



MAYRE APARECIDA BORGES DA COSTA

**CARACTERIZAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO
MÉTODO ANALÍTICO DE TEOR E PERFIL DE LIBERAÇÃO *in vitro* –
SUSPENSÃO DE SULFASSALAZINA 250 mg/5 mL**

Rio de Janeiro

2011

C837c Costa, Mayre Aparecida Borges da.

Caracterização, desenvolvimento e validação do método analítico de teor e perfil de liberação *in vitro*: suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL/ Mayre Aparecida Borges da Costa; orientadores Elisabete Pereira dos Santos, Eduardo Ricci-Júnior. – Rio de Janeiro : UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2011. 182f. : il. (algumas col.) ; 30cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Sulfassalazina. 2. Suspensão. 3. Método analítico. 4. Dissolução. 5. Doença de Chron. 6. Estabilidade. I. Santos, Elisabete Pereira dos. II. Ricci-Júnior, Eduardo. III. Título.

CDD 615.19

Mayre Aparecida Borges da Costa

**CARACTERIZAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO
ANALÍTICO DE TEOR E PERFIL DE LIBERAÇÃO *in vitro* – SUSPENSÃO DE
SULFASSALAZINA 250 mg/5 mL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadores: Profa. Dra. Elisabete Pereira dos Santos
Prof. Dr. Eduardo Ricci-Júnior

**Rio de Janeiro
2011**

Mayre Aparecida Borges da Costa

**CARACTERIZAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO
ANALÍTICO DE TEOR E PERFIL DE LIBERAÇÃO *in vitro* – SUSPENSÃO DE
SULFASSALAZINA 250 mg/5 mL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências

Aprovada em : ____/____/____

Elisabete Pereira dos Santos, Profa. Dra., DEMED – UFRJ

Eduardo Ricci-Júnior, Prof. Dr., DEMED - UFRJ

Franceline Reynaud, Profa. Dra., DEMED – UFRJ

Sheila Garcia, Profa. Dra., DEMED – UFRJ

Carla Holandino Quaresma, Profa. Dra., DEMED - UFRJ

Dedico este trabalho à minha irmã Iana Marcia, que sempre torceu por mim, grande exemplo de amor e dedicação e a minha família, João Henrique, Maria Clara e Ana Carolina.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** pela minha vida, pela minha saúde, minha família, meus amigos, meus estudos, pelas oportunidades de aprendizado e por todo o caminho percorrido até aqui.

Agradeço a nossa mãe do céu, **Nossa Senhora**, por me acompanhar durante toda a minha vida e proteger com sua Luz e bênçãos a minha vida.

Agradeço ao meu esposo, **João Henrique**, por todo apoio e paciência nos momentos mais difíceis, amo você!

Agradeço minhas filhinhas, **Maria Clara e Ana Carolina**, por compreenderem a falta de tempo da mamãe, mas eu amo muito vocês, que são as forças motrizes da minha vida, razão do meu viver e fontes de alegrias e felicidades.

Agradeço aos meus pais **Geraldina e Ivanil**, que, entendendo ou não, apoiaram-me todo o tempo, me dando amor, atenção e carinho. Se hoje estou aqui, sou eternamente grata a vocês!

Agradeço a minha orientadora, **Prof. Elisabete P. dos Santos**, pelo aprendizado diário, pela oportunidade de amadurecimento profissional, apoio e confiança.

Agradeço ao **Professor Eduardo Ricci** por ter me dado vários ensinamentos, incentivos, força, amizade e confiança no meu trabalho.

Agradeço a minha amiga **Tailane**, obrigada pelo carinho, amizade, força, ensinamentos, risadas e empurrões de não desista e vá em frente!!

Agradeço a todos os colegas do **LabCQ**, fundamentais na realização deste trabalho. **Eliane, Maria, Gisele, Luiz**. Com vocês aprendi muito, principalmente sobre amizade, convivência e respeito.

Agradeço ao **LabCQ**, em especial a **Prof. Valéria**, muito obrigada pelas dicas, sugestões, apoio, e também pela ajuda com os equipamentos e materiais.

Agradeço ao **Professor Lúcio Mendes Cabral**, por, além de ser da minha banca de acompanhamento, ter me dado várias dicas de como proceder com o meu trabalho.

Agradeço ao **Professor Luís Maurício T. R. Lima** e a **Professora Sheila Garcia**, por me confiar à chave do laboratório didático para os ensaios de dissolução.

Agradeço ao **Laboratório Desenvolvimento Galênico** por abrir suas portas para que eu preparasse as suspensões e em especial as amigas, **Aline, Débora e Mainara** pela gentileza de me acompanhar ao IMA.

Agradeço a **Jaqueline** do laboratório de Tecnologia Farmacêutica pela acompanhamento nas análises de DSC e DRX.

Agradeço aos Professores da banca de acompanhamento **Nancy Barbi e Lúcio Mendes Cabral**, por toda a ajuda.

Agradeço aos professores da banca de avaliação, que aceitaram participar da defesa desta dissertação.

Agradeço a todas as pessoas que sempre me incentivaram, me deram forças, ouviram-me, me acompanharam, brigaram comigo, me ajudaram e que, de alguma maneira tornaram real este momento da minha vida.

RESUMO

COSTA, Mayre A. Borges da. Caracterização, desenvolvimento e validação do método analítico de teor e perfil de liberação *in vitro* - Suspensão de sulfassalazina 250 mg/5mL. Rio de Janeiro, 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011

A sulfassalazina (SSZ) é um pró-fármaco utilizado no tratamento da Doença de Chron, artrite reumatóide e colites ulcerativas. Atualmente no Brasil, a Sulfassalazina é encontrada somente como comprimidos de liberação retardada Azulfín[®] 500 mg (Apsen Farmacêutica). O desenvolvimento de uma formulação líquida desse fármaco é importante devido sua aplicabilidade para atender pacientes pediátricos, pessoas com dificuldade de deglutição, além de facilitar a administração de diferentes doses. No presente trabalho, foi desenvolvida uma suspensão de sulfassalazina 250 mg/ 5 mL. Na formulação utilizamos a carboximetilcelulose sódica na concentração de 0,3% como agente suspensor, benzoato de sódio como conservante, além de ciclamato de sódio como adoçante e tween 80 como tensoativo. Foram selecionados três fornecedores D, H e P a fim de compararmos as formulações. As matérias-primas foram caracterizadas quanto à sua pureza, teor, quantidade de água, presença de polimorfismo, tamanho de partícula. As suspensões foram caracterizadas quanto à viscosidade, tamanho de partícula, densidade, pH, potencial zeta, teor total de SSZ e teor do fármaco dissolvido nas formulações. Para determinação de sulfassalazina na suspensão, dois métodos analíticos foram desenvolvidos e validados: espectrofotometria UV/Vis e CLAE. Ambos os métodos mostraram-se precisos, exatos e apresentaram limite de quantificação menor que a concentração de determinação dos métodos. A robustez de ambos os métodos também foi demonstrada. As matérias-primas não apresentaram presença de polimorfos, os três fornecedores apresentaram perfil de DRX e DSC semelhantes ao padrão, porém na análise de tamanho de partícula foi verificado que não existe controle na distribuição do tamanho das partículas, apresentando valores de *span* elevados. O volume de sedimentação apresentou valor próximo a 1 por um período de 6 horas, o que é farmacêuticamente aceitável. O valor do potencial zeta mostrou que as forças de repulsão (carga negativa) estão

predominando às de atração, evitando a formação de aglomerados e sedimentação rápida. Na suspensão houve redução considerável do valor de *span* quando comparado com a matéria-prima. Os meios de dissolução para o ensaio de dissolução foram selecionados após o teste de solubilidade do fármaco em diferentes meios. Os meios escolhidos foram: HCl 0,1N, tampão fosfato pH 5,8, tampão fosfato pH 5,8 com tween 80 à 0,5%, tampão fosfato pH 6,8 e pH 7,4, nas rotações de 25 e 50 rpm. A adição das amostras às cubas foi feita com auxílio de seringa, por diferença de peso, sendo a dose calculada frente a densidade de cada formulação. No meio HCl 0,1N, o percentual total dissolvido não ultrapassou 10%, devido a baixa solubilidade da SSZ nesse meio. Nos demais meios, as formulações apresentaram mais de 85% do total dissolvido em 15 minutos, caracterizando-a como formulação de liberação muito rápida. Análise estatística foi utilizada para racionalização do meio de dissolução e da rotação. O meio tampão fosfato pH 7,4 na velocidade de rotação de 50 rpm foi o mais representativo. Foi realizado estudo de estabilidade à 40°C por 90 dias e as suspensões apresentaram estabilidade físico-química e microbiológica.

Palavras-chave: Sulfassalazina. Suspensão. Método Analítico. Dissolução. Doença de Chron. Estabilidade.

ABSTRACT

COSTA, Mayre A. Borges da. Characterization, development and validation of the analytical method of assay, release profile *in vitro* - Suspension de sulfasalazine 250 mg/5mL. Rio de Janeiro, 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011

The sulfasalazine (SSZ) is a prodrug used in the treatment of the Chron's disease, colitis ulcerative and rheumatoid arthritis. Currently in Brazil, the sulfasalazine is found only as tablets of delayed release Azulfin® 500 mg (Pharmaceutical Apsen). The development of a liquid formulation of this drug is important because its applicability to take care of pediatrics patients, people with deglutition difficulty, beyond facilitating the administration of different doses. In the present work a suspension of sulfasalazine 250 mg/5 mL was developed. In the formulation was used sodium carboxymethylcellulose in the 0,3% it was suspender, sodium benzoate as conservator, sodium cyclamate as sweetener and polysorbate 80 as surfactant. Three suppliers D, H and P was used to compare the formulations. The raw materials had been characterized such as its purity, content, amount of water, presence of polymorphism, size of particle. The suspensions had been characterized such as to viscosity, size of particle, density, pH, and potential zeta, total content of SSZ and content of the drug dissolved in the formulations. Two analytical methods had been developed and validated: spectrophotometry UV/Vis and HPLC for determination of sulfasalazine in the suspension. Both methods showed, accuracy and had presented limit of quantification less than the concentration of determination of the methods. The robustness of both methods also was demonstrated. The raw materials had not presented presence of polymorphous, the three suppliers had presented similar profile of DRX and DSC when compared with standard. However, in the analysis of size of particle it was verified that control in the distribution does not exist of size of particles, presenting raised values of span. The flocculation degree presented value next the 1 for a period to 6 hours, what it is pharmaceutical acceptable. The value of the potential zeta, showed that the repulsion forces (negative load) are predominating to the ones of attraction, preventing the formation of clusters and fast sedimentation. In the suspension it had considerable reduction of the value of span

when compared with the raw material. The dissolution testing had been selected the solubility test of the drug in different medium. The following media was chosen: HCl 0.1N, buffer phosphate pH 5.8, buffer phosphate with polysorbate 80 0.5%, buffer phosphate pH 6.8 and pH 7.4, in the 50 and 25 rpm. The addition of the samples to cubes was made with syringe for weight difference, having been the calculated dose front the density of each formulation. In the medium HCl 0.1N, % dissolved total did not exceed 10%, due low the solubility of the SSZ in this medium. In the excessively half ones, the formulations had more than presented 85% of the total dissolved in 15 minutes, characterizing it as formulation of very fast release. Analysis statistics was used for to choose of the medium of dissolution and the rotation. The medium buffer phosphate pH 7.4 in the speed of rotation of 50 rpm was better. Stability studies by 40°C for 90 days was carried and the suspensions showed microbiological and physicist-chemistry stability.

Keywords: Sulfasalazine. Suspension. Analytical Method. Dissolution. Chron's Disease. Stability.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	31
1.1 SULFASSALAZINA (SSZ)	31
1.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA SULFASSALAZINA	36
1.3 CARACTERÍSTICAS FARMACOCINÉTICAS	36
1.4 USO DA SULFASSALAZINA EM SUSPENSÃO ORAL	37
1.5 SUSPENSÃO ORAL	38
1.6 SISTEMAS DEFLOCULADOS E FLOCULADOS	39
1.7 FATORES RELACIONADOS À FORMULAÇÃO DE SUSPENSÕES	39
1.7.1 Tamanho de partícula do fármaco	39
1.7.2 Agentes molhantes	41
1.7.3 Agentes modificadores da viscosidade	42
1.7.4 Parâmetros de sedimentação	42
1.7.5 Potencial Zeta ζ	42
1.8 TESTE DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> – DISSOLUÇÃO	44
1.8.1 Importância da dissolução para formas farmacêuticas especiais .	45
1.8.2 Cinética da dissolução	45
1.8.3 Condições <i>sink</i>	47
1.8.4 Fatores que interferem na dissolução	47
1.8.4.1 Solubilidade	47
1.8.4.2 Polimorfismo	48
1.8.4.3 Efeito do tamanho da partícula	48
1.8.5 Parâmetros para o teste de dissolução de suspensão	49
1.8.5.1 Meios de dissolução	49
1.8.5.2 Aparato e rotação	50
1.9 ESTUDO DE ESTABILIDADE	51
2 OBJETIVOS	53
2.1 OBJETIVO GERAL	53
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
3 MATERIAIS E MÉTODOS	54
3.1 MATERIAL	54

3.1.1 Reagentes e vidrarias	54
3.1.2 Equipamentos e acessórios	55
3.1.3 Matérias-primas	56
3.1.4 Material de referência	56
3.1.5 Soluções	56
4 MÉTODOS	58
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA SULFASSALAZINA	58
4.1.1 Determinação do teor da matéria-prima	58
4.1.2 Identificação por IR e UV/Vis	59
4.1.2.1 Identificação por IR	59
4.1.2.2 Identificação por UV/Vis...	59
4.1.3 Solubilidade	59
4.1.3.1 Screening de meios de dissolução	60
4.1.4 Pureza cromatográfica	60
4.1.5 Distribuição do tamanho de partícula	61
4.1.6 Perda por dessecação	62
4.1.7 Cinzas sulfatadas	62
4.1.8 Presença de Polimorfos	62
4.1.8.1 Difração por Raio X (DRX)	62
4.1.8.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	62
4.1.8.3 Ponto de fusão	63
4.2 DESENVOLVIMENTO DA SUSPENSÃO ORAL MAGISTRAL DE SULFASSALAZINA	63
4.2.1 Escolha do agente suspensor	63
4.2.2 Determinação da viscosidade	64
4.2.3 Formulação de Suspensão de Sulfassalazina 250 mg/5 mL	64
4.3 CARACTERIZAÇÃO DA SUSPENSÃO DE SULFASSALAZINA 250 mg/5 mL	65
4.3.1 Desenvolvimento e validação do método de teor de Sulfassalazina suspensão oral	66
4.3.1.1 Metodologia por Espectrofotometria UV/Vis	66
4.3.1.2 Seletividade e especificidade	66
4.3.1.3 Linearidade	67

4.3.1.4 Precisão intra e inter-dia	67
4.3.1.5 Exatidão	67
4.3.1.6 Robustez	68
4.3.2 Metodologia de determinação de teor de SSZ por CLAE – DAD	68
4.3.2.1 Condições cromatográficas	68
4.3.2.2 Especificidade e seletividade	69
4.3.2.3 Linearidade	69
4.3.2.4 Precisão intra e inter-dia	69
4.3.2.5 Exatidão	70
4.3.2.6 Robustez	70
4.3.3 Densidade	70
4.3.4 pH	70
4.3.5 Viscosidade	70
4.3.6 Velocidade de sedimentação	70
4.3.7 Potencial Zeta ζ	71
4.3.8 Determinação do teor de Sulfassalazina na suspensão	71
4.3.9 Microscopia óptica da suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL .	72
4.3.10 Determinação do teor de comprimido revestido Azulfin® 500	
mg.....	72
4.4 DISSOLUÇÃO DA SUSPENSÃO DE SULFASSALAZINA 250 mg/5mL ...	73
4.4.1 Preparo das amostras	73
4.4.2 Rotação	75
4.4.3 Tempo de coleta	75
4.4.4 Meios de dissolução e condições sink	75
4.4.5 Adsorção nos filtros	76
4.4.6 Modelo de Weibull aplicado ao perfil de dissolução	77
4.4.7 Tratamento estatístico da dissolução	78
4.4.8 Perfil de dissolução do comprimido revestido referência Azulfin®	
500 mg	78
4.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE	
DISSOLUÇÃO	79
4.5.1 Especificidade e seletividade	79
4.5.2 Linearidade	79

4.5.3 Exatidão/recuperação	80
4.5.4 Precisão e precisão intermediária	80
4.5.5 Limite de Quantificação (LQ) e Limite de Detecção (LD)	81
4.5.6 Estudo da estabilidade das soluções de dissolução	81
4.6 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS SUSPENSÕES DE SULFASSALAZINA D, H E P	82
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA SULFASSALAZINA	83
5.1.1 Teor	83
5.1.2 Identificação por UV/Vis	83
5.1.3 Identificação por Espectrofotometria IR	84
5.1.4 Perda por dessecação	87
5.1.5 Solubilidade	87
5.1.6 Cinzas sulfatadas	90
5.1.7 Pureza cromatográfica	90
5.1.8 Determinação do tamanho de partícula	90
5.1.9 Presença de polimorfismo	92
5.1.9.1 DRX (Difração por raio X)	92
5.1.9.2 Ponto de fusão	93
5.1.9.3 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	94
5.1.10 Discussão geral sobre a caracterização das matérias-primas	96
5.2 ESCOLHA DO AGENTE SUSPENSOR.....	97
5.3 CARACTERIZAÇÃO DA SUSPENSÃO DE SSZ 250 mg/5 mL	103
5.3.1 Determinação do tamanho de partículas das suspensões	103
5.3.2 Microscopia ótica das suspensões.....	106
5.3.3 Densidade, pH e viscosidade	107
5.3.4 Potencial Zeta ζ	108
5.4 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE DOSEAMENTO DE SSZ POR UV/Vis	109
5.4.1 Seletividade e especificidade	109
5.4.2 Linearidade	109
5.4.3 Precisão intermediária	112

5.4.4 Exatidão/recuperação	114
5.4.5 Robustez	115
5.5 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CLAE-DAD (DETECTOR DE ARRANJO DE FOTODIODOS)	115
5.5.1 Especificidade e seletividade	115
5.5.2 Linearidade	117
5.5.3 Precisão	119
5.5.4 Precisão intermediária	120
5.5.5 Exatidão/recuperação	122
5.5.6 Robustez	123
5.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SULFASSALAZINA NAS SUSPENSÕES (UV/Vis)	124
5.6.1 Determinação do teor do comprimido de Azulfin® 500 mg	125
5.7 DISSOLUÇÃO DA SUSPENSÃO DE SULFASSALAZINA	126
5.7.1 Teste de adsorção dos filtros	126
5.7.2 Determinação dos perfis de dissolução das suspensões de Sulfassalazina 250 mg/5 mL	126
5.7.2.1 Meio HCl 0,1N	126
5.7.2.2 Meio tampão fosfato pH 5,8, tampão fosfato pH 5,8 tween 80 0,5%, tampão fosfato pH 6,8 e tampão fosfato pH 7,4	128
5.7.3 Modelo Weibull aplicados aos perfis de dissolução	135
5.7.4 Determinação do perfil de dissolução do comprimido revestido Azulfin® 500 mg	139
5.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO APLICADO À DISSOLUÇÃO	141
5.8.1 Especificidade	141
5.8.2 Linearidade	142
5.8.3 Exatidão e recuperação	145
5.8.4 Precisão e precisão intermediária	146
5.8.5 Estabilidade das soluções da dissolução	148
5.8.6 Limite inferior de quantificação (LQ) e limite inferior de detecção (LD)	148

5.9 ESTUDO DE ESTABILIDADE	148
5.10 DISCUSSÃO GERAL	158
6 CONCLUSÕES	161
7 ANEXOS	162
ANEXO 1 - Curva de calibração nos diferentes meios para determinação da solubilidade em mg/mL.	163
ANEXO 2 - Cromatogramas da SSZ das suspensões fabricadas com amostras dos fornecedores D, H e P e seus respectivos espectros de absorção tridimensional.	166
ANEXO 3 - Resultados do perfil de liberação das suspensões D, H e P	168
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	172

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-ABA	4-amino benzoil- β alanina
5-ASA	ácido 5-aminosalicílico
A	absorbância
AcSP	N-acetilsulfapiridina
ANVISA	agência nacional de vigilância sanitária
AP	apical
BL	basolateral
C	concentração
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CMC-Na	carboximetilcelulose sódica
Cpr	comprimido
cps	centipoise
C_s	concentração de saturação
C_t	concentração no tempo t
D	coeficiente de difusão
DAD	detector arranjo de diodos
DPR	desvio padrão relativo
DP	desvio padrão
DRX	difração por raio X
DSC	calorimetria diferencial de varredura
Ed	edição
EHL	equilíbrio hidrófilo-lipófilo
F	grau de floculação ou volume de sedimentação
FB	farmacopéia brasileira
g	grama
h	espessura da camada de difusão
H₂O	água
HCl	ácido clorídrico
HPLC	high performance liquid cromathography

HPMC	hidroxipropilmetilcelulose
ICH	international conference on harmonization
IL-2	interleucina 1
IR	infra-red (infra-vermelho)
mL	mililitros
NaOH	hidróxido de sódio
NAT2	N-acetiltransferase hepática
nm	nanômetro
°C	graus centígrados
PA	pureza absoluta
PDA	arranjo de fotodiodos
PDR	coeficiente de permeabilidade
POLI	polissorbato
q.s.p	quantidade suficiente para
rpm	rotação por minuto
S	superfície do sólido
SSZ	sulfasalazina
SP	sulfapiridina
t	tempo
TNF-α	fator α de necrose tumoral
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
USP	farmacopéia americana
UV/Vis	ultra violeta/visível
V	volume do meio de dissolução
V₀	volume inicial da suspensão
V_u	volume definitivo de sedimento
δ	desvio padrão
ζ	potencial zeta
μm	micra
μg	micrograma
λ	comprimento de onda

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática de um intestino grosso acometido por inflamações crônicas, características da Doença de Chron. Disponível em: www.emforma.net/saude/condicoes/doenca-de-chron . Acesso em: 24 jul.2010.	32
Figura 2	Sulfassalazina: pró-fármaco recíproco de sulfapiridina e ácido aminossalicílico. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v41n2/28036.pdf . Acesso em: 25 jul. 2011.	34
Figura 3	Estrutura química da sulfassalazina.	36
Figura 4	Esquema da dupla camada elétrica em uma superfície com carga positiva , os íons de carga contrária ao da superfície (contra-íons), formando a camada de Stern e a camada difusa. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/ce/v43n283-284/4848.pdf . Acesso em: jun. 2011.	43
Figura 5	Esquema da dissolução de um fármaco a partir de uma matriz sólida, mostrando a camada de difusão estática entre a superfície da forma farmacêutica e a solução.	46
Figura 6	Fluxograma do procedimento de preparo da suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL.	65
Figura 7	Esquema de amostragem das suspensões para determinação do teor de sulfassalazina.	72
Figura 8	Roteiro do ensaio de dissolução da esquerda para direita: (a) seringas contendo a suspensão pesadas e numeradas em ordem de adição nas cubas. (b) adição da suspensão nas cubas. (c) coleta realizada com a seringa e pré-filtração com filtro 35 µm. (d) filtração da amostra coletada com filtro 0,45 µm (Millex [®])(e) amostras filtradas.	74
Figura 9	Espectro de absorção UV/Vis da sulfassalazina fornecedor D (lote: 20090712).	84

Figura 10	Espectro de absorção UV/Vis da sulfassalazina material de referência Sigma (lote: 1450407).	84
Figura 11	(A) Espectro de infravermelho do padrão Sigma de sulfassalazina (B) faixa de comprimento de onda que representa a área de impressão digital dos picos de 600 a 1200 cm^{-1} .	85
Figura 12	Espectro de absorção do padrão sigma (lote: 1450407) utilizando detector DAD.	90
Figura 13	Distribuição gráfica do tamanho de partícula para SSZ fornecedor D, H e P.	91
Figura 14	Difratogramas dos lotes de SSZ dos fornecedores H (lote: 090702) e P (lote: 20071214), D (lote: 20090712) e padrão Sigma (lote: 1450407).	93
Figura 15	Gráficos de DSC dos lotes de SSZ dos fornecedores H (lote: 090702), P (lote: 20071214), D (lote: 20090712) e padrão Sigma (lote: 1450407).	95
Figura 16	Valores de viscosidade (cps) obtidos em soluções de CMC à 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,5% e 0,7% (p/v).	98
Figura 17	Valores de viscosidade (cps) obtidos em soluções de CMC à 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,5% e 0,7% (p/v).	99
Figura 18	Grau de floculação (F) das suspensões de sulfassalazina 250 mg/5 mL fabricadas com SSZ de três fornecedores diferentes.	100
Figura 19	Aspecto das suspensões D, H e P após 192 horas (8 dias) de preparo.	101
Figura 20	Gráficos de distribuição do tamanho das partículas para suspensões dos fornecedores D, H e P, usando como dispersante placebo.	103
Figura 21	Gráficos de distribuição do tamanho das partículas para suspensões dos fornecedores D, H e P, usando dispersante solução de HCl 0,1N.	105
Figura 22	Microscopia ótica da suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL, fornecedor H, (aumentada 20x).	106
Figura 23	Microscopia ótica da suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL, fornecedor D, (aumentada 20x).	106

Figura 24	Microscopia ótica da suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL, fornecedor P, (aumentada 20x).	107
Figura 25	Espectro de absorção no UV/Vis da amostra de suspensão de SSZ em solução de NaOH 0,1N e do placebo nas mesmas condições.	109
Figura 26	curvas padrão médias – linearidade do método espectrofotométrico.	110
Figura 27	(a) Gráfico tipo ratiogram mostrando a pureza do pico obtida pela razão cromatográfica. (b) cromatograma tridimensional obtido através de detector UV/PDA para uma solução padrão de SSZ na concentração de 6µg/mL. (C) espectro de absorção do placebo injetado nas mesmas condições do padrão. (d) espectro de UV/PDA para uma solução padrão de SSZ na concentração de 6 µg/mL.	116
Figura 28	Curvas padrão de SSZ – linearidade do método cromatográfico.	117
Figura 29	Perfil de dissolução de suspensão de Sulfassalazina 250 mg/5 mL em HCl 0,1N pH 1,2, 25rpm (a) e 50 rpm (b).	127
Figura 30	Perfis de dissolução da suspensão de sulfassalazina 250 mg/ 5 mL em meio tampão fosfato pH 5,8 , nas rotações de 25 rpm (a) e 50 rpm (b).	129
Figura 31	Perfis de dissolução da suspensão de sulfassalazina 250 mg/ 5 mL em meio tampão fosfato pH 5,8 com polissorbato 80 0,5%, nas rotações de 25 rpm (a) e 50 rpm (b).	130
Figura 32	Perfis de dissolução da suspensão de sulfassalazina 250 mg/ 5 mL em meio tampão fosfato pH 6,8, nas rotações de 25 rpm (a) e 50 rpm (b).	131
Figura 33	Perfis de dissolução da suspensão de sulfassalazina 250 mg/ 5 mL em meio tampão fosfato pH 7,4, nas rotações de 25 rpm (a) e 50 rpm (b).	132
Figura 34	Perfil de dissolução do comprimido revestido de Azulfin® 500 mg usando pá rotatória (aparato 2) em meio tampão 7,4 à 100 rpm.	140
Figura 35	espectro de absorção do placebo (a) e de amostra de SSZ (b) em tampão fosfato pH 7,4.	142
Figura 36	curvas padrão obtidas do estudo da linearidade no meio tampão fosfato pH 7,4.	143

Figura 37	Aspecto da suspensão de sulfassalazina no tempo inicial do estudo de estabilidade.	149
Figura 38	Distribuição do tamanho de partículas das suspensões D, H e P no tempo inicial da estabilidade.	150
Figura 39	Distribuição do tamanho de partícula das suspensões D, H e P após 90 dias à 40°C.	152
Figura 40	Microscopia ótica das suspensões de sulfassalazina 250 mg/5 mL, fornecedor D, após 90 dias à 40°C em duas escalas (50 µm e 100 µm).	152
Figura 41	Microscopia ótica das suspensões de sulfassalazina 250 mg/5 mL, fornecedor H e P, após 90 dias à 40°C em duas escalas (50 µm e 100 µm).	153
Figura 42	Gráfico de valores de pH durante 90 dias de estudo de estabilidade (a); gráfico de valores de viscosidade (b); gráfico de teor por metodologia UV/Vis (c) e teor por CLAE (d).	155

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Testes realizados na caracterização da matéria-prima sulfassalazina.	58
Quadro 2	Formulação de suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL.	64
Quadro 3	Planejamento estudo estabilidade 40°C por 90 dias.	149

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	Velocidade de Sedimentação (Lei de Stokes)	40
Equação 2	Volume de Sedimentação	42
Equação 3	Equação de Noyes e Whitney	45
Equação 4	Teoria de Nernst e Brummer	46
Equação 5	<i>span</i>	61
Equação 6	Percentual de adsorção nos filtros	77
Equação 7	Equação de Weibull	77
Equação 8	Limite de Detecção	81
Equação 9	Limite de Quantificação	81

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1	Aminosalicilatos correntemente viáveis no Brasil e nos Estados Unidos.	35
Tabela 2	pH fisiológico a serem considerados nos testes de dissolução.	50
Tabela 3	Condições <i>sink</i> adotadas para os meios de dissolução usados no ensaio de dissolução da suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL.	76
Tabela 4	Planejamento dos testes do estudo de estabilidade das suspensões de Sulfassalazina 250 mg/5 mL.	82
Tabela 5	Análise quantitativa (doseamento) da sulfassalazina fornecedor P, D e H.	83
Tabela 6	Resultados de comprimento de onda λ (cm^{-1}) das principais bandas do espectro IR da amostra de sulfassalazina fornecedor P (lote 20071214), fornecedor D (lote 20090712), fornecedor H (lote 090702) comparados com o padrão Sigma (lote 1450407).	86
Tabela 7	Perda por dessecação da sulfassalazina fornecedor P, D e H.	87
Tabela 8	Parâmetros provenientes das curvas padrão (mínimo de 3 níveis) utilizadas na determinação da solubilidade por espectrofotometria UV/Vis das amostras dos fornecedores D, H e P para os diferentes meios de dissolução.	88
Tabela 9	Resultados do valor da solubilidade (mg/mL) para as amostras ($n = 3$) de SSZ dos fornecedores D, H e P por espectrofotometria UV/VIS à 25°C.	88
Tabela 10	Espectros de absorção no UV/VIS da SSZ para os diferentes meios de dissolução.	89
Tabela 11	Valor de cinzas sulfatadas (%) determinado para SSZ para os fornecedores D, H e P.	90

Tabela 12	Distribuição do tamanho das partículas (μm) das matérias- primas D, H e P.	91
Tabela 13	Valores de ponto fusão ($^{\circ}\text{C}$) encontrados para as amostras de SSZ dos fornecedores D, H, e P (n = 3).	93
Tabela 14	Valores de viscosidade em centipoise (cps) determinados em viscosímetro Brookfield Spindle 2 velocidade 30 série LV (fator = 10).	97
Tabela 15	Volume de sedimentação (F) obtido em SSZ resuspendida em CMC nas concentrações de 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,5% e 0,7%, considerando volume inicial (HI = 25 cm).	98
Tabela 16	Volume de sedimentação (F) obtidas nas suspensões de SSZ 250 mg/5 mL para os três fornecedores D, H e P.	100
Tabela 17	Distribuição do tamanho das partículas (μm) das suspensões D, H e P.	103
Tabela 18	Distribuição do tamanho das partículas (μm) das suspensões D, H e P, usando como dispersante solução de HCl 0,1N.	104
Tabela 19	Valores de pH, densidade e viscosidade de SSZ 250 mg/5 mL de três fornecedores D, H e P.	108
Tabela 20	Valores de potencial zeta (média de 6 medições em mV \pm dp) obtido para as três suspensões de SSZ dos fornecedores D, H e P.	108
Tabela 21	Confirmação da linearidade método espectrofotométrico por ANOVA.	111
Tabela 22	Dados para o cálculo do intervalo de confiança do intercepto (b) e da inclinação da curva (a) dos coeficientes da reta.	111
Tabela 23	Estatística da regressão do método espectrofotométrico de determinação do teor.	112
Tabela 24	Resultados do teste de precisão usando espectrofotômetro Shimadzu PC1204 e hidróxido de sódio (Vetec) em micropérolas na concentração de 0,1N.	112

Tabela 25	Resultados do teste de precisão usando espectrofotômetro Varian e hidróxido de sódio 0,1N – Proquímios.	113
Tabela 26	Resultados de precisão intermediária (interlaboratorial) método espectrofotométrico de determinação de teor.	114
Tabela 27	Resultados obtidos para a exatidão/recuperação em três soluções de concentrações diferentes: baixa (80%), média (100%) e alta (110%).	114
Tabela 28	Resultados da robustez do método espectrofotométrico – estabilidade das soluções em temperatura ambiente (25°C).	115
Tabela 29	Confirmação da linearidade por ANOVA – método cromatográfico.	118
Tabela 30	Dados para o cálculo do intervalo de confiança do intercepto (b) e da inclinação da curva (a) dos coeficientes da reta.	119
Tabela 31	Estatística da regressão do método de determinação do teor por CLAE.	119
Tabela 32	Resultados da precisão da metodologia de determinação de teor de SSZ por CLAE (HPLC Waters).	120
Tabela 33	Resultados da precisão intermediária do método cromatográfico de determinação de SSZ por CLAE (HPLC Shimadzu VP-Class).	121
Tabela 34	Resultados da exatidão da metodologia de determinação de teor de SSZ por CLAE.	122
Tabela 35	Resultados do ensaio de robustez para o método cromatográfico.	123
Tabela 36	Teor encontrado de SSZ nas suspensões D, H e P pelo método espectrofotométrico.	124
Tabela 37	Determinação do teor do comprimido de Azulfin® 500 mg por ambas metodologias UV/Vis e CLAE.	125

Tabela 38	Resultados (n=3) da análise da suspensão e do comprimido revestido Azulfin® 500 mg pela metodologia por CLAE e por UV/Vis.	125
Tabela 39	Resultados do teste de adsorção dos filtros nos diferentes meios de dissolução.	126
Tabela 40	Dados estatísticos obtidos do estudo <i>in vitro</i> de dissolução de suspensão de sulfassalazina 250 mg/ 5 mL nos meios tampão fosfato pH 5,8, tampão fosfato pH 5,8 poli 80 0,5%, tampão fosfato pH 6,8 e tampão fosfato pH 7,4, nas rotações de 25 e 50 rpm. ^a Considerando estatisticamente significativo para P < 0,05.	133
Tabela 41	Parâmetros de Weibull e determinação do coeficiente de determinação R ² para suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL em meio tampão fosfato pH 5,8.	136
Tabela 42	Parâmetros de Weibull e determinação do coeficiente de determinação R ² para suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL em meio tampão fosfato pH 5,8 tween 80 0,5%.	136
Tabela 43	Parâmetros de Weibull e determinação do coeficiente de determinação R ² para suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL em meio tampão fosfato pH 6,8.	136
Tabela 44	Parâmetros de Weibull e determinação do coeficiente de determinação R ² para suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL em meio tampão fosfato pH 7,4.	136
Tabela 45	Teste F para avaliação da validade da regressão e a significância estatística da curva ajustada considerando p > 0,1 (90% de confiança) para as formulações estudadas à 25 rpm.	138
Tabela 46	Teste F para avaliação da validade da regressão e a significância estatística da curva ajustada considerando p > 0,1 (90% de confiança) para as formulações estudadas à 50 rpm.	138
Tabela 47	Resultado da dissolução do estágio I do perfil de dissolução do comprimido Azulfin® 500 mg.	139

Tabela 48	Percentual total dissolvido do comprimido de liberação retardada Azulfin® 500 mg – estágio II	140
Tabela 49	Confirmação da linearidade por ANOVA – método espectrofotométrico aplicado à dissolução.	143
Tabela 50	Dados para o cálculo do intervalo de confiança do intercepto (b) e da inclinação da curva (a) dos coeficientes da reta.	144
Tabela 51	Estatística da regressão – método espectrofotométrico aplicado ensaio de dissolução.	144
Tabela 52	Parâmetros obtidos das curvas padrão (5 níveis) utilizadas no doseamento por espectrofotometria UV/Vis nos quatro diferentes meios de dissolução.	145
Tabela 53	Resultados da exatidão obtidos em meio tampão fosfato pH 7,4 por espectrofotometria UV/Vis.	146
Tabela 54	Resultados da precisão intermediária (inter-ensaio) e precisão (intra-ensaio) obtido do doseamento das suspensões no meio de dissolução empregando espectrofotometria UV/Vis.	147
Tabela 55	Coefficientes de correlação de curvas de calibração lidas por um período de 48 horas (armazenadas em temperatura ambiente).	148
Tabela 56	Resultados do limite de quantificação e detecção (valores médios de 3 curvas de calibração).	148
Tabela 57	Resultados do tamanho de partícula nas suspensões D, H e P no tempo inicial para estudo de estabilidade.	149
Tabela 58	Resultados do tamanho de partícula nas suspensões D, H e P após 90 dias armazenadas à 40°C para estudo de estabilidade.	151
Tabela 59	Valores de potencial zeta ζ (média de 3 medições em mV \pm dp) obtido para as 3 suspensões de SSZ dos fornecedores D, H e P após armazenamento à 40°C por 90 dias.	154

Tabela 60	Estabilidade à 40°C da suspensão sulfassalazina 250 mg/ 5 mL (fornecedor D lote: 20090712).	156
Tabela 61	Estabilidade à 40°C da suspensão sulfassalazina 250 mg/ 5 mL (fornecedor H lote: 90702).	157
Tabela 62	Estabilidade à 40°C da suspensão sulfassalazina 250 mg/ 5 mL (fornecedor P lote: 20071214).	158

1 INTRODUÇÃO

1.1 SULFASSALAZINA (SSZ)

A sulfassalazina (SSZ) é correntemente utilizada como medicação antiinflamatória e antibacteriana no combate a colite ulcerativa e Doença de Crohn. A colite ulcerativa causa inflamação no intestino grosso, cólon ou reto e provoca sintomas, como: dores abdominais severas, diarréias e sangramento. A Doença de Crohn caracteriza-se por inflamação crônica que afeta predominantemente a parte inferior do intestino delgado (íleo) e o intestino grosso (cólon), mas também pode afetar a boca, passando pelo esôfago, estômago, intestino delgado e grosso, até o reto e ânus. A Doença de Crohn pode ocorrer em pacientes de 20 a 30 anos, mas também pode aparecer em bebês e pacientes geriátricos. Os sintomas mais frequentes são diarréia e dor abdominal com cólica, náuseas e vômitos acompanhados de febre moderada, sensação de distensão abdominal que piora com as refeições; perda de peso; mal-estar geral e cansaço. Pode haver complicações das doenças como câncer no intestino grosso e delgado e sangramentos, além de manifestações na pele como eritema nodoso (TRINCHES *et al.*, 2004).

