

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

Micronização e obtenção de complexos de inclusão de acetazolamida
para o desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas de
administração oral

Katherine Jasmine Curo Melo

Tese para obtenção do título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz

São Paulo

2021

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

Micronização e obtenção de complexos de inclusão de acetazolamida
para o desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas de
administração oral

Katherine Jasmine Curo Melo

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.

Tese para obtenção do título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz

São Paulo

2021

Katherine Jasmine Curo Melo

Micronização e obtenção de complexos de inclusão de acetazolamida
para o desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas de
administração oral

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof. f. Dr. Humberto Gomes Ferraz
orientador/presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2021.

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

M528m Melo, Katherine Jasmine Curo
 Micronização e obtenção de complexos de inclusão
 de acetazolamida para o desenvolvimento de formas
 farmacêuticas sólidas de administração oral /
 Katherine Jasmine Curo Melo. - São Paulo, 2021.
 121 p.

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

1. Farmacotécnica . 2. Tecnologia Farmacêutica .
I. T. II. Ferraz, Humberto Gomes, orientador.

DEDICATÓRIA

À minha família, de forma especial aos meus pais que sempre me estimulam na realização dos meus sonhos. Pelo amor, compreensão e suporte desde que sai do meu país

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa no Laboratório de Desenvolvimento e Inovação Farmacotécnica (DEINFAR).

Ao Prof. Dr. Raimar Löbenberg, da University of Alberta, Canadá, por ter me aceitado como aluna visitante no seu laboratório Drug Development and Innovation Centre (DIC), por todo o aprendizado, confiança, disposição, paciência e ajuda durante minha estadia no Canadá.

À minha família pelo amor, apoio e compreensão apesar da distância...por serem minha principal fonte de energia.

À minhas amigas Lorena Barba e Karla Carpio do Canadá, que foram minha fortaleza e suporte nos momentos mais difíceis. As agradeço por me acompanharem no meu caminho dia a dia apesar da distância.

À pós- doutoranda Michele G. Issa pela amizade, sugestões e discussões durante toda esta fase de crescimentos profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Marcelo Duque pelas sugestões e discussões.

À Prof^a. Dr^a. Nadia Bou Chacra, Natalia, Isabela, Margarete, Vania e Jennifer por sua amizade durante todo o caminho recorrido aqui no Brasil.

À Eremita e aos colegas do DEINFAR, meus sinceros agradecimentos pelo auxílio, compreensão e apoio durante as jornadas de trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, muito obrigada.

Epígrafe

“Sempre se mantenha fiel a si mesmo e nunca deixe o que alguém diz te distrair de seus objetivos”.

Michelle Obama

Resumo

MELO, K. J. **Micronização e obtenção de complexos de inclusão de acetazolamida para o desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas de administração oral.** 2021.121p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2021.

A acetazolamida (ACZ) é um potente inibidor da anidrase carbônica, utilizado no tratamento de epilepsia, edema cardíaco, edema induzido por medicamentos e na aclimação de alpinistas e indivíduos susceptíveis ao mal da montanha. Este fármaco pertence à classe IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) portanto possui baixa solubilidade e baixa permeabilidade. Existem diversas abordagens promissoras para melhorar as condições desfavoráveis da solubilidade de fármacos classe II e IV. Entre estas técnicas temos a micronização, uma das mais conhecidas e utilizadas na indústria farmacêutica, cujo principal objetivo é o aumento da solubilidade e da velocidade de dissolução como decorrência da redução do tamanho de partícula do fármaco. Outra abordagem que visa esta melhora é a formação de complexos binários e ternários a base de ciclodextrinas. Estudos de desenvolvimento de comprimidos orodispersíveis (CODs), forma farmacêutica sólida de rápida desintegração e dissolução vem ganhando muito interesse pelos pesquisadores devido a que permitem um aumento significativo da biodisponibilidade do fármaco e aceitação do paciente. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo a preparação e a caracterização físico-química de micronizados de ACZ para posterior desenvolvimento de comprimido de liberação imediata. Os resultados demonstraram que o processo de micronização aumentou de forma significativa a solubilidade e velocidade de dissolução da ACZ em tampão fosfato pH 6,8. Adicionalmente a produção de comprimidos utilizando estes micronizados mostrou-se viável. A análise estatística determinou que o principal fator em influenciar a liberação do fármaco foi o tamanho de partícula. A formação dos complexos ternários usando metil- β -ciclodextrina e Kollidon® 90F foi viável, sendo que a solubilidade do fármaco aumentou de forma significativa. Durante o desenvolvimento dos CODs se apresentaram diversas dificuldades, no entanto a dureza, tempo de desintegração, teor e perfil de dissolução foram satisfatórias.

Palavras-Chave: acetazolamida, complexação, micronização, comprimidos orodispersíveis.

Abstract

MELO, K. J. **Micronization and obtaining acetazolamide inclusion complexes for the development of solid pharmaceutical forms of oral administration.** 2021.121p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2021.

Acetazolamide (ACZ) is a potent inhibitor of carbonic anhydrase, used in the treatment of epilepsy, cardiac edema, edema induced by medicines, and in the acclimatization of climbers and individuals susceptible to mountain sickness. This drug belongs to class IV of the Biopharmaceutical Classification System (SCB) therefore it has low solubility and low permeability. There are several promising approaches to improve the unfavorable conditions for the solubility of class II and IV drugs. Among these techniques, we have micronization, one of the best known and used in the pharmaceutical industry, whose main objective is to increase the solubility and the speed of dissolution as a result of the reduction in the particle size of the drug. Another approach that aims at this improvement is the formation of binary and ternary complexes based on cyclodextrins. Studies on the development of orodispersible tablets (CODs), a solid pharmaceutical form of rapid disintegration and dissolution, have been gaining a lot of interest by researchers because they allow a significant increase in the bioavailability of the drug and patient acceptance. In this sense, the present work had as objective the preparation and the physicochemical characterization of ACZ micronized for later development of an immediate-release tablet. The results showed that the micronization process significantly increased the solubility and dissolution rate of ACZ in phosphate buffer pH 6.8. Additionally, the production of tablets using these micronized products proved to be viable. The statistical analysis determined that the main factor influencing the release of the drug was the particle size. The formation of ternary complexes using methyl- β -cyclodextrin and Kollidon® 90F was feasible, and the drug's solubility increased significantly. During the development of the CODs, several difficulties were presented, however, the hardness, disintegration time, content, and dissolution profile were satisfactory.

Keywords: acetazolamide, complexation, micronization, orodispersible tablets.

Lista de Figuras

Capítulo 2: Obtenção e caracterização de complexos de inclusão ternários de acetazolamida para produção de comprimidos orodispersíveis.

Figura 1. Mini Spray Dryer B-290.	36
Figura 2. Prensa hidráulica utilizada na obtenção dos CODs.	38
Figura 3. Absorbância máxima da solução de ACZ 15 µg/mL no intervalo de 200-400 nm.	40
Figura 4. Curva analítica da ACZ obtida por espectrofotometria a 266 nm.	41
Figura 5. Gráficos de Pareto para os efeitos das variáveis independentes sobre a solubilidade de ACZ. As barras à direita da linha vermelha representam os efeitos significativos.	46
Figura 6. Micrografia óticas do complexo C3-ACZ.	47
Figura 7. Curva DSC da ACZ-MP e do complexo C3-ACZ a 5 °C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min ⁻¹ .	48
Figura 8. Curvas TG de ACZ-MP e do complexo C3-ACZ a 10 °C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 100 mL min ⁻¹ .	49
Figura 9. Porcentagem (%) de ACZ dissolvida da formulação COD- C3 ACZ (n=3).	53

Capítulo 3: Micronização de acetazolamida: caracterização físico-química e desenvolvimento de comprimidos de liberação imediata.

Figura 1. Estrutura química da acetazolamida.	59
Figura 2. Micronizador Fluid Jet Mill J-20.	62
Figura 3. Espectros CLAE da ACZ. A- Espectro nos comprimentos de onda 200 a 400nm e B- Cromatograma 3D mostrando o pico principal da solução de ACZ 60 µg/mL a 235 nm.	69
Figura 4. Cromatograma da solução 60 µg/mL de ACZ em água	69
Figura 5. Curva analítica da ACZ obtida por CLAE a 235 nm.	70
Figura 6. Gráficos de Pareto para os efeitos das variáveis sobre % de recuperação. As barras à direita da linha vermelha representam os efeitos significativos.	72

Figura 7.	Gráficos de Pareto para os efeitos das variáveis independentes sobre a relação de distribuição de tamanhos das partículas (RT) das amostras de ACZ micronizada. As barras à direita da linha vermelha representam os efeitos significativos	74
Figura 8.	Superfície de resposta para RT em função dos fatores estudados.	75
Figura 9.	Gráfico de otimização da avaliação do RT da ACZ micronizada contendo as seguintes variáveis fluxo de alimentação (g/mL), pressão de micronização (PM) e pressão de alimentação (PA).	76
Figura 10.	Tamanho médio da ACZ-MP e das amostras de ACZ micronizada (n=10).	78
Figura 11.	Micrografia MEV da ACZ MP (aumento:500x).	78
Figura 12.	Micrografia MEV da ACZ M1. A: aumento:1200x e B: 1500X	79
Figura 13.	Micrografia MEV da ACZ M2. A: aumento:1200x e B:micrografia com ImageJ.	80
Figura 14.	Micrografia MEV da ACZ M3. A:aumento:1500x e B: micrografia com ImageJ.	80
Figura 15.	Micrografia MEV da ACZ M4. A:aumento:1800x e B:micrografia com ImageJ.	80
Figura 16.	Micrografia MEV da ACZ M5. A: aumento:1800x e B:micrografia com ImageJ.	81
Figura 17.	Micrografia MEV da ACZ M6. A: aumento:1800x e B:micrografia com ImageJ.	81
Figura 18.	Micrografia MEV da ACZ M7. A: aumento:1800x e B:micrografia com ImageJ.	81
Figura 19.	Micrografia MEV da ACZ M8. A: aumento:1800x e B:micrografia com ImageJ.	82
Figura 20.	Micrografia MEV da ACZ-D. A: aumento:1800x e B:micrografia com ImageJ.	82
Figura 21.	Padrões de difração de raios X (PDRX) da ACZ matéria prima e da ACZ padrão (polimorfo A ou II) achada na literatura. (GRIESSER; BURGER; MEREITER, 1997).	83
Figura 22.	Padrões de difração de raios X (PDRX) da ACZ-MP e das amostras de ACZ micronizada.	84
Figura 23.	Difratograma refinado pelo método de Rietveld para a amostra de ACZ-MP.	85

Figura 24.	Difratograma refinado pelo método de Rietveld para a amostra de ACZ M1.	86
Figura 25.	Difratograma refinado pelo método de Rietveld para a amostra de ACZ M2.	86
Figura 26.	Difratograma refinado pelo método de Rietveld para a amostra de ACZ M3.	86
Figura 27.	Difratograma refinado pelo método de Rietveld para a amostra de ACZ M4.	87
Figura 28.	Difratograma refinado pelo método de Rietveld para a amostra de ACZ M5.	87
Figura 29.	Difratograma refinado pelo método de Rietveld para a amostra de ACZ M6.	87
Figura 30.	Difratograma refinado pelo método de Rietveld para a amostra de ACZ M7.	88
Figura 31.	Difratograma refinado pelo método de Rietveld para a amostra de ACZ M8.	88
Figura 32.	Curvas DSC e DDSC da ACZ-MP a 5 °C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL. min ⁻¹ .	89
Figura 33.	Curvas DSC das amostras de ACZ micronizada a 5 °C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL. min ⁻¹ .	90
Figura 34.	Curvas DSC e DDSC da ACZ M3 a 5 °C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL. min ⁻¹ .	91
Figura 35.	Curvas DSC e DDSC da ACZ M3 a 10 °C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL. min ⁻¹ .	91
Figura 36.	Curvas DSC e DDSC da ACZ M3 a 20 °C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL. min ⁻¹ .	92
Figura 37.	Solubilidade obtida através do método de equilíbrio ACZ matéria-prima (ACZ-MP) e das amostras de ACZ micronizada (n=30).	94
Figura 38.	Porcentagem de ACZ dissolvida de Diamox® e formulações a base de ACZ MP e ACZ- M em meio HCl 0,01 N (n = 3).	99
Figura 39.	Porcentagem de ACZ dissolvida para Diamox® e formulações a base de ACZ MP e ACZ- M em meio tampão fosfato pH 6,8 (n=3).	100
Figura 40.	Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis sobre a ED (%) em meio HCl 0,01 N, os resultados à direita da linha vermelha são considerados significativos.	101

- Figura 41.** Superfícies de resposta para a ED % em função dos fatores estudados. 102
- Figura 42.** Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis sobre a ED (%) solução tampão fosfato pH 6,8, os resultados à direita da linha vermelha são considerados significativos. 103
- Figura 43.** Superfícies de resposta para a ED % em função dos fatores estudados. 104

Apêndice: Dissolução bifásica: Uma estratégia inovadora que pode ser utilizada para a bioisenção de fármacos classe I de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica

- Figura 1.** Curva analítica de MTZ em tampão fosfato pH 6,8. 115
- Figura 2.** Curva analítica de MTZ em n-octanol. 116
- Figura 3.** Perfis de dissolução dos comprimidos de MTZ em meio SIF (linhas sólidas) e tampão fosfato de baixa capacidade tampão (5mM - linhas tracejadas). 118
- Figura 4.** Perfis de dissolução bifásica de formulações de metronidazol nas fases aquosa (linhas tracejadas) e orgânica (linhas contínuas). 119

Lista de Tabelas

Capítulo 2: Obtenção e caracterização de complexos de inclusão ternários de acetazolamida para produção de comprimidos orodispersíveis

Tabela 1. Concentração das amostras obtidas a partir de uma solução padrão de ACZ 500 µg/mL empregadas para determinação da linearidade.	34
Tabela 2. Variáveis empregadas no planejamento fatorial completo (3 ²) e níveis estudados.	35
Tabela 3. Matriz de ensaios do delineamento experimental.	35
Tabela 4. Composição das formulações de comprimidos orodispersíveis (CODs).	38
Tabela 5. Valores de absorvância média, DP e CV% (n=3).	41
Tabela 6. Solubilidade da ACZ (mg/mL) avaliando os tipos de CDs em presença da PVP.	42
Tabela 7. Solubilidade da ACZ (mg/mL) avaliando os tipos de CDs em presença da HPMC.	43
Tabela 8. Solubilidade da ACZ (mg/mL) avaliando os tipos de CDs em presença de Kollidon® 90F.	43
Tabela 9. ANOVA one way dos resultados obtidos para a solubilidade de ACZ.	44
Tabela 10. Médias dos resultados obtidos para a solubilidade de ACZ.	44
Tabela 11. Teste de comparação múltipla de Tukey para média da solubilidade de ACZ.	45
Tabela 12. Resultados da solubilidade de ACZ obtidos a partir dos complexos ternários.	45
Tabela 13. ANOVA para os resultados de solubilidade de ACZ. Os resultados com valor de p< 0,05 são considerados significativos.	46
Tabela 14. Coeficientes codificados de regressão do modelo matemático selecionado no ensaio de solubilidade de ACZ.	47
Tabela 15. Teor de acetazolamida no complexo ternário (n=3).	50
Tabela 16. Composição das formulações de CODs e os resultados de dureza e tempo de desintegração.	50
Tabela 17. Composição de formulação final de COD- C3 ACZ.	51

Tabela 18. Peso médio, diâmetro, espessura, dureza e friabilidade do COD-C3 ACZ (n=10).	51
Tabela 19. Teor de ACZ na formulação COD- C3 ACZ (n=6).	52
Tabela 20. Tempo de desintegração da formulação COD- C3 ACZ (n=3).	52
Tabela 21. Perfis de dissolução da formulação COD- C3 ACZ obtidos em solução tampão fosfato pH 6,8 (n = 3).	53

Capítulo 3. Micronização de acetazolamida: caracterização físico-química e desenvolvimento de comprimidos de liberação imediata.

Tabela 1. Concentração das amostras de ACZ obtidas a partir de uma solução padrão 1 mg/mL empregadas na determinação da linearidade.	62
Tabela 2. Variáveis e níveis usados no planejamento fatorial completo 2^3 .	63
Tabela 3. Matriz de ensaios do delineamento experimental do tipo fatorial completo 2^3 .	64
Tabela 4. Variáveis empregadas no planejamento fatorial fracionado (2^{3-1}) e níveis estudados.	66
Tabela 5. Matriz de ensaios do planejamento fatorial fracionado (2^{3-1}) para granulação.	66
Tabela 6. Composição de formulações de ACZ-F1, ACZ -F2, ACZ-F3 e ACZ-F4.	67
Tabela 7. Áreas obtidas na curva analítica para quantificação da ACZ (n=3).	70
Tabela 8. Áreas obtidas no teste de filtros para as três concentrações de ACZ (n=3).	71
Tabela 9. Análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos para o teste de filtros, os resultados com valor de $p < 0,05$ são considerados significativos.	72
Tabela 10. Valores da relação da distribuição do tamanho (RT) obtidos para amostras de ACZ micronizada.	73
Tabela 11. Análise de variância para os dados de relação da distribuição do tamanho de partículas do fármaco (RT) das amostras de ACZ micronizada.	74
Tabela 12. Teste para significância dos coeficientes codificados de regressão do modelo selecionado no ensaio para avaliação do RT das amostras de ACZ micronizada.	75

Tabela 13. Relação da distribuição do tamanho de partículas (RT) teórico e prático (n=3).	76
Tabela 14. Valores de diâmetro médio, d10%, d50% e d90% da ACZ -D (n=10).	77
Tabela 15. Valores de diâmetro médio, d10%, d50% e d90% da ACZ -MP e das amostras de ACZ micronizada (n=10).	77
Tabela 16. Tamanho médio das amostras de ACZ micronizada determinadas a partir do programa ImageJ.	79
Tabela 17. Índices de qualidade do refinamento de Rietveld para ACZ MP e amostras da ACZ micronizada.	85
Tabela 18. Resultados de densidade verdadeira obtidos em picnômetro de gás Hélio (n=3).	92
Tabela 19. Solubilidade de saturação da ACZ-MP e das amostras de ACZ micronizada (n=3).	93
Tabela 20. ANOVA de teste de solubilidade para as amostras de ACZ micronizadas e ACZ matéria-prima.	94
Tabela 21. Teste de comparação múltipla de Tukey para média.	95
Tabela 22. Peso médio (n=20). Diâmetro, espessura, dureza e friabilidade das formulações de ACZ (n=10).	96
Tabela 23. ANOVA para peso médio, diâmetro, espessura e dureza das formulações de ACZ.	97
Tabela 24. Teste de comparação múltipla de Tukey para média.	98
Tabela 25. Teor de ACZ nos comprimidos (n=6).	98
Tabela 26. Perfis de dissolução dos comprimidos (Diamox® e formulações a base de ACZ micronizada) obtidos em meio HCl 0,01 N (n = 3).	99
Tabela 27. Perfis de dissolução dos comprimidos (Diamox® e formulações a base de ACZ micronizada) obtidos em meio tampão fosfato pH 6,8 (n = 3).	100
Tabela 28. Valores de eficiência de dissolução (ED%), das formulações de ACZ (n=3).	101
Tabela 29. Análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos de ED (%) em meio HCl 0,01 N, os resultados em vermelho são considerados significativos (p< 0,05).	101
Tabela 30. Análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos de ED (%) em meio tampão fosfato pH 6,8, os resultados em vermelho são considerados significativos (p< 0,05).	103

Apêndice: Dissolução bifásica: Uma estratégia inovadora que pode ser utilizada para a bioisenção de fármacos classe I de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica.

Tabela 1. Concentração das amostras obtidas a partir de uma solução padrão de MTZ 1,00 mg/mL empregadas para determinação da linearidade.	111
Tabela 2. Concentração das amostras de MTZ obtidas a partir de uma solução padrão do fármaco a 1,00 mg/mL e empregadas para determinação da linearidade.	112
Tabela 3. Áreas obtidas na curva analítica para quantificação da MTZ em tampão fosfato pH 6,8 (n=3).	114
Tabela 4. Absorbâncias obtidas na curva analítica para quantificação da MTZ em n-octanol (n=3).	115
Tabela 5. Peso médio dos comprimidos comerciais de MTZ (n=6).	116
Tabela 6. Teor de MTZ nos comprimidos comerciais (n=6).	117
Tabela 7. Tempo de desintegração dos comprimidos comerciais (n=3).	117

Sumário

Capítulo 1	21
Caracterização de comprimidos orodispersíveis (CODs)	21
1. Introdução.....	22
2. Métodos de fabricação dos comprimidos orodispersíveis	23
2.1. Liofilização.....	23
2.2. Moldagem por compressão e calor	24
2.3. Compressão	24
3. Ensaio de caracterização de comprimidos orodispersíveis	25
3.1. Dureza e friabilidade	256
3.2. Tamanho e peso dos comprimidos.....	26
3.3. Teor do fármaco	26
3.4. Tempo de desintegração.....	26
3.5. Tempo de molhabilidade	26
3.6. Estudos de dissolução	27
3.7. Estudos de estabilidade	27
4. Conclusão.....	27
5. Referências bibliográficas	29
Capítulo 2	31
Obtenção e caracterização de complexos de inclusão ternários de acetazolamida para produção de comprimidos orodispersíveis	31
1. Introdução.....	32
2. Material e métodos	33
2.1. Material.....	33
2.2. Métodos	33
2.2.1. Desenvolvimento de metodologia analítica por espectrofotometria UV-Visível (UV-Vis) para quantificação de acetazolamida	33
2.2.2. Preparação dos complexos ternários.....	34
2.2.3. Caracterização dos complexos ternários	35
2.2.4. Produção dos comprimidos orodispersíveis (CODs).....	37
2.2.5. Caracterização dos comprimidos orodispersíveis (CODs) de ACZ	399
2.3. Resultados e discussão.....	40
2.3.1. Desenvolvimento de metodologia analítica por espectrofotometria UV-Vis para a quantificação de ACZ.....	40
2.3.2. Preparação dos complexos ternários.....	41

2.3.3.	Caracterização dos complexos	47
2.3.4.	Produção de comprimidos orodispersíveis (CODs).....	50
2.3.5.	Caracterização dos comprimidos orodispersíveis (CODs)	51
3.	Conclusão.....	54
5.	Referências bibliográficas	55
Capítulo 3	58
Micronização de acetazolamida: caracterização físico-química e desenvolvimento de comprimidos de liberação imediata.	58
1.	INTRODUÇÃO.....	59
2.	MATERIAL E MÉTODOS	60
2.1.	Material.....	60
2.1.1.	Fármaco	60
2.1.2.	Reagentes	60
2.2.	Métodos	61
2.2.1.	Desenvolvimento de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	61
2.2.2.	Teste de filtros	62
2.2.3.	Micronização da ACZ	62
2.3.4.	Caracterização de acetazolamida matéria prima e ACZ micronizada	64
2.3.5.	Produção de comprimidos de ACZ micronizada	65
2.3.6.	Caracterização dos comprimidos de ACZ.....	67
3.	Resultados e discussão	68
3.1.	Desenvolvimento de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	68
3.1.1.	Determinação do comprimento de onda para ACZ	68
3.1.2.	Linearidade	69
3.2.	Teste de filtros.....	70
3.3.	Micronização	72
3.3.1.	Verificação do modelo matemático	76
3.4.	Caracterização da ACZ MP e das amostras de ACZ micronizada.....	77
3.4.1.	Tamanho de partículas	77
3.4.2.	Análise morfológica e tamanho do cristal.....	78
3.4.3.	Difração de raios X (DRX).....	82
3.4.4.	Calorimetria exploratória diferencial	88
3.4.5.	Densidade verdadeira	92
3.4.6.	Determinação da solubilidade de saturação.....	93

3.5. Produção de comprimidos de ACZ micronizada	96
3.5.1. Ensaio físico	96
3.5.2. Teor	98
3.5.3. Perfil de dissolução	98
3. Conclusão.....	104
4. Referências bibliográficas	105
Apêndice	108
Dissolução bifásica: Uma estratégia inovadora que pode ser utilizada para a bioensação de fármacos classe I de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica.....	108
1. Introdução.....	109
2. Material e métodos	110
2.1. Material.....	110
2.2. Métodos de quantificação de MTZ	110
2.2.1. Metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	110
2.2.2. Metodologia analítica por espectrofotometria UV-Visível (UV-Vis) para quantificação de MTZ em n-octanol.....	111
2.2.3. Caracterização física dos comprimidos comerciais de MTZ.....	112
3. Resultados e discussão	114
3.1. Desenvolvimento de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	114
3.2. Metodologia analítica por espectrofotometria UV-Visível (UV-Vis) para quantificação de MTZ.....	115
3.3. Caracterização física dos comprimidos comerciais de MTZ	116
3.3.1. Peso médio	116
3.3.2. Teor de MTZ nos comprimidos	117
3.3.3. Tempo de desintegração	117
3.3.4. Perfil de dissolução.....	117
4. Conclusão.....	119
5. Referências bibliográficas	120

Capítulo 1

Caracterização de comprimidos orodispersíveis (CODs)

1. Introdução

Diversas formas farmacêuticas (xaropes, suspensões, soluções e outros) têm sido propostas para melhorar a aceitabilidade e adesão dos pacientes ao longo do tempo. No entanto, atualmente o mercado possui a maior parte dos produtos em forma de comprimidos e cápsulas, devido a que são facilmente transportados, apresentam dose precisa e tem a capacidade de serem produzidos em grandes escalas pelas diversas indústrias farmacêuticas.

Apesar destas vantagens, estas formas farmacêuticas sólidas podem apresentar diversos problemas durante sua administração. Calculasse que cerca de 20% da população apresenta problemas fisiológicos ou psicológicos que dariam como resultado dificuldade na capacidade de engolir estes produtos. Crianças, idosos e pacientes psiquiátricos são algumas das pessoas quem nem sempre conseguem engolir um comprimido inteiro e para os quais seria interessante a utilização de uma forma farmacêutica inovadora que solucione este problema. Outra desvantagem a ser considerada é a necessidade de água durante a administração, o qual dificultaria o consumo para aqueles pacientes com reduzida ingestão de líquidos ou viajantes (CILURZO et al., 2018) (PATEL; PRAJAPATI; RAVAL, 2010) (SEAGER, 1998).

Os comprimidos orodispersíveis (CODs) são formas farmacêuticas que tem ganhado muito interesse nos últimos anos devido que possuem rápida desintegração e dissolução (15 segundos a 3 minutos) na cavidade bucal na presença da saliva. Sua maior vantagem quando comparado com as outras formas farmacêuticas sólidas convencionais é a não necessidade de beber água nem mastigar durante sua administração, o qual evita o risco de asfixia e soluciona o problema em pacientes com dificuldade de deglutição, além de conseguir melhoras na adesão do paciente ao tratamento (DEY; MAITI, 2010).

Dentre os outros benefícios dos CODs temos a precisão da dose e o fácil transporte quando comparado com as formas farmacêuticas líquidas, início rápido da ação e um incremento na biodisponibilidade, este último pode ser explicado devido que após serem deglutidos os CODs são destinados ao efeito sistêmico, sendo que parte da absorção pode ocorrer na boca, faringe e esôfago (absorção pre-gástrica). Está demonstrado que esta absorção evita o efeito de primeira passagem o qual é sumamente benéfico para aqueles fármacos que são altamente metabolizados a

nível hepático (IBRAHIM; EL-SETOUHY, 2010) (BANDARI et al., 2008) (DEY; MAITI, 2010). Entre as outras vantagens apresentadas pelos CODs são o sabor agradável, forma de produção simples e convencional e que dependendo dos excipientes pode ser de baixo custo (KAKAR, 2018).

Outros dos nomes que são atribuídos a estas formas farmacêuticas são: comprimidos de desintegração oral, comprimidos de dissolução bucal e comprimidos de dissolução rápida.

Dentro da composição dos CODs podemos encontrar excipientes como os superdesintegrante, que ajudam a desintegrar os comprimidos de forma rápida na cavidade bucal e na presença de saliva. Compostos à base de açúcar que são muito utilizados como diluentes (manitol, dextrose, lactose, entre outros) os quais permite a formação da estrutura porosa e brindam a adequada palatabilidade junto com alguns agentes aromatizantes na formulação (BEHNKE et al., 2003) (OZEKI et al., 2003).

No entanto os CODs podem apresentar certas limitações como: baixa resistência mecânica, sabor desagradável dependendo das características do fármaco (a maioria das moléculas dos fármaco possuem sabor desagradável) e a dificuldade de formulação para aqueles fármacos de altas doses (WHO-DEVELOPMENT, 2012). O objetivo do presente trabalho foi dar a conhecer a importância do desenvolvimento de CODs, os métodos de fabricação e a necessidade de padronização das metodologias de caracterização dos comprimidos orodispersíveis (CODs).

2. Métodos de fabricação dos comprimidos orodispersíveis

Dentre das principais técnicas de preparação de comprimidos orodispersíveis temos:

2.1. Liofilização

Esta metodologia permite obter comprimidos de baixa densidade e de alta porosidade, características que permitem que a água presente na saliva ingresse de forma rápida nos comprimidos gerando rápida liberação do fármaco a consequência da quase imediata dissolução dos excipientes solúveis da formulação (DOUROUMIS, 2011).

A mais conhecida das tecnologias de liofilização para CODs é a chamada de Zydis®, que consiste em três etapas: a preparação da suspensão aquosa do fármaco e enchimento da formulação nos blisters; a liofilização da formulação nos blister e finalmente a selagem dos blisters para garantir a estabilidade e a proteção de produto (SHUKLA et al., 2009a) (SEAGER, 1998).

Entres as vantagens desta tecnologia podemos ressaltar que dependendo das condições do processo pode se alcançar certas características físico químicas desejadas nos fármacos tais como a amorfização e redução do tamanho do cristal (SLOW; WAN SIA HENG; CHAN, 2016) (SHUKLA et al., 2009b). No entanto, algumas das principais desvantagens seriam a baixa resistência mecânica, uma elevada friabilidade e uma alta capacidade de captar umidade sendo necessário a utilização de embalagens especiais que podem gerar elevados custos (DAVE et al., 2017).

2.2. Moldagem por compressão e calor

Na moldagem por compressão, a mistura do fármaco e excipientes é umedecida por um solvente hidroalcolico, com posterior compressão em placas para formar uma massa úmida a qual é seca ao ar. A força de compressão é menor a aquela usada na compressão convencional portanto os CODs são menos compactos.

Na técnica de moldagem por calor uma massa fundida contendo o fármaco disperso ou dissolvido e os excipientes é colocada em blisters. Posteriormente esta dispersão é solidificada à temperatura ambiente (KAUR et al., 2011).

As duas metodologias têm como resultado comprimidos moldados altamente porosos, com elevada capacidade de desintegração e dissolução (BADGUJAR; MUNDADA, 2011). No entanto algumas desvantagens desta tecnologia são a baixa resistência mecânica, a dificuldade de atingir o tempo de desintegração de forma rápida quando comparado com os CODs liofilizados e os elevados custos de produção (BADGUJAR; MUNDADA, 2011) (CILURZO et al., 2018).

2.3. Compressão direta

A compressão é a metodologia mais simples de produzir CODs de baixa resistência mecânica. Para obter as características necessárias desta forma farmacêutica utilizando esta metodologia se faz imprescindível a presença de certos excipientes tais como: superdesintegrantes, agentes de sublimação ou diluentes de

tamanho de partícula grande que visem a rápida e completa desintegração (AL-KHATTAWI; MOHAMMED, 2013). As tecnologias de compressão mais conhecidas são Durasolv® e Orasolv®, sendo que a primeira produz comprimidos mais frágeis quando comparados com a segunda tecnologia, os quais muitas vezes precisam de embalagens especiais que elevam os custos (KAUR et al., 2011).

3. Ensaio de caracterização de comprimidos orodispersíveis

O principal diferencial dos CODs quando comparado com as outras formas farmacêuticas sólidas convencionais são a capacidade de desintegração e liberação do fármaco de forma rápida sem necessidade da ingestão de água ou de mastigar (FDA,2008). A continuação, serão apresentadas as principais técnicas de caracterização destas formas farmacêuticas, as quais ainda não estão totalmente estabelecidas pelas entidades regulatórias, o qual demonstra a necessidade da padronização e conhecimento dos valores permitidos.

3.1. Dureza e friabilidade

A dureza e a friabilidade são características que estão relacionadas com a força de compactação com a qual os comprimidos são produzidos. Os CODs devem apresentar dureza menor que os comprimidos convencionais devido a necessidade de rápida desintegração. Os valores a serem considerados como adequados são os mesmos estabelecidos para os comprimidos não revestidos, de 3-5 kg/cm² (aproximadamente de 29,5 - 58,8 N/cm²). No entanto na literatura podemos encontrar valores de dureza para CODs que vão desde 20 até 80 N/cm² (DEY; MAITI, 2010).

A friabilidade é um ensaio que tenta simular algumas condições desfavoráveis no momento de transporte, a abrasão na embalagem ou a manipulação do paciente. Este ensaio gera perda de peso dos comprimidos devido a um atrito no equipamento friabilômetro (SINKA et al., 2004). Após este procedimento o pó aderido na superfície, resultado do desgaste pelas rotações do equipamento é eliminado do comprimido avaliando-se a porcentagem de perda de massa. O valor considerado como aceitável para friabilidade dos CODs é um valor menor a 1,5% de forma similar os comprimidos não revestidos (BRASIL,2019).

3.2. Tamanho e peso dos comprimidos

O tamanho e o peso dos CODs não estão inclusos na definição desta forma farmacêutica, no entanto estas características devem ser consideradas sobre o efeito que os comprimidos vão ter na segurança e adesão do paciente. Recomenda-se que o peso não exceda dos 500 mg. No caso em que esta forma farmacêutica fosse um candidato para o desenvolvimento de um produto cujo fármaco apresenta dose alta, uma justificativa deve ser apresentada e o produto deve ter bom desempenho, ser eficaz e aceito pelos pacientes (FDA, 2008).

3.3. Teor do fármaco

A determinação de conteúdo de fármaco nos comprimidos é baseada em ensaios convencionais para cada fármaco e seus valores estão estabelecidos nas suas monografias dentro da Farmacopeia Americana (USP, 2019)

3.4. Tempo de desintegração

Os CODs são formas farmacêuticas sólidas que se desintegram de forma rápida na cavidade bucal. O tempo de desintegração *in vitro* desejado deve ser de aproximadamente de 3 minutos ou menos de acordo com a Farmacopeia Europeia. A Food and Drug Administration (FDA) indica que este tempo seja menor o igual a 30 segundos quando baseado no método de teste de desintegração da Farmacopeia Americana (USP, 2019) (BANDARI et al., 2008). No entanto, a principal recomendação no momento do desenvolvimento destes comprimidos é que esta cumpra com as características que o definem: “desintegração rápida na saliva sem necessidade de mastigar ou de ingerir líquidos” (FDA, 2008).

3.5. Tempo de molhabilidade

O tempo de molhabilidade nos proporciona uma inferência da estrutura interna dos comprimidos e da hidrofiliabilidade dos excipientes. Este ensaio tenta mimetizar a forma em como a saliva atua sobre os CODs, conseguindo inferir o tempo de desintegração (quanto mais curto o tempo de molhabilidade mais rápido será o umedecimento e posterior desintegração) (BANDARI et al., 2008).

O teste consiste em colocar um papel de filtro de 10 cm de diâmetro em uma placa de petri de também 10 cm de diâmetro para posteriormente incorporar 10 mL de uma solução aquosa com corante (eosina, corante azul de metileno, entre outros).

Após estes procedimentos um COD é cuidadosamente colocado na superfície do papel, sendo que o tempo de molhabilidade será aquele necessário para que o corante alcance a superfície superior do comprimido (GOHEL et al., 2004).

3.6. Estudos de dissolução

O teste de dissolução é um ensaio importante na caracterização de toda forma farmacêutica sólida pois fornece inferência de como o fármaco vai ser liberado no tempo. A metodologia mais utilizada para formas farmacêuticas sólidas convencionais e CODs é realizada utilizando aparato 2 (pá), com revoluções de entre 50 a 100 rpm, com um volume de meio de 900 mL e a $37 \pm 0,5$ °C. O aparato 1 de dissolução (do tipo cesta) também pode ser utilizado sendo que os cuidados devem ser maiores devido a que em alguns casos fragmentos dos CODs podem ficar presos na superfície interna do cesto impossibilitando a completa dissolução (NARAZAKI et al., 2004) (SWAMY et al., 2009).

