre formas farmacêuticas ou classes biofarmacêuticas dos fármacos.

Por outro lado, o termo *hormônio* é originado do grego *hormona* e se refere aos componentes químicos responsáveis por circular por todo o organismo enviando “mensagens” às células distantes de sua origem. Tais mensagens, ao serem recebidas pelas células características, através dos receptores específicos, são traduzidas em regulação do armazenamento, produção e utilização de energia, na adaptação de novos ambientes, sob condições estressantes, no estímulo ao crescimento, desenvolvimento e maturação das funções dos sistemas reprodutores masculino e feminino (PARKER & SHIMMER, 2012).

A endocrinologia é a área que estuda os hormônios, e utilizou das metodologias disponíveis em cada época para sondar os vários sistemas endócrinos. No intervalo de 1900 a 1960, estudos na área de endocrinologia se aprofundaram ao nível fisiológico, o que resultou na descoberta de, aproximadamente, 25 hormônios. A era bioquímica dos hormônios se iniciou por volta de 1955-1960 e se estende até os dias atuais (NORMAM & HENRY, 2014).

As atividades metabólicas no ser humano são lideradas pelo sistema neuroendócrino, sendo os processos mais complexos realizados por um ou mais hormônios, através de sinalizações neuronais ou hormonais tipicamente. No sistema hormonal, a sinalização é feita através da excreção de hormônios na circulação sistêmica e, neste caso, estes vão percorrer longas distâncias até a célula alvo (NELSON & COX, 2014).

Este trabalho teve como objetivo realizar uma revisão na literatura sobre os principais desafios no desenvolvimento de métodos de dissolução para hormônios sexuais, tendo como alvo o fármaco estradiol devido a sua relevância e predominância na clínica atual, sendo utilizado isoladamente ou em associação à outras substâncias ativas.

2. MECANISMO DE AÇÃO DOS HORMÔNIOS

Os hormônios agem principalmente através de duas maneiras: a primeira através da ativação de adenilciclase de células-alvo, que resulta na formação de AMP-cíclico e a segunda por indução da produção de enzimas que atuam no material genético. No **Quadro 1** estão alguns

exemplos de hormônios que tem mecanismo de ação através da ativação de adenilciclase e os que atuam através da síntese de enzimas diretamente relacionadas ao gene (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988).

Quadro 1 – Exemplos de hormônios de acordo com seu mecanismo de ação.

Ação através da ativação de adenilciclase	Ação através da síntese de enzimas
Insulina	Androgênios e Estrogênios
Oxitocina	Corticotrofina e Insulina
Tirotrófina	Glicocorticóides e hormônios da tireóide

Assim, de acordo com NELSON & COX (2014) hormônios peptídicos (insulina, glucagon), catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), e eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos) (hormônios denominados de mensageiros primários) atuam se ligando seletivamente à receptores na membrana plasmática da célula-alvo, ativando um segundo mensageiro sendo que os mensageiros primários não entram na célula. Os esteroides (adrenocorticoides e sexuais), vitamina D (calcitriol), retinoides (retinol, ácido retinóico) e os hormônios da tireoide entram nas células-alvo e alteram a expressão gênica, atuando em receptores nucleares específicos.

3. CLASSIFICAÇÃO DOS HORMÔNIOS

3.1. Breve introdução aos hormônios

Hormônios podem pertencer às seguintes classes químicas: peptídeos, esteroides, derivados de aminoácidos aromáticos e de ácidos graxos, ou seja, podem ser moléculas orgânicas pequenas ou grandes polipeptídios ou glicoproteínas (KOLKOROVAS & BURCKHALTER, 1988).

Ainda é útil dividir os hormônios em dois grupos: os que atuam na maior parte através de receptores nucleares (esteroides, tireoidianos) e aqueles que atuam predominantemente através de receptores de membrana (peptídicos e constituintes de aminoácidos). A atuação nos receptores nucleares controla a transcrição nas células alvos enquanto a atuação nos de

membrana proporciona efeitos rápidos nas vias de transdução de sinais (PARKER & SHIMMER, 2012).

Em uma das referências consultadas (LARINI, 2008), e mais popularmente, os hormônios são classificados em femininos, masculinos, corticosteroides, para tratamento de diabetes, da tireoide e outros com ação hormonal e anti-hormonal. Os sexuais podem ser naturais (produzidos endogenamente) ou sintéticos, ou seja, preparados quimicamente idênticos aos hormônios produzidos pelo organismo.

3.2. *Hormônios sexuais*

Os hormônios sexuais se dividem, principalmente, em andrógenos e esteroides anabolizantes, estrógenos e progestogênios (KOLKOROVAS & BURCKHALTER, 1988; DELUCIA & OLIVEIRA-FILHO, 2004).

Estrógenos são os hormônios femininos, obtidos no ovário e na placenta, sendo produzidos em menor quantidade nos testículos e córtex da suprarrenal. São sintetizados a partir da testosterona, cuja molécula principal é o colesterol e, o estrogênio mais potente é o estradiol, seguido pela estrona e estriol (RANG et al, 2016a).

Esses hormônios apresentam inúmeras ações na mulher, sendo responsáveis pelas alterações nas características sexuais femininas, ciclo menstrual, aumento na vascularização e atividade do epitélio da vulva e vagina, aumento da reserva lipídica, aumento na espessura da pele, atividade das glândulas sebáceas, entre outras (DELUCIA & OLIVEIRA-FILHO, 2004).

Os progestogênios, progestágenos, ou progestinas são produzidos pelas gônadas femininas (ovários) e apresentam ações conjuntas com os estrogênios para desenvolvimento e modulação das características sexuais na mulher, por exemplo, diminuem a proliferação endometrial causada pelo estrogênio, suprimem a menstruação e contratilidade do útero para manutenção da gestação. Além disso, também apresentam várias funções metabólicas (LEVIN & HAMMES, 2012).

Mulheres após a menopausa, ou seja, com suspensão da menstruação por, pelo menos, 12 meses, apresentam sintomas desagradáveis, que abalam a qualidade de vida, como por exemplo, os “fogachos”, que são as sensações súbitas de ondas de calor pelo corpo. Um dos tratamentos para auxiliar a minimizar esses sintomas é o uso de hormônios estrogênios e progestogênios em associação ou a prescrição de estrogênios isolados (MALLHI, 2018).

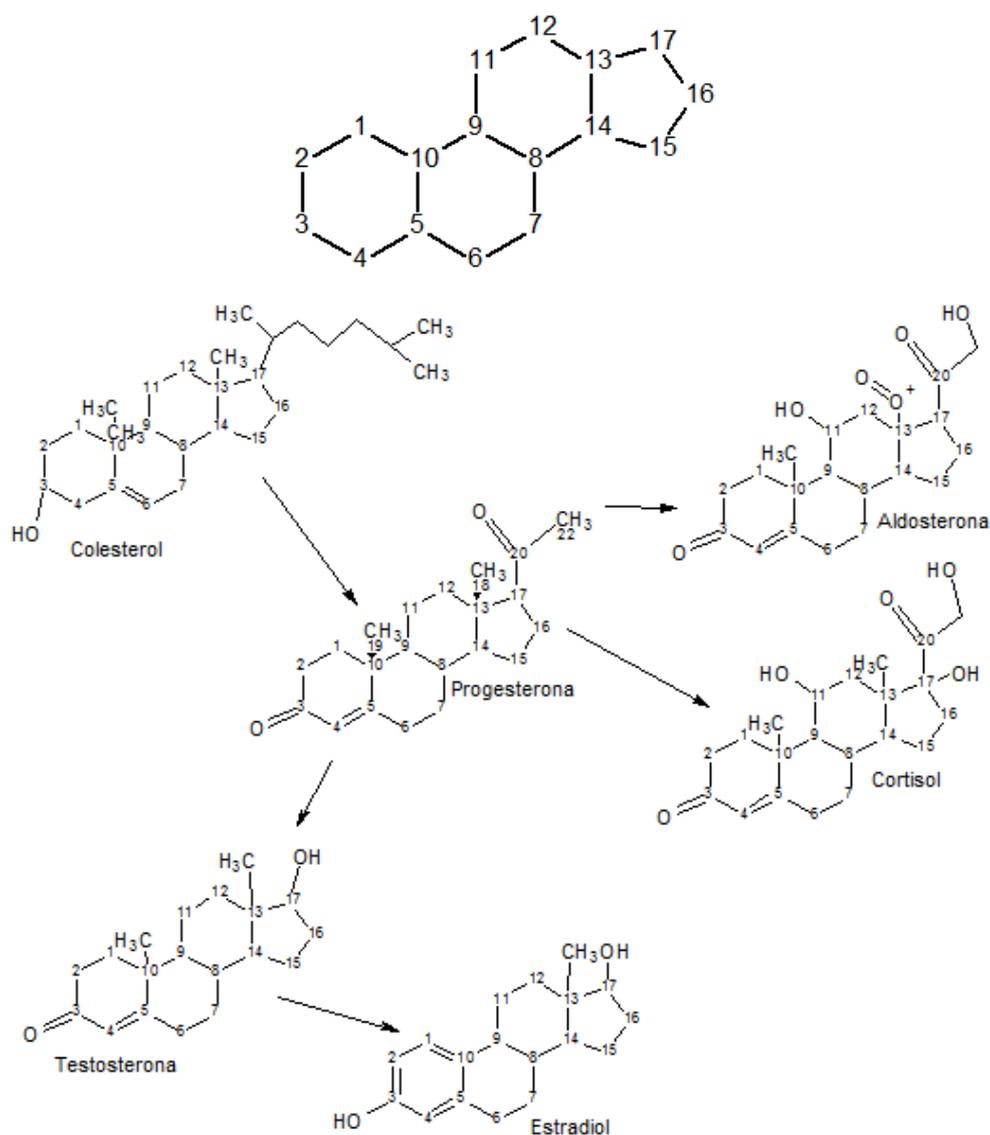
A reposição hormonal em mulheres na menopausa deve ser feita de forma contínua para que não haja depleção dos níveis de estrogênios e, assim, evitar que os sintomas dessa fase de vida feminina se intensifiquem (ALLAIS, 2018).

Contraceptivos orais, usualmente, apresentam a associação de um estrogênio e um progestogênio com eficácia teórica de 99,9% e se apresentam no mercado comercialmente disponíveis em diversas formulações (LEVIN & HAMMES, 2012).

O principal hormônio sexual masculino (andrógeno) é a testosterona que é produzida principalmente pelos testículos, mas também pode ser produzida pelos ovários e glândulas suprarrenais (SIURANA et al, 2017). Esteroides androgênicos anabolizantes são quimicamente semelhantes à testosterona e possuem propriedades responsáveis pelo desenvolvimento das características sexuais masculinas, como aumento de volume e força, sendo, por este motivo, usados, abundantemente, para fins estéticos (ABRAHIN et al, 2013).

A estrutura química comum aos hormônios esteroides pode ser observada na **Figura 1**.

Figura 1 - Estrutura básica dos hormônios esteroides.



Estruturas desenhadas com auxílio do software ChemSketch.

No topo da **Figura 1**, observa-se a estrutura básica dos hormônios sexuais e corticoides, o ciclo pentano-peridrofenantreno, identificando os 17 carbonos presentes em sua molécula. Nota-se que os compostos utilizados para ilustração possuem apenas uma ligação dupla em sua estrutura básica, sendo que, quanto menor a quantidade de ligações duplas nas cadeias lipídicas, menor a solubilidade em água (NELSON & COX, 2014). O caráter lipofílico dessa classe de fármacos implica na dificuldade de solubilização desses em meios aquosos.

4. MENOPAUSA, REPOSIÇÃO HORMONAL E ESTRADIOL

4.1. *Menopausa*

Com a puberdade feminina, ocorre um aumento na liberação de hormônios do hipotálamo e da adeno-hipófise para estimular a secreção de estrogênios pelos ovários com a finalidade de desenvolver características sexuais secundárias e regular o ciclo de menstruação e gestação. No ciclo normal da mulher, que se inicia com a menstruação ou liberação da camada mais superficial da parede do útero, ocorre a fase folicular e a fase lútea (RANG et al, 2016a).

Na fase folicular, após o fim da menstruação, o hormônio liberador de gonadotrofina por sua vez estimula a adeno-hipófise a liberar o hormônio folículo-estimulante e o hormônio luteinizante. Esses estimulam a produção de folículos, sendo que, dentre eles, um cresce mais (denominado folículo de Graaf) e libera estrogênios, o qual é responsável pela regeneração do endométrio nessa fase e age retroalimentando negativamente a adeno-hipófise na liberação dos hormônios citados, seja pela via endógena ou pela administração oral de medicamentos contendo estrógenos (RANG et al, 2016a).

Durante a metade do ciclo ocorre a ruptura do folículo contendo o óvulo, que pode ser fecundado ou não. Esse folículo que rompeu forma o corpo lúteo que estimula a liberação de progesterona, a qual promove retroalimentação negativa para liberação do hormônio luteinizante, e caso não haja fecundação/gestação, a secreção de progesterona cessa e ocorre novamente a menstruação, reiniciando o ciclo e todas essas variações hormonais preservam a saúde do sistema reprodutor feminino. (RANG et al, 2016a).

Para a mulher, existe um momento em que o corpo passa por mudanças em sua fisiologia que resultam na menopausa. Naturalmente, esse período que pode durar até 5 anos é denominado perimenopausa, e é onde ocorre uma queda do estrogênio. Na menopausa (reconhecida após passados 12 meses da última menstruação e acontece geralmente em torno dos 48 aos 50 anos de idade (BRASIL, 2020a)), seja natural ou induzida por cirurgias, há o encerramento dos ciclos menstruais já que os ovários não produzem mais hormônios.

Nesse momento, muitas mulheres apresentam sintomas físicos desagradáveis, problemas de saúde e psicológicos devido envelhecimento e perda da capacidade reprodutiva (FERREIRA et al, 2013).

4.2. Reposição hormonal

Nos casos onde há sintomas desagradáveis e/ou indesejáveis na fase de menopausa, a terapia de reposição hormonal que pode ser feita com estrógenos isolados ou associados à progestógenos (PARDINI, 2014), é indicada de maneira individualizada, preferencialmente, com hormônios naturais e de baixa dosagem (como exemplo, estradiol, estrona, estriol e estetrol), por um determinado período de tempo.

Em geral, a reposição hormonal é realizada concomitante à monitorização anual com mamografia, estímulos à atividade física, dieta equilibrada e abolição do tabagismo (LIMA & ALDRIGUI, 2002).

Os principais sintomas apresentados na menopausa e, que são comprovadamente atenuados e/ou sanados com a terapia de reposição, são os fogachos e sudorese noturna, além de contribuir com menor probabilidade de incontinência urinária, infecções recorrentes do trato urinário, atrofia vaginal, perda óssea/ osteoporose, risco de câncer de cólon, risco de câncer e hiperplasia endometrial ao utilizar estrógenos associados a progestogênios, risco de doença de Alzheimer, risco de diabetes melito tipo II, entre outros. Efeitos negativos da reposição hormonal incluem aumento de risco de eventos tromboembólicos, risco de câncer e hiperplasia endometrial quando utilizado estrógenos isolados e risco de acidente vascular cerebral (PARDINI, 2014; CHUFFA et al, 2017).

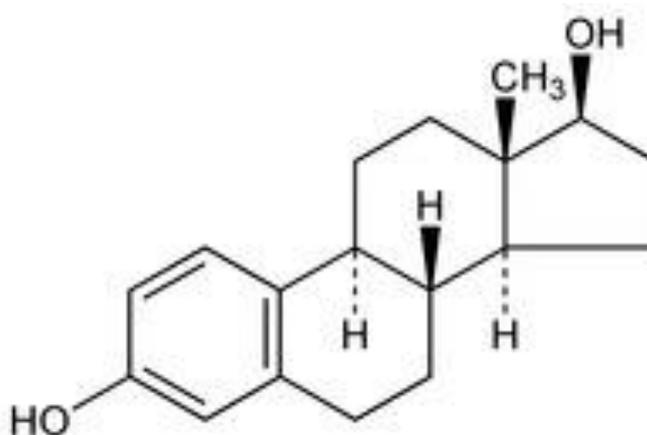
Em 2017, a Sociedade Norte Americana de Menopausa publicou uma posição em relação ao entendimento dos riscos e benefícios do tratamento de reposição hormonal, indicando que a terapia com estrogênios (estradiol, estrona) deve ser avaliada com a menor dose efetiva para prevenção dos sintomas mais críticos da menopausa como perda óssea e outros potenciais riscos à saúde (geniturinários) da mulher, associando progestogênios quando necessário proteger o endométrio (NORTH AMERICAN, 2017).

4.3. Estradiol

O 17 β -estradiol é o hormônio sexual feminino circulante mais importante até a idade em que ocorre a menopausa, quando este tem seus níveis drasticamente reduzidos devido à diminuição da função ovariana. Este regula muitas funções na mulher e por isso, nesse período, sua reposição é altamente indicada para reduzir riscos de problemas musculares e esqueléticos, determinados tipos de câncer e sintomas genitais e urinários (LAAKKONEN et al, 2017).

O estradiol, sinônimo de 17β-estradiol, é indicado, geralmente, para reposição hormonal, para anticoncepção e para deficiência ovariana prematura, e apresenta fórmula molecular $C_{18}H_{24}O_2$, massa molecular de 272,39 g/mol, pKa 10,33 e a estrutura química abaixo (**Figura 2**) (LOFTSSON, 2015; THE MERCK INDEX, 2018; CHEMICALIZE, 2020; USP-NF, 2020c). A sua forma mais utilizada, devido sua estabilidade química, é a hemi-hidratada.

Figura 2 - Estrutura química do estradiol.

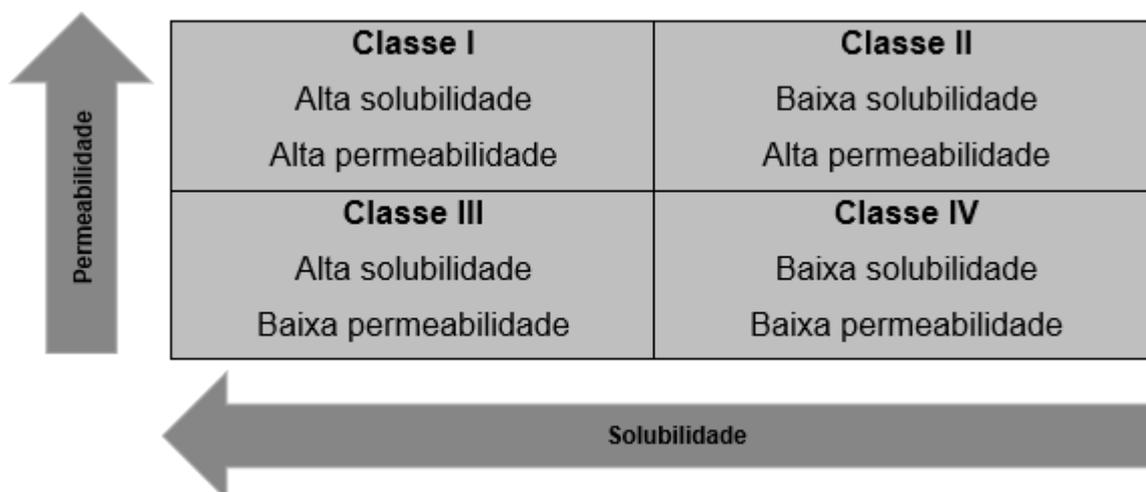


Fonte: Chemicalize, 2020.

Na literatura, o estradiol foi relatado como pertencente às classes I (LOFTSSON, 2015) e II (EMA, 2009) no sistema de classificação biofarmacêutica (SCB) proposto por AMIDON et al (1995) (**Figura 3**). A diferença dessa classificação encontrada nas literaturas deve-se às doses consideradas nos estudos (as doses registradas dos fármacos, em geral, podem variar de acordo com cada país). Como demonstrado na **Figura 1**, o estradiol apresenta características que dificultam a solubilidade em meios aquosos, porém, o grande número de cadeias carbônicas favorece a permeabilidade através do trato gastrointestinal.

A absorção de um fármaco administrado por via oral depende, especialmente, de sua ionização e sua lipofilicidade (RANG et al, 2016b). Nesse contexto, os hormônios, e mais especificamente o estradiol, apresentam alta capacidade de atravessar as membranas do trato gastrointestinal.

Figura 3 -Sistema de classificação biofarmacêutica proposto por AMIDON et al (1995).



Fonte: Adaptado de Amidon et al, 1995.

Um fármaco é considerado como sendo de alta solubilidade quando sua maior dose registrada administrada oralmente de uma só vez é solúvel em 250 mL, ou menos, em meios aquosos dentro da faixa de pH fisiológico, ou seja, dentro da faixa de pH de 1,0 a 6,8, a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ (BRASIL, 2010; BRASIL, 2013; BRASIL, 2018).

Na **Tabela 1** são apresentados alguns exemplos de hormônios e suas classes biofarmacêuticas. Com base nos dados, verificou-se que esses fármacos apresentam alta permeabilidade, não tendo sido encontrado nas referências consultadas hormônios pertencentes às classes III e IV do SCB. Vale ressaltar que a classificação biofarmacêutica de um fármaco pode variar com base na dose utilizada (FDA, 2017), devido diferenças na solubilidade. Logo, observa-se na Tabela 1 que um mesmo fármaco pode apresentar classificação como classe I ou II e isso se deve à variação da maior dose registrada do mesmo princípio ativo em cada país.

Tabela 1 – Classificação biofarmacêutica de algumas substâncias ativas hormonais.

	SCB Classe I	SCB Classe II
Fármacos	Levonorgestrel ¹	Medroxiprogesterona ¹
	Etinilestradiol ^{1,3}	Progesterona ^{2,3}
	Cortisol ³	Testosterona ^{2,3}
	Desogestrel ³	Drospirenona ^{2,3}

¹BCS database, 2020; ²GOLFAR & SHAYANFAR, 2019; ³BENET et al, 2011.

Assim, o estradiol tem alta permeabilidade, porém, a solubilidade do fármaco deve ser determinada experimentalmente para cada fabricante de insumo farmacêutico ativo uma vez que diferentes rotas de síntese podem fornecer substâncias com características físico-químicas distintas, levando a possíveis diferenças na taxa de solubilização e dissolução (BRASIL, 2018), e a definição como alta ou baixa solubilidade deve ser feita considerando sua dose.

Atualmente, o estradiol isolado é comercializado em diversas formas farmacêuticas sendo as mais comuns adesivo transdérmico, gel, comprimido e drágea (DrugBank, 2020; BRASIL, 2020b).

As formas farmacêuticas sólidas orais têm como vantagem maior estabilidade, facilidade para adequação de dose, facilidade de transporte e armazenamento e melhor adesão do paciente ao tratamento, especialmente, devido menor frequência e facilidade de administração (LAJOINIE et al, 2014).

5. MÉTODOS DE DISSOLUÇÃO PARA MEDICAMENTOS SÓLIDOS ORAIS CONTENDO FÁRMACOS HORMONAIIS

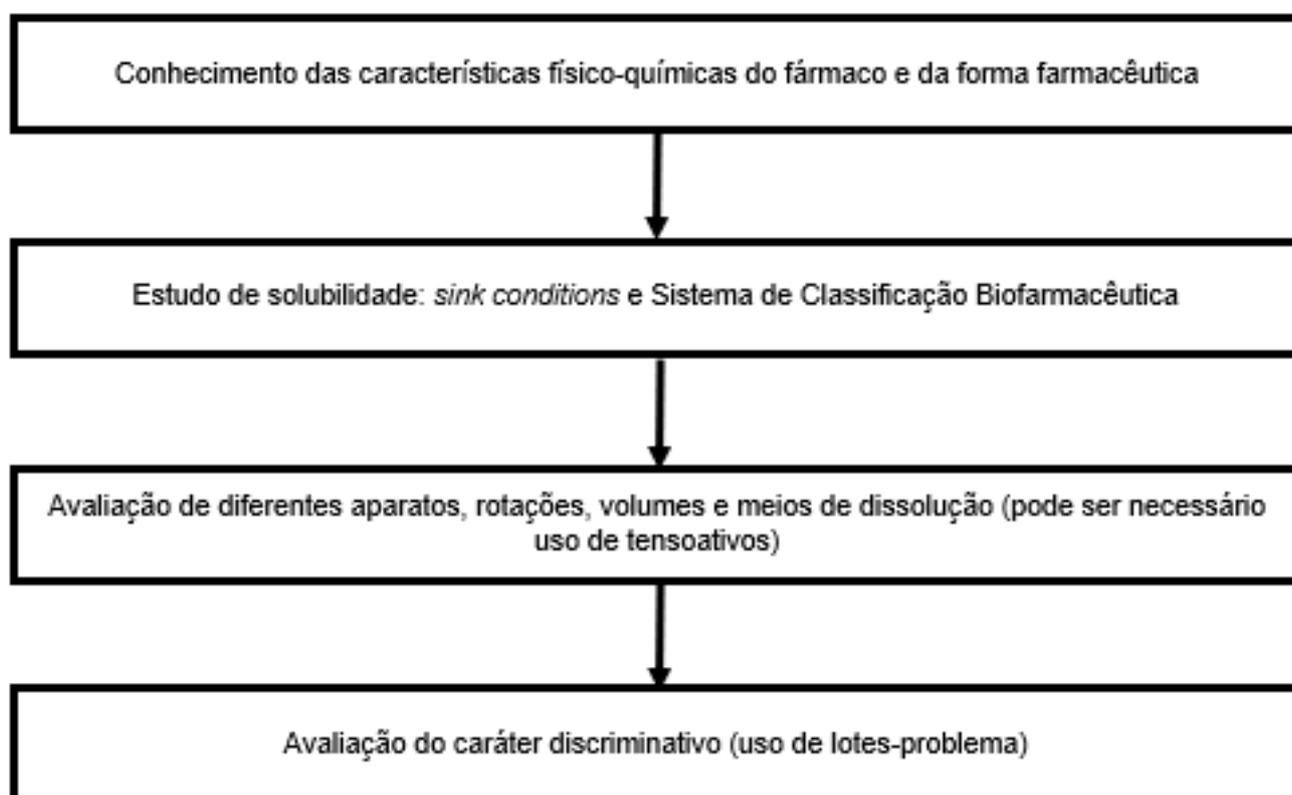
5.1. Aspectos gerais

A dissolução é o procedimento pelo qual o fármaco é liberado de sua forma farmacêutica, sendo, então, possível sua absorção pelo organismo humano. É um teste físico-químico usualmente aplicado no controle de qualidade lote-a-lote na indústria farmacêutica, sendo esse uma ferramenta importante para demonstrar *in vitro* o desempenho dos medicamentos que

necessitam de dissolução para absorção e, conseqüente, atingir seu efeito desejado (CHORILLI et al, 2010; BRASIL, 2018).