A sulfassalazina também é utilizada no tratamento da artrite reumatóide e da espondilite anquilosante que são as principais doenças reumáticas e auto-imune comuns no mundo (GENC *et al.*, 2006).

Sulfassalazina foi desenvolvida por Svartz na Suécia em 1940, (OKUBO *et al.*, 2002) e vem sendo usada desde 1942, como o primeiro fármaco desenvolvido para o tratamento da artrite reumatóide e para colite ulcerativa. Ainda é usada como agente terapêutico para manutenção de remissão (QURESHI *et al.*, 2005).

Em 1970, comprimido revestido de sulfassalazina (Azulfidine®) foi desenvolvido para reduzir os sintomas gastrintestinais, passando a ser um dos fármacos mais usuais para o tratamento de artrite reumatóide. Desde então, o Azulfidine® tem sido utilizado em mais de cinquenta países como fármaco para desordens reumáticas (OKUBO *et al.*, 2002).

Existem descrições de casos de uso de sulfassalazina no tratamento da Doença de Behçet. Esta doença inflamatória complexa consiste de uma vasculite crônica recorrente, multisistêmica, que acomete indivíduos de 20 a 30 anos, de

causa desconhecida e que se caracteriza por úlceras orais recorrentes, úlceras genitais, uveíte e lesões de pele. Pode comprometer vários sistemas, tais como o vascular, o neurológico, o articular, o respiratório e o gastrointestinal (HOYT *et al.*, 1995).

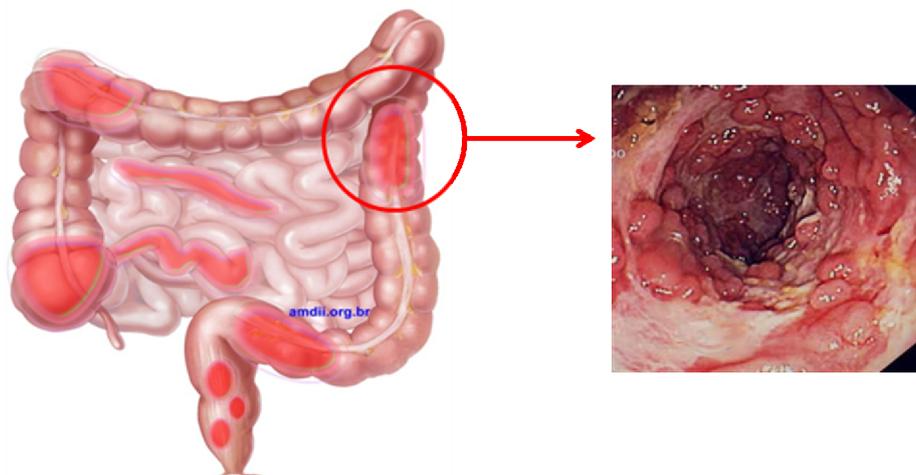


Figura 1: Representação esquemática de um intestino grosso acometido por inflamações crônicas (úlceras), características da Doença de Chron. Disponível em www.emforma.net/saude/condicoes/doenca-de-crohn. Acesso em 24 jul. 2010.

Recentes estudos mostraram que a sulfassalazina tem sido usada com segurança no tratamento prolongado de várias doenças inflamatórias e auto-imunes. Resultados promissores estão sendo publicados em dermatologia, sendo observado a manutenção do crescimento de cabelo em pacientes acometidos por alopecia areata severa. Os pacientes, foram tratados com corticosteróides e sulfassalazina por um período de 2 a 6 meses e mantidos por 4 a 12 meses somente com sulfassalazina. Nesse estudo, dos seis pacientes que usaram o medicamento, todos apresentaram crescimento de cabelo, podendo a SSZ ser utilizada como um fármaco seguro e adjuvante no tratamento da Alopecia Areata (BAKAR *et al.*, 2007).

Atualmente, no mercado brasileiro a sulfassalazina está disponível somente na forma de comprimidos gastro resistentes de 500 mg, Azulfin[®], fabricado pela APSEN Farmacêutica, não existindo apresentação em forma líquida. Uma vantagem da formulação líquida está relacionada à sua

aplicabilidade para atender pacientes pediátricos e geriátricos, devido a facilidade de deglutição, ou, pacientes que são incapazes de tolerar uma forma sólida, como aqueles que recebem medicação por sondas. A formulação líquida representa maior flexibilidade na administração de doses (TRINCHES *et al.*, 2004; JUNYAPRASERT *et al.*, 2008). Outras formas farmacêuticas, como enemas e supositórios não são efetivas no tratamento dessas doenças ulcerativas, visto que, não liberam a droga no local, no caso de úlceras localizadas no cólon ou em porções interiores do intestino. Essas formas farmacêuticas não são as mais indicadas (WONG *et al.*, 1996).

Sulfassalazina é formada pela ligação do ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) ligado com a sulfapiridina (SP) através de uma ligação do tipo azo (Figura 2). Quando administrado oralmente, 30% da sulfassalazina é absorvida na parte superior do trato gastrintestinal, e o remanescente passa para o cólon onde a ligação azo é desfeita pela ação das enzimas azoredutases bacterianas, liberando, então o ácido 5-aminosalicílico para agir no cólon. A sulfapiridina é totalmente absorvida e metabolizada para N-acetilsulfapiridina por enzimas hepáticas (KUMAGAI *et al.*, 2003). O 5-ASA não é absorvido no cólon, mas a sulfapiridina é absorvida e metabolizada para N-acetilsulfapiridina (AcSP) por N-acetiltransferase hepática (NAT2). A sulfapiridina é anfótera, sendo, portanto solúvel em meio ácido ou alcalino; o ácido salicílico tem duas funções de caráter ácido, sendo, portanto solúvel em meio alcalino. Ambas, SSZ e SP apresentam uma variedade de ações, como: imunomoduladora, atividade antibacteriana e inibição de enzimas folato-dependente. Reações adversas como náusea, vômito, dor de cabeça, anemia hemolítica e reticulose parecem ser dependentes da concentração da SP no soro (KUMAGAI *et al.*, 2004).

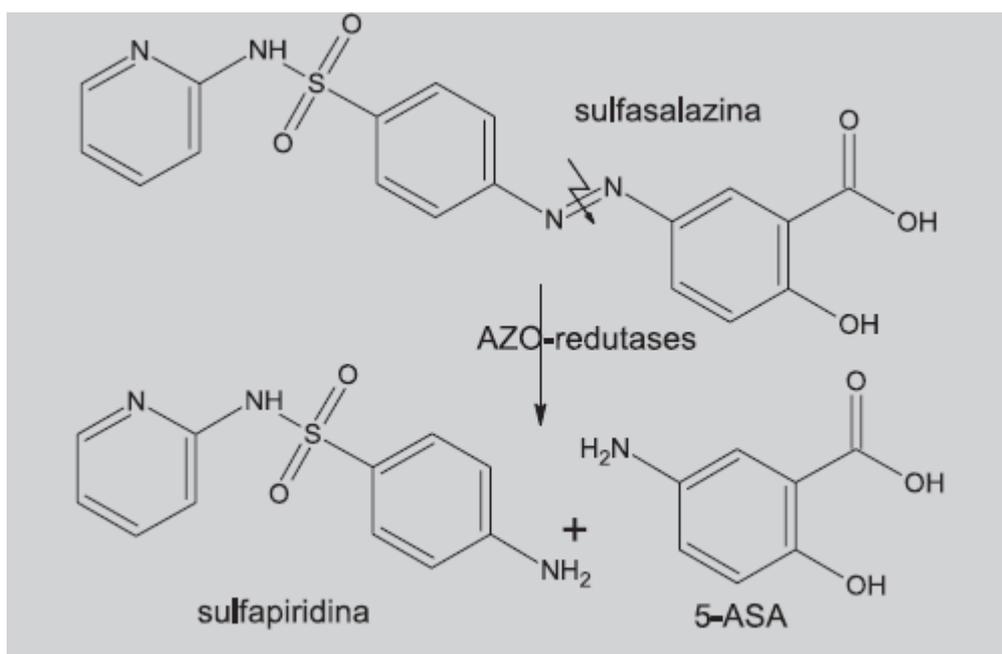


Figura 2 – Sulfassalazina: pró-fármaco recíproco de sulfapiridina e ácido aminossalicílico. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v41n2/28036.pdf>. Acesso em: 25 jul. 2011.

A presença de um núcleo piridínico do grupo azo faz com que a SSZ interfira com o metabolismo normal do ácido fólico, que deve ser suplementado no período de pré-concepção (KUMAGAI *et al.*, 2004).

A SSZ é o medicamento de primeira linha na terapia de pacientes acometidos com doença inflamatória intestinal. Porém, a fim de eliminar os efeitos indesejáveis que a molécula de sulfapiridina acarreta ao bem estar dos usuários, novos modelos de fármacos têm sido desenvolvidos, dentre eles a olsalazina sódica e a balsalazina, que têm na estrutura a mesma ligação azo da estrutura da sulfassalazina, permitindo assim, sua liberação no cólon (QURESHI *et al.*, 2004).

A mesalamina (ácido 5-aminossalicílico) é a molécula ativa responsável pela atividade antiinflamatória no lúmen intestinal, conferindo a SSZ sua atividade (KUMAGAI *et al.*, 2004). O mecanismo de ação preciso da 5-ASA ainda não é totalmente conhecido. O 5-ASA bloqueia a produção de Interleucina 1 (IL-1) e inibe o fator α de necrose tumoral (TNF- α). A SSZ também faz a inibição de fator α de necrose tumoral, conseqüentemente levando a uma resposta antiinflamatória (QURESHI *et al.*, 2004).

A mesalamina (ácido 5-aminossalicílico) é absorvida na parte superior do intestino, quando administrada oralmente é muito pouco absorvida no cólon. Para prevenir essa rápida absorção na parte superior do intestino e baixa absorção no

cólon, têm sido desenvolvido novos sistemas de fármacos com liberação cólon específica (QURESHI *et al.*, 2004).

Tabela 1 - Aminosalicilatos correntemente viáveis no Brasil e nos Estados Unidos.

Medicamento	Local liberação	Formulação
Sulfassalazina (Azulfín®)	cólon	5-ASA com ligação azo estabilizada Sulfa (cpr revestidos)
Mesalamina (Asacol®)	Íleo distal/cólon	Eudragit® S resina pH 7,0
Mesalamina (Pentasa®)	estômago para cólon	grânulos de etil celulose
Olsalazina (Dipentum®)	cólon	2 moléculas 5-ASA ligadas; clivada por azoredutases bacterianas
Balsalazida (Colazal®)	cólon	5-ASA ligada a 5-ABA (4-amino benzoil- β -alanina – carreador inerte): pró-fármaco
Mesalamina Supositório (Canasa®)	reto	5-ASA supositório
Mesalamina enema (Rowasa®)	reto	5-ASA enema

A tabela 1 mostra os aminosalicilatos correntemente viáveis no Brasil e Estados Unidos. Atualmente, os medicamentos disponíveis para venda no Brasil são o Azulfín® (medicamento referência), Pentasa® comprimidos revestidos e Pentasa® enema e supositório (QURESHI *et al.*, 2005).

A vantagem do uso da sulfassalazina em relação a 5-ASA consiste na sua especificidade pelo cólon e a liberação da molécula ativa no sítio de ação. Por ser um pró-fármaco, a SSZ tem especificidade pelo sítio de ação (YANG *et al.*, 2002; CHUNG *et al.*, 2005).

Estudos comparativos realizados por um período de 4 meses a 3 anos em voluntários usando 5-ASA e SSZ mostraram que, para pacientes com doença no íleo, a 5-ASA sozinha não foi efetiva para doença no cólon, ao contrário do que foi observado para a SSZ. Os pesquisadores verificaram que para terapia de

manutenção, ambas SSZ e 5-ASA, são efetivas, reduzindo o risco de remissão da doença depois de um ano (STEINHART *et al.*, 1994).

1.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA SULFASSALAZINA

A sulfassalazina, 5-(p-2-ÁcidoSalicílicoFenilAzo)Pyridilsulfônico, possui fórmula molecular $C_{18}H_{14}N_4O_5S$, peso molecular 398,4 e fórmula estrutural conforme apresentação abaixo:

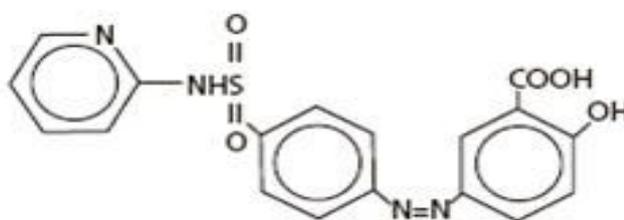


Figura 3 – Estrutura química da sulfassalazina

Segundo a classificação biofarmacêutica, a sulfasalazina é um fármaco classe IV (CLARYSSE *et al.*, 2011), sendo insolúvel em água e de baixa permeabilidade. A SSZ tem caráter ácido devido a três grupos diferentes, carboxila, sulfonamido e hidroxila fenólica, sendo, portanto, solúvel em meio alcalino e insolúvel em meio ácido, pKa 0,6, 2,4, 9,7 e 11,8. Levemente solúvel em álcool, praticamente insolúvel em água, benzeno, clorofórmio e éter (MERCK INDEX, 2001).

1.3 CARACTERÍSTICAS FARMACOCINÉTICAS

Quando administrada oralmente, SSZ é pouco absorvida, de 3 a 12%. Liang e colaboradores mostraram que a SSZ exibiu um alto valor de PDR (taxa de permeabilidade direcional). O valor do PDR é dado pela razão da taxa de transporte da direção basolateral para apical (BL – AP) e da taxa de transporte da

direção apical para basolateral (AP – BL). Se o valor de (BL – AP) é alto, o valor do PDR também é alto. A SSZ apresentou alto valor de PDR em todas as concentrações estudadas (100, 200 e 500 μM), indicando sua forte interação com a bomba de efluxo celular da monocada de células Caco-2. O grupo funcional ácido carboxílico tem importância na permeabilidade da sulfassalazina através de células Caco-2. Quando a sulfassalazina é descarboxilada, esta passa a não ser mais um substrato para o transporte. Como a sulfapiridina e o ácido 5-aminosalicílico são os principais produtos de degradação da SSZ, foi estudado também suas permeabilidades através de células Caco-2, e não mostraram grande afinidade como a SSZ, devendo então, a integridade da estrutura da SSZ ser a responsável pela sua alta especificidade. A permeabilidade da SSZ através da monocamada de células Caco 2 é muito baixa devido sua forte interação com transportadores e bomba de efluxo celular, que explica sua baixa absorção *in vivo* (LIANG *et al.*, 2000; SINKO, 2008).

A sulfassalazina - o ácido 5-aminossalicílico (mesalazina) preso à sulfapiridina por uma ligação azo - permanece intacta em todo seu trajeto pelo trato gastrointestinal. Devido à circulação entero-hepática relevante e à excreção biliar da molécula não metabolizada, 90% do composto ingerido atinge o cólon, onde, então, sofre ação fragmentadora da azo-redutase bacteriana com a liberação dos componentes mesalazina e sulfapiridina. A maior parte da sulfapiridina é absorvida e acetilada no fígado. Pequena parte do 5-ASA é absorvida e a maior parte (80%) é excretada nas fezes (MARTINS *et al.*, 2005; DAHAN *et al.*, 2010).

1.4 USO DA SULFASSALAZINA EM SUSPENSÃO ORAL

Ryde e Lima em 1981 mostraram que a biodisponibilidade de sulfassalazina é a mesma se administrada na forma de comprimido ou suspensão (TRINCHES *et al.*, 2004). Em setembro de 2009, foi lançado pela empresa Rosemont Pharmaceuticals Limited, localizada em Yorkshire, Reino Unido, a suspensão oral de sulfassalazina na dosagem de 250 mg/5 mL, Salazopyrin Suspension, que pode ser adquirida ao custo de \$183,00 por frasco contendo 500 mL. Essa apresentação não está disponível no mercado brasileiro, além disso, a metodologia de análise de sulfassalazina suspensão oral está listada como uma

prioridade da Farmacopéia Americana desde fevereiro de 2011, (disponível em www.usp.org/USPNF/submitMonograph/newMon.html).

A Farmácia Universitária da UFRJ manipula a sulfassalazina em suspensão e o veículo escolhido é o xarope simples. Essa formulação teve boa aceitabilidade entre os pacientes e apresentou boa viscosidade. Os dados obtidos no estudo de estabilidade mostraram que a suspensão preparada em xarope simples apresentou um prazo de validade não superior a 60 dias, com indicação preferencial de armazenamento em lugar fresco (cerca de 25°C) e ao abrigo da luz (TRINCHES *et al.*, 2004).

Como o xarope simples é um veículo que nem todos os pacientes podem utilizar, devido à alta concentração de açúcar, planejamos então, nesse estudo, formular uma suspensão oral de sulfassalazina sem açúcar, para uso pediátrico, geriátrico e para pacientes com dificuldade de deglutição. O estudo deverá contemplar a caracterização do princípio ativo, o desenvolvimento da metodologia de análise, a caracterização da suspensão oral de sulfassalazina e a avaliação de seu perfil de liberação *in vitro*.

1.5 SUSPENSÃO ORAL

As suspensões podem ser definidas como preparações que contêm partículas de fármaco finamente divididas (suspensóide), distribuídas de forma uniforme em um veículo onde o fármaco apresenta baixa solubilidade (ANSEL, 2007).

As suspensões são sistemas heterogêneos em que a fase externa ou contínua é líquida ou semi-sólida, e a fase interna ou dispersa, é constituída por partículas sólidas insolúveis no meio utilizado (PRISTA, 2008).

Os principais aspectos físicos a considerar na preparação racional de uma suspensão são: o produto deve permanecer homogêneo até o momento da administração; não deve ocorrer flutuação das partículas suspensas; a partícula suspensa não deve se depositar muito rapidamente; as partículas devem ser facilmente dispersas em uma mistura uniforme quando o recipiente for agitado; as partículas suspensas que se depositarem no fundo do recipiente não podem formar uma massa compacta de difícil redispersibilidade; o produto deve ter

aparência suave e atraente, sem aspecto granuloso ao tato (PRISTA, 2008; AULTON, 2005).

As suspensões que apresentam rápida sedimentação, podem apresentar problemas na administração exata da dose e, esteticamente, aspecto desagradável à vista. Desta forma, são empregados agentes suspensores que têm como objetivo manter as partículas em suspensão e espessar a fase dispersante.

1.6 SISTEMAS DEFLOCULADOS E FLOCULADOS

Em sistemas defloculados a velocidade de sedimentação é mais lenta, pois as partículas maiores sedimentam mais rápido, enquanto as menores permanecem suspensas. A baixa velocidade de sedimentação evita que o líquido fique preso, formando assim um sedimento compacto, de difícil dispersão. Esse é o principal problema na formulação de suspensão (AULTON, 2005).

Em sistemas floculados, a velocidade de sedimentação é a mais rápida, formando assim, um sedimento mais frouxo, com mais líquido agregado e de fácil redispersão. O sobrenadante é mais claro do que um sistema defloculado (SINKO, 2008).

A melhor suspensão é aquela que permite a retirada de doses mais uniformes do recipiente. O sistema defloculado pode permitir a administração de doses mais uniformes, porém, a redispersão é dificultada pelas características do sedimento. Já com o floculado, o sedimento não sofre alteração por longos períodos, permitindo, após a agitação, a redispersão normal da suspensão, possibilitando, assim, a administração de doses mais uniformes (AULTON, 2005; PRISTA, 2007).

1.7 FATORES RELACIONADOS À FORMULAÇÃO DE SUSPENSÕES

1.7.1 Tamanho da partícula do fármaco

O fator mais importante para obter uma suspensão fisicamente estável é o tamanho da partícula. Em suspensões líquidas orais, o tamanho da partícula deve estar compreendido entre 1 a 50 μm (ANSEL, 2007).

Antes de formular uma suspensão devemos garantir que o fármaco a ser suspenso tenha tamanho de partícula homogêneo e reduzido. Partículas maiores que 5 μm podem promover uma sedimentação rápida da suspensão tornando o produto com aspecto desagradável (AULTON, 2005).

Após a administração de um medicamento a forma farmacêutica deve liberar o fármaco dissolvido a uma velocidade ideal. Esse evento depende de muitos fatores entre os quais o tamanho de partícula. Nas suspensões, a grande área superficial do fármaco disperso assegura a alta disponibilidade para dissolução e, portanto, a absorção. Contudo é importante conhecer e controlar o tamanho de partícula, tanto no que tange à produção de medicamentos contendo sólidos particulados quanto em relação à eficácia do medicamento administrado (AULTON, 2005; WONG *et al.*, 1996).

A velocidade de sedimentação (v) de partículas esféricas com densidade ρ em um meio com densidade ρ_0 e viscosidade η_0 é dada pela lei de Stokes (equação 1):

$$v = 2r^2(\rho - \rho_0)/9\eta_0 \text{ (equação 1)}$$

A lei de Stokes foi desenvolvida a partir de uma suspensão ideal, onde as partículas são uniformes e se sedimentam sem causar turbulência. Porém, segundo a equação 1, a velocidade de sedimentação está diretamente proporcional ao tamanho da partícula (r), ou seja, quanto maior o tamanho da partícula, maior é a velocidade de sedimentação. A velocidade de sedimentação também pode ser diminuída pelo aumento da viscosidade da fase dispersante, porém um aumento muito grande na viscosidade pode dificultar o escoamento da suspensão e também a dispersão das partículas (SINKO, 2008).

A situação ideal para atingir a estabilidade física de uma suspensão, é ter partículas com dimensões uniformes e sem separação entre elas. Desta forma, não haverá formação de aglomerados e se evitará a formação de uma massa sólida, chamada *cake* (ANSEL, 2007).

Polímeros, como hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e carboximetilcelulose sódica (CMC-Na), são frequentemente usados no preparo de suspensões para promover a uniformidade da dispersão das partículas insolúveis em água. A

seleção apropriada do polímero e a sua concentração são, contudo, difíceis, porque o comportamento da suspensão muda, dependendo da combinação droga-polímero e de suas características e concentrações, que podem ocasionar aumento da floculação ou *caking* da suspensão. Entretanto, o potencial zeta, o volume de sedimentação e a redispersibilidade da suspensão são bons parâmetros para avaliar a floculação das partículas insolúveis em água e ajudar na seleção correta do polímero solúvel em água. O comportamento reológico da suspensão é também um fator importante para as características do produto (TAGLIARI *et al.*, 2009).

1.7.2 Agentes molhantes

Quando a partícula sólida, na fase dispersa da suspensão, não é suficientemente molhada pela fase dispersante, observa-se que existe uma tendência das partículas em flutuar, aglomerando-se junto à superfície do líquido. Para evitar a flutuação de partículas são necessárias substâncias que facilitam a molhabilidade dos sólidos na fase dispersa; são chamados de agentes molhantes e promovem a redução da tensão superficial através da diminuição do ângulo de contato entre a superfície sólida e o líquido (PRISTA, 2008).

Os agentes molhantes atuam facilitando a molhabilidade dos fármacos hidrofóbicos pela água, possibilitando assim a dispersão na fase aquosa mediante agitação. Fármacos insolúveis podem ser molhados com facilidade com o uso de tensoativos. Quando o fármaco se encontra finamente dividido e devidamente molhado, ao entrar em contato com o fluido gastrointestinal, sua dissolução ocorre de imediato. Daí a importância de avaliarmos a liberação do fármaco (DRESSMAN *et al.*, 2007; PRISTA, 2008).

Os agentes molhantes atuam reduzindo a tensão interfacial entre o sólido e o líquido, de forma que o ar adsorvido na superfície do sólido seja deslocado pelo líquido, aumentando o contato entre o fármaco hidrofóbico e o líquido (AULTON, 2005).

Um dos agentes molhantes mais usados são os polissorbatos (Tweens) que possuem valor de EHL (Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo) na faixa que compreende valores de 7 a 9. Valores nesta faixa são característicos de agentes molhantes e

de espalhamento que promovem a dispersibilidade de fármacos hidrofóbicos (PRISTA, 2008).

1.7.3 Agentes modificadores da viscosidade

A velocidade de liberação do fármaco vai depender da viscosidade do produto. Quanto maior é a viscosidade da preparação, maior é a probabilidade do fármaco ser liberado mais lentamente (AULTON, 2005).

Muitos derivados da celulose são usados como agentes suspensores, como a carboximetilcelulose sódica (CMC). A CMC é solúvel em água e pode ser aquecida até 60°C para mais rápida solubilização (ANSEL, 2007).

A carboximetilcelulose é considerada como um agente suspensor ideal, visto que apresenta elevada viscosidade quando em repouso, ou seja, baixa velocidade de cisalhamento e uma baixa viscosidade quando a suspensão é agitada e retirada do frasco, ou seja, alta velocidade de cisalhamento (SINKO, 2008). A concentração adequada para uso oral não pode ser superior a 1% (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 1994).

1.7.4 Parâmetros de sedimentação

Um dos parâmetros utilizados para avaliar a sedimentação das suspensões é o Volume de Sedimentação (F) que é definido como a razão entre o volume definitivo de sedimento (V_U) e o volume inicial da suspensão (V_O):

$$F = V_U / V_O \text{ (equação 2)}$$

O valor aceitável para F é igual a 1, o que significa que o volume do sedimento é igual ao volume inicial da suspensão. Valores de F entre 0,5 e 1,0 são os mais aceitáveis farmaceuticamente e são chamados de “equilíbrio de floculação” (SINKO, 2008; PRISTA, 2008).

1.7.5 Potencial Zeta ζ

O potencial zeta ζ tem aplicação prática na avaliação da estabilidade de dispersões grosseiras, pois governa o grau de repulsão entre as partículas

dispersas adjacentes de cargas semelhantes. A medida do potencial zeta ζ permite obter informação do estado de carga da interface sólido-líquido através da técnica de microeletroforese (MIKULÁSEK et al., 1997).

O princípio de determinação do potencial zeta ζ está fundamentado na compreensão da dupla camada elétrica, formada por uma partícula sólida carregada em uma solução aquosa, que contém íons positivos e negativos. A carga da superfície da partícula sólida influencia na distribuição dos íons positivos e negativos. Os íons de carga oposta ao da superfície são atraídos para a superfície e os de mesma carga são repelidos, fazendo com que atinja uma situação de equilíbrio. Além dessas forças elétricas, também o movimento térmico dos íons contribui para obtenção de um sistema eletricamente neutro. O resultado é a formação de uma dupla camada elétrica (figura 4).

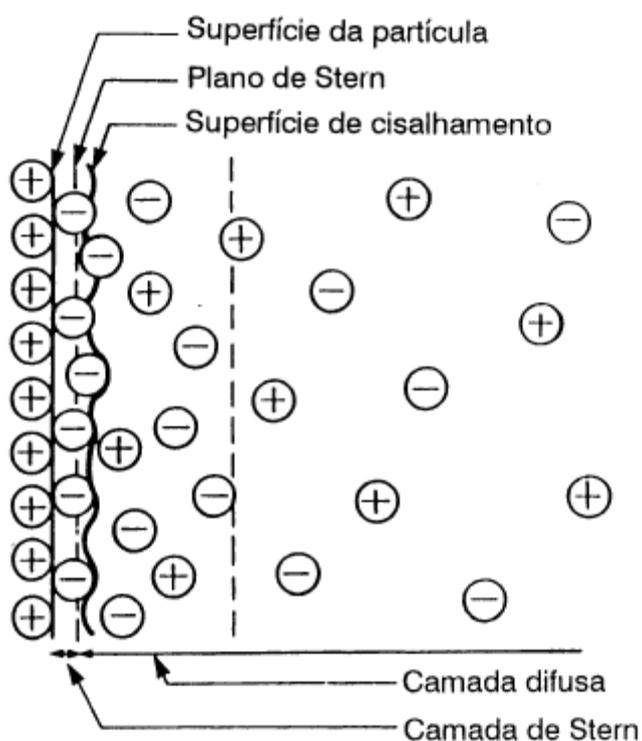


Figura 4 - Esquema da dupla camada elétrica em uma superfície com carga positiva, os íons de carga contrária ao da superfície (contra-íons), formando a camada de Stern e a camada difusa. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/ce/v43n283-284/4848.pdf>. Acesso em: jun. 2011.

Dessa forma, a dupla camada é formada por uma camada de superfície eletricamente carregada. Adjacente à essa camada existe uma região líquida (solvente) contendo íons negativos intimamente ligados à superfície sólida, formando uma superfície de cisalhamento. Essa região é chamada de camada de

Stern. A segunda camada é mais difusa, contendo mais íons negativos do que positivos. A diferença entre o potencial da camada fortemente ligada (camada de Stern) e a camada difusa é chamado de *potencial zeta*, ζ . A estabilidade da suspensão é atingida quando as forças repulsivas são suficientemente grandes para superar as forças de atração, evitando assim a floculação (SINKO, 2008; AULTON, 2005, HOTZA, 1997; MIKULÁSEK *et al.*, 1997).

Um potencial zeta ζ negativo significa que as partículas migram em direção ao eletrodo positivo da célula eletroforética, prevalecendo, desta forma, as forças de repulsão frente as de atração, o que é favorável para a estabilidade de sistemas dispersos. Logo, quando as forças de repulsão entre duas partículas excedem as de atração, temos um sistema defloculado, pois nesse caso, as partículas não se agregam e continuam preservando seu caráter individual.

1.8 TESTE DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* – DISSOLUÇÃO

A liberação *in vitro* é um importante indicador da performance do produto *in vivo*. Os testes de liberação *in vitro* são usados para:

1. Estabelecer uma rotina de controle de qualidade;
2. Otimizar o desenvolvimento da formulação;
3. Desenvolver a relação *in vitro-in vivo* (BHARDWAJ *et al.*, 2010).

A dissolução pode ser definida, em termos farmacocinéticos e biofarmacêuticos, como um ensaio físico que visa prever a liberação de um fármaco para uma determinada área, numa determinada quantidade e no tempo correto (MANADAS *et al.*, 2002).

A dissolução ocorre quando um fármaco se dissolve em partículas sólidas individuais e se mistura (molécula por molécula) com o meio líquido. Logo, a dissolução é um processo no qual o fármaco é liberado da fase sólida e passa para a fase em solução (SINKO, 2008).

Para formas farmacêuticas de uso oral, como é o caso de suspensões, comprimidos revestidos e comprimidos mastigáveis, o teste de dissolução é o mais adequado para avaliações *in vitro*. Para formas farmacêuticas, como

adesivos transdérmicos, supositórios, formas farmacêuticas de uso pulmonar e formulações para uso tópico, utiliza-se, o teste de liberação, que defini a dissolução (SHAH *et al.*, 2002; SIEWERT *et al.*, 2003; SINKO, 2008).

1.8.1 Importância da dissolução para formas farmacêuticas especiais

Na indústria farmacêutica o teste de dissolução é uma ferramenta importante no desenvolvimento de novas formulações e no controle de qualidade (SHAH *et al.*, 2002; SIEWERT *et al.*, 2003).

Aspectos importantes a considerar quanto ao teste de dissolução:

- Consiste em um procedimento de controle de qualidade que visa avaliar a variabilidade de cada lote dentro dos padrões regulatórios aceitáveis;
- O monitoramento da estabilidade das formas farmacêuticas;
- A predição do desempenho *in vivo* dos medicamentos;
- A diminuição dos estudos na fase clínica.

Hoje, os pesquisadores têm muito interesse na padronização dos procedimentos e das condições de ensaio a fim de que os testes de dissolução sejam corretamente delineados e executados (MANADAS *et al.*, 2002; GARCIA *et al.*, 2006; HEIGOLDT *et al.*, 2010).

1.8.2 Cinética da dissolução

Em 1897, Noyes e Whitney, estabeleceram uma relação entre a velocidade de dissolução, a solubilidade máxima do soluto e a concentração no tempo t , que pode ser representada pela equação abaixo:

$$dc/dt = K (C_s - C_t) \text{ (equação 3)}$$

Em 1904, Nernst e Brummer modificaram a equação de Noyes e Whitney e incluíram na equação os parâmetros que influenciam no coeficiente de difusão (D), a área da superfície do sólido (S), a espessura da camada de difusão (h) e o volume do meio de dissolução (V):

$$dC/dt = K DS/Vh(C_s - C_t) \text{ (equação 4)}$$

Essa teoria (Equação 4) que é a mais aceita hoje, assume que existe uma camada aquosa de difusão, na qual o sólido está se dissolvendo; essa camada de difusão tem uma espessura h de solvente, na qual as moléculas estão em concentração que varia de C_s a C , de modo que essa concentração não afeta mais a velocidade de dissolução, sendo constante (MANADAS *et al.*, 2002; SINKO, 2008).

Portanto, a dissolução de um sólido em um líquido ocorre em dois estágios: o primeiro estágio é uma reação interfacial entre a fase sólida e a fase líquida, a qual resulta na liberação de moléculas de soluto a partir da fase sólida (solvatação). O segundo estágio, é o transporte dessas moléculas de soluto a partir da interface até o meio de dissolução, ou seja a difusão (MOSHARRAF *et al.*, 1995).