3.7. Estudos de estabilidade

Este estudo vai fornecer evidências sobre a qualidade do fármaco na forma farmacêutica ao longo do tempo sobre a influência de fatores ambientais como temperatura, umidade, luz e as condições de armazenamento. A International Council for Harmonisation (ICH) recomenda estudo de estabilidade a longo prazo a 25 ± 2 °C / $60 \pm 5\%$ de umidade relativa (UR) por 12 meses e estabilidade acelerada a 40 ± 2 °C / $75 \pm 5\%$ de umidade relativa (UR) por 6 meses (JAMAKANDI et al., 2016).

4. Conclusão

Os CODs apresentam muitas vantagens sobre as formas farmacêuticas sólidas convencionais melhorando desde as condições de administração até a adesão do paciente. No entanto quando comparado a sua presença no mercado sentimos a ausência deste tipo de produtos, o que significa um grande desafio para as pessoas entorno da pesquisa (que possuem a responsabilidade de disseminar conhecimentos de estratégias inovadoras) e das empresas que poderiam desenvolver e comercializar estes produtos.

Assim também devemos ressaltar a importância desta forma farmacêutica devido a que poderia resolver os problemas de administração de alguns fármacos para aqueles pacientes que possuem certas condições fisiológicas e psicológicas que

os impedem de consumir os produtos convencionais. Além de todo o mencionado os CODs solucionam o problema de falta de água em algumas ocasiões por motivos de viagens ou estar simplesmente encontrar se fora de casa o qual acrescenta ainda mais sua importância e presença no mercado.

Desta forma, espera-se que no futuro próximo possamos encontrar mais destes produtos sendo comercializados e que tenham a mesma importância que as formas farmacêuticas tradicionais, assim como poder contar com uma padronização das metodologias de caracterização destas formas farmacêuticas.

5. Referências bibliográficas

AL-KHATTAWI, Ali; MOHAMMED, Afzal R. Compressed orally disintegrating tablets: Excipients evolution and formulation strategies. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v.10, n. 5, p. 1–13, 2013.

BADGUJAR, Bhatu P.; MUNDADA, Atish S. The technologies used for developing orally disintegrating tablets: a review. **Acta pharmaceutica**, v. 61, n. 2, p. 117–139, 2011.

BANDARI, Suresh; MITTAPALLI, Rajendar Kumar; GANNU, Ramesh; RAO, Yamsani Madhusudan. Orodispersible tablets: An overview. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v. 2, n. 1, 2008.

BEHNKE, Kirsten; SØGAARD, Jesper; MARTIN, Stephen; BÄUML, Josef; RAVINDRAN, Arun V.; ÅGREN, Hans; VESTER-BLOKLAND, Estelle D. Mirtazapine orally disintegrating tablet versus sertraline: A prospective onset of action study. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 23, n. 4, p. 358–364, 2003.

BRASIL, ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. Guia para validação de métodos analíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 24 de julho de 2017.

BRASIL, ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, volume 1. 6ª Ed. Brasília, 2019.

BRASIL, ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, volume 2. 6ª Ed. Brasília, 2019.

CILURZO, Francesco; MUSAZZI, Umberto M.; FRANZÉ, Silvia; SELMIN, Francesca; MINGHETTI, Paola. Orodispersible dosage forms: biopharmaceutical improvements and regulatory requirements. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 2, p. 251–259, 2018.

DAVE, Vivek; YADAV, Renu Bala; AHUJA, Richa; YADAV, Sachdev. Formulation design and optimization of novel fast dissolving tablet of chlorpheniramine maleate by using lyophilization techniques. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University**, v. 55, n. 1, p. 31–39, 2017.

DOUROUMIS, Dennis. Orally disintegrating dosage forms and taste-masking technologies; 2010. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 8, n.51, p. 665–675, 2011.

Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (FDA/CDER). Guidance for Industry Orally Disintegrating Tablets, U.S. Department of Health and Human Services, p. 1–3, 2008.

GOHEL, Mukesh; PATEL, Madhabhai; AMIN, Avani; AGRAWAL, Ruchi; DAVE, Rikita; BARIYA, Nehal. Formulation design and optimization of mouth dissolve tablets of nimesulide using vacuum drying technique. **AAPS PharmSciTech**, v. 5, n. 3, p. 10–15, 2004.

IBRAHIM, Howida Kamal; EL-SETOUHY, Doaa A. Valsartan orodispersible tablets: Formulation, in vitro/in vivo characterization. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 1, p. 189–196, 2010.

JAMAKANDI, VG; KALSANNAVAR, ChetanPrakash; HIREMATH, SP; DASANAKOPPA, FS;

KERUR, SS. Formulation, characterization, and evaluation of orodispersible tablet of a model antidepressant drug. **Indian Journal of Health Sciences**, v. 9, n. 3, p. 264, 2016.

KAKAR, Satinder. Orodispersible tablets: an overview. **MOJ Proteomics & Bioinformatics**, v. 7, n. 3, 2018.

KAUR, Tejvir; GILL, Bhawandeep; KUMAR, Sandeep; GUPTA, G. D. Mouth Dissolving Tablets: A Novel Approach To Drug Delivery. **International Journal of Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2011.

NARAZAKI, Ryuichi; HARADA, Tsutomu; TAKAMI, Norishige; KATO, Yoshiteru; OHWAKI, Takayuki. A new method for disintegration studies of rapid disintegrating tablet. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 6, p. 704–707, 2004.

OZEKI, Tetsuya; YASUZAWA, Yuriko; KATSUYAMA, Hideyo; TAKASHIMA, Yuuki; KASAI, Takahide; EGUCHI, Takahiro; KAKIUCHI, Hisaya; YUASA, Hiroshi; OKADA, Hiroaki. Design of rapidly disintegrating oral tablets using acid-treated yeast cell wall: A technical note. **AAPS PharmSciTech**, v. 4, n. 4, p. 2–5, 2003.

PATEL, Alpesh R.; PRAJAPATI, Dharmendra S.; RAVAL, Jignyasha A. Fast dissolving films (FDFs) as a newer venture in fast dissolving dosage forms. **International Journal of Drug Development and Research**, v. 2, n.2, p. 322–246, 2010.

SEAGER, H. Drug-delivery products and the Zydys fast-dissolving dosage form. **JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY**, v. 50, n.4, p. 375–382, 1998.

SHUKLA, Dali; CHAKRABORTY, Subhashis; SINGH, Sanjay; MISHRA, Brahmeshwar. Mouth dissolving tablets I: An overview of formulation technology. **Scientia Pharmaceutica**, v. 77, p. 309–326, 2009.

SINKA, I. C.; BURCH, S. F.; TWEED, J. H.; CUNNINGHAM, J. C. Measurement of density variations in tablets using X-ray computed tomography. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 271, n. 1–2, p. 215–224, 2004.

SLOW, Carin Ru Shan; WAN SIA HENG, Paul; CHAN, Lai Wah. Application of freeze-drying in the development of oral drug delivery systems. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 13, n. 11, p. 1595–1608, 2016.

SWAMY, P. V.; DIVATE, S. P.; SHIRSAND, S. B.; RAJENDRA, P. Preparation and evaluation of orodispersible tablets of pheniramine maleate by effervescent method. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, n. 2, p. 151–154, 2009.

UNITED States Pharmacopeia. 41 ed. rev. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2018. 8854 p.

WHO-DEVELOPMENT. 0014-Annex 5: Development of paediatric medicines: points to consider in formulation. **Forty-sixth report of the WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations**, p. 235, 2012.

Capítulo 2

Obtenção e caracterização de complexos de inclusão ternários de acetazolamida para produção de comprimidos orodispersíveis.

1. Introdução

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos compostos por 6 a 8 unidades de glicose (α -CD, β -CD e γ -CD, respectivamente) unidas por ligações glicosídicas α -1,4. Estas moléculas são obtidas a partir da degradação do amido por ação da enzima ciclodextrina- α -glicosiltransferase em processos biotecnológicos (SZENTE; SZEMÁN; SOHAJDA, 2016). Estes compostos apresentam uma superfície externa hidrofílica e uma cavidade central lipofílica que permite que diversos tipos de moléculas orgânicas consigam ser encapsuladas em suas soluções aquosas.

A formação de complexos de inclusão utilizando ciclodextrinas (CDs) é uma estratégia muito utilizada para aumento da solubilidade e dissolução de fármacos pouco solúveis em água permitindo uma maior porcentagem de liberação destes nos fluidos fisiológicos. Por conta dessas mudanças nas características físico-químicas dos fármacos podemos inferir que estes complexos permitem uma melhora na biodisponibilidade e a estabilidade química das moléculas encapsuladas (ALOISIO; DE OLIVEIRA; LONGHI, 2014) (BREWSTER et al., 2008)(MISHUR et al., 2011).

Existem diversos tipos de complexos de inclusão na literatura entres estes podemos citar os complexos binários, ternários e quaternários. Os complexos ternários possuem na sua composição o fármaco, a ciclodextrina, e um polímero hidrossolúvel ou tensoativo. A presença deste terceiro componente produz um aumento significativo da solubilidade e dissolução do fármaco tendo como consequência a redução da quantidade de ciclodextrina utilizada quando comparada a complexos binários, assim como a redução de efeitos toxicológicos e a diminuição de custos (SOUZA; FERRAZ-FREITAS; OLIVEIRA, 2016) (YANG et al., 2011).

Para uma correta formação dos complexos é imprescindível a realização de um estudo adequado, o qual forneça as proporções corretas e mais promissoras de fármaco e ciclodextrina (CD) a serem utilizados. O ensaio de delineamento experimental fatorial completo é uma metodologia estatística que permite conseguir de forma rápida e eficiente estes parâmetros assim como diminuir a quantidade de ensaios, otimizando os processos de obtenção dos complexos.

Os comprimidos orodispersíveis (CODs) surgiram como resposta à constante necessidade de desenvolvimento de formas farmacêuticas que sejam facilmente

toleráveis pelos diversos tipos de pacientes, desde crianças até idosos. Os CODs são formas farmacêuticas sólidas que possuem rápida desintegração oral, fácil consumo e aceitação do paciente além de uma elevada capacidade de aumentar a biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água através do aumento da velocidade de dissolução (AHMED; ABOUL-EINIEN, 2007) (SHOUKRI; AHMED; SHAMMA, 2009) .

O objetivo do presente trabalho foi obter complexos ternários de ACZ visando aumentar a solubilidade do fármaco para posterior desenvolvimento de comprimidos orodispersíveis (CODs).

2. Material e métodos

2.1. Material

Acetazolamida (ACZ), ativo farmacêutico, origem NAKODA Chemicals (Andhra Pradesh, Índia). A β CD (beta –ciclodextrina) e metil- β -ciclodextrina foram adquiridas da Wacker Chemical Corporation (Munique, Alemanha) e a HP β CD (2-hidroxypropil-beta–ciclodextrina) foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich (Missouri, EUA). Os polímeros polivinilpirrolidona (PVP) (massa molar de 30.000 g·mol⁻¹), Kollidon® 90F (polivinilpirrolidona) (massa molar de 90.000 g·mol⁻¹) e Kollidon® CL (crospovidona) foram adquiridos da empresa BASF (Ludwigshafen, Alemanha). Hidropropilmetilcelulosa (HPMC) foi adquirida de Dow Chemical Company (Michigan, EUA). Ac-Di-sol® (croscarmelosa sódica), Avicel® PH 102 e Avicel® PH 200 (celulose microcristalina) foram adquiridos da empresa DuPont Pharma (Barueri - Brasil).

2.2. Métodos

2.2.1. Desenvolvimento de metodologia analítica por espectrofotometria UV-Visível (UV-Vis) para quantificação de acetazolamida

2.2.1.1. Espectro UV-Visível

O espectro de absorção da acetazolamida foi obtido na região de 200-400 nm em espectrofotômetro Evolution 201-Thermo Scientific, utilizando cubeta de quartzo de 10 mm de comprimento e solução tampão fosfato pH 6,8 como branco e diluente.

2.2.1.2. Preparação da solução padrão de acetazolamida

Solução padrão 500 µg/mL foi preparada a partir da pesagem de 12,5 mg de acetazolamida (padrão secundário), a qual foi transferida para balão volumétrico de

25 mL, adicionando-se aproximadamente 10 mL de solução tampão fosfato pH 6,8 e 500 µL de NaOH 5N, deixando em agitação em ultrassom por 10 minutos até a completa solubilização do fármaco, em seguida o volume foi completado com o mesmo diluente.

2.2.1.3. Linearidade

A partir da solução padrão de ACZ foram transferidas alíquotas para balões volumétricos de 5 mL que posteriormente foram completados com solução tampão fosfato pH 6,8 conforme a Tabela 1, com a finalidade de obter soluções com concentrações definidas do fármaco. A curva analítica foi preparada em triplicata em cinco níveis de concentrações diferentes. As absorbâncias médias foram plotadas no eixo das ordenadas e as concentrações (µg/mL) no eixo das abscissas.

Tabela 1- Concentração das amostras obtidas a partir de uma solução padrão de ACZ 500 µg/mL empregadas para determinação da linearidade.

Amostra	Alíquota da SP (µL)	Volume final (mL)	Concentração final (µg/mL)
1	50,0	5,0	5,0
2	75,0	5,0	7,5
3	100,0	5,0	10,0
4	150,0	5,0	15,0
5	200,0	5,0	20,0

SP: Solução padrão

2.2.2. Preparação dos complexos ternários

Os complexos ternários foram preparados nas proporções de ACZ: ciclodextrina de 1:1 e 1:2 utilizando como meio dispersante solução tampão fosfato pH 6,8 com as concentrações dos polímeros escolhido para cada ensaio. As ciclodextrinas utilizadas foram a beta –ciclodextrina (β-CD), 2-hidroxiopropil-β-CD (HP-β-CD) e metil-β–ciclodextrina (M- β-CD) e os polímeros avaliados foram polivinilpirrolidona (PVP), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e Kollidon® 90F. As misturas destes três componentes foram agitadas por 24 horas para alcançar o equilíbrio e avaliar a melhor condição de solubilidade para os posteriores ensaios.

2.2.2.1. Obtenção de complexos ternários por delineamento experimental tipo fatorial completo 3²

A partir dos resultados obtidos na seção 2.2.2. foram selecionados a ciclodextrina e o polímero mais interessantes para os seguintes ensaios. Um

delineamento experimental tipo fatorial completo 3^2 foi desenvolvido com a finalidade de determinar as melhores condições de obtenção dos complexos ternários.

A Tabela 2 apresenta as variáveis independentes (fatores): proporção da ciclodextrina com respeito ao fármaco e concentração do polímero (% m/m) na fase dispersante, solução tampão fosfato pH 6,8; assim como a variável dependente (resposta), a solubilidade do fármaco. A matriz de ensaios (Tabela 3) apresenta os níveis de cada variável e os ensaios realizados. Os resultados foram avaliados empregando o programa Statistica® 12.0 (Statsoft, Inc.).

Tabela 2. Variáveis empregadas no delineamento fatorial completo (3^2) e níveis estudados.

Variáveis independentes	Nível		
	-1	0	1
Proporção de M- β -CD	1,00	1,50	2,00
Concentração do polímero (Kollidon® 90F)	0,20	0,30	0,40
Variável dependente			
Solubilidade da ACZ			

M- β -CD: metil- β -ciclodextrina

Tabela 3. Matriz de ensaios do delineamento experimental.

Ensaio	Nome	Kollidon® 90F (% m/m)	Proporção M- β -CD
1	C1-ACZ	0,40	2,00
2	C2-ACZ	0,30	2,00
3	C3-ACZ	0,20	2,00
4	C4-ACZ	0,40	1,50
5	C5-ACZ	0,20	1,00
6	C6-ACZ	0,30	1,50
7	C7-ACZ	0,40	1,00
8	C8-ACZ	0,30	1,00
9	C9-ACZ	0,20	1,50

M- β -CD: metil- β -ciclodextrina

2.2.3. Caracterização dos complexos ternários

2.2.3.1. Ensaios de solubilidade

Para determinar a solubilidade da ACZ foram colocados em um frasco de vidro as diferentes proporções de fármaco: ciclodextrina estabelecidas no delineamento experimental da seção 2.2.2.1. Foram utilizados 20 mL de solução de tampão fosfato pH 6,8 contendo as diferentes proporções do polímero (% m/m) a serem avaliados. Estas suspensões foram agitadas a 500 rpm por 72 horas a 25 ± 1 °C, após atingir o equilíbrio, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 10000 rpm com a finalidade

de retirar o excesso de partículas não solubilizadas e quantificar o fármaco no sobrenadante por espectrofotometria a 266 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.2.3.2. Secagem

Os complexos de inclusão obtidos foram submetidos à secagem no mini Spray Dryer B-290 (Buchi, Suíça) (Figura 1). A temperatura do ar de secagem utilizada foi de 160 °C, com vazão do ar de secagem 60 m³ h⁻¹ e vazão de alimentação de suspensão 4 g min⁻¹, alimentada a um atomizador tipo duplo fluido com mistura interna com pressão e vazão do ar de atomização respectivamente de 2,5 kgf cm⁻² e 17 lpm.

Figura 1. Mini Spray Dryer B-290.



2.2.3.3. Determinação do tamanho de partícula do complexo ternário

Para determinação do tamanho dos complexos ternários foi utilizado microscópio óptico Olympus BX60MIV com aumento de 50 vezes, as imagens foram capturadas por câmera digital. A preparação do material foi feita utilizando a amostra seca dos complexos diluídas em solução saturada de ACZ e dispersas em uma lâmina de vidro.

2.2.3.4. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A caracterização dos eventos térmicos foi realizada empregando DSC Extar 7020 (Seiko Instruments, Japão) previamente calibrada com índio metálico (ponto de fusão: 156,4 °C/ ΔH fusão: 28,50 J g⁻¹). Usou-se faixa de temperatura de 25 a 350 °C. As amostras foram cuidadosamente pesadas em cadinhos de alumínio hermeticamente fechados e submetidos à velocidade de aquecimento de 5 °C.min⁻¹ e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL. min⁻¹.

2.2.3.5. Análise Termogravimétrica (TG/DTG)

As curvas termogravimétricas foram realizadas em equipamento TG/DTA 7200 (Exstar, Bunkyo-Ku, Japão) sob fluxo de nitrogênio 100 mL.min⁻¹ com uma velocidade de aquecimento de 10 °C. min⁻¹, em uma faixa de temperatura de 25 °C a 600 °C. Massa conhecida das amostras foram adicionadas em um cadinho de platina sendo registrada a perda de peso em função da temperatura. O equipamento foi previamente calibrado usando padrão de oxalato de cálcio monoidratado.

2.2.3.6. Teor de acetazolamida no complexo ternário

Para determinação do teor de ACZ nos complexos ternários foi transferida quantidade de aproximadamente 15 mg do complexo seco em balão volumétrico de 25 mL. Posteriormente foi adicionado 15 mL de solução tampão fosfato pH 6,8 e algumas gotas de NaOH 5N levando ao ultrassom por 15 minutos, visando garantir a solubilização completa do ativo. Após este tempo, o volume do balão foi completado com o mesmo tampão procedendo-se com a homogeneização final e posterior centrifugação para garantir a separação de possíveis resíduos sólidos. A quantidade de ACZ foi determinada empregando espectrofotômetro Evolution 201-Thermo Scientific no comprimento de onda de 266 nm.

2.2.4. Produção dos comprimidos orodispersíveis (CODs)

Os comprimidos orodispersíveis foram obtidos por compressão direta empregando o complexo ternário escolhido após avaliação do delineamento experimental (2.2.2.1.). Para a produção dos CODs, o complexo selecionado foi pesado em quantidade suficiente para fornecer 75 mg de ACZ. O complexo ternário seco e outros excipientes tais como aspartame, Kollidon® CL (crospovidona), Ac-Di-sol® (croscarmelosa sódica), Avicel® PH 102 e Avicel® PH 200 (celulose microcristalina) e manitol foram transferidos a um saco de polietileno e misturado por

dez minutos, posteriormente estearato de magnésio foi tamisado em malha 0,42 mm (Bronzinox, São Paulo, Brasil), adicionado à sacola e misturado por mais um minuto (Tabela 4). Finalmente os comprimidos foram produzidos em prensa hidráulica (Figura 2) (America Lab., Charqueada, SP, Brasil) com punção de 11 mm e força de compressão a 300 psi por um minuto.

Figura 2. Prensa hidráulica utilizada na obtenção dos CODs.



Tabela 4. Composição das formulações de comprimidos orodispersíveis (CODs).

Componentes (% m/m)	F1	F2	F3	F4
Complexo de ACZ	61,75	61,75	61,75	61,75
Aspartame	2,00	2,00	2,00	2,00
Kollidon® CL	3,00	-	3,00	-
Ac-Di-sol®	-	3,00	-	3,00
Avicel® PH 102	27,25	27,25	-	-
Avicel® PH 200	-	-	27,25	27,25
Estearato de magnésio	1,00	1,00	1,00	1,00
Manitol	5,00	5,00	5,00	5,00

2.2.5. Caracterização dos comprimidos orodispersíveis (CODs) de ACZ

2.2.5.1. Ensaio físicos

2.2.5.1.1. Peso médio

Foram pesadas individualmente 10 unidades de CODs na balança analítica (Marte, Shimadzu, AUW220D, Filipinas). Posteriormente foram calculados o peso médio, desvio padrão e o coeficiente de variação (CV%) de acordo com o método geral da Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019).

2.2.5.1.2. Diâmetro e espessura

Estes aspectos dos comprimidos foram obtidos com o auxílio de um paquímetro, utilizando 10 unidades para cada medição.

2.2.5.1.3. Dureza e friabilidade

Estes ensaios foram realizados nos comprimidos conforme a Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019). A dureza foi determinada utilizando 10 comprimidos em equipamento durômetro de bancada (Ethik Technology, EDTS, Brasil).

Para determinação da friabilidade foram utilizados 10 comprimidos os quais foram pesados com exatidão e introduzidos no equipamento friabilômetro (LOGAN, FAB-2, Estados Unidos). A velocidade foi ajustada para 25 rotações por minuto (rpm) durante 4 minutos. Após este procedimento foi removido todo o pó da superfície dos comprimidos que foram pesados novamente.

2.2.5.2. Teor de acetazolamida nos CODs

Para determinação do teor de ACZ nos comprimidos foi transferida uma quantidade de aproximadamente 25 mg do pó, proveniente da trituração dos comprimidos em um balão volumétrico de 50 mL. Posteriormente foi adicionado 30 mL de solução tampão fosfato pH 6,8 e umas gotas de NaOH 5N levando ao ultrassom por 15 minutos, visando garantir a completa solubilização do ativo. Após este tempo, o volume do balão foi completado com o mesmo tampão procedendo-se homogeneização final e separação dos resíduos com filtro de seringa PVDF com poro de 0,45 µm. O ensaio foi efetuado utilizando seis comprimidos. A quantidade de ACZ foi determinada empregando espectrofotômetro Evolution 201-Thermo Scientific no comprimento de onda de 266 nm.

2.2.5.3. Tempo de desintegração

Para a realização do teste de tempo de desintegração foram avaliados um total 6 comprimidos no desintegrador (Ethik Technology, Brasil) e 750 mL de solução tampão fosfato pH 6.8.

2.2.5.4. Perfil de dissolução

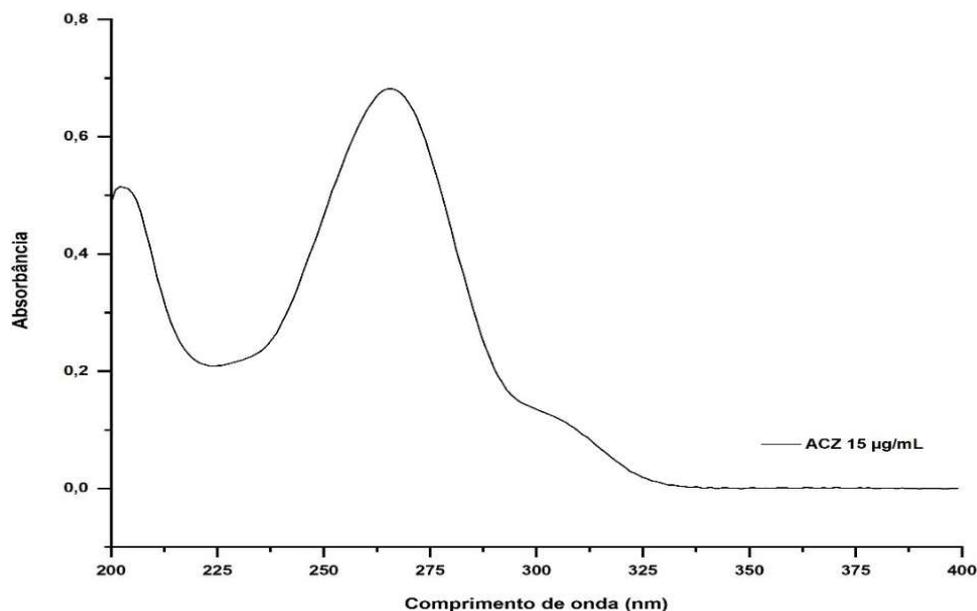
Para determinação do perfil de dissolução dos CODs foi utilizado aparato 2 (pá) 708-DS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) a 37 °C, 75 rotações por minuto (rpm) e 900 mL de solução tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução preparado de acordo com a Farmacopeia Americana (USP, 2019). Alíquotas de 5 mL foram retiradas nos tempos de 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos. Finalmente, a quantidade de ACZ dissolvida foi determinada em espectrofotômetro Evolution 201-Thermo Scientific no comprimento de onda de 266 nm.

2.3. Resultados e discussão

2.3.1. Desenvolvimento de metodologia analítica por espectrofotometria UV-Vis para a quantificação de ACZ

Para determinação da absorvância máxima foi utilizada uma solução de ACZ 15 µg/mL na região de 200-400 nm foi determinado que o comprimento de onda que apresenta absorvância máxima para ACZ foi em 266 nm com um pico de absorvância máxima de 0,88 como observado na Figura 3.

Figura 3. Absorvância máxima da solução de ACZ 15 µg/mL no intervalo de 200-400 nm.



3.2.1.1. Linearidade

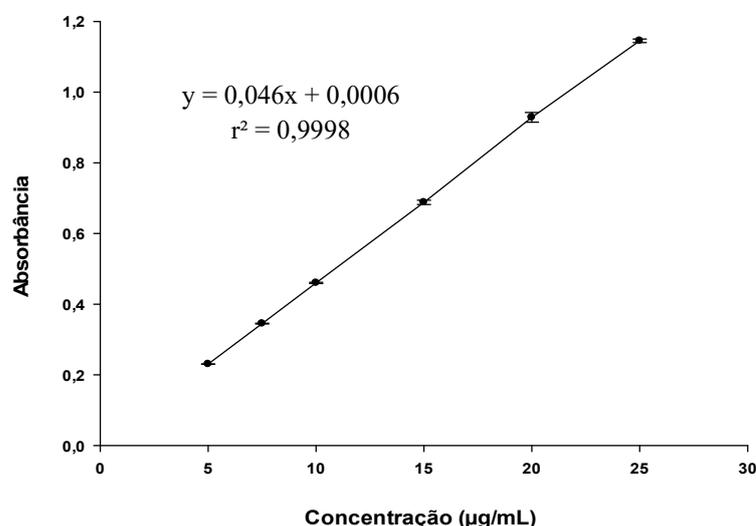
A linearidade do método foi determinada mediante a construção de uma curva de calibração. A equação da reta e seu correspondente coeficiente de correlação linear (r^2) são observados na Figura 4. O desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV%) para cada nível de concentração foram determinados, sendo que todos os CV% foram inferiores a 5%, valores considerado aceitáveis conforme descrito na norma vigente RDC n° 166/17 (BRASIL, 2017).

Tabela 5. Valores de absorvância média, DP e CV% (n=3).

CON ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância			Média	DP	CV%
	I	II	III			
5,00	0,230	0,230	0,231	0,230	0,001	0,251
7,50	0,345	0,344	0,346	0,345	0,001	0,290
10,00	0,458	0,461	0,461	0,460	0,002	0,377
15,00	0,681	0,692	0,691	0,688	0,006	0,884
20,00	0,913	0,934	0,939	0,929	0,014	1,486
25,00	1,140	1,146	1,150	1,145	0,005	0,439

CON: Concentração, DP= Desvio padrão, CV%= Coeficiente de variação.

Figura 4. Curva analítica da ACZ obtida por espectrofotometria a 266 nm.



2.3.2. Preparação dos complexos ternários

A preparação dos complexos ternários de ACZ demonstrou-se como simples e rápido além de permitir o aumento da solubilidade do fármaco (KAUR et al., 2005). Para a determinação das melhores condições de produção dos complexos inicialmente foram avaliados diversos tipos de ciclodextrinas e polímeros, ensaios que são apresentados a continuação.

2.3.2.1. Determinação das melhores condições de preparação de complexos ternários de ACZ

Estudos prévios da complexação da ACZ utilizando a beta-ciclodextrina (β -CD) e 2-hidroxipropil- β -CD (HP- β -CD) já foram abordados em diversos trabalhos de pesquisa. Estes resultados demonstraram o aumento da solubilidade do fármaco como consequência da formação dos complexos (LOFTSSON; HREINSDÓTTIR; MÁSSON, 2007) (LOFTSSON; FRIRIKSDÓTTIR, 1998) (BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

A solubilidade de um fármaco pode ser aumentada de diversas formas durante a complexação, entre estas estratégias encontramos a adição de um terceiro componente tal como um polímero, o ajuste do pH do meio dispersante, a ionização do fármaco e a formação de sal (ALOISIO; DE OLIVEIRA; LONGHI, 2014) (PONCE-PONTE et al., 2018). Diversos polímeros e seus efeitos na solubilidade da ACZ e de outros fármacos já foram determinados previamente. Estes trabalhos demonstraram que os polímeros solubilizam a ciclodextrina assim como que ajudam na formação dos complexos fármaco-ciclodextrina (LOFTSSON; FRIRIKSDÓTTIR; GUMUNSDÓTTIR, 1996) (LOFTSSON; FRIRIKSDÓTTIR, 1998). Como mencionado temos na literatura estudos prévios avaliando a complexação da ACZ, como uma forma de corroborar estes estudos e acrescentar novos resultados foram realizados diversos ensaios avaliando novas ciclodextrinas e polímeros na formação dos complexos ternários de ACZ, os quais são apresentados nas Tabelas 6, 7 e 8.

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos usando polivinilpirrolidona (PVP) como polímero na formação de complexos ternários. Observa-se que em presença da metil- β -CD a solubilidade da ACZ aumenta quando comparada com as outras CD.

Tabela 6. Solubilidade da ACZ (mg/mL) avaliando os tipos de CDs em presença da PVP.

Amostra	mg/mL			Média	DP
	I	II	III		
ACZ em S _{PVP}	1,00	0,99	1,03	1,01	0,02
ACZ- M- β -CD (1:1) em S _{PVP}	1,42	1,42	1,42	1,42	0,01
ACZ- β -CD (1:1) em S _{PVP}	1,24	1,23	1,22	1,23	0,01
ACZ- HP- β -CD (1:1) em S _{PVP}	1,20	1,19	1,19	1,19	0,01

ACZ: acetazolamida, DP: desvio padrão, M- β -CD: metil- β -ciclodextrina, β -CD: β -ciclodextrina, HP- β -CD: 2-hidroxipropil- β -CD, PVP: polivinilpirrolidona.

Quando avaliada a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) como polímero na formação dos complexos ternários os resultados obtidos determinaram que a presença de metil- β -CD nos complexos ternários permite uma maior solubilidade da ACZ nas diferentes proporções fármaco: ciclodextrina (Tabela 7).

Tabela 7. Solubilidade da ACZ (mg/mL) avaliando os tipos de CDs em presença da HPMC.

Amostra	mg/mL			Média	DP
	I	II	III		
ACZ em S _{HPMC}	0,91	0,93	0,92	0,92	0,01
ACZ- M- β -CD (1:1) em S _{HPMC}	1,42	1,47	1,48	1,46	0,03
ACZ- M- β -CD (1:2) em S _{HPMC}	1,86	1,97	1,97	1,93	0,06
ACZ- β -CD (1:1) em S _{HPMC}	1,22	1,27	1,29	1,26	0,04
ACZ- β -CD (1:2) em S _{HPMC}	1,58	1,60	1,60	1,59	0,01

ACZ: acetazolamida, DP: desvio padrão, M- β -CD: metil- β -ciclodextrina, β -CD: β -ciclodextrina, HPMC: hidroxipropilmetilcelulose.

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos utilizando Kollidon® 90F como polímero na formação dos complexos, os resultados demonstraram que a solubilidade de ACZ apresenta um impacto significativo na presença deste polímero e da metil- β -CD. Uma possível explicação deste fenômeno poderia ser a capacidade do polímero de fornecer um pH adequado (4,0 - 7,0) para a formação dos complexos ternários, assim como que a presença deste no meio dispersante auxiliaria na molhabilidade das partículas do fármaco causando um efeito sinérgico entre os três componentes (SMITH; MACRAE; SNOWDEN, 2005) (LAHIANI-SKIBA et al., 2006).

Tabela 8. Solubilidade da ACZ (mg/mL) avaliando os tipos de CDs em presença de Kollidon® 90F.

Amostra	mg/mL			Média	DP
	I	II	III		
ACZ -S Kollidon® 90F	0,93	0,93	0,93	0,93	0,01
ACZ- M- β -CD(1:2) em S Kollidon® 90F	2,11	2,12	2,1	2,11	0,01
ACZ- β -CD (1:2) em S Kollidon® 90F	1,6	1,6	1,63	1,61	0,02

ACZ: acetazolamida, DP: desvio padrão, M- β -CD: metil- β -ciclodextrina, β -CD: β -ciclodextrina.

Analisando os resultados, podemos inferir que a metil- β -CD foi a ciclodextrina que apresentou maior capacidade de solubilização do fármaco. Este aumento pode

ser uma atribuição direta da capacidade desta CD na formação de interações eletrostáticas e hidrofóbicas que incrementaram a solubilidade e estabilidade dos complexos (HUANG et al., 2013) (FREITAS et al., 2012) (PONCE-PONTE et al., 2018). Como nossa finalidade foi a formação de complexos que apresentem alta solubilidade para uma posterior produção de comprimidos orodispersíveis (COD) a utilização desta CD e do polímero Kollidon® 90F seria o mais indicado devido a maior solubilidade do fármaco na água e conseqüentemente menor toxicidade (YANG et al., 2011).

Para uma melhor avaliação da capacidade de complexação sobre a solubilidade do fármaco foi realizado uma análise de variância (ANOVA one way) (Tabela 9 e 10). Os resultados indicaram que a solubilidade foi maior quando utilizou se a proporção 1:2 de ACZ: metil- β -CD, assim como em presença do Kollidon® 90F no meio dispersante.

Tabela 9. ANOVA one way dos resultados obtidos para a solubilidade de ACZ.

Efeitos	GL	SQ	MQ	Valor-F	p-valor
CD	3	0,5764	0,1921	168,3000	0,001
Erro	8	0,0091	0,0011		
Total	11	0,5856			

CD: ciclodextrina SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática, Valor-p: nível de significância.

Tabela 10. Médias dos resultados obtidos para a solubilidade de ACZ.

Amostra	N	Média	DP	IC de 95%
ACZ- β -CD (1:2) em S _{HPMC}	3	1,5933	0,0115	(1,5483; 1,6383)
ACZ- M- β -CD (1:2) em S _{HPMC}	3	1,9333	0,0635	(1,8883; 1,9783)
ACZ- β -CD (1:2) em S _{Kollidon® 90F}	3	1,6100	0,0173	(1,5650; 1,6550)
ACZ- M- β -CD (1:2) em S _{Kollidon® 90F}	3	2,1100	0,0100	(2,0650; 2,1549)

ACZ: acetazolamida, DP: desvio padrão, M- β -CD: metil- β -ciclodextrina, β -CD: β -ciclodextrina, HPMC: hidroxipropilmetilcelulose.

A Tabela 11 apresenta os resultados do teste de Tukey. Observa-se que o tipo de polímero presente no meio dispersante influencia de forma significativa na solubilidade do fármaco quando a metil- β -ciclodextrina está presente no complexo ternário. A formação de dois agrupamentos indicou que as amostras são

significativamente diferentes para esta ciclodextrina. No entanto quando a β -CD foi utilizada na complexação, o polímero não influencia de forma significativa na resposta, devido a que foi observado um agrupamento único para as duas amostras indicando que ambas foram similares.