De acordo com a resolução RDC nº31/2010 (BRASIL, 2010), Nota Técnica nº003/2013 (BRASIL, 2013) e Guia nº 14 (BRASIL, 2018), para evidenciar que a condição de dissolução escolhida para o medicamento teste é a mais adequada, diferentes combinações devem ser avaliadas, incluindo as variáveis de aparato, velocidade de rotação, volume de meio, pH e sais dos meios de dissolução, como exemplo.

Figura 4 - Esquema ilustrativo mostrando resumidamente as etapas para desenvolvimento de um método de dissolução.



O principal desafio para desenvolvimento de um método de dissolução, atualmente, e seu principal objetivo, é que este seja capaz de discriminar lotes com desvios ou variações que comprometam o desempenho de um medicamento daqueles lotes adequados, quanto à qualidade, segurança e eficácia para comercialização, ou seja, que possua caráter discriminativo satisfatório (BRASIL, 2018).

Com a determinação das melhores condições de dissolução para um fármaco em um medicamento, outros pontos adicionalmente devem ser considerados para garantir a

reprodutibilidade e robustez do método como, por exemplo, necessidade de desaeração do meio de dissolução, tempos e modo de coleta e reposição do meio, com posterior validação analítica. A influência de microbolhas de ar presentes no meio de dissolução pode ser avaliada através de um estudo com o meio de dissolução sem desaeração em comparação à um estudo utilizando meio desaerado (geralmente conforme previsto pelo capítulo <711> da Farmacopeia Americana USP-NF), uma vez que as bolhas podem aumentar a flutuação do medicamento, alterar a taxa de dissolução (apresentando maior impacto para fármacos de baixa solubilidade) ou causar alteração na hidrodinâmica dentro das cubas por aderir aos aparatos e/ ou paredes das mesmas. Para meios de dissolução contendo tensoativo, a desaeração não é recomendada pois esse processo pode aumentar a presença de espuma no meio. O processo de reposição do meio de dissolução pode ser necessário para manutenção das condições *sink* de volume na dissolução (USP-NF, 2020b), contudo, também pode alterar a hidrodinâmica dentro das cubas e deve ser averiguado.

Devem ser estabelecidos os tempos para coleta visando garantir a visualização do perfil de dissolução todo, ou seja, com fase ascendente e fase de platô, sendo que podem ser realizadas coletas de forma manual ou automatizada. A automatização do método pode trazer grande vantagem, desde que bem avaliadas as variáveis introduzidas através do procedimento de validação analítica (USP-NF, 2020b).

Particularmente esteroides costumam apresentar adsorção em materiais do sistema de coleta no ensaio de dissolução, sendo que a influência é menor em materiais como fluorocarbono, vidro e aço inoxidável 360 (BANAKAR, 1991). Ao final do desenvolvimento, uma especificação e os critérios de aceitação devem ser estabelecidos (USP-NF, 2020b).

5.2. Aparatos

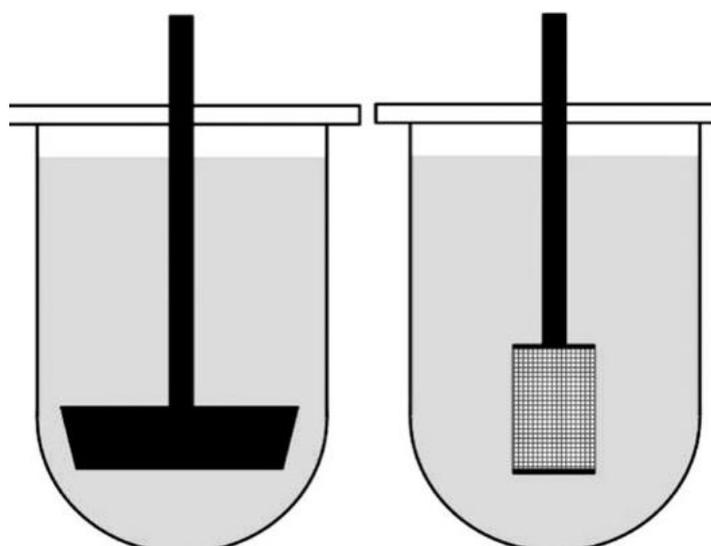
Os aparatos I e II (cestos e pás, respectivamente) são os mais utilizados na rotina da indústria farmacêutica, por isso, volumes que variam entre 500 a 1000 mL são mais comuns e a velocidade de rotação pode variar de 50 a 100 rpm para ambos os aparatos, sendo que para formas farmacêuticas de suspensão é usualmente utilizado 25 rpm no aparato II. Para determinadas formulações ou fármacos de difícil solubilização, alternativas podem ser utilizadas considerando esses aparatos, como por exemplo, cubas *peak vessel*, alteração do tamanho da malha dos cestos, uso de âncoras ou *sinkers*, rotações dos aparatos I e II acima de 100 rpm, entre outras, desde que devidamente justificadas (GOWTHAMARAJAN & SINGH, 2010; USP-NF, 2020b).

Usualmente, o aparato I é utilizado para cápsulas e formas farmacêuticas que flutuam em meios aquosos, enquanto o aparato II é bastante utilizado e preferível para comprimidos e

cápsulas que não flutuam. Porém, existem outros aparatos farmacopeicos, não comumente aplicados na rotina de controle de qualidade e dos estudos de estabilidade, mas que podem ser testados para o desenvolvimento de uma formulação e em ensaios de dissolução para casos específicos, sendo eles o aparato 3: cilindros recíprocos, aplicável a comprimidos mastigáveis, de liberação retardada e que não desintegram, por exemplo; aparato 4: células de fluxo contínuo, aplicável a diversas formas farmacêuticas com destaque para formas com liberação modificada e fármacos de baixa solubilidade devido a possibilidade de utilizar grandes volumes e gradientes de pH com facilidade; aparato 5: pás sobre discos e aparato 6: cilindros rotativos, são aplicáveis às formas farmacêuticas transdérmicas e; o aparato 7: cilindro rotatório cuja aplicação é mais comum às formas transdérmicas (USP-NF, 2020b).

Os aparatos cestos e pás (**Figura 5**) são os mais utilizados devido a maior acessibilidade, uma vez que um mesmo equipamento de dissolução (**Figura 6**) permite a troca do acessório, uma ampla faixa de volumes de meio de dissolução (de 500 a 4000 mL) e de rotação (25 a 150 rpm), apresenta preços menores quando comparados aos demais equipamentos de dissolução compendiais, número elevado de monografias e publicações de métodos utilizando esses aparatos, entre outras vantagens.

Figura 5 - Aparato USP2 (pás) à esquerda e aparato USP1 (cestos) à direita.



Fonte: Adaptado de Capítulo 5.1.5. da Farmacopeia Brasileira 6ª edição (BRASIL, 2019).

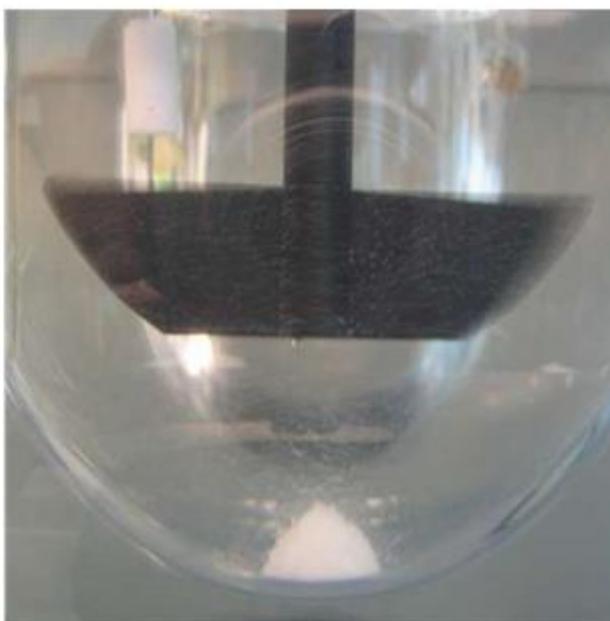
Figura 6 – Equipamento de dissolução para aparato USP1 e USP2.



Fonte: flowscience.com.br (2020).

Um dos fenômenos que pode ser observado na utilização das pás é a formação de cone no fundo da cuba (**Figura 7**). Este evento impacta a dissolução gerando variabilidade nos resultados e, por isso, deve ser evitado. A não formação de cone é possível, por exemplo, com o aumento da rotação do aparato ou com a utilização de cubas do tipo *peak vessel* (HIGUCHI et al, 2011).

Figura 7 - Fenômeno de formação de cone no ensaio de dissolução.



É importante conhecer e considerar as opções de aparatos oficiais uma vez que a hidrodinâmica no ensaio de dissolução é uma variável importante e significativa, conforme demonstrado por TODARO e colaboradores (2017). O grupo evidenciou, no trabalho publicado, a diferença da hidrodinâmica do meio de dissolução dentro da cuba de dissolução com os aparatos I e II, em diferentes velocidades de rotação desses aparatos (TODARO et al, 2017).

Essa variável pode impactar significativamente a taxa de dissolução de um fármaco e deve ser controlada, por exemplo, através da calibração dos equipamentos e qualificação por equipe técnica especializada. Sendo assim, a avaliação de aparatos e diferentes velocidades de rotação pode ser necessária para definir a melhor condição de dissolução caso a caso (TODARO et al, 2017).

O aparato USP3 é uma excelente opção para medicamentos que não desintegram muito rápido, sejam de liberação imediata ou controlada, pois este equipamento permite que a dissolução seja observada em toda a faixa de pH fisiológica e/ ou com diferentes velocidades de agitação, sendo ainda possível o uso de mais de um meio de dissolução biorrelevante em um mesmo teste (PEZZINI et al, 2015; USP-NF, 2020b).

A célula de fluxo contínuo, ou aparato USP4 (**Figura 8**), é uma ótima alternativa para avaliação do perfil de dissolução de um produto farmacêutico em toda a faixa de pH fisiológico, sendo permitida a utilização do sistema fechado ou sistema aberto, além de possibilitar a utilização de uma quantidade ilimitada de volume de meio de dissolução, com ou sem gradiente de pH e com ampla faixa de fluxo de trabalho. Os resultados obtidos nesse equipamento apresentam, com base no desenho experimental adequado, grande potencial para correlação *in vivo in vitro* (CIVIV) (HORI et al, 2017; USP-NF, 2020b).

Figura 8 - Aparelho dissolutor USP4: célula de fluxo contínuo e exemplos de células utilizadas.



Fonte: disotax.com.br (2020).

5.3. Meios de dissolução

Outro parâmetro a se considerar é a escolha do pH e o tipo de sal do tampão para ser utilizado como meio de dissolução, pois, devido à baixa concentração normalmente encontrada nos medicamentos contendo fármacos hormonais, muitas vezes é necessário desafiar outros valores de pH ou força iônica dos meios para conferir melhor solubilidade à substância ativa e permitir o uso de volumes menores obtendo, assim, concentrações mais altas nas amostras coletadas, além de permitir condições com maior biorrelevância. MAUGER (2017) apresentou uma revisão das principais características físico-químicas dos fluídos biológicos simulados e com potencial para uso em testes de dissolução e discutiu sobre a influência do tampão na solubilidade dos fármacos, ou seja, resumidamente demonstrou a importância de conhecer sobre o fármaco e sua interação com o meio de dissolução escolhido.

O volume de meio de dissolução utilizado na cuba deve ser definido com base nos resultados dos estudos de solubilidade e avaliação das *sink conditions* (BRASIL, 2013; BRASIL, 2018; USP-NF, 2020b), porém, como citado, considerando a limitação da técnica utilizada para quantificação do ativo.

Para os ensaios de dissolução, considerando os medicamentos administrados via oral, os meios devem estar a $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e com o seu pH dentro da faixa fisiológica, ou seja, de 1,0 a 6,8, sendo os meios usualmente recomendados o ácido clorídrico 0,1N, tampão acetato pH 4,5 e tampão fosfato pH 6,8. A água pura também pode ser utilizada como meio de dissolução, com uma ressalva para fármacos que são pH independentes, pois, as características físico-químicas, incluindo o pH, da água podem variar de acordo com o local e dia da coleta (BRASIL, 2018; USP-NF, 2020b).

Por outro lado, meios de dissolução com características de maior biorrelevância, ou seja, meios de dissolução capazes de simular fluídos biológicos em estados de jejum e pós-prandial do trato gastrointestinal são descritos na literatura e, com um certo custo associado, disponíveis comercialmente pré-preparados (MARQUES, 2004; ZOELLER & KLEIN, 2007, USP-NF, 2020b).

Tais meios de dissolução permitem uma melhor proximidade de resultados *in vitro* com o que se espera da formulação *in vivo*, sendo, portanto, uma excelente e promissora ferramenta para possíveis correlações *in vivo in vitro*, possibilitando uma associação entre os perfis de dissolução e resultados de farmacocinética (CIVIV) (MARQUES, 2004; ZOELLER & KLEIN, 2007; WANG et al, 2009).

Estudos mais recentes apontam que uma alternativa, buscando maior biorrelevância em meios de dissolução, com um menor custo e maior viabilidade em uma rotina analítica, é o uso de tampão bicarbonato (KRIEG, 2015; SILVA, 2019).

Hoje em dia, o uso de tampão fosfato é o mais indicado nas referências legais e compendiais (BRASIL, 2018; USP-NF, 2020b), todavia, SILVA e colaboradores (2019) relatam que a quantidade de fosfato presente no trato gastrointestinal é significativamente baixa, enquanto que o bicarbonato é mais presente e pode contribuir mais com predições de desempenho de uma formulação *in vivo* através de seus resultados obtidos nos perfis de dissolução com este meio.

Contudo, a escolha do meio de dissolução mais adequado para avaliação de desempenho do produto deve levar em consideração, principalmente, as características físico-químicas do fármaco em estudo e a capacidade tamponante do meio (KRIEG, 2015).

5.4. Solubilidade

É importante observar que a baixa solubilidade aquosa de um fármaco e sua reduzida velocidade de dissolução podem impactar em menor disponibilidade oral e uma possível ineficácia na terapia medicamentosa. Por isso, várias estratégias farmacotécnicas podem ser utilizadas para melhorar a solubilidade de um fármaco e, conseqüentemente a dissolução de um novo medicamento, como por exemplo, síntese de pró fármacos, formação de nanocristais, dispersões sólidas, incorporação em nanopartículas poliméricas (HASSAN, 2018), tamanho de partícula, entre outros.

Portanto, o desenvolvimento farmacêutico de um medicamento genérico ou similar, por exemplo, deve buscar perfis de dissolução, não mais rápidos ou mais lentos, mas iguais aos do medicamento de referência, com mesma velocidade de dissolução, buscando garantir que *in vivo* também se comportem da mesma maneira (BRASIL, 2010), em especial para fármacos com classificação biofarmacêutica II e IV, devido a solubilidade ser crítica para absorção.

A solubilidade de um fármaco é um fator que contribui fortemente na taxa de dissolução deste de sua forma farmacêutica, sendo, portanto, fundamental conhecer essa propriedade da substância ativa para selecionar adequadamente o meio de dissolução e demonstrar esses dados no desenvolvimento de um método de dissolução para atendimento à legislação vigente (SILVA et al, 2016).

Nos casos dos fármacos classe II e classe IV, a solubilidade é considerada fator limitante para absorção e seu estudo fornece informações fundamentais para escolha de parâmetros críticos durante o desenvolvimento de formulações através de ferramentas de *quality by design*,

ou QbD (ISSA & FERRAZ, 2017). Cerca de 35 a 40% dos fármacos descobertos com auxílio de novas tecnologias têm baixa solubilidade (GOWTHAMARAJAN & SINGH, 2010).

A determinação da solubilidade de um fármaco na faixa de pH fisiológica a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ deve ser feita através do método de equilíbrio utilizando o *shake flask* (**Figura 9**) (BRASIL, 2018).

Figura 9 – *Shaker* ou incubadora com agitação orbital: equipamento utilizado para estudos de solubilidade pelo método de equilíbrio *shake-flask*.



Fonte: <https://www.bioprocessonline.com/> (2020).

5.5. Sink conditions

Para métodos de dissolução é recomendado o uso de volumes de meio de dissolução que atendam às condições *sink*. *Sink condition* é um termo utilizado para definir uma condição de não saturação para ensaios de dissolução, ou seja, uma condição em que o volume de meio de dissolução disponível é, no mínimo, três vezes maior que o volume necessário para atingir a saturação deste pelo fármaco, de acordo com o capítulo <1092> da Farmacopeia Americana (USP-NF, 2020b).

No caso de fármacos que possuem classificação biofarmacêutica II ou IV, com baixa solubilidade, o principal desafio no desenvolvimento de um método de dissolução é a escolha do meio, pois, espera-se que este apresente minimamente condições satisfatórias de solubilidade

(*sink conditions*) e adequada condição de quantificação por técnicas usuais, como espectrofotometria no UV-VIS e cromatografia líquida por UV e FLD (fluorescência) devido às baixas concentrações do fármaco no medicamento.

5.6. *Baixa solubilidade dos fármacos e tensoativos*

Durante o desenvolvimento de um método de dissolução para fármacos de baixa solubilidade, para atender às *sink conditions*, algumas alternativas podem ser avaliadas, como por exemplo, maior volume de meio de dissolução, aumento da velocidade de rotação do aparato ou do fluxo (no caso de aparato IV), alteração na composição, molaridade e força iônica do meio de dissolução e adição de tensoativos (USP-NF, 2020b).

Os hormônios sexuais, por terem sua estrutura básica formada pelo colesterol, tendem a apresentar menor solubilidade em meios aquosos (MARTINS et al, 2013).

De acordo com a base de dados de métodos de dissolução da Farmacopeia Americana, os principais métodos de dissolução disponíveis para hormônios femininos isolados ou em associação, contém tensoativo, sendo o mais utilizado o lauril sulfato de sódio (LSS) (USP Dissolution Methods Database, 2020).

Na **Tabela 2**, observa-se a solubilidade de alguns fármacos hormonais e as condições de dissolução preconizadas na Farmacopeia Americana (BCS database, 2020; USP Dissolution Methods Database, 2020).

Tabela 2 – Solubilidade de alguns fármacos hormonais e suas respectivas condições de dissolução descritas na farmacopeia americana, para comprimidos.

Fármaco	Menor solubilidade*	Método de dissolução**
Desogestrel	-	Meio de dissolução: água com 0,05% p/V de LSS; Volume: 500 mL; Aparato/ rotação: II, 50 rpm (teste 1)
Drospirenona	-	Meio de dissolução: água; Volume: 500 mL; Aparato/ rotação: II, 50 rpm (teste 1)
Etinilestradiol	0,01 mg/mL	Meio de dissolução: água com 0,3% p/V de LSS; Volume: 500 mL; Aparato/ rotação: II, 100 rpm (teste 1)
Estradiol	-	Meio de dissolução: água com 0,3% p/V de LSS; Volume: 500 mL; Aparato/ rotação: II, 100 rpm
Levonorgestrel	0,01 mg/mL	Meio de dissolução: água com 0,0005% p/V de polissorbato 80; Volume: 500 mL; Aparato/ rotação: II, 75 rpm (teste 1)
Medroxiprogesterona	0,01 mg/mL	Meio de dissolução: água; Volume: 900 mL; Aparato/ rotação: I, 100 rpm
Noretisterona	0,01 mg/mL	Meio de dissolução: HCl com 0,5% p/V de LSS; Volume: 500 mL; Aparato/ rotação: II, 75 rpm (teste 3)

*Extraído de: BCS database, 2020.

**Extraído de: USP Dissolution Methods Database, 2020.

Porém, a legislação nacional que aborda o desenvolvimento de métodos de dissolução (BRASIL, 2010) e a própria Farmacopeia Americana, no capítulo geral <1092> (USP-NF, 2020b), recomendam que a escolha do tensoativo e sua concentração sejam justificadas, sendo sugerido o uso da menor concentração possível deste, pois, uma maior quantidade de tensoativo no meio de dissolução promove uma diminuição na capacidade discriminativa do método por aumentar significativamente a velocidade de solubilização do fármaco e dos componentes de formulação.

Os tensoativos são indicados em meios de dissolução para fármacos de baixa solubilidade a fim de promover as condições *sink* pois no corpo humano há compostos que apresentam a função tensoativa, como por exemplo, os sais biliares (USP-NF, 2020b).

A Farmacopeia Americana (USP-NF, 2020b) indica quais são os principais tensoativos utilizados em meios de dissolução, bem como sua característica (aniônico, não iônico, catiônico

ou zwitteriônico) e sua concentração micelar crítica para auxiliar na escolha do mesmo, quando necessário, considerando às propriedades físico-químicas do fármaco e formulação (**Tabela 3**).

Para escolha do tensoativo, é de extrema importância avaliar o grau de pureza do reagente, pois diferenças nos níveis de pureza podem afetar significativamente a solubilidade do fármaco e alterar os resultados de perfis de dissolução, conseqüentemente, além de possíveis complicações analíticas, como por exemplo, formação de precipitados nas amostras contendo o meio de dissolução e impacto na análise cromatográfica. Neste caso, é recomendado que a última opção seja aumentar a concentração de tensoativo, sendo que, se necessário o acréscimo deve ser devidamente justificado, bem como seu uso. Logo, antes devem ser testados diferentes aparatos, alterações de pHs, velocidades de rotação e volumes de meio de dissolução nas cubas, como já citado (BREDAEL et al, 2015; USP-NF, 2020b).

Tabela 3 - Tensoativos comumente utilizados em meios de dissolução (Fonte: Capítulo <1092> da Farmacopeia Americana (USP-NF, 2020b)).

	Tensoativo	Concentração micelar crítica (% p/V)
Aniônico	Dodecil sulfato de sódio (DSS), lauril sulfato de sódio (LSS)	0,18 a 0,23%
	Sal de sódio do ácido taurocólico	0,20%
	Sal de sódio de ácido cólico	0,16%
	Sal de sódio do ácido desoxicólico	0,12%
Catiônico	Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB)	0,033% a 0,036% (0,92 a 1,0 mM)
	Cloreto de benzetônio (Hiamina 1622)	0,18% (4 mM)
Não iônico	Polissorbato 20 (Tween 20)	0,07 a 0,09%
	Polissorbato 80 (Tween 80)	0,02 a 0,08%
	Glicerídeos Caprilcaproil 8-polioxil (Labrasol)	0,01%
	Polioxil 35 Óleo de castor (Cremophor EL)	0,02%
	Polioxietileno 23 lauril éter (Brij 35)	0,01%
	Octoxinol (Triton X-100)	0,01 a 0,03%
Zwitteriônico	N-óxido de laurildimetilamina (LDAO)	0,02%

Os tensoativos mais utilizados, principalmente devido ao baixo custo, são o lauril sulfato de sódio, brometo de cetiltrimetilamônio e polissorbatos (aniônico, catiônico e não iônico, respectivamente) (GOWTHAMARAJAN & SINGH, 2010; GUPTA et al, 2010).

Os tensoativos aniônicos contêm uma região polar de carga negativa em sua estrutura molecular; os não iônicos não apresentam em suas moléculas qualquer região com cargas verdadeiras, sendo compostos de grupos hidrofílicos sem cargas; os catiônicos possuem um grupo hidrofílico com cargas positivas e; os anfóteros ou zwitteriônico oferecem na mesma molécula grupos carregados positiva e negativamente (DALVIN, 2011). A escolha do uso de uma ou outra classe de tensoativo deve ser feita considerando suas propriedades e as características do meio de dissolução utilizado, do fármaco e da formulação em estudo.

5.7. *Interação de hormônios com filtros*

Outro desafio no desenvolvimento de um método de dissolução é a escolha dos filtros, pois, estes podem apresentar interações químicas ou regiões de adsorção com o fármaco (BERTHELSEN, 2016).

A etapa de filtração é de extrema importância nos ensaios de dissolução pois é responsável pela separação de partículas não dissolvidas do material coletado no tempo especificado. Dentre as várias maneiras de realizar essa fase, o uso de filtros de seringa é o mais utilizado, porém, a adequabilidade de cada membrana deve ser avaliada para que não haja presença de impurezas residuais dos filtros ou alteração do resultado do teste (JOSHI et al, 2008).