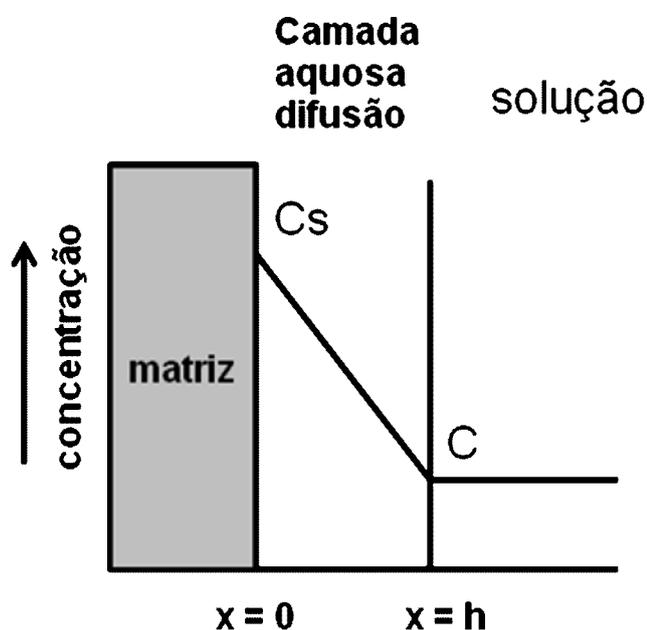


Figura 5 – Esquema da dissolução de um fármaco a partir de uma matriz sólida, mostrando a camada de difusão estática entre a superfície da forma farmacêutica e a solução, onde C_s é a concentração de saturação, C é a concentração e x é a espessura (h) da camada de difusão.

A determinação da cinética de dissolução permite melhores conclusões a respeito do processo de dissolução da formulação, pois descreve a velocidade do processo e os pontos nos quais podem ocorrer mudanças significativas da dissolução (KANO *et al.*, 2007).

1.8.3 Condições *sink*

Quando C torna-se menor que a concentração de saturação do fármaco C_s , dizemos que o sistema está operando em condições *sink*, ou seja, o volume do meio de dissolução é grande o suficiente (10% a 20%). A condição *sink* é importante, pois garante que a concentração de saturação C_s não seja atingida durante o ensaio de dissolução.

1.8.4 Fatores que interferem na dissolução

1.8.4.1 Solubilidade

O uso da solubilidade aquosa para prever a absorção oral de um fármaco é uma ferramenta importante no desenvolvimento dos ensaios de dissolução e também para sua biodisponibilidade. Uma formulação administrada por via oral é primeiramente liberada no estômago. Para fármacos solúveis em meio ácido, pode ocorrer uma completa dissolução nesse meio; contudo, ácidos fracos podem ter uma dissolução maior no intestino delgado, pois o pH do intestino delgado oferece condições melhores de solubilização. A predição da solubilidade do fármaco no trato gastrointestinal está diretamente relacionada à vantagem de desenvolver programas aplicativos que podem ser úteis na indústria farmacêutica para desenvolvimentos de pré-formulações (DRESSMAN *et al.*, 2007).

A dissolução do fármaco no meio gastrointestinal pode ser afetada pela presença de substâncias endógenas, como por exemplo, sais biliares, que podem aumentar a viscosidade do fluido gastrointestinal. Outro fator, que também altera a dissolução das partículas, é a presença de alimentos, que pode reduzir a velocidade de dissolução, por diminuição do coeficiente da camada de difusão. Parâmetros fisiológicos podem, portanto, afetar a solubilidade do fármaco no meio (AULTON, 2005).

O uso de tensoativos em meios de dissolução é uma das principais formas de aumentar a solubilidade de fármacos insolúveis ou pouco solúveis em água, como é o caso da sulfassalazina. O mecanismo no qual os tensoativos aumentam a solubilidade, está relacionado à sua capacidade de molhabilidade e solubilização micelar. O mecanismo de molhabilidade consiste no deslocamento de uma pequena camada de ar da superfície da partícula, a qual é substituída por uma pequena fase líquida, diminuindo assim, o ângulo de contato sólido – líquido do meio com a partícula. Baixos níveis dos mesmos (0,5–5,0% p/v) são indicados para serem incluídos no meio de dissolução, de maneira a fornecer melhor relação com as condições *in vivo*, principalmente no estado de jejum (VOLPATO *et al.*, 2002).

1.8.4.2 Polimorfismo

O polimorfismo tem adquirido grande importância atualmente, pois diferentes polimorfos possuem diferentes solubilidades. Eles também podem exibir ponto de fusão, padrões cristalinos de raio X diferentes, embora sejam quimicamente idênticos. No caso de fármacos com baixa solubilidade, um polimorfo pode ser mais solúvel que outro, afetando a velocidade de dissolução. Sob condições de temperatura e pressão definidas, apenas uma das possíveis formas polimórficas de uma substância pura é estável, sendo as demais denominadas metastáveis. Estas últimas, por sua vez, são formas que se transformam em diferentes velocidades, na forma estável. Em geral, a forma mais estável é a que apresenta menor energia livre, enquanto a mais solúvel é a amorfa (AULTON, 2005; SINKO, 2008; FONSECA, 2007; SINGHAL *et al.*, 2004).

1.8.4.3 Efeito do tamanho da partícula

A dissolução é uma etapa importante para fármacos administrados oralmente. No caso particular de drogas hidrofóbicas, a etapa de dissolução torna-se ainda mais desafiadora. Portanto, a pesquisa de outros fatores que possam levar a um aumento na taxa de dissolução, é de interesse, principalmente para a indústria farmacêutica (MOSHARRAF *et al.*, 1995).

De acordo com a equação de Nernst e Brummer, em 1904 e Bisrat e colaboradores, em 1988, a diminuição no tamanho da partícula, resulta em um aumento na taxa de dissolução, pois aumenta a área superficial. Estudos mostraram que para fármacos levemente solúveis em água, o mesmo efeito é observado, pois diminui a espessura da camada de difusão ao redor da partícula. Esse fenômeno ocorre para materiais que têm tamanho de partícula menores que 5 μm (AULTON, 2005; SINKO, 2008; MOSHARRAF *et al.*, 1995).

1.8.5 Parâmetros para o teste de dissolução de suspensão

1.8.5.1 Meios de dissolução

Os meios de dissolução são biologicamente compatíveis e ajustados, de modo que, as condições dos testes *in vitro* sejam mais próximas possíveis das fisiológicas, a fim de aumentar seu valor preditivo *in vivo* (MANADAS *et al.*, 2002).

Em geral, os meios de dissolução devem possuir pH na faixa fisiológica, variando entre 1,2 a 6,8 (BRASIL, 2010). Os meios devem simular o meio gástrico (pH 1,2) e o meio intestinal (pH 6,8). Um ponto importante a ser considerado é que, na presença de alimentos, tanto o estômago quanto o intestino, apresentam variações de pH. No intestino, a presença de sais biliares também deve ser considerada, quando se deseja simular os meios mais próximos possíveis dos fisiológicos (MARTIM, 2008; MANADAS *et al.*, 2002).

Em 1997, Farmacopéia Européia e colaboradores como Aiache, Siewert e Dressman estabeleceram algumas recomendações com relação aos meios biologicamente ativos:

- O uso da água como meio de dissolução é permitido, desde que justificado, pois não possui capacidade tamponante (SINKO, 2008);
- O volume do meio pode variar entre 500 a 1000 mL (mais comumente 900 mL);
- A faixa de pH fisiológico (1,2 a 6,8) deve ser respeitada, porém meios mais alcalinos até 8,0 podem ser usados, porém com justificativas;

- A temperatura do meio deve estar a 37°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$);
- O meio deve ser filtrado e desgaseificado, para que sejam eliminadas bolhas;
- Atender as condições *sink*, ou seja, o distanciamento de 5 a 10 vezes da concentração de saturação de fármaco. A condição *sink* é recomendada, porém não obrigatória (SIEWERT *et al.*, 2002; CDER/FDA, 1997).

Os meios mais comuns utilizados são: água, solução tampão de pH entre 4,5 a 7,6 (USP, 2011), suco gástrico simulado contendo pepsina e suco intestinal simulado, contendo pancreatina (MANADAS *et al.*, 2002; SIEWERT *et al.*, 2002; CDER/FDA, 1997). Outros pontos importantes a serem considerados são: o volume do conteúdo gástrico, a porção do segmento intestinal e a duração do teste de dissolução, que está relacionada com o tempo de residência do medicamento no estômago e no intestino (SINKO, 2008).

Tabela 2 – Valores de pH fisiológico a serem considerados nos testes de dissolução.

Local	pH	pH na presença de alimentos
Estômago	1,2	3,0
Duodeno	5,4	6,1
Íleo	7,0	8,0
Cólon	7,0	8,0

1.8.5.2 Aparato e Rotação

No início de 1970, a edição da USP 23, descreveu o método de dissolução, usando o aparato 1 (cesta) e o aparato 2 (pá). Atualmente, na edição 34 da USP encontram-se descritos, até 8 aparatos para diferentes formas farmacêuticas. A importância do teste de dissolução para a indústria farmacêutica se dá, principalmente, por ser um teste que demonstra a robustez e a uniformidade dos lotes preparados. Para a indústria, a relevância desse teste em prever o

comportamento do medicamento *in vivo* é tão importante, que entre 2000 e 2002, 16% dos *recalls* representaram erros na fabricação de formas farmacêuticas que não apresentaram boa *performance* nos testes de dissolução (BAXTER *et al.*, 2005).

Os dados disponíveis referentes a hidrodinâmica do trato gastro-intestinal não são suficientes para selecionar um padrão de rotação representativo. Muitos estudos, mostram que baixas rotações podem não atingir as condições *sink* e a correlação *in vitro/in vivo* (BAXTER *et al.*, 2005).

Em geral, a pá rotatória (aparato 2), é o método utilizado para suspensão oral. Parâmetros como: a introdução da amostra na cuba, a homogeneização da amostra, a composição e viscosidade, são importantes para estabelecer o método. A adição das amostras deve ser feita com precisão e exatidão. Para suspensões com baixa viscosidade, a velocidade de 25 rpm é a mais adequada e podem ser adicionadas com auxílio de uma pipeta volumétrica. Para suspensões mais viscosas, pode ser utilizada a velocidade entre 50 – 75 rpm e a adição quantitativa da amostra ser feita por peso (SIEWERT *et al.*, 2002).

1.9 ESTUDO DE ESTABILIDADE

A estabilidade físico-química e microbiológica das formulações líquidas é importante para garantir a segurança e a eficácia durante o uso do medicamento. A estabilidade é um passo importante no desenvolvimento de um produto farmacêutico. O tipo de forma farmacêutica tem um impacto importante, influenciando nas propriedades físicas e químicas das substâncias ativas. A maioria dos fármacos, quando preparadas em solução aquosa, é vulnerável a degradação química. Se ocorrer degradação do fármaco, sua eficácia terapêutica está comprometida. A degradação pode ser acompanhada pela formação de subprodutos de degradação, tóxicos e também de formas polimórficas que comprometem a biodisponibilidade do produto (GLASS *et al.*, 2006).

O ensaio de estabilidade a que os medicamentos são submetidos deve ser realizado em condições experimentais padronizadas e tem como objetivo determinar o prazo de validade dos medicamentos. O estudo de estabilidade é

realizado em duas etapas: o estudo acelerado, que foi projetado para acelerar possíveis degradações químicas e físicas das substâncias ativas e excipientes farmacêuticos e o estudo de estabilidade de longa duração, que avalia as características físico-químicas e microbiológicas do produto farmacêutico durante o prazo de validade esperado. Juntos, os estudos acelerado e de longa duração avaliam os efeitos esperados durante um período pré-determinado para a forma farmacêutica (BRASIL, 2005; TRINCHES *et al.*, 2004).

No Brasil, o guia para a realização de estudos de estabilidade foi publicado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) em 2005, a fim de estabelecer uma padronização para os ensaios de estabilidade nas condições climáticas do país. Para as formulações líquidas envasadas em recipientes impermeáveis, como frasco de vidro, as condições para o estudo acelerado são: 40°C por um período de seis meses. O estudo de longa duração ou tempo de prateleira é realizado na temperatura de 30°C, estabelecendo a condição de armazenamento de 15°C a 30°C (BRASIL, 2005).

Dentro desse contexto, nosso trabalho consiste em desenvolver uma suspensão oral simples de sulfassalazina na concentração de 250 mg/5mL, que atenda pacientes pediátricos, diabéticos, idosos, e pacientes acamados com dificuldade de deglutição. Para avaliarmos a qualidade do fármaco, foram avaliados três diferentes fornecedores, quanto as características físico-químicas e caracterizada a suspensão oral preparada. Com esses dados foi possível correlacionar as características do fármaco e da suspensão com seu comportamento na dissolução.

Dessa forma, a finalidade e relevância do trabalho foi o desenvolvimento de uma suspensão oral de sulfassalazina (SSZ) na concentração de 250 mg/5 mL, inédita no mercado brasileiro, de fácil elaboração tanto para indústria quanto para farmácias com manipulação, a um baixo custo. Com base nestas considerações, é importante estabelecer o controle de qualidade e a estabilidade física e microbiológica das suspensões a fim de assegurar seu uso.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar uma suspensão oral de sulfassalazina 250 mg/5 mL e correlacionar as características físico-químicas das matérias-primas, oriundas de três fornecedores diferentes, com o perfil de liberação *in vitro*, a fim de determinar os requisitos de controle de qualidade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Caracterizar a matéria-prima sulfasalazina de três fornecedores diferentes, avaliando os seguintes parâmetros: tamanho de partícula, pureza cromatográfica, espectroscopia UV/VIS, espectroscopia IR, perda por dessecação, ponto de fusão, cinzas, teor do ativo e solubilidade;

2.2.2 Desenvolver a suspensão oral magistral de sulfasalazina (SSZ);

2.2.3 Avaliar a qualidade da suspensão oral quanto às características físico-químicas: teor, viscosidade, pH, densidade, potencial zeta, velocidade de sedimentação e redispersibilidade;

2.2.4 Desenvolver e validar metodologia de análise da suspensão oral;

2.2.5 Desenvolver e validar metodologia de dissolução da suspensão oral usando o aparato 2 (pá rotatória);

2.2.6 Desenvolver um estudo de estabilidade para a suspensão oral de sulfassalazina 250 mg/5 mL.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Reagentes e vidrarias

Balões volumétricos;

Pipetas volumétricas e graduadas;

Becher de vidro de 50 mL;

Agitador magnético;

Gral de ágatha;

Unidade filtrante poro 0,45 μm (Millipore);

Espátulas;

Filtro Millex[®] 0,45 μm ;

Filtro de polietileno 35 μm

Acetonitrila grau HPLC (Tedia);

Metanol grau HPLC (Tedia);

Metanol PA (Vetec Química);

Acetonitrila PA (Vetec Química);

Tween 80 (Vetec Química);

Lauril sulfato de sódio (Vetec Química);

Ácido fosfórico PA (Vetec Química);

Hidróxido de sódio PA micropérolas e lentilhas (Vetec Química);

Hidróxido de sódio PA (Proquímios);

Hidróxido de amônio (Reagen);

Etanol PA (Vetec Química);

Ácido acético PA (Vetec Química);

Ácido nítrico (Vetec Química);

Brometo de potássio (REAGEN);

Ácido fórmico PA (Vetec Química);

Acetona PA (Vetec Química);

Clorofórmio PA (Vetec Química);

Fosfato de potássio monobásico (Vetec Química).

3.1.2 Equipamentos e acessórios

Analizador do tamanho de partículas por difração a laser MALVERN

MASTERSIZE 2000/2000E – módulo Hidro 2000 SM;

Analizador de tamanho de partícula MALVERN ZETASIZER;

Difratômetro de Raios-X RIGAKU MINIFLEX;

Balança analítica METTLER TOLEDO – modelo AG204;

Espectrofotômetro SHIMADZU UV, modelo 2401PC;

Espectrofotômetro IR , modelo Shimadzu IRPrestige21;

Espectrofotômetro VARIAN UV-VIS, modelo CARRY 50;

Espectrofotômetro BEL SP 2000 UV;

Microscópio óptico DMLS 30 Leica

Destilador QUIMIS;

Ultra-som THORNTON, modelo T14;

Placa de agitação e aquecimento Corning;

Potenciômetro METTLER TOLEDO, modelo MPC 227;

Estufa Quimis;

Ponto de Fusão BÜCHI, modelo B-540;

Cromatógrafo líquido de alta eficiência WATERS – bomba modelo 510, detector de UV modelo 486 e sistema de integração de dados Lachron Elite;

Cromatógrafo líquido de alta eficiência SHIMADZU – bomba modelo LC-10AD VP, auto injetor modelo SIL-10AD VP, detector de arranjo de fotodiodos modelo SPDM10A VP e sistema de dados (software) modelo CLASS –VP versão 6.1;

Coluna Cromatográfica Shim-pack CLC-ODS (número série: 4156992) C18 15x 4,6 mm (Shimadzu);

Sistema de filtração à vácuo Millipore;

Viscosímetro BROOKFIELD Spindle 2 série LV ;

Picnômetro de vidro capacidade de 25 mL;

Placa de agitação de seis pontos MARTE;

Balança de precisão BG2000 GEHAKA;

Termômetro de líquido em vidro;

Dissolutor Erweka DT6R;

Cronômetros;

Seringas plásticas de 5 mL e 2 mL.

3.1.3 Matérias-primas

- Sulfassalazina lote 20071214 do fornecedor **P**, originária da China, fabricante **KX**, prazo de validade 19/12/2010;
- Sulfassalazina lote 20090712 do fornecedor **D**, originária da China, fabricante **KZC**, prazo de validade 27/07/2012;
- Sulfassalazina lote 090702 do fornecedor **H**, originária da China, fabricante **SH**, prazo de validade 03/07/2012;
- Ciclamato de sódio;
- Óleo essencial de laranja Brigaradeia (Dierberger);
- Benzoato de sódio;
- Tween 80 (Viafarma) lote: 090115M32808 (Fabricação: 01/09 Validade: 07/10);
- Carboximetilcelulose sódica (Pharma Special) lote: 54199 (Fabricação: 11/09 Validade: 11/10)
- Azulfín[®] comprimidos 500 mg lote: 10100406 (Fabricação: 08/2010 Validade: 08/2012)

3.1.4 Material de Referência

Sulfassalazina Sigma (Fluka) – lote:1450407 (10g) – teor: 98,3%

3.1.5 Soluções

Solução de hidróxido de sódio 0,1N: Transferir 4 g de hidróxido de sódio para um balão volumétrico de 1000 mL, completar o volume com água destilada e homogeneizar.

Solução de ácido acético 0,1N: Transferir 0,6 mL de ácido acético glacial para um balão volumétrico de 100 mL, completar com água destilada para este volume e homogeneizar.

Solução tampão fosfato pH 5,8: Transferir 6,805 g de fosfato de potássio monobásico para um balão volumétrico de 1000 mL. Adicionar 0,144 g de

hidróxido de sódio, completar o volume com água destilada para este volume e homogeneizar. Acertar o pH para 5,8 usando solução de hidróxido de sódio 0,1N.

Solução tampão fosfato pH 6,8: Transferir 6,805 g de fosfato de potássio monobásico para um balão volumétrico de 1000 mL. Adicionar 0,896g de hidróxido de sódio, completar o volume com água destilada para este volume e homogeneizar. Acertar o pH para 6,8 usando solução de hidróxido de sódio 0,1N.

Solução tampão fosfato pH 7,4: Transferir 6,805 g de fosfato de potássio monobásico para um balão volumétrico de 1000 mL. Adicionar 1,564 g de hidróxido de sódio, completar o volume com água destilada para este volume e homogeneizar. Acertar o pH para 7,4 usando solução de hidróxido de sódio 0,1N.

Suco entérico simulado: Transferir 6,805 g de fosfato de potássio monobásico e 10 g de pancreatina para um balão volumétrico de 1000 mL, adicionar 154 mL de solução de hidróxido de sódio 0,1N, homogeneizar e completar para o volume com água destilada. Acertar o pH para 6,8 com hidróxido de sódio 0,1N.

Suco gástrico simulado: Transferir 2 g de cloreto de sódio, 3,2 de pepsina purificada para um balão volumétrico de 1000 mL, adicionar cerca de 300 mL de água destilada, homogeneizar, adicionar 7 mL de ácido clorídrico, homogeneizar e completar o volume para 1000 mL com água destilada. Acertar o pH para 1,2, usando ácido clorídrico diluído (1% v/v).

4 MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA SULFASSALAZINA

A caracterização da matéria-prima foi realizada em três lotes de matéria-prima de diferentes fornecedores: D, H e P, todos de origem chinesa e de fabricantes diferentes. A caracterização foi realizada segundo os critérios estabelecidos pela Farmacopéia Americana 34^a edição. Em adição foram feitos testes específicos: como solubilidade e tamanho de partícula, importantes para estabilidade física das suspensões. Os testes realizados estão descritos no quadro abaixo:

Quadro 1 – Testes realizados na caracterização da matéria-prima sulfassalazina.

Testes	Metodologia	Referência
Teor	Espectrofotometria UV/Vis	USP 34 Ed., 2011a
Identificação	Espectrofotometria UV/Vis Espectrofotometria IR	USP 34 Ed., 2011a MOFFAT <i>et al.</i> , 2004
Solubilidade	Espectrofotometria UV/Vis	SEHIC <i>et al.</i> , 2009
Pureza Cromatográfica	CLAE	DAHAN <i>et al.</i> , 2010
Tamanho de Partícula	Malvern – Modo úmido (difração a laser)	SEHIC <i>et al.</i> , 2009
Perda por Dessecação	Gravimetria	USP 34 Ed., 2011b
Cinzas	Gravimetria	USP 34 Ed., 2011c
Presença de polimorfos	Difração raio X (DRX); DSC (Calorimetria diferencial de varredura); Ponto de fusão	AULTON, 2005; SKOOG, 2009

4.1.1 Determinação do teor da matéria-prima

A metodologia de determinação do teor de sulfassalazina está descrita na Farmacopéia Americana 34^a edição. A metodologia consiste no método espectrofotométrico e a amostra é solubilizada em solução de hidróxido de sódio 0,1N. A absorbância (A) da amostra é determinada no comprimento de onda de 359 nm. O padrão utilizado consiste no padrão Sigma da sulfassalazina (teor \geq 98%). Foram pesados cerca de 150 mg da amostra e transferidos para um balão

volumétrico âmbar de 100 mL contendo 75 mL de solução de hidróxido de sódio 0,1N. A solução foi colocada em banho ultrasônico por cinco minutos até total solubilização. Uma alíquota de 1 mL foi transferida para um balão volumétrico de 200 mL, adicionado 4 mL de solução de ácido acético 0,1N e o volume foi completado para 200 mL com água purificada, a fim de obter uma solução final de concentração 7,5 µg/mL. Dessa solução foi retirada uma alíquota de 5 mL e o volume completado com água purificada para 10 mL em balão volumétrico, a fim de obter uma leitura de absorvância em torno de 0,5. O valor encontrado deve estar compreendido entre 97,0 a 101,5%, calculado na base seca.

4.1.2 Identificação por IR e por UV/Vis

4.1.2.1 Identificação por IR

Foram preparadas pastilhas de SSZ em brometo de potássio (KBr), na proporção de 1% (p/p) para cada uma das três matérias-primas e uma pastilha para o padrão de referência. A varredura foi realizada em espectrofotômetro IR entre 400 e 3800 cm^{-1} .

4.1.2.2 Identificação por UV/Vis

A sulfassalazina apresenta máximos de absorção em 359 nm. A amostra utilizada para identificação no UV/Vis consiste nas amostras utilizadas para determinação do teor (item 4.1.1). A varredura foi realizada na faixa de comprimento de onda entre 200 a 600 nm.

4.1.3 Solubilidade

A solubilidade e a taxa de dissolução do princípio ativo são os ingredientes de maior importância na pré-formulação de uma forma farmacêutica (MILANI *et al.*, 2009; CLARYSSE *et al.*, 2011). A solubilidade foi determinada por adição de um excesso de amostra em 50 mL de meio de dissolução. As amostras foram colocadas em agitador magnético a 100 rpm, deixadas em temperatura ambiente com constante agitação por 24 horas e posteriormente levadas à centrifugação por 120 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi separado cuidadosamente e diluído. A concentração foi determinada através de uma curva de calibração

construída no mesmo meio de dissolução. O teste foi realizado em triplicata para cada matéria-prima à temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). As amostras foram analisadas em espectrofotômetro UV/Vis. A fim de determinar a especificidade e seletividade da SSZ, foi determinado o espectro de absorção da amostra para cada meio de dissolução testado (SEHIC *et al.*, 2009).

4.1.3.1 Screening de meios de dissolução

A solubilidade foi testada nos seguintes meios de dissolução:

1. H_2O ;
2. suco gástrico (HCl 0,1N pH 1,2);
3. suco gástrico pH 1,2 com pepsina;
4. tampão fosfato 5,8 (USP 34 Ed., 2011d);
5. tampão fosfato 5,8 com Tween 80 0,3%;
6. tampão fosfato 5,8 com Tween 80 0,5%;
7. tampão fosfato 6,8 (USP 34 Ed., 2011d);
8. suco entérico com pancreatina;
9. tampão fosfato 7,4 (USP 34 Ed., 2011d).

4.1.4 Pureza Cromatográfica

A pureza cromatográfica foi realizada utilizando CLAE (Shimadzu – modelo CLASS-VP) constituído de detector de PDA (arranjo de fotodiodos), nas seguintes condições cromatográficas:

- Coluna cromatográfica C18, $5\mu\text{m}$, $15,0 \times 4,6 \text{ mm}$;
- Detector DAD (arranjo de diodos);
- Fase móvel: acetonitrila: H_2O (1:1) pH 2,5 com ácido fosfórico;
- Temperatura ambiente;
- Volume de injeção $20 \mu\text{l}$;
- Fluxo $1,0 \text{ mL/min}$
- Comprimento de onda ($\lambda = 359 \text{ nm}$)

O detector de arranjo de fotodiodos permite monitorar toda a faixa espectral de interesse, pois os diodos monitoram uma faixa de 2 nm do espectro. Assim é possível verificar se existe uma co-eluição juntamente com o pico de interesse e

determinar a pureza cromatográfica (LANÇAS, 2009). O equipamento utilizado possui *software* (CLASS-VP) adequado que estabelece como pureza cromatográfica um valor que é acima de 0,99 para os picos cromatográficos, além de mostrar o espectro de absorção do pico de interesse.

4.1.5 Distribuição do tamanho de partícula

A distribuição granulométrica da matéria-prima deve ser realizada considerando os seguintes fatores, a fim de que a metodologia empregada esteja correta:

1. Quantidade de amostra disponível;
2. Número de pontos determinados no tamanho da partícula (para fins de cálculos de resolução e desvios de resultados).

Considerando que o melhor meio dispersante para leitura de tamanho de partícula em suspensão é o próprio meio dispersante (MOSHARRAF *et al.*, 1995), ou um meio no qual o fármaco é insolúvel, a leitura do tamanho de partícula foi realizada no equipamento Laser Obscuration Malvern Mastersize 2000/2000E, utilizando o módulo para amostras líquidas Hydro 2000 SM (módulo úmido). O equipamento Malvern Mastersize utiliza a difração a laser e o tamanho em diâmetro é obtido quando a luz laser passa através das partículas e então é difratada a um determinado ângulo, obtendo assim, a distribuição. Os dados são obtidos em diâmetro do volume de distribuição de D_{10} , D_{50} e D_{90} e o valor *span* (índice de polidispersividade) pode então ser calculado pela equação 5. O *span* representa um parâmetro estatístico útil para avaliar a distribuição do tamanho de partículas (JUNYAAPRASERT *et al.*, 2008; SKOOG, 2009; SARKAR *et al.*, 2005):

$$span = D_{90} - D_{10}/D_{50} \text{ (equação 5)}$$

Onde:

D_{10} – valor do tamanho de partícula abaixo do qual se situam 10% da amostra

D_{50} – valor do tamanho de partícula abaixo do qual se situam 50% da amostra

D_{90} – valor do tamanho de partícula abaixo do qual se situam 90% da amostra

O diâmetro médio das partículas foi determinado pela média de seis medidas, através da técnica de difração a laser (Malvern Mastersize).

4.1.6 Perda por dessecação

Foi seguido o procedimento geral descrito na USP 34^a Ed. As análises foram realizadas em triplicata por gravimetria. O limite de aceitação é no máximo 1,0% de perda do peso em 105°C por 2 horas ou até peso constante.

4.1.7 Cinzas sulfatadas

Foi seguido o procedimento geral descrito na USP 34^a Ed. Foi realizada apenas uma amostra por matéria-prima testada. O limite de aceitação é no máximo 0,5% de perda do peso.

4.1.8 Presença de Polimorfos

4.1.8.1 Difração por Raio X (DRX)

O padrão de difração de raios-X do pó pode ser considerado a impressão digital da estrutura do cristal. A comparação da posição e da intensidade das linhas comparadas entre o padrão e amostra nos permite uma análise qualitativa e quantitativa. Polimorfos diferentes exibem padrões distintos de difração de raio-X (AULTON, 2005; SKOOG, 2009).

Os difratogramas de raios-X das amostras foram obtidos através do método do pó no difratômetro de raios-X Rigaku Miniflex, operado a 40,0kV e 30,0mA. O ângulo de difração 2θ foi de 2,0 a 60,0° à temperatura ambiente e a radiação Cu-K α ($\lambda = 1,542$ Angstrom) com um passo de 0,05 (2θ) e 1 segundo/passos. As análises foram realizadas no Instituto de Macromoléculas (IMA) da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

O padrão de difração em raio X foi realizado nas amostras de pó de SSZ dos três fornecedores: D, H e P e comparados com o padrão Sigma.

4.1.8.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) é uma técnica que utiliza de 2 a 5 mg de amostra. O DSC mede a diferença de temperatura entre uma amostra e uma referência como uma função do tempo e da temperatura. O equipamento de DSC mede a quantidade de energia necessária para manter a

amostra na mesma temperatura da referência, isto é, a entalpia de transição (AULTON, 2005).

As curvas de DSC das amostras foram obtidas no aparelho SHIMADZU, modelo DSC 60, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min) e taxa de aquecimento de 15 °C/min, na faixa de temperatura 35 a 500 °C, em cadinhos de alumínio fechados. A massa das amostras foi de 3 mg. O aparelho foi calibrado utilizando os padrões índio e zinco metálico.

A análise de DSC foi realizada nas amostras de pó de SSZ dos três fornecedores: D, H e P e comparados com o padrão Sigma.

4.1.8.3 Ponto Fusão

O ponto de fusão foi avaliado utilizando-se tubo capilar em uma chapa metálica aquecida. A amostra foi introduzida em capilar de vidro e levada ao equipamento BÜCHI B-540 para determinação da faixa de fusão (F. Bras. V, 2010a).

4.2 DESENVOLVIMENTO DA SUSPENSÃO ORAL MAGISTRAL DE SULFASSALAZINA

A suspensão oral de sulfassalazina foi desenvolvida no Laboratório de Desenvolvimento Galênico – LADEG da Farmácia Universitária da UFRJ. Foram formuladas suspensões com as três matérias-primas de diferentes fornecedores para avaliação de sua estabilidade físico-química. Os excipientes que constituem o produto estão mais próximos possíveis aos utilizados pela empresa britânica Rosemont, que produz esse medicamento na forma farmacêutica líquida. Foi avaliada a possibilidade de fazer algo semelhante ou até mais simples e avaliar a estabilidade físico-química e microbiológica da suspensão.

4.2.1 Escolha do agente suspensor

Foram preparadas cinco soluções de carboximetilcelulose sódica (CMC) nas seguintes concentrações: 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,5% e 0,7%. A concentração máxima de CMC permitida para ingestão oral é 1,0% (Handbook Excipients, 1994), desta forma, escolhemos estas concentrações para estudo.

Sulfassalazina foi resuspendida na mesma concentração da suspensão (50 mg/mL) usando o polissorbato 80 (tween) como tensoativo e a velocidade de sedimentação medida. As amostras foram transferidas para uma proveta volumétrica de vidro de 25 mL e deixadas em repouso (PRISTA, 2008; SINKO, 2008). A altura do sedimento formado, em repouso, foi medida por um período de 72 horas. A Velocidade de Sedimentação foi determinada pela razão entre o volume do sedimento V_s e o volume inicial V_i ($F = V_s / V_i$).

4.2.2 Determinação da viscosidade

A viscosidade das soluções de CMC foi determinada em viscosímetro Brookfield LVT. Foi utilizada a agulha número 2 e a velocidade 30. A viscosidade é um parâmetro que avalia o escoamento da suspensão, por isso, é importante controlar este parâmetro antes da elaboração da formulação (ANSEL, 2007).

4.2.3 Formulação de suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL

A formulação de suspensão de sulfassalazina preparada está descrita no quadro 2 a seguir:

Quadro 2 – Formulação de suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL.

Substância	Quantidade (g)	Função
Sulfassalazina	5,0	Princípio ativo
Ciclamato de sódio	0,01	Edulcorante
Benzoato de sódio	0,5	Conservante
Carboximetilcelulose sódica	0,3	Agente suspensor
Polissorbato 80	0,5	Tensoativo
Óleo essencial laranja Brigaradea	0,2	Aromatizante
Água Purificada q.s.p		100 mL

A formulação de suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL foi preparada seguindo o seguinte fluxo, mostrado na figura 6:

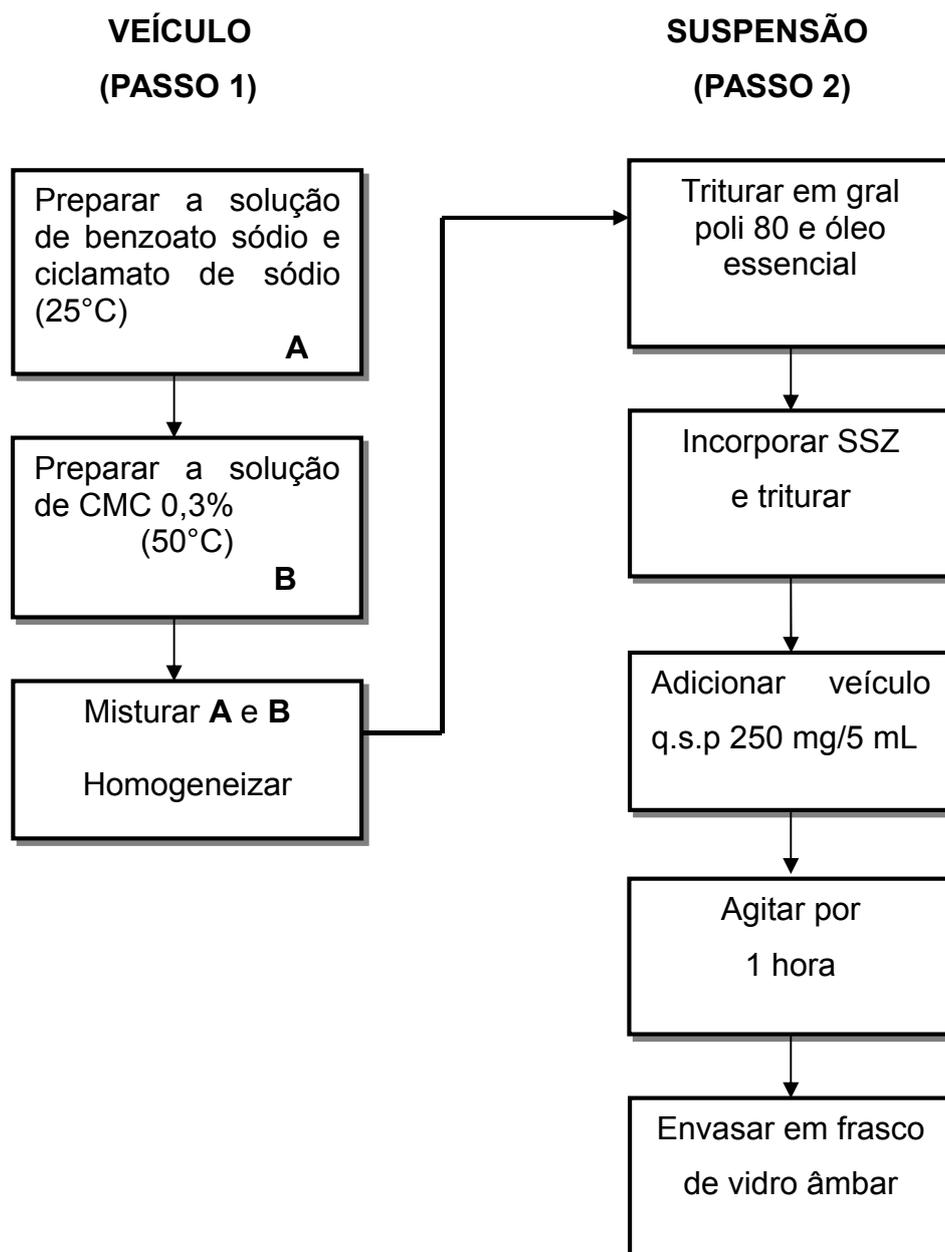


Figura 6 – Fluxograma do procedimento de preparo da suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL.