Tabela 11. Teste de comparação múltipla de Tukey para média da solubilidade de ACZ.

Amostra	N	Média	Agrupamento
ACZ- M- β -CD (1:2) em S _{Kollidon® 90F}	3	2,1100	A
ACZ- M- β -CD (1:2) em S _{HPMC}	3	1,9333	B
ACZ- β -CD (1:2) em S _{Kollidon® 90F}	3	1,6100	C
ACZ- β -CD (1:2) em S _{HPMC}	3	1,5933	C

ACZ: acetazolamida, M- β -CD: metil- β -ciclodextrina, β -CD: β -ciclodextrina, HPMC: hidroxipropilmetilcelulose.

2.3.2.2. Obtenção de complexos ternários por delineamento experimental tipo fatorial completo 3²

A partir dos resultados obtidos anteriormente foi desenvolvido um delineamento experimental do tipo fatorial completo 3² onde foram avaliadas as variáveis independentes (fatores): concentração de polímero Kollidon® 90F e a proporção de metil- β -CD, sobre a solubilidade do fármaco (resposta). A Tabela 12 apresenta os resultados dos nove ensaios realizados, assim como os fatores e níveis empregados no delineamento.

Tabela 12. Resultados da solubilidade de ACZ obtidos a partir dos complexos ternários.

Ensaio	Kollidon® 90F	ACZ	CD	mg/mL			Média	DP
	(%w/w)	(%w/w)	(%w/w)	I	II	III		
C1-ACZ	0.40	1.00	2.00	2,42	2,28	2,30	2,33	0,07
C2-ACZ	0.30	1.00	2.00	2,42	2,35	2,30	2,36	0,06
C3-ACZ	0.20	1.00	2.00	2,43	2,39	2,33	2,38	0,05
C4-ACZ	0.40	1.00	1.50	2,00	1,99	1,92	1,97	0,05
C5-ACZ	0.20	1.00	1.00	1,65	1,66	1,60	1,64	0,03
C6-ACZ	0.30	1.00	1.50	1,96	1,95	1,90	1,94	0,03
C7-ACZ	0.40	1.00	1.00	1,72	1,71	1,73	1,72	0,01
C8-ACZ	0.30	1.00	1.00	1,66	1,64	1,68	1,66	0,02
C9-ACZ	0.20	1.00	1.50	1,98	1,97	1,94	1,96	0,02

ACZ: acetazolamida, CD: ciclodextrina, DP: desvio padrão

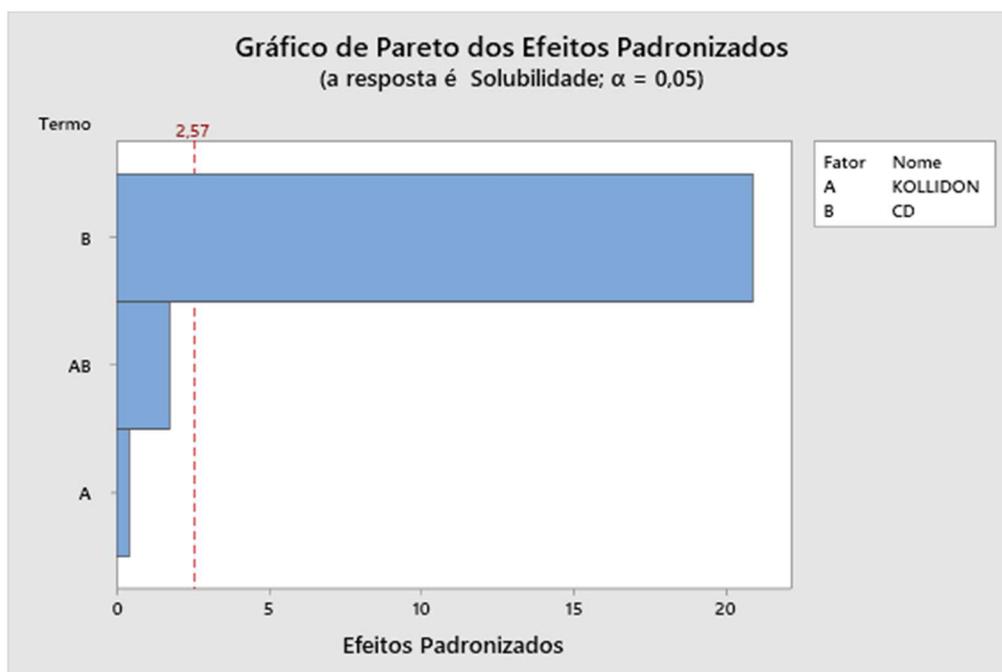
A análise de variância (Tabela 13) e o gráfico de Pareto (Figura 5) indicaram que dentre os fatores estudados a ciclodextrina apresentou impacto significativo no aumento de solubilidade de ACZ. A Tabela 14 apresenta a estimativa dos coeficientes de regressão mediante os quais podemos obter a Equação 1 (Eq.1) que representa o modelo matemático utilizado na avaliação do impacto das variáveis independentes estudadas sobre a solubilidade do fármaco.

Tabela 13. ANOVA para os resultados de solubilidade de ACZ. Os resultados com valor de $p < 0,05$ são considerados significativos.

Efeito	SQ	GL	MQ	Valor-F	p-valor
Modelo	17,7231	3	5,908	146,320	0,001
Linear	17,601	2	8,800	217,960	0,001
Kollidon® 90F	0,007	1	0,007	0,170	0,696
CD	17,594	1	17,594	435,750	0,001
Interação de 2 fatores	0,123	1	0,126	3,030	0,142
Kollidon® 90F * CD	0,123	1	0,126	3,030	0,142
Erro	0,202	5	0,040		
Total	17,925	8			

CD: ciclodextrina, SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática, Valor-p: nível de significância.

Figura 5. Gráficos de Pareto para os efeitos das variáveis independentes sobre a solubilidade de ACZ. As barras à direita da linha vermelha representam os efeitos significativos.



$$\text{Solubilidade} = 3,164 + 5,59 \text{ Kollidon® 90F} + 4,475 \text{ CD} - 3,50 \text{ Kollidon® 90F} * \text{CD} \quad (\text{Eq.1})$$

Tabela 14. Coeficientes codificados de regressão do modelo matemático selecionado no ensaio de solubilidade de ACZ.

Termos	Coeficientes	C-DP	Estatística T	Valor -p	VIF
Constantes	9,9785	0,0670	148,98	0,001	
Kollidon® 90F	0,0340	0,0820	0,41	0,696	1,0
CD	1,7124	0,0820	20,87	0,001	1,0
Kollidon® 90F * CD	-0,175	0,1000	-1,74	0,142	1,0
DP= 0,201 R²= 98,87% R² (aj) = 98,20% R² (prev) = 95,52%					

CD: ciclodextrina, R²: coeficiente de determinação; R² (aj): coeficiente de determinação ajustado; R² (prev): coeficiente de determinação de previsão do modelo ajustado; DP = desvio-padrão; Valor-p: nível de significância.

Dessa forma, mediante esta avaliação estatística, o complexo C3-ACZ preparado utilizando 0.20 % de Kollidon® 90F no tampão fosfato pH 6,8 e com uma proporção 1:2 de fármaco: ciclodextrina foi escolhido como o complexo ternário a ser utilizado nos posteriores ensaios devido a que apresentou o maior valor de solubilidade do fármaco dentro do delineamento além de utilizar menor porcentagem de polímero. Finalmente, este complexo será a matéria prima a ser utilizada no desenvolvimento dos comprimidos orodispersíveis (COD).

2.3.3. Caracterização dos complexos

2.3.3.1. Determinação do tamanho de partícula do complexo ternário

A Figura 6 apresenta a determinação do tamanho de partícula utilizando microscopia ótica, podemos observar que após o processo de secagem o complexo C3- ACZ apresentou partículas na faixa de 60,8 µm a 141,4 µm. A avaliação do tamanho foi realizado em solução saturada do fármaco devido à alta solubilidade que apresentam os complexos secos na água (KECK; MÜLLER, 2008).

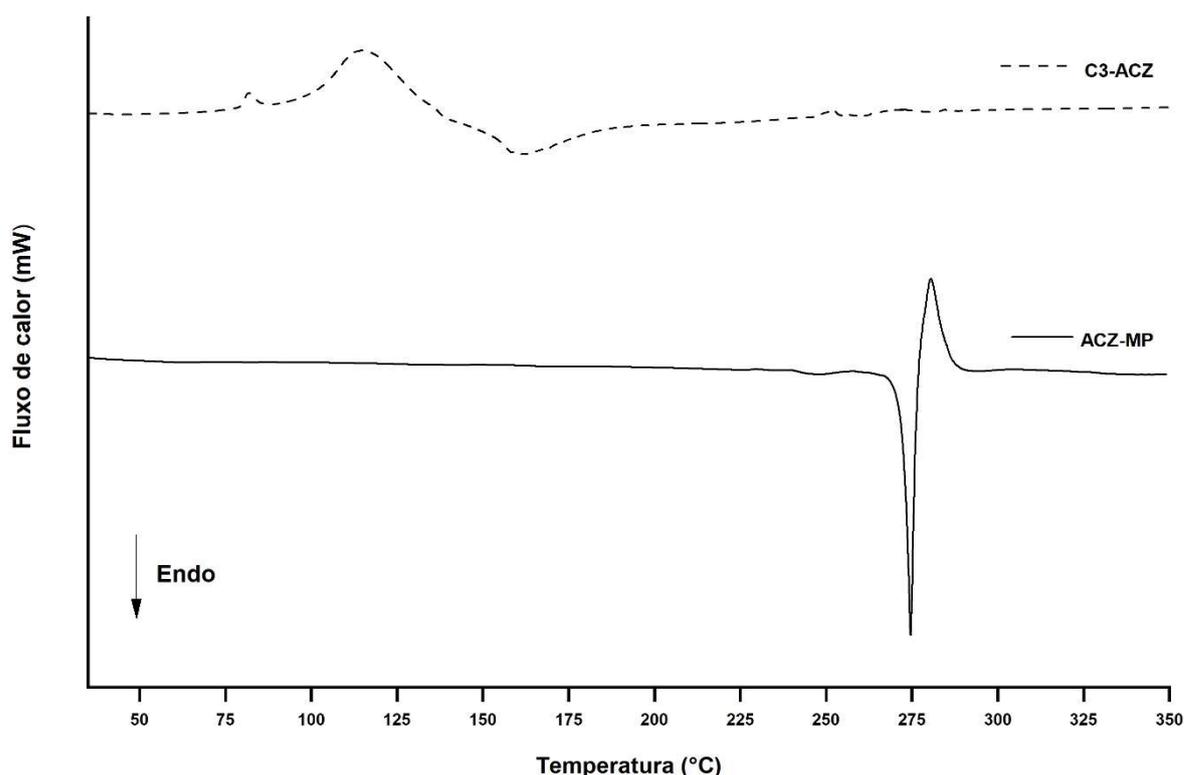
Figura 6. Micrografia óticas do complexo C3-ACZ.



2.3.3.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A curva DSC da ACZ matéria prima (ACZ-MP) e do complexo C3-ACZ são apresentados na Figura 7. Observa-se que o fármaco apresentou uma endoterma correspondente ao ponto de fusão com valor T_{pico} em 251,80 °C, que posteriormente é seguido por uma decomposição com T_{pico} em 272,79 °C. A curva DSC da metil- β -CD nos complexos apresentou perda característica de água entre os 40 e 100 °C estando de acordo com a literatura. No entanto observa-se a ausência do pico característico da ACZ no complexo o qual sugere a formação de um complexo de inclusão amorfo como resultados do encapsulamento do fármaco dentro da cavidade da ciclodextrina (RIBEIRO et al., 2008).

Figura 7. Curva DSC da ACZ-MP e do complexo C3-ACZ a 5°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min⁻¹.

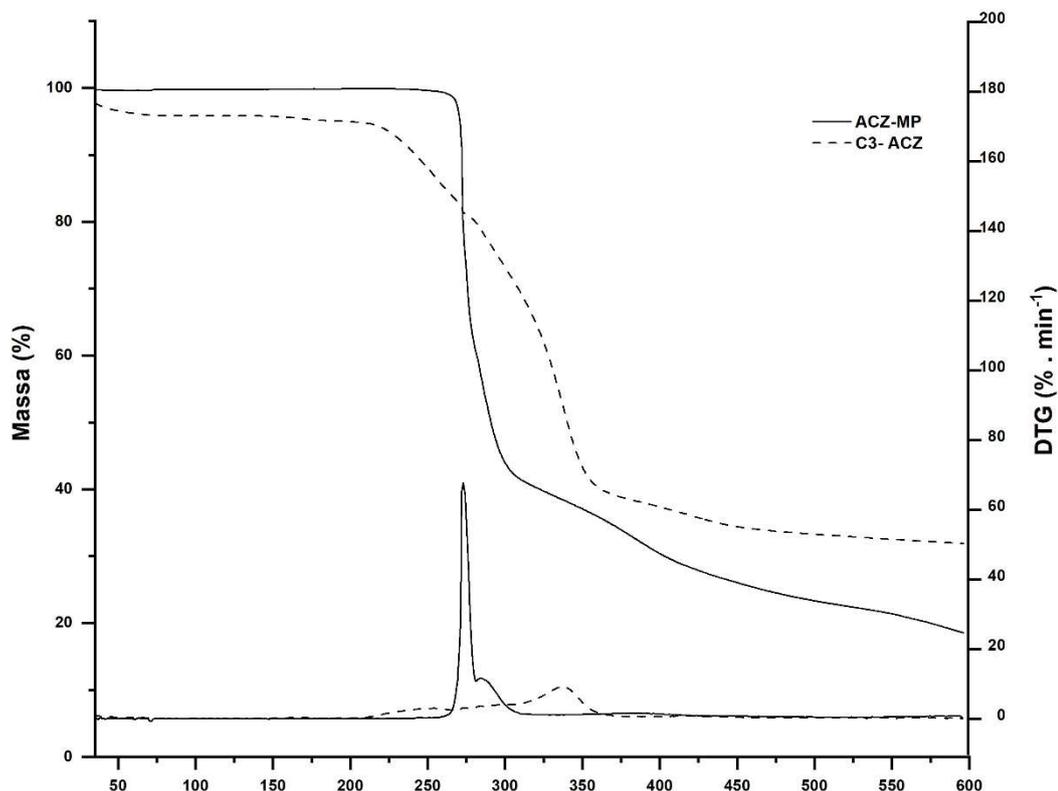


3.2.4.3. Análise Termogravimétrica (TG/DTG)

A curva TG da ACZ-MP e do complexo C3-ACZ são apresentados na Figura 8. Observa-se que o fármaco apresentou três processos de perda de massa que são corroborados na curva DTG. Quando avaliado o complexo C3-ACZ este exibe uma perda de massa inicial antes dos 100°C devido à perda de moléculas de água,

posteriormente duas perdas de massas são observadas, mas com valores de temperatura antecipadas de formas que podemos inferir que a formação do complexo alterou as propriedades de degradação da ciclodextrina e o fármaco (SAMBASEVAM et al., 2013).

Figura 8. Curvas TG de ACZ-MP e do complexo C3-ACZ a 10 °C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 100 mL min⁻¹.



3.2.4.4. Teor de acetazolamida no complexo ternário

O resultado do teor de ACZ no complexo C3-ACZ é apresentado na Tabela 15. O valor obtido foi de 26,69%, que representa um valor inferior ao esperado e que na sua vez indica uma baixa recuperação do fármaco após secagem. Esta perda poderia ser explicada como uma consequência do processo de secagem seja porque o fármaco ficou dentro das paredes do equipamento ou no frasco de coleta final ou também pela alta solubilização do fármaco durante o tempo de formação do complexo (24 horas).

Tabela 15. Teor de acetazolamida no complexo ternário (n=3).

AMOSTRA	Teor de ACZ (%)	DP
C3-ACZ	26,69	0,35

2.3.4. Produção de comprimidos orodispersíveis (CODs)

Inicialmente foram avaliadas diversas condições na formulação e no processo de compressão com a finalidade de obter a formulação final e adequada para os CODs de ACZ. Os parâmetros avaliados como respostas foram o tempo de desintegração e a dureza. A Tabela 16 apresenta algumas formulações testadas, após avaliação destes ensaios foram escolhidos o Ac-Di-Sol® como superdesintegrante e o manitol e o aspartame como excipientes para melhora das características organolépticas.

Tabela 16. Composição das formulações de CODs e os resultados de dureza e tempo de desintegração.

Componentes (%m/m)	F1	F2	F3	F4
Complexo de ACZ	61,75	61,75	61,75	61,75
Aspartame	2,00	2,00	2,00	2,00
Kollidon® CL	3,00	-	3,00	-
Ac-Di-sol ®	-	3,00	-	3,00
Avicel® PH 102	27,25	27,25	-	-
Avicel® PH 200	-	-	27,25	27,25
Estearato de magnésio	1,00	1,00	1,00	1,00
Manitol	5,00	5,00	5,00	5,00
Compressão (psi)	500	300	500	300
Dureza (N)	67,6,	15,70	51,00	15,70
Tempo de desintegração (s)	42,00	23,00	59,00	21,00

ACZ: acetazolamida

As formulações anteriormente descritas nos permitiram determinar certas condições organolépticas desagradáveis das formulações. Tentando melhorar estas características foi considerado a incorporação de Parteck® (excipiente que contém entre 90-95% manitol e 3-7% croscarmelose) na sua composição. Este excipiente é utilizado frequentemente e de forma específica no desenvolvimento de CODs devido que proporciona sabor agradável e fresco no produto final. A Tabela 17 apresenta a formulação final e que foi utilizada nos posteriores ensaios.

Tabela 17. Composição de formulação final de COD- C3 ACZ.

Componentes (%m/m)	COD- C3 ACZ
Complexo de ACZ	61,75
Aspartame	2,00
Ac-Di-sol®	6,00
Parteck®	11,25
Avicel® PH 200	8,00
Estearato de magnésio	1,00

ACZ: acetazolamida

2.3.5. Caracterização dos comprimidos orodispersíveis (CODs)

2.3.5.1. Peso médio, diâmetro, espessura, dureza e friabilidade

A Tabela 18 apresenta os resultados de peso médio, diâmetro, espessura, dureza e friabilidade para a formulação COD- C3 ACZ, feita a partir do complexo ternário do fármaco. Os dados são expressos em média e desvio padrão. Nota-se que os desvios para cada caracterização foram baixos, o qual evidencia a homogeneidade entre os comprimidos.

Tabela 18. Peso médio, diâmetro, espessura, dureza e friabilidade do COD-C3 ACZ (n=10).

	Peso médio (mg)	Diâmetro (cm)	Espessura (cm)	Dureza (N)	Friabilidade (%)
COD- C3 ACZ	0,483 ± 0,034	1,086 ± 0,039	0,528 ± 0,101	20,55 ± 2,929	0,709
CV (%)	1,270	0,710	1,960	4,620	

ACZ: acetazolamida, CV%: coeficiente de variação

O peso médio da formulação apresenta coeficiente de variação (CV%) menor de 5%, valor que cumpre os requerimentos da Farmacopeia Brasileira. No caso da friabilidade, o resultado obtido foi de uma perda inferior a 1,5% do peso inicial, conforme também com as normativas estabelecidas (Brasil, 2019).

A dureza é um dos parâmetros mais importantes durante o desenvolvimento de CODs, devido a necessidade de uma rápida desintegração desta forma farmacêutica após sua administração. O valor obtido foi de 20,55 N, o qual está conforme as especificações. No entanto cabe ressaltar que este tipo de comprimidos não possui até hoje valores definidos para este parâmetro, mas na literatura são recomendados valores inferiores a 30 N (DEY; MAITI, 2010).

2.3.5.2. Teor de acetazolamida nos CODs

O resultado de teor de ACZ na formulação COD-C3 ACZ apresenta valor superior a 95% do fármaco, o qual está dentro das especificações dadas pela Farmacopeia Americana (USP, 2019) (conteúdo de não menos de 95% e não mais de 105 %) (Tabela 19).

Tabela 19. Teor de ACZ na formulação COD- C3 ACZ (n=6).

Amostra	Concentração (mg/mL)	DP	Teor (%)
COD- C3 ACZ	71,91	6,35	95,88

ACZ: acetazolamida, DP: desvio padrão

2.3.5.3. Tempo de desintegração

Considerada uma das características mais importante no momento de avaliar CODs devido a que estas formas farmacêuticas se caracterizam por uma completa e rápida desintegração. A Farmacopeia Europeia recomenda um tempo de desintegração menor de 3 minutos, no entanto a Food and Drug Administration (FDA) indica que este tempo não exceda os 30 segundos (BRNIAK; JACHOWICZ; PELKA, 2015). A Tabela 20 apresenta o resultado obtido para a formulação COD- C3 ACZ, como podemos observar este valor está dentro do permitido e recomendado pela primeira entidade regulatória mencionada anteriormente.

Tabela 20. Tempo de desintegração da formulação COD- C3 ACZ (n=3).

Amostra	Tempo de desintegração (s)
I	70,0
II	85,0
III	75,0
Media	76,7
DP	7,6

DP: desvio padrão

2.3.5.4. Perfil de dissolução

A Tabela 21 e Figura 9 apresentam os resultados obtidos para os ensaios de perfil de dissolução em função do tempo utilizando aparato 2, 900mL de tampão fosfato pH 6,8 como meio, 75 rpm e 37 °C. Podemos observar na Tabela 21 que a porcentagem de liberação do fármaco no tempo de 15 minutos foi de 95,88%, sendo quase completa a liberação do fármaco. Este resultado corrobora a rápida dissolução

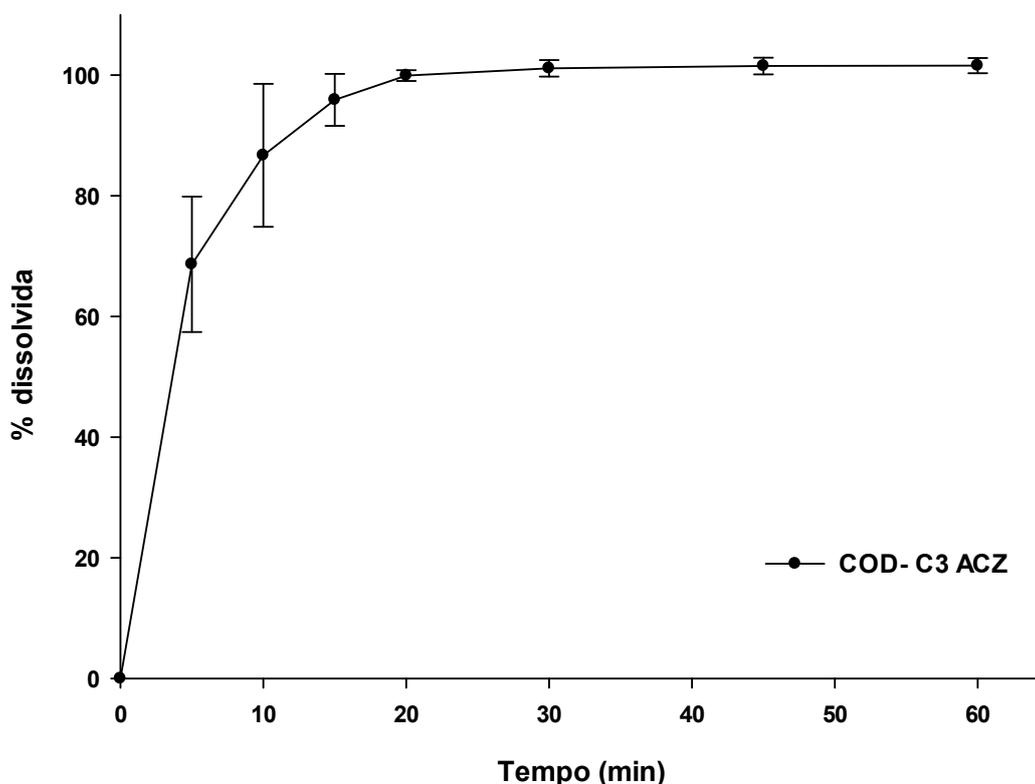
da ACZ que pode ser atribuída à complexação do fármaco utilizando M- β -CD, a diminuição da tensão superficial devido à presença desta ciclodextrina e do polímero Kollidon® 90F no complexo ternário ou à composição dos comprimidos.

Tabela 21. Perfis de dissolução da formulação COD- C3 ACZ obtidos em tampão fosfato pH 6,8 (n = 3).

Tempo	%Diss I	%Diss II	%Diss III	Média Q%	DP
0	0	0	0	0	0
5	55,70	75,05	75,18	68,64	11,21
10	73,02	93,68	93,38	86,69	11,84
15	91,02	99,20	97,43	95,88	4,30
20	99,91	100,81	99,00	99,91	0,90
30	102,42	101,27	99,68	101,12	1,38
45	102,42	102,19	99,90	101,50	1,39
60	102,42	102,19	100,13	101,58	1,26
PI	103,33	102,88	101,70	102,64	0,84

% Diss: % dissolvida. DP: desvio padrão

Figura 9. Porcentagem (%) de ACZ dissolvida da formulação COD- C3 ACZ (n=3).



3. Conclusão

Neste trabalho se evidenciou a viabilidade da complexação de ACZ utilizando metil- β -ciclodextrina e Kollidon® 90F como componentes dos complexos ternários. A solubilidade do fármaco apresentou um aumento significativo. No entanto durante o desenvolvimento farmacotécnico se apresentaram diversas dificuldades em alcançar a dose do fármaco nos CODs, isto como resposta à perda do fármaco durante a secagem ou no momento da produção dos complexos. Os CODs apresentaram características satisfatórias enquanto a dureza, tempo de desintegração, teor e perfil de dissolução podendo ser considerada uma estratégia promissória e viável como alternativa terapêutica para crianças e idosos. Um estudo mais profundo da metodologia de complexação e secagem considerando o teor da ACZ durante todo o tempo de formação dos complexos de forma que seja evitada a perda do fármaco resolveria este problema apresentado. Estudos posteriores se fazem necessários de forma que seja evitado as dificuldades farmacotécnicas apresentadas durante esta pesquisa.

5. Referências bibliográficas

AHMED, Iman Saad; ABOUL-EINIEN, Mona Hassan. In vitro and in vivo evaluation of a fast-disintegrating lyophilized dry emulsion tablet containing griseofulvin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, n. 1, p. 58–68, 2007.

ALOISIO, Carolina; DE OLIVEIRA, Anselmo Gomes; LONGHI, Marcela. Solubility and release modulation effect of sulfamerazine ternary complexes with cyclodextrins and meglumine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 100, p. 64–73, 2014.

BRASIL, ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. Guia para validação de métodos analíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 de julho de 2017.

BRASIL, ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, volume 1. 6ª Ed. Brasília, 2019.

BRASIL, ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, volume 2. 6ª Ed. Brasília, 2019.

BREWSTER, Marcus E.; LOFTSSON, Thorsteinn. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 645–666, 2007.

BREWSTER, Marcus E.; VANDECRUYS, Roger; PEETERS, Jef; NEESKENS, Peter; VERRECK, Geert; LOFTSSON, Thorsteinn. Comparative interaction of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and sulfobutylether- β -cyclodextrin with itraconazole: Phase-solubility behavior and stabilization of supersaturated drug solutions. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, n. 2–3, p. 94–103, 2008.

BRNIAK, Witold; JACHOWICZ, Renata; PELKA, Przemyslaw. The practical approach to the evaluation of methods used to determine the disintegration time of orally disintegrating tablets (ODTs). **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 4, p. 437–443, 2015.

DEY, Paramita; MAITI, Sabyasachi. Orodispersible tablets: A new trend in drug delivery. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**, v. 1, n. 1, p. 2–5, 2010.

Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (FDA/CDER). Guidance for Industry Orally Disintegrating Tablets, U.S. Department of Health and Human Services, p. 1–3, 2008.

FREITAS, Márcia Rocha De; ROLIM, Larissa Araújo; SOARES, Monica Felts De La Roca; ROLIM-NETO, Pedro José; ALBUQUERQUE, Miracy Muniz De; SOARES-SOBRINHO, José Lamartine. Inclusion complex of methyl- β -cyclodextrin and olanzapine as potential drug delivery system for schizophrenia. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 4, p. 1095–1100, 2012.

HUANG, Min et al. Enantiomeric separations of four basic drugs containing N-alkyl groups by a RP-HPLC system using SBE- β -CD as chiral mobile phase additive. **Chinese Chemical Letters**, v. 24, n. 9, p. 840–844, 2013. DOI: 10.1016/j.cclet.2013.05.019.

KAUR, Indu; KAPIL, Mona; SMITHA, R.; AGGARWAL, Deepika. Development of Topically Effective Formulations of Acetazolamide Using HP- β -CD-Polymer Co-Complexes. **Current Drug Delivery**, v. 1, n. 1, p. 65–72, 2005.

KECK, Cornelia M.; MÜLLER, Rainer H. Size analysis of submicron particles by laser diffractometry-90% of the published measurements are false. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, n. 1–2, p. 150–163, 2008.

LAHIANI-SKIBA, Malika; BARBOT, Cécile; BOUNOURE, Frédéric; JOUDIEH, Samer; SKIBA, Mohamed. Solubility and dissolution rate of progesterone-cyclodextrin-polymer systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 32, n. 9, p. 1043–1058, 2006.

LOFTSSON, Thorsteinn; FRIRIKSDÓTTIR, Hafrún. The effect of water-soluble polymers on the aqueous solubility and complexing abilities of β -cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 163, n. 1–2, p. 115–121, 1998.

LOFTSSON, Thorsteinn; FRIRIKSDÓTTIR, Hafrún; GUMUNDSDÓTTIR, Thrórunn K. The effect of water-soluble polymers on aqueous solubility of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 127, n. 2, p. 293–296, 1996.

LOFTSSON, Thorsteinn; HREINSDÓTTIR, Dagný; MÁSSON, Már. The complexation efficiency. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 57, n. 1–4, p. 545–552, 2007.

MISHUR, Robert J.; GRIFFIN, Matthew E.; BATTLE, Cooper H.; SHAN, Bin; JAYAWICKRAMARAJAH, Janarthanan. Molecular recognition and enhancement of aqueous solubility and bioactivity of CD437 by β -cyclodextrin. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 2, p. 857–860, 2011.

PONCE-PONTE, Micaela; ALOISIO, Carolina; ROMERO-GUERRA, Diana Marcela; GRACIA-VÁSQUEZ, Sandra; GARNERO, Claudia; LONGHI, Marcela. Binary and ternary complexes of norfloxacin to improve the solubility of the active pharmaceutical ingredient. **Therapeutic Delivery**, v. 9, n. 9, p. 639–652, 2018.

RIBEIRO, Andreza; FIGUEIRAS, Ana; SANTOS, Delfim; VEIGA, Francisco. Preparation and solid-state characterization of inclusion complexes formed between miconazole and methyl- β -cyclodextrin. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 4, p. 1102–1109, 2008.

SAMBASEVAM, Kavirajaa Pandian; MOHAMAD, Sharifah; SARIH, Norazilawati Muhamad; ISMAIL, Nor Atiqah. Synthesis and characterization of the inclusion complex of β -cyclodextrin and azomethine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 2, p. 3671–3682, 2013.

SHOUKRI, Raguia Ali; AHMED, Iman Saad; SHAMMA, Rehab N. In vitro and in vivo evaluation of nimesulide lyophilized orally disintegrating tablets. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73, n. 1, p. 162–171, 2009.

SMITH, J. S.; MACRAE, R. J.; SNOWDEN, M. J. Effect of SBE7- β -cyclodextrin complexation on carbamazepine release from sustained release beads. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 60, n. 1, p. 73–80, 2005.

SOUZA, Cláudia R. F.; FERRAZ-FREITAS, Patrícia N.; OLIVEIRA, Wanderley P. Complexos de inclusão binários, ternários e quaternários contendo óleo essencial de *Lippia sidoides*. **Quimica Nova**, v. 39, n. 8, p. 979–986, 2016.

SZENTE, Lajos; SZEMÁN, Julianna; SOHAJDA, Tamás. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Analytical characterization of cyclodextrins : History , official methods and recommended new techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 130, p. 347–365, 2016.

UNITED States Pharmacopeia. 41 ed. rev. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2018. 8854 p.

YANG, Li Juan; CHEN, Wen; MA, Shui Xian; GAO, Yun Tao; HUANG, Rong; YAN, Sheng Jiao; LIN, Jun. Host-guest system of taxifolin and native cyclodextrin or its derivative: Preparation, characterization, inclusion mode, and solubilization. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 3, p. 629–637, 2011.

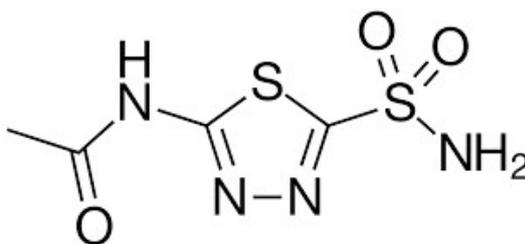
Capítulo 3

Micronização de acetazolamida: caracterização físico-química e desenvolvimento de comprimidos de liberação imediata.

1. INTRODUÇÃO

A acetazolamida (ACZ) é um potente inibidor enzimático específico da anidrase carbônica (Figura 1). Pertence à classe IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004) (PALMA et al., 2009) (VERMA et al., 2013). Conhecido também como acetamida, possui fórmula molecular de $C_4H_6N_4O_3S_2$ e massa molecular de $222,24 \text{ g mol}^{-1}$. É um ácido fraco com constante de dissociação (pK_a) de 7,2; muito pouco solúvel em água, pouco solúvel em álcool e acetona, e praticamente insolúvel em éter. Macroscopicamente é um pó cristalino branco e inodoro.

Figura 1. Estrutura química da acetazolamida.



A ACZ é utilizada em certos casos de glaucoma e no tratamento pré-operatório de glaucoma de ângulo fechado. Atua mediante a redução da pressão intraocular por inibição da anidrase carbônica que a sua vez permite o controle da produção de humor aquoso pelo epitélio ciliar (SHARAN et al., 2010) (COSTA et al., 2010) (SHARAN et al., 2010). Pode ser usada no tratamento de epilepsia centro-encefálicas e convulsões não-localizadas (REISS; OLES, 1996) (LIM et al., 2001) (SINGLA et al., 2002), como também em quadros clínicos de retenção hídrica anormal (edema cardíaco devido à insuficiência cardíaca congestiva, edema pulmonar, edema cerebral e edema induzido por medicamentos (VOGIATZIS et al., 2013) (KASSAMALI; SICA, 2011).

A ACZ também é usada na prevenção e redução de sintomas do mal das montanhas de alpinistas e indivíduos susceptíveis a este quadro (SRINIVASU et al., 2010) caracterizado por dor de cabeça, náuseas, cansaço, tontura e falta de ar, quando se atinge de maneira rápida altitudes elevadas (geralmente acima 3048 m).

Apesar da ACZ ser um fármaco amplamente descrito na literatura para o tratamento de diversas sintomatologias, a molécula desse fármaco apresenta características físico-químicas que limitam seu uso (CARAMELO et al., 2008; GRANERO et al., 2008).

Existem abordagens promissoras como a micronização que buscam o aumento da solubilidade de saturação e da velocidade de dissolução dos fármacos classe II e IV, segundo o SCB (Sistema de Classificação Biofarmacêutica). A micronização é uma tecnologia que promove o aumento da área superficial, em decorrência da diminuição do tamanho de partículas, sendo considerado um processo importante para o aumento da solubilidade (DURÁN et al., 2010; PATRAVALE; DATE; KULKARNI, 2004). Este processo é muito utilizado na indústria farmacêutica tanto para a redução do tamanho das partículas de fármacos como para a homogeneização da granulometria dos lotes destes. Entretanto, algumas alterações no material podem ocorrer, como a perda da estabilidade da molécula e algumas mudanças na estrutura cristalina, pela energia envolvida no processo, assim como também podem alterar as características de fluxo do pó (GOVINDARAJAN; SURYANARAYANAN, 2006; KIM et al., 2007; LIU et al., 2008).

Dessa forma, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a influência dos parâmetros de micronização sobre as propriedades físico-químicas da acetazolamida micronizada no desenvolvimento de comprimidos de liberação imediata.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

2.1.1. Fármaco

Acetazolamida (ACZ), ativo farmacêutico, origem NAKODA Chemicals (Andhra Pradesh, Índia).