Existem diversos tipos de membranas filtrantes disponíveis no mercado para utilização em ensaios de dissolução, sendo que os mais usuais são as de fluoreto de polivinilideno (PVDF), polietersulfona (PES), politetrafluoroetileno (PTFE), polipropileno (PP), polissulfona (PS), acetato de celulose (AC) e nylon (CHEN et al, 2002; VÖLGYI et al, 2018).

Outro ponto a ser considerado na escolha do filtro é o seu diâmetro e o tamanho do poro, pois, dependendo desses aspectos, é necessário avaliar diferentes volumes de descarte para atingir a saturação da membrana e minimizar a interferência da mesma (HAN et al, 2010).

Figura 10 - Exemplo de modelos de filtros para dissolução disponíveis comercialmente.

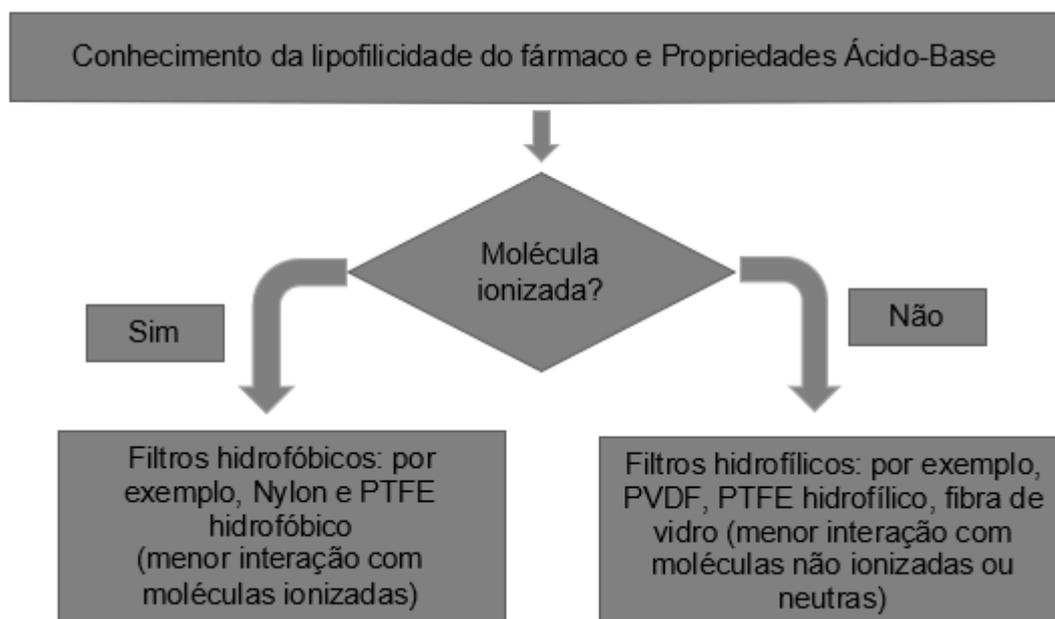


Fonte: www.merckmillipore.com (2020).

HAN e colaboradores (2010) estudaram a interação/ adsorção da estrona, um metabólito do estradiol, e com características estruturais muito semelhantes à este, com seis diferentes filtros (nylon, celulose regenerada, microfibras de vidro, AC, PP, PTFE) e verificaram que a adsorção do ativo está altamente relacionada ao tipo de material utilizado como filtro e, em menor proporção, dependente do tamanho do poro da membrana. Foi observado que a estrona apresentou maior adsorção com nylon, provavelmente devido a formação de ligações de hidrogênio com os grupos amida do filtro. Somente a microfibras de vidro apresentou resultados satisfatórios com valor de adsorção de 2,3%, enquanto filtros de nylon e PP tiveram mais de 90% do fármaco adsorvido. As possíveis interações apontadas pelo grupo de pesquisadores foram: “(1) adsorção física dentro das membranas devido às suas estruturas altamente porosas; (2) interações de carga entre moléculas de estrona e filtros; (3) moléculas de estrona que se ligam a membranas reagindo com certos grupos funcionais nas superfícies delas”. Com a celulose regenerada, PP e PTFE foi observada uma redução da porcentagem de adsorção da estrona à medida que foi aumentado o volume de descarte, o que sugere a adsorção física nessas membranas filtrantes, sendo que este processo não foi observado com a utilização do nylon, evidenciando a suspeita de ligação química.

Portanto, para optar por qual membrana filtrante é mais adequada, deve ser considerada a lipofilicidade do fármaco e suas propriedades ácido-base (**Figura 11**). De modo geral, Nylon e PTFE são utilizados para filtração de moléculas ionizadas enquanto os filtros hidrofílicos são mais indicados às não ionizadas, ou seja, espécies ionizadas sofrem menor interação com membranas hidrofóbicas e espécies ionizadas e neutras interagem menos com filtros hidrofílicos (VÖLGYI et al, 2018).

Figura 11 - Esquema simplificado para escolha dos filtros, considerando as características do fármaco.



Desta forma, a escolha do filtro adequado deve ser criteriosamente avaliada para hormônios devido à baixa dosagem do fármaco no medicamento, especialmente em ensaios de dissolução (concentração reduzida e grandes volumes utilizados para promover a solubilidade do ativo), pois, para uma solução contendo uma menor concentração do fármaco, mesmo mínima adsorção do fármaco com o filtro promove uma variação significativa da concentração do ativo na solução filtrada e, conseqüentemente, na sua resposta analítica (CHEN et al, 2002).

6. CONCLUSÃO

O tratamento de reposição hormonal é altamente recomendável para mulheres onde há depleção da produção endógena de estrogênios e o estradiol é utilizado nesses casos, sendo amplamente prescrito na forma de administração oral, por isso, os medicamentos devem ter sua qualidade assegurada especialmente em relação a sua dissolução uma vez que o fármaco possui baixas dosagens e baixa solubilidade, portanto, a sua liberação total deve ser garantida.

Os métodos de dissolução para fármacos de baixa dosagem e baixa solubilidade têm inúmeros desafios na etapa de desenvolvimento, sendo os pontos críticos a obtenção de condição de solubilidade adequada ao ensaio de dissolução (*sink condition*), possíveis interações físico-

químicas da substância ativa com os filtros utilizados no teste e dificuldades na quantificação devido à baixa concentração do fármaco.

Para o desenvolvimento do ensaio de dissolução para hormônios, tais particularidades devem ser consideradas e criticamente avaliadas para que seja possível obter um método com adequado caráter discriminativo. Todavia, atualmente há um número pequeno de estudos sobre ensaios de dissolução de fármacos hormonais, bem como poucas publicações sobre a interação dos hormônios sexuais, portanto, existe a necessidade e possibilidade de mais estudos nessa área para contribuir com este entendimento.

7. REFERÊNCIAS

ABRAHIN, O.S.C. et al. Prevalence of the use of anabolic androgenic steroids by physical education students and Teachers who work in health clubs. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. Vol. 19, n. 1, p.27-30. 2013.

ALLAIS, G. et al. Estrogen, migraine, and vascular risk. *Neurological Sciences*. Vol. 39(1). p.11-20. doi: 10.1007/s10072-018-3333-2. 2018.

AMIDON, G.L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of *in Vitro* Drug Product Dissolution and *in Vivo* Bioavailability. *Pharmaceutical Research*, Vol. 12, n. 13, p. 413-420. 1995.

BANAKAR, U.V. *Pharmaceutical Dissolution Testing*. Drug and the Pharmaceutical Sciences. Vol. 49. 1991.

Base de dados de dissolução da USP. Disponível em: <http://www.usp.org/resources/dissolution-methods-database>. Acesso em 10 de maio de 2020.

BCS database. Base de dados de Sistema de Classificação Biofarmacêutica. Disponível em: <http://www.ddfint.net/search.cfm>. Acesso em 10 de maio de 2020.

BENET, L.Z.; BROCCATELLI, F.; OPREA, T. I. BDDCS Applied to Over 900 Drugs. The AAPS Journal, Vol. 13, No. 4, 2011. DOI: 10.1208/s12248-011-9290-9.

BERTHELSEN, R. et al. Dissolution Model Development: Formulation Effects and Filter Complications. Dissolution Technologies. 7p. dx.doi.org/10.14227/DT230116P6. 2016.

BRASIL. Resolução RDC nº 31, de 11 de agosto de 2010. Dispõe sobre a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 2010.

BRASIL. Resolução RDC nº 37, de 03 de agosto de 2011. Dispõe sobre o Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência e dá outras providências. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 2011.

BRASIL. Nota Técnica nº 003/2013, de 16 de abril de 2013. Ementa: Dispõe sobre a avaliação da solubilidade de fármacos e o desenvolvimento de métodos de dissolução para estudos de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução comparativo, e dá outras providências. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 2013.

BRASIL. Guia nº 14 versão 1: Guia de Dissolução Aplicável a Medicamentos Genéricos, Novos e Similares. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 2018. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3364628/%281%29Proposta+de+Guia+de+Dissolu%C3%A7%C3%A3o.pdf/572ed44f-9f72-4b4c-9dce-f7154b31dfcc>. Acesso em 10 de maio de 2020.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira 6ed. Capítulo geral 5.1.5. Dissolução. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 2019.

BRASIL. Manual de Atenção à Mulher no Climatério / Menopausa. Ministério da Saúde. 2020a.

Disponível em:

http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_atencao_mulher_climaterio.pdf. Acesso em 10 de maio de 2020.

BRASIL. Lista de Medicamentos de Referência. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 2020b. Disponível em

<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/medicamentos/produtos/medicamentos-de-referencia/lista>. Acesso em 10 de maio de 2020.

BREDAEL, G.M.; LIANG, S.; HAHN, D. A Strategy for Quality Control Dissolution Method Development for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms. *Dissolution Technologies*. 7p. [dx.doi.org/10.14227/DT220315P10](https://doi.org/10.14227/DT220315P10). 2015.

CHEMICALIZE Website. Disponível em <https://chemicalize.com/>. Acesso em 10 de maio de 2020.

CHEN, T.; SHEN, H.; ZHU, C. Evaluation of a method for high throughput solubility determination using a multi-wavelength plate reader. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. Bentham Science Publishers Ltd. Vol 5. p.575-581. 2002.

CHORILLI, M.; SOUZA, A. A.; CORRÊA, F. e SALGADO, H. R. N. Estudos de perfil de dissolução dos medicamentos de referência, genéricos e similares contendo cefalexina na forma farmacêutica cápsula. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. Vol 31(1). p. 69-73. 2010.

CHUFFA, L. G. de A., et al. The role of sex hormones and steroid receptors on female reproductive cancers. *Steroids*. Vol. 118, p.93–108. [doi:10.1016/j.steroids.2016.12.011](https://doi.org/10.1016/j.steroids.2016.12.011). 2017.

DALTIN, D. *Tensoativos: química, propriedades e aplicações*. São Paulo: Blucher. 49p. 2011.

DELUCIA, R.; OLIVEIRA-FILHO, R.M. *Farmacologia Integrada*. Ed. Revinter. Cap. 63-64. p.612-626. 2004.

DRUGBANK Base de dados. Informações sobre estradiol. Disponível em <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00783>. Acesso em 10 de maio de 2020.

DUMONT, M. L.; BERRY, M. R.; NICKERSON, B. Probability of Passing Dissolution Acceptance Criteria for an Immediate Release Tablet. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, V. 44, p. 79-84. 2007.

EMA European Medicines Agency. Assessment Report EMEA/H/C/002068. 2009. Disponível em https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/iaa-epar-public-assessment-report_en.pdf. Acesso em 10 de maio de 2020.

EMA European Medicines Agency. Reflection paper on the dissolution specification for generic solid oral immediate release products with systemic action. 2017. Disponível em https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/reflection-paper-dissolution-specification-generic-solid-oral-immediate-release-products-systemic_en.pdf. Acesso em 02 de dezembro de 2018.

EMA European Medicines Agency. ICH guideline M9 on biopharmaceutics classification 4 system based biowaivers. 2020. Disponível em https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-m9-biopharmaceutics-classification-system-based-biowaivers-step-5_en.pdf. Acesso em 08 de abril de 2020.

FDA. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. 1997. Disponível em <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070237.pdf>. Acesso em 10 de maio de 2020.

FDA Food and Drug Administration. Guia para Indústria Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. U.S. Department of Health and Human Services. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 2017. Disponível em <https://www.fda.gov/media/70963/download>. Acesso em 10 de fevereiro de 2020.

FERREIRA, V. N., CHINELATO, R. S. C., CASTRO, M. R., FERREIRA, M. E. C. Menopausa: marco biopsicossocial do envelhecimento feminino. *Psicologia & Sociedade*, 25(2), p.410-419. 2013.

GITE, S.; CHOCALE, M.; PATRAVALE, V. Development and Validation of a Discriminating Dissolution Method for Atorvastatin Delayed-Release Nanoparticles Using a Flow-Through Cell: A Comparative Study Using USP Apparatus 4 ad 1. *Dissolution Technologies*, p.14-20. DOI: [dx.doi.org/10.14227/DT230216P14](https://doi.org/10.14227/DT230216P14). 2016.

GOLFAR, Y.; SHAYANFAR, A. Prediction of Biopharmaceutical Drug Disposition Classification System (BDDCS) by Structural Parameters. *J Pharm Sci (www.cspCanada.org)* 22, 247 - 269, 2019. DOI: 10.18433/jpps30271.

GOWTHAMARAJAN, K.; SINGH, S.K. Dissolution Testing for Poorly Soluble Drugs: A Continuing Perspective. *Dissolution Technologies*. [dx.doi.org/10.14227/DT170310P24](https://doi.org/10.14227/DT170310P24). 2010.

GUPTA, A. GAUD, R.S.; GANGA, S. Development of Discriminating Dissolution Method for an Insoluble Drug: Nisoldipine. *International Journal of PharmTech Research*. Vol. 2, n.1, p. 931-939. 2010.

HAN, J.; QIU, W.; GAO, W. Adsorption of estrone in microfiltration membrane filters. *Chemical Engineering Journal* 165. p.819–826. doi:10.1016/j.cej.2010.10.024. 2010.

HASSAN, S.A. et al. Solubilization and Enhancement of Ex Vivo Vaginal Delivery of Progesterone Using Solid Dispersions, Inclusion Complexes and Micellar Solubilization Current Drug Delivery. p.110-121. DOI:10.2174/1567201814666170320142136. 2018.

HORI, S.; KAWADA, T.; KOGURE, S.; YABU, S.; MORI, K.; AKIMOTO, M. Comparative release studies on suppositories using the basket, paddle, dialysis tubing and flow-through cell methods I. Acetaminophen in a lipophilic base suppository. *Pharmaceutical Development and Technology*. Vol 22(1). p. 130-135. <http://dx.doi.org/10.1080/10837450.2016.1230132>. 2017.

HIGUCHI, M.; YOSHIHASHI, Y.; TARADA, K.; SUGANO, K. Minimum rotation speed to prevent coning phenomena in compendium paddle dissolution apparatus. *European journal of pharmaceutical sciences*. Vol 65. p.74-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2014.09.010>. 2011.

ISSA, M. G.; FERRAZ, H. G. Intrinsic Dissolution Evaluation of Poorly Soluble Drugs. In: WEBSTER, G. K.; BELL, R. G.; JACKSON, J. D. *Poorly Soluble Drugs*. Pan Stanford, cap.4. 2017.

JOSHI, V.; BLODGETT, J.; GEORGE, J.; BRINKER, J. Impact of Sample Preparation on Dissolution Testing: Drug Binding and Extractable Impurities and Their Effect on Dissolution Data. *Dissolution Technologies*. 6p. dx.doi.org/10.14227/DT150408P20. 2008.

KOLKOROVAS, A.; BURCKHALTER, J.H. *Química Farmacêutica*. Guanabara & Koogan. p.669. 1988.

KOSTEWICZ, E. S. et al. *In Vitro* Models for Prediction of *in vivo* Performance of Oral Dosage Forms. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, V. 57, p. 342-366. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2013.08.024. 2014.

LAACKONEN, E. K. et al. Estrogenic regulation of skeletal muscle proteome: a study of premenopausal women and postmenopausal MZ cotwins discordant for hormonal therapy. *Aging Cell* 16, p.1276–1287. doi: 10.1111/accel.12661. 2017.

LARINI, L. *Fármacos e Medicamentos*. Ed.Artmed. Cap. 1. p.31. 2008.

LEVIN, E.R.; HAMMES, S.R. Estrogênios e progestogênios. In: BRUNTON, L.L; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman*. 12ed. AMGH Editora Ltda. Cap.40. p.1163-1190. 2012.

LAJOINIE, A.; HENIN, E.; KASSAI, B.; TERRY, D. Solid oral forms availability in children: a cost saving investigation. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 78(5), p.1080–1089. doi:10.1111/bcp.12442). 2014.

LIMA, S. M.R.R.; ALDRIGUI, J.M. Indicações atuais de terapia de reposição hormonal (TRH) após a menopausa. Revista da Associação Médica Brasileira. 48(4). p.275-96. 2002. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/26367865_Indicacoes_atuais_da_Terapia_de_Reposicao_Hormonal_TRH_apos_a_menopausa. Acesso em 10 de maio de 2020.

LOFTSSON, T. Estradiol Sublingual Tablets. IN: Essential Pharmacokinetics: A Primer for Pharmaceutical Scientists. p.105-118. doi.org/10.1016/B978-0-12-801411-0.00004-4. 2015.

MALLHI, T.H et al. Managing Hot Flashes in Menopausal Women: A Review. J Coll Physicians Surg Pak. 28(6). p.460-465. doi: 10.29271/jcsp.2018.06.460. 2018.

MARQUES, M. Dissolution Media Simulating Fasted and Fed States. Dissolution Technologies. 1p. [dx.doi.org/10.14227/DT110204P16](https://doi.org/10.14227/DT110204P16). 2004.

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. Solubilidade das substâncias orgânicas. Química Nova. Vol. 36, n.8, p.1248-1255. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422013000800026>. 2013.

MAUGER, J. W. Physicochemical Properties of Buffers Used in Simulated Biological Fluids with Potential Application for In Vitro Dissolution Testing: A Mini-review. Dissolution Technologies. 14p. [dx.doi.org/10.14227/DT240317P38](https://doi.org/10.14227/DT240317P38). 2017.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. Artmed. 6ed. Cap 23. p.929-978. 2014.

NORMAN, A.W.; HENRY, H.L. Hormones. 3ed. Academic Press. Cap.1. p.1. 2014.

NORTH AMERICAN MENOPAUSE SOCIETY. The 2017 hormone therapy position statement of The North American Menopause Society. Menopause: The Journal of The North American Menopause Society. Vol. 24, n. 7, p. 728-753. DOI: 10.1097/GME.0000000000000921. 2017.

PARDINI, D. Terapia de reposição hormonal na menopausa. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia. Vol.58(2). <http://dx.doi.org/10.1590/0004-2730000003044>. 2014.

PARKER, K.L.; SHIMMER, B.P. Introdução à endocrinologia: o eixo hipotálamo-hipófise. In: BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman. 12ed. AMGH Editora Ltda. Cap.38. p.1103. 2012.

PEZZINI, B.R.; ISSA, M.G.; DUQUE, M.D.; FERRAZ, H.G. Applications of USP apparatus 3 in assessing the in vitro release of solid oral dosage forms. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol. 51 (2). p.265-272. doi.org/10.1590/S1984-82502015000200003. 2015.

RANG, H.P. et al. Rang & Dale's Pharmacology. Elsevier. 8ed. Cap. 34. 2016a.

RANG, H.P. et al. Rang & Dale's Pharmacology. Elsevier. 8ed. Cap. 8. 2016b.

SILVA, M.F.; GIORGETTI, L.; DUQUE, M.D.; ISSA, M.G.; FERRAZ, H.G. Comparação da solubilidade de diferentes amostras de glibenclamida pelo método "shake-flask". Revista Brasileira de Farmácia, Vol. 97, p. 78-90. 2016.

SILVA, D.A. et al. Simulated, Biorelevant, clinically relevant or physiologically relevant dissolution media: The hidden role of bicarbonate buffer. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. doi.org/10.1016/j.ejpb.1029.06.006. 2019.

SIURANA, D.; GADEA, M.; ESPERT, R. Efectos organizacionales y activacionales de la testosterona sobre la asunción de riesgos en conductas económicas: una revisión sistemática. Suma Psicológica. Vol. 24, n. 2, p. 142-152. 2017.

THE MERCK INDEX. Disponível em: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m5028/estradiol?q=unauthorize>. Acesso em 10 de maio de 2020.

TODARO, V. et al. Characterization and Simulation of Hydrodynamics in the Paddle, Basket and Flow-Through Dissolution Testing Apparatuses - A Review. *Dissolution Technologies*. 13p. [dx.doi.org/10.14227/DT240317P24](https://doi.org/10.14227/DT240317P24). 2017.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). USP42-NF37. General Chapter <711> Dissolution. 2020a.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). USP42-NF37. General Chapter <1092> The Dissolution Procedure: Development and Validation. 2020b.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). USP42-NF37. Monografia *Estradiol*. 2020c.

VÖLGYI, G.; CSICSÁK, D.; TAKÁCS-NOVÁK, K. Right filter selection for phase separation in equilibrium solubility measurement. *Phasci*. doi: 10.1016/j.ejps.2018.06.031. 2018.

ZOELLER, T.; KLEIN, S. Simplified Biorelevant Media for Screening Dissolution Performance of Poorly Soluble Drugs. *Dissolution Technologies*. 6p. [dx.doi.org/10.14227/DT140407P8](https://doi.org/10.14227/DT140407P8). 2007.

WANG, Q.; FOTAKI, N.; MAO, Y. Biorelevant Dissolution: Methodology and Application in Drug Development. *Dissolution Technologies*. 7p. [dx.doi.org/10.14227/DT160309P6](https://doi.org/10.14227/DT160309P6). 2009.

**PARTE II: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO NOS
APARATOS (USP) I, II E IV PARA COMPRIMIDOS CONTENDO 1 MG DE
ESTRADIOL**

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um método de dissolução, com capacidade discriminativa satisfatória, para comprimidos contendo 1 mg de estradiol, utilizando planejamento experimental (*DoE*) para reduzir o tempo através de um número menor de ensaios. Para tanto, foi realizado o estudo de solubilidade do fármaco para definição de volume necessário e meio de dissolução mais adequado e, posteriormente o desenvolvimento do método com as definições das demais condições de dissolução, bem como a investigação das membranas filtrantes e outras interferências possíveis no ensaio. O desenvolvimento do método de dissolução foi realizado avaliando-se os aparatos I (cestos), II (pás) e IV (célula de fluxo contínuo). Logo, foram obtidos dois métodos com condições de dissolução capazes de diferenciar as formulações analisadas entre si, sendo um pelo aparato II, empregando 500 mL de tampão fosfato pH 6,8 com pás a 75 rpm e; outro pelo aparato IV, utilizando 1500 mL de tampão fosfato pH 6,8 com fluxo de 25 mL/minuto e célula de 12mm, evidenciando ser possível esse desenvolvimento com um número reduzido de experimentos com a mesma confiança hoje praticada pela abordagem de tentativa e erro obtendo, portanto, método adequado para utilização na rotina de controle de qualidade do medicamento Natifa® 1 mg.

1. INTRODUÇÃO

Quando administrado por via oral, para ser absorvido pelo organismo e promover sua ação terapêutica, o fármaco deve estar dissolvido nos fluidos biológicos, ou seja, liberado de sua forma farmacêutica e disponível para ser solubilizado, pois a substância ativa só se dissolve após a desintegração e só pode ser absorvido após a dissolução/ solubilização (PITA et al, 2004; RODRIGUES et al, 2008; SILVA et al, 2018).

O ensaio de dissolução permite verificar a quantidade de fármaco dissolvido no meio de dissolução, no tempo t, sob condições previamente determinadas e este ensaio tem como objetivo avaliar se o produto atende à uma especificação definida de forma a garantir a qualidade e desempenho do produto que será comercializado. O resultado obtido deve ser determinado em porcentagem da quantidade declarada no rótulo do medicamento. (BRASIL, 2019; USP-NF, 2020a).

Nas indústrias farmacêuticas, o ensaio de dissolução é utilizado especialmente para desenvolvimento de novos medicamentos, inovadores, genéricos e/ou similares, buscando a formulação mais adequada para realizar testes *in vivo*; e, no controle de qualidade do produto acabado após registro, para comercialização lote a lote. Para o controle de qualidade, o método e sua especificação devem garantir que os lotes distribuídos mantenham o desempenho do lote submetido aos estudos *in vivo* durante toda sua vida útil (SHAH, 2001).

Ainda, deve ser evidenciado que o método de dissolução possui caráter discriminativo, sendo capaz de garantir com confiança que é capaz de aprovar lotes com a mesma qualidade e desempenho do biolote (lote avaliado *in vivo* frente ao medicamento de referência/ comparador com bioequivalência pivotal aprovada) bem como reprovar um lote não conforme (KHAN, 2017).

Para auxiliar no desenvolvimento de métodos de dissolução cada vez mais robustos e com a finalidade de padronizar as recomendações entre as agências de todo o mundo, uma vez que os produtos podem ser registrados e comercializados em mais de um país, vários guias técnicos e resoluções estão sendo harmonizadas e estão disponíveis para consulta (FDA, 1997; BRASIL, 2010, EMA, 2010; FDA, 2017; BRASIL 2018, BRASIL, 2019; JPMA, 2019; USP-NF, 2020b).

AMIDON et al (1995) sugerem que a predição da biodisponibilidade de um fármaco deve ser embasada na sua classificação biofarmacêutica (SCB), uma vez que esta considera a solubilidade e a permeabilidade através de absorção oral.