As amostras de suspensão foram envasadas em frasco de vidro âmbar de 250 mL, fechadas com tampas plásticas de polietileno e armazenadas em temperatura ambiente para testes de caracterização e estabilidade.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA SUSPENSÃO DE SULFASSALAZINA 250 mg/5 mL

As suspensões orais foram caracterizadas seguindo os ensaios clássicos que incluem: determinação de teor, tamanho de partícula, densidade, pH, redispersibilidade e volume de sedimentação (TAGLIARI *et al.*, 2009). Como não

está contemplada nas farmacopéias a metodologia de análise de sulfassalazina em suspensão oral e existe a prioridade de publicação dessa metodologia na Farmacopéia Americana. A metodologia de determinação de teor deve ser validada quanto aos parâmetros de especificidade, linearidade, precisão inter e intra-dia, exatidão e robustez, conforme os critérios estabelecidos na Resolução RE 899 - Guia de validação de métodos analíticos, categoria I, para princípios ativos (BRASIL, 2003).

4.3.1 Desenvolvimento e validação do método de teor de sulfassalazina suspensão oral:

4.3.1.1 Metodologia por Espectrofotometria UV/Vis

A metodologia por UV/Vis segue os mesmos parâmetros analíticos descritos na monografia de sulfassalazina, matéria-prima (USP 34). Foi transferida acuradamente para um balão volumétrico de 100,0 mL, 1,0 mL da suspensão oral, que corresponde a cerca de 50 mg de sulfassalazina e adicionado 80 mL de NaOH 0,1N . Essa mistura foi homogeneizada e levada ao banho ultrassônico por 20 minutos, agitando ocasionalmente. O volume foi completado para 100,0 mL com hidróxido de sódio 0,1N. Posteriormente foi transferida uma alíquota de 1,0 mL para um balão volumétrico de 100,0 mL, adicionado 2 mL de solução de ácido acético 0,1N, homogeneizado e completado o volume com água destilada. A concentração final dessa solução é cerca de 5 µg/mL . A leitura foi realizada em espectrofotômetro na região do UV/Vis em comprimento de onda de 359 nm, usando água purificada para zerar o equipamento. Como esta metodologia segue os requisitos descritos na Farmacopéia Americana 34ª edição para matéria-prima, foi necessária à validação para a suspensão oral para avaliação da interferência dos excipientes. A validação seguiu os requisitos da Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003, categoria I (BRASIL, 2003).

4.3.1.2 Seletividade e especificidade

A seletividade e a especificidade comprovam a capacidade de um método em determinar um analito de maneira inequívoca na presença de outras

substâncias que possam interferir na sua determinação (LANÇAS, 2009; BRASIL, 2003).

A seletividade para o método espectrofotométrico foi determinada através da varredura do espectro do placebo em comparação com a amostra. A varredura foi realizada entre 200 e 600 nm e as amostras foram preparadas conforme o item 4.3.1.1 - Metodologia por Espectrofotometria UV/Vis.

4.3.1.3 Linearidade

A linearidade é a resposta obtida em função da concentração do analito, a qual deve ser estudada em uma concentração adequada (LANÇAS, 2009; BRASIL, 2003).

Foram preparadas três curvas padrão com faixa de concentração entre 2,0 µg/mL a 12,0 µg/mL. Foram feitas leituras de absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 359 nm, para cada concentração. A curva de calibração foi elaborada com a ajuda do software Excell® (Microsoft, 2007). Os critérios de linearidade para aceitação da curva foram os coeficientes de correlação e a equação da reta ($y = ax + b$). Um estudo estatístico ANOVA foi utilizado para avaliar a equivalência dos dados (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

4.3.1.4 Precisão intra e inter-dia

Foram preparadas seis soluções com a mesma concentração e diluídas a fim de obter uma concentração final de aproximadamente 7,5 µg/mL. Foi realizada leitura em espectrofotômetro na região do UV/Vis no comprimento de onda de 359 nm das seis soluções. A precisão inter-dia foi realizada com o mesmo analista, equipamento diferente e em dia diferente.

Foi considerado como critério de aceitação o desvio padrão relativo (DPR) entre as medições, que deve ser menor que 5,0% (BRASIL, 2003).

4.3.1.5 Exatidão

Foram preparadas 3 soluções em triplicata com níveis de concentração diferentes: baixo (80%), médio (100%) e alto (120%). A leitura foi realizada em

espectrofotômetro UV/Vis no comprimento de onda de 359 nm das nove soluções obtidas. A análise de exatidão foi realizada através do desvio padrão (δ) e desvio padrão relativo (DPR). O DPR deve ser menor que 5,0% e a recuperação entre 98,0 e 102,0% (POLONONI *et al.*, 2011).

4.3.1.6 Robustez

O teste de robustez demonstra se as medições são suscetíveis a variações, caso seja, esta deve ser documentada no procedimento analítico (ICH, 2005; BRASIL, 2003).

Para os testes de robustez os seguintes parâmetros foram realizados:

- Estabilidade da solução estoque em balão volumétrico transparente exposto a luz ambiente;
- Estabilidade da solução estoque mantida em balão volumétrico âmbar;

Os testes acima foram realizados em temperatura ambiente.

4.3.2 Metodologia de determinação de teor de SSZ por CLAE – DAD

A metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi desenvolvida como uma outra alternativa para a determinação da sulfassalazina em suspensão. Foi utilizado como sistema de detecção o arranjo de fotodiodos e a pureza cromatográfica do pico foi avaliada.

A validação por CLAE também seguiu os critérios estabelecidos na Resolução Anvisa RE 899 – Guia de Validação de Métodos Analíticos de 29 de maio de 2003 para determinação de teor de princípios ativos em formas farmacêuticas – Categoria I (BRASIL, 2003).

4.3.2.1 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas estabelecidas foram (DAHAN *et al.*, 2010):

- Coluna cromatográfica C18, 5 μ m, 15,0 x 4,6 mm;
- Detector DAD (arranjo de diodos);
- Fase móvel: acetonitrila:H₂O (1:1) pH 2,5 com ácido fosfórico;
- Temperatura ambiente;

- Volume de injeção 20 μL ;
- Fluxo 1,0 mL/min;
- Comprimento de onda ($\lambda = 359 \text{ nm}$).

A análise foi realizada em cromatógrafo Waters com injeção manual e detector UV/Vis e também em cromatógrafo Lachrom Elite e Shimadzu Class VP com injetor automático e detector DAD (arranjo de fotodiodos).

4.3.2.2 Especificidade e Seletividade

Foram injetadas nas mesmas condições cromatográficas acima as seguintes amostras: diluente, que consiste em acetonitrila: H_2O (1:1), placebo (veículo estruturado) e suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL. Foram realizadas duas injeções de cada amostra.

4.3.2.3 Linearidade

Três curvas padrão foram preparadas com cinco níveis de concentração variando entre 3 $\mu\text{g/mL}$ e 12 $\mu\text{g/mL}$. A curva de calibração foi calculada com a ajuda do *software* Excell[®] (Microsoft, 2007). Os critérios de linearidade para aceitação da curva foram os coeficientes de correlação e a equação da reta ($y = ax + b$). Um estudo estatístico ANOVA foi utilizado para avaliar se os dados obtidos são equivalentes. A homocedasticidade foi calculada usando o teste de Cochran (Teste G) para avaliar se as variâncias alteram proporcionalmente ao valor de x (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

4.3.2.4 Precisão intra e inter-dia

A precisão foi avaliada com seis soluções com concentração de aproximadamente 6 $\mu\text{g/mL}$. As amostras foram preparadas em dois dias diferentes e injetadas em dois equipamentos diferentes: cromatógrafo Waters com injeção manual e cromatógrafo com injetor automático Shimadzu. A análise de precisão foi realizada através do desvio padrão (δ) e desvio padrão relativo (DPR). O DPR deve ser menor que 5,0% (BRASIL, 2003)

4.3.2.5 Exatidão

Foram preparadas três soluções em triplicata com níveis de concentração diferentes: baixo (80%), médio (100%) e alto (120%). Foram realizadas três injeções de cada amostra. A análise de exatidão foi realizada através do desvio padrão (δ) e desvio padrão relativo (DPR). A recuperação deve estar entre 98,0 e 102,0% (BRASIL, 2003).

4.3.2.6 Robustez

A robustez foi testada para as seguintes condições cromatográficas:

- Equipamento;
- Composição da fase móvel;
- Fluxo;
- Composição e pH da fase móvel

4.3.3 Densidade

A densidade das suspensões foi determinada utilizando o método do picnômetro de 25 mL (GIL, 2010).

4.3.4 pH

O pH foi determinado utilizando potenciômetro Mettler Toledo previamente calibrado com tampões 4,0 e 7,0 (materiais de referência – Tedia Brazil). Todas as leituras foram realizadas em temperatura ambiente (F. Bras. V, 2010b).

4.3.5 Viscosidade

A viscosidade foi medida em viscosímetro Brookfield usando agulha 2 , velocidade 30. Foram realizadas seis leituras de cada amostra em um intervalo de 15 segundos entre as leituras em temperatura ambiente (F. Bras. V, 2010c).

4.3.6 Velocidade de Sedimentação

As amostras de suspensão foram transferidas para uma proveta de vidro de capacidade de 100 mL. As amostras foram avolumadas para 100 mL e deixadas em repouso, considerando a altura inicial (HI = 100). A altura do

sedimento foi medida por um período de 8 dias nos seguintes intervalos: 17, 21, 38, 48, 72, 96, 192 horas. A relação Hs/HI foi calculada e um gráfico foi construído para avaliação (PRISTA, 2008; SINKO, 2008).

4.3.7 Potencial Zeta ζ

O potencial zeta ζ foi determinado utilizando o equipamento Malvern – Zetasizer. O potencial zeta utiliza a técnica de microeletroforese, onde a estabilidade de dispersões grosseiras como suspensões podem ser avaliadas (AULTON, 2005; SINKO, 2008).

A técnica de microeletroforese avalia o movimento de uma partícula sob influência de um campo elétrico em um líquido estacionário. As partículas são observadas como ponto de luz espalhados (AULTON, 2005).

As amostras para leitura, no equipamento Zetasizer Malvern Instrument, foram preparadas da seguinte maneira: 0,3 mL das suspensões D, H e P foram retiradas com pipeta automática e transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com água ultrapura e depois homogeneizada. O diluente escolhido foi a água, pois este, deve ser o mais próximo possível da fase contínua da amostra. Para cada formulação foi medido o índice de refração e a absorbância em 766 nm e os dados lançados no Zetasizer Software para cálculo do Potencial Zeta ζ .

A leitura foi realizada na célula microeletroforética do equipamento. As amostras foram injetadas no circuito da célula com seringas de 1 mL, de modo que, toda a célula ficasse preenchida e livre de bolhas. Foram realizadas seis leituras para cada suspensão. O DP e o DPR também foram calculados.

4.3.8 Determinação do teor de sulfassalazina na suspensão

As amostras de suspensão de sulfassalazina foram analisadas por UV/Vis. A análise foi realizada de forma a simular o uso da suspensão e também avaliar se a dose retirada era constante durante a administração.

As suspensões foram agitadas até total homogeneização e três alíquotas retiradas do frasco da seguinte forma: topo, meio e fundo. Essa análise foi realizada duas vezes ao dia para cada suspensão avaliada.

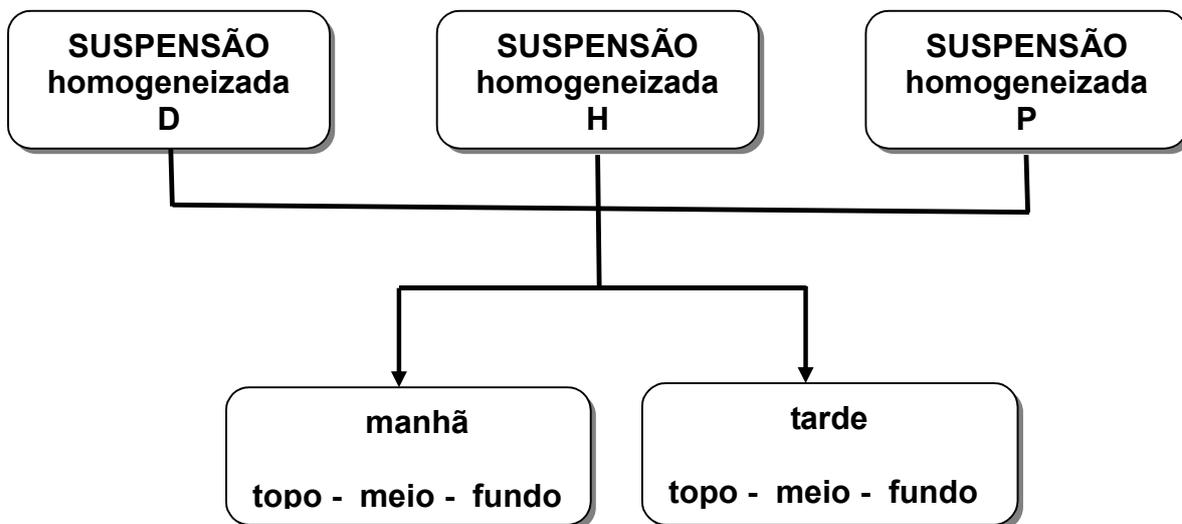


Figura 7 - Esquema de amostragem das suspensões para determinação do teor de sulfassalazina.

4.3.9 Microscopia óptica da suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL

Um microscópio óptico da marca Leica (modelo DMLS 30) foi utilizado para avaliar fisicamente as partículas das suspensões. Uma alíquota de 0,5 mL foi transferida para uma lâmina, foi adicionado 0,5 mL de água destilada sobre a amostra e em seguida uma lamínula foi colocada. A lâmina preparada foi levada ao microscópio e as fotos foram tiradas em duas escalas: 50 μm e 100 μm .

4.3.10 Determinação do teor de comprimidos revestidos de Azulfin® 500 mg

As duas metodologias validadas foram utilizadas para determinação do teor do comprimido revestido de Azulfin® 500 mg: CLAE e UV/Vis.

Para determinação do peso médio dos comprimidos, dez amostras de comprimidos foram pesadas individualmente e o peso médio determinado. Posteriormente, os comprimidos foram reunidos e triturados em gral de porcelana. A partir do pó obtido foi retirada uma amostra para posterior análise.

A análise por CLAE, foi realizada utilizando-se um padrão, na concentração de 6 $\mu\text{g/mL}$, tendo como diluente uma mistura de acetonitrila:água (1:1). Assim, cerca de 80 mg do pó fino triturado foi transferido para um balão volumétrico de 250 mL, adicionados 125 mL de diluente. A amostra foi deixada em banho ultrassônico por 20 minutos, sendo agitada ocasionalmente. O volume foi completado com diluente para 250 mL. Dessa solução, foi retirada uma alíquota

de 3 mL e transferida para um balão de 100,0 mL e completada com o mesmo diluente. As amostras foram filtradas em membrana Millex[®] antes da injeção.

Para a metodologia por UV/Vis, foram transferidos 53,5 mg de sulfassalazina padrão para um balão volumétrico de 100,0 mL e adicionada uma solução de NaOH 0,1N até total solubilização. Uma alíquota de 1,0 mL foi transferida para um balão volumétrico de 100,0 mL, adicionado de aproximadamente 20 mL de água destilada e 2 mL de ácido acético 0,1N. Após homogeneização, o volume foi completado com água destilada. As amostras e padrão foram lidos em espectrofotômetro UV/Vis no comprimento de onda de 359 nm, usando água destilada como branco. Todas as amostras foram feitas em triplicatas e o DPR determinado. O valor DPR recomendável é de no máximo 2%.

4.4 DISSOLUÇÃO DA SUSPENSÃO DE SULFASSALAZINA 250 mg/5 mL

O teste de dissolução foi realizado utilizando o aparato 2 (pá rotatória), que é indicado na literatura para suspensões orais (SHAH *et al.*, 2002; HANSON, 2004). A validação do ensaio de dissolução foi realizada seguindo os critérios estabelecidos pela Resolução RE 899 – Guia de Validação de Métodos Analíticos de 29 de maio de 2003, categoria 3: teste de performance, que engloba os seguintes parâmetros: linearidade, precisão intra e inter-dia, especificidade/seletividade, limite de detecção e quantificação. Outras referências, como International Conference on Harmonization (ICH, 2005) e RDC 31 de 12 de agosto de 2010 (ANVISA) também foram consultadas para avaliação dos resultados do perfil de dissolução (AZEVEDO *et al.*, 2008).

4.4.1 Preparo das amostras

Como as amostras eram do tipo suspensões, as mesmas foram pesadas e transferidas para as cubas. As seringas vazias foram pesadas e a massa transferida foi determinada por diferença de peso. A quantidade total dissolvida em cada ponto foi calculada, levando em consideração a massa adicionada de suspensão em cada cuba e a densidade. O roteiro do ensaio de dissolução pode ser visualizado na figura 8:

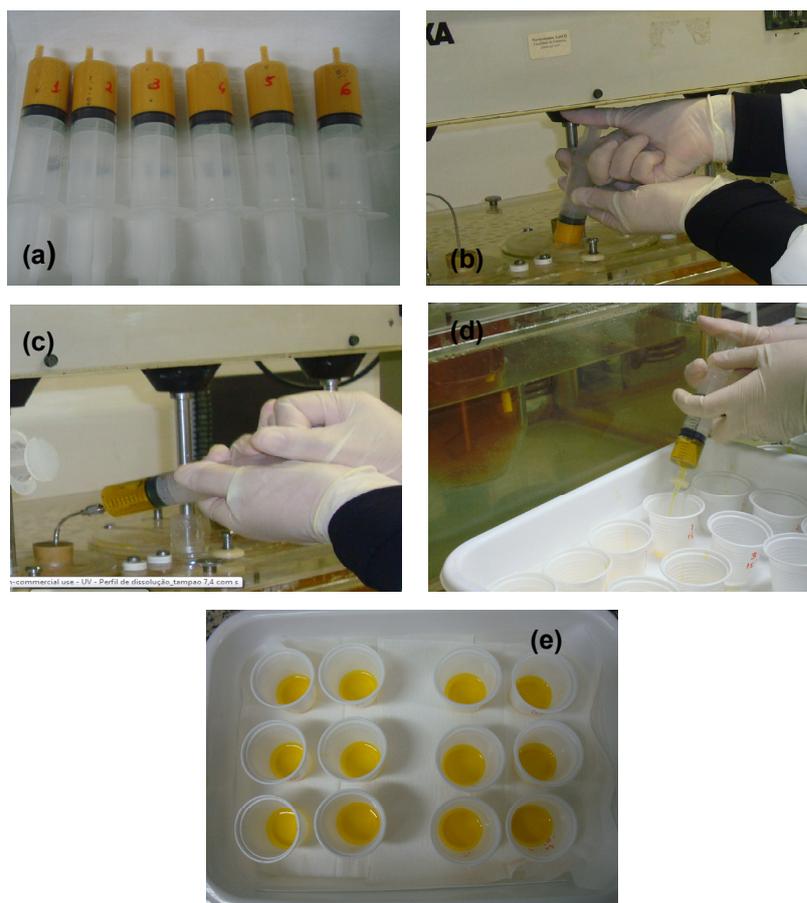


Figura 8 - Roteiro do ensaio de dissolução da esquerda para direita: (a) seringas contendo suspensão pesadas e numeradas em ordem de adição nas cubas. (b) adição da suspensão nas cubas. (c) coleta realizada com a seringa e pré-filtração com filtro 35 μm . (d) filtração da amostra coletada com filtro 0,45 μm (Millex[®]) (e) amostras filtradas.

O teor real das suspensões, foi determinado antes da dissolução. Para cada dia de teste foi construída uma curva de calibração de cinco níveis de concentração no meio avaliado. As curvas foram construídas a cada dia de teste. Os cálculos do perfil de dissolução foram feitos a partir da massa de suspensão adicionada a cada cuba de dissolução. Todos os cálculos foram realizados utilizando o teor encontrado (real) nas suspensões antes da dissolução. A concentração e a massa total dissolvida em cada ponto foram calculadas utilizando curvas de calibração de cinco pontos que foram construídas de acordo com o meio avaliado.

As amostras foram introduzidas na cuba de dissolução da maneira mais rápida possível, sendo que, ao final de dez segundos, as seis amostras já estavam introduzidas na cuba, padronizando, dessa maneira, a adição em todos os ensaios de dissolução realizados.

4.4.2 Rotação

Foram testadas duas rotações para a suspensão de sulfassalazina: 25 e 50 rpm. Para suspensões com baixa viscosidade, pode ser utilizada a rotação de 25 rpm. As rotações rotineiramente utilizadas nas monografias farmacopeicas são: 50 e 75 rpm, essa última para suspensões com viscosidade maiores (SIEWERT *et al.*, 2003; HANSON *et al.*, 2004).

4.4.3 Tempo de coleta

O perfil de dissolução para as suspensões dos três fornecedores foi realizado nas seguintes condições:

Rotação 25 rpm: 1, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 min - totalizando 8 pontos

Rotação 50 rpm: 1, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 min - totalizando 8 pontos

O volume de amostra coletada em cada tempo foi de 10 mL. Não houve reposição do meio de dissolução. As devidas correções de massa do ativo retiradas para cada cuba foram consideradas para o cálculo do percentual dissolvido. Durante a coleta, foi observado, se na rotação de 25 rpm ocorreu a estagnação da dissolução, por depósito da suspensão no fundo da cuba.

4.4.4 Meios de dissolução e condições *sink*

Os meios selecionados para o perfil de dissolução partiram do estudo de solubilidade, que mostraram que a SSZ é praticamente insolúvel em água, em solução de HCl 0,1N e em suco gástrico. Partindo desse ponto, selecionamos cinco meios biorelevantes para esse estudo:

- HCl 0,1N
- Tampão fosfato pH 5,8
- Tampão fosfato pH 5,8 com tween 0,5%
- Tampão fosfato pH 6,8
- Tampão fosfato pH 7,4

Considerando a atividade específica da SSZ no cólon e as características anatômicas e fisiológicas do sistema gastrointestinal, foram selecionados os seguintes meios: tampão fosfato pH 5,8, tampão fosfato pH 5,8 com tween 0,5%, tampão fosfato pH 6,8 e tampão fosfato pH 7,4, que são os mais relevantes para

a atividade desse fármaco nesse local. A passagem do fármaco pelo cólon ocorre em pH que varia de 5,5 a 7, podendo aumentar, devido a presença de sais biliares que contribuem para a emulsificação e aumento da solubilidade. Nesse local também são encontradas as bactérias colônicas responsáveis pela clivagem da ligação azo da SSZ, dando origem aos seus dois constituintes – ácido 5-aminosalicílico e sulfapiridina (Figura 2).

As condições *sink* não foram respeitadas no meio HCl 0,1N (pH 1,2), pois a SSZ mostrou-se pobremente solúvel nesse meio. Os demais meios escolhidos atingiram as condições *sink*, conforme a tabela 3:

Tabela 3 – Condições *sink* adotadas para os meios de dissolução usados no ensaio de dissolução da suspensão de sulfasalazina 250 mg/5 mL.

Meios de Dissolução	Volume (mL)	Conc. Saturação (C) mg/mL	Conc. Suspensão	Conc. em condições <i>sink</i> (C ₀)
HCl 0,1N	900	18,6	100 mg	Não atende
Tampão fosfato pH 5,8	900	246,0	100 mg	2,5 x
Tampão fosfato pH 5,8 tween 0,5%	900	653,0	100 mg	6,5 x
Tampão fosfato pH 6,8	900	2120,0	250 mg	8,5 x
Tampão fosfato pH 7,4	900	4870,0	500 mg	9,7 x

O meio de dissolução foi filtrado em membrana porosa a fim de eliminar partículas e bolhas de ar. Após filtração, foram aquecidos à 38°C e transferidos exatamente 900 mL, com auxílio de proveta graduada de 1000 mL, para as cubas de dissolução.

Considerando que as condições *sink* devem ser até 10 vezes menor que a concentração de saturação (C) do fármaco no meio, nos três últimos meios as condições *sink* estão sendo respeitadas, enquanto no tampão fosfato pH 5,8 a condição *sink* está 2,5 vezes abaixo da concentração de saturação (C).

4.4.5 Adsorção nos filtros

Para o teste de dissolução foram utilizados dois tipos diferentes de porosidade de filtro. Para fazer a coleta da amostra da cuba, foi utilizado um filtro de polietileno com porosidade de 35 µm. As amostras antes de serem lidas em

espectrofotômetro foram filtradas em membrana Millex[®] PVDF com 0,45 µm de poro.

Foram preparadas soluções padrão de SSZ nos meios de dissolução e submetidas ao mesmo sistema de filtração do teste de dissolução. As soluções filtradas e não filtradas foram lidas nas mesmas condições espectrofotométricas do teste de dissolução. O percentual de perda por filtração foi calculado, segundo equação 6 abaixo:

$$\text{LNF} - \text{LF/LNF} \times 100 \text{ (equação 6)}$$

Onde,

LNF é a leitura da amostra de SSZ não filtrada

LF é a leitura da amostra filtrada

O critério de aceitação para este teste é de no máximo 5,0% (FONSECA, 2008; HANSON, 2004).

4.4.6 Modelo de Weibull aplicado ao perfil de dissolução

Uma equação geral empírica foi descrita por Weibull em 1951 e modificada por Langebucher em 1972 para se adaptar aos processos de liberação e dissolução. Esta equação pode ser aplicada com sucesso a todos os tipos de curvas de dissolução (COSTA *et al.*, 2001).

Os perfis de dissolução da suspensão de sulfassalazina foram analisados pelo modelo cinético de Weibull que é o que melhor se aplica ao estudo de suspensão (PATEL *et al.*, 2008; AGUIAR *et al.*, 2005; PAPADOPOULOU *et al.*, 2006).

Quando aplicada à dissolução de formas farmacêuticas, a equação de Weibull expressa a quantidade acumulada do fármaco (m) em solução no tempo t. A equação de Weibull está demonstrada na equação 7:

$$\log[-\ln(1-m)] = \beta \log(t - T_i) - \log \alpha \text{ (equação 7)}$$

Onde:

m: massa do fármaco;

β: parâmetro de forma da curva;

α: parâmetro de escala.

O seguinte gráfico foi plotado: logaritmo da quantidade de fármaco dissolvida versus logaritmo do tempo (MANADAS *et al.*, 2002).

Nas retas resultantes dos modelos matemáticos aplicado, foram incluídos os pontos até o início do platô (indicando o término do processo), necessitando de pelo menos três pontos antes de atingir 100% da dissolução (DOKOUMETZIDIS *et al.*, 2006). Foi determinado para todas as retas o coeficiente de determinação (R^2). Com base nos resultados obtidos foi possível determinar os valores de β e α .

4.4.7 Tratamento estatístico da dissolução

Foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.04 (1992-2010 GraphPad software, inc.), para avaliar diferenças significativas dos percentuais dissolvidos entre as formulações D,H e P em cada meio de dissolução avaliado. A comparação dos perfis de dissolução foi realizada utilizando two-way ANOVA. Nesse método o percentual dissolvido foi a variável dependente e o tempo, o fator repetido. Valor de P menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo (PATEL *et al.*, 2008; YUKSEL *et al.*, 2000).

4.4.8 Perfil de dissolução do comprimido revestido referência Azulfin[®] 500 mg

O perfil de dissolução foi realizado em dois estágios: Estágio I (meio HCl 0,1N – 900 mL) e Estágio II (tampão fosfato pH 7,4 – 900 mL), seguindo a especificação (USP 34, 2011d).

Para o Estágio I, foi construída uma curva de calibração em meio HCL 0,1N nas seguintes condições: foi preparada uma solução padrão na concentração de 0,025 mg/mL. Dessa solução estoque foram retiradas alíquotas de 3, 4, 5 e 6 mL e transferidas, respectivamente, para balão volumétrico de 10 mL. A solução de 0,025 mg/mL foi lida como o ponto número 5 da curva. O valor da correlação da curva de calibração deve ser maior que 0,99. Os comprimidos foram transferidos para a cuba do dissolutor e após 2 horas sob rotação à 100 rpm, alíquotas de 10 ml foram coletadas com auxílio de amostradores manuais e a absorbância no comprimento de onda de 359 nm, usando HCl 0,1N para zerar o equipamento. O máximo dissolvido em duas horas deve ser de 10%.

Para o Estágio II, foi construída uma curva de calibração em meio tampão fosfato pH 7,4 nas seguintes condições: foi preparada uma solução estoque na concentração de 0,28 mg/mL. Dessa solução foram retiradas alíquotas de 1, 2, 3 e 4 mL, respectivamente, para balões volumétricos de 200 e 100 mL, de modo obtermos uma curva de calibração na faixa de concentração de 1,4 a 11,2 µg/mL. A correlação deve ser maior que 0,99.

Os comprimidos foram retirados da cuba, com auxílio de uma pinça e colocados sobre vidros de relógio. Imediatamente o meio foi trocado das cubas, para iniciar o estágio II. O meio HCl 0,1N foi retirado das cubas e colocado o meio tampão fosfato pH 7,4 previamente aquecido e desaerado. Os mesmos comprimidos foram adicionados novamente nas cubas num intervalo de 5 segundos e a dissolução realizada na velocidade de 100 rpm. Amostras de 10 mL foram retiradas em intervalos de 10, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. Alíquotas de 1 mL foram transferidas para um balões volumétricos de 100 ml a fim de obter a concentração final de 5,5 µg/mL. As amostras foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 359 nm zerado com tampão fosfato pH 7,4. Não houve reposição do meio de dissolução. Não menos que 85% (Q) de sulfassalazina deve estar dissolvida em 60 minutos (USP 34, 2011e), ou seja, para 6 comprimidos (Estágio 2) o valor deve ser Q + 5 (90%).

4.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE DISSOLUÇÃO

4.5.1 Especificidade e Seletividade

A especificidade do método espectrofotométrico da dissolução foi realizada através da varredura do placebo nos meios tampões fosfato pH 5,8, tampão fosfato pH 5,8 com tween 80 à 0,5%, tampão fosfato pH 6,8 e tampão fosfato pH 7,4. Paralelamente, foi realizada a varredura das amostras nos mesmos tampões. A varredura foi realizada em espectrofotômetro UV/Vis entre 200 nm a 600 nm.

4.5.2 Linearidade

A linearidade foi comprovada através de três curvas de calibração nas faixas de concentração de 1,4, 2,8, 5,6, 8,4 e 12,5 µg/mL de sulfassalazina em tampão fosfato pH 7,4. Todas as soluções foram lidas no comprimento de onda

de 359 nm, usando tampão fosfato pH 7,4 como branco. A linearidade foi avaliada através da regressão linear das curvas padrão. Foram determinados o coeficiente angular (a) e de determinação (R^2). O critério de aceitação foi de 0,999 ou maior para o coeficiente de correlação (r) (RIBANI *et al.*, 2004; MENDONÇA *et al.*, 2011).

4.5.3 Exatidão/ recuperação

A exatidão do método espectrofotométrico foi determinada usando concentrações conhecidas de padrão de sulfassalazina. Todos os balões continham placebo (veículo estruturado sem a SSZ). As amostras de SSZ para o teste de exatidão foram preparadas, em triplicata, em três níveis de concentração: 2,5 $\mu\text{g/mL}$, 5,0 $\mu\text{g/mL}$, 7,5 $\mu\text{g/mL}$. Para a concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ foram transferidos para três balões volumétricos de 100,0 mL, 0,5 mL de placebo e 25 mg de sulfassalazina e adicionado tampão fosfato 7,4 para solubilizar. O volume foi completado para 100 mL com tampão fosfato pH 7,4. Posteriormente, foi transferido uma alíquota de 1,0 mL para um balão volumétrico de 100,0 mL e o volume completado com tampão fosfato pH 7,4 a fim de obter a concentração final de 2,5 $\mu\text{g/mL}$. As amostras na concentração de 5,0 $\mu\text{g/mL}$ também foram preparadas em triplicata: foram transferidos para três balões volumétricos de 200 mL, 1,0 mL de placebo, 50 mg de sulfassalazina e adicionado tampão fosfato pH 7,4 para dissolver. Uma segunda diluição de 2 mL para 100,0 mL foi feita a fim de obter a concentração final de 5,0 $\mu\text{g/mL}$. A concentração de 7,5 $\mu\text{g/mL}$ foi obtida a partir de três soluções contendo 25 mg de sulfassalazina em balão volumétrico de 100 mL contendo 0,5 mL de placebo cada. Uma segunda diluição de 3,0 mL para 100,0 mL foi feita a fim de obter concentração final de 7,5 $\mu\text{g/mL}$. Todas as soluções foram lidas em espectrofotômetro na região do UV/Vis em comprimento de onda de 359 nm, usando tampão fosfato pH 7,4 como branco. Os valores de recuperação, foram expressos em porcentagem e o desvio padrão relativo calculado para cada nível de concentração.

4.5.4 Precisão e Precisão intermediária

A precisão foi calculada realizando-se o doseamento das suspensões nos meios tampão fosfato pH 5,8, tampão fosfato pH 5,8 tween 80 à 0,5%, tampão

fosfato pH 6,8 e tampão fosfato pH 7,4. O ensaio de dissolução foi realizado utilizando seis pesagens das suspensões do equivalente a 100 mg de Sulfassalazina, que foi adicionado individualmente em seis cubas do dissolutor no mesmo dia (intra-dia) e em um segundo dia (inter-dia), procedendo-se ao ensaio de dissolução nas condições padronizadas. Alíquotas de 1,0 mL foram coletadas e diluídas 100 vezes no meio de dissolução. Procedeu-se à leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 359 nm, usando o meio de dissolução como branco. O desvio padrão relativo das seis determinações foi determinado e deve ser no máximo 5,0% (BRASIL, 2003; GERING *et al.*, 2011).

4.5.5 Limite de Quantificação (LQ) e Limite de Detecção (LD)

O cálculo desses limites foram obtidos a partir dos parâmetros das três curvas de calibração. As estimativas do LD e do LQ foram então determinadas através das seguintes equações:

$$LD = (DP \times 3)/IC \quad (\text{equação 8})$$

$$LQ = (DP \times 10)/IC \quad (\text{equação 9})$$

Onde, DP é o desvio padrão relativo do intercepto com o eixo Y e IC é a inclinação (*slope*) ou coeficiente angular da curva analítica obtida no estudo de linearidade (RIBANI *et al.*, 2004; BRASIL, 2003; GERING *et al.*, 2011).

4.5.6 Estudo da estabilidade das soluções de dissolução

A estabilidade da SSZ no meio tampão fosfato pH 7,4, foi realizada por um período de 48 horas. Cinco soluções foram diluídas a partir de uma solução mãe na concentração de 0,31 mg/mL foram deixadas em temperatura ambiente por um período de 48 horas, e o aspecto das soluções observado. A absorbância das soluções padrão foi lida à 359 nm, usando tampão fosfato pH 7,4 como branco. Curvas padrão foram construídas e o coeficiente de correlação avaliado.

4.6 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS SUSPENSÕES DE SULFASSALAZINA D, H E P

O estudo de estabilidade das suspensões foi realizado utilizando suspensões dos fornecedores D, H e P. O tempo programado foi de 90 dias (3 meses) para um estudo acelerado à 40°C. O planejamento está mostrado na tabela 4:

Tabela 4 – Planejamento dos testes do estudo de estabilidade das suspensões de sulfassalazina 250 mg/5 mL.

Teste	Tempo inicial	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Aspecto	x	X	X	X	X
pH	x	X	X	X	X
Densidade	x	X	X	X	X
Viscosidade	x	X	X	X	X
Teor	x	X	X	X	X
Tamanho partícula	x	X	-	-	X
Dissolução	-	-	-	-	X
Pesquisa de patógenos	-	-	-	-	X
Fungos e leveduras					X
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	X
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	X
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	X

As suspensões foram armazenadas em frasco de vidro âmbar e fechadas com rolhas plásticas de polietileno. As amostras foram estocadas em câmara climática a 40°C por 90 dias e retiradas periodicamente conforme tabela 4. O estudo foi baseado nas condições climáticas estabelecidas para formas farmacêuticas líquidas, armazenadas em frasco de vidro, ou seja, embalagem impermeável. Desta forma, não foi levado em conta a umidade relativa e sim a temperatura (BRASIL, 2005).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA SULFASSALAZINA

5.1.1 Teor

O teor foi realizado segundo metodologia da USP 34^a edição. Os resultados obtidos estão na tabela 5:

Tabela 5 - Análise quantitativa (doseamento) da sulfassalazina fornecedor P, D e H.