2.1.2. Reagentes

Ácido clorídrico (Labsynth, Diadema, São Paulo, Brasil), acetonitrila grau HPLC obtida da Merck (Darmstadt, Alemanha), fosfato de potássio monobásico-KH₂PO₄ grau analítico Merck (Darmstadt, Alemanha).

2.2. Métodos

2.2.1. Desenvolvimento de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi desenvolvido em cromatógrafo líquido HITACHI ELITE LaChromeL-2000 (Tokyo, Japão); bomba HITACHI ELITE LaChrome L-2130 (Tokyo, Japão), detector HITACHI ELITE LaChrome UV L-2455 (Tokyo, Japão), forno HITACHI ELITE LaChrome L-2300 (Tokyo, Japão), autoinjeter HITACHI ELITE LaChromeL-2200 (Tokyo, Japão) e programa EZChrom Elite para processamento dos dados. Utilizou-se coluna tipo Purospher®STAR RP-18e de 5µm, 250mm x 4,6mm Merck (Darmstadt, Alemanha). A fase móvel foi constituída de solução fosfato de potássio monobásico 0,05M (KH₂PO₄) pH 3,0, acetonitrila e água (30:20:50 v/v), fluxo de 0,7 mL.min⁻¹, à temperatura de 30 °C. O volume injetado foi de 20µL e a detecção foi realizada no comprimento de onda 235 nm.

2.2.1.1. Preparo da solução padrão

Para o preparo da solução padrão 1 mg/mL de acetazolamida foram pesados 10 mg do fármaco (padrão secundário) em balão volumétrico de 10 mL, adicionando-se aproximadamente 1 mL de NaOH 5N e deixando em agitação em ultrassom por 5 minutos até completa solubilização do fármaco, em seguida o volume foi completado com água.

2.2.1.2. Linearidade

A partir da solução padrão de ACZ foram transferidas alíquotas para balões volumétricos de 10 mL e os volumes foram completados com água em análise conforme a Tabela 1, obtendo-se soluções com concentrações definidas do fármaco. A curva analítica foi preparada em triplicata em seis níveis de concentrações diferentes. As absorbâncias médias correspondentes à três determinações para cada diluição, foram plotadas no eixo das ordenadas e as concentrações (µg/mL) no eixo das abscissas.

Tabela 1. Concentração das amostras de ACZ obtidas a partir de uma solução padrão 1 mg/mL empregadas na determinação da linearidade.

Amostra	Aliquota SP (μL)	VF (mL)	CONC ($\mu\text{g/mL}$)
1	200	10	20
2	400	10	40
3	600	10	60
4	800	10	80
5	1000	10	100
6	1200	10	120

SP: Solução padrão, VF: volume final, CONC: concentração

2.2.2. Teste de filtros

Foram avaliados filtro de seringa PVDF com poro de 0,45 μm e filtro cânula com poro de 1,00 μm , sendo utilizadas três concentrações (20 $\mu\text{g/mL}$, 60 $\mu\text{g/mL}$ e 120 $\mu\text{g/mL}$) da curva de calibração em triplicata. As amostras foram previamente filtradas para determinar possíveis interferências, os resultados foram expressos em termos de porcentagem de recuperação do fármaco \pm desvio padrão.

2.2.3. Micronização da ACZ

As amostras de ACZ micronizada foram obtidas empregando micronizador Fluid Jet Mill J-20 (Figura 2).

Figura 2. Micronizador Fluid Jet Mill J-20



2.2.3.1. Delineamento experimental do tipo fatorial completo 2³

Este estudo foi determinado para avaliar a influência das variáveis independentes (fatores): fluxo de alimentação (g.min⁻¹), pressão de alimentação ou de Venturi (bar) e pressão de micronização (bar) sobre a relação da distribuição do tamanho de partículas do fármaco (RT) (Tabela 2). O modelo de regressão linear apresentado na equação 1 (Eq.1) foi gerado pelo programa Statistica™ 13 (Statsoft Inc). Os termos de significância foram escolhidos com intervalo de confiança de 95% (p <0,05).

$$Y_i = a_0 + a_1 X_1 + a_2 X_2 + a_3 X_3 + a_{12} X_1 X_2 + a_{13} X_1 X_3 + a_{23} X_2 X_3 + a_{123} X_1 X_2 X_3 \text{ (Eq.1)}$$

Onde Y_i (RT: relação da distribuição do tamanho de partícula) é a variável dependente; a₀ é a interceptação; a₁ a a₁₂₃ são os coeficientes de regressão; e X₁ (FA), X₂ (PM) e X₃ (PA) são as variáveis independentes.

Tabela 2. Variáveis e níveis usados no planejamento fatorial completo 2³.

Variáveis independentes	Níveis	
	Inferior (-1)	Superior (1)
FA (g.min ⁻¹)	0,5	0,7
PM (bar)	2,5	4,0
PA (bar)	+1 PM	+2 PM
Variável dependente		
RT = (d90% -d50%) / (d50% -d10%)		

FA: Fluxo de alimentação, PM: pressão de micronização, PA: pressão de alimentação e RT: relação da distribuição do tamanho de partícula

O estudo teve como objetivo o desenvolvimento de um método robusto e adequado para redução do tamanho de partícula. A matriz (Tabela 3) apresenta os ensaios realizados, os resultados foram avaliados empregando o programa estatístico anteriormente mencionados.

Tabela 3. Matriz de ensaios do delineamento experimental do tipo fatorial completo 2³.

Ensaio	Nome	FA (g.min ⁻¹)	PM (bar)	PA (bar)
1	ACZ M1	0,50	2,50	3,50
2	ACZ M2	0,70	2,50	3,50
3	ACZ M3	0,50	4,00	5,00
4	ACZ M4	0,70	4,00	5,00
5	ACZ M5	0,50	2,50	4,50
6	ACZ M6	0,70	2,50	4,50
7	ACZ M7	0,50	4,00	6,00
8	ACZ M8	0,70	4,00	6,00

FA: Fluxo de alimentação, PA: pressão de alimentação, PM: pressão de micronização e RT: relação da distribuição do tamanho de partícula

2.2.3.2. Verificação do modelo matemático

A equação polinomial derivada foi verificada usando uma análise de ponto de verificação. O valor das variáveis independentes foi obtido em um ponto. O valor teórico do RT, calculado substituindo o valor no modelo de regressão linear, foi comparado com o valor observado.

2.3.4. Caracterização de acetazolamida matéria prima e ACZ micronizada

2.3.4.1. Tamanho de partícula

Para a determinação do tamanho de partícula da ACZ matéria-prima (ACZ-MP) e das amostras de ACZ micronizada foi utilizado o equipamento de difração de raios laser Granulometer Cilas 1900 (Cilas, Orleans, França) programado para método de via úmida, utilizando o método de Franhoufer. Como meio dispersante foi utilizada uma solução saturada do fármaco, previamente filtrada para a remoção do fármaco não solubilizado. O sistema foi mantido sem ultrassom durante a leitura para evitar a quebra das partículas, o tempo de medição foi de 30 segundos.

2.3.4.2. Análise morfológica e tamanho de partículas para ACZ-MP e ACZ micronizada

A forma e o tamanho do cristal, antes e depois da micronização, foram determinados utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV) empregando o equipamento TM4000Plus (Hitachi High Technologies, Japão). A matéria prima e as amostras de ACZ micronizada foram analisadas com tensão de aceleração 15,0 kV e aumento de 500x a 15000x. A avaliação do tamanho foi feita pelo programa ImageJ (Image Processing and Analysis in Java) utilizado as micrografias geradas pela MEV.

2.3.4.3. Difração de raios X (DRX)

A caracterização do estado cristalino da ACZ-MP e das amostras de ACZ micronizada foi realizada utilizando o método de difração do pó. Utilizou-se difratômetro de raios X Bruker Modelo D8. Advance Da Vinci (Bruker, Japão), na radiação de Cu- $K\alpha$ e com voltagem de 40kV. As análises foram realizadas à temperatura ambiente e varredura na faixa angular ($2\theta^\circ$) entre 3° e 50° .

2.3.4.4. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A caracterização dos eventos térmicos foi realizada empregando o DSC Exstar 7020 (Seiko Instruments, Japão) previamente calibrada com índio metálico (ponto de fusão: $156,4^\circ\text{C}$ / ΔH fusão: $28,50\text{ J g}^{-1}$). Utilizou-se faixa de temperatura de $25-300^\circ\text{C}$. As amostras foram cuidadosamente pesadas em cadinhos de alumínio hermeticamente fechados e submetidos à velocidade de aquecimento de $5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

2.3.4.5. Densidade verdadeira

A densidade verdadeira das amostras foi obtida em picnômetro de gás hélio Ultrapycnometer 1000 (Quantachrome Corporation, Estados Unidos), onde cerca de 1,0 a 2,0 gramas de cada amostra foram submetidas a cinco medições de volume e densidade, determinando-se ao final a densidade média.

2.3.4.6. Determinação da solubilidade de saturação

Para determinar a solubilidade da ACZ-MP e das amostras de ACZ micronizada foi empregado o método do equilíbrio ou de saturação. Dessa forma excesso do fármaco foi acondicionado no interior de frascos de vidro contendo 10 mL dos seguintes meios: suco gástrico pH 1,2, água deionizada e tampão fosfato pH 6,8; preparados de acordo com a Farmacopéia Americana (USP 41, 2018). Os frascos foram constantemente agitados a 150 rpm durante 72 horas a 37°C , em agitador orbital Tecnal TE 420 (Tecnal, São Paulo, Brasil). Após atingir a saturação alíquotas foram retiradas e filtradas com filtro PVDF $0,45\ \mu\text{m}$. A concentração do fármaco foi determinada pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência.

2.3.5. Produção de comprimidos de ACZ micronizada

Os comprimidos foram obtidos por granulação úmida empregando ACZ-MP (acetazolamida matéria prima) e a amostra de ACZ- M (acetazolamida micronizada)

desenvolvida a partir da verificação do modelo matemático (2.2.3.2.). Os grânulos foram feitos seguindo um delineamento experimental do tipo fatorial fracionado (2^{3-1}) gerado pelo programa Statistica™ 13 (Dell Inc., Tulsa, Estados Unidos). As variáveis independentes e dependentes são apresentadas na Tabela 4. A Tabela 5 apresenta a matriz dos ensaios realizados.

Tabela 4. Variáveis empregadas no planejamento fatorial fracionado (2^{3-1}) e níveis estudados.

Variáveis independentes	Nível	
	(-1)	1
Tamanho de fármaco	ACZ- MP	ACZ-M
Aquateric® N100 (%m/m)	3,00	5,00
ACZ (%m/m)	40,00	60,00
Variável dependente		
ED %		

ACZ- MP: acetazolamida matéria prima, ACZ-M: acetazolamida micronizada, ED: eficiência de dissolução.

Tabela 5. Matriz de ensaios do planejamento fatorial fracionado (2^{3-1}) para granulação.

Ensaio	Granulados	T-ACZ	ACZ (%)	AQ (%m/m)
1	ACZ-G1	ACZ-M	60,0	5,0
2	ACZ-G2	ACZ-MP	60,0	3,0
3	ACZ-G3	ACZ-MP	40,0	5,0
4	ACZ-G4	ACZ-M	40,0	3,0

T-ACZ: tamanho de partícula de ACZ, ACZ- MP: acetazolamida matéria prima, ACZ-M: acetazolamida micronizada, AQ: Aquateric® N100 (%m/m).

A granulação foi realizada em agitador orbital planetário sobre controle de velocidade de agitação. Ao final do processo de umidificação e homogeneização, a massa úmida obtida foi tamisada em malha de 1,18 mm (Bronzinox, São Paulo, Brasil) e transferida para estufa de secagem Fabbe Mod219 (Fabbe Primar, Brasil), com temperatura controlada a 40 °C. Posteriormente foi realizado o controle da umidade destes granulados por meio de analisador de umidade por infra-vermelho IV 2002 (GEHAKA, Brasil), as amostras foram retiradas da estufa com uma umidade residual menor que 5%. Finalmente, os granulados foram calibrados em tamis de malha 1,00 mm.

A partir dos grânulos obtidos foram preparados quatro tipos de comprimidos (Tabela 6) com a finalidade de selecionar o que apresentasse melhor perfil de dissolução (eficiência de dissolução (ED%)). Para a produção dos comprimidos, os grânulos (quantidade suficiente para fornecer 250 mg de ACZ) e os outros excipientes

(celulose microcristalina (Avicel PH-102) e croscarmelose sódica) foram transferidos a um saco de polietileno e misturado por dez minutos, finalmente o estearato de magnésio foi tamisado em malha 0,42 mm (Bronzinox, São Paulo, Brasil), adicionado à sacola e misturado por mais um minuto. Dessa forma, os comprimidos foram produzidos em máquina de comprimir LM08D (Lemaq, Diadema, Brasil) utilizando punção de 14 mm e força de compressão a 1500 psi.

Tabela 6. Composição de formulações de ACZ-F1, ACZ -F2, ACZ-F3 e ACZ-F4.

Formulação	Granulados de ACZ (% m/m)	AQ (% m/m)	Croscarmelose (% m/m)	Avicel PH 102 (% m/m)	Estearato de magnésio (% m/m)
ACZ-F1	ACZ-M	2,60	2,28	62,88	1,00
ACZ-F2	31,25 ACZ- MP	1,59	2,88	63,93	1,00
ACZ-F3	ACZ- MP	3,91	2,68	61,18	1,00
ACZ-F4	ACZ- M	2,35	2,67	62,73	1,00

ACZ: acetazolamida, AQ: Aquateric® N100 (%m/m)

2.3.6. Caracterização dos comprimidos de ACZ

2.3.6.1. Ensaaios físicos

2.3.6.1.1. Peso médio

Foram pesadas individualmente 20 unidades dos comprimidos em balança analítica (Marte, Shimadzu, AUW220D, Filipinas). Posteriormente foram calculados o peso médio, desvio padrão e o coeficiente de variação (CV%) de acordo com o método geral da Farmacopeia Brasileira 6ª edição (Brasil,2019).

2.3.6.1.2. Diâmetro e espessura

Estes aspectos dos comprimidos foram obtidos com o auxílio de um paquímetro, utilizando 10 unidades para cada medição.

2.3.6.1.3. Dureza e friabilidade

Estes ensaios foram realizados nos comprimidos conforme a Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019). A dureza foi determinada utilizando 10 comprimidos em equipamento durômetro de bancada (Ethik Technology, EDTS, Brasil).

O teste de friabilidade foi determinado usando 10 unidades de cada comprimido, os quais foram pesados com exatidão e introduzido no equipamento friabilômetro (LOGAN, FAB-2, Estados Unidos). A velocidade foi ajustada para 25

rotações por minuto (rpm) durante 4 minutos. Após o teste, o pó foi removido da superfície dos comprimidos e pesado novamente. Foram considerados aceitáveis aqueles comprimidos cuja perda após o teste não ultrapassou o valor de 1,5% do peso inicial.

2.3.6.2. Teor de acetazolamida

O teor de acetazolamida presente nos comprimidos foi avaliado utilizando cromatografia líquida de alta eficiência. Foram avaliados 6 comprimidos de cada formulação, cada um deles foi triturado com auxílio de um gral de porcelana e pistilo. Uma quantidade do pó resultante (aproximadamente 125 mg) foi pesada em um balão volumétrico de 50 mL, adicionando-se umas gotas de NaOH 5N e tampão fosfato pH 6,8, levado ao ultrassom por uns 15 minutos. Finalmente após agitação o volume do balão foi completado. A quantidade de ACZ presente em cada comprimido deve estar entre 95,0 e 105,0% do valor declarado (USP 42, 2019).

2.3.6.3. Perfil de dissolução

Para determinar o perfil de dissolução dos comprimidos foi utilizado aparato 2 (pá) 708-DS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) a 37 °C, 75 rotações por minuto (rpm), 900 mL de tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução preparado de acordo com a Farmacopeia Americana (USP 42, 2019). Alíquotas de 5 mL foram retiradas nos tempos de 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos. Finalmente, a quantidade de ACZ dissolvida foi determinada por método cromatografia líquida de alta eficiência a 235 nm.

3. Resultados e discussão

3.1. Desenvolvimento de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

3.1.1. Determinação do comprimento de onda para ACZ

A fase móvel utilizada foi desenvolvida utilizando solução fosfato de potássio monobásico 0,05M (KH₂PO₄) pH 3,0, acetonitrila e água (30:20:50 v/v), sob vazão de 0,7 mL min⁻¹, à temperatura de 30°C, com a finalidade de diminuir o risco de danificação da coluna o máximo possível. Os resultados para quantificação da ACZ determinaram um tempo de retenção de 6,83 minutos (Figura 3 e 4) com volume de injeção de 20µL, o método demonstrou-se simples e rápido.

Figura 3. Espectros CLAE da ACZ. **A-** Espectro nos comprimentos de onda 200 a 400nm e **B-** Cromatograma 3D mostrando o pico principal da solução de ACZ 60 µg/mL a 235 nm.

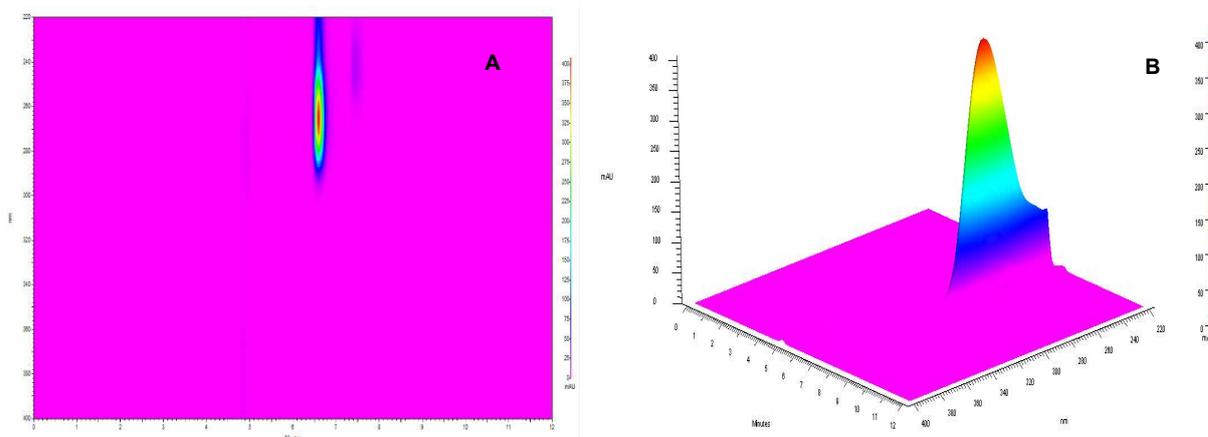
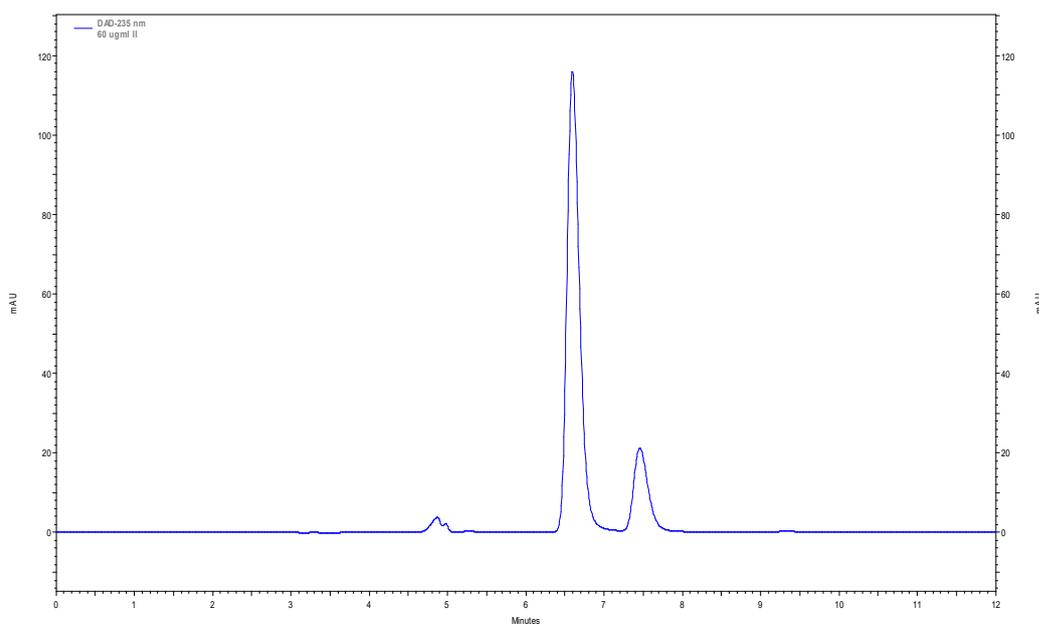


Figura 4. Cromatograma da solução 60 µg/mL de ACZ em água



3.1.2. Linearidade

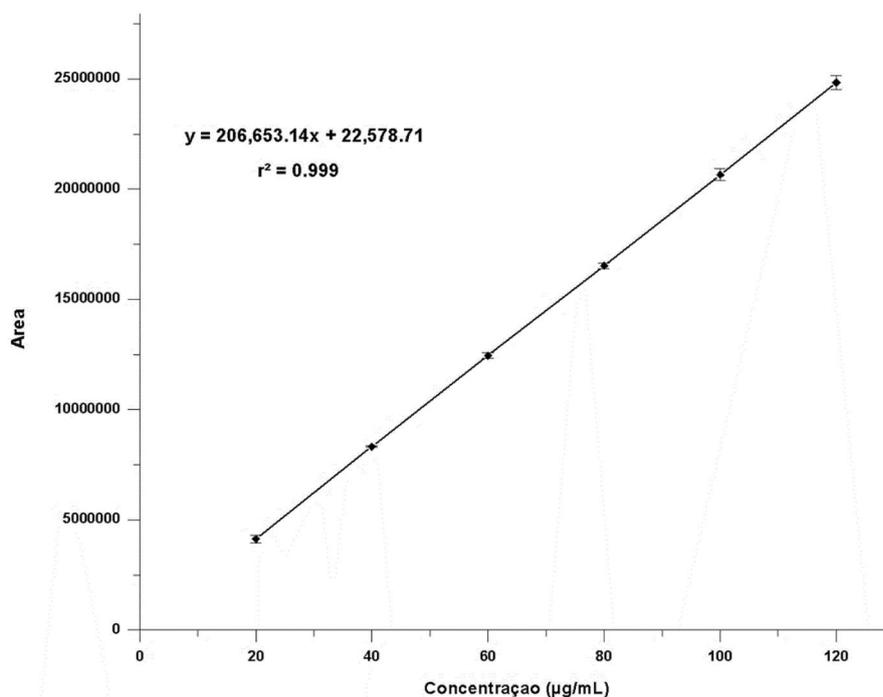
A partir da curva analítica do fármaco foram determinados o coeficiente de correlação (r^2) e a equação da reta. O valor de r^2 foi 0,9999 (Figura 4), valor considerado adequado segundo a norma vigente RDC 166/2017 (BRASIL, 2017) e que comprova a boa linearidade do método. A Tabela 7 apresenta os dados das áreas para determinação de linearidade.

Tabela 7. Áreas obtidas na curva analítica para quantificação da ACZ (n=3).

CON (µg/mL)	Padrão I	Padrão II	Padrão III	Média	DP	CV%
20	4236176	4204309	3936337	4125607,333	164685,521	3,99178855
40	8345739	8287013	8352063	8328271,667	35870,6903	0,4307099
60	12568526	12310407	12461724	12446885,67	129697,674	1,04200904
80	16648481	16404222	16532279	16528327,33	122177,439	0,73920026
100	20932924	20382651	20656749	20657441,33	275137,153	1,33190335
120	25165997	24556578	24807194	24843256,33	306305,808	1,23295354

CON: concentração, DP= Desvio padrão, CV%= Coeficiente de variação

Figura 5. Curva analítica da ACZ obtida por CLAE a 235 nm.



3.2. Teste de filtros

A quantificação da ACZ nos ensaios de solubilidade, perfil de dissolução e teor nas formas farmacêuticas foram realizados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), motivo pelo qual uma avaliação inicial dos filtros foi de vital importância para determinação daquele que possua menor interferência e cujo uso permita obter os resultados mais precisos e exatos. Sabemos que a membrana do filtro e o fármaco podem alterar a adsorção destes durante a filtração causando variações durante a quantificação causando resultados não reais (ZHAO, LIMIAN AND LONG, 2013). Para determinação das melhores condições de filtração foram avaliados filtros de seringa PVDF com tamanho de poro de 0,45 µm e cânula com tamanho de poro de 1,00 µm

para soluções de 20 µg/mL, 60 µg/mL e 120 µg/mL de ACZ. Os filtros demonstraram saturação após 4 mL de descarte, este volume foi necessário para garantir a precisão e adequada recuperação do fármaco (100% de recuperação) (Tabela 8). Baseado nestes resultados podemos considerar que os filtros demonstraram serem inertes e compatíveis com a ACZ, além de apresentarem porosidade adequada para garantir a retenção das partículas nos ensaios de dissolução.

Tabela 8. Áreas obtidas no teste de filtros para as três concentrações de ACZ (n=3).

FILTRO	CONC (µg/mL)	VD	MÉDIA	DP	CV (%)	% REC
PVDF	20	SD	6688892,00	-	-	100,00
		0	6704519,00	10676,49	0,16	100,23
		2	6696329,33	22080,30	0,33	100,06
		4	6702459,33	15051,35	0,22	100,02
	60	SD	19409871,00	-	-	100,00
		0	19319778,33	21031,18	0,11	99,54
		2	19338546,00	18140,23	0,09	100,01
		4	19305034,67	347769,83	1,80	99,82
	120	SD	38058185,00	-	-	100,00
		0	37859539,67	686227,77	1,81	99,48
		2	37760522,67	532330,25	1,41	99,49
		4	37957881,33	169601,54	0,45	100,15
CANULA	20	SD	6688892,00	-	-	100,00
		0	6697663,00	19193,71	0,29	100,13
		2	6696126,00	25047,58	0,37	99,65
		4	6699096,33	37300,26	0,56	99,67
	60	SD	19409871,00	-	-	100,00
		0	18659242,33	754185,09	4,04	96,13
		2	19104295,83	154489,59	0,81	107,26
		4	19296103,00	12572,43	0,07	100,21
	120	SD	38058185,00	-	-	100,00
		0	37901442,67	121898,64	0,32	99,59
		2	37636397,67	459967,32	1,22	99,64
		4	37903216,67	159391,87	0,42	102,15

CONC: concentração, VD: Volume de descarte, SD: sem descarte, DP: desvio padrão, CV (%): coeficiente de variação e %REC: porcentagem de recuperação do fármaco

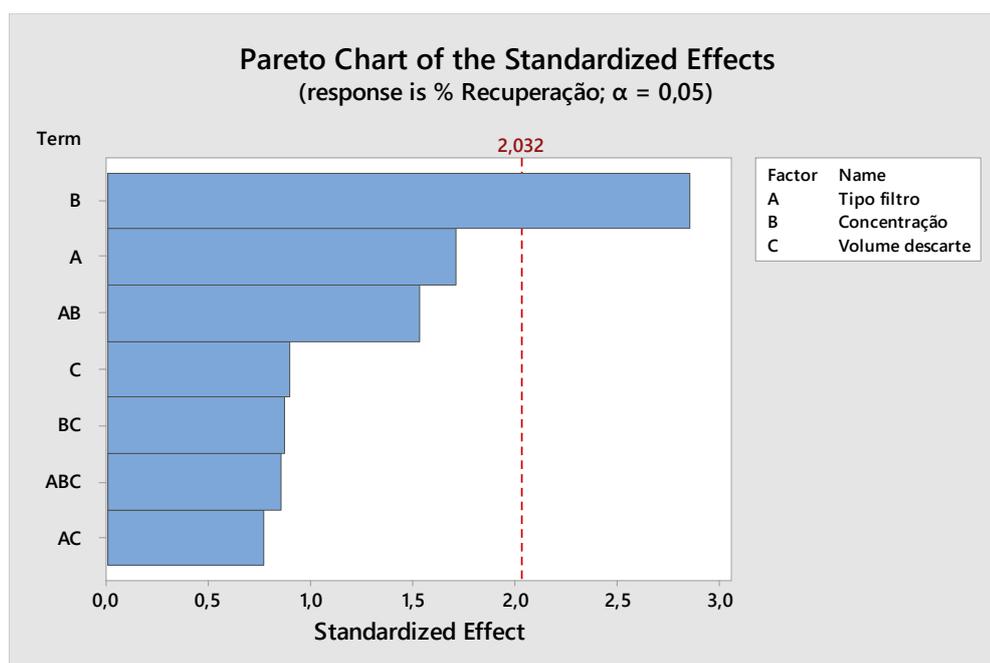
Para uma melhor avaliação das condições de filtração foi realizado uma análise de variância (ANOVA) (Tabela 9) e o gráfico de Pareto (Figura 6) que indicaram que dentre os fatores estudados, a concentração é a variável de maior impacto na porcentagem de recuperação do fármaco (REC %).

Tabela 9. Análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos para o teste de filtros, os resultados com valor de $p < 0,05$ são considerados significativos.

Efeitos	GL	SQ	MQ	Valor-F	p-valor
TF	1	4,482	4,4824	2,94	0,095
CON	2	17,467	8,7336	5,73	0,007
VD	2	3,060	1,5302	1,00	0,377
TF*CON	2	6,501	3,2506	2,13	0,134
TF*VD	2	2,513	1,2566	0,82	0,447
CON*VD	4	6,497	1,6243	1,07	0,389
TF*CON*VD	4	6,344	1,5860	1,04	0,401
Erro	34	51,819	1,5241		
Total	53	100,523			

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; MQ: média quadrática, Valor-p: nível de significância, TF: tipo de filtro, VD: volume de descarte e CON: concentração.

Figura 6. Gráficos de Pareto para os efeitos das variáveis sobre % de recuperação. As barras à direita da linha vermelha representam os efeitos significativos.



3.3. Micronização

A metodologia de delineamento experimental tipo fatorial completo 2^3 consiste em um método estatístico eficaz para otimizar processos, sendo utilizada com a finalidade de reduzir o número de ensaios experimentais, que consequentemente permite diminuir o tempo do desenvolvimento de amostras de ACZ micronizada e a quantidade de matéria-prima a ser utilizada.

No delineamento foram avaliadas as variáveis independentes (fatores): fluxo de alimentação ($\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$), pressão de alimentação (bar) e pressão de micronização ou de Venturi (bar) sobre a relação da distribuição do tamanho de partículas do fármaco [$\text{RT} = (\text{d}90\% - \text{d}50\%) / (\text{d}50\% - \text{d}10\%)$]. Esta resposta permitiu visualizar o impacto da micronização no tamanho de partículas. A Tabela 10 apresenta os resultados dos 8 ensaios realizados, assim como os fatores e níveis empregados no delineamento.

Tabela 10. Valores da relação da distribuição do tamanho (RT) obtidos para amostras de ACZ micronizada.

Ensaio	Amostra	FA (g/mL)	PM (bar)	PA (bar)	RT
1	ACZ M1	0,50	2,50	3,50	1,36
2	ACZ M2	0,70	2,50	3,50	1,33
3	ACZ M3	0,50	4,00	5,00	1,49
4	ACZ M4	0,70	4,00	5,00	1,47
5	ACZ M5	0,50	2,50	4,50	1,52
6	ACZ M6	0,70	2,50	4,50	1,37
7	ACZ M7	0,50	4,00	6,00	1,78
8	ACZ M8	0,70	4,00	6,00	1,63

FA: Fluxo de alimentação, PM: pressão de micronização, PA: pressão de alimentação.

A análise de variância (Tabela 11) e o gráfico de Pareto (Figura 7) indicaram que dentre os fatores estudados o fluxo de alimentação, a pressão de micronização e pressão de alimentação e suas interações demonstraram impacto significativo na redução do tamanho das partículas do fármaco, em função do parâmetro adotado como resposta. O nível de significância denotado pelo valor p , apresenta valor menor que 0,05 (para $\alpha=0,05$) portanto o modelo obtido é considerado estatisticamente significativo (MONTGOMERY, 2001), demonstrando-se que os termos do nosso modelo têm efeitos significativos sobre a resposta.

A Tabela 12 apresenta a estimativa dos coeficientes de regressão mediante os quais podemos obter a Equação 2 (Eq.2). Esta equação representa o modelo matemático mediante o qual foi avaliado o impacto das variáveis estudadas sobre a relação da distribuição do tamanho de partículas do fármaco (RT). A avaliação do desempenho global do modelo inclui o coeficiente de determinação, indicado por R^2 , o qual deve ser analisado conjuntamente ao R^2 ajustado. Quando ambos diferem drasticamente, há indicação de que termos não significativos foram incluídos no modelo (TRINH, KANG, 2011), no nosso estudo os dois valores não foram significativamente diferentes (Tabela 12). Adicionalmente, o R^2 de previsão também

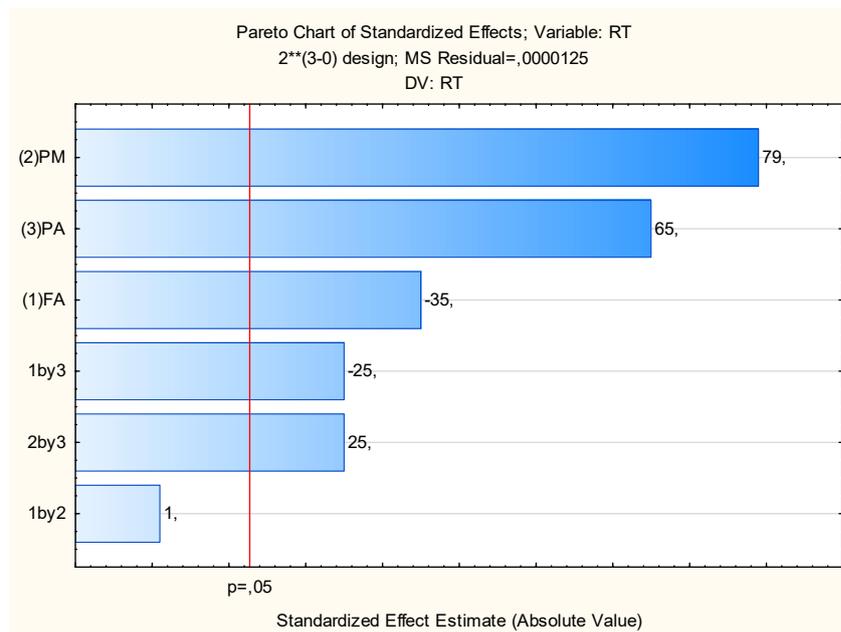
não foi substancialmente diferente destes valores, que indica elevada probabilidade de que os dados previstos (teóricos) sejam próximos aos valores práticos.

Tabela 11. Análise de variância para os dados de relação da distribuição do tamanho de partículas do fármaco (RT) das amostras de ACZ micronizada.

Efeito	SQ	GL	MQ	Valor-F	p-valor
FA	0,015312	1	0,015313	1225,000	0,018184
PM	0,078012	1	0,078012	6241,000	0,008058
PA	0,052812	1	0,052812	4225,000	0,009793
FA*PM	0,000012	1	0,000012	1,000	0,500000
FA*PA	0,007813	1	0,007813	625,000	0,025451
PM*PA	0,007812	1	0,007812	625,000	0,025451
Error	0,000012	1	0,000013		
Total	0,161787	7			

SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática, Valor-p: nível de significância, FA: Fluxo de alimentação, PM: pressão de micronização e PA: pressão de alimentação.