Os dados do estudo de solubilidade devem ser utilizados para a escolha do meio de dissolução e do volume necessário para garantir a condição *sink* (ou *sink conditions*). Esse estudo deve ser realizado para cada fabricante do insumo farmacêutico ativo, pois avalia o impacto do

pH e meio de dissolução no processo de liberação do fármaco em meios aquosos na faixa de pH fisiológico (MARQUES et al, 2013; BRASIL, 2018; USP-NF, 2020b).

A resolução RDC nº31/2010 e demais guias que tratam sobre desenvolvimento de métodos de dissolução, preveem que, para evidenciar que as condições de dissolução são as mais adequadas, devem ser avaliados os parâmetros críticos do ensaio, incluindo aparato, velocidade de rotação, volume de meio, pH e composição dos meios de dissolução (FDA, 1997; BRASIL, 2010, EMA, 2010; FDA, 2017; BRASIL, 2018, JPMA, 2019; USP-NF, 2020b).

Muitas vezes, estas condições são estudadas através de tentativa e erro, porém, utilizar o planejamento experimental, entre outras vantagens, possibilita a avaliação do efeito de cada variável, otimização de mais de uma resposta ao mesmo tempo e a redução de experimentos com melhora na qualidade dos resultados (RODRIGUES & IEMMA, 2014).

ABUZARUR-ALOUL et al (1997) também relatam que o método de desenho estatístico experimental consegue alterar mais de uma variável independente ao mesmo tempo e relacionar os resultados obtidos através de um modelo matemático que descreve o domínio dos experimentos investigados, contrário à abordagem clássica realizada através da alteração de uma única variável e a manutenção das demais.

Existem várias maneiras de realizar um planejamento experimental para desenvolvimento de um método analítico (*Design of Experiments* ou somente “*DoE*”): um fator por vez, matriz, delineamento composto central rotacional (DCCR). A avaliação crítica do delineamento a cada estudo deve ser realizada utilizando o bom senso, disponibilidade de tempo e recursos, e as respostas desejadas.

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um método de dissolução para comprimidos revestidos contendo 1 mg de estradiol, através do planejamento experimental utilizando *DoE*, buscando diminuir o tempo na etapa de desenvolvimento analítico, através da redução do número de testes práticos, para este fármaco, comparado ao desenvolvimento do método pela abordagem convencional (ou tentativa e erro).

1.1. Informações sobre o fármaco

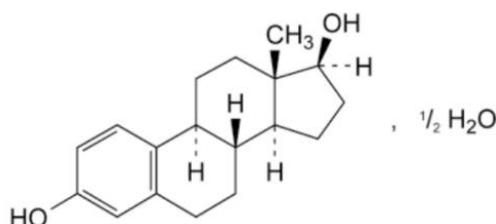
O estradiol hemi-hidratado apresenta as seguintes características físico-químicas:

Nome químico: Estra-1,3,5(10)-trieno-3,17-diol (17 β)-, hidrato (2:1);

CAS: 35380-71-3;

Fórmula estrutural:

Figura 12 - Fórmula estrutural do estradiol hemi-hidratado.



Fonte: British Pharmacopoeia BP2020.

Fórmula molecular: $C_{18}H_{24}O_2 \cdot \frac{1}{2} H_2O$;

Massa molar: 281,4 mols/L;

Aparência: Pó branco ou amarelado;

Solubilidade: Praticamente insolúvel em água, solúvel em acetona, facilmente solúvel em etanol (96%), pouco solúvel em diclorometano;

Classificação biofarmacêutica: Classe I (LOFTSSON, 2015) ou classe II (EMA, 2009).

1.2. Informações sobre o medicamento

Os medicamentos que contém 1,0 mg por comprimido revestido da substância ativa estradiol, usado para suplementar ou substituir a produção dos estrogênios endógenos, comercialmente disponíveis no Brasil são o Natifa® (Libbs Farmacêutica) e o Primogyna® (Bayer AG).

Neste trabalho, o produto escolhido foi o Natifa® 1 mg (**Figura 14**), por ser o medicamento de referência registrado na Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (BRASIL, 2020a).

Figura 13 - Medicamento de referência para comprimidos contendo 1 mg de estradiol no Brasil:
Natifa®.



De acordo com a bula do medicamento registrada na Anvisa, “*Natifa® é indicado como terapia hormonal para o tratamento dos sintomas da deficiência estrogênica, incluindo ondas de calor, suor noturno e secura vaginal, assim como prevenção da perda do conteúdo mineral ósseo em mulheres na pós-menopausa com alto risco de apresentar fraturas. Natifa® é particularmente indicado para mulheres que removeram o útero (histerectomizadas), que não necessitam de terapia combinada com progestagênio. Para mulheres com útero intacto, deve ser considerada terapia combinada com progestagênio durante pelo menos dez a doze dias em cada ciclo. A experiência de tratamento em mulheres com mais de 65 anos de idade é limitada*” (BRASIL, 2020b).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

O medicamento utilizado, Natifa® (lote 19D1202), o padrão analítico caracterizado de estradiol hemi-hidratado (lote 86224, grau de pureza de 99,9% base anidra), a matéria prima do fármaco analisado (lote 44376, potência de 100,2% base anidra) e o placebo (lote PLA041/19) foram gentilmente cedidos pela empresa Libbs Farmacêutica Ltda (SP, Brasil).

Para preparo dos meios de dissolução, dos padrões e amostras foram utilizadas as balanças analíticas Shimadzu ATY-224 (Shimadzu, Japão) e Mettler Toledo XS205 DU (Mettler Toledo, Estados Unidos); a balança semi-analítica Ohaus ARA520 (OHAUS, Estados Unidos) e; os pHmetros Gehaka PG2000 (Gehaka, Brasil) e Metrohm 913 (Metrohm, Suíça).

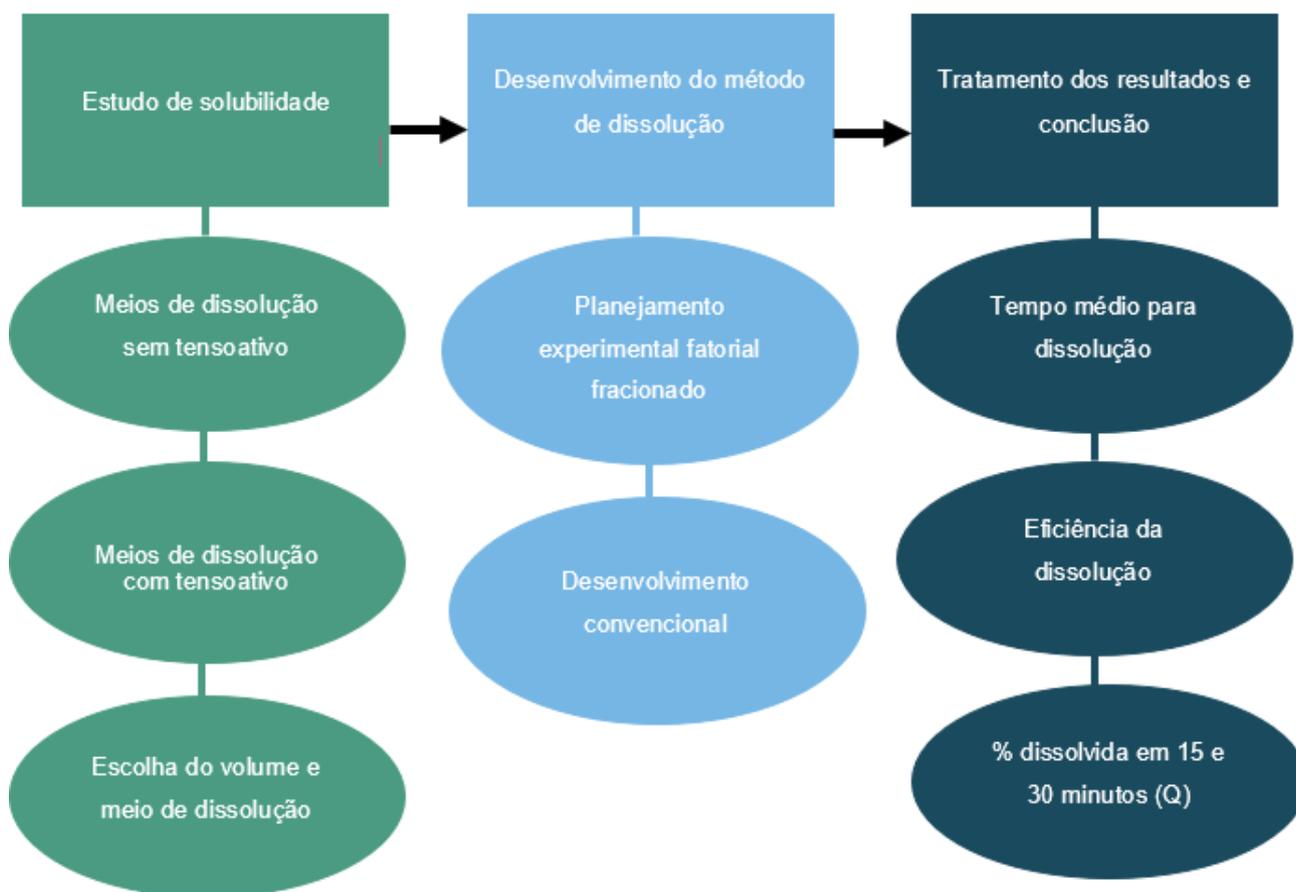
Durante o estudo de solubilidade e desenvolvimento do método de dissolução foram utilizados os reagentes acetonitrila grau HPLC (Merck, Alemanha), ácido clorídrico (HCl) p.a. (Synth, Brasil), acetato de sódio tri-hidratado p.a. (Casa Americana, Brasil), ácido acético glacial p.a. (Casa Americana, Brasil), fosfato de potássio monobásico p.a. (Synth, Brasil), fosfato de sódio monobásico anidro p.a. (Indukern Brasil Química, Brasil), hidróxido de sódio p.a. (Synth, Brasil), ácido fosfórico p.a. (Synth, Brasil), lauril sulfato de sódio p.a. (Tedia, Estados Unidos), polissorbato 80 (tween®80 – Sigma-Aldrich, Estados Unidos) e, os filtros de seringa de PVDF (fluoreto de polivinilideno) de 0,45 µm (Jet Biofil, China) e filtros de cânula de polietileno de 1,0 µm (QLA, Reino Unido).

Foi utilizada a base de dados do Chemicalize.com (software ChemAxon) para avaliação da estrutura química do estradiol e o software Statistica 13.5 para tratamento estatístico dos resultados dos ensaios obtidos pelo planejamento *DoE*.

2.2. Métodos

O desenvolvimento do método de dissolução foi planejado conforme esquema ilustrativo demonstrado na **Figura 14**.

Figura 14 - Estrutura Analítica do Trabalho.



O método escolhido para quantificação das amostras após ensaios de dissolução foi por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou *HPLC*) devido maior seletividade da técnica analítica, com o uso de cromatógrafo líquido com detector UV/DAD e forno Hitachi LaChrom Elite (Hitachi, Japão) para os ensaios conduzidos no aparelho de dissolução aparato USP1 e USP2 Agilent 708-DS (Agilent, Estados Unidos) e cromatógrafo líquido com detector UV/DA e forno Agilent 1260 Infinity (Agilent, Estados Unidos) para os ensaios realizados com o aparelho de dissolução Flow Through Cell Apparatus USP4 Sotax CE7 Smart (Sotax, Suíça).

Na cromatografia foi utilizada a coluna cromatográfica ODS Hypersil (250 mm x 4,6 mm x 5,0 µm) (Thermo Fischer Scientific, Estados Unidos) e como fase móvel acetonitrila grau HPLC e água ultrapura na proporção de 50:50 V/V, com fluxo de 1,0 mL/minuto, temperatura do forno à 25°C, volume de injeção de 50 µL, com detecção no UV no comprimento de onda de 205 nm.

2.3. Preparo das soluções

2.3.1. Preparo de HCl 0,1N

Foram adicionados 8,5 mL de ácido clorídrico (HCl) 37% p.a. em um béquer de 1000 mL contendo aproximadamente 800 mL de água pura. O volume foi completado para 1 L e a solução foi homogeneizada.

2.3.2. Preparo de tampão acetato pH 4,5

Foram pesados 2,99 g de acetato de sódio triidratado p.a. e transferidos para um béquer de 1000 mL. Foram adicionados cerca de 900 mL de água pura, homogeneizando-se até completa solubilização. Foram adicionados, volumetricamente, 1,62 mL de ácido acético glacial p.a. e o pH foi ajustado para $4,5 \pm 0,1$ com ácido acético p.a. O volume foi completado para 1 L com água pura e homogeneizado.

2.3.3. Preparo de tampão fosfato pH 6,8

Foram pesados 6,81 g de fosfato de sódio monobásico anidro p.a. e 0,9 g de hidróxido de sódio p.a. em um béquer de 1 L. Foram adicionados cerca de 800 mL de água pura, homogeneizando-se até completa solubilização. O pH foi ajustado para $6,8 \pm 0,1$, quando necessário, com hidróxido de sódio 1 mol/L ou ácido fosfórico 1 mol/L. O volume foi completado para 1 L com água pura e homogeneizado.

Tampão fosfato pH 6,8 com 0,025% p/V de LSS: Foram dissolvidos 6,81 g de fosfato de sódio monobásico anidro p.a., 0,9 g de hidróxido de sódio p.a. e 2,5 g de LSS (lauril sulfato de sódio p.a.) em 1000 mL de água pura. O pH final da solução foi verificado e, quando necessário, foi ajustado para $6,8 \pm 0,1$ com ácido fosfórico 1 mol/L ou com hidróxido de sódio 1 mol/L. O volume foi completado para 1 L com água pura e homogeneizado.

Tampão fosfato pH 6,8 com 0,05% p/V de LSS: Foram dissolvidos 6,81 g de fosfato de sódio monobásico anidro p.a., 0,9 g de hidróxido de sódio p.a. e 5 g de LSS (lauril sulfato de sódio p.a.) em 1000 mL de água pura. O pH final da solução foi verificado e, quando necessário, foi ajustado para $6,8 \pm 0,1$ com ácido fosfórico 1 mol/L ou com hidróxido de sódio 1 mol/L. O volume foi completado para 1 L com água pura e homogeneizado.

Tampão fosfato pH 6,8 com 0,025% p/V de tween®80: Foram dissolvidos 6,81 g de fosfato de sódio monobásico anidro p.a, 0,9 g de hidróxido de sódio p.a. e 2,5 g de Tween®80 (polissorbato 80 p.a.) em 1000 mL de água pura. O pH final da solução foi verificado e, quando necessário, foi ajustado para $6,8 \pm 0,1$ com ácido fosfórico 1 mol/L ou com hidróxido de sódio 1 mol/L. O volume foi completado para 1 L com água pura e homogeneizado.

2.3.4. Preparo do diluente e fase móvel

Foram adicionados 500 mL de água ultrapura e 500 mL de acetonitrila grau HPLC e a solução foi homogeneizada.

2.3.5. Preparo da solução padrão

Foram pesados 25,8 mg de estradiol hemi-hidratado (equivalente a 25 mg de estradiol) e transferidos para balão volumétrico âmbar de 100 mL. Foram adicionados 70 mL de acetonitrila e o balão foi colocado em banho de ultrassom por 10 minutos ou até completa solubilização. Após a solução atingir temperatura ambiente, o volume do balão foi completado com acetonitrila e a solução foi homogeneizada. Em seguida, foi pipetado 1,0 mL e transferido para balão volumétrico. De 10 mL. O volume do balão foi completado com o diluente e homogeneizado. A solução foi filtrada em membrana PVDF 0,45 μm , descartando os primeiros 2 mL do filtrado.

2.3.6. Preparo da amostra

Foi inserido o volume de meio de dissolução em teste a $37 \pm 0,5$ °C em cada uma das seis cubas do equipamento de dissolução. Foi introduzido um comprimido em cada cuba e imediatamente a rotação do aparato foi acionada. Uma alíquota de 5,0 mL, em cada tempo estabelecido, foi retirada com cânula contendo filtro full flow de 1,0 μm e filtrado imediatamente através de membrana de PVDF 0,45 μm , descartando os primeiros 2 mL do filtrado. Em seguida, foi realizada uma diluição 50:50 V/V com o diluente.

2.4. *Teste de filtros e estabilidade da solução*

Foi avaliada experimentalmente a interferência das membranas filtrantes e a estabilidade das soluções da amostra e padrão conforme diretrizes descritas na Nota Técnica nº003/2013 e guia nº 14 da Anvisa (BRASIL, 2013; BRASIL, 2018).

A escolha da membrana filtrante durante o estudo de solubilidade do fármaco orienta sobre qual deve ser utilizada nos ensaios de dissolução (BRASIL, 2010; BRASIL, 2013; BRASIL, 2018). Por isso, no estudo foram testados os filtros de seringa de PVDF (fluoreto de polivinilideno) de 13 mm e 0,45 µm e de polietileno de cânula de 1,0 µm. A membrana filtrante foi considerada inerte e adequada com o valor da recuperação da solução filtrada comparada à solução não filtrada (centrifugada) entre 95,0 a 105,0%.

A estabilidade das soluções foi avaliada a partir da recuperação da solução analisada após determinado tempo em comparação com a solução recém preparada (tempo inicial). A solução foi aceita como estável com o valor da recuperação da solução em teste comparada à solução recém preparada entre 95,0 a 105,0%.

2.5. *Ensaio de solubilidade*

Foi determinada experimentalmente a solubilidade do fármaco estradiol por meio do método *shake-flask*, realizado conforme diretrizes descritas na Nota Técnica nº003/2013 e guia nº 14 da Anvisa (BRASIL, 2013; BRASIL 2018).

Para avaliar a solubilidade do estradiol, adicionou-se um quantidade de fármaco em um frasco de vidro com tampa contendo 10 mL dos meios de dissolução em estudo, até obtenção da saturação do meio, seguida de agitação desta mistura por 24 horas em incubadora com plataforma de agitação orbital e temperatura controlada Tecnal TE-420 (Tecnal, Brasil) (*Shaker*) a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 150 rpm.

As amostras foram coletadas no tempo pré-estabelecido (24 horas) e filtradas em membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno) descartando os primeiros 2 mL da solução para saturação do filtro. Quando necessário, as amostras foram diluídas no respectivo meio de dissolução para obtenção da solução com concentração dentro do intervalo linear do método de quantificação.

A solubilidade no equilíbrio do estradiol foi determinada experimentalmente na faixa de pH fisiológico em HCl 0,1N, tampão acetato pH 4,5, tampão fosfato pH 6,8 e em tampão fosfato pH 6,8 contendo 0,025% p/V e 0,05% p/V de LSS (lauril sulfato de sódio).

Adicionalmente, foi avaliada a solubilidade no tampão fosfato pH 6,8 com 0,01 mol/L, 0,025 mol/L e 0,05 mol/L para observar se haveria diferença na solubilidade do fármaco, não só em relação ao pH, como também, devido variação na molaridade (influência da força iônica) do meio de dissolução.

2.6. *Determinação das sink conditions*

Uma vez que o estudo de solubilidade foi realizado para aplicação em um método de dissolução para comprimidos revestidos de administração via oral contendo 1 mg de estradiol, foi avaliada se há *sink conditions*, ou seja, calculou-se qual o volume necessário para solubilizar, pelo menos, 3 vezes a quantidade de fármaco presente no medicamento (USP-NF, 2020b).

2.7. *Método de dissolução para comprimidos de estradiol*

2.7.1. Tentativa e erro com aparato I e II

O desenvolvimento de um método de dissolução, convencionalmente, é feito através de diversos ensaios onde um parâmetro é variado enquanto os demais são fixados e, assim, é possível comparar o quanto cada variável é capaz de impactar no perfil de dissolução do medicamento. Essa forma convencional de tratar o desenvolvimento de um método analítico é também chamada de tentativa e erro.

Neste caso, os parâmetros avaliados foram: meio de dissolução, aparato, velocidade de rotação, volume de meio, desaeração (ou desgaseificação) e reposição do meio de dissolução. Na **Tabela 4** estão resumidas as condições analisadas em cada ensaio.

A interferência da coleta automática *versus* manual também foi investigada ao final do trabalho. Para os demais ensaios, as coletas, e reposição do meio quando aplicável, foram feitas manualmente.

Tabela 4 – Planejamento dos ensaios para a abordagem de tentativa e erro.

Ensaio	Aparato	Rotação	Meio	Volume	Reposição	Desaeração
1	Pá (II)	75 rpm	HCl 0,1N	900 mL	Sim	Sim
2	Pá (II)	75 rpm	Tampão acetato pH 4,5	900 mL	Sim	Sim
3	Pá (II)	75 rpm	Tampão fosfato pH 6,8	900 mL	Sim	Sim
4	Pá (II)	75 rpm	Tampão fosfato pH 6,8 com 0,025% p/V de LSS	900 mL	Sim	Não
5	Pá (II)	75 rpm	Tampão fosfato pH 6,8 com 0,025% p/V de Tween® 80	900 mL	Sim	Não
6	Pá (II)	50 rpm	Tampão fosfato pH 6,8	900 mL	Sim	Sim
7	Pá (II)	75 rpm	Tampão fosfato pH 6,8	900 mL	Sim	Sim
8	Pá (II)	100 rpm	Tampão fosfato pH 6,8	900 mL	Sim	Sim
9	Cesto (I)	75 rpm	Tampão fosfato pH 6,8	900 mL	Sim	Sim
10	Cesto (I)	100 rpm	Tampão fosfato pH 6,8	900 mL	Sim	Sim
11	Pá (II)	75 rpm	Tampão fosfato pH 6,8	1000 mL	Sim	Sim
12	Pá (II)	75 rpm	Tampão fosfato pH 6,8	500 mL	Sim	Sim
13	Pá (II)	75 rpm	Tampão fosfato pH 6,8	500 mL	Sim	Não
14	Pá (II)	75 rpm	Tampão fosfato pH 6,8	500 mL	Não	Sim

2.7.2. Método com planejamento experimental (DoE) com aparato I e II

O desenvolvimento do método de dissolução para comprimidos de liberação imediata contendo estradiol 1,0 mg também foi feito através de um conjunto de ensaios dados por um delineamento experimental, do tipo fatorial fracionado 2^{4-1} (RODRIGUES & IEMMA, 2014), sem ponto central (não foi necessária repetição uma vez que foram avaliadas 6 cubas e foi possível avaliar a repetição através do desvio padrão relativo - DPR - obtido), considerando quatro fatores em dois níveis, de acordo com a **Tabela 5**, totalizando 8 ensaios.

BARROS NETO et al (2007) advertem sobre a possibilidade de ser necessário complementar o delineamento experimental fatorial com oito ensaios para poder identificar qual o efeito dos fatores.

A escolha do meio de dissolução e volume deste foi realizada através dos resultados do estudo de solubilidade descrito no item 3.2, sendo utilizado, portanto, 500 mL de tampão fosfato pH 6,8.

Foram analisadas as repostas Y_1 para % dissolvida em função do tempo em 15 minutos (Q1), Y_2 para % dissolvida em função do tempo em 30 minutos (Q2) e Y_3 para eficiência da dissolução (ED%).

Os ensaios foram realizados conforme demonstrado na **Tabela 6**. Além disso, os ensaios descritos na Tabela 6 foram numerados a partir de 15 para facilitar a identificação dos testes durante a execução no laboratório, contudo, não são continuidade dos ensaios da Tabela 4.

Foram realizadas coletas nos tempos em 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60.

Tabela 5 - Planejamento do desenvolvimento do método pelo experimento fracionado 2^{4-1} .

Variáveis	Código	-1	+1
Aparato	X ₁	Pá (II)	Cesto (I)
Rotação	X ₂	50 rpm	100 rpm
Desaeração do meio de dissolução	X ₃	Não desaerado	Desaerado
Reposição do meio de dissolução	X ₄	Sem reposição	Com reposição

Tabela 6 – Ensaios realizados pelo experimento fracionado 2^{4-1} .

Ensaio	Aparato	Rotação	Desaeração do meio	Reposição
15	Pá (II)	50 rpm	Não desaerado	Sem reposição
16	Cesto (I)	50 rpm	Não desaerado	Com reposição
17	Pá (II)	100 rpm	Não desaerado	Com reposição
18	Cesto (I)	100 rpm	Não desaerado	Sem reposição
19	Pá (II)	50 rpm	Desaerado	Com reposição
20	Cesto (I)	50 rpm	Desaerado	Sem reposição
21	Pá (II)	100 rpm	Desaerado	Sem reposição
22	Cesto (I)	100 rpm	Desaerado	Com reposição

Tabela 7 – Codificação dos ensaios realizados pelo experimento fracionado 2^{4-1} .

Ensaio	Aparato	Rotação	Desaeração do meio	Reposição
15	-1	-1	-1	-1
16	+1	-1	-1	+1
17	-1	+1	-1	+1
18	+1	+1	-1	-1
19	-1	-1	+1	+1
20	+1	-1	+1	-1
21	-1	+1	+1	-1
22	+1	+1	+1	+1

2.7.3. Ensaios complementares

Complementarmente, os ensaios descritos na **Tabela 8** foram realizados após os ensaios descritos nos itens 2.6.1. e 2.6.2. para avaliação do caráter discriminativo do método, robustez da coleta automática *versus* manual e comparação do resultado obtido no perfil de dissolução *versus* obtido em coleta de ponto único.

As condições utilizadas foram Pá (II) a 75 rpm, com 500 mL de tampão fosfato pH 6,8, sem desaeração e com reposição do meio de dissolução.

Tabela 8 - Ensaios complementares para desenvolvimento do método de dissolução.