Amostra	P	D	H
1	99,4	100,1	98,9
2	99,6	100,7	98,7
3	100,2	100,0	99,9
Média	99,7	100,3	99,2
DP	0,41	0,38	0,64
DPR (%)	0,41	0,38	0,65

A análise foi realizada em triplicata e o DPR (desvio padrão relativo) calculado. Os resultados de teor na matéria-prima encontrados para os três fornecedores estão dentro do limite de aceitação (98,5 a 100,5%) preconizados na USP 34^a edição. O valor de DPR aceito para determinação de teor segundo a USP 34^a edição, é de no máximo 2%. Os valores encontrados de DPR na determinação de teor para os três fornecedores foram DPR abaixo de 2% e, portanto, satisfatórios.

5.1.2 Identificação por UV/Vis

O espectro de absorção da amostra do fornecedor P (lote 20071214), mostrou máximos de absorbância em 358,5 nm e em 239 nm (Figura 9). Para o fornecedor D (lote 20090712), o máximo de absorbância ocorreu em 360,4 nm e em 238,4 nm e para o fornecedor H (lote 090702), máximos em 358,5 nm e em 238,5 nm. O espectro de absorção do padrão de referência mostrou máximos em 360 nm e 238,5 nm com absorbâncias de 0,893 e 0,774 respectivamente. Os máximos obtidos para amostra padrão Sigma (Figura 10) estão dentro dos limites aceitáveis de máximo em 359 nm, conforme preconizado na USP 34^a edição.

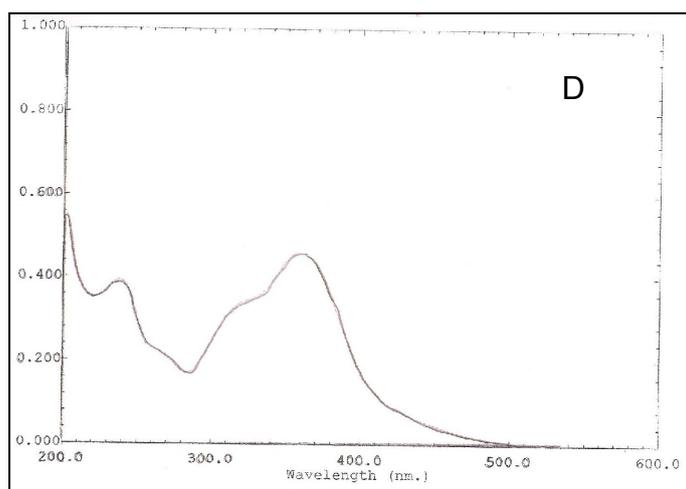


Figura 9 - Espectro de absorção UV/Vis da sulfasalazina fornecedor D (lote: 20090712).

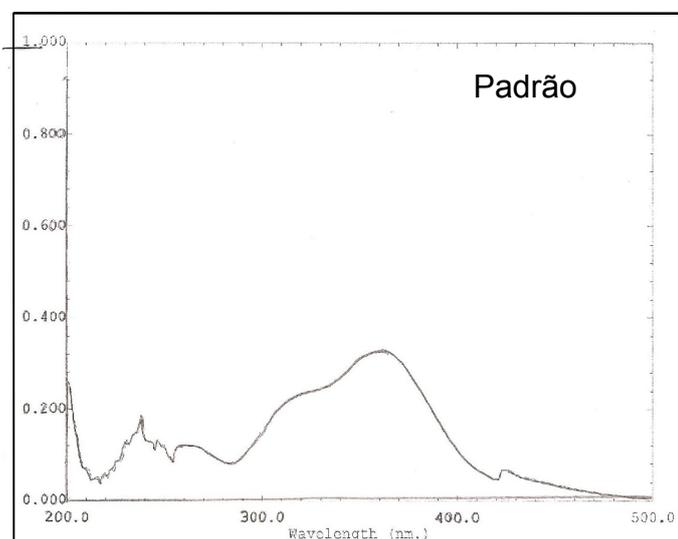


Figura 10 - Espectro de absorção UV/Vis da sulfasalazina material de referência Sigma (lote: 1450407)

5.1.3 Identificação por Espectrofotometria IR

O espectro do padrão Sigma está representado na figura 11. O ensaio foi realizado na faixa de comprimento médio de 4000 a 200 cm^{-1} . Um espectro na região do infravermelho mostra detalhes mais expressivos da identidade molecular das substâncias. Os picos podem ser agudos e intensos, característicos de grupos carbonila, quanto alargados e rasos, característicos de ligação CH. Essas diferenças espectrais fazem do infravermelho uma boa técnica de identificação de substâncias (GIL, 2010).

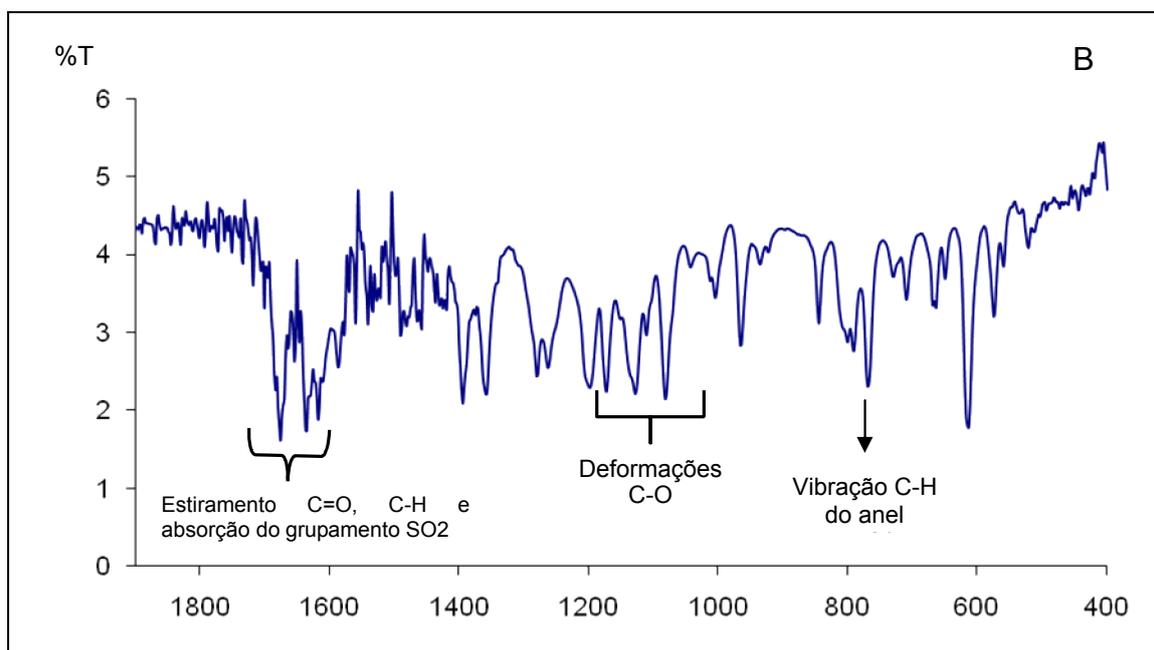
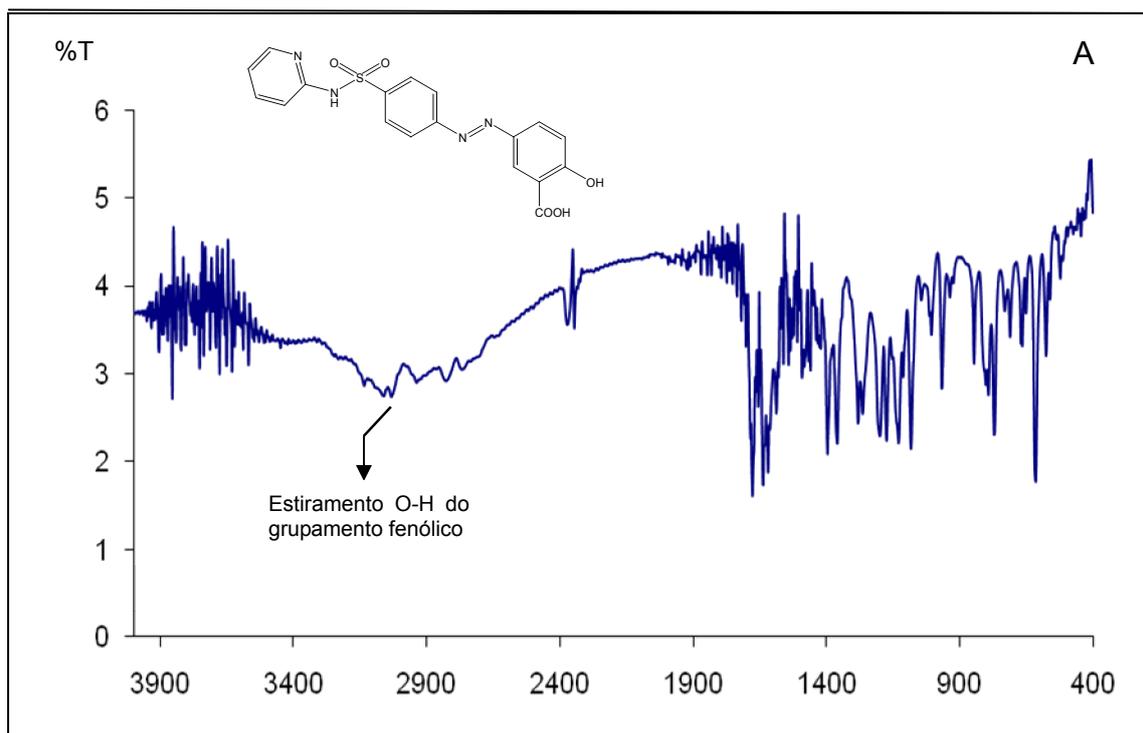


Figura 11 - (A) Espectro de infravermelho do padrão Sigma de sulfassalazina (B) faixa de comprimento de onda que representa a área de impressão digital dos picos de 600 a 1200 cm^{-1} .

A tabela 6, mostra os picos principais referenciados na literatura e os valores obtidos para as amostras.

Tabela 6: Resultados de comprimento de onda λ (cm^{-1}) das principais bandas do espectro IR da amostra de sulfasalazina fornecedor P (lote 20071214), fornecedor D (lote 20090712), fornecedor H (lote 090702) comparados com o padrão Sigma (lote 1450407).

λ máx. (cm^{-1}) (MOFFAT <i>et al.</i> , 2004)	Padrão Sigma	D	H	P
772	768	768	768	768
1078	1082	1082	1082	1082
1123	1128	1128	1128	1128
1175	1173	1172	1173	1173
1634	1637	1635	1637	1637
1672	1676	1676	1676	1676

Os resultados acima demonstram similaridade entre as bandas citadas na literatura (MOFFAT *et al.*, 2004) e aquelas obtidas durante o experimento. O uso do espectro infravermelho na caracterização de fármacos fornece dados para verificar as transições vibracionais e rotavibracionais mais importantes na estrutura molecular. A região de impressão digital das bandas está entre 1200 a 600 cm^{-1} . Nessa região pode ser observado uma banda com forte intensidade em 772 cm^{-1} , referente a vibração da ligação C–H do anel aromático, 1078 cm^{-1} , 1123 cm^{-1} , 1175 cm^{-1} referentes a deformações C–O, característicos de ácidos carboxílicos e 1634 cm^{-1} e 1672 cm^{-1} , característicos de estiramento das ligações C=O e C=N e deformação em N-H. Nessa região o grupo sulfonamida R-SO₂-NH absorve radiação infra-vermelha (SKOOG, 2009). Na região entre 3400 – 3450, uma banda bi-dentada é característica de estiramento da ligação O-H referente ao grupamento fenólico OH e do ácido carboxílico; a existência de água de hidratação também pode ser evidenciada nessa região do espectro (MOHAMED *et al.*, 2005; REFAT *et al.*, 2011; SOLIMAN, 2006). Porém, a análise térmica, DSC, evidenciou que não houve nenhum outro evento além do seu único pico de fusão (item 5.1.9.3), mostrando que, não ocorreu perda de moléculas de água. Desta forma, as amostras dos fornecedores D, H e P de SSZ e o padrão não possuem água de hidratação (MOTHÉ, 2009).

5.1.4 Perda por dessecação

Os resultados obtidos por perda por dessecação das amostras e do padrão encontram-se dentro do limite de aceitação, máximo 1,0% do peso da amostra, conforme preconiza a USP 34^a edição.

Tabela 7: Perda por dessecação da sulfassalazina fornecedor P , D e H

Amostra	P (lote 20071214)	D (lote 20090712)	H (lote 090702)
1	0,61	0,33	0,33
2	0,56	0,32	0,32
3	0,50	0,30	0,30
Média	0,57	0,32	0,32
DP	0,05	0,02	0,02
DPR (%)	11,01	4,82	4,82

Durante o processo de cristalização pode ocorrer que as moléculas de água fiquem retidas no retículo cristalino da molécula, nesse caso, temos os hidratos. Morris e colaboradores mostraram que, de um total de 16 mil substâncias, 11% eram hidratos. Os três lotes de SSZ avaliados apresentaram perda menor que 1% (tabela 7) e na análise térmica realizada (item 5.1.9.3), não houve nenhum evento característico de perda de moléculas de água de hidratação em torno de 100°C, mostrando assim, que as amostras e o padrão não são hidratos (MOHAMED *et al.*, 2005; GIL, 2010).

5.1.5 Solubilidade

A solubilidade dos sais de SSZ dos três fabricantes, D, H e P foi determinada utilizando uma placa de agitação de seis pontos. A 50 ml do meio de dissolução, foi adicionado a SSZ obtendo-se uma solução saturada com o fármaco. A solução saturada permaneceu sob agitação por 24 horas à temperatura ambiente (25°C). Subsequentemente as amostras foram centrifugadas à 4000 rpm por 120 minutos e depois filtradas em Millex[®] 0,45 micra e efetuada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 359 nm. Para todos os meios de dissolução testados, foi feito o espectro de absorção da sulfassalazina. Uma curva de calibração, de pelo menos três pontos, (DOKOUMETIZIDIS *et al.*, 2006) foi construída para cada meio de dissolução e a

concentração determinada (SEHIC *et al.*, 2010). As curvas de calibração do estudo de solubilidade estão mostradas no anexo 1 – Curvas de calibração para determinação da solubilidade.

Tabela 8 – Parâmetros provenientes das curvas padrão (mínimo de 3 níveis) utilizadas na determinação da solubilidade por espectrofotometria UV/Vis das amostras dos fornecedores D, H e P para os diferentes meios de dissolução.

Meio de dissolução	Equação da reta	Correlação
Suco gástrico (HCl 0,1N pH 1,2)	$y = 6,90x - 0,0010$	0,9991
Suco gástrico com enzima (pH 1,2)	$y = 13,20x + 0,0043$	0,9979
H ₂ O	$y = 66,41x + 0,0108$	0,9991
Tampão fosfato pH 5,8	$y = 58,30x + 0,0004$	0,9995
Tampão fosfato pH 5,8 com Tween 80 0,3%	$y = 115,77x + 0,2160$	0,9994
Tampão fosfato pH 5,8 com Tween 80 0,5%	$y = 110,60x + 0,0077$	1,0000
Suco entérico (pH 6,8)	$y = 43,37x + 0,0904$	0,9951
Suco entérico pH 6,8 com enzima	$y = 62,33x + 0,0375$	0,9950
Tampão fosfato pH 7,4	$y = 63,36x - 0,0039$	0,9996

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se adequada correlação linear, uma vez que os coeficientes de correlação obtidos possuem valores superiores a 0,99 como preconizado pela Resolução 899 da ANVISA (BRASIL, 2003). Desta forma, foi possível determinar a concentração em mg/mL da quantidade dissolvida das amostras (Tabela 9).

Tabela 9 – Resultados do valor da solubilidade (mg/mL) para as amostras (n = 3) de SSZ dos fornecedores D, H e P por espectrofotometria UV/Vis à 25°C(± 2°C).

Meios de dissolução	D	H	P
Suco gástrico (HCl 0,1N pH 1,2)	0,018 ± 0,002	0,021 ± 0,002	0,023 ± 0,003
Suco gástrico com pepsina (pH 1,2)	0,012 ± 0,002	0,010 ± 0,001	0,010 ± 0,001
H ₂ O	0,003 ± 0,0001	0,070 ± 0,030	0,019 ± 0,003
Tampão fosfato pH 5,8	0,299 ± 0,045	0,154 ± 0,008	0,367 ± 0,029
Tampão fosfato pH 5,8 com Tween 80 0,3%	0,445 ± 0,045	0,402 ± 0,021	0,379 ± 0,020
Tampão fosfato pH 5,8 com Tween 80 0,5%	0,739 ± 0,059	0,757 ± 0,044	0,679 ± 0,031
Suco entérico (pH 6,8)	2,759 ± 0,206	2,080 ± 0,050	1,509 ± 0,425
Suco entérico pH 6,8 pancreatina	4,854 ± 0,150	3,988 ± 0,267	6,463 ± 1,550
Tampão fosfato pH 7,4	6,890 ± 0,059	4,030 ± 0,090	5,306 ± 0,649

Os resultados obtidos mostram que ocorre um aumento na solubilidade da SSZ a medida que o pH do meio aumenta, isto deve-se principalmente ao seu caráter ácido. Os valores de solubilidade em H₂O e HCl 0,1N foram baixos, devido sua insolubilidade em água e no pH ácido do meio (DRESSMAN *et al.*, 2007). O uso do surfactante também aumentou a solubilidade da SSZ, por aumento da molhabilidade (MOSHARRAF *et al.*, 1995; AZARMI *et al.*, 2007). Observa-se também diferença na solubilidade entre os lotes D, H e P. Essa diferença de solubilidade mostra que os lotes dos três fornecedores possuem características diferentes.

Tabela 10 – Espectros de absorção no UV/Vis da SSZ para os diferentes meios de dissolução.

Meios de dissolução	λ máximo (nm)
Suco Gástrico (HCl 0,1N pH 1,2)	359
Suco Gástrico com enzima (pH 1,2)	359
H ₂ O	359
Tampão pH 5,8	359
Tampão pH 5,8 com Tween 80 0,3%	359
Tampão pH 5,8 com Tween 80 0,5%	359
Suco entérico (pH 6,8)	359
Suco entérico pH 6,8 com enzima	359
Tampão pH 7,4	456

Como pode ser observado, a medida que o pH dos meios torna-se mais alcalino, a SSZ fica mais ionizada e a solução fica com uma coloração amarela mais forte. Foi observado também um deslocamento batocrômico no comprimento de onda em 456 (tabela 10), com uma mudança na estrutura eletrônica nos estado associado ou dissociado, decorrente do grupamento do ácido carboxílico, que possui um pKa igual a 0,6. É importante a solubilização da SSZ no cólon em pH 7,4. Nesse local, ocorre a clivagem da ligação azo por azoreductases bacterianas, que libera, a sulfapiridina e o 5-ASA, com o último, sendo o responsável pela atividade antiinflamatória (SINKO, 2008; LIANG *et al.*, 2000; DAHAN *et al.*, 2010).

5.1.6 Cinzas sulfatadas

Os resultados encontrados estão dentro dos critérios de aceitação (USP, 2011c) de no máximo 0,5%. O fornecedor H apresentou maior valor de cinzas, indicando maior quantidade de sólidos inorgânicos metálicos (GIL, 2010), porém abaixo do limite especificado pela USP 34^a edição (Tabela 11).

Tabela 11 – Valor de cinzas sulfatadas (%) determinado para SSZ para os fornecedores D, H e P.

D	H	P
0,02	0,07	0,03

5.1.7 Pureza Cromatográfica

As condições cromatográficas foram as mesmas utilizadas na validação do método de teor, onde foi utilizado o detector de DAD (arranjo de fotodiodos).

Os espectros de absorção e os tempos de retenção, observados na figura 12, para o padrão e as amostras de SSZ obtidos para os fornecedores D, H e P (anexo 2), apresentam similaridade com o padrão e pureza cromatográfica igual a 1, o que significa que não existe outro composto co-eluído nas mesmas condições cromatográficas do teste.

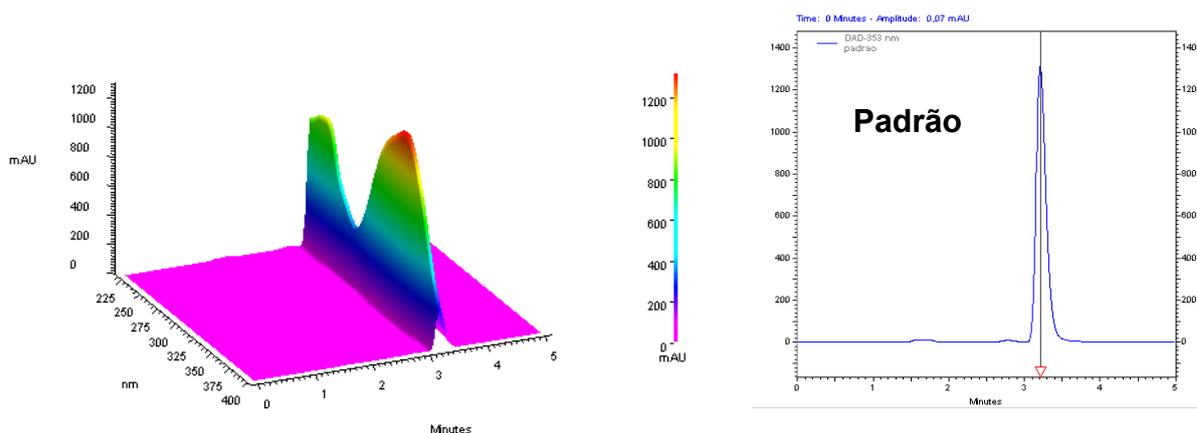


Figura 12 - Espectro de absorção do padrão Sigma (lote: 1450407) utilizando detector DAD.

5.1.8 Determinação do tamanho de partícula

As amostras de matéria-prima foram dispersas em água, considerando, que a SSZ é insolúvel nesse meio. Foi observado que, com esse dispersante

houve uma estabilização melhor do laser, permitindo leituras mais reprodutíveis. Durante as leituras, não houve precipitação, aglomeração, solubilização e/ou flutuação das partículas, devido a estabilização da intensidade do laser (laser obscuration) medido através do software do equipamento por sessenta segundos. A intensidade do laser obscuration é medida através de uma escala, onde o valor mínimo é 6%. Se a intensidade for menor que 6%, significa que a amostra pode estar decantando, solubilizando ou sobrenadando, mostrando que o dispersante utilizado não é o mais adequado para a análise (MALVERN, 2011). Os resultados estão apresentados na tabela 12 a seguir:

Tabela 12 - distribuição do tamanho das partículas (μm) das matérias-primas D, H e P.

Distribuição	D (μm)	H (μm)	P (μm)
D₅₀	4,94	6,68	4,67
D₁₀	1,13	1,28	1,12
D₉₀	33,05	89,51	69,03
span	32,82	89,32	14,54

Nota: $span = D_{90} - D_{10} / D_{50}$

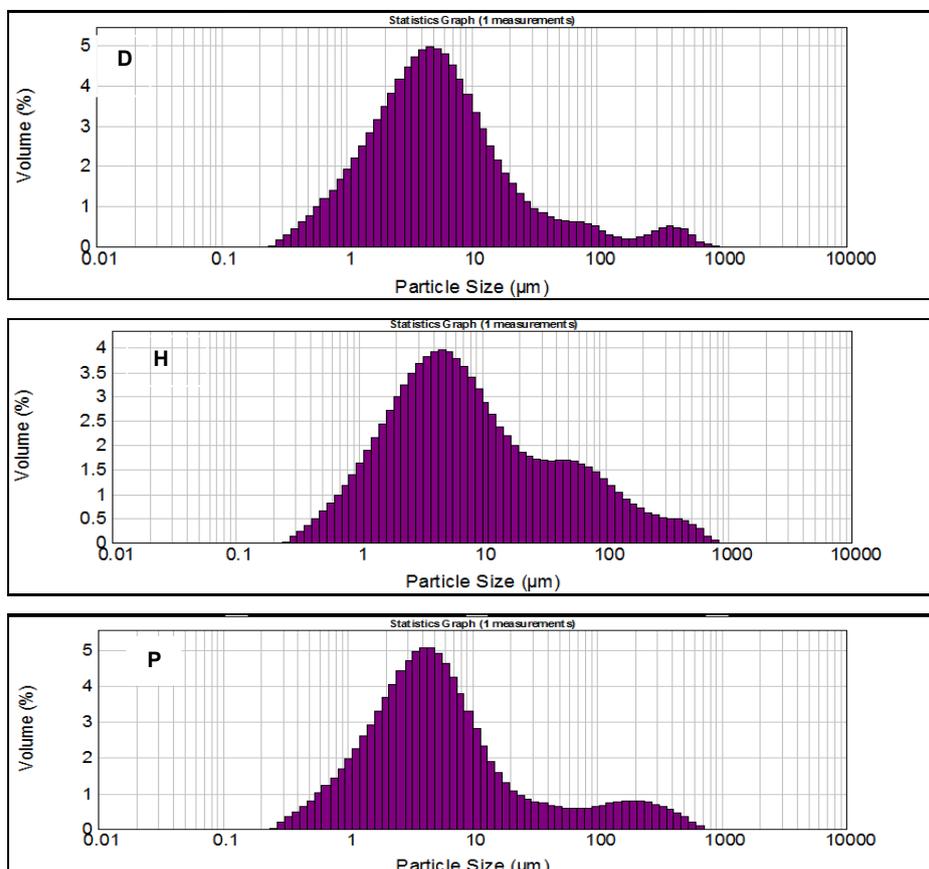


Figura 13 – Distribuição gráfica do tamanho de partícula para SSZ fornecedor D, H e P.

Como podemos observar nos gráficos de distribuição de tamanho de partícula, na figura 13 acima, todas as amostras existe uma pequena proporção de partículas até 1000 μm , o que nos sugere que esse parâmetro não é controlado pelos fornecedores da matéria-prima, obtendo assim, uma baixa uniformidade no tamanho da partícula. O maior número de partículas para o fornecedor D e P está em torno de 5 μm e para o fornecedor H , 6 μm . São lotes que diferem entre si em tamanho de partícula e índice de polidispersividade (*span*) elevados. Os três lotes são micronizados, possivelmente tamanhos maiores de partículas podem ser devido a presença de aglomerados (JUNYAPRASERT *et al.*, 2008).

5.1.9 Presença de Polimorfismo

5.1.9.1 DRX (Difração por raio X)

A difração de Raio X foi realizada e os resultados estão demonstrados na figura 14 a seguir:

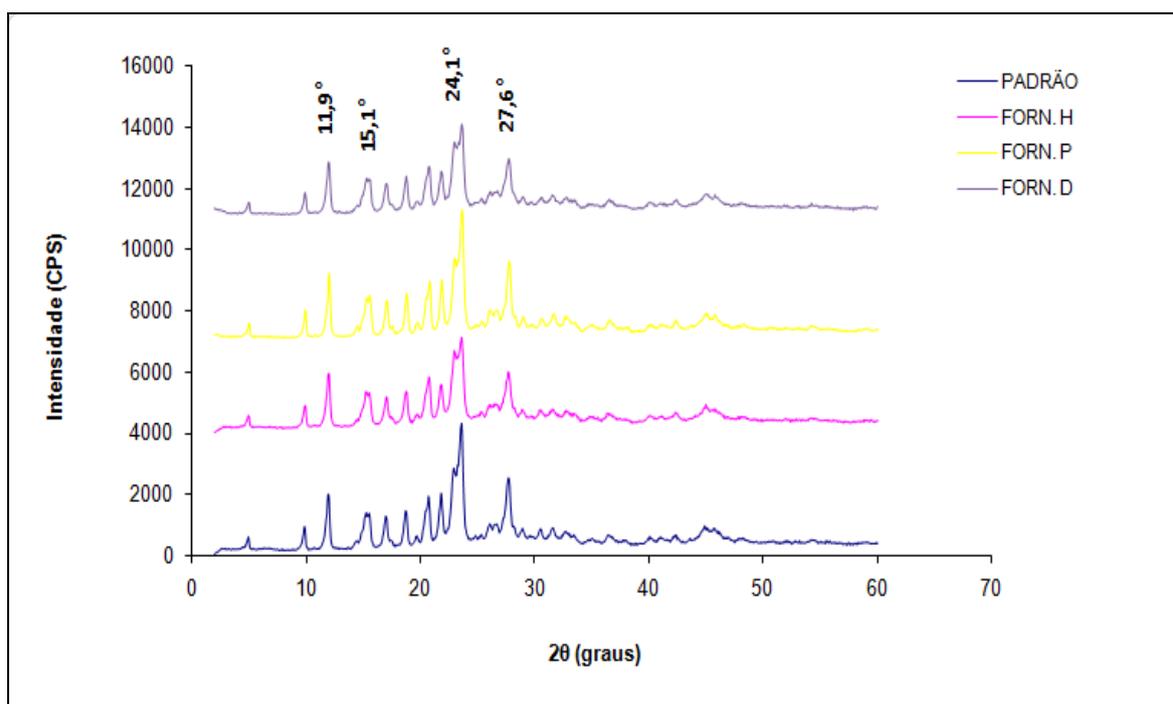


Figura 14 - Difratogramas dos lotes de SSZ dos fornecedores H (lote: 090702) e P (lote: 20071214), D (lote: 20090712) e padrão Sigma (lote: 1450407).

A utilização do DRX na análise das amostras de H, P e D evidenciaram que as substâncias possuem padrões de DRX únicos e semelhantes ao padrão Sigma (figura 14), com estrutura cristalina bem definida e com sinais característicos em 11,9°, 15,1°, 24,1° e 27,6° para os três lotes estudados. Na literatura não estão descritos polimorfos para a sulfassalazina. Entretanto podemos observar uma variação na intensidade dos picos do fornecedor H e D. A alteração na intensidade dos picos, está relacionada com a estrutura organizacional dos cristais, quanto melhor organizado, maior é a intensidade (SILVA, 2010) e ao preparo das amostras.

5.1.9.2 Ponto de fusão

A tabela 13 mostra os resultados obtidos de ponto de fusão para os fornecedores D, H e P.

Tabela 13 – Valores de ponto fusão (°C) encontrados para as amostras de SSZ dos fornecedores D, H, e P (n = 3).

Amostra	ponto de fusão (°C)
Padrão	251,0 ± 0,28%
D	250,1 ± 0,18%
H	251,0 ± 0,14%
P	250,1 ± 0,05%

O ponto de fusão de um sólido cristalino é a temperatura na qual o sólido começa a se tornar líquido sob a pressão de uma atmosfera. Compostos orgânicos cristalinos, se puros, têm o ponto de fusão bem definido, apresentando um pequeno intervalo. A presença de impurezas miscíveis ou parcialmente miscíveis faz com que essa diferença entre a primeira formação do líquido e a fusão total aumente bastante, causando o início do ponto de fusão a uma temperatura mais baixa. O ponto de fusão é usado como um ensaio preliminar para avaliar o grau de pureza de um composto, ou ajudar na sua identificação através de valores de pontos de fusão publicados em compêndios oficiais ou de substâncias químicas de referência (GIL, 2010).

O ponto de fusão declarado na literatura para sulfassalazina é de 240 a 245°C com decomposição (MERCK INDEX, 2001). Os valores encontrados de ponto de fusão para as amostras dos três fornecedores e também para o padrão foram maiores do que os da literatura. Considerando que polimorfos possuem arranjos moleculares diferentes, pois possuem ligações intermoleculares com diferentes forças, a temperatura de fusão para esses arranjos também será diferente, portanto polimorfos possuem pontos de fusão diferentes (SINKO, 2008). Os resultados acima, demonstraram que o ponto de fusão foi semelhante para o padrão e, para as amostras, portanto, apresentaram arranjo cristalino semelhantes entre elas.

5.1.9.3 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A figura 15 mostra os gráficos obtidos de DSC para os fornecedores D, H e P e o padrão Sigma.

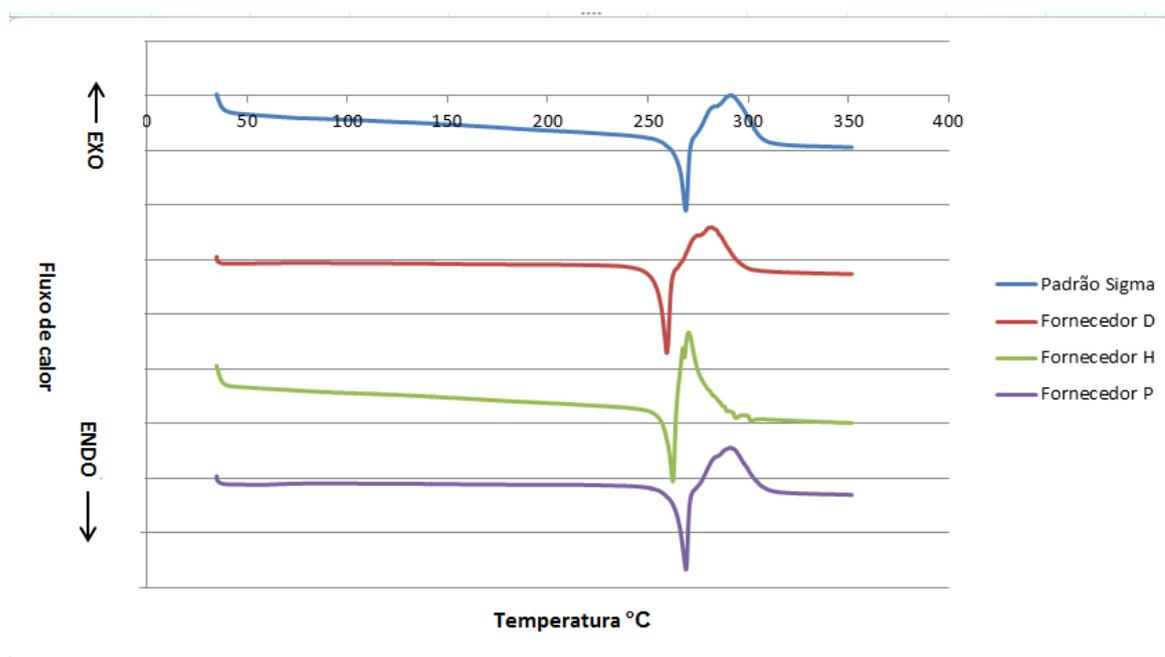


Figura 15 : Gráficos de DSC dos lotes de SSZ dos fornecedores H (lote: 090702), P (lote: 20071214), D (lote: 20090712) e padrão Sigma (lote: 1450407).

A curva de DSC é usada para medir a capacidade calorífica de uma substância comparando com uma substância padrão, e é uma propriedade termofísica muito importante para as substâncias. A DSC pode ser definida como uma técnica que mede as diferenças de temperatura e o fluxo de calor associado com as transições dos materiais em função da temperatura e tempo (MOTHÉ, 2009). O primeiro evento e único refere-se a fusão das amostras que ocorre em 259,88°C para o padrão sigma, e 259,34°C, 260,17°C e 259,56°C para os fornecedores D, H e P, respectivamente. Nesse estágio, a amostra passa de um estado rígido para uma estrutura mais flexível, característico de um evento endotérmico e a sua mobilidade permite aliviar a tensão. Não foi observado outro evento em temperatura diferente em nenhuma das curvas dos três fornecedores avaliados, o que caracteriza que temos a sulfasalazina sem a presença de polimorfo para os fornecedores avaliados. O próximo evento, é um pico exotérmico, decorrente da decomposição da amostra. Não foi encontrado NA literatura polimorfismo descrito para a SSZ determinado pela técnica de DSC. Curvas de DSC da SSZ apresentam temperatura de fusão (T_m) de 255°C (LAMPRECHT *et al.*, 2000).