Figura 7. Gráficos de Pareto para os efeitos das variáveis independentes sobre a relação de distribuição de tamanhos das partículas (RT) das amostras de ACZ micronizada. As barras à direita da linha vermelha representam os efeitos significativos



FA: Fluxo de alimentação, PM: pressão de micronização e PA: pressão de alimentação.

$$RT = 0,9608 + 0,4458 FA - 0,0033 PM + 0,2667 PA + 0,0167 FA * PM - 0,6250 FA * PA + 0,08333 PM * PA \quad (\text{Eq.2})$$

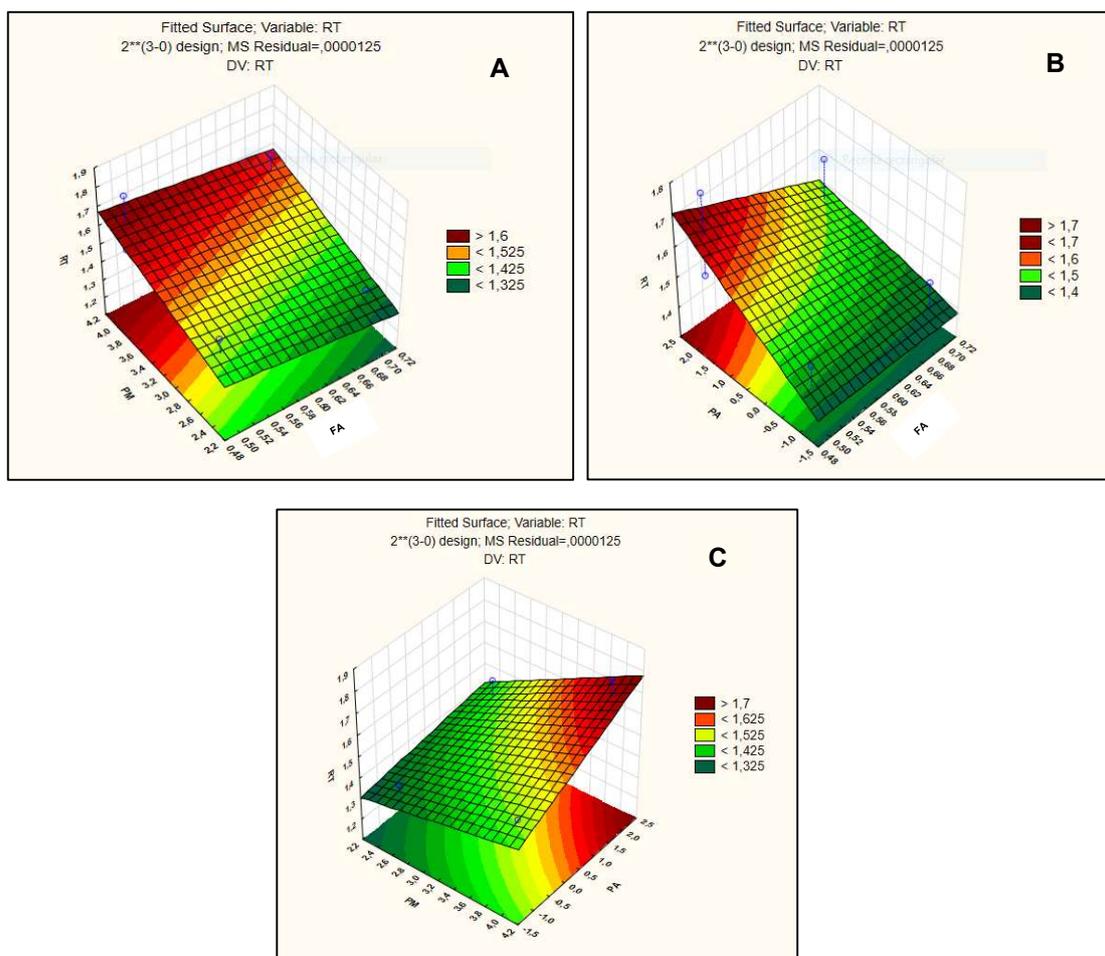
Tabela 12. Teste para significância dos coeficientes codificados de regressão do modelo selecionado no ensaio para avaliação do RT das amostras de ACZ micronizada.

Termos	Coefficientes	C-DP	Estatística T	Valor -p	VIF
FA	-0,043750	0,001250	-35,00	0,018184	1,0
PM	0,098750	0,001250	79,00	0,008058	1,0
PA	0,081250	0,001250	65,00	0,019793	1,0
FA * PM	0,001250	0,001250	1,00	0,500000	1,0
FA * PA	-0,031250	0,001250	-25,00	0,025451	1,0
PM * PA	0,031250	0,001250	25,00	0,025451	1,0
DP= 0,0035355 R²= 99,99% R² (aj) = 99,95% R² (prev) = 99,51%					

R2: coeficiente de determinação; R2 (aj): coeficiente de determinação ajustado; R2 (prev): coeficiente de determinação de previsão do modelo ajustado; DP = desvio-padrão; Valor-p: nível de significância; C- DP: coeficientes de desvio padrão.

Os gráficos de superfície de resposta (Figura 8) permitiram observar a comparação da influência significativa dos fatores avaliados assim como a interação entre eles sobre a variável dependente (RT).

Figura 8. Superfície de resposta para RT em função dos fatores estudados.



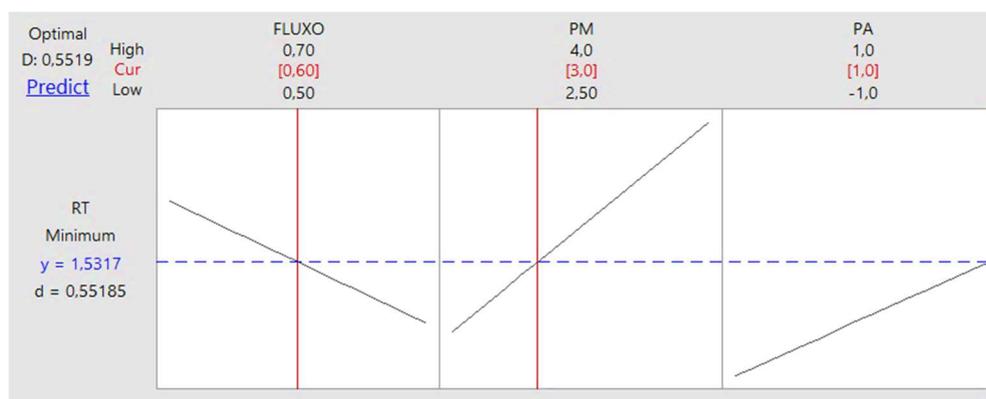
FA: Fluxo de alimentação, PM: pressão de micronização e PA: pressão de alimentação.

3.3.1. Verificação do modelo matemático

O delineamento experimental tipo fatorial completo 2^3 avaliou a influência dos parâmetros do processo de micronização sobre a relação da distribuição do tamanho de partículas (RT) do fármaco. Com este estudo foi possível obter uma base racional científica baseada na estatística para o entendimento da influência destes parâmetros do processo de micronização.

Para poder validar a equação do modelo matemático (Equação 2) estabelecida para RT, foi conduzido um experimento, sob as condições mencionadas nas Figuras 9. Para estas condições, o RT prático foi 1,53, valor encontrado dentro do intervalo de confiança previsto, calculado com $\alpha=0,05$ (Tabela 13). O resultado prático demonstra a validação do modelo matemático obtido.

Figura 9. Gráfico de otimização da avaliação do RT da ACZ micronizada contendo as seguintes variáveis fluxo de alimentação (g/mL), pressão de micronização (PM) e pressão de alimentação (PA).



A Tabela 13 apresenta as condições de micronização e os valores de RT teórico e prático da amostra de ACZ micronizada feita utilizando a Equação 2 com a finalidade de desafiar este modelo matemático. A Tabela 14 apresenta os resultados de tamanho de partícula por difração de raios laser para amostra mencionada.

Tabela 13. Relação da distribuição do tamanho de partículas (RT) teórico e prático (n=3).

Amostra	Fluxo (g/mL)	PM (bar)	PA (bar)	RT teórico	RT prático	95 % IC
ACZ-D	0,60	3,00	5,00	1,531667	1,53	1,507990: 1,555343

Tabela 14. Valores de diâmetro médio, d10%, d50% e d90% da ACZ -D (n=10).

Nome	d10% (μm)	d50% (μm)	d90% (μm)	Tamanho médio (μm)	DP
ACZ-D	1,13	3,00	5,90	3,29	0,08

3.4. Caracterização da ACZ matéria prima (ACZ-MP) e das amostras de ACZ micronizada

3.4.1. Tamanho de partículas

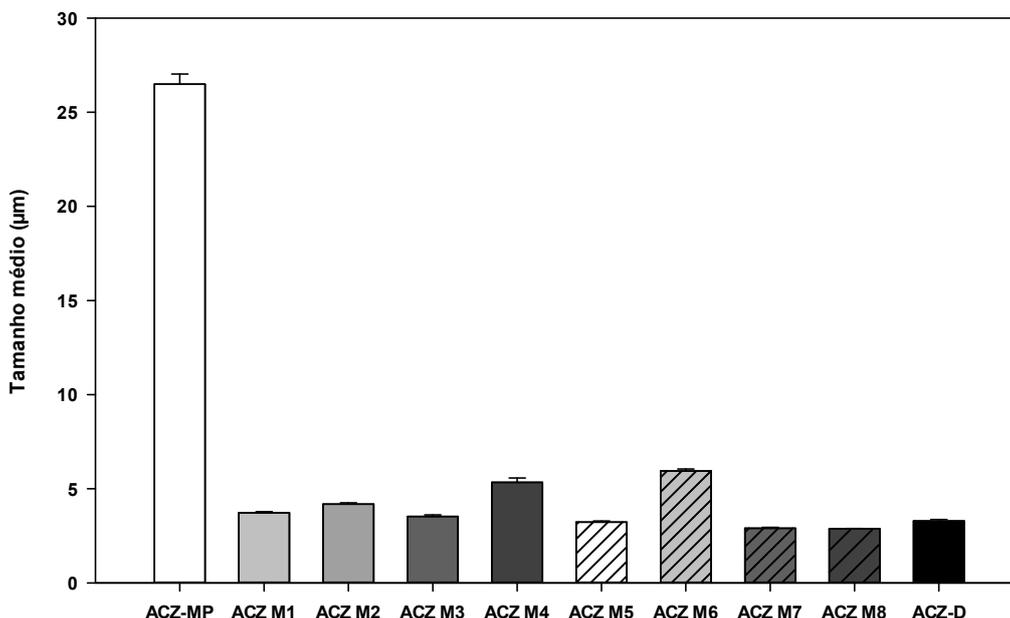
A Tabela 15 apresenta a distribuição de tamanho das partículas da ACZ MP e das amostras de ACZ micronizada. A avaliação do tamanho de partículas foi feita utilizando o método de difração de raios laser em via úmida, que por sua vez utilizou como meio dispersante uma solução saturada do fármaco para evitar a possível solubilização das partículas no momento da leitura (KECK; MÜLLER, 2008). O tamanho médio das partículas das amostras de ACZ micronizada foi drasticamente reduzido quando comparados com tamanho inicial do fármaco. A Figura 10, corroborou esses achados e demonstrou, que dependendo das condições aplicadas, se obteve diferenças nas faixas granulométricas dos produtos.

Tabela 15. Valores de diâmetro médio, d10%, d50% e d90% da ACZ -MP e das amostras de ACZ micronizada (n=10).

Nome	d10% (μm)	d50% (μm)	d90% (μm)	Tamanho médio (μm)	DP
ACZ MP	7,90	24,44	47,77	26,49	0,54
ACZ M1	1,17	3,48	6,62	3,72	0,06
ACZ M2	1,25	3,94	7,50	4,18	0,07
ACZ M3	1,06	3,24	6,49	3,53	0,08
ACZ M4	1,22	4,86	10,20	5,34	0,23
ACZ M5	1,04	2,94	5,85	3,23	0,06
ACZ M6	1,36	5,46	11,07	5,94	0,11
ACZ M7	0,93	2,54	5,41	2,90	0,05
ACZ M8	0,95	2,58	5,23	2,87	0,02

ACZ MP: acetazolamida matéria prima, DP: desvio padrão

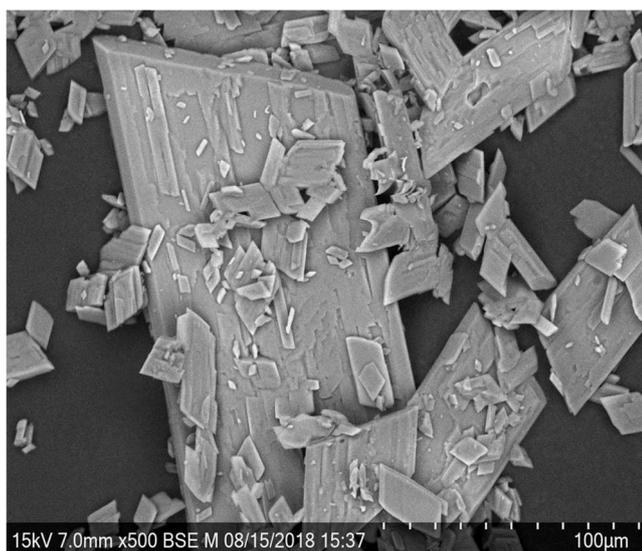
Figura 10. Tamanho médio da ACZ-MP e das amostras de ACZ micronizada (n=10).



3.4.2. Análise morfológica e tamanho do cristal

Esta análise permitiu monitorar a morfologia da ACZ antes e após micronização. O uso do programa Image.J determinou o tamanho das partículas das amostras através das micrografias. Na Figura 11 observou-se que a ACZ MP apresentou hábito cristalino em forma de placa o que explica o fluxo ruim de escoamento do fármaco.

Figura 11. Micrografia MEV da ACZ MP (aumento:500x).



Após a micronização as amostras de ACZ micronizada (ACZ M1- ACZ M8) apresentaram hábito cristalino de forma granular (Figura 12-20) com uma drástica redução do tamanho de partículas. Durante a preparação das amostras, com objetivo

de poder determinar o tamanho real nas micrografias, estas foram preparadas com solução saturada do fármaco para evitar a solubilização. Observa-se, na Figura 12, que a diluição utilizada para a amostra ACZ M1 não foi ideal devido a impossibilidade de observar as partículas de forma isolada. O contrário foi observado para as amostras de ACZ M2- ACZ M8 nas quais utilizou-se o programa ImageJ que mensurou 1.910 μm como menor valor de tamanho de partícula e 6,388 μm como aquele de maior tamanho. Os tamanhos médios determinados pelo programa ImageJ para estas amostras estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Tamanho médio das amostras de ACZ micronizada determinadas a partir do programa ImageJ.

Amostra	T. mínimo (μm)	T. máximo (μm)
ACZ M1	0,731	8,933
ACZ M2	0,781	12,146
ACZ M3	0,448	6,780
ACZ M4	0,693	7,985
ACZ M5	0,501	6,829
ACZ M6	0,686	14,901
ACZ M7	0,873	10,111
ACZ M8	0,605	5,095
ACZ- D	0,758	11,409

Figura 12. Micrografia MEV da ACZ M1. A: aumento:1200x e B: 1500X

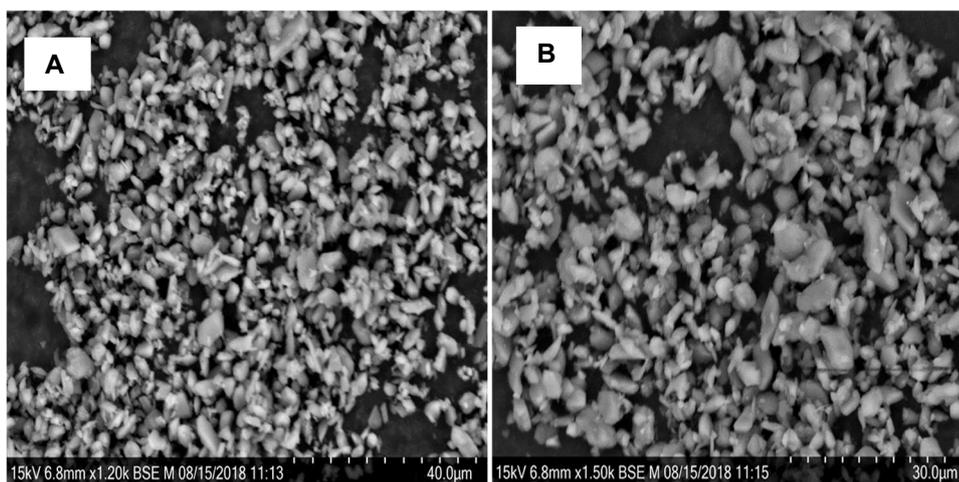


Figura 13. Micrografia MEV da ACZ M2. A: aumento:1200x e B:micrografia com ImageJ.

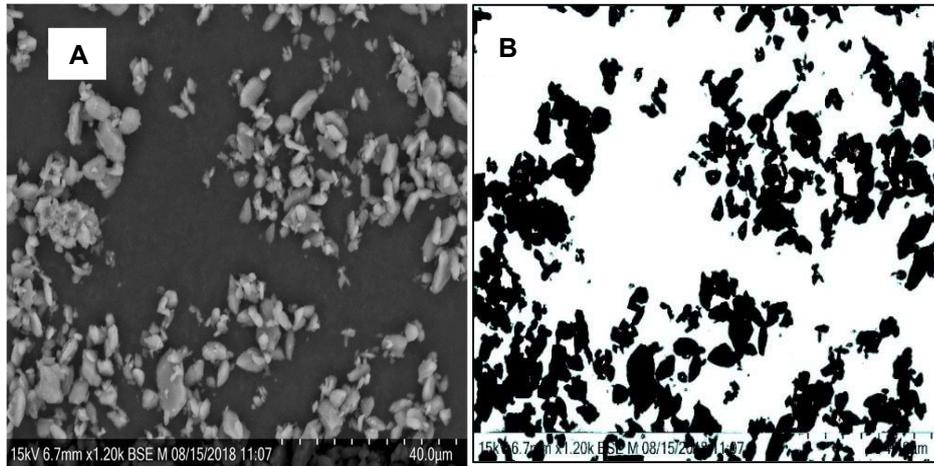


Figura 14. Micrografia MEV da ACZ M3. A:aumento:1500x e B: micrografia com ImageJ.

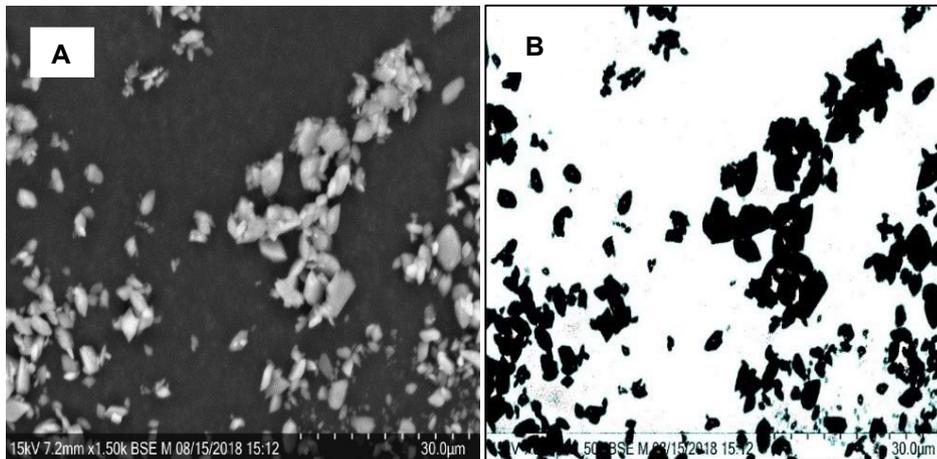


Figura 15. Micrografia MEV da ACZ M4. A:aumento:1800x e B:micrografia com ImageJ.

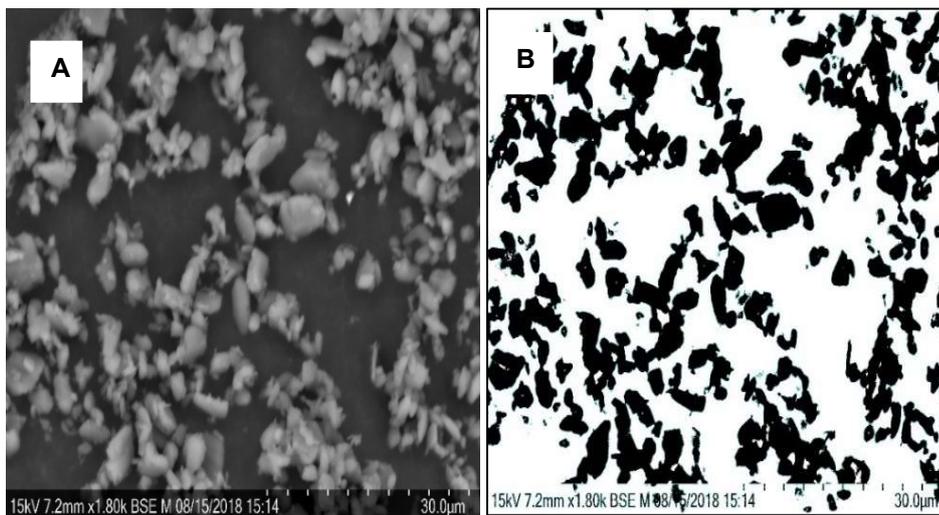


Figura 16. Micrografia MEV da ACZ M5. A: aumento:1800x e B:micrografia com ImageJ.

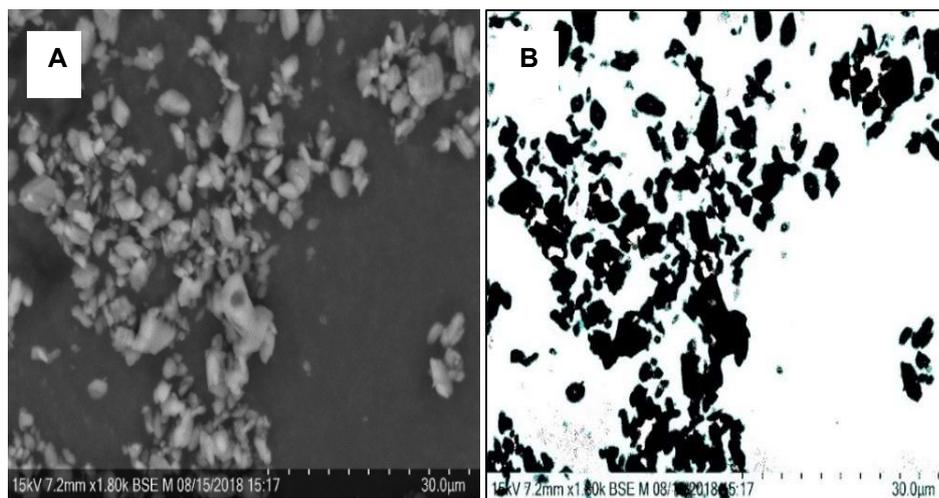


Figura 17. Micrografia MEV da ACZ M6. A: aumento:1800x e B:micrografia com ImageJ.

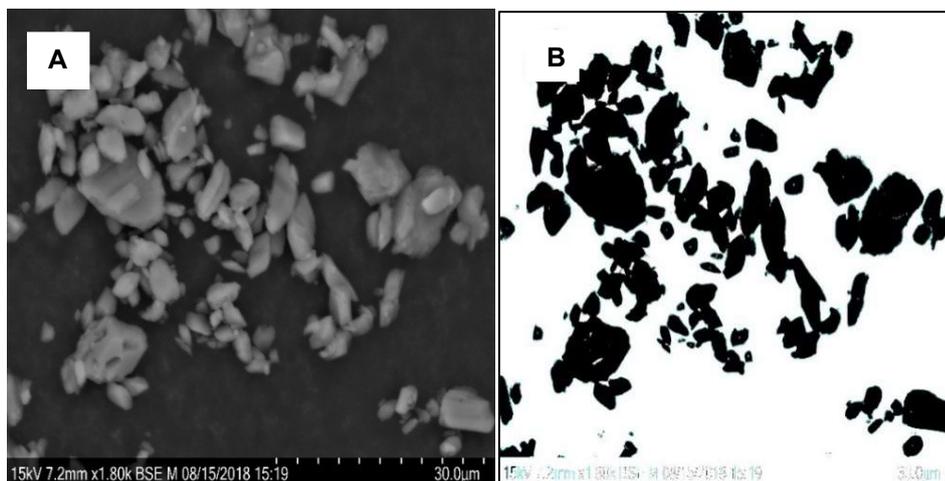


Figura 18. Micrografia MEV da ACZ M7. A: aumento:1800x e B:micrografia com ImageJ.

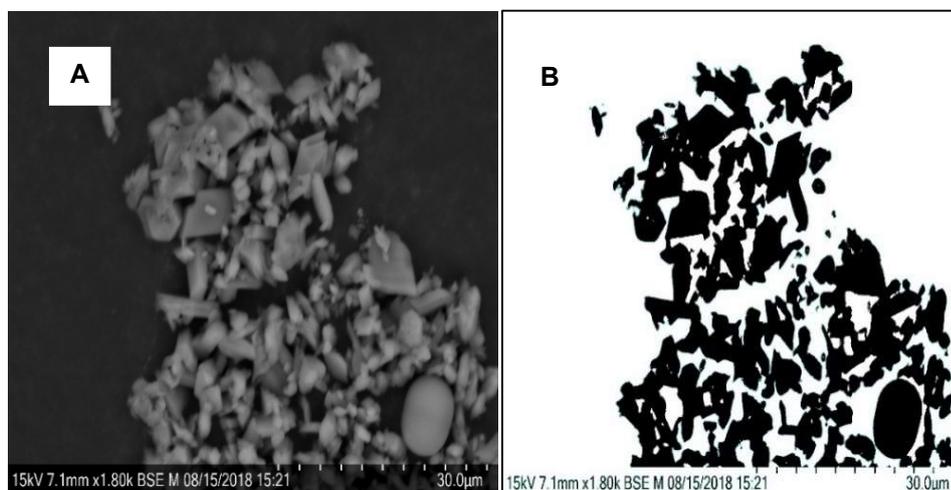


Figura 19. Micrografia MEV da ACZ M8. A: aumento:1800x e B:micrografia com ImageJ.

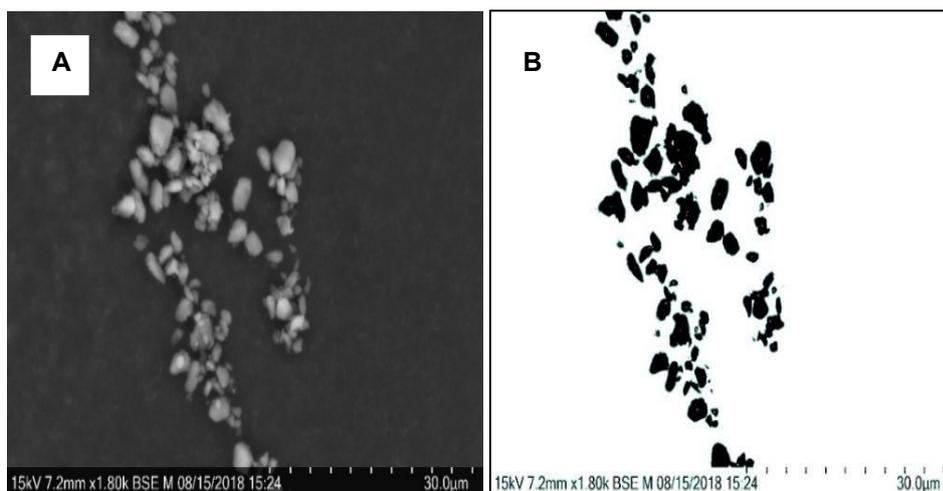
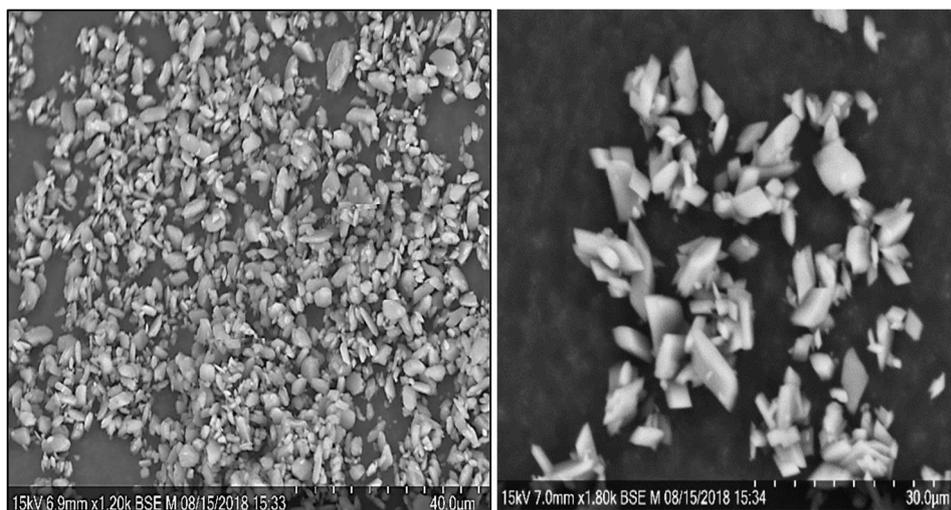


Figura 20. Micrografia MEV da ACZ-D. A: aumento:1800x e B:micrografia com ImageJ.



3.4.3. Difração de raios X (DRX)

A Figura 21 apresenta o padrão de difração de raios X (PDRX) da ACZ MP e da ACZ padrão da forma A (ACZ P), encontrada na literatura. O PDRX da forma A apresenta picos característicos em $9,9^\circ$; $24,8^\circ$ e $29,4^\circ$ já a forma B apresenta picos característicos em $13,7^\circ$; $19,6^\circ$; $22,3^\circ$; $26,0^\circ$ e $26,9^\circ$ (GRIESSER; BURGER; MEREITER, 1997) (UMEDA et al., 1985). Portanto, quando comparado os PDRX da forma polimórfica A e da nossa matéria prima, ambos apresentaram picos similares nos mesmos valores de 2θ , motivo pelo qual foi determinada a presença desta forma polimórfica na ACZ matéria prima.

Os PDRX das amostras de ACZ micronizada (Figura 22) refletem sobreposição dos principais picos encontrados na matéria prima sendo concluído que todos eles correspondem a forma polimórfica A. De forma complementar, foram realizados posteriores ensaios de refinamento de Rietveld nas amostras para se determinar de forma quantitativa uma possível mistura das formas polimórficas A e B.

Figura 21. Padrões de difração de raios X (PDRX) da ACZ matéria prima e da ACZ padrão (polimorfo A ou II) achada na literatura. (GRIESSER; BURGER; MEREITER, 1997).

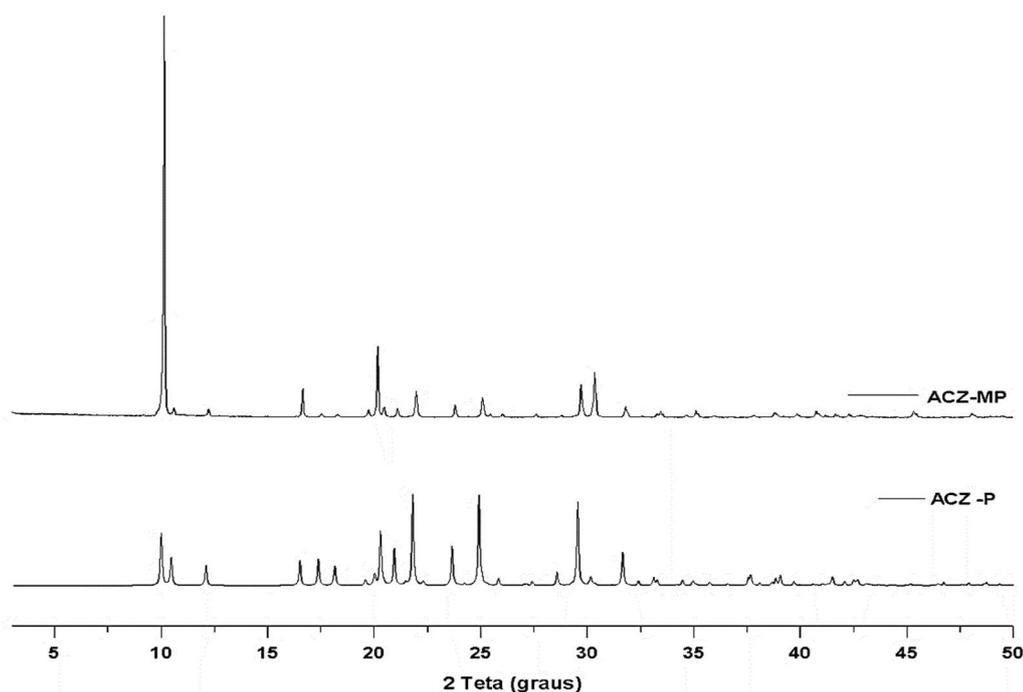
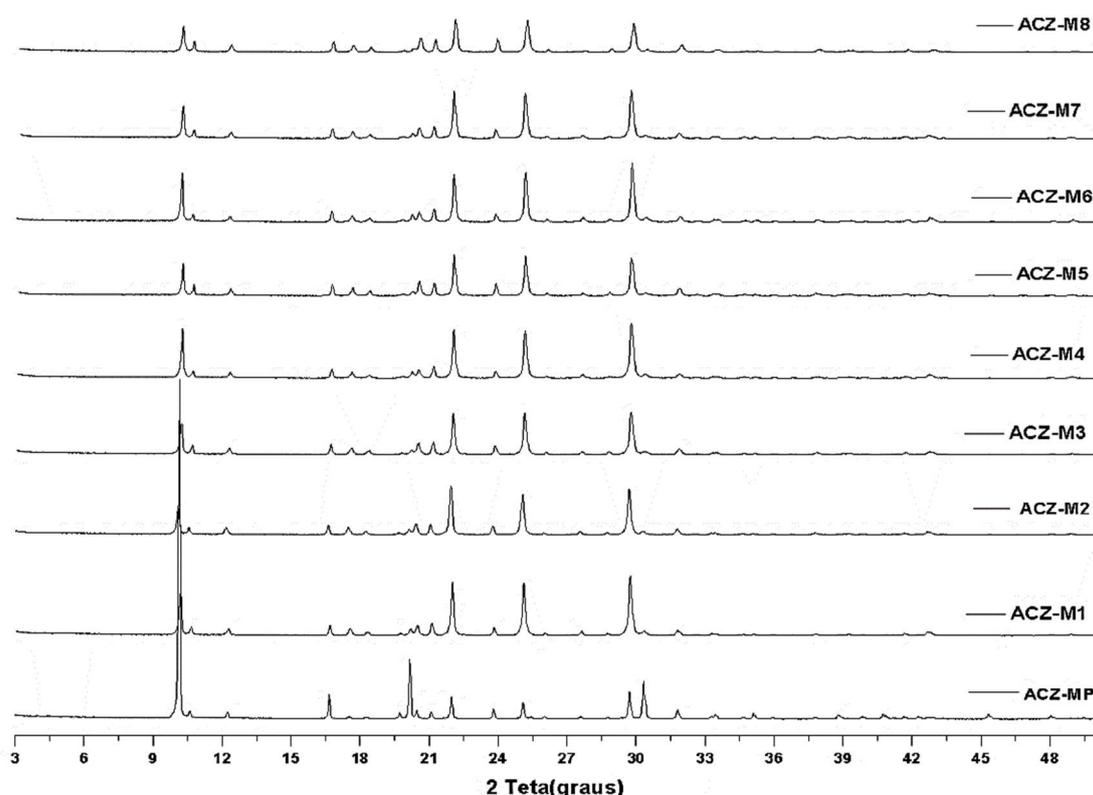


Figura 22. Padrões de difração de raios X (PDRX) da ACZ-MP e das amostras de ACZ micronizada.



O refinamento pelo método de Rietveld (RIETVELD, 1969) é uma ferramenta na análise estrutural de compostos cristalinos que permite determinar a proximidade do padrão difratométrico teórico calculado (ACZ P) (Y_{Cal}) com o padrão de difração observado nas amostras (Y_{obs}). Os resultados por este método permitem fornecer informações sobre as formas polimórficas presentes em um determinado material, tamanho de partícula assim como a quantificação da composição (porcentagem de formas polimórficas) em caso de materiais com possível mistura (GOMES, L. B.; POKORNY, A.; BERGMANN, 2014).

Na Tabela 17 são apresentados os indicadores numéricos de refinamento ou também chamados de critérios de refinamento (índices R) que fornecem uma estimativa da qualidade do método (Figura 23-31). Entre os índices avaliados temos o índice de discordância (R_{wp}) que avalia a qualidade calculando a diferença percentual entre o padrão e as leituras observadas; o R-esperado (R_{esp}) que é o melhor valor possível para R_{wp} ; o R_{Bragg} goodness-of-fit (G) ($G^2=X^2= R_{\text{wp}}/R_{\text{exp}}$) e R_{Bragg} (GOMES, L. B.; POKORNY, A.; BERGMANN, 2014; TOBY, 2006).

Tabela 17. Índices de qualidade do refinamento de Rietveld para ACZ MP e amostras da ACZ micronizada.