Ensaio	Item avaliado
23	Caráter discriminativo do método: Lote Problema 1
24	Caráter discriminativo do método: Lote Problema 2
25	Robustez de coleta: Automática <i>versus</i> manual
26	Robustez de coleta: Perfil <i>versus</i> pontual

Foram utilizados dois lotes problemas (Lote Problema 1 e Lote Problema 2) para avaliação do caráter discriminativo do método e as formulações estão detalhadas na Tabela 21.

2.7.4. Método com planejamento experimental (DoE) com aparato IV

A escolha do meio de dissolução e volume mínimo deste foi realizada através dos resultados do estudo de solubilidade descrito no item 3.2.

Foi utilizado o planejamento experimental de fatorial completo 2^3 (RODRIGUES & IEMMA, 2014), sem pontos centrais (não foi necessária repetição uma vez que foram avaliadas 6 cubas e foi possível avaliar a repetição através do DPR obtido), analisando as repostas Y_1 para % dissolvida em função do tempo em 30 minutos (Q1) e Y_2 para eficiência da dissolução (ED%) no tempo de 60 minutos (Q2).

As variáveis avaliadas foram: fluxo do meio de dissolução (X_1), tamanho da célula (X_2) e quantidade de esfera (X_3), sendo esta considerada uma variável qualitativa, conforme demonstrado nas **Tabelas 9 e 10**.

Os perfis de dissolução foram traçados a partir de coletas nos tempos em 10, 15, 20, 30, 45 e 60.

Tabela 9 - Planejamento experimental fatorial completo 2^3 em dois níveis para desenvolvimento do método de dissolução de comprimidos contendo 1,0 mg de estradiol com o aparato IV.

Variáveis	Código	-1	+1
Fluxo	X ₁	20 mL/ minuto	25 mL/ minuto
Tamanho da célula	X ₂	12 mm	22 mm
Quantidade de esfera	X ₃	12 mm: 1g	12 mm: 2g
		22 mm: 2g	22 mm: 5g

Tabela 10 – Valores codificados e respostas dos ensaios.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	Fluxo	Tamanho da célula	Quantidade de esfera
1	1	1	1	25 mL/ minuto	22 mm	5 g
2	1	-1	-1	25 mL/ minuto	12 mm	1 g
3	-1	1	-1	20 mL/ minuto	22 mm	2 g
4	-1	-1	1	20 mL/ minuto	12 mm	2 g
5	1	1	-1	25 mL/ minuto	22 mm	2 g
6	1	-1	1	25 mL/ minuto	12 mm	2 g
7	-1	1	1	20 mL/ minuto	22 mm	5 g
8	-1	-1	-1	20 mL/ minuto	12 mm	1 g

Ao final dos testes descritos acima, foram realizados os perfis de dissolução dos dois lotes problemas (Lote Problema 1 e Lote Problema 2 – vide Tabela 21) a fim de avaliar o caráter discriminativo do método, totalizando 10 ensaios.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas: coluna cromatográfica ODS Hypersil (250 mm x 4,6 mm x 5,0 µm); fase móvel acetonitrila grau HPLC e água ultrapura na proporção de 50:50 V/V; fluxo 1,0 mL/minuto; temperatura do forno à 25°C; volume de injeção de

50 µL e; detecção UV em 205 nm. O método analítico foi desenvolvido internamente e validado, apresentando resultados satisfatórios quanto à seletividade e especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez cromatográfica. Foi elaborado um relatório contendo os procedimentos e resultados da validação analítica, o qual foi entregue à Libbs Farmacêutica.

O peso médio obtido para o lote analisado de Natifa® foi de 92,2 mg, uniformidade de doses unitárias com VA = 5 e resultado do teste de doseamento de 1,00 mg de estradiol por comprimido (100%).

3.1. Avaliação dos filtros e estabilidade das soluções

Para escolher qual filtro é mais adequado, deve ser considerada a lipofilicidade do fármaco e suas propriedades ácido-base. De modo geral, espécies ionizadas sofrem menor interação com membranas hidrofóbicas e espécies ionizadas e neutras interagem menos com filtros hidrofílicos (VÖLGYI et al, 2018).

Com isso, o estradiol em meio aquoso na faixa de pH fisiológico está em sua forma molecular, neutra, portanto, foram realizados os testes com filtros de seringa de PVDF de 0,45 µm (Jet Biofil, China) e de cânulas (full flow) de 1,0 µm (QLA, Estados Unidos) (hidrofílicos) com volume de descarte de 1 e 3 mL, em tampão fosfato pH 6,8.

Os resultados obtidos estão resumidos na **Tabela 11**.

Tabela 11 - Resultados obtidos no teste de filtro da solução 0,002 mg/mL de estradiol em tampão fosfato pH 6,8.

Filtro	% recuperação
PVDF 0,45 µm com descarte de 1 mL	100,1%
PVDF 0,45 µm com descarte de 3 mL	99,8%
Full flow 1,0 µm com descarte de 1 mL	100,4%
Full flow 1,0 µm com descarte de 3 mL	100,0%

Com base nos resultados acima e considerando o critério de aceitação 95,0 a 105,0% de recuperação, observou-se que os filtros utilizados no estudo de solubilidade e nos ensaios de dissolução para estradiol são adequados.

Ainda, foi avaliada a estabilidade do estradiol em tampão fosfato pH 6,8 (0,002 mg/mL) através da avaliação da recuperação da concentração do ativo em relação à solução recém preparada. Após 55 horas em solução, foi observada a recuperação de 97,2% de estradiol.

Portanto, utilizando o mesmo critério de aceitação adotado para avaliação dos filtros (recuperação de 95,0 a 105,0%), foi evidenciado que o estradiol apresenta estabilidade satisfatória na faixa de pH fisiológico até 55 horas, sendo esse tempo suficiente para todos os ensaios conduzidos neste estudo.

3.2. Solubilidade do estradiol hemi-hidratado

O pH das amostras do estudo de solubilidade foi medido no início e ao final dos testes e os valores obtidos evidenciaram a manutenção desse nas soluções ensaiadas durante todo o estudo.

Após quantificação das amostras pelo sistema cromatográfico, os resultados foram calculados, bem como os valores médios e desvios padrão relativo (DPR).

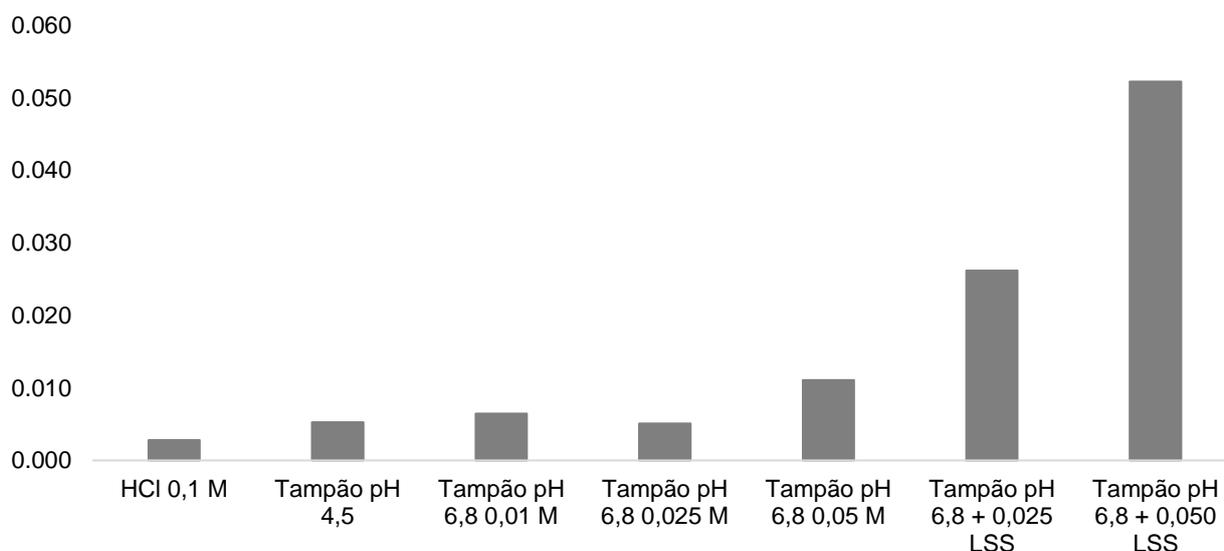
Na **Tabela 12** e **Figura 15** estão resumidos os valores de solubilidade obtidos no estudo para determinação da solubilidade em meios de dissolução na faixa de pH fisiológica do estradiol.

Tabela 12 - Resultados de solubilidade em meios de dissolução obtidos para o estradiol hemi-hidratado.

Meio de dissolução	Amostra 1 (mg/mL)	Amostra 2 (mg/mL)	Amostra 3 (mg/mL)	Média (mg/mL)	DPR (%)
HCl 0,1N	0,003	0,003	0,003	0,003	9,82
Tampão acetato pH 4,5	0,007	0,005	0,003	0,005	37,76
Tampão fosfato 0,01 M pH 6,8	0,008	0,007	0,005	0,006	20,35
Tampão fosfato 0,025 M pH 6,8	0,009	0,004	0,003	0,005	59,81
Tampão fosfato 0,05 M pH 6,8	0,012	0,013	0,008	0,011	25,60
Tampão fosfato com 0,025% p/V de LSS	0,033	0,023	0,023	0,026	21,01
Tampão fosfato com 0,05% p/V de LSS	0,065	0,054	0,038	0,052	25,40

Na **Tabela 12**, observa-se que, considerando os meios de dissolução sem tensoativo, o estradiol hemi-hidratado apresenta maior solubilidade no pH 6,8 em tampão fosfato 0,05 mol/L. Os valores de DPR obtidos foram altos e devem-se, provavelmente, a dificuldade de obtenção do equilíbrio nesse estudo de solubilidade.

Figura 15 - Resultados de solubilidade do estradiol, em mg/mL.



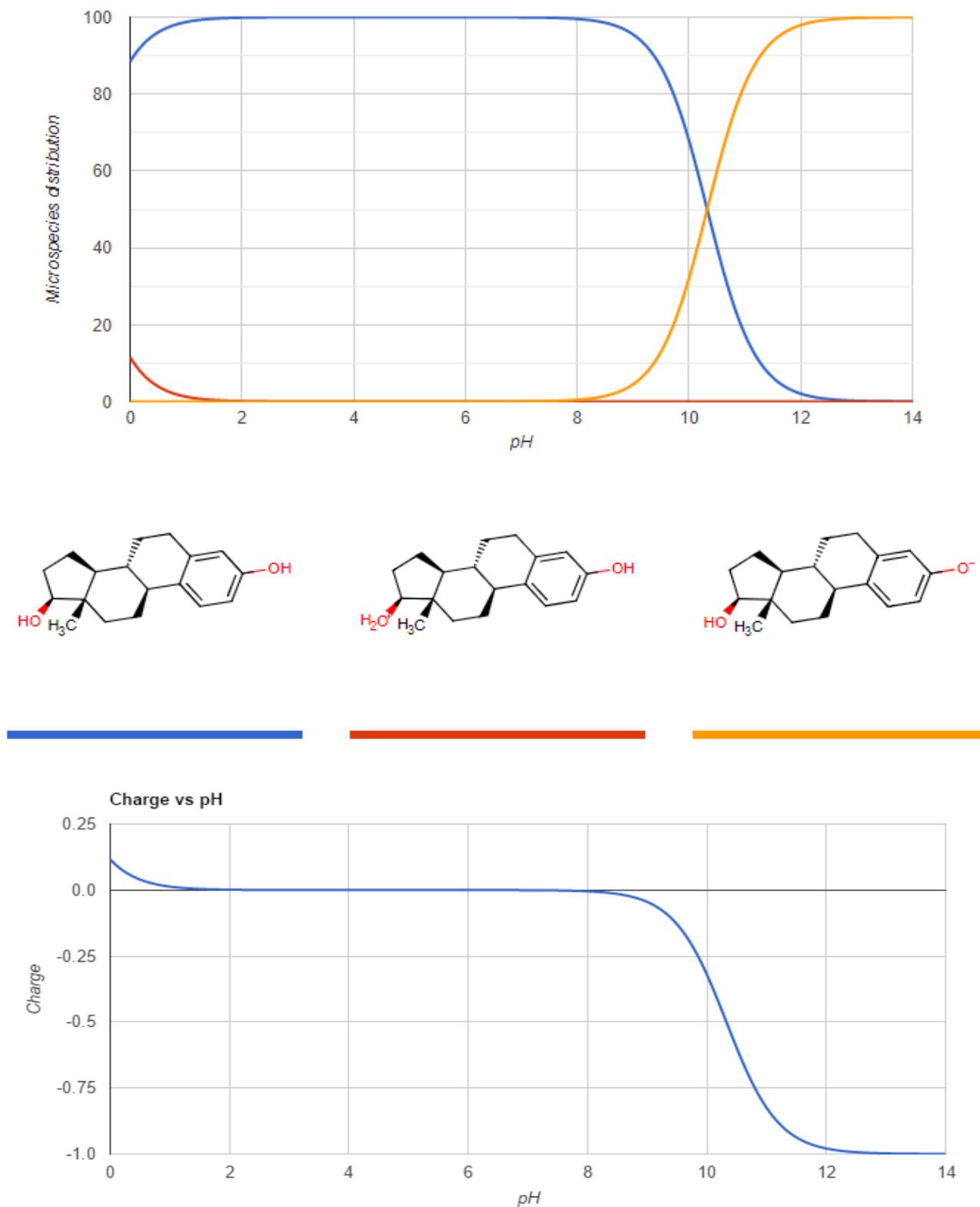
O fármaco é pH independente na faixa fisiológica. Essa afirmação é embasada pela distribuição de microespécies da molécula do estradiol mostrada na **Figura 16** e pela análise da variância (ANOVA One-way) dos resultados dos meios HCl 0,1 M, tampão pH 4,5 e Tampão pH 6,8 0,01 M, onde não foi observada diferença significativa da solubilidade em função do pH.

Foi observada diferença de solubilidade do estradiol quando utilizado tampão fosfato pH 6,8 com molaridades distintas (0,01, 0,025 e 0,05 mol/L). Através da análise de variância (ANOVA), observou-se que em tampão pH 6,8 0,05 M a solubilidade é estatisticamente diferente dos valores obtidos em tampão pH 6,8 0,1 M e tampão pH 6,8 0,025 M.

Ainda, a solubilidade do estradiol foi favorecida quando adicionado o tensoativo, sendo que, ao dobrar a concentração do tensoativo, foi observada a mesma proporcionalidade no resultado de concentração solubilizada do fármaco.

Sendo assim, optou-se pelo uso do tampão fosfato 0,05 mol/L pH 6,8 para continuidade dos testes por ser o meio em que o estradiol mostrou melhor solubilidade.

Figura 16 - Distribuição das microespécies e de cargas e valores de pH para o estradiol.



Fonte: Chemicalize, 2020.

O estradiol possui 5 carbonos quirais com estereoquímica absoluta definida, possibilitando em teoria a existência de 2 estereoisômeros distintos. É uma molécula pouco ionizável (ioniza adotando carga negativa), com valores de pKa e de distribuição de cargas conforme a figura 16. Este fármaco encontra-se predominantemente na sua forma não ionizada na faixa de pH entre 0 – 9,0 e a partir do pH 9,0 a microespécie ionizada da hidroxila fenólica passa a ser predominante frente a forma molecular.

Devido sua estrutura química, o estradiol é um exemplo de molécula de baixa solubilidade em meios aquosos, contudo, a solubilidade em condições do trato gastrointestinal é facilitada devido à sua baixa dosagem nos medicamentos e por não apresentar pH dependência na faixa de pH fisiológica, de 1,0 a 6,8.

Uma vez que a classificação biofarmacêutica (AMIDON et al, 1995) de um fármaco pode variar de acordo com a sua dose, observou-se que o estradiol foi classificado como um fármaco classe I por LOFTSSON (2015) considerado a dose de 0,1mg, enquanto o relatório apresentado ao EMA (2009) apresenta o estradiol como classe II pois considera a dose de 1,5mg.

Com base nos resultados obtidos na Tabela 12, devido ao valor de solubilidade obtido em HCl 0,1N (1,0 mg de estradiol insolúvel em 250 mL), o fármaco é classificado como de baixa solubilidade. Sendo assim, considerando sua alta permeabilidade e a dose de 1 mg, conclui -se que o estradiol é um fármaco classe II.

3.3. *Cálculo da sink condition para estradiol hemi-hidratado*

Com base nos resultados obtidos e apresentados no estudo de solubilidade, foi realizado o cálculo para verificar se há atendimento às *sink conditions* para o estradiol hemi-hidratado nos meios de dissolução avaliados.

Tabela 13 - Resultados obtidos para a condição *sink*, conforme Guia nº 14 (BRASIL, 2018).

Meio de dissolução	Solubilidade (mg/mL)	Q* (mg)	VN** (mL)	VCS*** (mL)	Razão 500mL/VN
HCl 0,1N	0,003	1,5	333,3	1000,0	1,5
Tampão acetato pH 4,5	0,005	2,5	200,0	600,0	2,5
Tampão fosfato 0,05 M pH 6,8	0,011	5,5	90,9	272,7	5,5
Tampão fosfato 0,01 M pH 6,8	0,006	3,0	166,7	500,0	3,0
Tampão fosfato 0,025 M pH 6,8	0,005	2,5	200,0	600,0	2,5
Tampão pH 6,8 + 0,025% LSS	0,026	13,0	38,5	115,4	13,0
Tampão pH 6,8 + 0,05% LSS	0,052	26,0	19,2	57,7	26,0

*Q = Quantidade de IFA dissolvida em 500 mL de meio de dissolução (Solubilidade x 500 mL).

**VN = Volume necessário para dissolver 1 comprimido de 1 mg.

*** VCs = Volume necessário para satisfazer condição *sink* (3 x VN).

De acordo com o capítulo geral <1092> da Farmacopeia Americana (USP-NF, 2020b), a condição *sink* é definida como 3 vezes o volume necessário para saturação do meio de dissolução. Portanto, considerando 500 mL, os meios de dissolução com resultado de Razão maior ou igual a 3 são satisfatórios para atender às *sink conditions* para 1,0 mg de estradiol.

Os meios contendo tensoativos atendem às condições *sink*, contudo, de acordo com a resolução RDC nº 31/2010, Guia nº14 e capítulo <1092> da Farmacopeia Americana, o uso de tensoativos deve ser evitado e quando necessário, deve ser justificado e utilizada a menor concentração possível (BRASIL, 2010; BRASIL, 2018; USP-NF, 2020b).

3.4. Desenvolvimento do método de dissolução pelo aparato I e II

3.4.1. Método convencional

3.4.1.1. Escolha do meio de dissolução

Para desenvolvimento do método de dissolução para comprimidos contendo 1 mg de estradiol foram realizados inicialmente os ensaios previstos na **Tabela 4**.

Dessa forma, os ensaios 1 a 5 foram executados para definição do meio de dissolução mais adequado, enquanto os parâmetros de rotação (75 rpm), aparato (pá), volume (900 mL) e reposição do meio foram mantidos.

O parâmetro de desaeração do meio de dissolução não é aplicado para meios de dissolução contendo tensoativos, conforme recomendação do capítulo geral <711> da

Farmacopeia Americana (USP-NF, 2020a), pois, o processo de desaeração pode gerar bolhas excessivamente no meio de dissolução. Todavia, antes da adição do tensoativo, o tampão fosfato foi desaerado.

A desaeração foi realizada de acordo com o procedimento validado e apresentado no capítulo geral <711> da Farmacopeia Americana (USP-NF, 2020a), ou seja, o meio foi aquecido em agitação suave até cerca de 41°C e imediatamente filtrado sob vácuo utilizando filtro de PVDF de 0,45 µm e; logo após, foi mantido sob agitação e vácuo por mais 5 minutos.

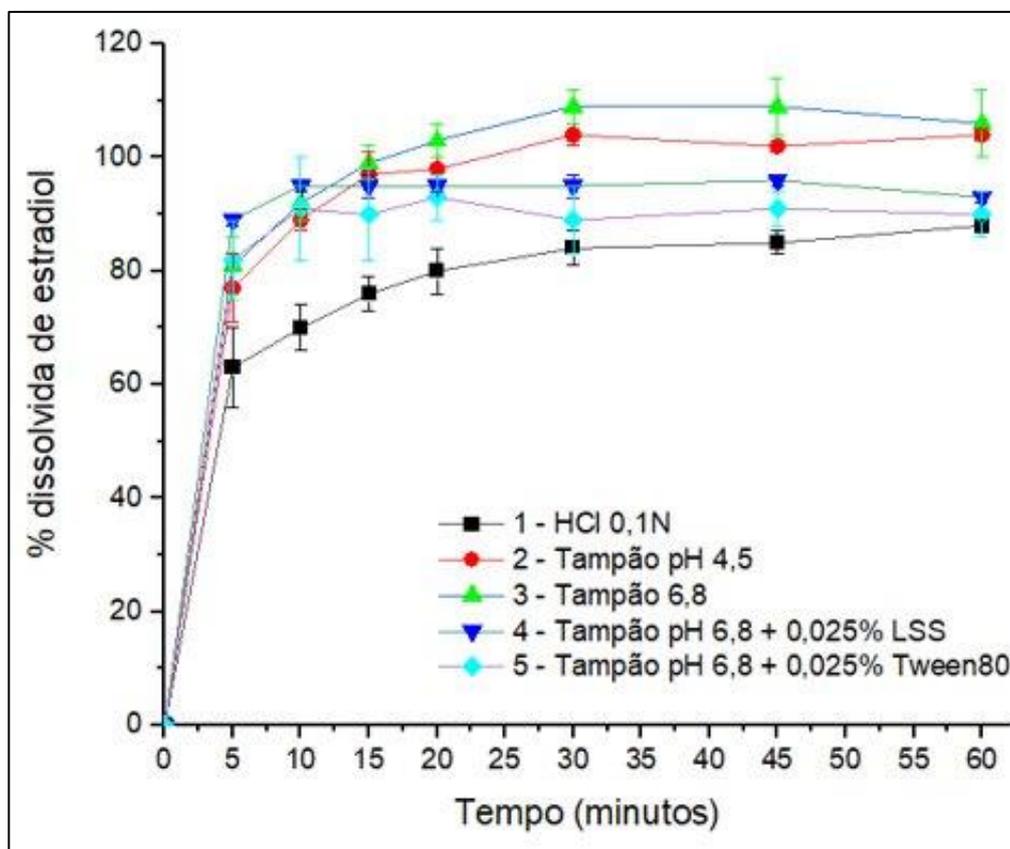
Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 14** e **Figura 17**.

Ressalta-se que, nesse trabalho, nas tabelas contendo os resultados, serão apresentados os valores médios da % de estradiol dissolvido (**% diss**) e desvios padrão relativos (**DPR%** ou coeficiente de variação) para cada tempo (**T**, em minutos) avaliado.

Tabela 14 - Resultados de estradiol dissolvido em função do tempo nos ensaios 1 a 5.

T (min)	Ensaio 1 HCl 0,1 N		Ensaio 2 Tampão pH 4,5		Ensaio 3 Tampão pH 6,8		Ensaio 4 Tampão pH 6,8 com 0,025% LSS		Ensaio 5 Tampão pH 6,8 com 0,025% Tween80	
	% diss	DPR%	% diss	DPR%	% diss	DPR%	% diss	DPR%	% diss	DPR%
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	63	7	77	6	81	5	89	1	82	7
10	70	4	89	2	92	3	95	1	91	9
15	76	3	97	4	99	3	95	2	90	8
20	80	4	98	2	103	3	95	1	93	4
30	84	3	104	2	109	3	95	2	89	6
45	85	2	102	1	109	5	96	1	91	3
60	88	1	104	1	106	6	93	1	90	4

Figura 17 – Resultados de estradiol dissolvido em função do tempo nos ensaios 1 a 5.



De acordo com o Guia nº14/2018 (BRASIL, 2018) e capítulo geral <1092> da Farmacopeia Americana (USP-NF, 2020b), “*para formulações de liberação imediata, a duração do processo de dissolução é, geralmente, de 30 a 60 minutos. O perfil de dissolução típico desses produtos demonstra um aumento gradual, alcançando 85 a 100% entre 30 a 45 minutos*”.

Observou-se nos resultados acima que, em meio de dissolução HCl 0,1N o estradiol não alcançou dissolução satisfatória (liberação esperada próxima a 100%, conforme observado nos demais perfis), alcançando um platô com liberação máxima de 87% em 60 minutos.

Os ensaios 4 e 5 contemplam o emprego de tensoativos nos meios de dissolução, sendo utilizado no ensaio 4 o lauril sulfato de sódio (aniônico) e no ensaio 5 o polissorbato 80 (não iônico), ambos na concentração de 0,025% p/V. Observou-se que os perfis de dissolução para esses ensaios foram semelhantes, com dissolução de estradiol superior a 85% em 15 minutos, indicando um perfil de dissolução muito rápida (BRASIL, 2010; BRASIL, 2018; USP-NF, 2020b; EMA, 2020), onde as propriedades dos tensoativos utilizados não apresenta relevância para dissolução do estradiol.

Os perfis de dissolução dos ensaios 2 (tampão acetato pH 4,5) e 3 (tampão fosfato pH 6,8) também apresentaram dissolução muito rápida, ou seja, dissolução superior a 85% em 15 minutos. Nesse caso os perfis de dissolução são considerados semelhantes e o cálculo de F2 (fator de similaridade) perde ser caráter discriminativo, não sendo aplicável (BRASIL, 2010; BRASIL, 2018; USP-NF, 2020b; EMA, 2020).