Na caracterização das matérias-primas D, H e P, observou-se através da determinação do teor, que todas apresentaram valores acima de 99%, que foi

comprovado através da pureza cromatográfica (HÖRTER *et al.*, 2001). Várias propriedades físico-químicas estão relacionados a solubilidade do fármaco, incluindo, polimorfismo, presença de solvatos ou hidratos e tamanho de partícula (SINGHAL *et al.*, 2004; CLARYSSE *et al.*, 2011). De acordo com os resultados, as matérias-primas D, H e P apresentam-se na sua forma cristalina, que foi evidenciado através da estabilidade termodinâmica das curvas de DSC.

5.1.10 Discussão geral sobre a caracterização das matérias-primas

Os gráficos de DRX e DSC demonstraram ausência de polimorfismo para a SSZ dos fornecedores D, H e P. O DRX também possibilitou a confirmação da pureza e a identificação de formas anidras da SSZ, por meio da análise comparativa dos padrões de difração do raio X entre as amostras e o padrão, que apresentaram similaridade entre os picos. Caso fosse observado diferenças entre as amostras analisadas, observaria intensidade e formas de linhas de difração diferentes entre padrão e amostras.

Um outro importante fator determinante para a avaliação da solubilidade do fármaco é o tamanho de partícula. A taxa de dissolução é diretamente proporcional a área superficial do fármaco, que se torna maior, com a diminuição do tamanho da partícula. Partículas em torno de 3 – 5 μm são estratégias favoráveis para o aumento da solubilidade. O tamanho e forma de partículas também são responsáveis por diferenças de solubilidades entre os meios (CLARYSSE *et al.*, 2011). Foi observado, que houve diferença de solubilidade entre os fornecedores D, H e P nos meios H_2O , tampão fosfato pH 5,8, tampão fosfato pH 6,8 e suco entérico com pancreatina. Esta diferença está relacionada às diferenças observadas na distribuição do tamanho de partículas para os três lotes com valores de *span* elevados, como mostrado na tabela 12. Como a área superficial efetiva depende da habilidade do meio em molhar a superfície da partícula, valores diferentes de solubilidade entre os fornecedores está relacionado ao efeito de aglomeração das partículas, ocasionado pela micronização das matérias-primas, que resultou na diminuição da área superficial, diminuindo a solubilidade (HÖRTER *et al.*, 2001; HUANG *et al.*, 2004). O uso de surfactantes nos meios tampão fosfato pH 5,8 poli 80 0,3% e tampão fosfato pH

5,8 poli 80 0,5% ajudaram na molhabilidade do fármaco, melhorando consideravelmente a solubilidade da SSZ nesses meios (DRESSMAN *et al.*, 2007).

5.2 ESCOLHA DO AGENTE SUSPENSOR

Foram feitas soluções de CMC nas concentrações de 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,5% e 0,7% e a viscosidade determinada. A temperatura durante as leituras de viscosidade foi mantida em 23°C. De acordo com a literatura, a concentração máxima de CMC para formulações de uso oral é de 1,0% (WADE, 1994).

Tabela 14 – Valores de viscosidade em centipoise (cps) determinados em viscosímetro Brookfield Spindle 2 velocidade 30 série LV (fator = 10).

Concentração CMC	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	Média	Desvio Padrão	DPR
0,1	35	35	35	35	0	0
0,2	95	95	95	95	0	0
0,3	150	150	150	150	0	0
0,5	355	350	350	352	2,89	0,82
0,7	905	905	905	905	0	0

A figura 16 mostra que houve um acréscimo considerável da viscosidade da solução de CMC da concentração de 0,3 para 0,5% e a concentração de 0,7% apresentou-se muito viscosa, sendo desaconselhável seu uso na formulação, visto que, pode ocasionar problema na administração da suspensão. O aumento da viscosidade da fase dispersante pode conduzir uma tendência das partículas sólidas se aglomerarem, formando *caking*. Dessa forma, devemos considerar que o aumento da viscosidade constitui o processo mais utilizado para reduzir a sedimentação, porém pode influenciar no escoamento do líquido (PRISTA, 2008).

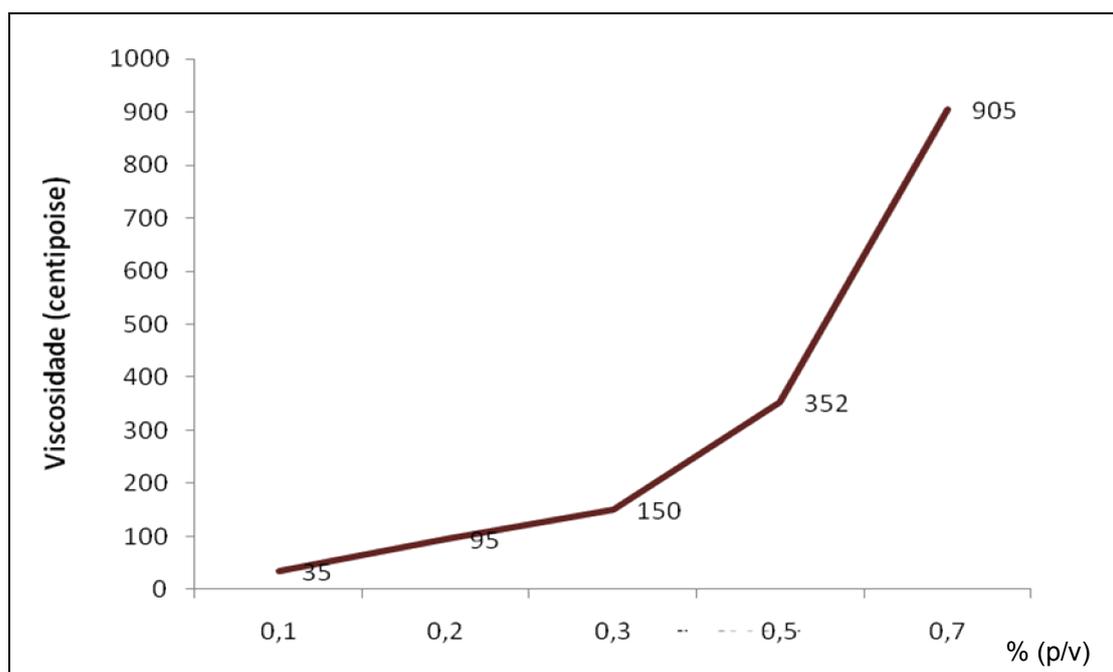


Figura 16 – Valores de viscosidade (cps) obtidos em soluções de CMC à 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,5% e 0,7% (p/v).

A SSZ foi resuspendida nas concentrações de CMC acima e o volume de sedimentação medido por um período de 72 horas, a fim de escolhermos a melhor concentração de CMC para a suspensão de sulfassalazina. Os resultados estão demonstrados na tabela 15:

Tabela 15 – Volume de sedimentação (F) obtido em SSZ resuspendida em CMC nas concentrações de 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,5% e 0,7%, considerando volume inicial (HI = 25 cm).

Tempo (horas)	0,1%		0,2%		0,3%		0,5%		0,7%	
	Hs	Hs/HI								
2	24,00	0,96	25,00	1,00	25,00	1,00	25,00	1,00	25,00	1,00
4	23,00	0,92	24,50	0,98	25,00	1,00	25,00	1,00	25,00	1,00
6	21,75	0,87	24,00	0,96	24,75	0,99	25,00	1,00	25,00	1,00
21	16,00	0,64	21,00	0,84	23,00	0,92	24,50	0,98	25,00	1,00
24	15,00	0,60	19,50	0,78	22,50	0,90	24,50	0,98	25,00	1,00
48	7,00	0,28	16,00	0,64	19,50	0,78	23,50	0,94	24,90	1,00
72	4,00	0,16	11,00	0,44	16,00	0,64	23,00	0,92	24,50	0,98

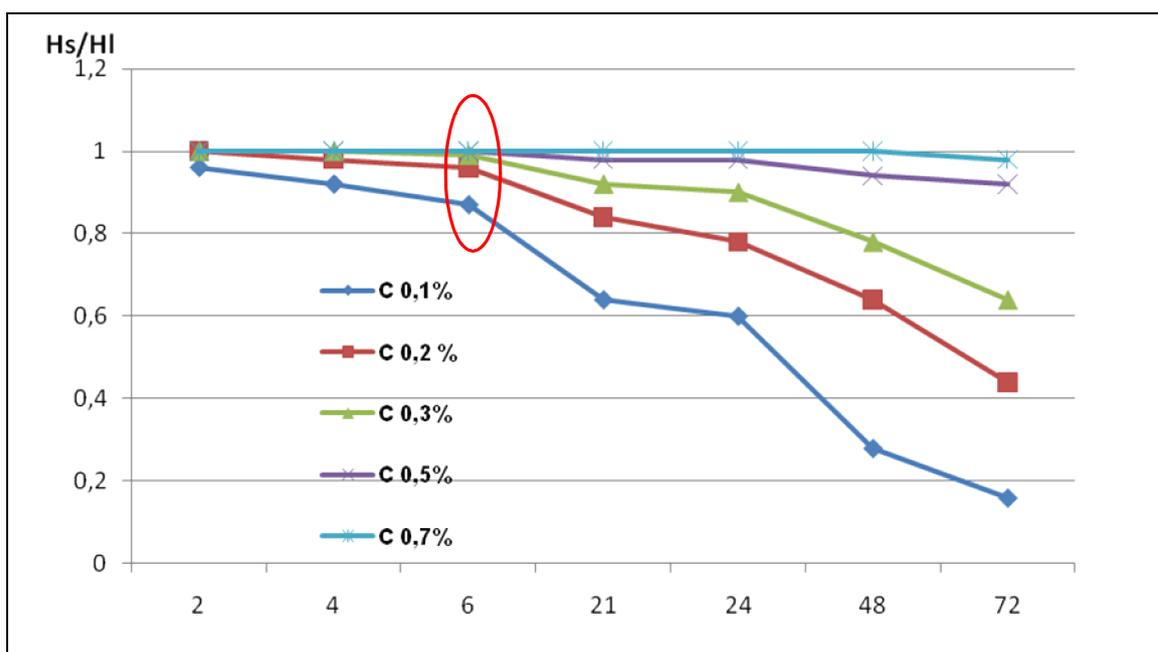


Figura 17 – Volume de sedimentação (F) de SSZ resuspendida em CMC nas concentrações de 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,5% e 0,7% após 72 horas.

Pelos resultados expostos na figura 17, o volume de sedimento obtido foi sempre menor que o volume de sedimento inicial ($V = 25 \text{ cm}$), isto significa que o volume máximo de sedimento é menor do que o volume original da suspensão. Os valores de F iguais a 1 ou próximos a 1 são os mais farmacologicamente aceitáveis, visto que o produto não deve ser muito viscoso, de modo a dificultar a administração da dose, ou seja, o produto deve fluir livremente pelo recipiente (SINKO, 2008). De acordo com os resultados acima, escolhemos a concentração de 0,3% que apresentou sedimentação lenta da SSZ durante um período de 6 horas, considerando que o produto deve ser sempre agitado antes de sua administração.

Foram preparadas três suspensões de SSZ na concentração de 250 mg/5 mL utilizando matéria-prima dos fornecedores D, H e P. Foi utilizado o pó micronizado para esse fim e o volume de sedimentação foi acompanhado durante 192 horas. A suspensão foi preparada de acordo com o fluxograma mostrado na figura 6 (Material e Métodos).

Tabela 16 – Volume de sedimentação (F) obtido nas suspensões de SSZ 250 mg/5 mL para os três fornecedores , D, H e P.

Tempo (horas)	D	H	P
6	1,00	1,00	1,00
12	0,98	0,96	0,99
17	0,94	0,90	0,95
21	0,93	0,88	0,94
38	0,84	0,71	0,86
48	0,80	0,66	0,83
72	0,72	0,52	0,76
96	0,60	0,34	0,66
192	0,25	0,05	0,35

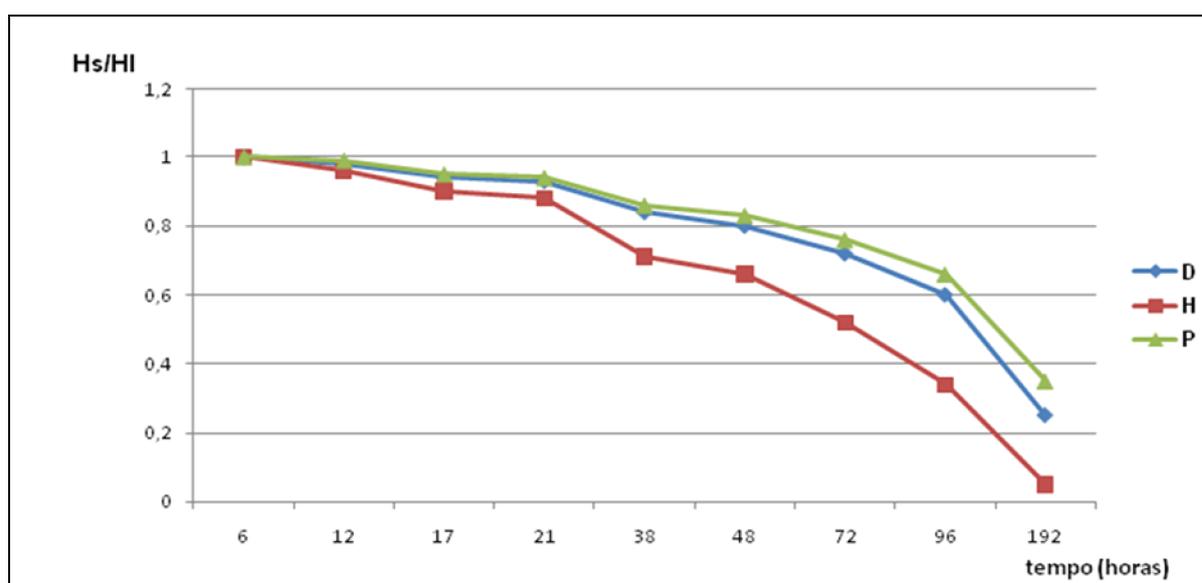


Figura 18 – Grau de flocação (F) das suspensões de sulfassalazina 250 mg/5 mL fabricadas com SSZ de três fornecedores diferentes.

De acordo com os resultados (tabela 16 e figura 18), as três suspensões apresentaram nas doze primeiras horas, valores de volume de sedimentação (F) próximo a 1. Pelo aspecto do gráfico mostrado na figura 22, as suspensões têm comportamento defloculada, pois formaram sedimento mais lentamente, porém, quando agitado por dois minutos apresentaram boa redispersibilidade. Vários fatores podem contribuir para a sedimentação da suspensão, dentre eles, o principal é o tamanho da partícula. A suspensão preparada com a amostra do fornecedor H foi a que sedimentou mais rapidamente em relação aos demais fornecedores e que apresentou o maior valor de span (tabela 12). A figura 19,

mostra o aspecto das suspensões após oito dias em repouso onde foi possível, observar um sedimento após longo período de armazenamento e um sobrenadante com coloração amarelado turvo da suspensão, caracterizando a sedimentação como lenta, característico de sistemas defloculados. O sedimento apresentou boa redispersão quando agitado por dois minutos (AULTON, 2005; PRISTA, 2008).

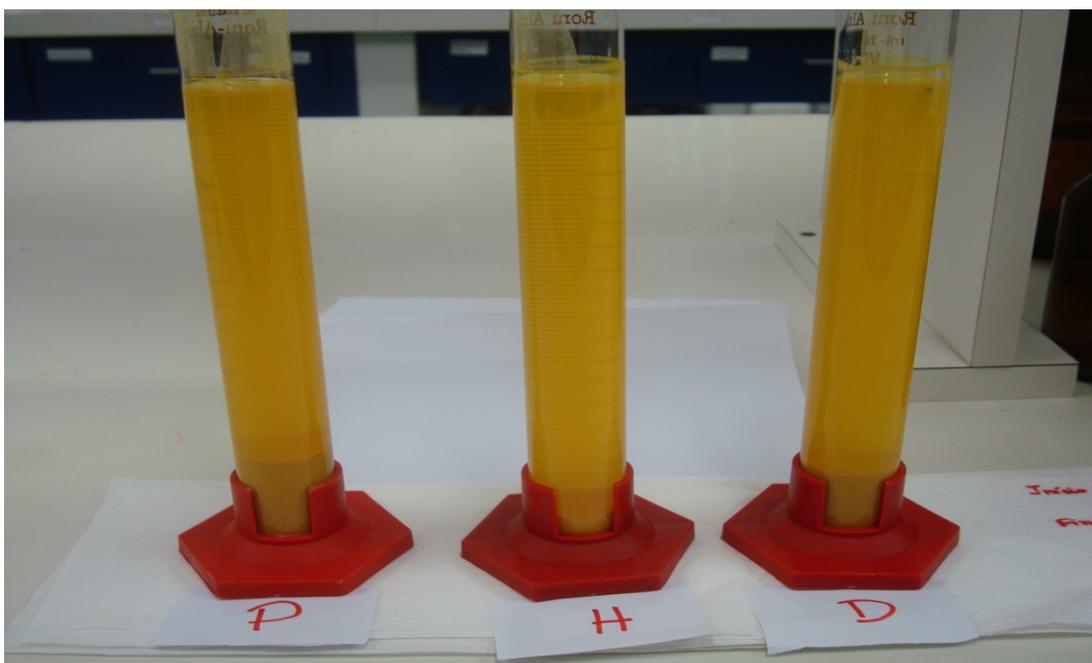


Figura 19 – Aspecto das suspensões D, H e P após 192 horas (8 dias) de preparo.

Alguns fatores são importantes no momento de escolher uma agente suspensor, como incompatibilidade com o princípio ativo, facilidade na preparação, facilidade na obtenção comercial, custo e temperatura de estabilidade (PRISTA, 2008; ANSEL, 2007). A suspensão produzida pela empresa Rosemont Pharmaceuticals - Salazopyrin® contém em sua lista de excipientes, a ácido cítrico monohidratado, citrato de sódio, benzoato de sódio, acesulfame K, polissorbato 80, goma xantana, óleo de limão e flavorizante tangerina/laranja (disponível em www.rosemontpharma.sulfasalazine). A suspensão preparada no LADEG (Laboratório de Desenvolvimento Galênico), usou como agente suspensor a CMC (Pharma Special) de alta viscosidade (solução 1% p/v - 1000 – 1500 cps). Outras opções de agentes suspensores,

como a goma xantana e o alginato de sódio também foram levados em consideração para o preparo da suspensão.

Segundo Handbook of Excipients, a goma xantana é um heteropolissacarídeo de alto peso molecular produzido a partir da fermentação aeróbica de cultura de *Xanthomonas campestris*. Apresenta boa solubilidade em água fria (AULTON, 2005), a viscosidade da solução à 1% é de 1200 a 1600 Cp à 25°C e é estável entre pH 3-12. Soluções de goma xantana com concentração menor que 1% podem ter a viscosidade afetada pelo aumento da temperatura ambiente, podendo ser utilizada na concentração máxima de 2%. Inicialmente, foi planejado o preparo de uma suspensão mais próxima possível da Salazopyrin®, usando a goma xantana como agente suspensor, porém houve dificuldade de adquirirmos goma xantana dentre os fornecedores de matéria-prima da Farmácia Universitária da UFRJ.

O alginato de sódio, uma outra opção para os agentes suspensores, consiste em um material higroscópico, estável em temperatura ambiente e baixa umidade relativa. Soluções aquosas são estáveis em pH de 4 a 10 e apresentam viscosidade de 20-400 cps (solução aquosa à 1%p/v). O alginato de sódio é um bom meio de cultura, facilitando o crescimento de microorganismos, por isso, é recomendado adicionar conservantes para aumentar a estabilidade das soluções aquosas, porém a alta concentração de conservantes, pode levar a um sabor desagradável nas formulações (PRISTA, 2008).

Tanto o alginato de sódio quanto a goma xantana, foram de difícil aquisição e apresentaram custo mais elevado do que a CMC. O alginato de sódio foi descartado devido sua baixa estabilidade a temperaturas mais elevadas e o risco de contaminação, enquanto a goma xantana, devido ao custo elevado e a dificuldade de aquisição.

A carboximetilcelulose sódica é o agente suspensor usado na maioria das suspensões produzidas pela Farmácia Universitária e é de fácil aquisição e baixo custo. A suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL é uma formulação inédita no mercado brasileiro, usando como agente suspensor a CMC.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DA SUSPENSÃO DE SSZ 250 mg/5 mL

5.3.1 Determinação do tamanho de partícula das suspensões

As leituras de tamanho de partículas foram realizadas no próprio placebo da suspensão. Porém, houve uma variação considerável na estabilidade do laser. Desta forma, a análise foi repetida usando água e ácido clorídrico 0,1N para avaliar o melhor dispersante para as suspensões. A instabilidade do sistema pode ter sido ocasionada pela possível aglomeração ou solubilidade das partículas menores no meio.

Tabela 17 - Distribuição do tamanho das partículas (μm) das suspensões D, H e P.

Distribuição	D (μm)	H (μm)	P (μm)
D₅₀	4,22	10,92	11,97
D₁₀	1,15	1,92	2,06
D₉₀	9,56	22,72	390,3
Span	9,28	1,90	32,43

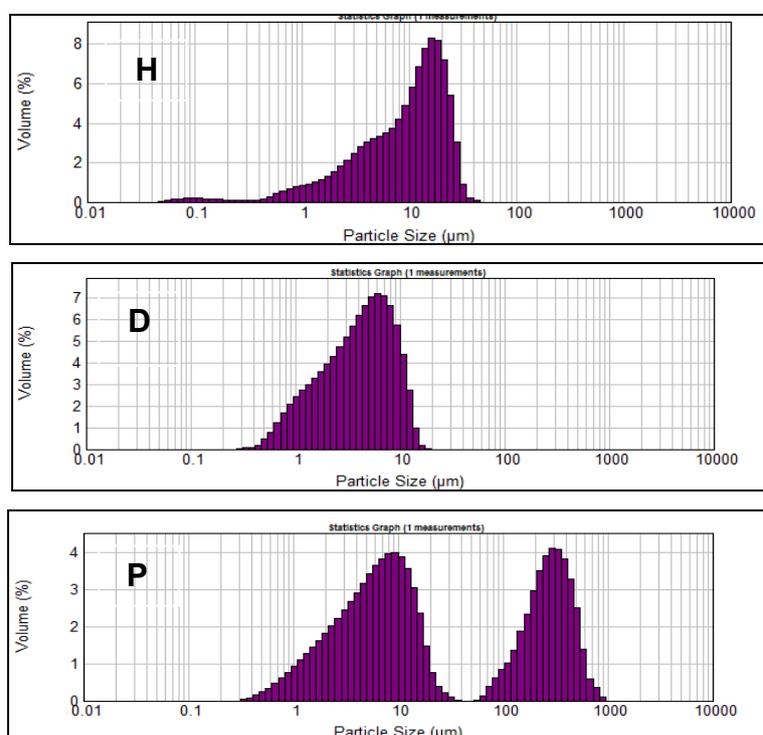


Figura 20 – Gráficos de distribuição do tamanho das partículas para suspensões dos fornecedores D, H e P, usando como dispersante placebo.

O tamanho das partículas das suspensões foi realizado com as suspensões já preparadas há quatro meses. Devido ao tempo que as suspensões já estavam preparadas, pode ter ocorrido aglomeração das partículas, principalmente para o fornecedor P. Conforme pode ser observado na figura 20, foram encontrados dois picos com máximos em torno de 9 μm e outro com máximo em torno de 300 μm . Várias hipóteses podem ser levadas em consideração para obtermos melhores resultados:

1. As amostras devem ser levadas em banho-ultrasônico antes da leitura;
2. O dispersante pode ter proporcionado alguma solubilidade das partículas menores;
3. Baixa homogeneização das amostras;
4. Suspensão preparada por cerca de 4 meses, com presença de aglomerados.

Dessa forma, esse experimento foi repetido, com solução recentemente preparada.

A análise foi repetida, usando como dispersante a solução de HCl 0,1N. As amostras foram deixadas por 15 minutos no banho ultrasônico e em seguida a leitura foi realizada. Os resultados estão apresentados na tabela 18 abaixo:

Tabela 18 - distribuição do tamanho das partículas (μm) das suspensões D, H e P, usando como dispersante solução de HCl 0,1N.

Distribuição	D (μm)	H (μm)	P (μm)
D₅₀	2,92	2,30	3,97
D₁₀	0,96	0,94	1,41
D₉₀	12,27	6,43	11,74
span	3,87	2,38	2,60

$$span = D_{90} - D_{10} / D_{50}$$

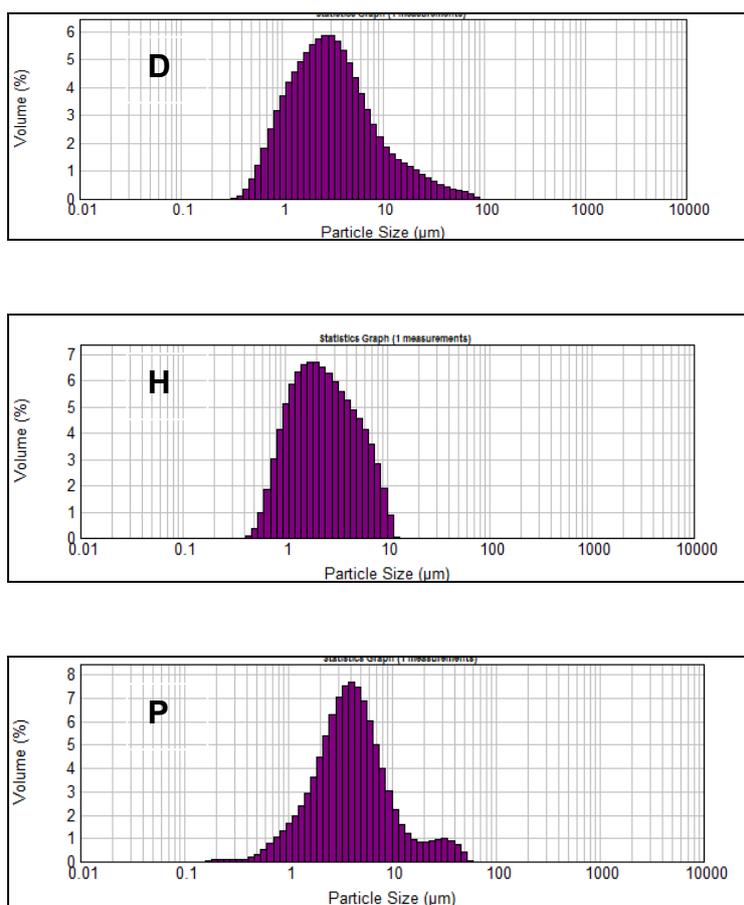


Figura 21 – Gráficos de distribuição do tamanho das partículas para suspensões dos fornecedores D, H e P, usando dispersante solução de HCl 0,1N.

A solução de HCl 0,1N foi um bom dispersante para a suspensão de SSZ, pois a estabilidade da intensidade do laser foi maior para esse dispersante, não foi observado solubilização, flutuação ou decantação das partículas nesse meio e a intensidade do laser durante as leituras permaneceu constante. Os gráficos obtidos para as amostras D, H e P é a média obtida de três leituras consecutivas realizadas automaticamente pelo software Malvern (Hidro 2000, versão 5.60). Os resultados apresentados na tabela 18, mostram que o *span* obtido para as três suspensões foi menor que o obtido para as matérias-primas. O único processo físico de homogeneização foi a trituração do pó com o tensoativo em gral de porcelana, reduzindo assim, o tamanho das partículas e melhorando sua distribuição.

5.3.2 Microscopia ótica das suspensões

Para avaliar melhor a qualidade das suspensões, foi utilizado um microscópio ótico para visualizar as partículas dispersas. As figuras 22, 23 e 24 mostram as fotos obtidas para as três suspensões preparadas:

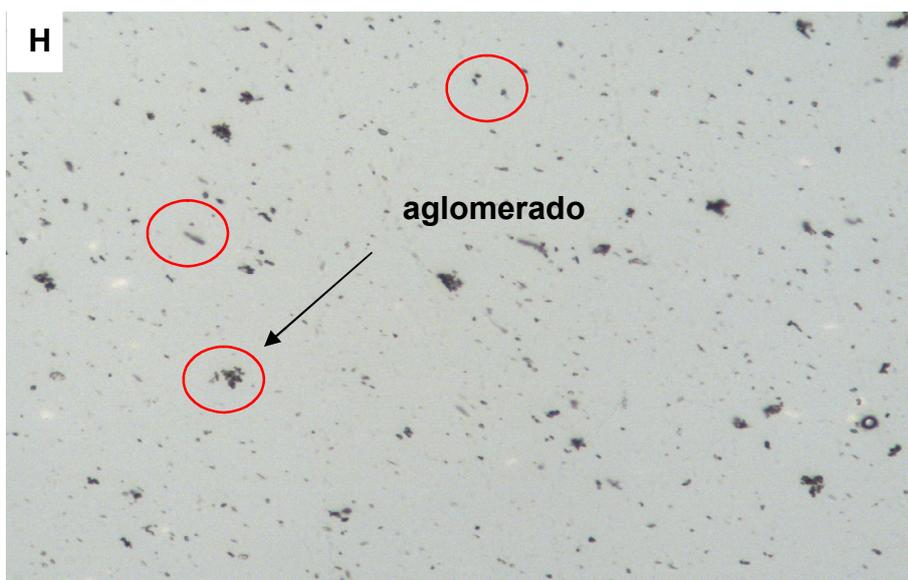


Figura 22 - Microscopia ótica da suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL , fornecedor H, (aumentada 20x).



Figura 23 - Microscopia ótica da suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL , fornecedor D, (aumentada 20x).



Figura 24 – Microscopia ótica da suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL , fornecedor P, (aumentada 20x).

A microscopia ótica das suspensões H, P e D mostra que existem partículas de diferentes tamanhos e formas, além de aglomerados. Foi observado partículas em formas de agulhas, oblongas e esféricas. Essa diferença de tamanho e forma das partículas está diretamente relacionada com o perfil de dissolução das suspensões, visto que a taxa de dissolução está diretamente relacionada com a área superficial e o tamanho das partículas. Estudos mostraram que uma redução do tamanho das partículas provoca um aumento na taxa de dissolução, pois reduz a espessura da camada de difusão ao redor da partícula. A forma da partícula também está relacionada com o decréscimo ou acréscimo da taxa de dissolução, pois partículas com alto grau de irregularidade (longas, oblongas), causam um aumento na camada de difusão, aumentando a taxa de dissolução (MOSHARRAF *et al*, 1995)

5.3.3 Densidade, pH e Viscosidade

Os valores de densidade, pH e viscosidade das suspensões D, H e P estão apresentadas na tabela 19. A temperatura de determinação da densidade foi de 20,3°C.

Tabela 19 – Valores de pH, densidade e viscosidade de SSZ 250 mg/5 mL de três fornecedores D, H e P.

Parâmetros	D	H	P
Densidade (g/mL)	1,0205	1,0185	1,0218
pH	5,25	5,32	5,20
Viscosidade (cps)	70	70	75

5.3.4 Potencial Zeta ζ

Os valores obtidos de Potencial Zeta ζ medido para as três suspensões estão expostos na tabela 20.

Tabela 20 – Valores de potencial zeta (média de 6 medições em mV \pm dp) obtido para as três suspensões de SSZ dos fornecedores D, H e P.

Amostra	Potencial Zeta (ζ)
D	- 39,15 \pm 2,25
H	- 47,83 \pm 1,04
P	- 46,03 \pm 2,86

De acordo com os resultados acima todas as suspensões apresentaram resultados negativos de potencial zeta, mostrando que as forças de repulsão (carga negativa) estão predominando frente às forças de atração (positiva). Esse comportamento é farmacologicamente desejável para a estabilidade das suspensões, pois caracteriza suspensões defloculadas (AULTON, 2005; MIKULÁSEK *et al.*, 1997).

Haines e Martin mostraram que o volume de sedimentação e o potencial zeta fornecem dados sobre a floculação ou a tendência de formar *caking* de uma suspensão. Quando existe a predominância de carga negativa, o volume de sedimentação (Hs/HI) é alto, diminuindo a floculação, mas com tendência de formar aglomerados. O valor de F permanece estável enquanto a floculação persistir; a medida que o valor de F diminui, significa que o potencial zeta está se tornando negativo, induzindo uma defloculação (PRISTA, 2008; SINKO, 2008). Os aglomerados visualizados na microscopia ótica das suspensões possibilitaram uma lenta sedimentação das suspensões, confirmados pelo potencial zeta negativo e o volume de sedimentação elevado nas primeiras quinze horas. A

redução do tamanho das partículas pela ação mecânica da trituração foi também um fator que induziu esse comportamento (JUNIAPRASERT *et al.*,2008).

5.4 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE DOSEAMENTO DE SSZ POR UV/Vis

5.4.1 Seletividade e especificidade

Comparando ambos os espectros de absorção foi observado que não houve interferência dos excipientes usados na suspensão e desta forma, a especificidade e seletividade do método foram comprovadas, conforme mostrado na figura 25.

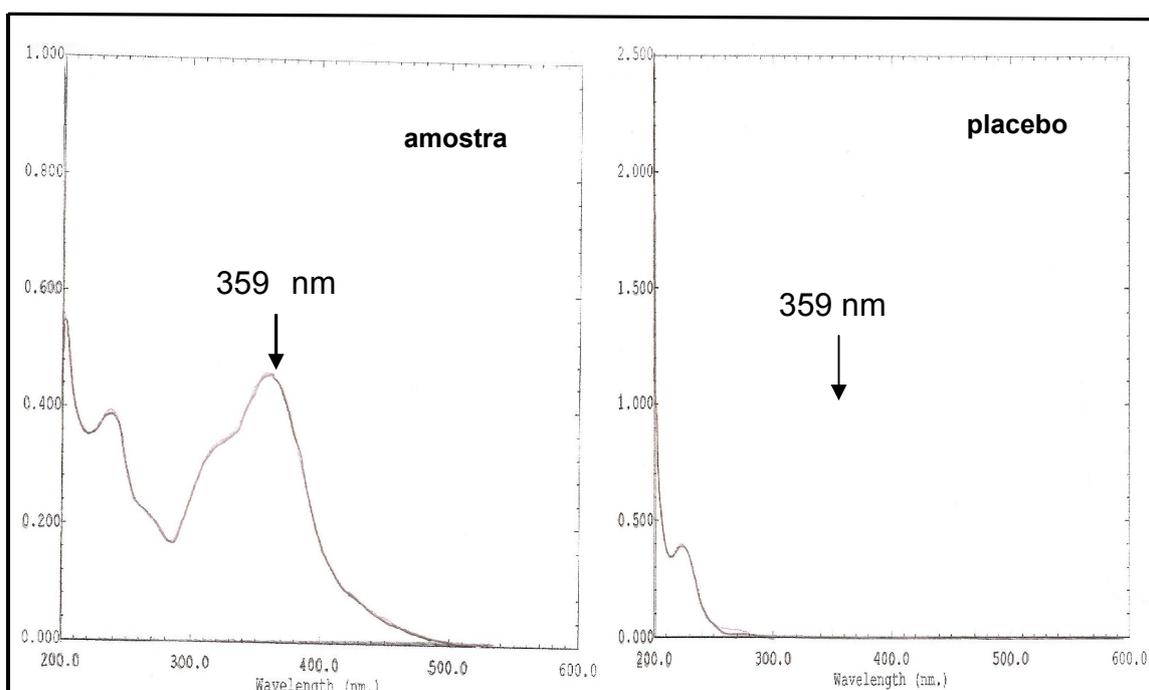


Figura 25 – Espectro de absorção no UV/Vis da amostra de suspensão de SSZ em solução de NaOH 0,1N e do placebo nas mesmas condições.