Amostra	R _{wp} (%)	R _{esp} (%)	R _{Bragg} (%)	X ²
ACZ MP	16,07	5,17	3,85	3,11
ACZ M1	8,35	5,18	1,59	1,61
ACZ M2	8,25	5,34	1,46	1,54
ACZ M3	9,31	5,34	2,02	1,74
ACZ M4	9,14	5,19	2,15	1,75
ACZ M5	8,81	5,45	1,65	1,61
ACZ M6	8,90	5,29	1,74	1,68
ACZ M7	8,32	5,30	1,52	1,57
ACZ M8	8,44	5,50	1,60	1,54

Os valores obtidos para R_{wp} (índice de discordância) das amostras revelaram valores inferiores a 15% que indica um refinamento bem sucedido (MCCUSKER et al., 1999; YOUNG, 1993). Outro indicador numérico da qualidade foi o índice de Bragg (R_{Bragg}), que mede a concordância entre as reflexões observadas (Y_{Obs}) e calculadas (Y_{Cal}), os valores pequenos determinado para este índice (< 5%) revelaram que o modelo foi adequado. O índice esperado (R_{esp}), mede a qualidade das intensidades coletadas (amostras analisadas). Os ensaios de refinamento realizados (Figura 25-33) podem ser considerados bem-sucedidos já que os valores determinados para X² foram inferiores a 5%, este valor reflete um refinamento otimizado. Finalmente se conclui a presença da forma polimórfica A em todas as amostras de ACZ micronizada (DINNEBIER, 2001).

Figura 23. Difratoograma refinado pelo método de Rietveld para a amostra de ACZ MP.

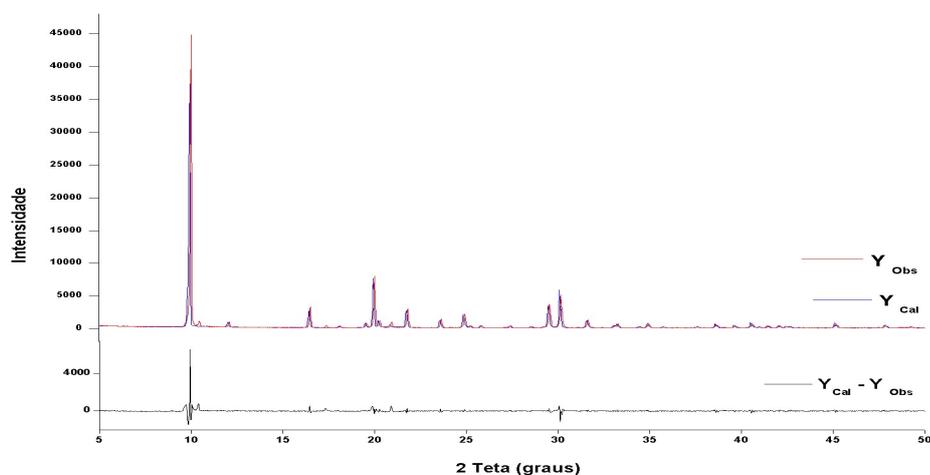


Figura 24. Difratoograma refinado pelo método de Rietveld para a amostra de ACZ M1.

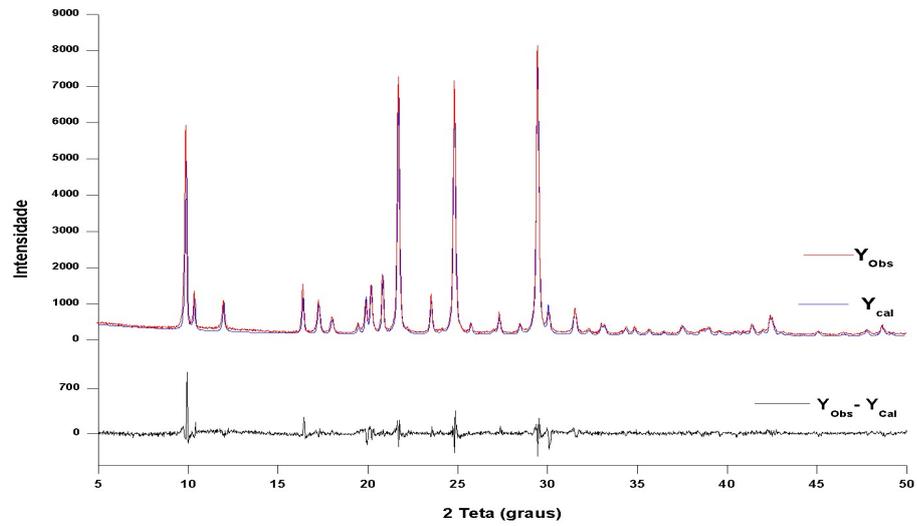


Figura 25. Difratoograma refinado pelo método de Rietveld para a amostra de ACZ M2.

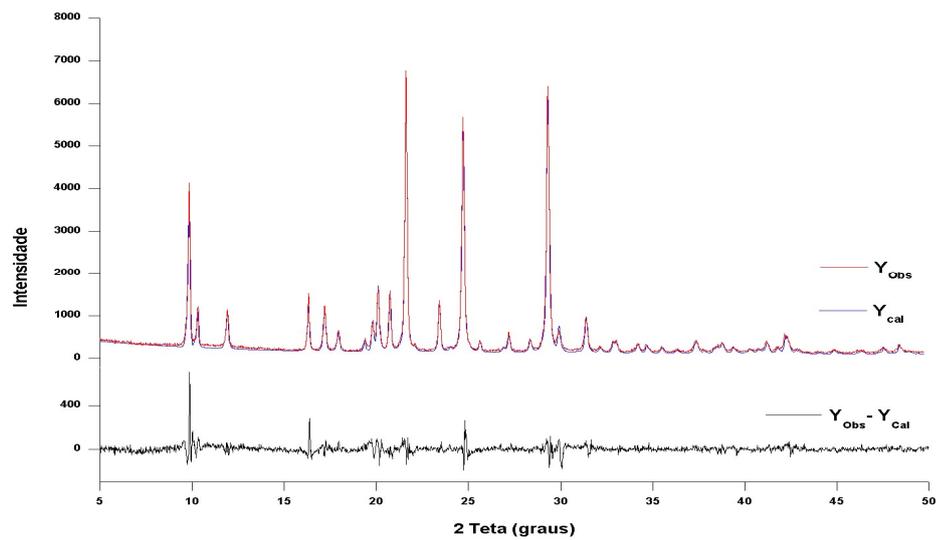


Figura 26. Difratoograma refinado pelo método de Rietveld para a amostra de ACZ M3.

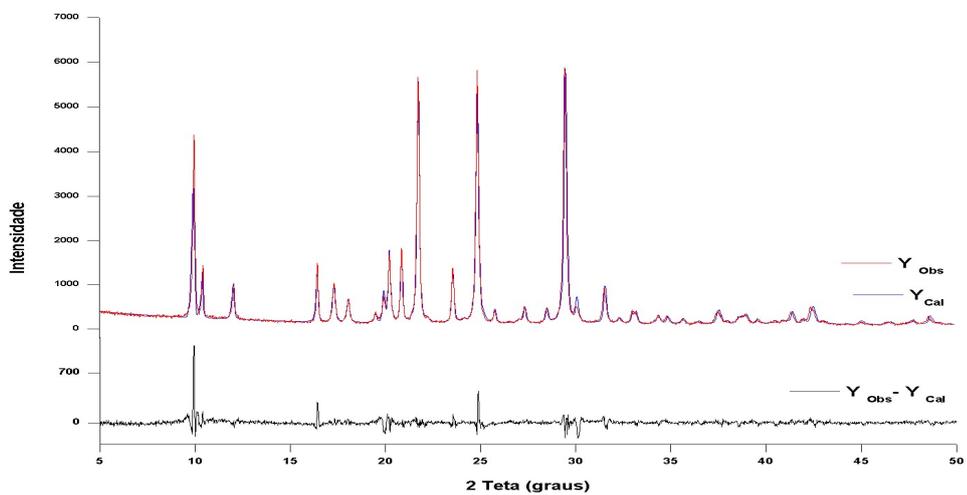


Figura 27. Difratoograma refinado pelo método de Rietveld para a amostra de ACZ M4.

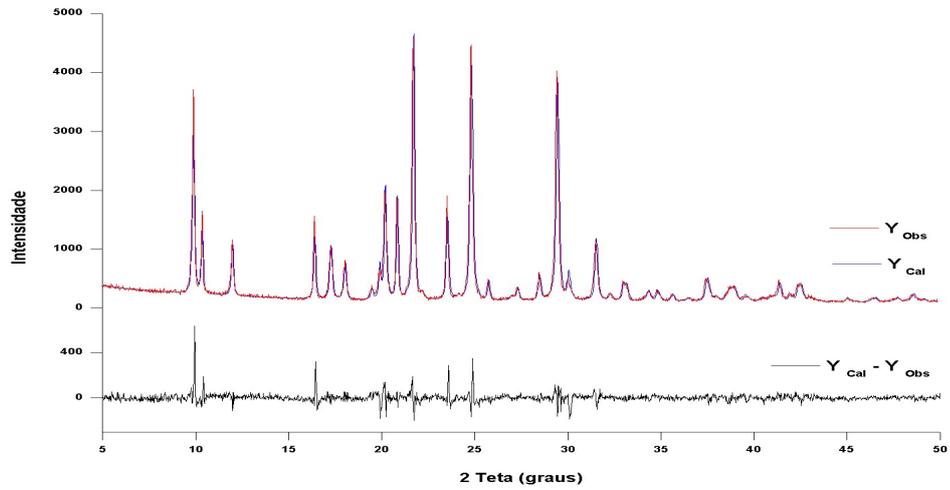


Figura 28. Difratoograma refinado pelo método de Rietveld para a amostra de ACZ M5.

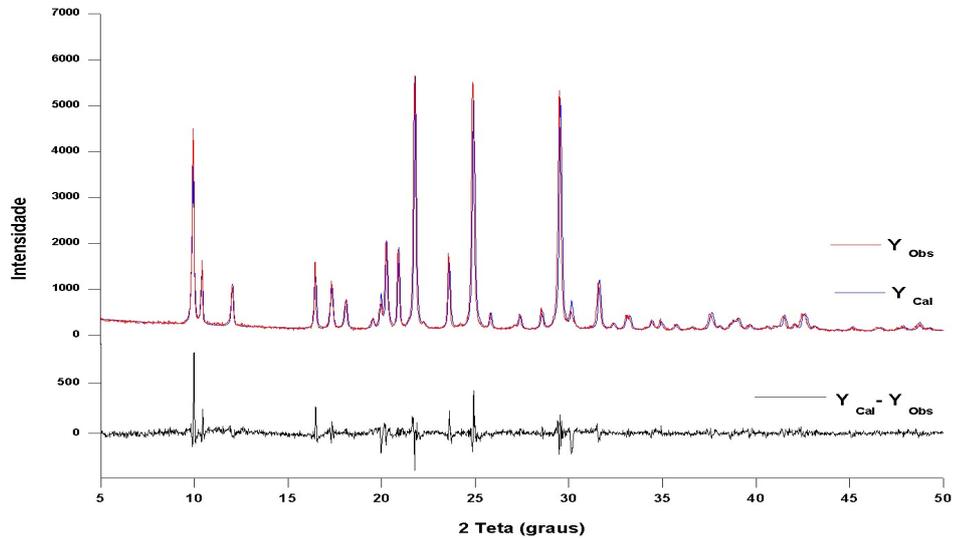


Figura 29. Difratoograma refinado pelo método de Rietveld para a amostra de ACZ M6.

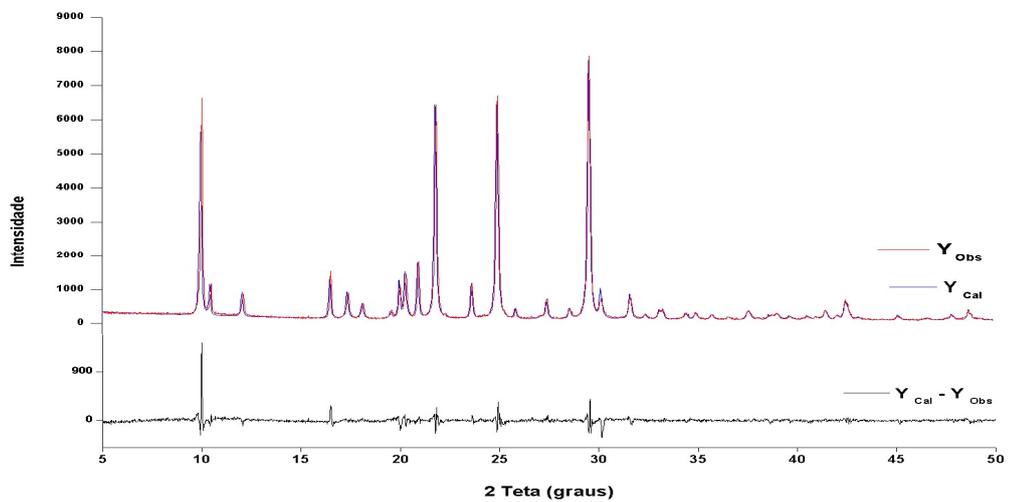


Figura 30. Difratoograma refinado pelo método de Rietveld para a amostra de ACZ M7.

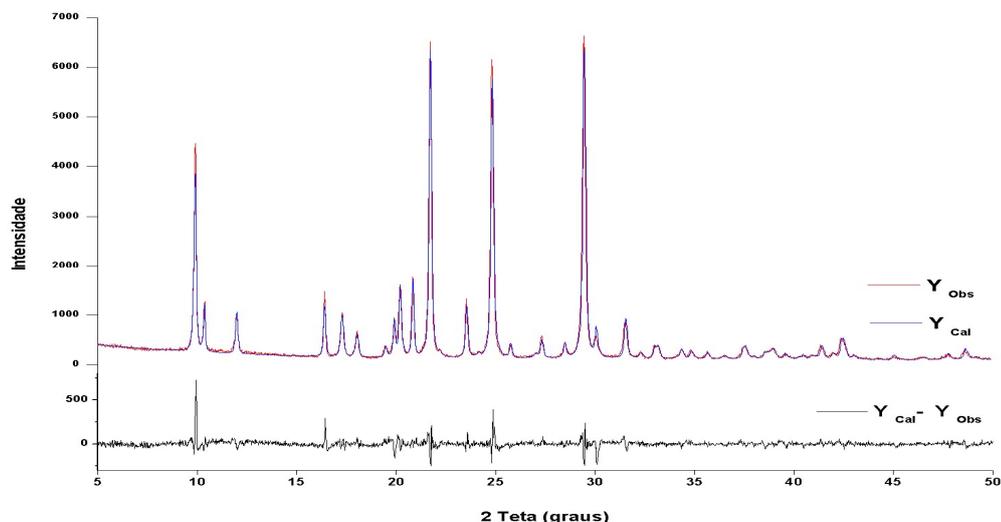
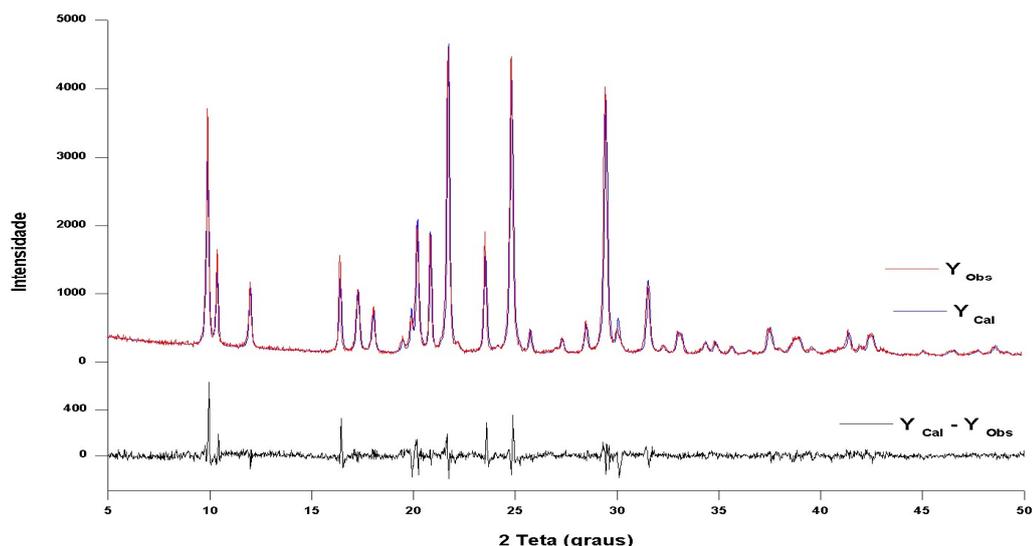


Figura 31. Difratoograma refinado pelo método de Rietveld para a amostra de ACZ M8.

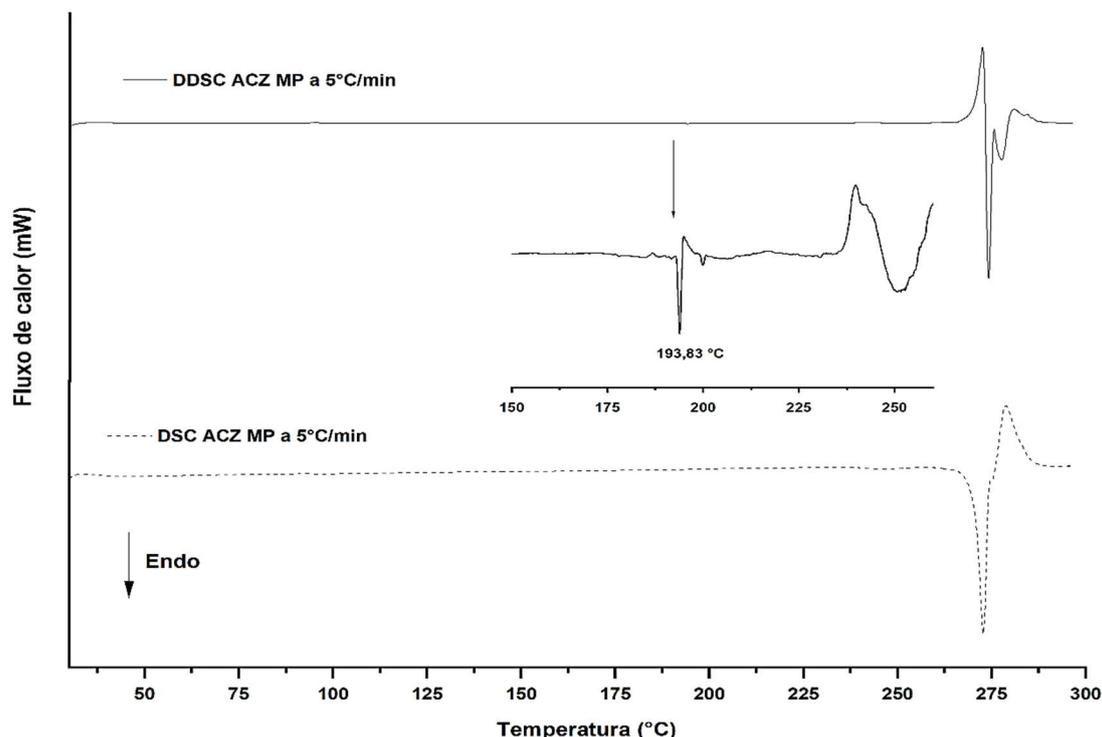


3.4.4. Calorimetria exploratória diferencial

A curva DSC da ACZ MP é apresentada na Figura 32. Observa-se que o fármaco apresenta uma endoterma correspondente ao ponto de fusão com valor T_{pico} em 251,80 °C, que posteriormente é seguido por uma decomposição com T_{pico} em 272,79 °C. Segundo a literatura o ponto de fusão característico da ACZ está no intervalo de 251-263 °C sendo que a diferença entre as duas formas polimórficas são que a forma polimórfica A apresenta dois picos endotérmicos, o primeiro aproximadamente entre os 190°C e 205 °C que corresponde à transição da forma A para B, seguido pelo ponto de fusão no mesmo valor T_{pico} da forma polimórfica B

(UMEDA et al., 1985) (GRIESSER; BURGER; MEREITER, 1997; UMEDA et al., 1985). Para melhor visualização dos eventos térmicos foi utilizada a curva DDSC da matéria prima mediante a qual pode ser observado o evento característico de transição da forma polimórfica A para B ao redor de 200 °C (T_{pico} em 193,83 °C).

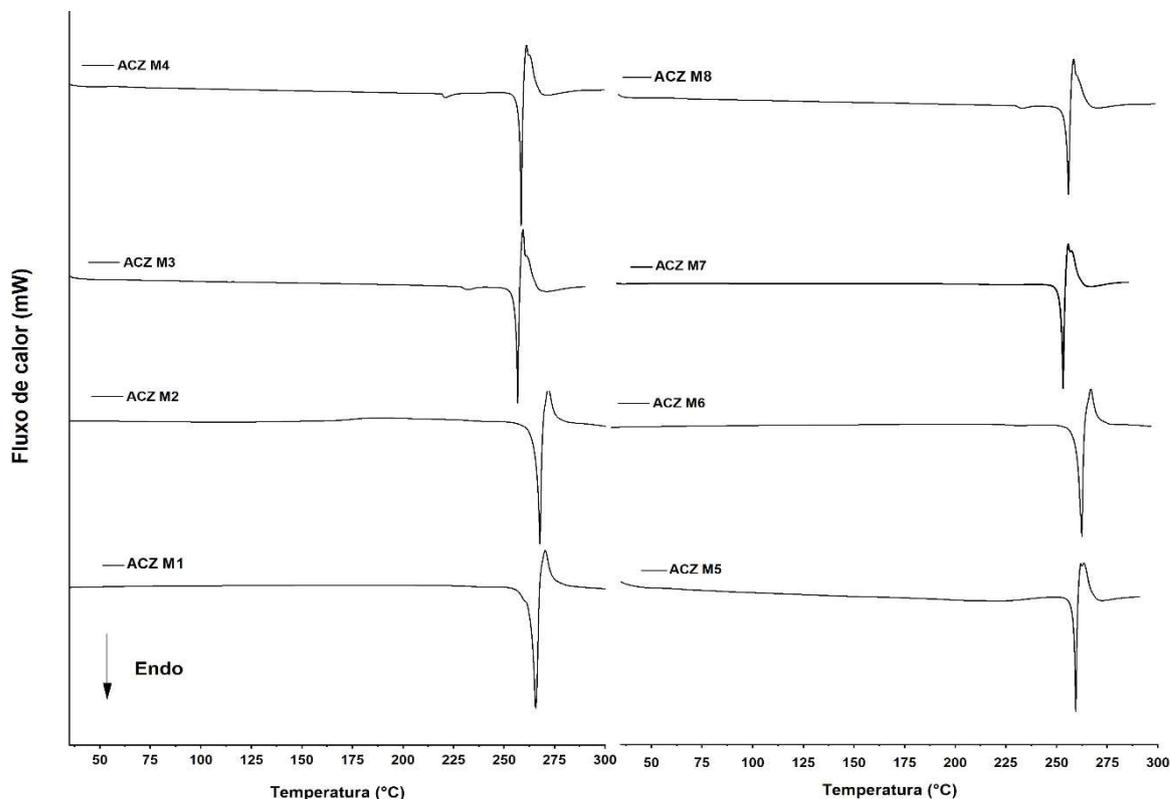
Figura 32. Curvas DSC e DDSC da ACZ-MP a 5°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL. min⁻¹.



A Figura 33 apresenta as curvas DSC das amostras de ACZ micronizada. Semelhante ao que aconteceu com a ACZ-MP não foi observado de forma definida o evento de transição polimórfica. Dessa forma foi realizado um ensaio complementar com uma das amostras de ACZ micronizada (ACZ M3) em diferentes razões de aquecimento que pudéssemos observar os eventos característicos da forma polimórfica A citada na literatura (URAKAMI et al., 2002).

Nas Figuras 34-36 podemos observar como a razão de aquecimento pode influenciar nos eventos térmicos observados.

Figura 33. Curvas DSC das amostras de ACZ micronizada a 5°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL. min⁻¹.



Analisando a curva DSC a uma razão de aquecimento de 5°C/min (Figura 34) observou-se que o evento de degradação foi antecipado de forma que a fusão do fármaco se sobrepõe ao evento de degradação próximo dos 250 °C (T_{pico} em 253,96 °C). Nas Figuras 35 e 36, com razões de aquecimento de 10 °C e 20 °C respectivamente, observou-se que a temperatura de degradação foi maior à medida que se aumentou a razão de aquecimento permitindo que o pico endotérmico de fusão fosse observado (CORVIS et al., 2016). A principal finalidade deste teste foi de observar a temperatura de fusão de forma isolada e utilizar as curvas DDSC para confirmar que a transição polimórfica da forma A para forma B esteve presente nas amostras de ACZ micronizada, uma vez que não foi possível verificar este evento nas curvas DSC. As curvas DDSC de todas as amostras a diferentes temperaturas de aquecimento permitem observar o evento de transição polimórfica da forma A para B ao redor de 193 °C. Portanto, esses achados corroboram os resultados encontrados no estudo de difração de raios X e do método de refinamento de Rietveld, que nos indicaram a presença de 100% da forma polimórfica A em todas as amostras estudadas.

Figura 34. Curvas DSC e DDSC da ACZ M3 a 5°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL.min⁻¹.

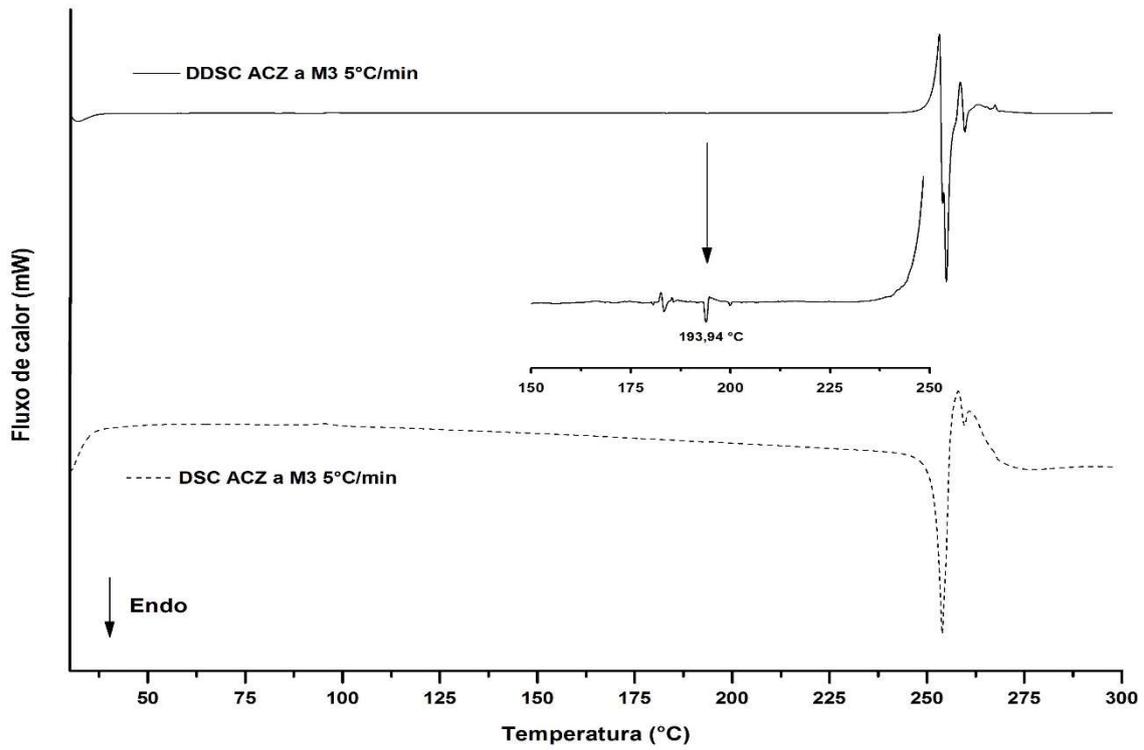


Figura 35. Curvas DSC e DDSC da ACZ M3 a 10° C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL.min⁻¹.

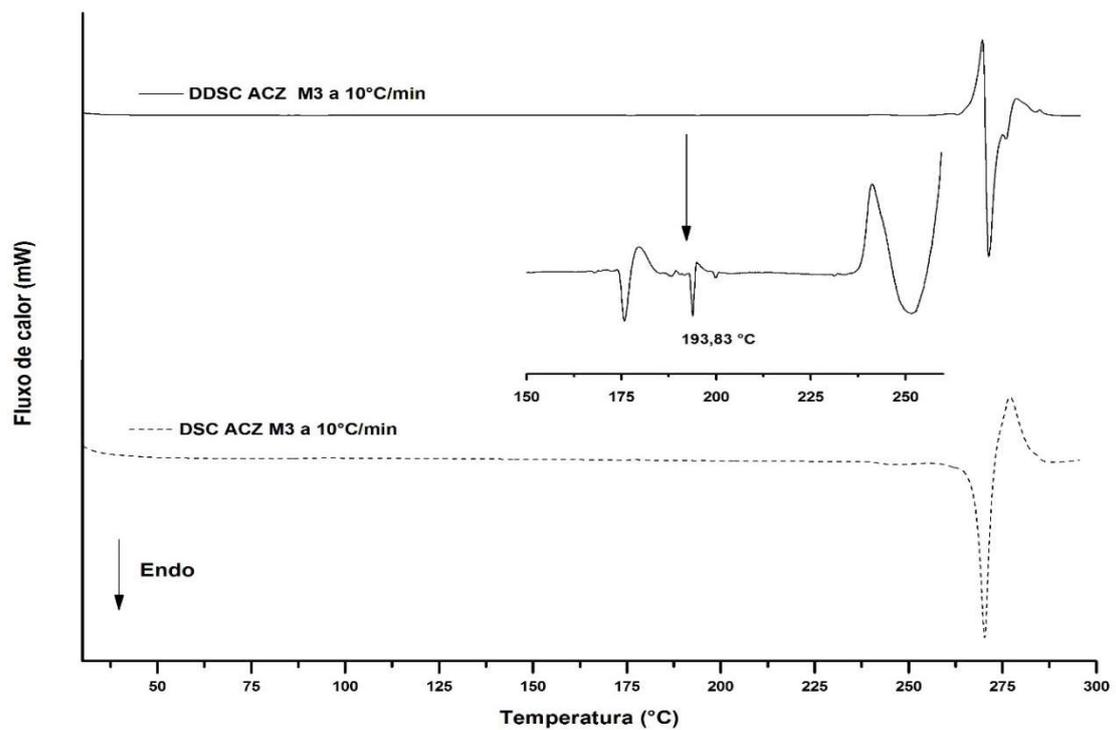
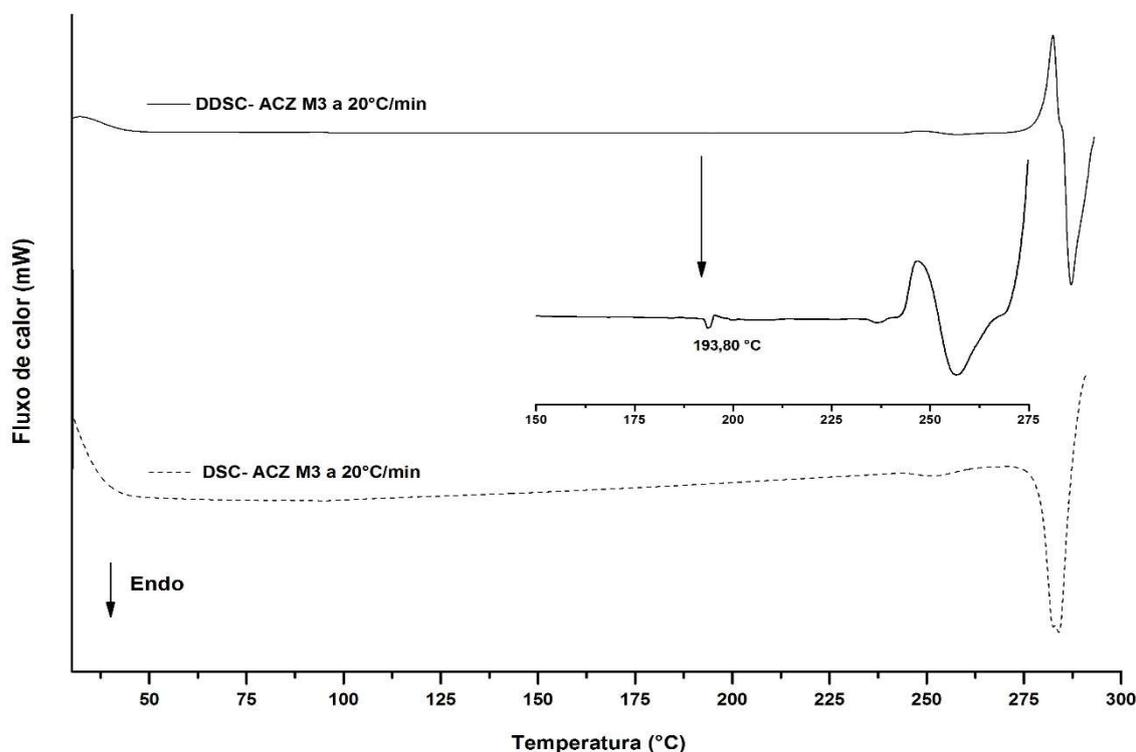


Figura 36. Curvas DSC e DDSC da ACZ M3 a 20°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL. min⁻¹.



3.4.5. Densidade verdadeira

Os resultados de densidade verdadeira são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Resultados de densidade verdadeira obtidos em picnômetro de gás Hélio (n=3).

Ensaio	Nome	Densidade verdadeira (g/mL)	DP (%)
1	ACZ-MP	1,7952	0,6177
2	ACZ M1	1,7463	0,6290
3	ACZ M2	1,6930	0,3351
4	ACZ M3	1,7084	0,9446
5	ACZ M4	1,7058	0,6436
6	ACZ M5	1,7250	0,5492
7	ACZ M6	1,6949	0,5999
8	ACZ M7	1,7432	0,5108
9	ACZ M8	1,7297	0,5789

DP: desvio padrão.

Os valores corroboram que o processo de micronização não influenciou na densidade verdadeira do pó das amostras finais de ACZ micronizada e também que não houve mudança da estrutura cristalina do fármaco após micronização.

3.4.6. Determinação da solubilidade de saturação

A Tabela 19 e a Figura 37 apresentam os resultados de solubilidade de saturação da matéria prima e das amostras de ACZ micronizada. Observa-se que a ACZ-MP apresenta ligeira solubilidade em suco gástrico, água e tampão fosfato pH 6,8. Os valores variaram de 1,19 e 1,23 mg/mL, assim estes valores similares nos três meios, estão em conformidade com os dados na literatura (PARASRAMPURIA; DAS GUPTA, 1990; REMKO, 2010).

A redução do tamanho de partícula, quase sempre gera um aumento da solubilidade do fármaco, seja pelo aumento da área superficial ou pelas mudanças da estrutura cristalina a outras formas polimórficas ou amorfização, demonstrando a capacidade de impactar na solubilidade de fármacos pouco solúveis (ALLEN, 2008).

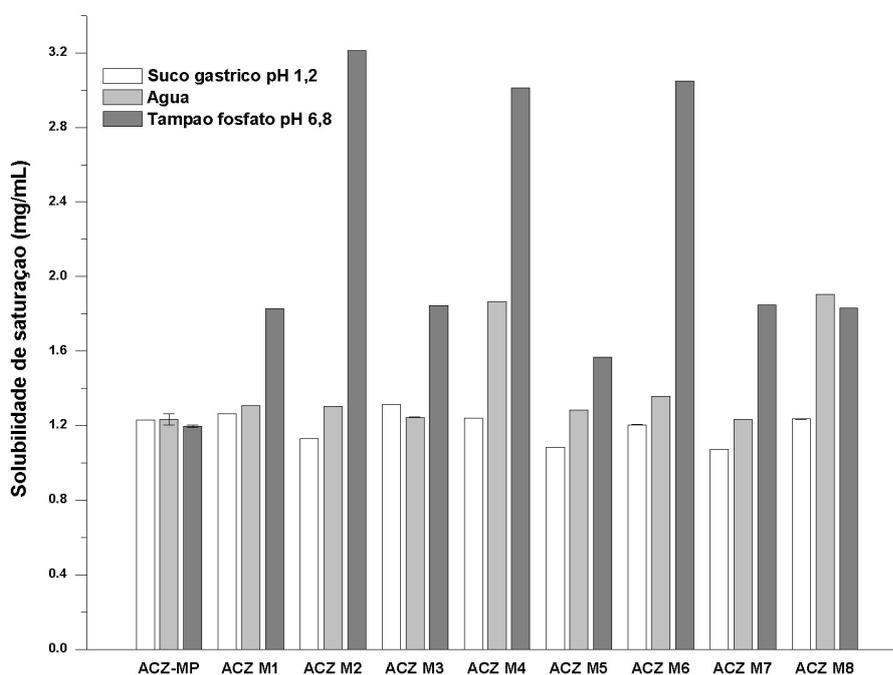
Os valores da solubilidade das amostras micronizadas aumentaram em água e tampão fosfato pH 6,8; com o qual se confirma a influência da micronização no aumento de solubilidade do fármaco como efeito direto da redução do tamanho de partícula.