Portanto, o uso de tensoativos não é necessário e foi definido o meio de dissolução tampão fosfato 0,05 mol/L pH 6,8 para continuação do desenvolvimento do método de dissolução para comprimidos contendo 1 mg de estradiol.

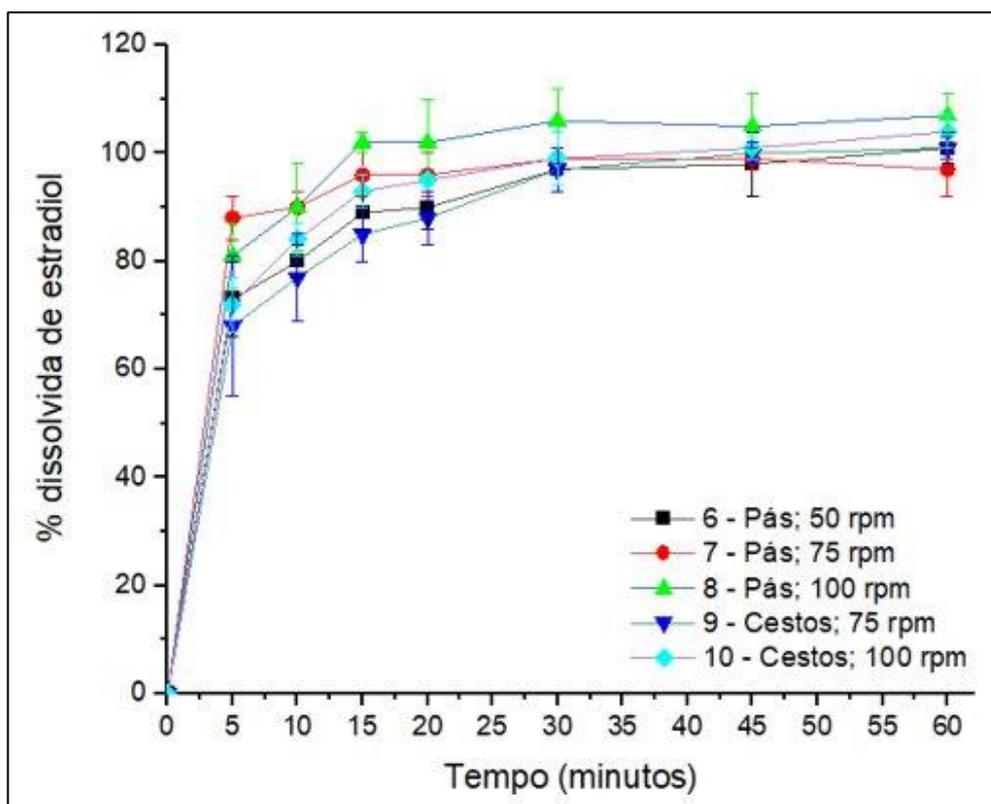
3.4.1.2. Escolha do aparato e velocidade de rotação

Em seguida, foram realizados os ensaios de 6 a 10 para definição do melhor aparato e sua velocidade de agitação para dissolução do Natifa®, usando 900 mL de tampão fosfato 0,05 M pH 6,8, e os resultados estão apresentados na **Tabela 15** e **Figura 18**.

Tabela 15 - Resultados médios de estradiol dissolvido em função do tempo nos ensaios 6 a 10.

T (min)	Ensaio 6 Pás 50 rpm		Ensaio 7 Pás 75 rpm		Ensaio 8 Pás 100 rpm		Ensaio 9 Cestos 75 rpm		Ensaio 10 Cestos 100 rpm	
	% diss	DPR%	% diss	DPR%	% diss	DPR%	% diss	DPR%	% diss	DPR%
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	73	7	88	4	81	6	68	13	72	5
10	80	3	90	3	90	8	77	8	84	3
15	89	3	96	4	102	2	85	5	93	3
20	90	4	96	4	102	8	88	5	95	1
30	97	3	99	1	106	6	97	4	99	5
45	98	6	99	2	105	6	100	2	101	2
60	101	3	97	5	107	4	101	2	104	3

Figura 18 - Resultados de estradiol dissolvido em função do tempo nos ensaios 6 a 10.



Os resultados evidenciam que os ensaios 6 (pá com 50 rpm), 7 (pá com 75 rpm), 8 (pá com 100 rpm), 9 (cesto com 75 rpm) e 10 (cesto com 100 rpm) apresentam perfil de dissolução muito rápida e são considerados semelhantes.

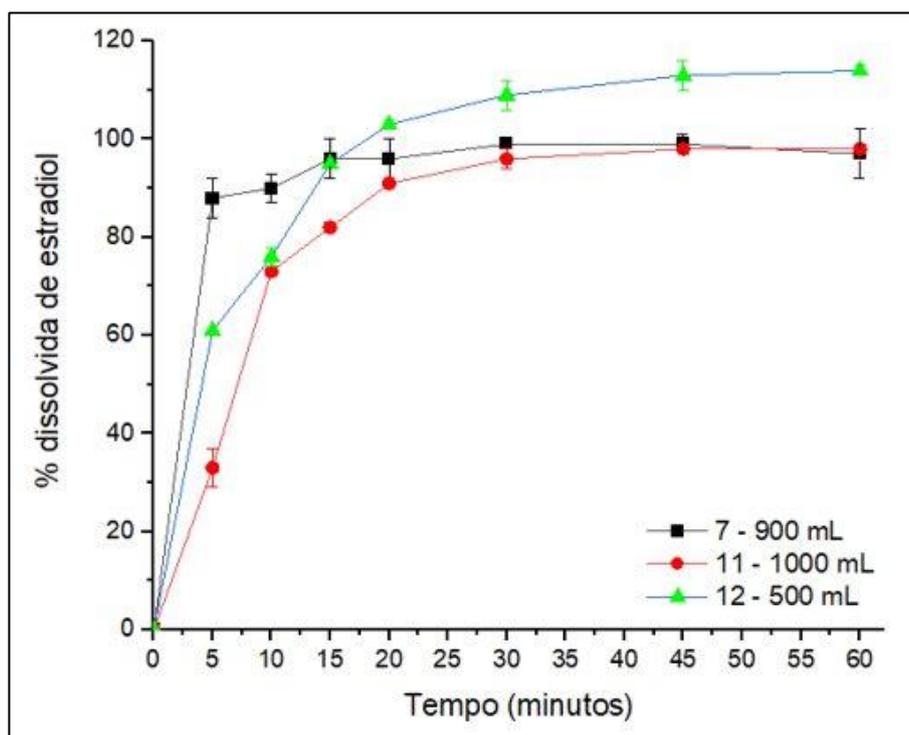
Portanto, uma vez que o fármaco apresenta dissolução muito rápida (85% dissolvido em 15 minutos), sendo um perfil característico e esperado para um classe I pelo sistema de classificação biofarmacêutica, qualquer condição poderia ser utilizada de modo satisfatório. Foi definido o aparato II (pá) com rotação de 75 rpm para dissolução do Natifa® usando como critério de decisão os valores de dissolução e DPR robustos nessa condição.

3.4.1.3. Escolha do volume de meio de dissolução

Foram realizados os ensaios 11 e 12 em comparação com o ensaio 7 para definição do volume de meio de dissolução mais adequado para dissolução do estradiol, com pás a 75 rpm e tampão fosfato pH 6,8. Os resultados são apresentados na **Tabela 16** e **Figura 19**.

Tabela 16 - Resultados de estradiol dissolvido em função do tempo nos ensaios 7, 11 e 12.

T (min)	Ensaio 7 900 mL		Ensaio 11 1000 mL		Ensaio 12 500 mL	
	% diss	DPR%	% diss	DPR%	% diss	DPR%
0	0	0	0	0	0	0
5	88	4	33	4	61	0
10	90	3	73	1	76	2
15	96	4	82	1	95	0
20	96	4	91	1	103	1
30	99	1	96	2	109	3
45	99	2	98	1	113	3
60	97	5	98	0	114	1

Figura 19 - Resultados de estradiol dissolvido em função do tempo nos ensaios 7, 11 e 12.

Os ensaios 7 (900 mL) e 12 (500 mL) apresentam perfis de dissolução muito rápida (85% dissolvido em 15 minutos) enquanto o ensaio 11 (1000 mL) apresenta perfil de dissolução rápida, ou seja, 85% de fármaco dissolvido em 30 minutos.

De acordo com o ICH M9 (EMA, 2020), quando as velocidades de dissolução são diferentes os perfis podem ser comparados pelo cálculo de F2 e considerados semelhantes quando o valor de F2 obtido estiver dentro da faixa de 50 a 100.

Dessa forma, foram calculados os valores de F2 para os perfis obtidos, considerando os 4 primeiros pontos para comparação, e esses estão apresentados na **Tabela 17**.

Tabela 17 - Valores de F2 obtidos para os ensaios 6 a 10.

Ensaio	Valor de F2
7 x 11	26
7 x 12	Não se aplica
11 x 12	39

Os perfis não são semelhantes, portanto, o volume de meio de dissolução é um parâmetro crítico para a dissolução do estradiol, pois, apesar de atender à condição *sink* com todos os volumes avaliados, o aumento do volume na cuba de dissolução altera a hidrodinâmica e muda o perfil de liberação do fármaco.

Ou seja, o volume de 1000 mL na cuba (ensaio 11) diminui a velocidade de liberação do fármaco provavelmente devido menor hidrodinâmica. Sendo assim, foi definido o volume de 500 mL de tampão fosfato pH 6,8 para dissolução do estradiol devido ser o menor volume permitido para uso no aparato II, atendimento às condições *sink* e propiciar visualmente melhor hidrodinâmica na cuba.

3.4.1.4. Coleta automática *versus* coleta manual

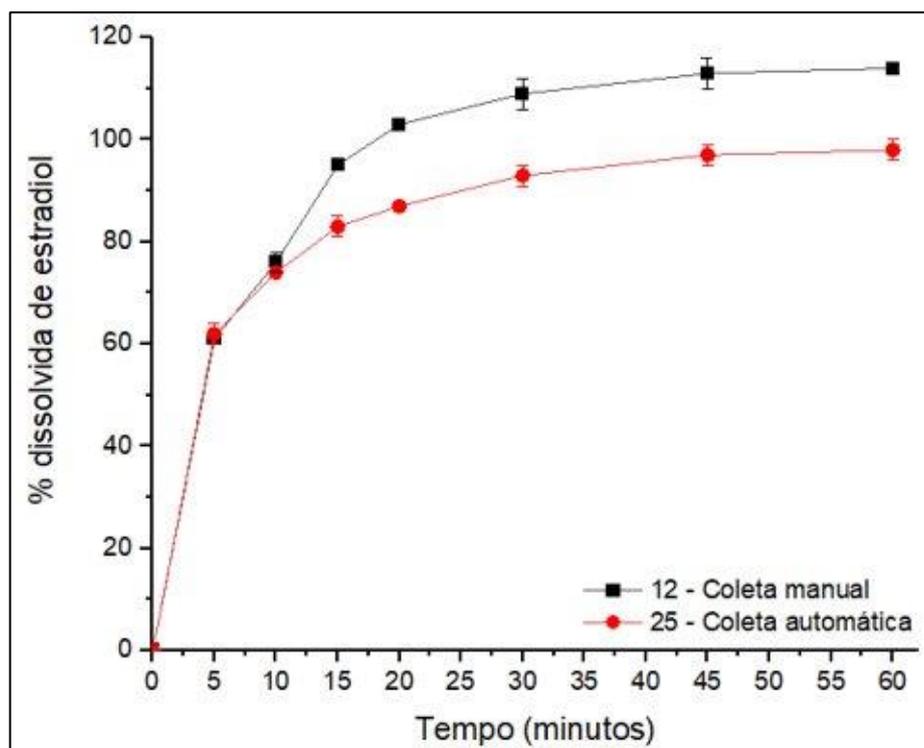
Após definição das condições de dissolução para meio de dissolução, aparato (pá), volume (500 mL) e velocidade de agitação (75 rpm), foi avaliado o impacto da coleta através de coletor automático (ensaio 25) frente ao perfil de dissolução coletado manualmente (ensaio 12).

Os resultados estão apresentados na **Tabela 18** e **Figura 20**.

Tabela 18 - Resultados de estradiol dissolvido em função do tempo nos ensaios 12 e 25.

T (min)	Ensaio 12		Ensaio 25	
	Coleta manual		Coleta automática	
	% diss	DPR%	% diss	DPR%
0	0	0	0	0
5	61	0	62	2
10	76	2	74	1
15	95	0	83	2
20	103	1	87	1
30	109	3	93	2
45	113	3	97	2
60	114	1	98	2

Figura 20 - Resultados de estradiol dissolvido em função do tempo nos ensaios 12 e 25.



Observou-se que o perfil de dissolução realizado com coletor automático apresentou um perfil de dissolução rápido (velocidade de dissolução limítrofe para muito rápida), enquanto o perfil coletado manualmente apresentou perfil de dissolução muito rápido.

Portanto, a coleta apresenta impacto na velocidade dos perfis de dissolução do estradiol 1 mg. Tal interferência pode ser promovida por turbulência nas cubas devido entrada e saída do probes do coletor automático e cânulas nas coletas manuais, interação do fármaco com o plástico das tubulações do coletor automático, entre outros possíveis fatores que não foram possíveis de serem investigados nesse trabalho. Essa avaliação do real fator de interferência pode ser abordada em um projeto futuro. Todavia, essa diferença observada não foi considerada relevante levando em conta que os resultados obtidos são capazes de aprovar os lotes mediante especificação proposta para avaliação da qualidade do produto no item 3.4.1.7 deste trabalho.

Dessa forma, foi definida a coleta manual para os ensaios de dissolução do Natifa® visando diminuir as variáveis do método e garantir maior robustez entre os resultados.

3.4.1.5. Avaliação da interferência da reposição do meio de dissolução

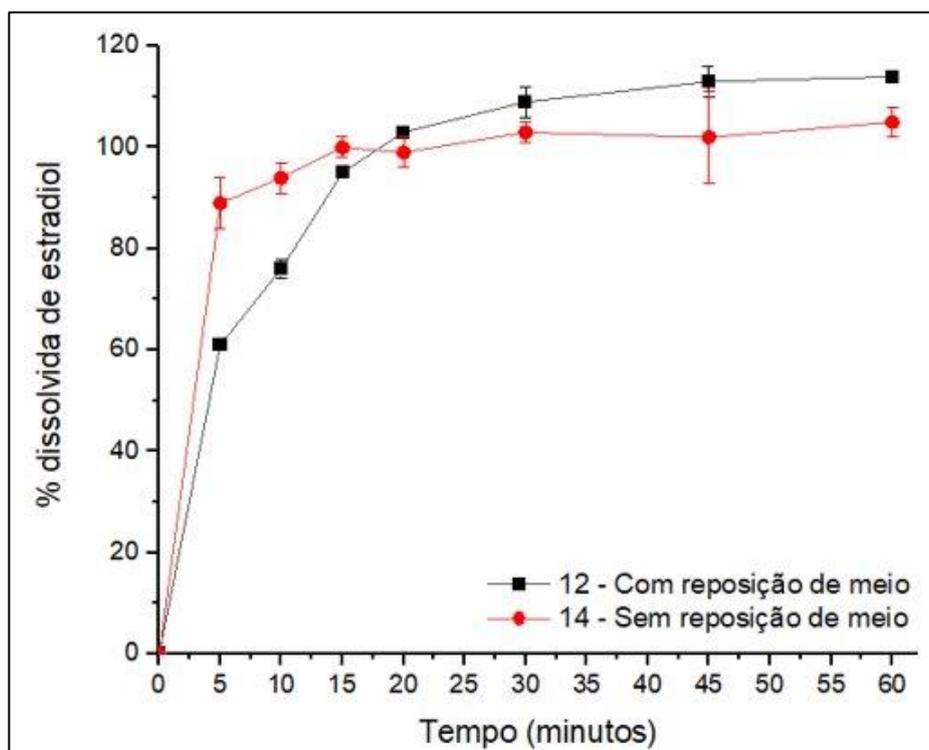
Em seguida, o perfil de dissolução traçado sem a reposição do meio após as coletas (ensaio 14) e foi comparado ao perfil de dissolução com reposição do meio após cada coleta. O

volume de coleta e reposição foi padronizado em 5 mL. Os resultados obtidos podem ser encontrados na **Tabela 19** e **Figura 21**.

Tabela 19 - Resultados de estradiol dissolvido em função do tempo nos ensaios 12 e 14.

T (min)	Ensaio 12		Ensaio 14	
	Com reposição do meio		Sem reposição do meio	
	% diss	DPR%	% diss	DPR%
0	0	0	0	0
5	61	0	89	5
10	76	2	94	3
15	95	0	100	2
20	103	1	99	3
30	109	3	103	2
45	113	3	102	9
60	114	1	105	3

Figura 21 - Resultados de estradiol dissolvido em função do tempo nos ensaios 12 e 14.



Os dois perfis de dissolução apresentaram dissolução muito rápida, sendo dessa forma, considerados semelhantes. Portanto, a reposição ou não do meio de dissolução não impacta no perfil de dissolução do estradiol.

Contudo, a fim de minimizar as variáveis do método, padronizando os ensaios e garantindo a manutenção das condições *sink*, foi definido para este método a coleta e reposição de 5 mL para perfis de dissolução.

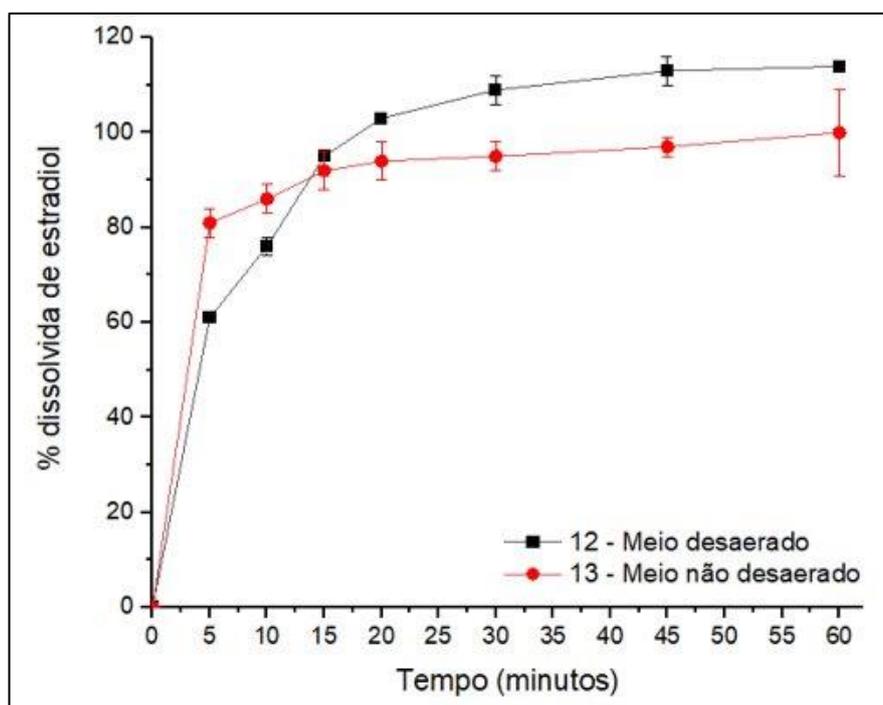
3.4.1.6. Avaliação do impacto da desaeração do meio de dissolução

Seguindo com o desenvolvimento do método de dissolução para comprimidos contendo 1 mg de estradiol, foi realizado um perfil de dissolução do Natifa® com 500 mL do meio de dissolução tampão fosfato 0,05 mol/L pH 6,8 não desaerado (ensaio 13) em comparação ao perfil do mesmo produto e com o mesmo tampão desaerado (ensaio 12), com pás a 75 rpm.

Os resultados obtidos são apresentados na **Tabela 20** e **Figura 22**.

Tabela 20 - Resultados de estradiol dissolvido em função do tempo nos ensaios 12 e 13.

T (min)	Ensaio 12		Ensaio 13	
	Meio desaerado	DPR%	Meio não desaerado	DPR%
0	0	0	0	0
5	61	0	81	3
10	76	2	86	3
15	95	0	92	4
20	103	1	94	4
30	109	3	95	3
45	113	3	97	2
60	114	1	100	9

Figura 22 - Resultados de estradiol dissolvido em função do tempo nos ensaios 12 e 13.

Os perfis de dissolução foram considerados semelhantes pois ambos apresentaram dissolução muito rápida.

Sendo assim, foi definido que o meio de dissolução não será desaerado para uso na rotina, pois a etapa de desaeração confere uma variável a mais no método.

3.4.1.7. Avaliação do caráter discriminativo do método e definição do Q

Para avaliar se o método em desenvolvimento apresenta caráter discriminativo, ou seja, avaliar se o método é capaz de detectar alterações de atributos farmacêuticos que possam afetar o desempenho do medicamento *in vivo* (BRASIL, 2018), foram preparados dois lotes problemas.

Lotes problemas são formulações com alterações propositais na fórmula e/ou no processo visando desafiar o método desenvolvido com o principal objetivo estabelecer um ensaio capaz de reprovar lotes com desempenho *in vivo* indesejado (BRASIL, 2018).

Na **Tabela 21** estão descritos os dois lotes problemas preparados com alterações nas formulações e no processo.

Tabela 21 – Formulações utilizadas para avaliação do caráter discriminativo do método de dissolução em desenvolvimento.

% média de estradiol dissolvido			
Formulação	Natifa®	Lote Problema 1	Lote problema 2
Estradiol hemi-hidratado	Formulação protegida pelo segredo industrial	1,033 mg	1,033 mg
Celulose microcristalina 102		192,967 mg	116,967 mg
Crospovidona		4,000 mg	Não se aplica
Estearato de magnésio		2,000 mg	2,000 mg
Lactose mono hidratada		Não se aplica	80,000 mg
Processo	Via úmida/ granulação	Mistura seca e compressão direta	Mistura seca e compressão direta
Designação (BRASIL, 2018)	Não se aplica	Atributo crítico de qualidade do produto/ Parâmetro crítico de processo	Atributo crítico de qualidade do produto/ Parâmetro crítico de processo

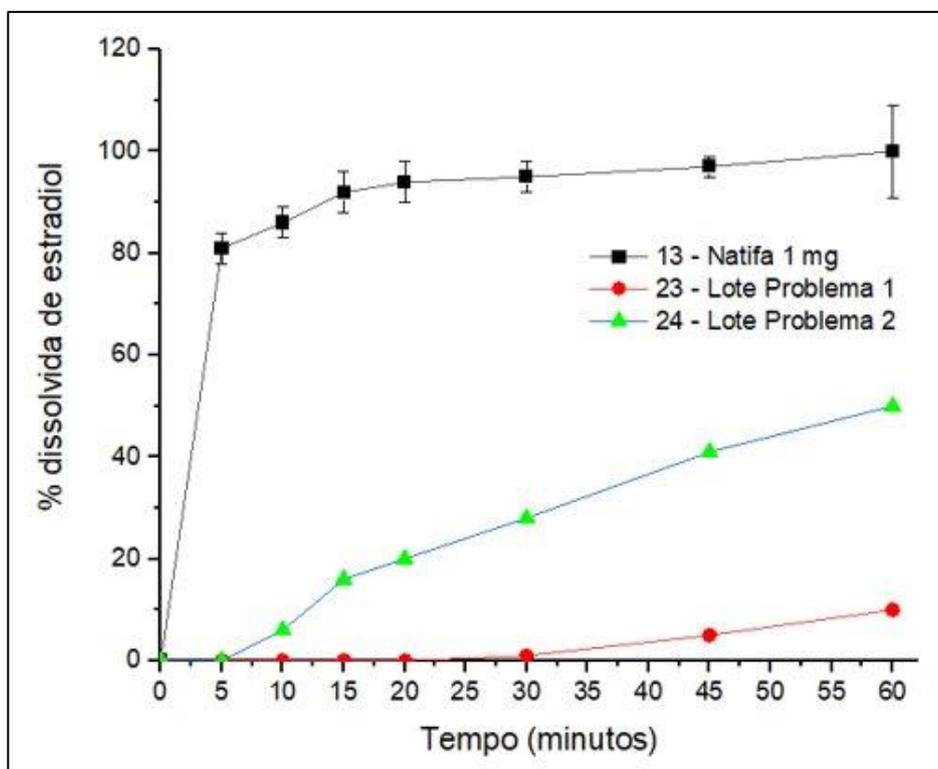
Na **Tabela 22** e **Figura 23** estão os resultados da avaliação do caráter discriminativo do método. O lote problema 1 (ensaio 23) e lote problema 2 (ensaio 24) foram comparados ao perfil de dissolução do Natifa® realizado com as condições finais do método, ou seja, em 500 mL de tampão fosfato pH 6,8 não desaerado, pá a 75 rpm, com coleta manual e reposição de 5 mL em cada tempo analisado.

Os valores discrepantes de DPR obtidos para os lotes problemas são decorrentes das baixas concentrações encontradas nos perfis de dissolução devido a não liberação do fármaco.

Tabela 22 - Resultados de estradiol dissolvido em função do tempo nos ensaios 13, 23 e 24.

T (min)	Ensaio 13 Natifa 1 mg		Ensaio 23 Lote problema 1		Ensaio 24 Lote problema 2	
	% diss	DPR%	% diss	DPR%	% diss	DPR%
0	0	0	0	0	0	0
5	81	3	0	0	0	0
10	86	3	0	0	6	86
15	92	4	0	0	16	42
20	94	4	0	0	20	52
30	95	3	1	245	28	2
45	97	2	5	120	41	13
60	100	9	10	91	50	11

Figura 23 - Resultados de estradiol dissolvido em função do tempo nos ensaios 13, 23 e 24 para avaliação do caráter discriminativo do método.