5.4.2 Linearidade

As curvas padrão médias da absorbância (A) versus concentração (mg/mL) estão apresentadas na figura 26:

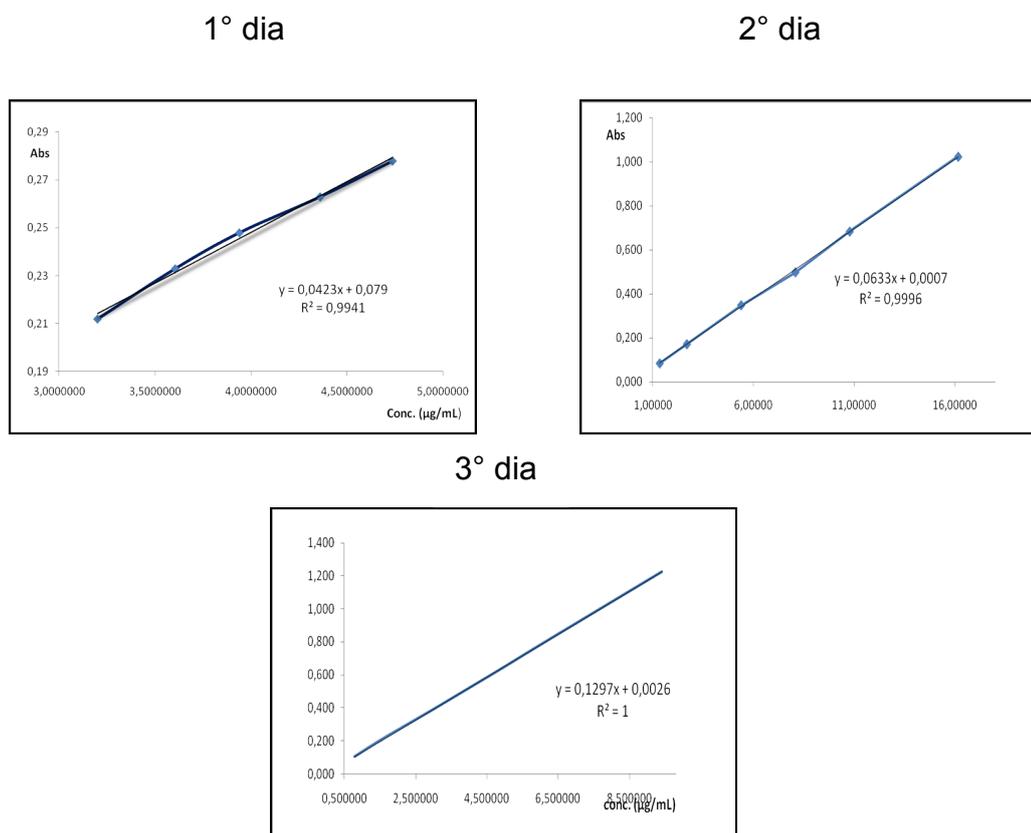


Figura 26 – Curvas padrão médias – linearidade do método espectrofotométrico.

A linearidade foi comprovada, pois o coeficiente de correlação de ambas as curvas padrão foi maior que 0,99, estando dentro do critério de aceitação da resolução da ANVISA (BRASIL, 2003).

As três curvas de calibração apresentaram coeficiente de correlação próximo a 1, mostrando-se lineares. A análise da variância (ANOVA) nos permite avaliar a linearidade do método e a validade da regressão (POLONINI *et al.*, 2011). O teste F considera a relação de variâncias de amostras, ou seja, a relação dos quadrados dos desvios padrão (GIL, 2010). Através do teste F é possível confirmar o modelo linear da curva, considerando a hipótese de que o coeficiente angular da curva seja diferente de zero, o valor de F calculado deve ser maior que o F crítico ou de significação. Nesse caso, o valor encontrado para F calculado foi de 5597,4 e o F de significação ou crítico igual a $1,61 \times 10^{-18}$, confirmando assim, a regressão nas três curvas de calibração. Neste caso, pode-se afirmar, com 95% de confiança, que o modelo é linear e que a inclinação da reta não é nula. Os dados obtidos da análise da variância das curvas de calibração, estão mostrados na tabela 21 a seguir.

Tabela 21: Confirmação da linearidade pelo método espectrofotométrico por ANOVA.

ANOVA					
Parâmetros ANOVA	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	0,000157371	0,000157371	5597,44	$1,61888 \cdot 10^{-18}$
Resíduo	13	$3,6549 \cdot 10^{-7}$	$2,81149 \cdot 10^{-8}$		
Total	14	0,0001577			

Nota: gl = graus de liberdade; SQ = soma quadrática; MQ = média quadrática; F = F calculado; E = exponencial

Os valores encontrados de limite inferior de detecção (LD) e limite inferior de quantificação (LQ) foram determinados: $1,05 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $3,50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente. Para a categoria I (BRASIL, 2003), esses parâmetros não são previstos, porém foram calculados adicionalmente para o método espectrofotométrico.

Tabela 22: Dados para o cálculo do intervalo de confiança do intercepto (b) e da inclinação da curva (a) dos coeficientes da reta.

Dados da curva	Coefficientes	95% inferiores	95% superiores
Intersecção (b)	$6,27984 \cdot 10^{-5}$	-0,000117053	0,00242649
Variável x 1 (a)	0,015432156	0,0014986541	0,015877771

Os coeficientes da reta e os seus valores máximo e mínimo para um nível de significância (α) igual a 0,05 (95% grau de confiança) foram usados no cálculo dos intervalos de confiança para os coeficientes da reta (tabela 22).

Um resumo dos valores encontrados para o coeficiente angular (a), linear (b) e o R^2 e seus respectivos erros padrão estão mostrados na tabela 23.

A linearidade foi comprovada, com baixos valores de erro padrão e coeficiente de correlação maior que 0,99 para as três curvas padrão, mostrando uma baixa dispersão dos dados (RIBANI *et al.*, 2004; POLONONI *et al.*, 2011; BRASIL, 2003; ABNT, 2000).

Tabela 23: Estatística da regressão do método espectrofotométrico de determinação do teor.

Linearidade método espectrofotométrico para ensaio de teor			
Dados da regressão			
Coeficiente angular (a)	0,0423	0,0633	0,1297
Coeficiente linear (b)	0,079	0,0007	0,0026
R Quadrado (R²)	0,9941	0,9996	1
Erro padrão regressão	0,00016767		
Erro padrão intercepto (b)	8.235.10 ⁻⁵		
Erro padrão inclinação (a)	0,000206268		

5.4.3 Precisão Intermediária

A precisão foi avaliada e os resultados apresentados na tabela 24:

1° dia (intra-dia)

Tabela 24 – Resultados do teste de precisão usando espectrofotômetro Shimadzu PC1204 e hidróxido de sódio (Vetec) em micropérolas na concentração de 0,1N.

Peso (mg)	Concentração (mg/mL)	Concentração teórica (mg/mL)	Absorbância	% Recuperação
77,7	0,008109	0,007716	0,502	95,15
82,1	0,008746	0,008153	0,536	93,22
78,3	0,008221	0,007775	0,508	94,57
75,2	0,007847	0,007467	0,488	95,16
70,0	0,007285	0,006951	0,458	95,41
80,6	0,008427	0,008004	0,519	94,97
Média				94,75
Desvio Padrão				0,80
Desvio Padrão Relativo (DPR)				0,84

2° dia (inter-dia)

Tabela 25 – Resultados do teste de precisão usando espectrofotômetro Varian e hidróxido de sódio 0,1N – Proquimios

Peso (mg)	Concentração (mg/mL)	Concentração teórica (mg/mL)	Absorbância	% Recuperação
70,0	0,006899	0,006951	0,413	99,25
74,1	0,008334	0,007358	0,461	104,65
80,2	0,008552	0,007964	0,512	107,39
71,6	0,006832	0,007110	0,409	96,09
74,5	0,007784	0,007398	0,466	105,22
89,0	0,009220	0,008838	0,552	104,33
Média				102,82
Desvio Padrão				4,25
Desvio Padrão Relativo (DPR)				4,13

A precisão intra-dia obteve um valor de DPR abaixo de 2% sendo satisfatório, atendendo as especificações do (ICH, 2005; USP, 2011). Observamos que com a mudança de reagente as amostras tornaram-se menos reprodutíveis, porém o valor do DPR ficou abaixo de 5%, atendo a especificação (BRASIL, 2003).

Como o DPR para a precisão intermediária foi acima de 2%, foi realizada a repetição da precisão intermediária, com outro lote de hidróxido de sódio do fornecedor Vetec, outro analista e outro laboratório. Os resultados obtidos estão mostrados na tabela 26:

Tabela 26 : Resultados de precisão intermediária (interlaboratorial) método espectrofotométrico de determinação de teor.

Peso (mg)	Concentração (mg/mL)	Concentração teórica (mg/mL)	Absorbância	% Recuperação
77,7	0,008109	0,007716	0,502	95,15
82,1	0,008746	0,008153	0,536	93,22
78,3	0,008221	0,007775	0,508	94,57
75,2	0,007847	0,007467	0,488	95,16
70,0	0,007285	0,006951	0,458	95,41
80,6	0,008247	0,008004	0,519	94,97
Média				94,95
Desvio Padrão				0,80
Desvio Padrão Relativo (DPR)				0,84

Os resultados foram satisfatórios, pois o DPR encontrado foi menor que 2% (BRASIL, 2003).

5.4.4 Exatidão/recuperação

Os resultados da exatidão são apresentados na tabela 27 a seguir:

Tabela 27 – Resultados obtidos para a exatidão/recuperação em três soluções de concentrações diferentes : baixa (80%), média (100%) e alta (110%).

%	Conc. Média experimental	Conc. Teórica	% recuperação	Média (%)	DP	DPR (%)
80	0,00314	0,0032	98,30	98,30	0,29	0,30
	0,00314	0,0032	97,94			
	0,00310	0,0032	98,53			
100	0,00399	0,0040	99,74	101,6	1,58	1,56
	0,00418	0,0040	102,53			
	0,00419	0,0040	102,45			
110	0,0043	0,0043	99,82	100,9	1,22	1,20
	0,0044	0,0045	102,25			
	0,0044	0,0044	100,90			

O método demonstrou boa recuperação e os valores encontrados de exatidão estão dentro do limite de 98,0 a 102,0% e os DPRs estão abaixo de 2%, atendendo assim a especificação (BRASIL, 2003).

5.4.5 Robustez

A robustez do método foi determinada durante o teste de precisão inter-dia, onde foi utilizado outro fornecedor de hidróxido de sódio - Proquimios. Embora o DPR para a precisão tenha ficado dentro do permitido pela RE 899 de 29 de maio de 2003, ou seja, menor que 5%, verificamos que a pureza e a validade do reagente é importante na robustez do método espectrofotométrico.

Na tabela 28 a seguir, são apresentados os resultados do teste de estabilidade das soluções padrões diluídas de SSZ mantidas em diferentes condições.

Tabela 28 – Resultados da robustez do método espectrofotométrico – estabilidade das soluções em temperatura ambiente (25°C).

Intervalo de Tempo	Solução A (balão incolor)	Solução B (balão âmbar)
1º dia (09/09/10)	0,502	0,536
2º dia (10/09/10)	0,506	0,536
5º dia (15/09/10)	0,506	0,537
12º dia (22/09/10)	0,509	0,545

Os resultados acima demonstram que as soluções permaneceram estáveis por cinco dias corridos, observamos que após esse período, houve um acréscimo no valor da absorbância, que pode ser acarretado por alguma perda por evaporação.

5.5 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CLAE – DAD (DETECTOR DE ARRANJO DE FOTODIODOS)

5.5.1 Especificidade e seletividade

A especificidade e seletividade do método foram avaliadas injetando nas mesmas condições, a amostra, o placebo, o diluente e a fase móvel. Não foi

detectado nos cromatogramas do placebo, da fase móvel e do diluente pico no tempo de retenção encontrado para a SSZ (3,2 minutos). Outra forma que se provou a seletividade e especificidade do método foi através da pureza cromatográfica do pico cromatográfico das amostras injetadas. A pureza cromatográfica pode ser comprovada através do gráfico tipo *radiogram*, onde é plotada a razão entre as absorbâncias em função do tempo de corrida (figura 27a). Essa razão deve ser uma constante e igual a 0 e ter forma retangular, mostrando assim, que no tempo de retenção da SSZ, não elui outro componente. Todos os picos obtidos das amostras injetadas da validação apresentaram pureza cromatográfica acima de 0,99, provando assim, que não havia outro pico eluindo junto com a SSZ.

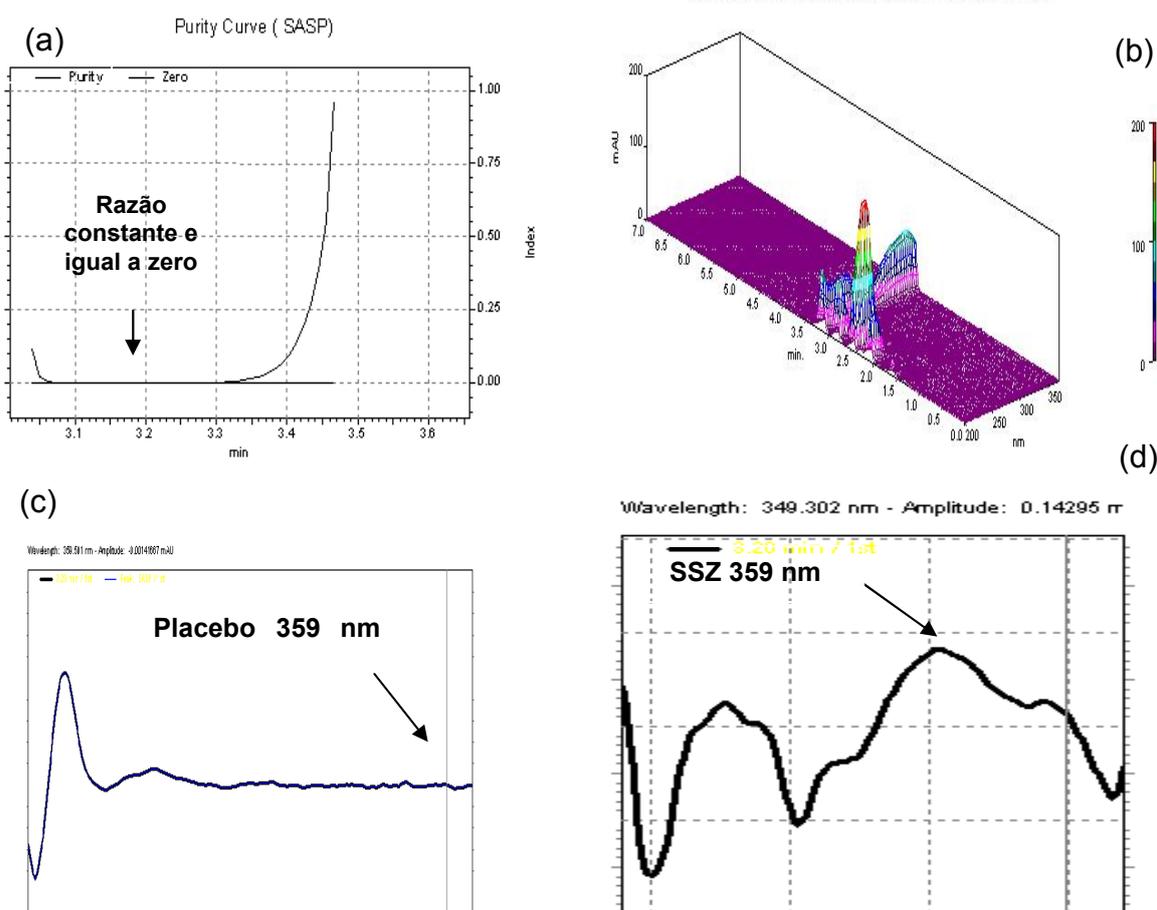
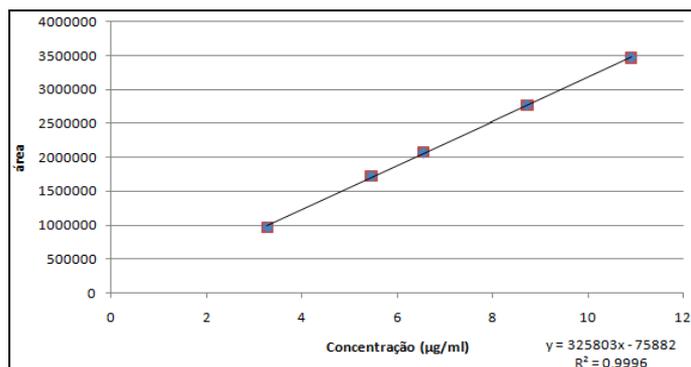


Figura 27 - (a) Gráfico tipo *radiogram* mostrando a pureza do pico obtida pela razão cromatográfica. (b) cromatograma tridimensional obtido através de detector UV/PDA para uma solução padrão de SSZ na concentração de $6\mu\text{g/mL}$. (c) espectro de absorção do placebo injetado nas mesmas condições do padrão. (d) espectro de UV/PDA para uma solução padrão de SSZ na concentração de $6\mu\text{g/mL}$.

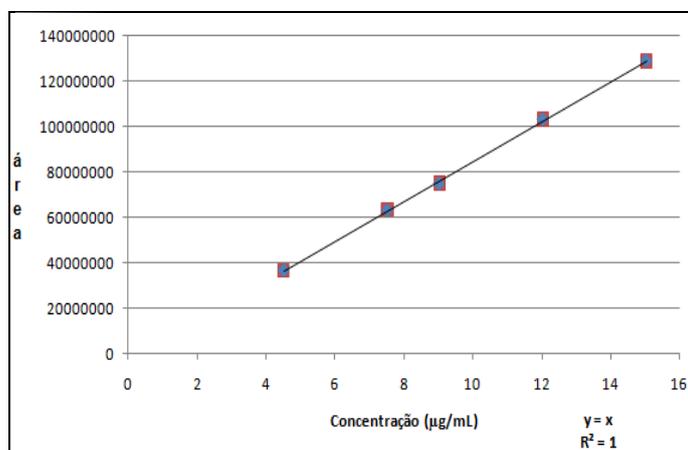
5.5.2 Linearidade

As curvas de calibração obtidas em dias diferentes e em equipamentos diferentes estão demonstradas na figura 28:

1° dia (HPLC Merck Lachrom Elite)



2° dia (HPLC Waters)



3° dia (Shimadzu VP-Class)

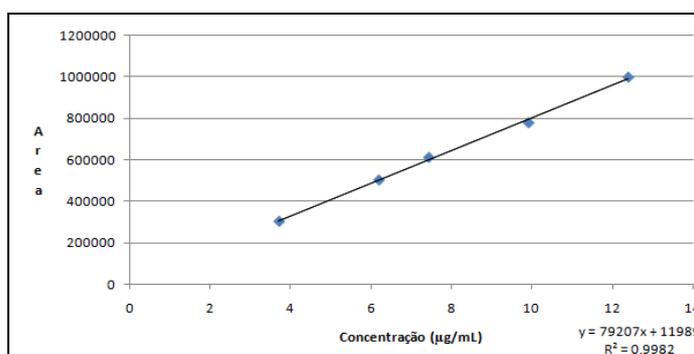


Figura 28 – Curvas padrão de SSZ – linearidade do método cromatográfico.

O método mostrou-se linear, pois as curvas de calibração apresentaram correlação acima de 0,99, atendendo aos parâmetros oficiais (ICH, 2005; Brasil, 2003; USP, 2011).

O método cromatográfico apresentou linearidade, com o coeficiente de determinação maior que 0,999. O tempo de retenção da SSZ nessas condições de análise é de 3,1 minutos (Figura 25a). A homocedasticidade para a curva de calibração foi testada e o valor G calculado (0,4940) sendo menor que o valor G tabelado (0,6838), indicando que as variâncias não foram significativamente diferentes. A validade da regressão analisada mostrou que para uma curva com o coeficiente angular diferente de zero, o F calculado deve ser menor que o F de significação. Nesse caso, o valor de F calculado foi de 6,04 e o valor do F de significação encontrado foi de 0,03, mostrando que a inclinação da curva não é nula (RIBANI *et al.*, 2004; POLONONI *et al.*, 2011; BRASIL, 2003; ABNT, 2000). Os dados obtidos da análise de regressão estão na tabela 29.

Tabela 29: Confirmação da linearidade por ANOVA – método cromatográfico

ANOVA					
Parâmetros ANOVA	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	5,185.10 ⁻⁵	5,185.10 ⁻⁵	6,0365	0,0288
Resíduo	13	0,00011168	8,590.10 ⁻⁶		
Total	14	0,000163539			

Nota: gl = graus de liberdade; SQ = soma quadrática; MQ = média quadrática; F = F calculado; E = exponencial

Adicionalmente, foi calculado, a partir das curvas analíticas o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ). Os valores obtidos foram: 1,12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 3,75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, mostrando que a sensibilidade do método é adequada para o objetivo proposto nesse trabalho e que a quantificação do método ficou acima do limite inferior de quantificação determinado.

Os coeficientes da reta e os seus valores máximo e mínimo para um nível de significância (α) igual a 0,05 (95% grau de confiança) foram usados no cálculo dos intervalos de confiança para os coeficientes da reta, conforme mostra a tabela 30.

Tabela 30: Dados para o cálculo do intervalo de confiança do intercepto (b) e da inclinação da curva (a) dos coeficientes da reta.

Dados da curva	Coefficientes	95% inferiores	95% superiores
Intersecção (b)	0,006935169	0,004968	0,00890
Variável x 1 (a)	$4,4335 \cdot 10^{-11}$	$5,3517 \cdot 10^{-12}$	$8,3318 \cdot 10^{-11}$

Um resumo dos valores encontrados para o coeficiente angular (a), linear (b) e o R^2 e seus respectivos erros padrão estão mostrados na tabela 31.

Tabela 31: Estatística da regressão do método de determinação do teor por CLAE.

Linearidade método cromatográfico			
Dados da regressão			
Coeficiente angular (a)	325803	1	79207
Coeficiente linear (b)	75882	0	11989
R Quadrado (R^2)	0,9996	1	0,9982
Erro padrão regressão	0,002931		
Erro padrão intercepto (b)	0,000910		
Erro padrão inclinação (a)	$1,8044 \cdot 10^{-11}$		

A linearidade foi comprovada com valores de erro padrão baixos e coeficiente de correlação maior que 0,99, mostrando uma baixa dispersão dos dados (RIBANI *et al.*, 2004; POLONONI *et al.*, 2011; BRASIL, 2003, ABNT, 2000).

5.5.3 Precisão

Os resultados da precisão são mostrados na tabela 32:

Tabela 32 – Resultados da precisão da metodologia de determinação de teor de SSZ por CLAE (HPLC Waters).

Peso (mg)	Concentração (mg/mL)	Área	Área Média (\pm DPR)	DPR (%)	% Recuperação
11,1	6,596	2073807	2073049 \pm 0,14	2,66	98,57
		2075418			
		2069923			
10,2	5,951	1861888	1863011 \pm 0,05		
		1863831			
		1863314			
11,6	6,932	2179407	2182519 \pm 0,14		
		2182792			
		2185360			
10,4	6,372	2001872	2000112 \pm 0,09		
		1998331			
		2000135			
10,3	6,411	2008692	2012719 \pm 0,17		
		2015230			
		2014236			
10,7	6,228	1956671	1953251 \pm 0,16		
		1950260			
		1952824			

Os resultados acima mostraram que o método cromatográfico apresenta boa precisão, com o DPR abaixo de 5% (BRASIL, 2003).

5.5.4 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi realizada utilizando um outro equipamento HPLC Shimadzu modelo VP-Class, em um outro laboratório. Devido a essas circunstâncias, outros lotes de acetonitrila grau HPLC também foram utilizados.

Tabela 33 - Resultados da precisão intermediária do método cromatográfico de determinação de SSZ por CLAE (Shimadzu VP-Class).

Peso (mg)	Concentração (mg/mL)	Área	Área Média (± DPR)	DPR (%)	% Recuperação
12,6	7,456	603429	602574 ± 0,48		
		600724			
		598746			
		603857			
		606116			
10,8	6,171	502399	500753 ± 0,26		
		500625			
		500734			
		501227			
		498782			
10,2	5,895	478924	481373 ± 0,52	1,83	99,29
		478644			
		481936			
		484046			
		483315			
9,2	5,371	437419	434396 ± 0,53		
		436236			
		432744			
		434038			
		431545			
9,3	5,500	447643	455540 ± 1,63		
		447366			
		462207			
		458965			
		461520			
13,8	8,113	645187	654592 ± 1,57		
		646029			
		651134			
		662303			
		668308			

Os resultados mostraram que a precisão intermediária foi satisfatória com o DPR menor que 5% (BRASIL, 2003).

5.5.5 Exatidão/recuperação

Os resultados da exatidão são mostrados na tabela 34:

Tabela 34 - Resultados da exatidão da metodologia de determinação de teor de SSZ por CLAE.

nível	peso padrão	Área	Conc.Teórica	Concentração (µg/mL)	% recuper.	Média	DPR
80%	11,1	1696777	5,4557	5,4377	100,33	98,9	1,6
		1694410					
		1696025					
	10,9	1686634	5,3574	5,4104	99,02		
		1689333					
		1684534					
	10,5	1651449	5,1608	5,3088	97,21		
		1655404					
		1654404					
100%	11,1	2073807	6,5468	6,5958	99,26	99,7	1,3
		2075418					
		2069923					
	10,2	1861888	6,0160	5,9511	101,09		
		1863831					
		1863314					
	11,6	2179407	6,8417	6,9318	98,70		
		2182792					
		2185360					
120%	10,7	2705701	8,4145	8,5364	98,57	99,2	1,4
		2705217					
		2705030					
	10,5	2665040	8,2572	8,4075	98,21		
		2662010					
		2662831					
	10,7	2645333	8,4145	8,3529	100,74		
		2648402					
		2642826					

Os resultados de exatidão estão dentro dos limites de aceitação, com o DPR menor que 5% e valores de recuperação entre 98,0 a 102,0% (BRASIL, 2003).

5.5.6 Robustez

Os parâmetros utilizados na robustez foram a variação do pH da fase móvel em 0,5 unidades (pH = 3,0), fluxo em 0,2 unidades (1,2 mL/min) e composição da fase móvel em 5% de acréscimo de acetonitrila, numa proporção final de acetonitrila:água (525:475).

Tabela 35 - Resultados do ensaio de robustez para o método cromatográfico.

Parâmetros alterados	Fluxo 1,0 mL/min	Fluxo 1,2 mL/min	525:475 (acetonitrila:água) pH 3,0
RT amostra	3,79	3,16	3,37
RT padrão	3,78	3,17	3,37
assimetria amostra	1,27	1,29	1,28
assimetria padrão	1,27	1,28	1,27
DPR (%) padrão	0,49	0,14	0,80
DPR (%) amostra	0,48	0,14	0,30

RT: tempo de retenção em minutos.

O método cromatográfico é robusto para modificações de equipamento, fluxo, variação de pH e fase móvel. O teste de robustez foi realizado em equipamentos diferentes de cromatografia líquida de alta resolução e foi avaliado o coeficiente de variação de 3 injeções consecutivas de padrão e amostra. As alterações realizadas não produziram mudanças significativas na assimetria (menor que 2,0) do pico de sulfasalazina e na estabilidade do sistema mantendo o coeficiente de variação (CV) menor que 2,0%. As amostras foram injetadas por um período de 24 horas e mostraram-se estáveis à temperatura ambiente.

Foi observado, que no momento do preparo da amostra para CLAE, deve ser adicionado à amostra o diluente acetonitrila:água (1:1). Se adicionarmos o volume corresponde de acetonitrila e depois a água, é formada uma rede, devido a carboximetilcelulose, que demanda um tempo maior de extração da

Sulfassalazina da rede formada. Esse evento não é observado quando adicionamos diretamente após a pesagem das amostras, o diluente já preparado.

5.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SULFASSALAZINA NAS SUSPENSÕES (UV/Vis)

Os resultados de teor encontrados para as três suspensões manipuladas são apresentados na tabela 36:

Tabela 36 – teor encontrado de SSZ nas suspensões D, H e P pelo método espectrofotométrico.

Amostragem Suspensão		Manhã (9:00 h)			Tarde (15:00 h)			Média Final (mg/mL)
		mg/mL	Média	DPR (%)	mg/mL	Média	DPR (%)	
D	Topo	48,34	48,3	0,52	46,54	46,7	0,52	47,5
	Meio	48,01			46,54			
	Fundo	48,50			46,96			
H	Topo	49,30	48,8	1,74	47,89	48,3	0,91	48,5
	Meio	49,22			48,22			
	Fundo	47,79			48,76			
P	Topo	52,60	53,5	1,63	53,39	53,1	0,46	53,3
	Meio	53,64			53,09			
	Fundo	54,34			52,90			

De acordo com os valores de DPR mostrados na tabela 36, em todos os casos, após homogeneização de 30 segundos, as suspensões apresentaram valores de DPR menores que 2,0%, que, segundo a Farmacopéia Americana, é o critério de aceitação para homogeneidade. Considerando uma variação de teor de sulfassalazina de $\pm 10\%$, o limite deve estar compreendido entre 45,0 a 55,0 mg/mL. Todas as suspensões se mantiveram dentro desse limite e os resultados acima, também mostram, que as suspensões obtidas segundo o procedimento descrito em Material e Métodos (figura 6), levou à obtenção de uma suspensão bem homogênea, dispersa, que é fundamental para que não ocorra variações na dosagem durante o tratamento (TRINCHES *et al.*, 2004).

5.6.1 Determinação do teor do comprimido de Azulfin® 500 mg

O teor do comprimido de Azulfin® 500 mg também foi determinado pelas duas metodologias validadas e o DPR para ambas as determinações foi menor que 2%.

Tabela 37 - Determinação do teor do comprimido de Azulfin® 500 mg por ambas metodologias UV/Vis e CLAE.

CLAE		UV/Vis	
mg/cpr	DPR (%)	mg/cpr	DPR (%)
508,7	0,81	502,4	0,23
510,0		504,6	
502,3		504,1	

Ambas as metodologias apresentaram DPR menor que 2%. O valor obtido pela metodologia por CLAE apresentou 1,4% acima do valor teórico do comprimido, enquanto a metodologia por UV/Vis apresentou 0,74%. Ambas obtiveram resultados satisfatórios.

Foram analisadas por ambas as metodologias analíticas, a suspensão oral e o comprimido referência de sulfassalazina 500 mg (Azulfin®). Os resultados foram satisfatórios, conforme mostrado na tabela 38.

Tabela 38 - Resultados (n=3) da análise da suspensão e do comprimido revestido Azulfin® 500 mg pela metodologia por CLAE e por UV/Vis.

Azulfin® 500 mg				Sulfassalazina 250 mg/5 mL			
CLAE		UV/VIS		CLAE		UV/Vis	
mg/cpr	DPR	mg/cpr	DPR	mg.mL ⁻¹	DPR	mg.mL ⁻¹	DPR
508,7		502,4		51,6		53,4	
510,0	0,81	504,6	0,23	50,4	1,45	53,0	0,46
502,3		504,1		50,3		52,9	

A metodologia analítica por espectrofotometria UV/Vis para a forma farmacêutica comprimido está descrita na Farmacopeia Americana 34ª edição, enquanto que a metodologia por CLAE (DAHAN *et al.*, 2010), ainda não foi contemplada. Para suspensão oral, ambas as metodologias, UV/Vis e CLAE ainda não estão contempladas na Farmacopéia Americana e na Farmacopeia Brasileira

5ª edição. Os resultados para ambas as formulações foram satisfatórios com DPR menor que 2%.

Como os métodos desenvolvidos e validados são inéditos, um manuscrito foi submetido à apreciação da revista Química Nova.

5.7 DISSOLUÇÃO DA SUSPENSÃO DE SULFASSALAZINA 250 mg/5 mL

5.7.1 Teste de adsorção dos filtros

A avaliação na adsorção nos filtros é importante, pois alguns princípios ativos podem ser adsorvidos em excesso em alguns materiais plásticos usados durante a dissolução (HANSON, 2004). Uma recuperação de 95% do princípio ativo é considerado como critério de aceitação para seleção do filtro (KIEHM *et al.*, 2008). Verifica-se nos resultados abaixo que houve menor variação nas absorvâncias quando a filtração foi realizada no meio tampão fosfato pH 6,8 e pH 7,4, usando conjuntamente o filtro de polietileno 35 μm e Millex[®] PVDF com 0,45 μm de poro, obtendo para esses meios, adsorção no filtro praticamente nula. O tampão fosfato pH 5,8 apresentou percentual de adsorção menor que 5%. Como no meio HCl 0,1N a SSZ permaneceu praticamente insolúvel, a adsorção no filtro foi próxima a 100 %.

Tabela 39: Resultados do teste de adsorção dos filtros nos diferentes meios de dissolução.

Meio	LNF	LF	% retida
HCl 0,1N	0,719	0,036	94,99
Tampão 5,8	0,401	0,388	3,24
Tampão 5,8 tween 0,5%	0,293	0,291	0,68
Tampão 6,8	0,437	0,437	0
Tampão 7,4	0,496	0,495	0,20

5.7.2 Determinação dos perfis de dissolução das suspensões de Sulfassalazina 250 mg/ 5 mL

5.7.2.1 Meio HCl 0,1N

Os resultados obtidos do perfil de dissolução em meio HCl 0,1N, pH 1,2 na rotação de 25 rpm e 50 rpm, estão mostrados no gráfico (figura 29):

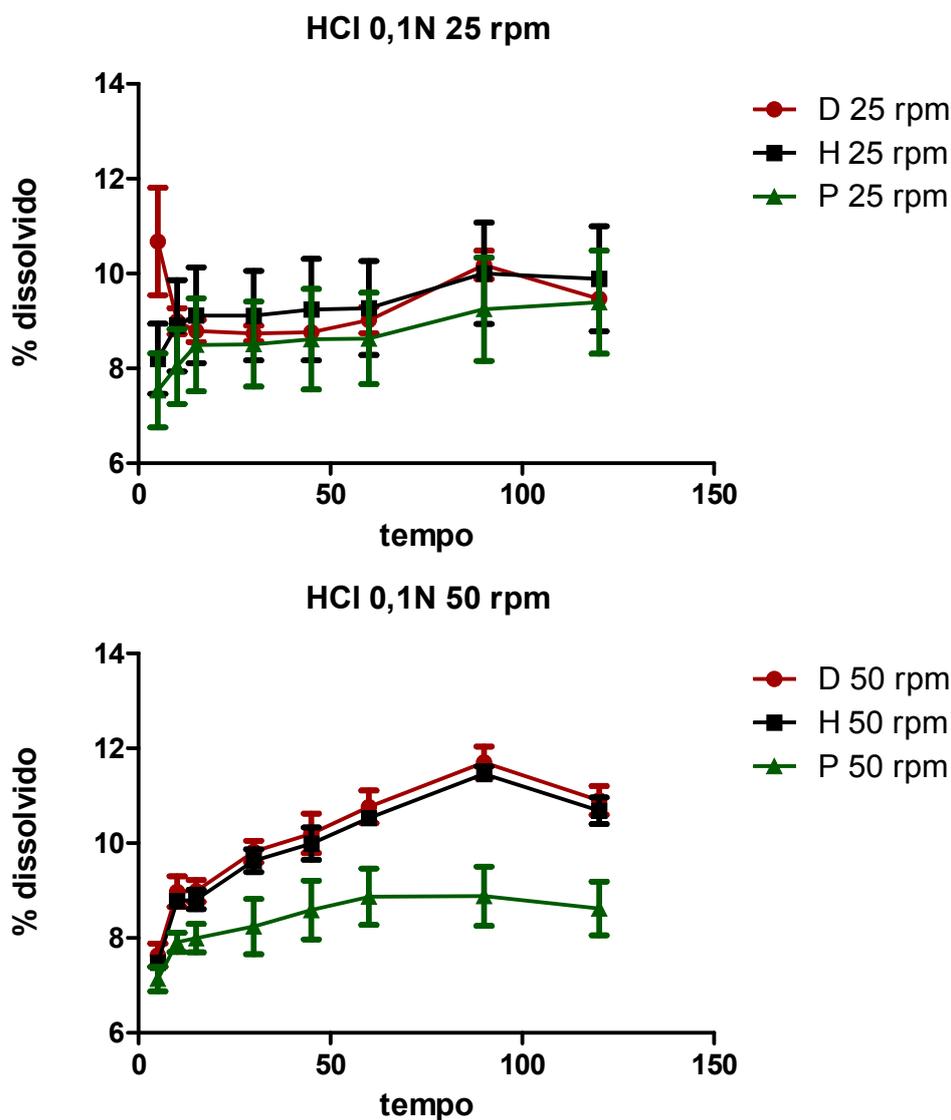


Figura 29 - Perfil de dissolução de suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL em HCl 0,1N, pH 1,2, 25 rpm (a) e 50 rpm (b).