Tabela 19. Solubilidade de saturação da ACZ-MP e das amostras de ACZ micronizada (n=3).

Ensaio	Nome	Suco gástrico pH 1,2		Água		Tampão fosfato pH 6,8	
		CON	DP	CON	DP	CON	DP
		(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)
1	ACZ-MP	1,2304	0,0005	1,2342	0,0297	1,1980	0,0064
2	ACZ M1	1,2646	0,0001	1,3070	0,0001	1,8280	0,0009
3	ACZ M2	1,1293	0,0003	1,3033	0,0004	3,2129	0,0004
4	ACZ M3	1,3147	0,0001	1,2451	0,0002	1,8436	0,0003
5	ACZ M4	1,2405	0,0001	1,8654	0,0002	3,0115	0,0002
6	ACZ M5	1,0824	0,0003	1,2843	0,0003	1,5668	0,0002
7	ACZ M6	1,2049	0,0002	1,3557	0,0001	3,0498	0,0002
8	ACZ M7	1,0742	0,0013	1,2338	0,0001	1,8481	0,0002
9	ACZ M8	1,2356	0,0007	1,9045	0,0001	1,8320	0,0001

CON: Concentração, DP: desvio padrão

Figura 37. Solubilidade obtida através do método de equilíbrio ACZ matéria-prima (ACZ-MP) e das amostras de ACZ micronizada (n=30).



Para determinar o impacto da micronização na solubilidade os resultados observados foram avaliados usando análise da Variância (ANOVA) (Tabela 20). Os resultados revelaram uma diferença significativa entre as médias de solubilidade entre as amostras de ACZ micronizada e a ACZ MP nos meios: água e tampão fosfato pH 6,8 (p-valor < 0.001; $\alpha = 0.05$).

Tabela 20. ANOVA de teste de solubilidade para as amostras de ACZ micronizadas e ACZ matéria-prima.

Meio	Efeito	GL	SQ (Aj.)	MQ (Aj.)	Valor-F	p-valor
SG pH 1,2	C1	8	0,1953	0,02442	1,33	0.292
	Error	18	0,3310	0,01839		
	Total	26	0,5264			
Água	C1	8	1,90576	0,238220	99,88	< 0.001
	Error	18	0,04293	0,002385		
	Total	26	1,94869			
TF pH 6,8	C1	8	7,4154	0,92692	25,57	0.001
	Error	18	0,6525	0,03625		
	Total	26	8,0679			

SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática, Valor-p: nível de significância.

Posteriormente, analisou-se os dados pelo teste de Tukey (Tabela 21) que permite comparar as médias dos tratamentos e identificar quais das amostras são diferentes. As médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não apresentaram diferenças significativas, ao nível de significância de 5%. Os meios água e tampão

fosfato (TF) pH 6,8 apresentaram diferenças significativas na solubilidade de saturação das amostras de ACZ micronizadas quando comparadas com a matéria prima. Desta forma o meio tampão fosfato pH 6,8 foi escolhido como o meio de dissolução para os posteriores ensaios por ser discriminativo. No entanto, de acordo com os resultados obtidos pelo teste de Tukey o meio mais discriminativo foi a água, porém este meio não é recomendado na literatura devido as suas características físico-químicas que podem variar dependendo da fonte utilizada e que a diferença das soluções tampões no possui um pH controlado devido a que nem sempre é controlado rigorosamente e pode variar dia a dia e durante o ensaio (USP, 2019).

Tabela 21. Teste de comparação múltipla de Tukey para média.

Amostra	Formulação	n	Média	Agrupamento
SG pH 1,2	ACZ-MP	3	1,1733	A
	ACZ-M1	3	1,2742	A
	ACZ-M2	3	1,1837	A
	ACZ-M3	3	1,3120	A
	ACZ-M4	3	1,2188	A
	ACZ-M5	3	1,0717	A
	ACZ-M6	3	1,2692	A
	ACZ-M7	3	1,3720	A
	ACZ-M8	3	1,3040	A
Água	ACZ-M4	3	1,9079	A
	ACZ-M8	3	1,8713	A
	ACZ-M6	3	1,3509	B
	ACZ-M3	3	1,2861	B C
	ACZ-M1	3	1,2691	B C
	ACZ-M7	3	1,2645	B C
	ACZ-M5	3	1,2497	B C
	ACZ-MP	3	1,2033	C
	ACZ-M2	3	1,1928	C
TF pH 6,8	ACZ-M6	3	2,845	A
	ACZ-M2	3	2,812	A
	ACZ-M4	3	2,763	A
	ACZ-M8	3	1,8745	B
	ACZ-M7	3	1,7985	B
	ACZ-M3	3	1,7979	B
	ACZ-M1	3	1,6770	B
	ACZ-M5	3	1,5945	B
	ACZ-MP	3	1,5467	B

3.5. Produção de comprimidos de ACZ micronizada

A granulação úmida mostrou-se viável para todas as formulações dos comprimidos de liberação imediata de ACZ matéria-prima e ACZ micronizada. Todas as formulações foram produzidas com sucesso e sem dificuldade na máquina de comprimir durante sua produção.

3.5.1. Ensaios físicos

3.5.1.1. Peso médio, diâmetro, espessura, dureza e friabilidade

A Tabela 22 apresenta os resultados de peso médio, diâmetro, espessura, dureza e friabilidade para cada formulação. Os dados são expressos em média e o desvio padrão. Nota-se que os valores de desvio padrão para cada ensaio foram baixos, o que evidencia a boa homogeneidade entre os comprimidos analisados.

Tabela 22. Peso médio (n=20). Diâmetro, espessura, dureza e friabilidade das formulações de ACZ (n=10).

	Peso médio ± DP (mg)	Diâmetro ± DP (cm)	Espessura ± DP (cm)	Dureza ± DP(N)	Friabilidade (%)
ACZ-F1	790,0 ± 0,01	1,41 ± 0,01	0,51 ± 0,01	10,83 ± 0,50	0,07
CV (%)	1,27	0,71	1,96	4,62	
ACZ-F2	800,0 ± 0,03	1,41 ± 0,01	0,53 ± 0,01	15,13 ± 0,23	0,14
CV (%)	3,75	0,71	1,89	1,52	
ACZ-F3	790,0 ± 0,02	1,41 ± 0,01	0,55 ± 0,01	16,05 ± 0,80	0,21
CV (%)	2,53	0,71	1,82	4,98	
ACZ-F4	800,0 ± 0,01	1,41 ± 0,01	0,51 ± 0,01	13,12 ± 1,00	0,10
CV (%)	1,25	0,71	1,96	7,62	

ACZ: acetazolamida, DP: desvio padrão

Os valores de peso médio das quatro formulações apresentam valor de coeficiente de variação (CV%) menor de 5%, valor que está conforme com as especificações estabelecidas pela Farmacopeia Brasileira para comprimidos com peso médio maior de 300 mg (Brasil, 2019).

A dureza é um parâmetro que mede a capacidade de resistência dos comprimidos e cujo valor está diretamente relacionado com a força de compressão utilizada. Os resultados determinados nas formulações foram de 10 a 17 N, sendo estes valores considerados informativos já que este teste não apresenta uma faixa fixa de valores de aceitação estabelecidas pelos órgãos reguladores (Brasil, 2019).

A friabilidade é um valor que nos permite inferir a resistências dos comprimidos à perda de peso e, portanto, a possível perda do princípio ativo quando os comprimidos são submetidos a certas condições desfavoráveis como transporte ou manipulação pelo paciente. Podemos observar nos resultados que as formulações apresentaram friabilidade com valores menores a 1,5%, valor considerado como aceitável segundo as normas estabelecidas pela Farmacopeia Brasileira.

Para avaliar a influência dos componentes das formulações sobre os parâmetros já mencionados anteriormente foi conduzido uma análise de variância (ANOVA one way), aplicando um nível de significância de 5% (Tabela 23). Os resultados revelaram uma diferença significativa entre as formulações quando comparadas nos parâmetros: diâmetro, espessura e dureza (p-valor < 0,05).

Tabela 23. ANOVA para peso médio, diâmetro, espessura e dureza das formulações de ACZ.

Parâmetro	Efeito	GL	SQ	MQ	Valor -F	p-Valor
Diâmetro	F	3	0,000056	0,000019	4,020	0,014
	Error	36	0,000166	0,000005		
	Total	39	0,000222			
Espesura	F	3	0,009918	0,003306	568,9	0,001
	Error	36	0,000209	0,000006		
	Total	39	0,010127			
Dureza	F	3	161,1300	53,7116	109,97	0,001
	Error	36	17,58000	0,48840		
	Total	39	178,7200			
Peso médio	F	3	0,002139	0,000713	2,49	0,066
	Error	76	0,021725	0,000286		
	Total	79	0,023864			

SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática, Valor-p: nível de significância.

Posteriormente, realizou-se o teste de Tukey (Tabela 24) que permite comparar as médias dos tratamentos e identificar que agrupamentos são formados. Observa-se que para os parâmetros peso médio e diâmetro as formulações não são estatisticamente diferentes devido a que compartilham a mesma letra. No entanto para espessura as formulações são estatisticamente diferentes sendo que entre elas a formulação ACZ-F1 e ACZ-F4 são similares. Finalmente enquanto a dureza as formulações são totalmente diferentes devido a formação de quatro agrupamentos diferentes.

Tabela 24. Teste de comparação múltipla de Tukey para média.

	Formulação	n	Media	Agrupamento
Diâmetro	ACZ-F2	10	1,4125	A
	ACZ-F3	10	1,4122	A
	ACZ-F1	10	1,4100	A
	ACZ-F4	10	1,4100	A
Espessura	ACZ-F3	10	0,5496	A
	ACZ-F2	10	0,5274	B
	ACZ-F1	10	0,5114	C
	ACZ-F4	10	0,5110	C
Dureza	ACZ-F3	10	16,050	A
	ACZ-F2	10	15,130	B
	ACZ-F4	10	13,120	C
	ACZ-F1	10	10,830	D
Peso médio	ACZ-F2	20	0,79784	A
	ACZ-F4	20	0,79617	A
	ACZ-F1	20	0,78927	A
	ACZ-F3	20	0,78507	A

3.5.2. Teor

Os resultados de teor das quatro formulações de comprimidos de ACZ micronizada apresentaram valores superiores a 95%, os quais estão dentro das especificações preconizadas pela Farmacopeia Americana 42 (USP, 2019) (conteúdo de não menos de 95% e não mais de 105 %).

Tabela 25. Teor de ACZ nos comprimidos (n=6).

Amostras	Concentração (mg. mL⁻¹)	DP	Teor (%)
ACZ-F1	238,48	1,42	95,38
ACZ-F2	246,83	4,96	98,73
ACZ-F3	245,25	0,71	98,10
ACZ-F4	245,08	8,80	98,03

ACZ: acetazolamida, DP: desvio padrão

3.5.3. Perfil de dissolução

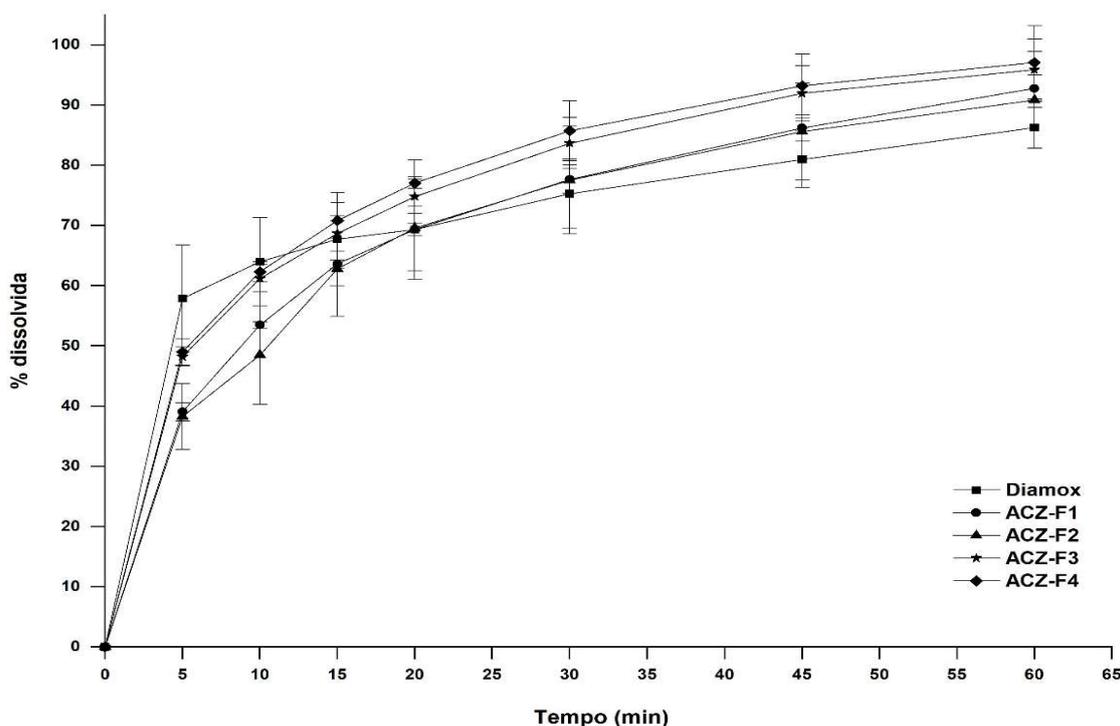
A Tabela 26 e Figura 38 apresentam os resultados obtidos para os ensaios de perfil de dissolução em função do tempo utilizando aparato 2 (pá) e meio de dissolução HCl 0,01 N, metodologia recomendada pela Farmacopeia Americana (USP, 2019). Podemos observar nos resultados que as porcentagens de liberação do fármaco no tempo de 60 minutos foi acima do preconizado na monografia da USP para este fármaco, na qual um parâmetro de tolerância de não menos de 75% do fármaco liberado em 60 minutos é o aceito para todas as formulações contendo ACZ.

Tabela 26. Perfis de dissolução dos comprimidos (Diamox® e formulações a base de ACZ MP e ACZ- M em meio HCl 0,01 N (n = 3).

Tempo (min)	DIAMOX®		ACZ-F1		ACZ-F2		ACZ-F3		ACZ-F4	
	% DISS.	DP								
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	57,89	8,80	39,04	1,53	38,28	5,47	48,23	1,54	48,98	2,19
10	64,00	7,32	53,49	0,53	48,45	8,20	61,22	2,29	62,30	1,70
15	67,73	7,70	63,60	0,70	62,81	7,94	68,68	2,99	70,84	2,95
20	69,33	6,84	69,36	1,03	69,56	8,53	74,82	2,81	77,05	3,83
30	75,30	5,72	77,67	2,36	77,56	8,93	83,68	4,23	85,74	5,00
45	81,00	4,67	86,21	2,19	85,62	8,03	91,95	4,62	93,19	5,30
60	86,25	3,37	92,79	2,23	90,87	8,05	95,89	5,10	97,07	6,05

%DISS: % dissolvida, DP: desvio padrão

Figura 38. Porcentagem de ACZ dissolvida de Diamox® e formulações a base de ACZ MP e ACZ- M em meio HCl 0,01 N (n = 3).



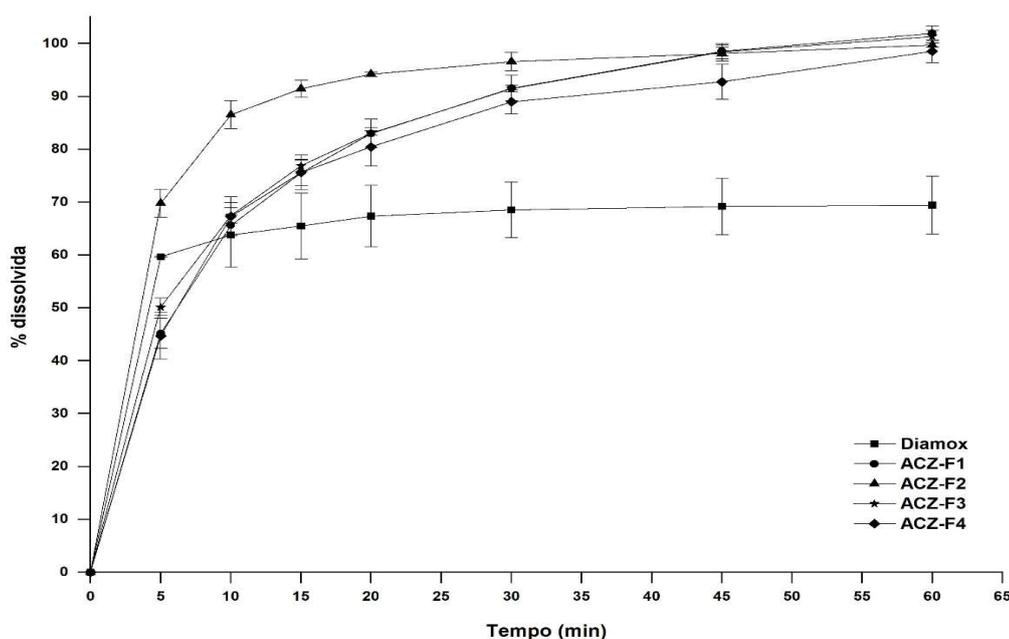
No entanto quando os resultados em tampão fosfato pH 6,8 foram avaliados (Tabela 27 e Figura 39), observa-se que o medicamento de referência, Diamox®, apresentou uma liberação de aproximadamente 70% no tempo de 60 minutos, não passando pelas condições sugeridas pelas agências regulatórias. Estes resultados corroboram que o meio tampão fosfato pH 6,8 possui poder discriminativo entre as formulações devido a que nos permite diferenciá-las.

Tabela 27. Perfis de dissolução dos comprimidos (Diamox® e formulações a base de ACZ MP e ACZ- M) em meio tampão fosfato pH 6,8 (n = 3).

	Diamox®		ACZ-F1		ACZ-F2		ACZ-F3		ACZ-F4	
	% DISS.	DP								
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	59,67	0,09	45,15	2,86	69,80	2,64	50,15	1,66	44,72	4,44
10	63,78	6,12	65,63	1,87	86,55	2,64	67,48	1,47	67,31	3,74
15	65,48	6,28	75,56	2,51	91,45	1,62	76,88	1,08	75,61	3,26
20	67,34	5,84	82,97	2,73	94,20	0,43	83,06	0,47	80,45	3,64
30	68,54	5,29	91,55	2,42	96,60	1,75	91,46	0,59	88,98	2,27
45	69,20	5,34	98,55	1,48	98,12	1,51	98,42	0,81	92,77	3,30
60	69,43	5,46	101,94	1,43	99,72	0,39	101,33	1,17	98,54	2,17

%DISS: % dissolvida, DP: desvio padrão

Figura 39. Porcentagem de ACZ dissolvida para Diamox® e formulações a base de ACZ MP e ACZ- M em meio tampão fosfato pH 6,8 (n=3).



3.5.3.1. Eficiência de dissolução

A eficiência de dissolução (ED%) é um parâmetro utilizado para avaliar a equivalência farmacêutica entre formulações, sendo uma estimativa da cinética de liberação ao longo do tempo do ensaio. Os resultados obtidos de ED% para as formulações foram avaliadas usando um estudo ANOVA one way para cada meio de dissolução (SERRA; STORPIRTIS, 2007).

A Tabela 28 apresenta os resultados de eficiência de dissolução (ED%) das formulações em meio HCl 0,01 N e tampão fosfato pH 6,8.

Tabela 28. Valores de eficiência de dissolução (ED%), das formulações de ACZ (n=3).

Amostra	HCl 0,1 N		TF pH 6,8	
	ED %	DP	ED %	DP
Diamox®	71,19	5,61	64,42	4,87
ACZ-F1	71,02	1,65	82,35	1,97
ACZ-F2	70,08	7,57	89,55	1,21
ACZ-F3	76,61	3,59	82,92	0,59
ACZ-F4	78,10	3,75	79,74	2,39

DP: desvio padrão

3.5.3.1.1. Estudo ANOVA one way para meio HCl 0,01 N

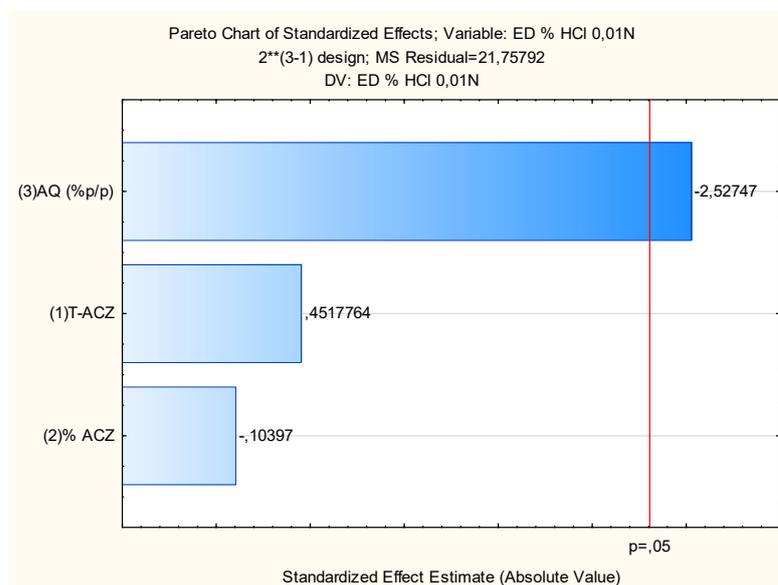
A análise de variância (Tabela 29) e o gráfico de Pareto (Figura 40) indicaram que, dentre os fatores independentes a porcentagem de Aquateric™ demonstrou impacto significativo na eficiência de dissolução (% ED) da ACZ quando o meio utilizado foi HCl 0,01N.

Tabela 29. Análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos de ED (%) em meio HCl 0,01 N, os resultados em vermelho são considerados significativos (p< 0,05).

	Efeito	GL	SQ	MQ	Valor -F	p-Valor
DISS HCl 0,01 N	T-ACZ	1	4,4408	4,4408	0,204102	0,663427
	%-ACZ	1	0,2352	0,2352	0,010810	0,919752
	AQ (%m/m)	1	138,9921	138,9921	6,388115	0,035394
	Error	8	174,0634	21,7579		
	Total	11	317,7316			

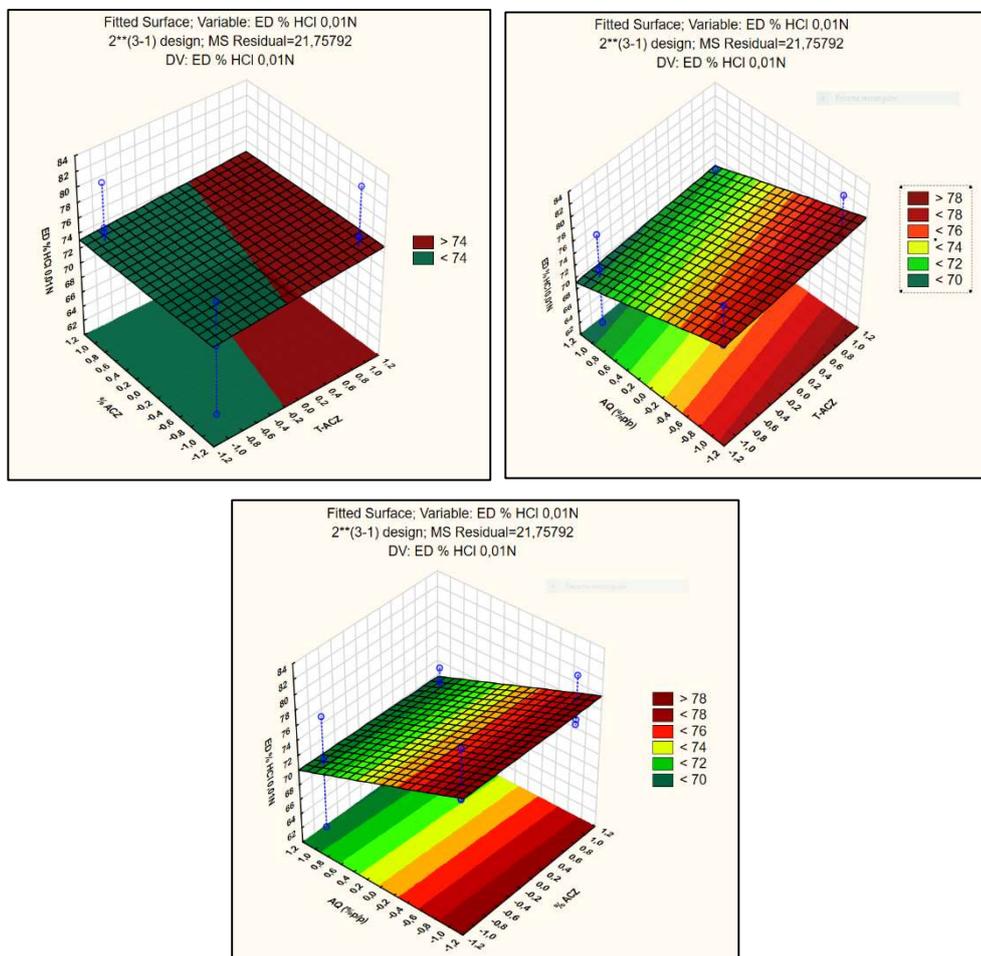
T-ACZ: Tamanho de partícula de ACZ, ACZ: acetazolamida, AQ: Aquateric™, SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática, Valor-p: nível de significância.

Figura 40. Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis sobre a ED (%) em meio HCl 0,01 N, os resultados à direita da linha vermelha são considerados significativos.



Os gráficos de superfície de resposta (Figura 41), permitem a comparação da influência de dois fatores sobre a variável dependente (ED %) em meio HCl 0,01 N.

Figura 41. Superfícies de resposta para a ED % em função dos fatores estudados



3.5.3.1.2. Estudo ANOVA one way para meio tampão fosfato pH 6,8

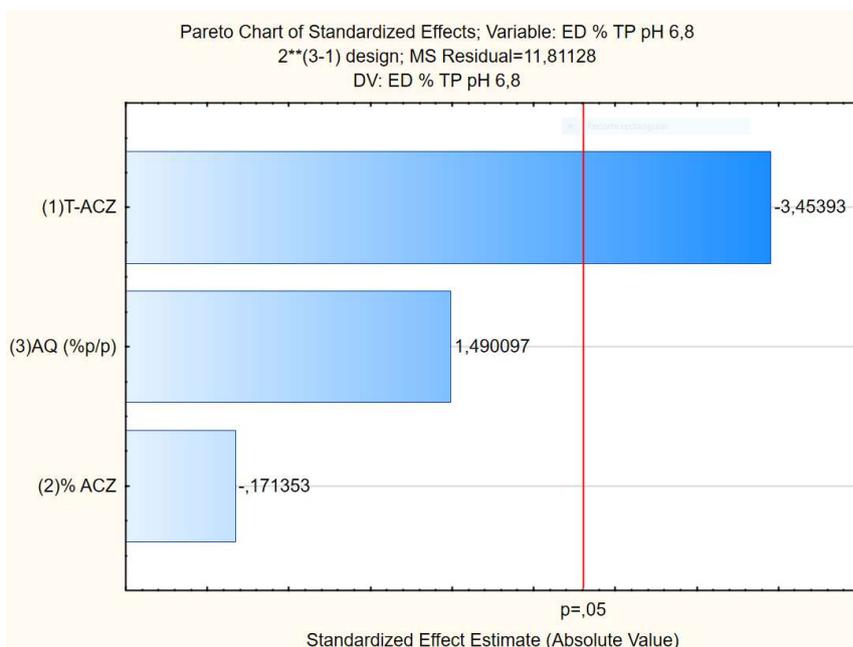
O estudo ANOVA (Tabela 30 e Figura 42) quando o meio de dissolução foi o tampão fosfato pH 6,8 indicou que dentre os fatores independentes o tamanho de partícula da ACZ demonstrou impacto significativo na eficiência de dissolução (%ED) do fármaco. Este resultado corrobora com os dados já obtidos no ensaio de solubilidade de saturação (item 3.4.6.), no qual determinou se um aumento da solubilidade do fármaco neste meio devido ao processo de micronização, o qual seria a principal causa da maior liberação do fármaco.

Tabela 30. Análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos de ED (%) em meio tampão fosfato pH 6,8, os resultados em vermelho são considerados significativos ($p < 0,05$).

	Efeito	GL	SQ	MQ	Valor -F	p-Valor
DISS TF pH 6,8	T-ACZ	1	140,9045	140,9045	11,92966	0,008645
	%-ACZ	1	0,3468	0,3468	0,02936	0,868201
	AQ (%m/m)	1	26,2256	26,2256	2,22039	0,174530
	Error	8	94,4902	11,8113		
	Total	11	261,9672			

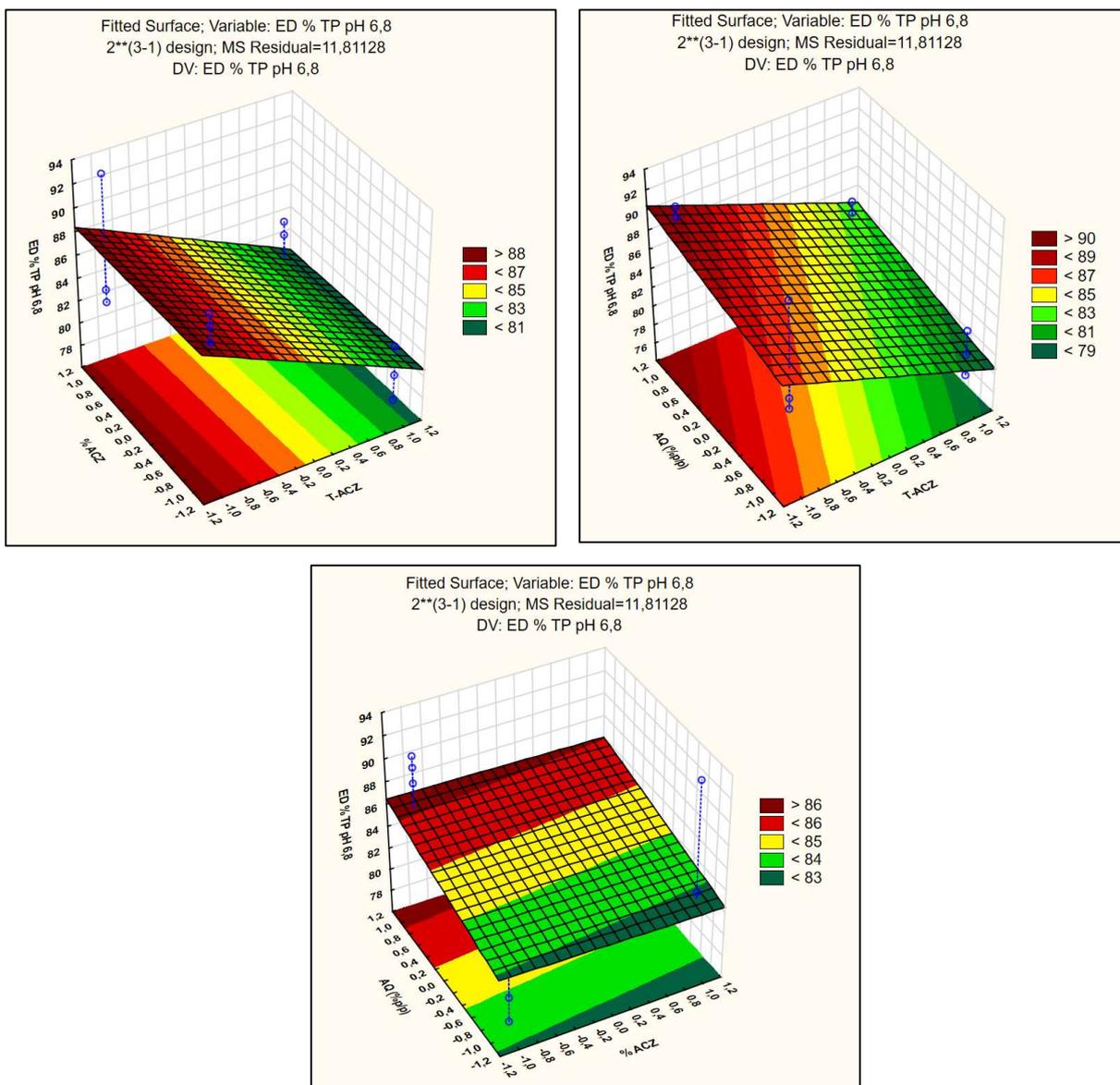
T-ACZ: Tamanho de partícula de ACZ, ACZ: acetazolamida, AQ: Aquateric™, SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática, Valor-p: nível de significância.

Figura 42. Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis sobre a ED (%) em meio tampão fosfato pH 6,8, os resultados à direita da linha vermelha são considerados significativos.



Os gráficos de superfície de resposta (Figura 43), permitem a comparação da influência de dois fatores sobre a variável dependente (ED %) em meio tampão fosfato pH 6,8.

Figura 43. Superfícies de resposta para a ED % em função dos fatores estudados.



3. Conclusão

O processo de micronização aumentou de forma significativa a solubilidade de saturação do fármaco e posterior velocidade de dissolução da ACZ em meio tampão fosfato pH 6,8. O trabalho demonstrou a viabilidade da produção de comprimidos de ACZ micronizada, quando as formulações foram submetidas a caracterização apresentaram qualidade adequada e satisfatória. A análise estatística sobre a eficiência de dissolução das formulações demonstrou que o tamanho de partícula foi o principal fator que influenciou nos resultados de liberação do fármaco em meio tampão fosfato pH 6,8.

4. Referências bibliográficas

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

BRASIL, ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. Guia para validação de métodos analíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 24 de julho de 2017.

BRASIL, ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, volume 1. 6ª Ed. Brasília, 2019.

BRASIL, ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, volume 2. 6ª Ed. Brasília, 2019.

CARAMELO, C.; ALBALATE, M.; TEJEDOR, A.; ALCÁZAR, R.; BALDOVÍ, S.; GARCÍA PÉREZ, A.; MARÍN, M. Vigencia de la acetazolamida en la terapéutica diurética actual: aplicaciones en el edema refractario y la hiperpotasemia relacionada al bloqueo aldosterónico. **Nefrología**, v. 28, n. 2, p. 234–238, 2008.

CORVIS, Yohann; NÉGRIER, Philippe; SOULESTIN, Jérémie; ESPEAU, Philippe. New Melting Data of the Two Polymorphs of Prednisolone. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 120, n. 41, p. 10839–10843, 2016.

COSTA, Viviana P.; BRAGA, Mara E. M.; DUARTE, Catarina M. M.; ALVAREZ-LORENZO, Carmen; CONCEIRO, Angel; GIL, Maria H.; DE SOUSA, Hermínio C. Anti-glaucoma drug-loaded contact lenses prepared using supercritical solvent impregnation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 53, n. 1–3, p. 165–173, 2010.

DINNEBIER, Robert. **Rietveld Refinement from Powder Diffraction Data**, n. 26, p. 1–47, 2001.

DURÁN, Nelson; DURÁN, Marcela; TASIC, Ljubica; MARCATO, Priscyla D. Tecnologia de nanocristais em fármacos. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 151–158, 2010.

GOMES, L. B.; POKORNY, A.; BERGMANN, C. P. Quantificação de fases pelo método de Rietveld de alumina comercial com elevada área superficial aditivada com nióbia. **58º Congresso Brasileiro de Cerâmica**, p. 3390–3401, 2014.

GOVINDARAJAN, Ramprakash; SURYANARAYANAN, Raj. Processing-induced Phase Transformations and Their Implications on Pharmaceutical Product Quality. In: **Polymorphism in the Pharmaceutical Industry: Solid Form and Drug Development**, p. 333–364, 2006.