Com base nos dados apresentados anteriormente, evidenciou-se que o método desenvolvido é capaz de discriminar entre lotes problema e lote com qualidade aceitável.

Ainda, observando os lotes problemas, verificou-se que a lactose apresenta maior influência no perfil de dissolução do estradiol do que a crospovidona, contudo, apresentam efeito sinérgico em relação à liberação do fármaco.

Dessa forma, sabendo que o Natifa® apresentou perfil de dissolução muito rápido durante todo o desenvolvimento, foi definido o Q de 80% em 15 minutos como especificação para garantir a qualidade lote a lote deste produto.

3.4.1.8. Coleta pontual *versus* coleta de perfil de dissolução

Uma vez definida a especificação para qualidade do produto, foi realizado o ensaio de dissolução do Natifa® com coleta pontual em 15 minutos (ensaio 26). O resultado obtido foi comparado ao resultado com o valor obtido nesse tempo no perfil de dissolução (ensaio 13).

Os resultados médios de estradiol dissolvido em 15 minutos nos ensaios 13 e 26 foram 92% e 95%, respectivamente.

Considerando a especificação definida ($Q = 80\%$ em 15 minutos), os resultados obtidos a partir do perfil de dissolução e através da coleta única, pontual em 15 minutos, são satisfatórios.

3.4.1.9. Condições finais do método

A partir dos resultados obtidos no desenvolvimento do método de dissolução para Natifa® foram definidas as seguintes condições de dissolução.

- Meio de dissolução: tampão fosfato de potássio 0,05 mol/L pH 6,8, não desaerado;
- Aparato: II (pás);
- Velocidade de agitação: 75 rpm;
- Volume de meio: 500 mL;
- Coleta e reposição do meio: 5 mL;
- Tipo de coleta: manual;
- Filtros para cânula: Polietileno 1,0 μm ;
- Filtros de seringa: PVDF de 13 mm e 0,45 μm ;
- Especificação: Q de 80% em 15 minutos;
- Critério de aceitação: Não menos que 85% de estradiol dissolvido em 15 minutos.

3.4.2. Planejamento experimental fatorial fracionado

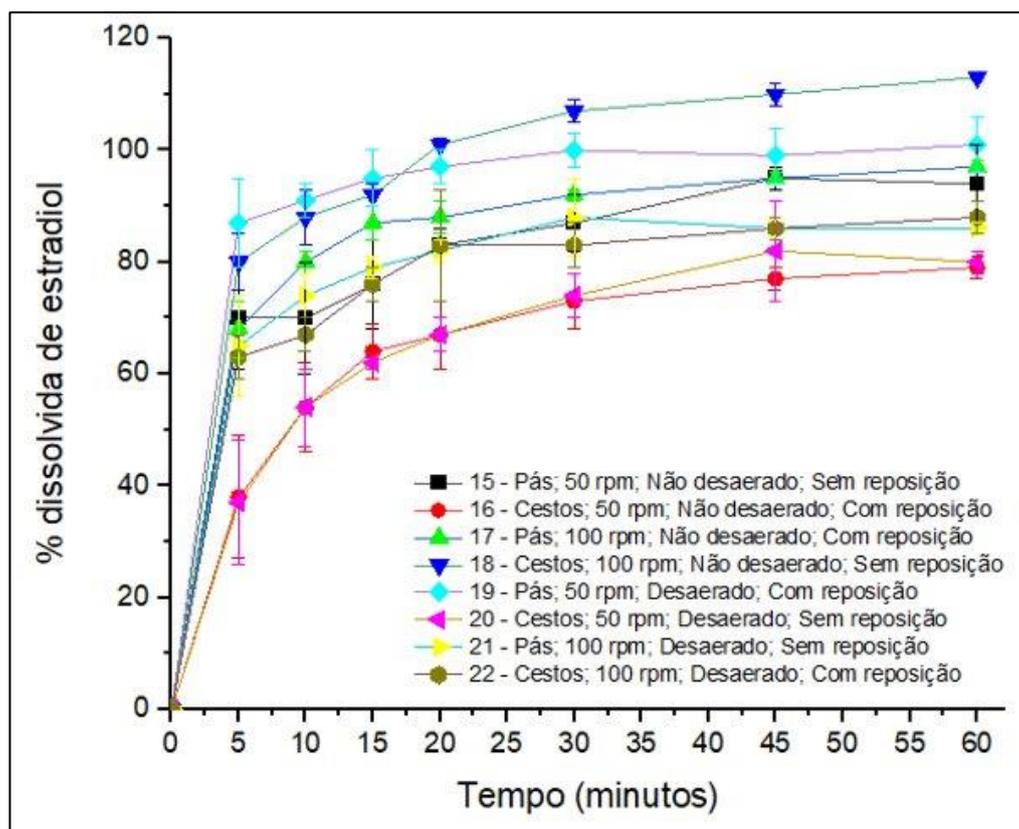
No desenvolvimento do método de dissolução realizado através do planejamento de experimentos (DoE) fatorial fracionado 2^{4-1} foram realizados os ensaios descritos na **Tabela 6**, considerando 500 mL de tampão fosfato 0,05 mol/L pH 6,8.

Os resultados obtidos a partir desse desenho estão apresentados na **Tabela 23** e **Figura 24**.

Tabela 23 - Resultados de estradiol dissolvido em função do tempo nos ensaios 15 a 22.

		Ensaio 15		Ensaio 16		Ensaio 17		Ensaio 18		Ensaio 19		Ensaio 20		Ensaio 21		Ensaio 22	
		Pás 50 rpm Não desaerado e sem reposição		Cestos 50 rpm Não desaerado e com reposição		Pás 100 rpm Não desaerado e com reposição		Cestos 100 rpm Não desaerado e sem reposição		Pás 50 rpm Desaerado e com reposição		Cestos 50 rpm Desaerado e sem reposição		Pás 100 rpm Desaerado e sem reposição		Cestos 100 rpm Desaerado e com reposição	
T (min)	% diss	DPR%	% diss	DPR%	% diss	DPR%	% diss	DPR%	% diss	DPR%	% diss	DPR%	% diss	DPR%	% diss	DPR%	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5	70	9	38	11	68	5	80	5	87	8	37	11	65	9	63	4	
10	70	10	54	8	80	2	88	5	91	3	54	7	74	4	67	3	
15	76	8	64	5	87	3	92	2	95	5	62	1	79	2	76	3	
20	83	3	67	6	88	3	101	1	97	3	67	3	82	2	83	10	
30	87	5	73	5	92	1	107	2	100	3	74	4	88	7	83	4	
45	95	2	77	2	95	1	110	2	99	5	82	9	86	2	86	2	
60	94	7	79	2	97	1	113	0	101	5	80	2	86	1	88	3	

Figura 24 – Resultados médios de estradiol dissolvido em função do tempo nos ensaios 15 a 22.



Com esses resultados foram avaliadas estatisticamente o efeito das respostas Y_1 para % dissolvida em função do tempo 15 minutos (Q1), Y_2 para % dissolvida em função do tempo 30 minutos (Q2) e Y_3 para eficiência da dissolução (ED%) utilizando o software Statistica 13.5.

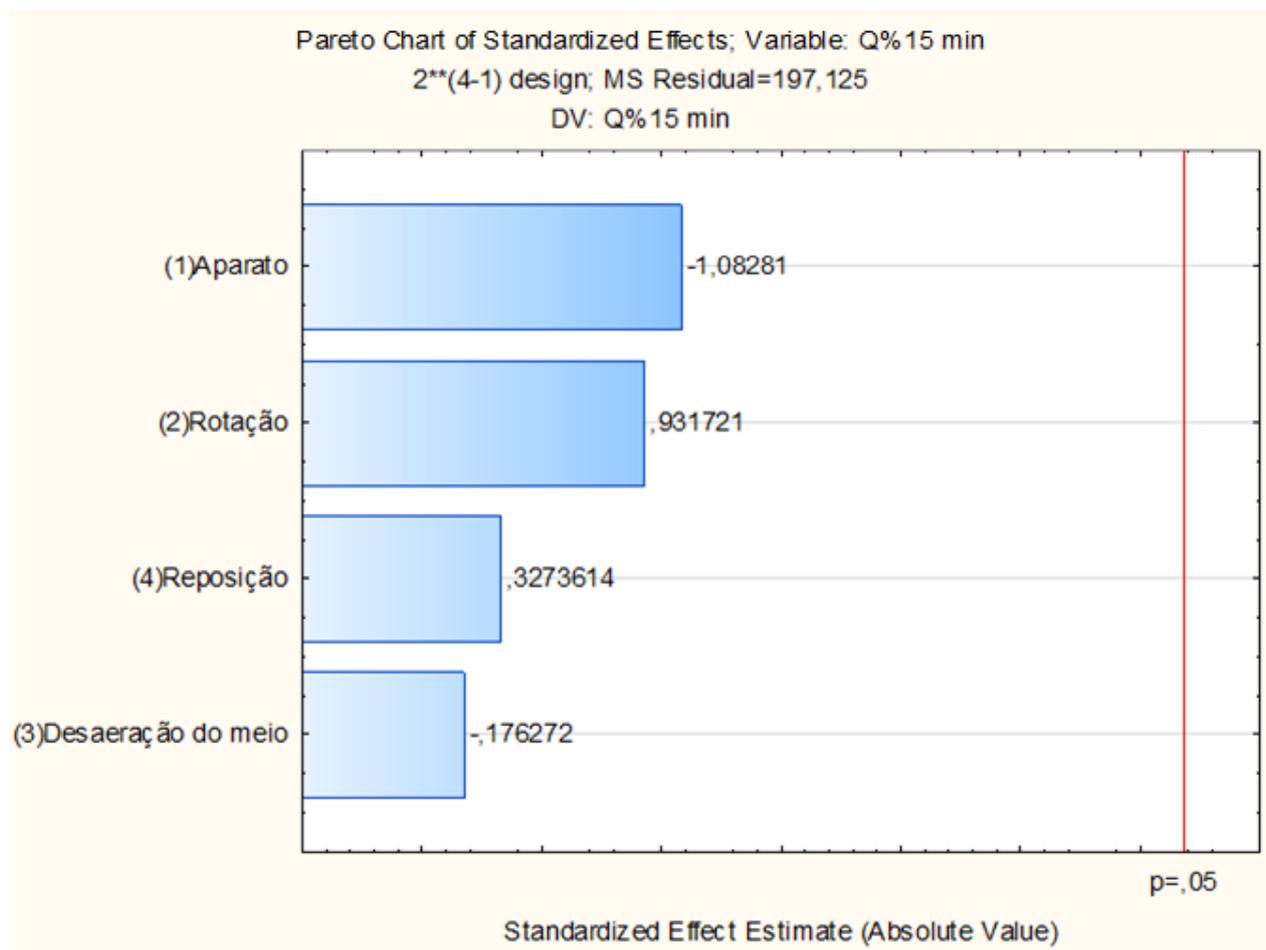
Os resultados obtidos na análise estatística (ANOVA: análise de variância) e os gráficos de pareto estão apresentados a seguir.

Figura 25 - Resultados de ANOVA para a resposta de % dissolvida em 15 minutos (Y1).

Effect Estimates; Var.:Q%15 min; R-sqr=,42072; Adj:0 2**(4-1) design; MS Residual=197,125 DV: Q%15 min										
Factor	Effect	Std.Err.	t(3)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	78,8750	4,963932	15,88962	0,000542	63,0776	94,67245	78,87500	4,963932	63,0776	94,67245
(1)Aparato	-10,7500	9,927865	-1,08281	0,358157	-42,3449	20,84490	-5,37500	4,963932	-21,1724	10,42245
(2)Rotação	9,2500	9,927865	0,93172	0,420210	-22,3449	40,84490	4,62500	4,963932	-11,1724	20,42245
(3)Desaeração do meio	-1,7500	9,927865	-0,17627	0,871308	-33,3449	29,84490	-0,87500	4,963932	-16,6724	14,92245
(4)Reposição	3,2500	9,927865	0,32736	0,764908	-28,3449	34,84490	1,62500	4,963932	-14,1724	17,42245

ANOVA; Var.:Q%15 min; R-sqr=,42072; Adj:0 2**(4-1) design; MS Residual=197,125 DV: Q%15 min						
Factor	SS	df	MS	F	p	
(1)Aparato	231,125	1	231,1250	1,172479	0,358157	
(2)Rotação	171,125	1	171,1250	0,868104	0,420210	
(3)Desaeração do meio	6,125	1	6,1250	0,031072	0,871308	
(4)Reposição	21,125	1	21,1250	0,107166	0,764908	
Error	591,375	3	197,1250			
Total SS	1020,875	7				

Figura 26 - Gráfico de pareto para a resposta de % dissolvida em 15 minutos (Y1).



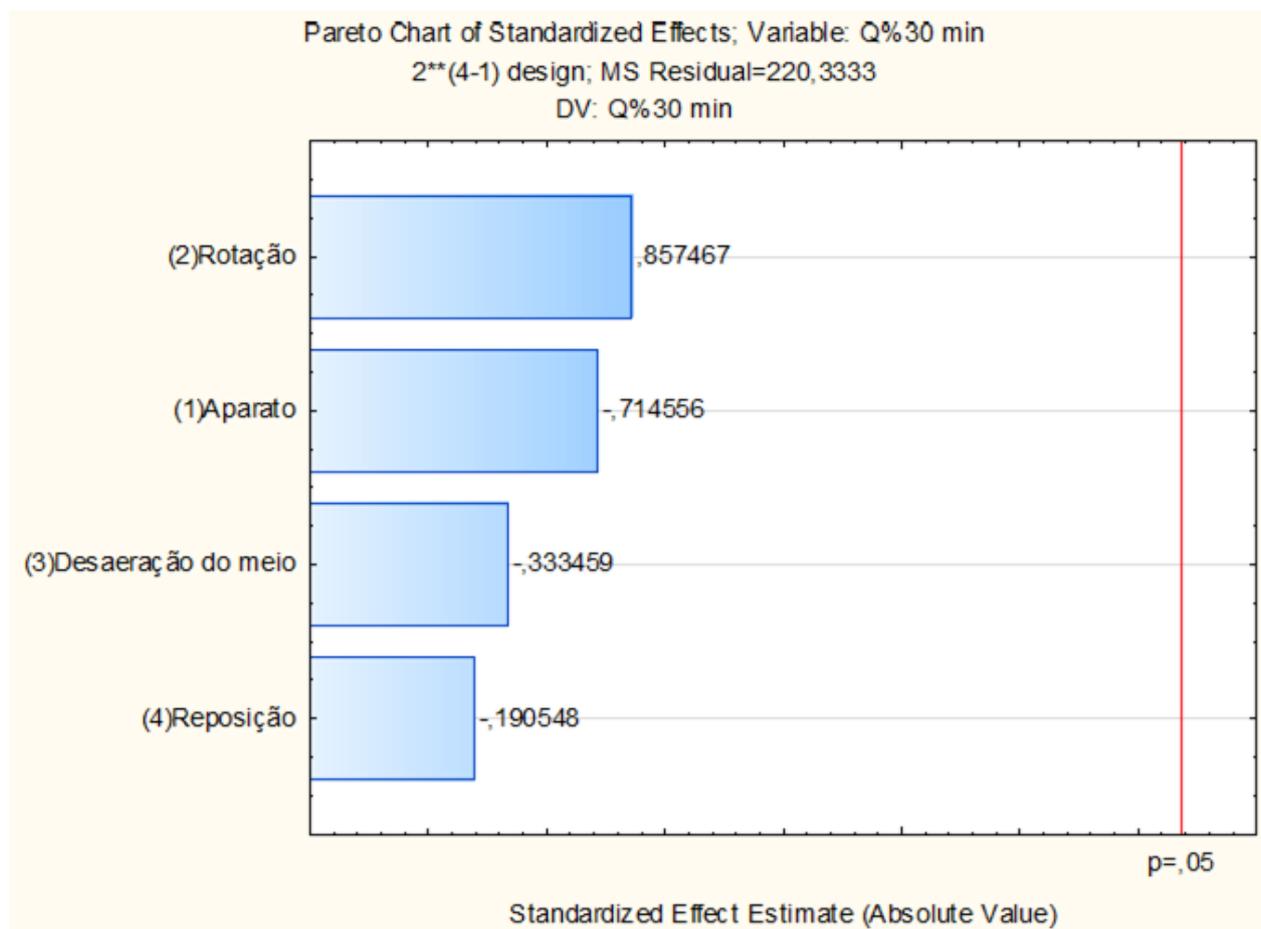
Como pode ser observado na **Figura 26**, nenhuma das variáveis apresenta interferência significativa da dissolução do estradiol com p-valor < 0,05, contudo, os dados de ANOVA (**Figura 25**) demonstram que o modelo não apresenta ajuste adequado com um r^2 de 0,42072.

Figura 27 - Resultados de ANOVA para a resposta de % dissolvida em 30 minutos (Y2).

Effect Estimates; Var.:Q%30 min; R-sqr=,31715; Adj:0, 2**(4-1) design; MS Residual=220,3333 DV: Q%30 min										
Factor	Effect	Std.Err.	t(3)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	88,00000	5,24802	16,76824	0,000462	71,2985	104,7015	88,00000	5,248015	71,2985	104,7015
(1)Aparato	-7,50000	10,49603	-0,71456	0,526467	-40,9031	25,9031	-3,75000	5,248015	-20,4515	12,9515
(2)Rotação	9,00000	10,49603	0,85747	0,454227	-24,4031	42,4031	4,50000	5,248015	-12,2015	21,2015
(3)Desaeração do meio	-3,50000	10,49603	-0,33346	0,760734	-36,9031	29,9031	-1,75000	5,248015	-18,4515	14,9515
(4)Reposição	-2,00000	10,49603	-0,19055	0,861045	-35,4031	31,4031	-1,00000	5,248015	-17,7015	15,7015

ANOVA; Var.:Q%30 min; R-sqr=,31715; Adj:0 2**(4-1) design; MS Residual=220,3333 DV: Q%30 min						
Factor	SS	df	MS	F	p	
(1)Aparato	112,5000	1	112,5000	0,510590	0,526467	
(2)Rotação	162,0000	1	162,0000	0,735250	0,454227	
(3)Desaeração do meio	24,5000	1	24,5000	0,111195	0,760734	
(4)Reposição	8,0000	1	8,0000	0,036309	0,861045	
Error	661,0000	3	220,3333			
Total SS	968,0000	7				

Figura 28 - Gráfico de pareto para a resposta de % dissolvida em 30 minutos (Y2).



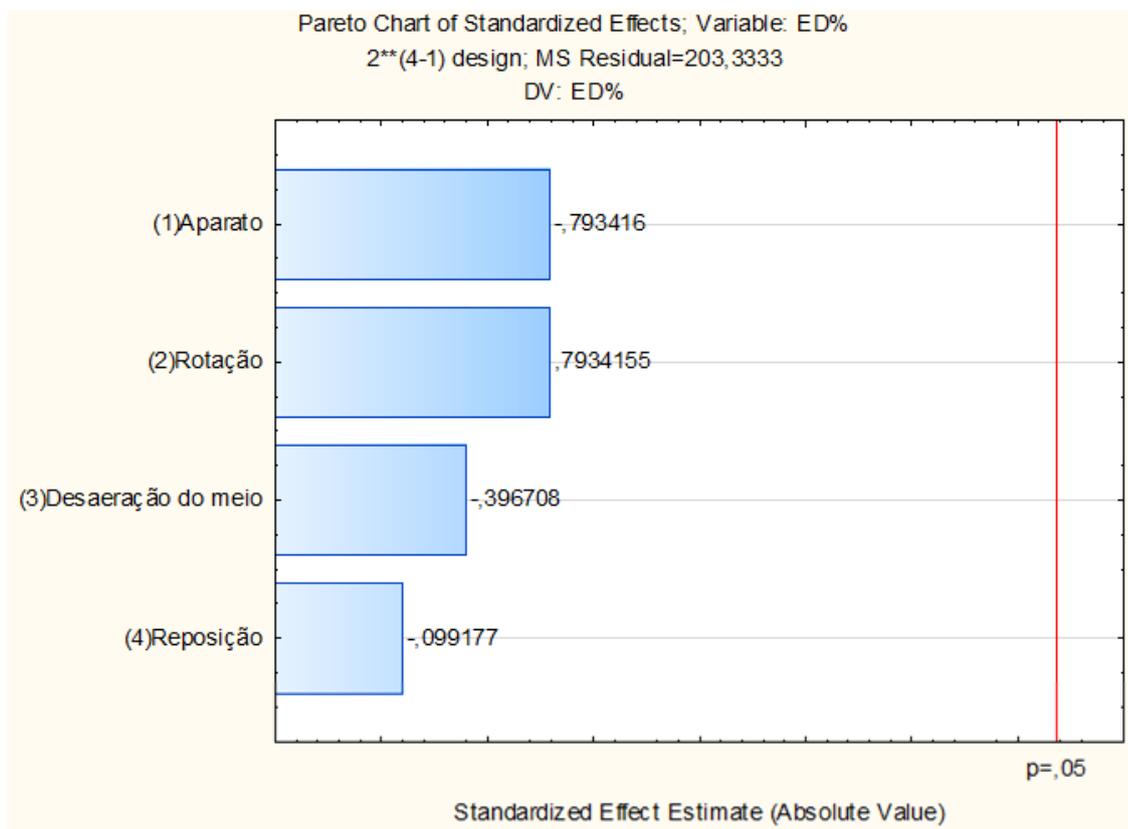
Olhando para **Figura 28**, verificou-se que as variáveis estudadas não proporcionam interferência estatisticamente significativa na dissolução do estradiol apresentando p-valor < 0,05, todavia, os dados de ANOVA (**Figura 27**) demonstram que o modelo não apresenta ajuste adequado com um r^2 de 0,31715.

Figura 29 - Resultados de ANOVA para a resposta de eficiência da dissolução (ED%) em 60 minutos (Y3).

Effect Estimates; Var.:ED%; R-sqr=.32222; Adj:0, 2**(4-1) design; MS Residual=203,3333 DV: ED%										
Factor	Effect	Std.Err.	t(3)	p	-95, % Cnf.Limt	+95, % Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95, % Cnf.Limt	+95, % Cnf.Limt
Mean/Interc.	81,00000	5,04149	16,06666	0,000524	64,9557	97,04429	81,00000	5,041494	64,9557	97,04429
(1)Aparato	-8,00000	10,08299	-0,79342	0,485496	-40,0886	24,08857	-4,00000	5,041494	-20,0443	12,04429
(2)Rotação	8,00000	10,08299	0,79342	0,485496	-24,0886	40,08857	4,00000	5,041494	-12,0443	20,04429
(3)Desaeração do meio	-4,00000	10,08299	-0,39671	0,718118	-36,0886	28,08857	-2,00000	5,041494	-18,0443	14,04429
(4)Reposição	-1,00000	10,08299	-0,09918	0,927253	-33,0886	31,08857	-0,50000	5,041494	-16,5443	15,54429

ANOVA; Var.:ED%; R-sqr=.32222; Adj:0, 2**(4-1) design; MS Residual=203,3333 DV: ED%						
Factor	SS	df	MS	F	p	
(1)Aparato	128,0000	1	128,0000	0,629508	0,485496	
(2)Rotação	128,0000	1	128,0000	0,629508	0,485496	
(3)Desaeração do meio	32,0000	1	32,0000	0,157377	0,718118	
(4)Reposição	2,0000	1	2,0000	0,009836	0,927253	
Error	610,0000	3	203,3333			
Total SS	900,0000	7				

Figura 30 - Gráfico de pareto para a resposta de eficiência de dissolução (ED%) em 60 minutos (Y3).



A **Figura 30** mostra que as variáveis estudadas não apresentam impacto significativo na dissolução do estradiol com p-valor $< 0,05$, porém, os dados de ANOVA (**Figura 29**) demonstram que o modelo não apresenta ajuste adequado com um r^2 de 0,32222.

Os modelos obtidos pela análise estatística não apresentaram valores de ajustes adequados (considerando adequados ou satisfatórios como maior que 0,95). BARROS NETO et al (2007) advertem sobre a possibilidade de ser necessário complementar o delineamento experimental fatorial com oito ensaios para poder identificar qual o efeito dos fatores. Contudo, dadas às características observadas de liberação imediata da formulação e dissolução muito rápida, os parâmetros avaliados não demonstraram interferência relevante tecnicamente.

Sendo assim, o desenvolvimento do método de dissolução para comprimidos revestidos contendo 1 mg de estradiol (Natifa®), através do planejamento experimental utilizando *DoE*, é capaz de reduzir o número de testes práticos comparado ao desenvolvimento do método pela abordagem de tentativa e erro.