GRANERO, G. E.; LONGHI, M. R.; BECKER, C.; JUNGINGER, H. E.; KOPP, S.; MIDHA, K. K.; SHAH, V. P. Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Acetazolamide, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 9, p. 3691–3699, 2008.

GRIESSER, Ulrich J.; BURGER, Artur; MEREITER, Kurt. The polymorphic drug substances of the european pharmacopoeia. Part 9. Physicochemical properties and crystal structure of acetazolamide crystal forms. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 3, p. 352–358,

1997.

KASSAMALI, Rahim; SICA, Domenic A. Acetazolamide: A forgotten diuretic agent. **Cardiology in Review**, v. 19, n. 6, p. 276–278, 2011.

KECK, Cornelia M.; MÜLLER, Rainer H. Size analysis of submicron particles by laser diffractometry-90% of the published measurements are false. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, n. 1–2, p. 150–163, 2008.

KIM, Min-Soo; LEE, Sibeum; PARK, Jeong-Sook; WOO, Jong-Soo; HWANG, Sung-Joo. Micronization of cilostazol using supercritical antisolvent (SAS) process: Effect of process parameters. **Powder Technology**, v. 177, n. 2, p. 64–70, 2007.

LIM, Li Ling; FOLDVARY, Nancy; MASCHA, Ed; LEE, Julia. Acetazolamide in women with catamenial epilepsy. **Epilepsia**, v. 42, n. 6, p. 746–749, 2001.

LINDENBERG, Marc; KOPP, Sabine; DRESSMAN, Jennifer B. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 265–278, 2004.

LIU, L. X.; MARZIANO, I.; BENTHAM, A. C.; LITSTER, J. D.; E.T.WHITE, E. T.; HOWES, T. Effect of particle properties on the flowability of ibuprofen powders. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 362, n. 1–2, p. 109–117, 2008.

MCCUSKER, L. B.; VON DREELE, R. B.; COX, D. E.; LOUE, D.; SCARDI, P. Rietveld refinement guidelines. **International Union of Crystallography Journal of Applied Crystallography J. Appl. Cryst**, v. 32, p. 36–50, 1999.

PALMA, Santiago D.; TARTARA, Luis I.; QUINTEROS, Daniela; ALLEMANDI, Daniel A.; LONGHI, Marcela R.; GRANERO, Gladys E. An efficient ternary complex of acetazolamide with HP- β -CD and TEA for topical ocular administration. **Journal of Controlled Release**, v. 138, n. 1, p. 24–31, 2009.

PARASRAMPURIA, J.; DAS GUPTA, V. Development of oral liquid dosage forms of acetazolamide. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 79, n. 9, p. 835–6, 1990.

PATRAVALE, V. B.; DATE, Abhijit A.; KULKARNI, R. M. Nanosuspensions: a promising drug delivery strategy. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 7, p. 827–840, 2004.

REISS, William G.; OLES, Karen S. Acetazolamide in the treatment of seizures. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 30, n. 5, p. 514–518, 1996.

REMKO, Milan. Molecular structure, pKa, lipophilicity, solubility and absorption of biologically active aromatic and heterocyclic sulfonamides. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 944, n. 1–3, p. 34–42, 2010.

RIETVELD, H. M. A profile refinement method for nuclear and magnetic structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 2, n. 2, p. 65–71, 1969.

SERRA, Cristina Helena Dos Reis; STORPIRTIS, Sílvia. Comparação de perfis de dissolução da cefalexina através de estudos de cinética e eficiência de dissolução (ED%). **Revista**

Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 43, n. 1, p. 79–88, 2007.

SHARAN, Sapna; DUPUIS, Annie; HÉBERT, Diane; LEVIN, Alex V. The effect of oral acetazolamide on weight gain in children. **Canadian Journal of Ophthalmology**, v. 45, n. 1, p. 41–45, 2010.

SINGLA, Anil; KAUR, Indu; GARG, Alka; AGGARWAL, Deepika. Novel Approaches for Topical Delivery of Acetazolamide. **Pharmaceutical Technology**, n. July, p. 24–34, 2002.

SRINIVASU, Prabha; SUBBARAO, Devarakonda V.; VEGESNA, Raju V. K.; SUDHAKAR BABU, K. A validated stability-indicating LC method for acetazolamide in the presence of degradation products and its process-related impurities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, n. 1, p. 142–148, 2010.

TOBY, Brian H. R factors in Rietveld analysis: How good is good enough? **Powder Diffraction**, v. 21, n. 01, p. 67–70, 2006.

UMEDA, Tsuneo; OHNISHI, Noriaki; YOKOYAMA, Teruyoshi; KURODA, Tsutomu; KITA, Yoshiaki; KURODA, Koji; TATSUMI, Etsuko; MATSUDA, Yoshihisa. Physico-chemical properties and isothermal transition of acetazolamide polymorphs. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 33, n. 8, p. 3422–3428, 1985.

URAKAMI, Koji; SHONO, Yasushi; HIGASHI, Atsuya; UMEMOTO, Kazuichi; GODO, Masayuki. A novel method for estimation of transition temperature for polymorphic pairs in pharmaceuticals using heat of solution and solubility data. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n. 2, p. 263–267, 2002.

UNITED States Pharmacopeia. 41 ed. rev. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2018. 8854 p.

VERMA, Parmanand; GUPTA, Roop Narayan; JHA, Arvind Kumar; PANDEY, Ravishankar. Development, in vitro and in vivo characterization of Eudragit RL 100 nanoparticles for improved ocular bioavailability of acetazolamide. **Drug Delivery**, v. 20, n. 7, p. 269–276, 2013.

VOGIATZIS, Ioannis; KOULOURIS, E.; SIDIROPOULOS, A.; GIANNAKOULAS, C. Acute pulmonary edema after a single oral dose of acetazolamide. **Hippokratia**, v. 17, n. 2, p. 177–179, 2013.

ZHAO, LIMIAN AND LONG, William. Syringe Filter Suitability for Sample Preparation in Drug Assays. **Agilent Technologies**, 2013.

Apêndice

Dissolução bifásica: Uma estratégia inovadora que pode ser utilizada para a bioisenção de fármacos classe I de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica

1. Introdução

A bioisenção pode ser definida como a não exigência dos estudos de biodisponibilidade relativa ou bioequivalência para certos fármacos (Brasil, 2011). O Sistema de Classificação Biofarmacêutica é uma ferramenta regulatória que permite classificar os fármacos em função da sua solubilidade e permeabilidade (AMIDON et al., 1995). Adicionalmente, tem como finalidade conseguir substituir determinados estudos de bioequivalência por estudos *in vitro* com o objetivo de evitar ou reduzir a exposição de pacientes sadios a certos fármacos além de permitir reduzir os elevados custos durante o desenvolvimento de diversos produtos farmacêuticos (LENNERNÄS; ABRAHAMSSON, 2005).

O teste de dissolução é uma das metodologias mais utilizadas no estudo do comportamento de liberação de um fármaco da sua forma farmacêutica, este permite determinar se dois produtos são equivalentes considerando como padrão de estudo o produto inovador ou de referência. Uma vez corroborado que um produto possui o mesmo comportamento de liberação do medicamento de referência pode ser considerado intercambiável ou equivalente com este (PHILLIPS et al., 2012).

Diversos estudos buscam avaliar uma relação entre o comportamento *in vitro* e *in vivo* dos fármacos. A dissolução bifásica tem-se demonstrado potencial adequada devido a capacidade de simular a dissolução e absorção de fármacos no trato gastrointestinal por causa da implementação de uma fase orgânica imiscível que permite manter as condições *sink* na fase aquosa. Esta metodologia é simples, econômica e é possível detectar a liberação e partição do fármaco simultaneamente em um mesmo ensaio (DENG; STAUFENBIEL; BODMEIER, 2017) (PESTIEAU; EVRARD, 2017) (SILVA et al., 2020). A dissolução bifásica consiste em um sistema com uma fase aquosa (solução ou tampão) e uma fase orgânica (n-octanol), sendo que o fármaco começa a dissolução na camada aquosa e posteriormente se particiona e passa para a fase orgânica, mantendo assim as condições *sink*, o qual seria uma das principais vantagens quando comparado com a metodologia de dissolução convencional.

Uma das principais características inovadoras deste sistema é que a fase orgânica pode simular a membrana gastrointestinal e o processo de dissolução-partição entre as duas fases que na sua vez simula o processo de dissolução e

absorção do fármaco que ocorre *in vivo* nos pacientes após a administração do medicamento.

Estudos demonstram que esta metodologia adicionalmente possui a capacidade de discriminar parâmetros importantes na formulação, dosagem, efeitos de alguns excipientes, polimorfos, assim como o tamanho da partícula do fármaco (PESTIEAU et al., 2016) (AL DURDUNJI; ALKHATIB; AL-GHAZAWI, 2016) (DENG; STAUFENBIEL; BODMEIER, 2017) (XU et al., 2018). O teste de dissolução bifásica para fármacos Classe I possui a capacidade de substituir os estudos de bioequivalência tradicionais, os quais são caros e demorados (LÖBENBERG et al., 2012).

O objetivo do presente trabalho foi demonstrar que a dissolução bifásica é uma abordagem *in vitro* inovadora e que apresenta maior relevância fisiológica para prever o desempenho *in vivo* e posterior bioisenção do fármaco metronidazol.

2. Material e métodos

2.1. Material

Metronidazol (MTZ) foi obtido da Medisca (Quebec, Canadá), comprimidos de metronidazol de liberação imediata e comerciais foram adquiridos como Flagyl (Pfizer USA Inc, lote C071094), Flagyl (Sanofi Aventis Mexico Inc, lote 888575), Flagenase (Laboratorios Liomont, SA Mexico Inc, lote 7009), Colpofilina (Laboratorio Lazar Argentina Inc) e Metral (Laboratorio Pablo Cassara Inc, lote 77). Os solventes orgânicos acetonitrila (grau HPLC) e 1-octanol 99% foram adquiridos da Acros Organics (New Jersey, EUA). Finalmente soluções tampão foram preparadas com água purificada (Elgastat Maxima UF e um purificador de água Elgastat Option 3B da ELGA Laboratories Ltd. (Mississauga, ON, Canadá).

2.2. Métodos de quantificação de MTZ

2.2.1. Metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi desenvolvido em cromatógrafo líquido Shimadzu LC-10AS (Tóquio, Japão) e detector de matriz de diodo Shimadzu SPD-M10AVP (Tóquio, Japão). Utilizou-se coluna LiChrospher® 60 RP-Select B 5µm (25 cm x 4,0 mm) Merck (Darmstadt, Alemanha). A fase móvel foi constituída por acetonitrila: água (34:66), filtradas e desgaseificadas. O fluxo utilizado

foi de 1,0 mL/min, à temperatura de 30°C e com volume de injeção de 20 µL. O tempo de retenção foi de 6,83 min e a detecção foi realizada no comprimento de onda 254 nm.

2.2.1.1. Preparação da solução padrão de metronidazol (MTZ)

Solução padrão de metronidazol 1,00 mg/mL foi preparada a partir da pesagem de 25 mg do fármaco, o qual foi transferida para balão volumétrico de 25 mL, adicionando aproximadamente 20 mL de metanol e deixando em agitação em ultrassom por 10 minutos até a completa solubilização do fármaco, em seguida o volume foi completado com o mesmo solvente.

2.2.1.2. Linearidade

A partir da solução padrão de metronidazol foram transferidas alíquotas para balões volumétricos de 5 mL, os volumes foram completados com tampão fosfato pH 6,8 conforme a Tabela 1, obtendo-se soluções com concentrações definidas do fármaco. A curva analítica foi preparada em triplicata em sete níveis de concentrações diferentes. As áreas medias correspondentes à três determinações para cada diluição, foram plotadas no eixo das ordenadas e as concentrações (µg/mL) no eixo das abscissas.

Tabela 1- Concentração das amostras obtidas a partir de uma solução padrão de MTZ 1,00 mg/mL empregadas para determinação da linearidade.

Concentração final (µg/mL)	Alíquota da SP (mL)	Volume final (mL)
20,0	0,100	5,0
50,0	0,250	5,0
150,0	0,750	5,0
350,0	1,750	5,0
450,0	2,250	5,0
500,0	2,500	5,0
650,0	3,250	5,0

2.2.2. Metodologia analítica por espectrofotometria UV-Visível (UV-Vis) para quantificação de MTZ em n-octanol

O espectro de absorção do MTZ foi obtido na região de 200-400 nm. As leituras foram realizadas em espectrofotométrico Shimadzu UV-1800, utilizando cubeta de quartzo de 10 mm de comprimento e n-octanol como branco. O comprimento de onda utilizando foi 312 nm.

2.2.2.1. Linearidade

A partir da solução padrão de metronidazol preparada no item 2.1.1.1. foram transferidas alíquotas para balões volumétricos de 5 mL e os volumes foram completados com n-octanol conforme a Tabela 2, obtendo-se soluções com concentrações definidas do fármaco. A curva analítica foi preparada em triplicata em cinco níveis de concentrações diferentes. As absorvâncias médias correspondentes à três determinações para cada diluição permitiram a determinação da curva de calibração.

Tabela 2- Concentração das amostras de MTZ obtidas a partir de uma solução padrão do fármaco a 1,00 mg/mL e empregadas para determinação da linearidade.

Concentração final ($\mu\text{g/mL}$)	Alíquota da SP (μL)	Volume final (mL)
5,0	25	5,0
7,5	38	5,0
10,0	50	5,0
12,5	63	5,0
15,0	75	5,0
20,0	100	5,0

2.2.3. Caracterização física dos comprimidos comerciais de MTZ

2.2.3.1. Peso médio

Foram pesadas individualmente 6 unidades dos comprimidos na balança analítica. Posteriormente foram calculados o peso médio, desvio padrão e o coeficiente de variação (CV%) de acordo com a Farmacopeia Brasileira 6ª edição (Brasil,2019).

2.2.3.2. Teor de MTZ nos comprimidos

Para determinação do teor de MTZ foi transferida uma quantidade de aproximadamente 50 mg do pó dos comprimidos comerciais de MTZ triturados previamente em um balão volumétrico de 25 mL. Posteriormente foi adicionado 15 mL de metanol levando ao ultrassom por 15 minutos visando garantir a solubilização completa do ativo. Após este tempo, o volume do balão foi completado com o mesmo solvente procedendo-se a homogeneização final. O ensaio foi efetuado utilizando seis comprimidos. A quantidade de metronidazol foi determinada por cromatografia líquida utilizando comprimento de onda 254 nm.

2.2.3.3. Tempo de desintegração

O teste foi realizado de acordo com o capítulo geral da USP <701> (USP, 2019). O tempo de desintegração foi medido em um aparato de desintegração (Eureka, Alemanha) usando 900 mL de tampão fosfato pH 6,8 como meio a 37 ± 2 °C. Seis comprimidos de cada produto comercial foram testados.

2.2.1.4. Perfil de dissolução

Para determinar os perfis de dissolução foram avaliados 3 comprimidos por produto comercial utilizando aparato 2 (pá) (ERWEKA, GmbH), com velocidade de rotação de 75 rpm e a 37 °C. O método de dissolução compendiado para metronidazol foi utilizado empregando dois diferentes tipos de meios de dissolução: o meio Simulated Intestinal Fluid (SIF) (tampão fosfato 50 mM a pH 6,8, 900mL) sem enzima e em tampão fosfato de baixa capacidade tamponante (tampão fosfato 5 mM a pH 6,8, 900mL), ambos filtrados por vácuo e desgaseificados em banho ultrassônico.

Adicionalmente os mesmos comprimidos foram testados em um sistema de dissolução bifásica constituído por uma fase aquosa (200 mL de tampão fosfato 5 mM a pH 6,8) e uma fase orgânica (100 mL de n-octanol). O equipamento de dissolução bifásica consiste em um aparato 2 (pá) (submergida na fase aquosa) na qual uma minipá (doada pela Sotax AG) é montada (submergida na fase orgânica) permitindo obter a hidrodinâmica suficiente para esta fase. O resultado da utilização de ambas pás é uma adequada hidrodinâmica no sistema. O volume de 200 mL de meio aquoso foi escolhido na tentativa de se aproximar melhor as condições dos fluidos intestinais (77 +/- 15 mL).

Para os testes de dissolução compendiais e bifásicos, alíquotas da fase aquosa e da fase orgânica foram coletadas em pontos de tempo específicos (5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 min). Finalmente, o MTZ foi quantificado por CLAE a 254 nm para a fase aquosa e a 321 nm por espectrofotometria para a fase orgânica.

3. Resultados e discussão

3.1. Desenvolvimento de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

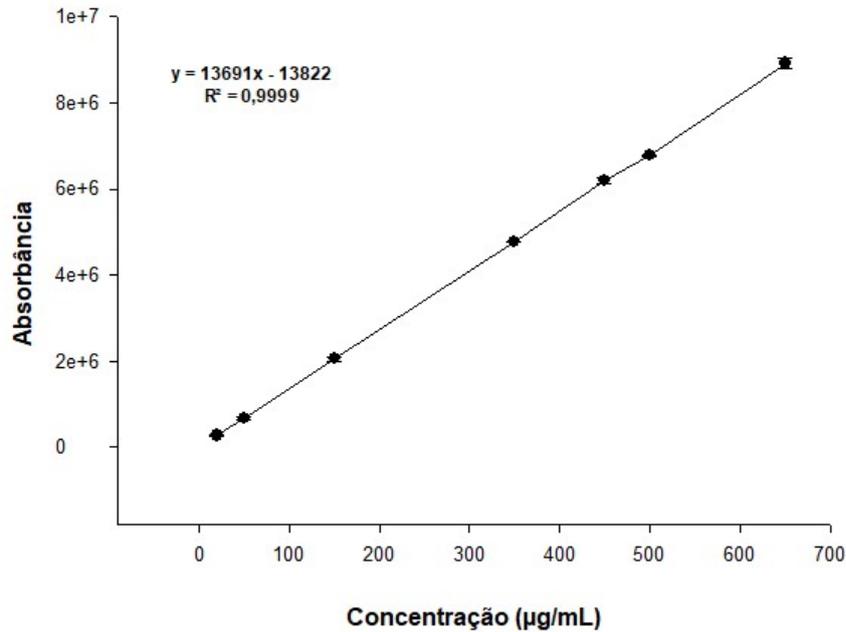
A metodologia analítica se mostrou simples e rápida, e a fase móvel composta de solventes que não apresentam risco para o equipamento e coluna. A partir da curva analítica foi determinado o coeficiente de correlação (r^2) e a equação da reta. O valor de r^2 foi 0,9999 (Figura 1), valor considerado adequado segundo a norma vigente RDC 166/2017 (BRASIL, 2017) e que comprova a boa linearidade do método. Assim também foram determinados o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação dos pontos das absorbâncias para cada nível de concentração da curva de calibração sendo considerado aceitáveis todos aqueles que apresentem um valor abaixo de 5% (Tabela 3) como descrito na norma vigente.

Tabela 3. Áreas obtidas na curva analítica para quantificação da MTZ em tampão fosfato pH 6,8 (n=3).

CON ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância			Média	DP	CV%
	1ºrep	2ºrep	3ºrep			
20,0	279727	279354	260101	273061	11225	4,1
50,0	683711	625126	675461	661433	31712	4,8
150,0	2098955	2006714	2029594	2045088	48033	2,3
350,0	4767227	4762419	4771217	4766954	4405	0,1
450,0	6133504	6257667	6170932	6187368	63692	1,0
500,0	6788924	6733192	6773148	6765088	28727	0,4
650,0	8800978	8934554	9005976	8913836	104058	1,2

CON: concentração, DP= Desvio padrão da média (n=3), CV%= Coeficiente de variação (n=3).

Figura 1. Curva analítica de MTZ em tampão fosfato pH 6,8.



3.2. Metodologia analítica por espectrofotometria UV-Visível (UV-Vis) para quantificação de MTZ

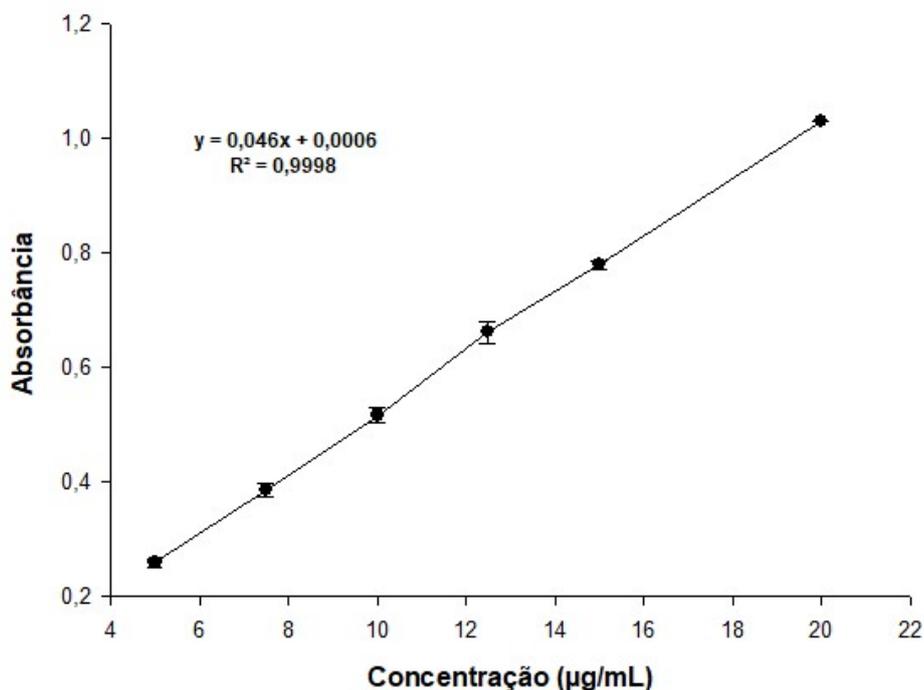
O valor de r^2 para a curva de calibração de MTZ foi 0,9998 (Figura 2), valor considerado adequado segundo a norma vigente RDC 166/2017 (BRASIL, 2017) e que comprova a adequada linearidade do método. O desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV%) dos pontos das absorbâncias para cada nível de concentração da curva foram avaliadas e consideradas aceitáveis devido a que apresentaram valor abaixo de 5% (Tabela 4).

Tabela 4. Absorbâncias obtidas na curva analítica para quantificação da MTZ em n-octanol (n=3).

CON (µg/mL)	Absorbância			Média	DP	CV%
	1ºrep	2ºrep	3ºrep			
5,0	0,259	0,252	0,265	0,245	0,007	2,515
7,5	0,373	0,391	0,396	0,387	0,012	3,128
10,0	0,516	0,503	0,531	0,517	0,014	2,712
12,5	0,651	0,683	0,650	0,661	0,019	2,838
15,0	0,775	0,787	0,775	0,779	0,007	0,889
20,0	1,030	1,030	1,029	1,030	0,001	0,056

CON: concentração, DP= Desvio padrão da média (n=3), CV%= Coeficiente de variação

Figura 2. Curva analítica de MTZ em n-octanol.



3.3. Caracterização física dos comprimidos comerciais de MTZ

3.3.1. Peso médio

Os valores dos pesos médios das seis unidades de todos os produtos comerciais apresentaram valor de coeficiente de variação (CV%) menor de 5%, valor que está conforme as especificações estabelecidas pela Farmacopeia Brasileira e Americana para comprimidos com peso médio maior de 300 mg (Brasil, 2019) (USP,2019). Os resultados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Peso médio dos comprimidos comerciais de MTZ (n=6).

Amostra	Peso médio (mg)	CV%
FLAGYL -USP	395,65 ± 1,78	0,45
FLAGYL -MEXICO	745,16 ± 10,22	1,37
FLAGENASE	745,55 ± 2,53	0,34
COLPOFILIN	704,12 ± 0,58	0,08
METRAL	745,52 ± 2,50	0,33

CV%= Coeficiente de variação

3.3.2. Teor de MTZ nos comprimidos

Os resultados do teor de MTZ nos comprimidos comerciais (Tabela 6) apresentaram valores superiores a 98%, os quais estão dentro das especificações dadas pela Farmacopeia Americana 42 (USP, 2019) (conteúdo de não menos de 90% e não mais de 110 %).

Tabela 6. Teor de MTZ nos comprimidos comerciais (n=6).

Amostra	Teor (%)
FLAGYL -USP	104,88 ± 7,61
FLAGYL -MEXICO	103,98 ± 31,48
FLAGENASE	104,68 ± 7,56
COLPOFILIN	102,02 ± 62,61
METRAL	98,02 ± 29,89

3.3.3. Tempo de desintegração

Esta é uma característica importante no momento de avaliar comprimidos de liberação imediata já que estes comprimidos devem ser desintegrados de forma rápida. O teste foi realizado de acordo com o capítulo geral da USP <701> (USP, 42). Os resultados são observados na Tabela 7.

Tabela 7. Tempo de desintegração dos comprimidos comerciais (n=3).

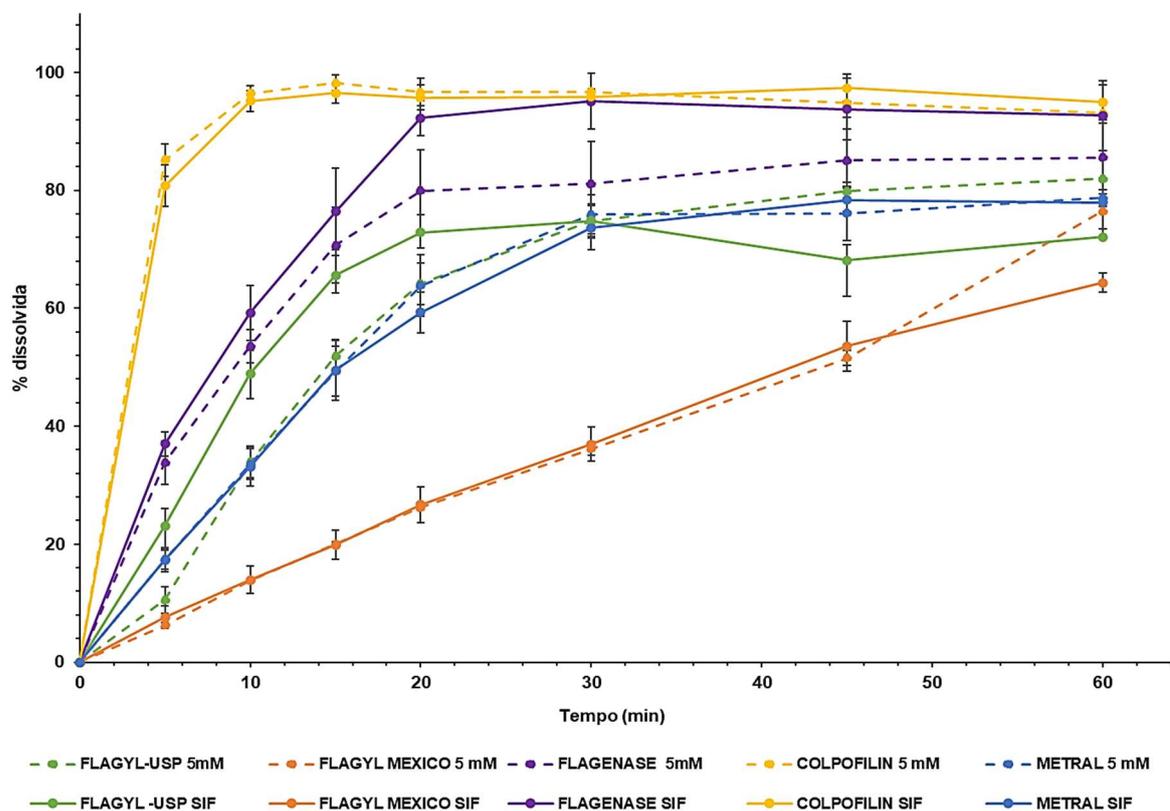
Amostra	Tempo (min)
FLAGYL -USP	5.32 ± 0,43
FLAGYL -MEXICO	18.27 ± 0,58
FLAGENASE	10.16 ± 0,07
COLPOFILIN	0.60 ± 0,22
METRAL	13.32 ± 0,78

3.3.4. Perfil de dissolução

Os resultados dos perfis de dissolução utilizando o método compendial e dois diferentes meios de dissolução (meio SIF (50 mM) e tampão fosfato de baixa capacidade (5mM)) são apresentados na Figura 3. Podemos observar que todos os comprimidos comerciais apresentaram desempenho similar em ambos tipos de tampão. No entanto podemos observar que quanto mais rápido é o tempo de desintegração maior será a porcentagem de liberação do fármaco. Este resultado é

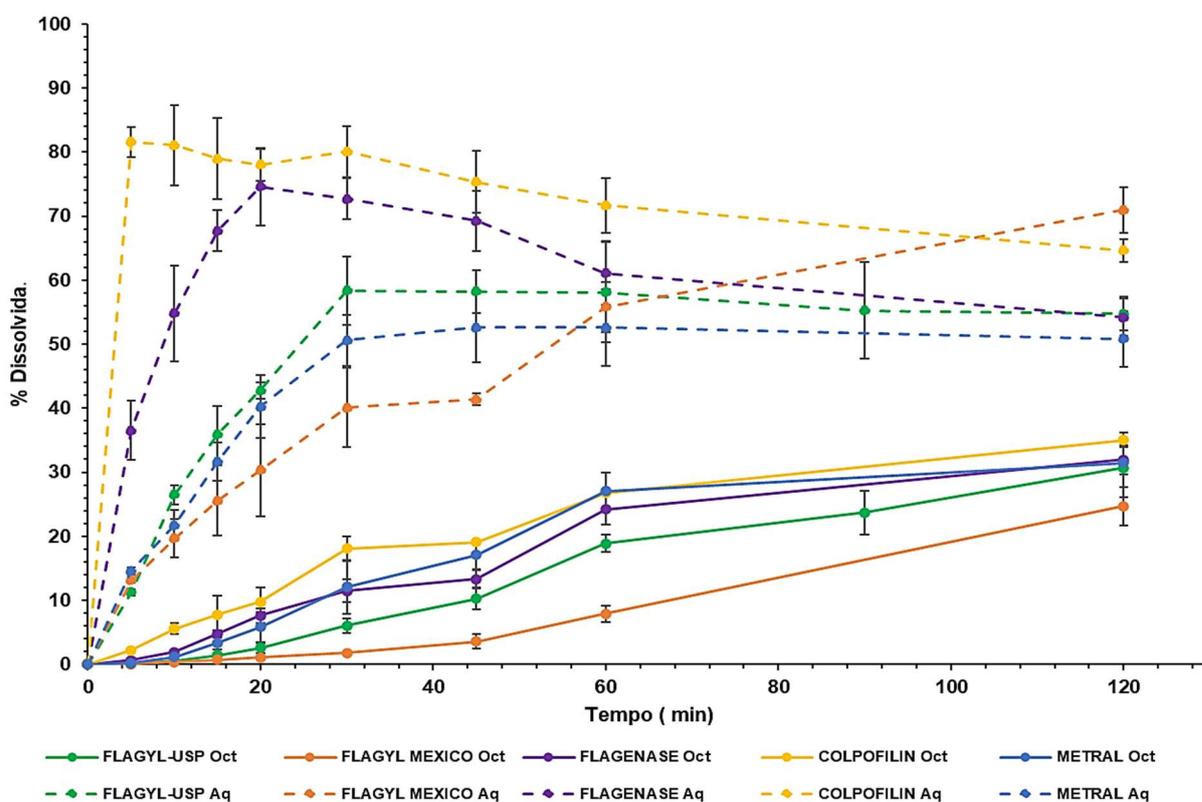
importante devido a que a alta solubilidade do MTZ deveria permitir uma completa e rápida dissolução em ambos meios sem diferença significativas entres estes.

Figura 3. Perfis de dissolução dos comprimidos de MTZ em meio SIF (linhas sólidas) e tampão fosfato de baixa capacidade tampão (5mM - linhas tracejadas).



Os resultados do teste de dissolução bifásica são apresentados na Figura 4. Um padrão de liberação semelhante ao teste de dissolução monofásico foi observado, no entanto, os comprimidos da marca Colpofilin apresentaram maior percentagem de liberação do fármaco o que corrobora a teoria que quanto mais rápida a desintegração mais rápida a dissolução. O passo do fármaco da fase aquosa a fase orgânica foi avaliada mediante a determinação da percentagem dissolvida de fármaco na fase orgânica (n-octanol). Os resultados permitiram observar que a percentagem dissolvida na fase orgânica nem sempre tem relação direta com a percentagem dissolvida na fase aquosa. Desta forma por exemplo o Colpofilin e Metral aos 60 minutos dissolveram 71% e 52%, respectivamente na fase aquosa, mas na fase orgânica neste mesmo tempo a percentagem determinada foi semelhante nos dois produtos (cerca de 27%).

Figura 4. Perfis de dissolução bifásica de formulações de metronidazol nas fases aquosa (linhas tracejadas) e orgânica (linhas contínuas).



4. Conclusão

Podemos concluir que nenhum dos produtos comerciais de metronidazol demonstraram equivalência farmacêutica *in vitro* ao produto de referência Flagyl-USP para ambos métodos de dissolução monobásicos (utilizando meio SIF e tampão fosfato de baixa capacidade tampão). No entanto, um comportamento similar na liberação do MTZ em todos os comprimidos foi observado na fase orgânica (n-octanol) do sistema bifásico. Este resultado permite inferir que esta metodologia poderia estimar o comportamento *in vivo* dos produtos à base de fármacos de alta solubilidade. Futuros ensaios complementares com outros fármacos da Classe I se fazem necessários para corroborar esta teoria e demonstrar os diversos benefícios que a dissolução bifásica proporciona para a bioisenção.

5. Referências bibliográficas

AL DURDUNJI, Amal; ALKHATIB, Hatim S.; AL-GHAZAWI, Mutasim. Development of a biphasic dissolution test for Deferasirox dispersible tablets and its application in establishing an in vitro-in vivo correlation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 102, p. 9–18, 2016.

AMIDON, Gordon L.; LENNERNÄS, Hans; SHAH, Vinod P.; CRISON, John R. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. **Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 12, n. 3, p. 413–420, 1995.

RASIL, ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO RDC Nº 37, DE 03 DE AGOSTO DE 2011. Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. Diário Oficial da União, Brasília, 03 de agosto de 2011.

DENG, Jia; STAUFENBIEL, Sven; BODMEIER, Roland. Evaluation of a biphasic in vitro dissolution test for estimating the bioavailability of carbamazepine polymorphic forms. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, p. 64–70, 2017.

LENNERNÄS, Hans; ABRAHAMSSON, Bertil. The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, n. 3, p. 273–285, 2005.

LÖBENBERG, Raimar; CHACRA, Nadia B.; STIPPLER, Erika S.; SHAH, Vinod P.; DESTEFANO, Anthony J.; HAUCK, Walter W.; WILLIAMS, Roger L. Toward Global Standards for Comparator Pharmaceutical Products: Case Studies of Amoxicillin, Metronidazole, and Zidovudine in the Americas. **The AAPS Journal**, v. 14, n. 3, p. 462–472, 2012.

PESTIEAU, Aude; EVRARD, Brigitte. In vitro biphasic dissolution tests and their suitability for establishing in vitro-in vivo correlations: A historical review. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, p. 203–219, 2017.

PESTIEAU, Aude; KRIER, Fabrice; BROUWERS, Adeline; STREEL, Bruno; EVRARD, Brigitte. Selection of a discriminant and biorelevant in vitro dissolution test for the development of fenofibrate self-emulsifying lipid-based formulations. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, p. 212–219, 2016.

PHILLIPS, Daniel J.; PYGALL, Samuel R.; COOPER, V. Brett; MANN, James C. Overcoming sink limitations in dissolution testing: A review of traditional methods and the potential utility of biphasic systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n.11, p. 1549–1559, 2012.

SILVA, Daniela Amaral; AL-GOUSOUS, Jozef; DAVIES, Neal M.; CHACRA, Nadia Bou; WEBSTER, Gregory K.; LIPKA, Elke; AMIDON, Gordon L.; LÖBENBERG, Raimar. Biphasic dissolution as an exploratory method during early drug product development. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 5, p. 1–17, 2020.

XU, Hao; SHI, Yi; VELA, Socrates; MARROUM, Patrick; GAO, Ping. Developing Quantitative In Vitro–In Vivo Correlation for Fenofibrate Immediate-Release Formulations With the Biphasic

Dissolution-Partition Test Method. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 107, n. 1, p. 476–487, 2018.