3.5. Desenvolvimento do método de dissolução pelo aparato IV utilizando planejamento experimental fatorial completo

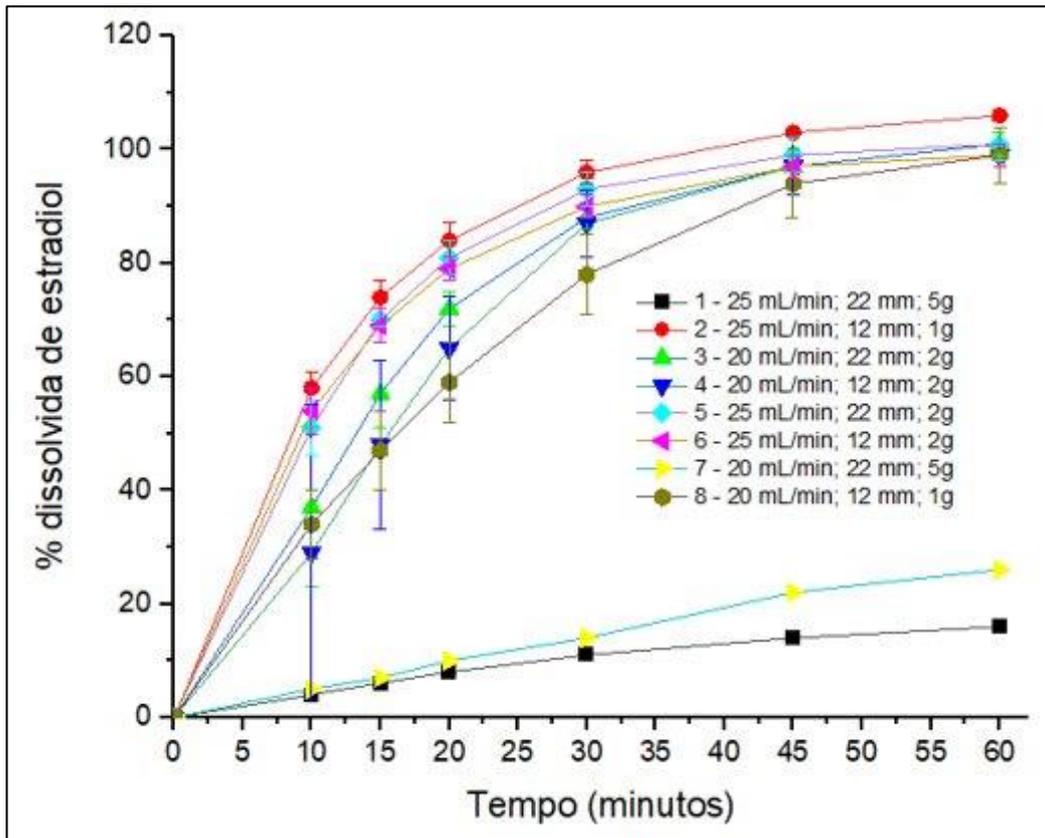
A escolha do meio de dissolução (tampão fosfato pH 6,8) e volume mínimo deste foi realizada através dos resultados do estudo de solubilidade descrito no item 3.2.

Os resultados de % dissolvida em função do tempo em 30 minutos (Y_1 ; Q1) e de eficiência da dissolução (ED%) no tempo de 60 minutos (Y_2 ; Q2) estão apresentados na **Tabela 24 e 26**.

Tabela 24 – Resultados de estradiol dissolvido em função do tempo nos ensaios 1 a 8 no aparato IV.

		Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3		Ensaio 4		Ensaio 5		Ensaio 6		Ensaio 7		Ensaio 8	
		25 mL/min; 22 mm; 5g		25 mL/min; 12 mm; 1g		20 mL/min; 22 mm; 2g		20 mL/min; 12 mm; 2g		25 mL/min; 22 mm; 2g		25 mL/min; 12 mm; 2g		20 mL/min; 22 mm; 5g		20 mL/min; 12 mm; 1g	
T (min)	% diss	DPR%															
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	4	19	58	3	37	14	29	26	51	5	54	4	5	80	34	6	
15	6	21	74	3	57	6	48	15	70	1	69	3	7	89	47	7	
20	8	24	84	3	72	3	65	9	81	3	79	2	10	92	59	7	
30	11	26	96	2	88	2	87	6	93	3	90	2	14	96	78	7	
45	14	29	103	1	97	2	97	5	99	3	97	2	22	107	94	6	
60	16	30	106	1	101	2	99	5	101	3	99	2	26	107	99	5	

Figura 31 - Perfis de dissolução de estradiol nos ensaios 1 a 8 no aparato IV.



O delineamento estudado foi um fatorial completo de dois níveis (2^3), tendo como variáveis independentes, o fluxo de meio de dissolução (20 e 25 mL/minuto), quantidade de esfera, neste caso sendo considerada uma variável qualitativa (**Tabela 25**) e tamanho da célula (12 mm e 22 mm).

Tabela 25 - Níveis considerados para a variável quantidade de esfera.

Tamanho da célula (mm)	Níveis	
	(-1)	(+1)
12	1 g	2 g
22	2 g	5 g

Como respostas, foram consideradas as porcentagens de fármaco dissolvido no tempo de 30 minutos ($Q\%_{30min}$) e a eficiência de dissolução, calculada em 60 minutos de ensaio ($ED\%_{60 min}$), conforme a matriz de experimentos apresentada na **Tabela 26**.

Tabela 26 - Matriz de experimentos para avaliação das condições de ensaio do aparato IV.

Fluxo (mL/ min)	Célula (mm)	Nível da Esfera	% dissolvida em 30 min	ED% em 60 min
20	12	(-1)	78,2	68,0
25	12	(-1)	96,1	83,0
20	22	(-1)	87,9	73,0
25	22	(-1)	93,1	77,0
20	12	(+1)	87,5	70,0
25	12	(+1)	90,0	78,0
20	22	(+1)	14,0	14,0
25	22	(+1)	10,7	10,0

3.5.1. Análise de variância Q% 30 minutos

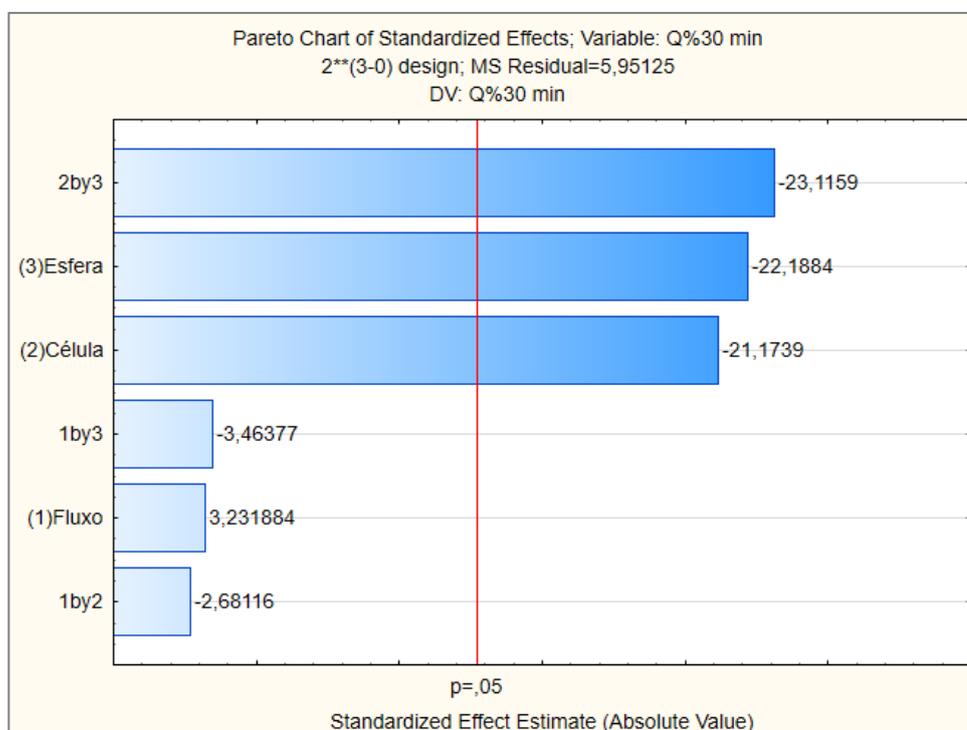
Segundo a análise de variância (ANOVA) para a resposta porcentagem dissolvida em trinta minutos (**Figuras 32 e 33**), o fluxo do meio de dissolução é a única variável que não influencia de modo significativo a resposta, dado o valor de $p > 0,05\%$, considerando um nível de significância de 5%.

Figura 32 - Análise de variância para a resposta de % dissolvida em 30 minutos (Q% 30 minutos).

ANOVA; Var.: Q%30 min; R-sqr=,99934; Adj:,99535 (Resultados DOE ap. IV importada) 2**(3-0) design; MS Residual=5,95125 DV: Q%30 min					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Fluxo	62,161	1	62,161	10,4451	0,191033
(2)Célula	2668,151	1	2668,151	448,3346	0,030044
(3)Esfera	2929,951	1	2929,951	492,3254	0,028672
1 by 2	42,781	1	42,781	7,1886	0,227268
1 by 3	71,401	1	71,401	11,9977	0,178929
2 by 3	3180,031	1	3180,031	534,3468	0,027523
Error	5,951	1	5,951		
Total SS	8960,429	7			

Com o gráfico de Pareto (**Figura 33**), é possível observar que a influência da quantidade de esfera e do tamanho da célula possuem efeitos parecidos. Neste caso, quando utilizados em seu menor nível, a porcentagem dissolvida é mais alta.

Figura 33 - Gráfico de Pareto para a resposta de % dissolvida em 30 minutos (Q% 30 minutos).



Nesse caso, as barras localizadas à direita da linha vermelha indicam os parâmetros que podem ser considerados significativos.

3.5.2. Análise de variância ED% 60 minutos

Para a resposta de eficiência da dissolução em 60 minutos (ED% 60 minutos) (**Figura 34**), todos os fatores estudados e as suas respectivas interações apresentaram valor de p abaixo de 0,05, indicando que, neste caso, além as variáveis quantidade de esfera e tamanho da célula, o fluxo também pode influenciar o resultado.

Figura 34 - Análise de Variância para a resposta de eficiência da dissolução em 60 minutos (ED% 60 minutos).

ANOVA; Var.:ED 60 min; R-sqr=,99998; Adj:,99986 (Resultados DOE ap. IV importada) 2**(3-0) design; MS Residual=,125 DV: ED 60 min					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Fluxo	66,125	1	66,125	529,00	0,027662
(2)Célula	1953,125	1	1953,125	15625,00	0,005093
(3)Esfera	2080,125	1	2080,125	16641,00	0,004935
1 by 2	66,125	1	66,125	529,00	0,027662
1 by 3	28,125	1	28,125	225,00	0,042379
2 by 3	1891,125	1	1891,125	15129,00	0,005176
Error	0,125	1	0,125		
Total SS	6084,875	7			

Ao avaliar o gráfico de Pareto na **Figura 35**, é possível destacar que embora, haja influência do fluxo, a intensidade de seu efeito é bem reduzida, quando comparada com os demais fatores. A combinação do fluxo mais alto, para a célula menor e menor quantidade de esferas, levou a uma liberação melhor do fármaco (**Figura 36**).

Figura 35 - Gráfico de Pareto para a resposta de eficiência da dissolução em 60 minutos (ED% 60 minutos).

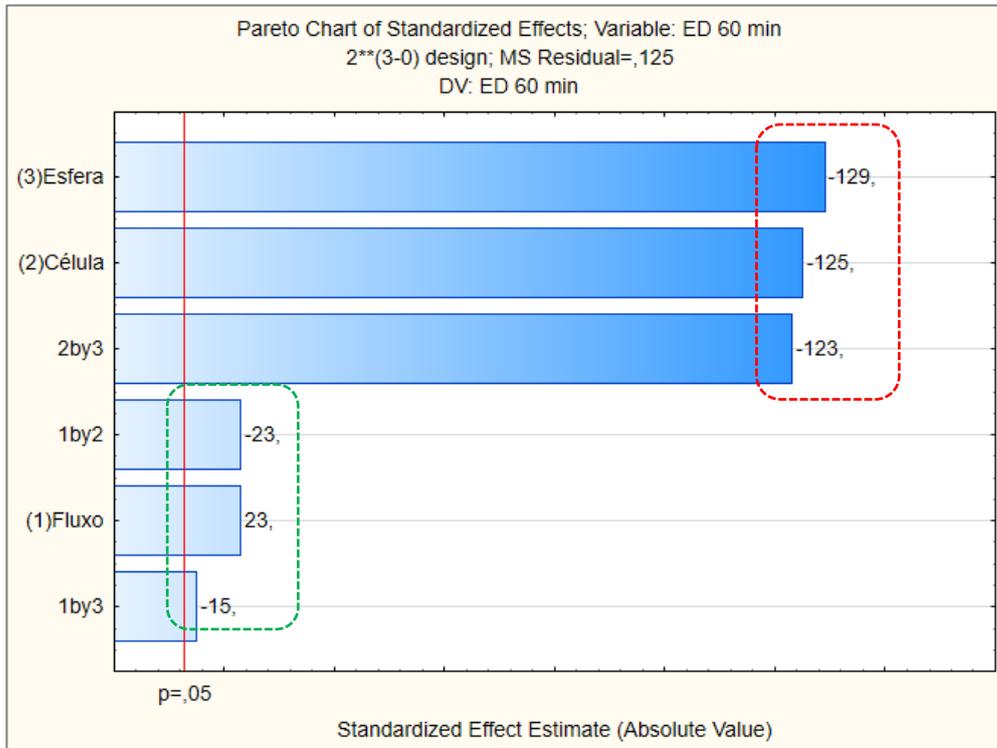
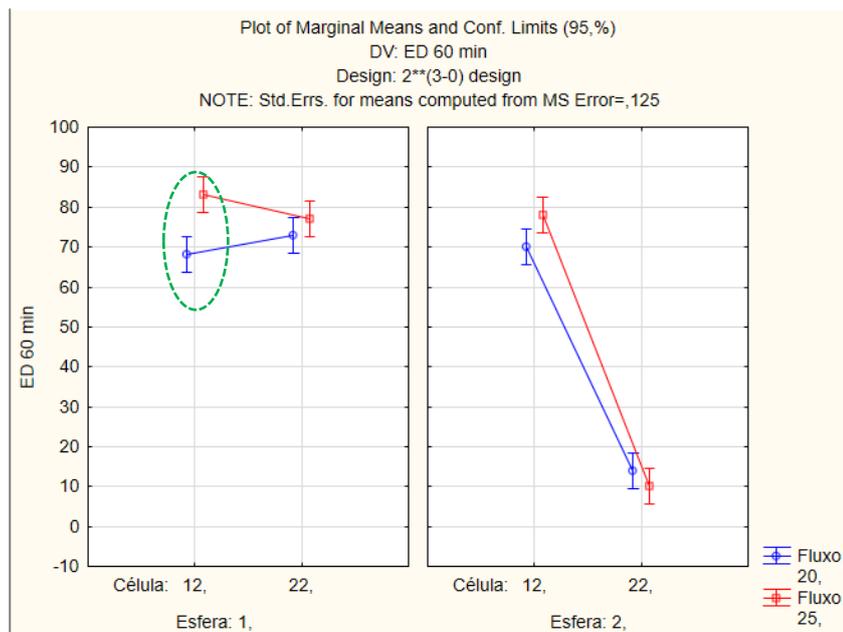


Figura 36 - Gráfico das médias para a resposta ED% 60 minutos



Com base nos resultados apresentados, definiu-se as condições do Ensaio 2 (com eficiência da dissolução de 83%) como satisfatórias para avaliar a dissolução do estradiol no produto Natifa® 1 mg pelo aparato IV; ou seja, tampão fosfato 0,05 mol/L pH 6,8, com fluxo de 25 mL/minuto, célula de 12mm e 1 g de esfera.

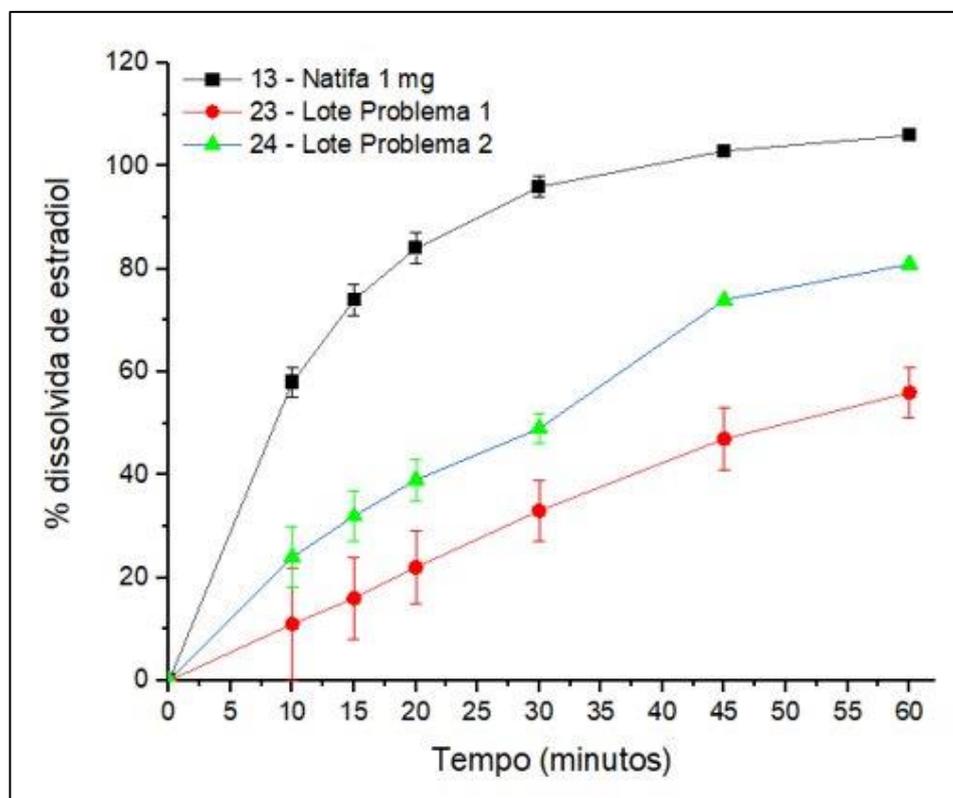
Com essas condições, foram analisados os lotes problema 1 e 2 para avaliar o caráter discriminativo do método.

Os resultados estão apresentados na **Tabela 27** e **Figura 37**.

Tabela 27 – Resultados de estradiol dissolvido em função do tempo nos lotes problema 1 e 2 no aparato IV para avaliação do caráter discriminativo, comparado ao perfil de dissolução do Natifa® com a condição de ensaio 2.

T (min)	Natifa (Ensaio 2)		Lote problema 1		Lote Problema 2	
	% diss	DPR%	% diss	DPR%	% diss	DPR%
0	0	0	0	0	0	0
10	58	3	11	11	24	6
15	74	3	16	8	32	5
20	84	3	22	7	39	4
30	96	2	33	6	49	3
45	103	1	47	6	74	26
60	106	1	56	5	81	25

Figura 37 - Perfis de dissolução de estradiol para avaliação do caráter discriminativo do método no aparato IV.



Portanto, evidenciou-se que o método de dissolução desenvolvido no aparato IV, através de delineamento de experimento (*DoE*), totalizando 10 perfis, é satisfatório para o produto Natifa® pois é capaz de discriminar entre perfis de dissolução distintos, sendo um lote comercial, fabricado sob condições de Boas Práticas de Fabricação (Natifa®) com qualidade, segurança e eficácia, e outros dois lotes problema, produzidos em bancada, com alterações intencionais na formulação e no processo, não comercializados, elaborados para desafiar o método.

4. CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos e apresentados nesse trabalho, apesar das características da formulação de liberação imediata e dos perfis com dissolução muito rápida nos aparatos I e II, foi possível desenvolver um método de dissolução para comprimidos revestidos contendo 1 mg de estradiol (Natifa®) com caráter discriminativo. Além disso, o desenvolvimento do método através do planejamento experimental utilizando *DoE*, reduziu o número de testes necessários para definição das condições de dissolução, diminuindo o tempo para conclusão do

desenvolvimento quando comparado ao número desses, e consequente tempo necessário, para definir as condições através da abordagem convencional, ou seja, por tentativa e erro.

Ainda, o aparato IV demonstrou capacidade discriminativa satisfatória para avaliação dos lotes mesmo para medicamentos de liberação imediata com fármaco de baixa solubilidade.

Portanto, os métodos de dissolução desenvolvidos neste trabalho possuem caráter discriminativo adequados para avaliação da qualidade de comprimidos revestidos contendo 1 mg de estradiol.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUZARUR-ALOUL, R.; GJELLAN, K.; SJOLUND, M.; LOFQVIST, M.; GRAFFNER, C. Critical Dissolution Tests of Oral Systems Based on Statistically Designed Experiments. I. Screening of Critical Fluids and *In vitro*/*In vivo* Modelling of Extended Release Coated Spheres. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, V. 23, p. 749-760, 1997.

AMIDON, G.L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of *in Vitro* Drug Product Dissolution and *in Vivo* Bioavailability. *Pharmaceutical Research*, V. 12, n. 13, p. 413-420, 1995.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria. 3. ed. Campinas, SP. Editora da Unicamp. 2007.

BRASIL. Resolução RDC nº 31, de 11 de agosto de 2010. Dispõe sobre a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 2010.

BRASIL. Nota Técnica nº 003/2013, de 16 de abril de 2013. Ementa: Dispõe sobre a avaliação da solubilidade de fármacos e o desenvolvimento de métodos de dissolução para estudos de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução comparativo, e dá outras providências. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 2013.

BRASIL. Guia nº 14 versão 1: Guia de Dissolução Aplicável a Medicamentos Genéricos, Novos e Similares. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 2018. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3364628/%281%29Proposta+de+Guia+de+Dissolu%C3%A7%C3%A3o.pdf/572ed44f-9f72-4b4c-9dce-f7154b31dfcc>. Acesso em 10 de maio de 2020.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira 6ed. Capítulo geral 5.1.5. Dissolução. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 2019.

BRASIL. Lista de Medicamentos de Referência. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 2020a. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/medicamentos/produtos/medicamentos-de-referencia/lista>. Acesso em 10 de maio de 2020.

BRASIL. Bulário eletrônico. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 2020b. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/bulario-eletronico1>. Acesso em 10 de maio de 2020.

British Pharmacopoeia (BP). BP2020. Ph. Eur. Monograph 0821 Estradiol Hemihydrate. 2020.

Chemicalize website. Disponível em: <https://chemicalize.com/app>. Acesso em 08 de maio de 2020.

EMA European Medicines Agency. Assessment Report EMEA/H/C/002068. 2009. Disponível em https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/ioa-epar-public-assessment-report_en.pdf. Acesso em 13 de agosto de 2019.

EMA European Medicines Agency. ICH guideline M9 on biopharmaceutics classification 4 system based biowaivers. 2020. Disponível em https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-m9-biopharmaceutics-classification-system-based-biowaivers-step-5_en.pdf. Acesso em 10 de maio de 2020.

EMA European Medicines Agency. Evaluation and Recommendation of Pharmacopoeial Texts for Use in ICH Regions on Dissolution Test General Chapter Q4B Annex 7(R2). 2010. Disponível em https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q4b-annex-7-r2-note-evaluation-recommendation-pharmacopoeial-texts-use-ich-regions_en.pdf. Acesso em 08 de maio de 2020.

FDA Food and Drug Administration. Guia para Indústria Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. U.S. Department of Health and Human Services. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 1997. Disponível em <https://www.fda.gov/media/70936/download>. Acesso em 10 de maio de 2020.

FDA Food and Drug Administration. Guia para Indústria Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. U.S. Department of Health and Human Services. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 2017. Disponível em <https://www.fda.gov/media/70963/download>. Acesso em 10 de maio de 2020.

KHAN, A. Development and Validation of a Discriminatory Dissolution Testing Method for Orally Disintegrating Tablets (ODTs) of Domperidone. Dissolution Technologies. 9p. [dx.doi.org/10.14227/DT240217P28](https://doi.org/10.14227/DT240217P28). 2017.

JPMA. Japan Pharmaceutical Manufacturers Association. Information on Japanese Regulatory Affairs: Regulatory Information Task Force. Disponível em: <http://www.jpma.or.jp/english/parj/whole.html>. Acesso em 15 de Agosto de 2019.

LOFTSSON, T. Capítulo 4, seção 4.2. Estradiol Sublingual Tablets. IN: Essential Pharmacokinetics: A Primer for Pharmaceutical Scientists. p.105-118. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801411-0.00004-4>. 2015.

MARQUES, M. R. C.; VIEIRA, F. P.; BARROS, A. C. S. Ensaios de dissolução e comparação de perfis de dissolução. In: VIEIRA, Fernanda Pires; REDIGUIERI, Camila Fracalossi; REDIGUIERI, Carolina Fracalossi. A regulação de medicamentos no Brasil. Porto Alegre: Artmed, 2013. 672 p., cap. 16, p. 237-272.

PITA, N. O. G.; PRATES, E. 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*. Vol 40(3). 7p. 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*. Vol 41(1). p.41-45. 2008.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. *Planejamento de Experimentos & Otimização de Processos*. 3. ed. SP. Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2014.

SHAH, V.P. Dissolution: A Quality Control Test vs. A Bioequivalence Test. *Dissolution Technologies*. 2p. [dx.doi.org/10.14227/DT080401P6](https://doi.org/10.14227/DT080401P6). 2001.

SILVA, D. A.; WEBSTER, G. K.; BOU-CHACRA, N.; LOBENBERG, R. The Significance of Disintegration Testing in Pharmaceutical Development. *Dissolution Technologies*. 9p. [dx.doi.org/10.14227/DT250318P30](https://doi.org/10.14227/DT250318P30). 2018.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). USP42-NF37. General Chapter <711> Dissolution. 2020a.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). USP42-NF37. General Chapter <1092> The Dissolution Procedure: Development and Validation. 2020b.

VÖLGYI, G.; CSICSÁK, D.; TAKÁCS-NOVÁK, K. Right filter selection for phase separation in equilibrium solubility measurement. *Phasci*. doi: 10.1016/j.ejps.2018.06.031. 2018.