Foi observado que no meio ácido, as partículas de SSZ permaneceram praticamente insolúveis. As amostras foram coletadas durante um período de duas horas e a quantidade dissolvida em cada ponto determinada. Foi observado valor alto no primeiro ponto (5 min) do fornecedor D, 25 rpm, onde o total dissolvido ($10,7\% \pm 25,9\%$), que pode ter sido provocado pela própria insolubilidade do fármaco no meio. Na rotação de 25 rpm, os demais fornecedores apresentaram percentual dissolvido menor que 10%. Na velocidade de 50 rpm, houve um acréscimo no percentual dissolvido, principalmente para os fornecedores D e H a partir do tempo de 45 minutos. Esse aumento no percentual dissolvido pode ter ocorrido por alguns motivos como: tempo e velocidade de

rotação maior. Vale ressaltar, que essas condições de teste não atende as condições *sink* e temos o meio saturado, que prejudica a avaliação de um perfil de dissolução (HANSON, 2004). Segundo a literatura, a quantidade de sulfassalazina que chega no colon é de 90%, onde então é clivada por azo-reductases bacterianas em sulfapiridina e ácido 5-aminosalicílico, só então a sulfapiridina é absorvida provocando os efeitos indesejáveis, como dor de cabeça, perda de apetite, náuseas. Portanto, no estômago não vai ocorrer a absorção da sulfapiridina, pois as azo-redutases não estão presentes neste meio (JUNIOR, 1999; GENC *et al.*, 2007). Cabe aqui ressaltar, que o sucesso de sistemas de liberação cólon específicos está na resposta de liberação ao longo do sistema gastrointestinal e particularmente nas condições fisiológicas do cólon. Um dos sistemas estratégicos para liberação cólon-específica é o pró-fármaco, que atinge o cólon sem liberar a molécula ativa, mesmo passando pelas mudanças fisiológicas ao longo do trato gastrointestinal (YANG *et al.*, 2002).

5.7.2.2 Meio tampão fosfato pH 5,8, tampão fosfato pH 5,8 tween 80 0,5%, tampão fosfato pH 6,8 e tampão fosfato pH 7,4

O perfil de dissolução para as suspensões preparadas dos três fornecedores é mostrado nas figuras 30, 31, 32 e 33.

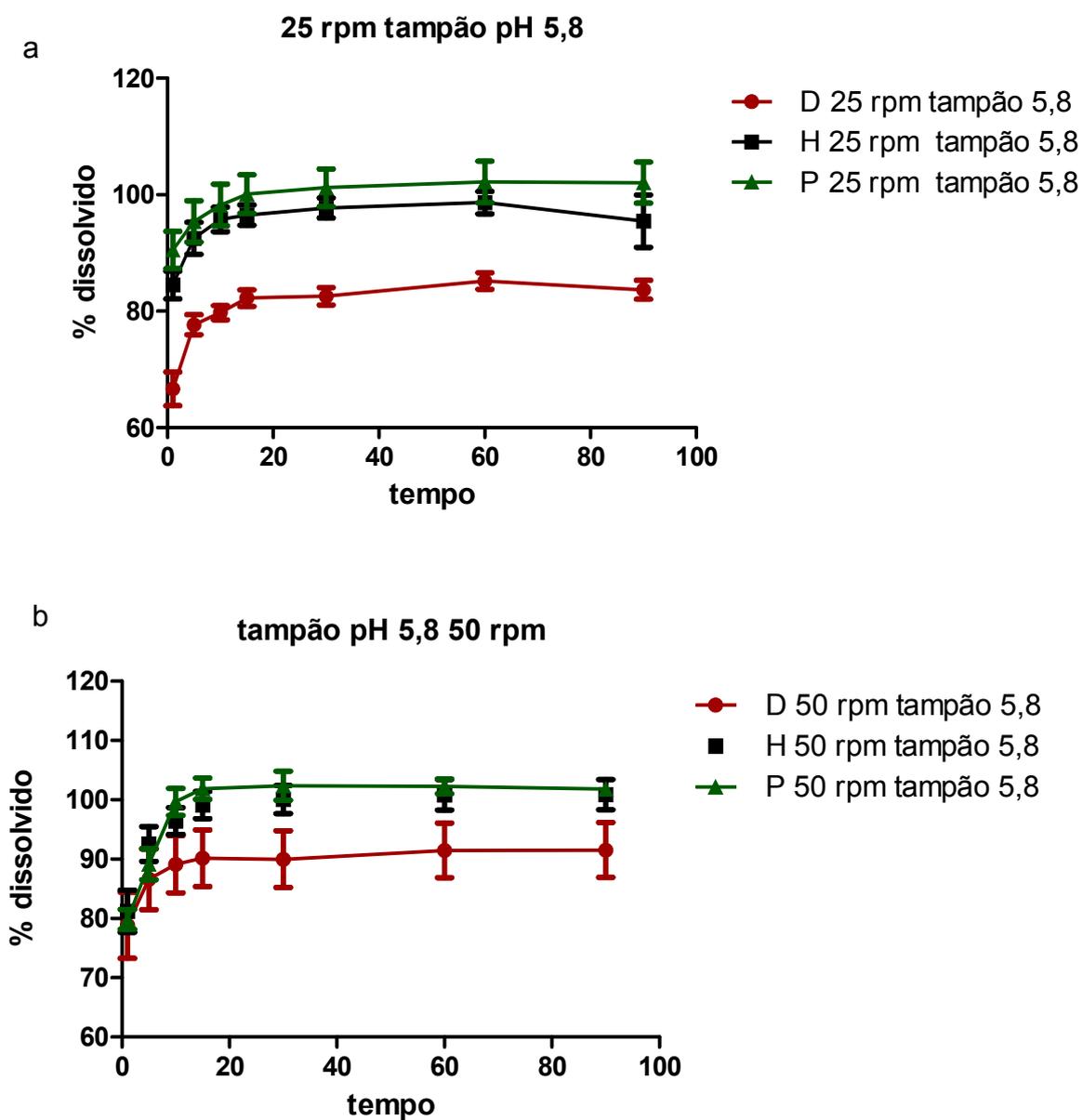


Figura 30 - Perfis de dissolução da suspensão de sulfassalazina 250 mg/ 5 mL em meio tampão fosfato pH 5,8 , nas rotações de 25 rpm (a) e 50 rpm (b) .

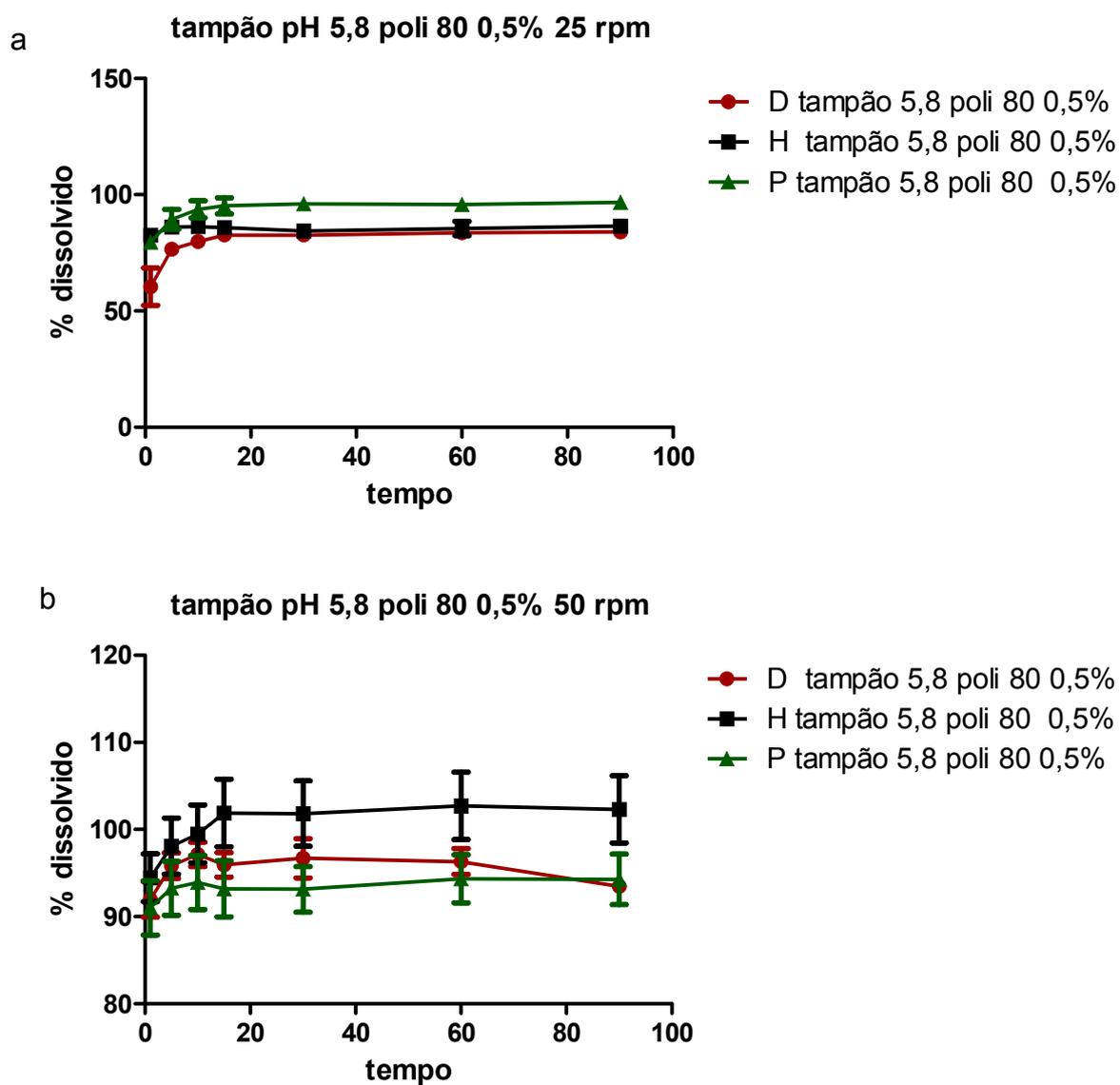


Figura 31 - Perfis de dissolução da suspensão de sulfassalazina 250 mg/ 5 mL em meio tampão fosfato pH 5,8 com polissorbato 80 0,5% , nas rotações de 25 rpm (a) e 50 rpm (b).

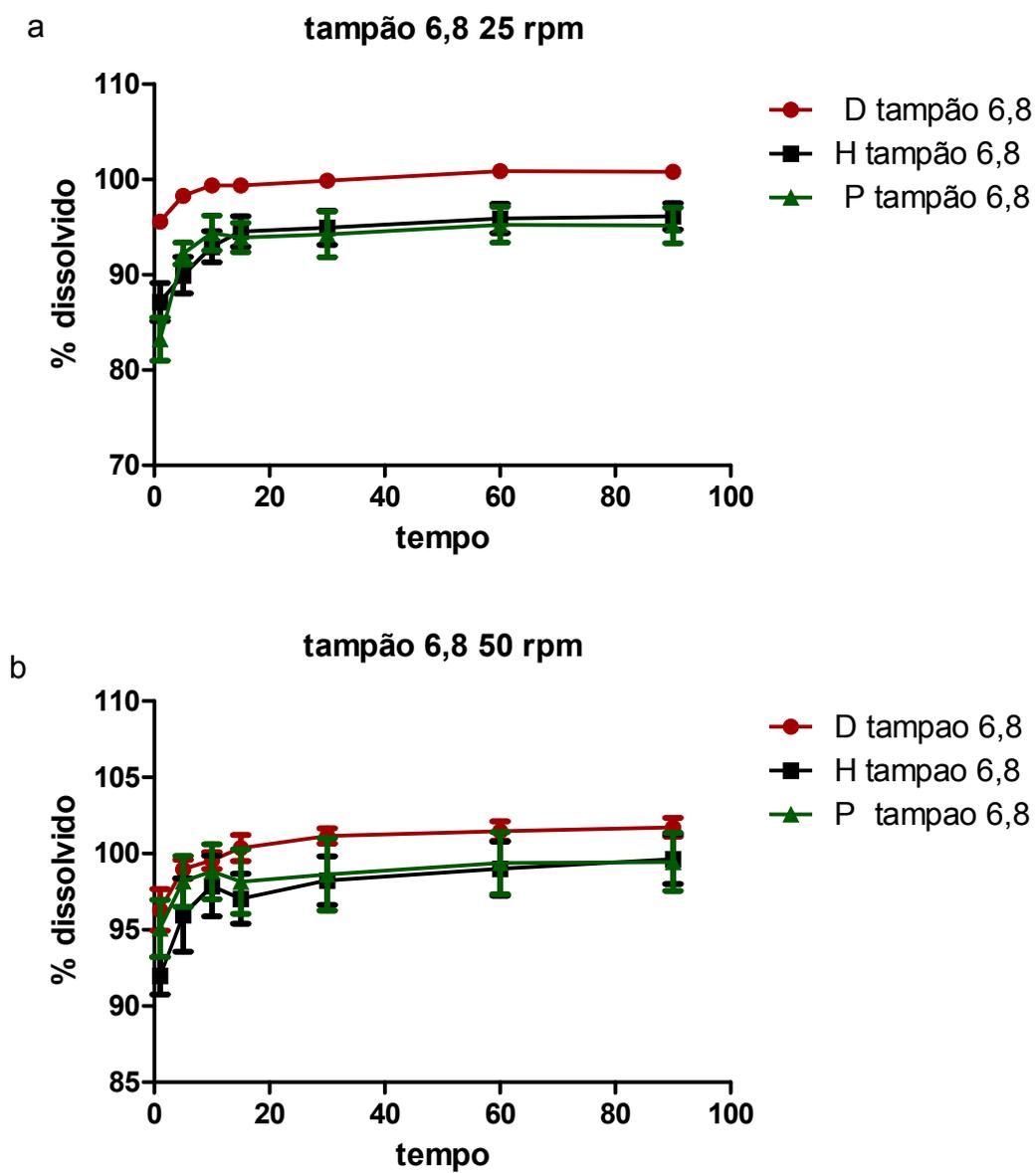


Figura 32: Perfis de dissolução da suspensão de sulfassalazina 250 mg/ 5 mL em meio tampão fosfato pH 6,8, nas rotações de 25 rpm (a) e 50 rpm (b).

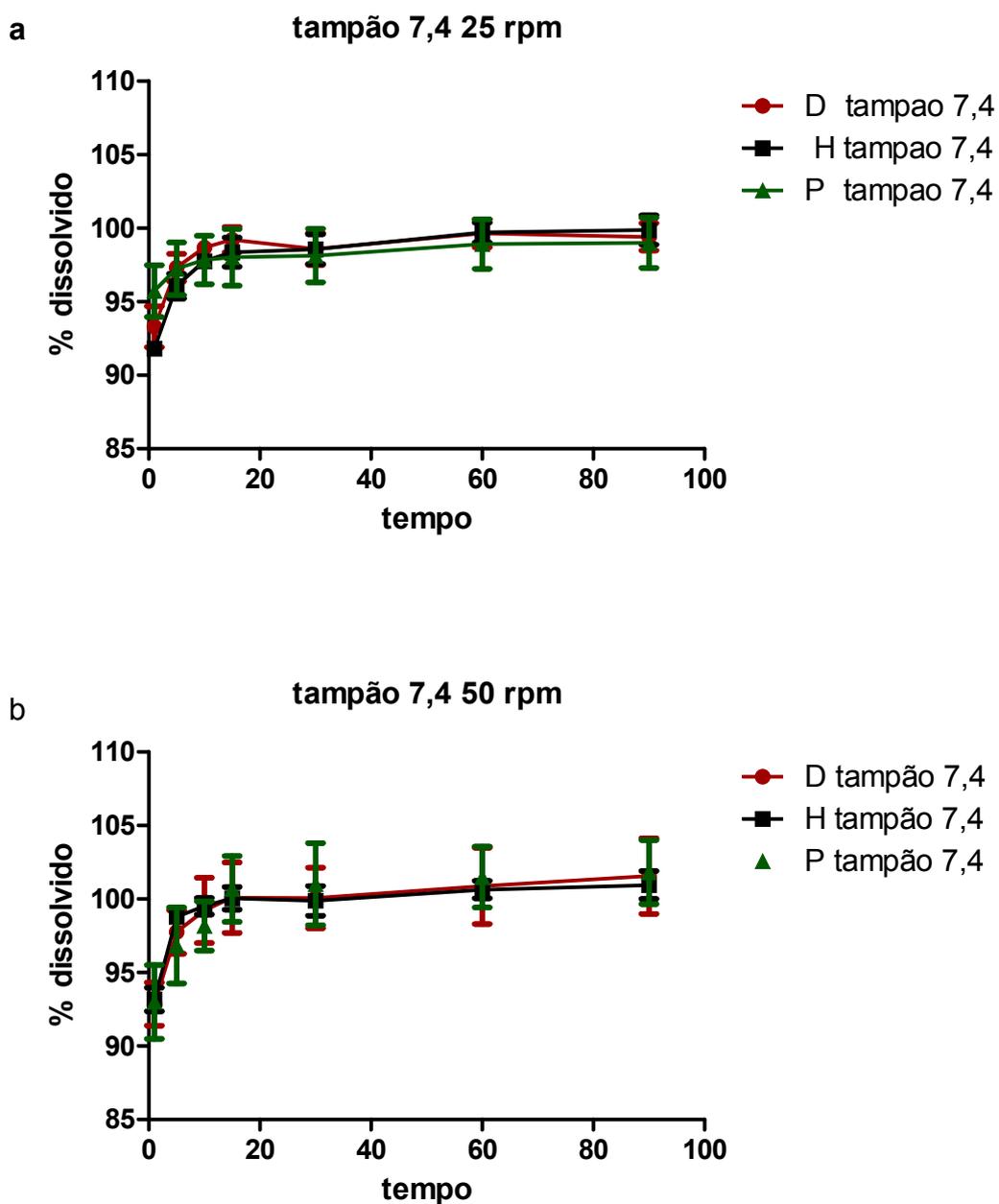


Figura 33: Perfis de dissolução da suspensão de sulfassalazina 250 mg/ 5 mL em meio tampão fosfato pH 7,4, nas rotações de 25 rpm (a) e 50 rpm (b).

A tabela 40 mostra o resumo dos dados estatísticos obtidos para o estudo de dissolução da suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL nos quatro meios estudados.

Tabela 40 – Dados estatísticos obtidos do estudo *in vitro* de dissolução de suspensão de sulfassalazina 250 mg/ 5 mL nos meios tampão fosfato pH 5,8, tampão fosfato pH 5,8 poli 80 0,5%, tampão fosfato pH 6,8 e tampão fosfato pH 7,4, nas rotações de 25 e 50 rpm.
^aConsiderando estatisticamente significativo para $P < 0,05$.

comparação	meio de dissolução	rotação (rpm)	tempo (min)	significância ^a
D x H	Tampão fosfato pH 5,8 25 rpm	25 rpm	1	$P < 0,001$ ****
			5	$P < 0,01$ **
			10	$P < 0,01$ **
			15	$P < 0,01$ **
			30	$P < 0,01$ **
			60	$P < 0,05$ *
D x P			1	$P < 0,0001$ ****
			5	$P < 0,001$ ****
			10	$P < 0,0001$ ****
			15	$P < 0,001$ ****
			30	$P < 0,0001$ ****
			60	$P < 0,001$ ****
D x H	Tampão fosfato pH 5,8 poli 80 0,5% 25 rpm	25 rpm	90	$P < 0,0001$ ****
			1	$P < 0,0001$ ****
D x P	Tampão fosfato pH 5,8 poli 80 0,5% 25 rpm		1	$P < 0,01$ **
			10	$P < 0,05$ *
D x H	Tampão fosfato pH 6,8 25 rpm		1	$P < 0,01$ **
			5	$P < 0,01$ **
D x P			1	$P < 0,0001$ ****
			1	$P < 0,0001$ ****

Nota: *significativo **** muito significativo

Os resultados obtidos pelo *two-way* Anova, para o meio tampão fosfato pH 5,8 em 25 rpm, mostram que houve diferença estatística significativa do percentual dissolvido ($P < 0,05$) entre as formulação D e H em cada tempo, com exceção de 90 minutos e entre D e P para todos os tempos de dissolução. Esses resultados mostram que a formulação D não apresentou semelhança no perfil de dissolução (figura 30a) quando comparado com as suspensões P e H.

Entre as formulação H e P, no tampão fosfato pH 5,8, na velocidade de 25 rpm, não houve diferença significativa ($P > 0,05$), apresentando semelhança entre os perfis. A formulação P apresentou em 15 minutos, percentual dissolvido de 100,14% e a H 96,53% (figura 30a).

No meio de dissolução tampão fosfato pH 5,8 na velocidade de rotação de 50 rpm, todas as formulações foram semelhantes, não havendo diferença significativa ($P > 0,05$).

Com relação a condição *sink*, no meio tampão fosfato pH 5,8, foi respeitada 2,5 vezes a concentração de saturação e a sulfassalazina apresentou uma dissolução completa após 15 minutos, para a formulação P (101,88%), H (99,13%) e D (90,16%) na rotação de 50 rpm (figura 30b).

O comportamento da dissolução das formulações D, H e P no meio de tampão fosfato pH 5,8 com poli 80 0,5% foi consideravelmente melhor do que no tampão fosfato pH 5,8, visto que o tensoativo melhorou a solubilidade média do fármaco nesse meio, de 273 µg/mL para 725 µg/mL (2,6 vezes). Observa-se na figura 31, que as curvas de dissolução para os três fornecedores em uma rotação de 50 rpm se mantiveram mais similares do que a 25 rpm.

No meio tampão fosfato pH 5,8 poli 80 0,5% , em uma rotação de 25 rpm (figura 31a), a comparação entre as formulações D e H mostrou diferença muito significativa no primeiro tempo ($P < 0,0001$) e entre D e P para os nos tempos 1 e 10 minutos ($P < 0,05$). Após esses tempos iniciais, a dissolução entre as formulações foi semelhante, atingindo o platô (anexo 3) em 15 minutos, como pode ser visto na figura 31. A diferença significativa no início da dissolução entre as formulações D versus P e D versus H no início da dissolução pode estar relacionado a baixa rotação e a amostragem, pois é possível observar que o DPR obtido para a formulação D no primeiro tempo ficou acima de 10% (anexo 3).

A dissolução do fármaco em 50 rpm (figura 31b), no meio tampão fosfato pH 5,8 poli 80 0,5%, apresentou todos os perfis semelhantes, não havendo diferença estatística significante ($P > 0,05$). A condição *sink* foi respeitada 6,5 vezes a concentração de saturação do fármaco, e a SSZ se apresentou bem mais solúvel nesse meio.

No meio tampão fosfato pH 6,8 (figura 32), todas as formulações atingiram acima de 85% do total dissolvido (anexo 3), nas rotações de 25 e 50 rpm em 15 minutos, o que caracteriza as formulações como sendo de liberação muito rápida (STORPIRTIS *et al.*, 2009; BRASIL, 2010; MANADAS *et al.*, 2002).

Na velocidade de 25 rpm (figura 32a), para o tampão fosfato pH 6,8 houve diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre as formulações D e H e D e P para os primeiros tempos de dissolução (tabela 40). A partir de 10 minutos, a dissolução continuou até 90 minutos, sem diferença estatística significativa.

A figura 33 mostra os perfis das suspensões D, H e P no tampão pH 7,4. Nesse meio, não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre os perfis das formulações nas duas rotações, 25 e 50 rpm, atingindo cerca 100% do total dissolvido em 15 minutos, todas as formulações apresentaram comportamento semelhante (anexo 3).

De acordo com o estudo da solubilidade da sulfassalazina nos meios avaliados, observou-se que ocorreu um aumento gradativo da solubilidade da SSZ à medida que o pH do meio aumenta, o que é característico desse fármaco, visto que, a SSZ é parcialmente ionizada, devido o grupamento ácido. Para ácidos fracos, quando o valor de pH do meio aumenta, a solubilidade do ácido também aumenta devido a contribuição da forma ionizada (HÖRTER *et al.*, 2001).

A sulfassalazina é um exemplo clássico de pró-fármaco e que sofre clivagem na ligação diazo, no colón, pela ação metabólica de bactérias colônicas, liberando assim, o ácido 5-aminossalicílico (5-ASA) e a sulfapiridina. Esse processo de liberação do 5-ASA, ocorre em um meio biológico de pH entre 5,5 a 7, que compreende o ceco, colón e reto. Nesse local, é importante, que se tenha a SSZ solubilizada para facilitar sua metabolização. Dentro deste contexto, os perfis mostram, que para as formulações de suspensão estudadas, o fármaco estará disponível durante seu trânsito no intestino grosso, possibilitando sua cedência nos sítios de ação (SINKO, 2008; JUNIOR, 1999; DAHAN *et al.*, 2010).

5.7.3 Modelo Weibull aplicado aos perfis de dissolução

O estudo dos perfis de dissolução possibilita identificar possíveis falhas no desenvolvimento galênico de produtos, na formulação e no estabelecimento de correlação dos dados *in vitro/in vivo*. A interpretação quantitativa dos valores obtidos no ensaio de dissolução é facilitada pelas equações matemáticas que podem deduzir, através de uma análise teórica, o processo de dissolução (COSTA *et al.*, 2001; MANADAS *et al.*, 2002; YUKSEL *et al.*, 2000).

A partir da equação 7 de Weibull foi obtida a relação linear de $-\ln(1-m)$ versus tempo t para cada perfil obtido nas suspensões D, H e P nos meios tampão fosfato pH 5,8, tampão fosfato pH 5,8 com tween 0,5%, tampão fosfato pH 6,8 e tampão fosfato pH 7,4.

Os resultados estão apresentados nas tabelas 41, 42, 43 e 44:

Tabela 41 - Parâmetros de Weibull e determinação do coeficiente de determinação R^2 para suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL em meio tampão fosfato pH 5,8.

parâmetros	Tampão 5,8 25 rpm			Tampão 5,8 50 rpm		
	Weibull	D	H	P	D	H
R^2	0,9862	0,9938	0,9496	0,9967	0,7729	0,9787
β	0,1651	0,2136	0,2223	0,1501	0,4871	0,7306
α	1,111	1,871	2,3088	1,562	1,441	0,2172

Tabela 42 - Parâmetros de Weibull e determinação do coeficiente de determinação R^2 para suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL em meio tampão fosfato pH 5,8 tween 80 0,5%.

parâmetros	Tampão 5,8 tween 80 25 rpm			Tampão 5,8 tween 80 50 rpm		
	Weibull	D	H	P	D	H
R^2	0,9993	0,9594	0,9973	0,9941	0,9183	0,9946
β	0,1038	0,2506	0,0665	0,3569	0,0578	0,2409
α	2,46	8,64	2,411	0,4957	1,7656	1,572

Tabela 43 - Parâmetros de Weibull e determinação do coeficiente de determinação R^2 para suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL em meio tampão fosfato pH 6,8.

parâmetros	Tampão 6,8 25 rpm			Tampão 6,8 50 rpm		
	Weibull	D	H	P	D	H
R^2	0,9677	0,9170	0,9971	0,9987	0,9793	0,9987
β	0,2037	0,1045	0,2097	0,2117	0,1773	0,1693
α	3,071	2,026	1,795	3,288	2,499	3,022

Tabela 44 - Parâmetros de Weibull e determinação do coeficiente de determinação R^2 para suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL em meio tampão fosfato pH 7,4.

Parâmetros	Tampão 7,4 25 rpm			Tampão 7,4 50 rpm			Tampão 7,4
	Weibull	D	H	P	D	H	P
R^2	0,9920	0,9917	0,9985	0,9867	0,9992	0,9961	0,9490
β	0,2005	0,1769	0,0843	0,2589	0,2987	0,1748	2,9612
α	2,685	2,4871	3,149	2,6060	2,6933	2,6479	0,1019

O modelo cinético de Weibull não pode caracterizar adequadamente a propriedade cinética de liberação do fármaco, mas pode descrever a curva de dissolução através dos parâmetros da equação da reta (PATEL *et al.*, 2008). O parâmetro β caracteriza a forma da curva (MANADAS *et al.*, 2002; COSTA *et al.*, 2001). Para valores de $\beta = 1$, a curva é exponencial, $\beta > 1$, as curvas apresentam forma de S e $\beta < 1$, caracteriza a curva como parabólica. As curvas parabólicas são comuns em suspensões que liberam rapidamente o fármaco nos primeiros

minutos da dissolução e depois atingem a saturação, permanecendo constante. A curva sofre uma brusca inflexão nos tempos iniciais e depois permanece constante. Desta forma, frente aos outros modelos cinéticos estudados, o modelo de Weibull se aplica mais especificamente, ao estudo do perfil de dissolução de suspensões (FONSECA, 2008; DOKOUMETZIDIS *et al.*, 2006).

O parâmetro β calculado para todas as formulações foi < 1 , o qual indica curvas parabólicas, com uma grande inflexão inicial, que podem ser vistas nas figuras 30, 31, 32 e 33.

A partir do valor de α e β podemos calcular o valor de T_d que é o tempo necessário para dissolver 63,2% do fármaco, o que equivale a $m=0,632$, [$\alpha = (T_d)^\beta$]. Não foi possível calcular o valor de T_d para as formulações, pois todas liberaram 63,2% do fármaco em um tempo inferior ao primeiro ponto da curva e, conseqüentemente, uma cinética rápida de dissolução para as formulações.

Um outro critério da avaliação do comportamento dos perfis de dissolução das suspensões de sulfassalazina foi a avaliação estatística através dos valores de F de Snedecor-Fischer e de R^2 , que estão diretamente relacionados (FONSECA, 2008; PATEL *et al.*, 2008). As tabelas 45 e 46 a seguir mostram a análise da validade da regressão realizada para todas as retas obtidas através do modelo de Weibull, para as rotações em 25 rpm e 50 rpm e para as suspensões obtidas dos três fornecedores estudados. O método para comparação dos perfis de dissolução escolhido foi a análise da variância (ANOVA). Com os resultados obtidos na análise da variância foi possível testar a linearidade do método e a significância estatística da curva ajustada utilizando o valor de F , que é a razão entre a média quadrática e o erro. Assim, foi obtido o valor de F , possibilitando comparar os valores F_{cal} e F_{cri} e afirmar se o modelo é ou não linear (ABNT, 2000; GIL, 2010).

Devemos considerar também que o número de graus de liberdade (n) utilizado para os dados cinéticos foi baixo ($n=3$). Se tivéssemos um valor de n alto, possivelmente mais formulações se adequariam ao estudo; porém não foi possível aumentar o número de pontos de amostragem até 10 minutos, visto que, todo o ensaio de dissolução foi feito manualmente e pequenos intervalos de amostragem poderiam afetar a reprodutibilidade dos resultados.

Tabela 45 - Teste F para avaliação da validade da regressão e a significância estatística da curva ajustada considerando $p > 0,1$ (90% de confiança) para as formulações estudadas à 25 rpm.

validade regressão ANOVA	25 rpm								
	D			H			P		
meios dissolução	F	F _{cri}	R ²	F	F _{cri}	R ²	F	F _{cri}	R ²
TF pH 5,8	*	*	*	478,3	0,0002	0,9938	*	*	*
TFpH 5,8 poli 80	337,7	0,003	0,9993	*	*	*	371,3	0,003	0,9973
TF pH 6,8	*	*	*	*	*	*	341,9	0,034	0,9971
TF pH 7,4	124,3	0,057	0,9920	119,1	0,058	0,9917	670,9	0,024	0,9985

Nota: TF – tampão fosfato * $R^2 < 0,99$

Tabela 46 - Teste F para avaliação da validade da regressão e a significância estatística da curva ajustada considerando $p > 0,1$ (90% de confiança) para as formulações estudadas à 50 rpm.

validade regressão ANOVA	50 rpm								
	D			H			P		
meios dissolução	F	F _{cri}	R ²	F	F _{cri}	R ²	F	F _{cri}	R ²
TF pH 5,8	604,1	0,001	0,9967	*	*	*			
TFpH 5,8 poli 80	1365,3	0,017	0,9941	*	*	*	368,9	0,033	0,9946
TF pH 6,8	745,5	0,023	0,9987	*	*	*	752,4	0,023	0,9987
TF pH 7,4	74,2	0,073	0,9867	1273,7	0,017	0,9992	256,5	0,039	0,9961

Nota: TF – tampão fosfato * $R^2 < 0,99$

Para todas as formulações que apresentaram R^2 maior que 0,99, o F calculado foi maior que o F crítico, provando assim, a validade da regressão com 90% de nível de confiança (POLONINI *et al.*, 2011). Os resultados mostrados na tabela 45 (25 rpm) indicam que nenhuma das formulações apresentou significância estatística para todos os meios de dissolução estudados, com exceção do meio tampão fosfato pH 7,4, no qual todas as formulações tiveram o valor de F calculado maior do que F crítico. Portanto, todas as formulações podem ser avaliadas no meio tampão fosfato pH 7,4 à 25 rpm.

Os resultados mostrados na tabela 46 (50 rpm) mostram que todas as formulações apresentaram F calculado maior que o F crítico no meio tampão fosfato pH 7,4 e que a formulação D apresentou significância estatística ($F_{cal} > F_{cri}$) para todos os meios estudados. Esses resultados, juntamente com os obtidos da comparação estatística entre as formulações ($P > 0,05$), mostram que as formulações apresentaram melhor *performance* no meio tampão fosfato pH 7,4, tanto na rotação de 25 rpm quanto em 50 rpm, porém na rotação de 25 rpm, observamos diferenças estatísticas significativas entre as formulações nos meios tampão fosfato pH 5,8, tampão fosfato pH 5,8 poli 80 0,5% e tampão fosfato pH 6,8. Esses resultados mostram que, a suspensão de sulfassalazina formulada

conforme o quadro 2 apresentou boa *performance* de liberação entre o pH 5,5 a 8,0 a uma velocidade de rotação de 50 rpm (YUKSEL *et al.*,2000; PATEL *et al.*,2008).

5.7.4 Determinação do perfil de dissolução do comprimido revestido Azulfín® 500 mg

Foi realizado o perfil de dissolução do comprimido revestido Azulfín® 500 mg para e os resultados estão na tabela 47:

Tabela 47- Resultado da dissolução do estágio I do perfil de dissolução do comprimido Azulfín® 500 mg.

Estágio I (HCl 0,1N por 2 horas)		
Cuba	Absorbância	% dissolvido
1	0,000	0
2	0,002	0,2
3	0,002	0,2
4	0,004	0,3
5	0,000	0
6	0,000	0
Média (%)		0,1

Para comprimidos de liberação retardada, o máximo liberado no estágio I, que compreende 2 horas na velocidade de rotação de 100 rpm em HCl 0,1N, deve ser no máximo 10% de percentual total dissolvido. Para o cálculo acima foi construída uma curva de calibração em meio HCl 0,1N com correlação próxima a 1. O resultado foi satisfatório, pois a liberação no estágio I foi menor que 10%, como pode ser observado na tabela 47.

Os resultados obtidos para o estágio II estão representados no figura 34.

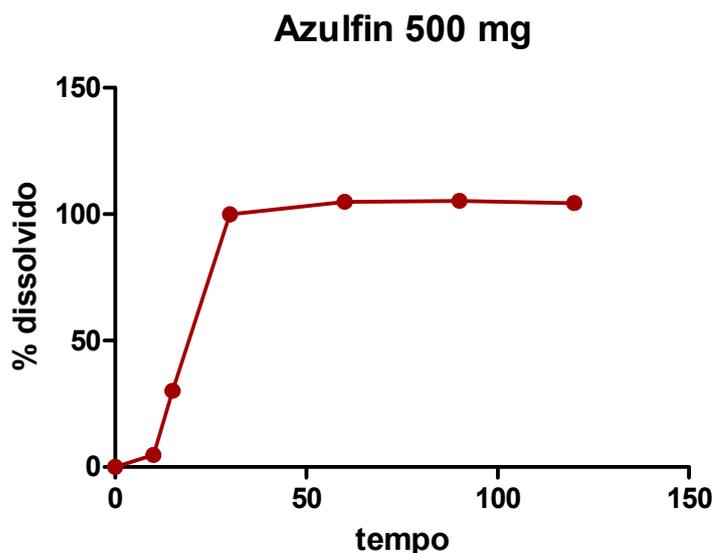


Figura 34 - Perfil de dissolução do comprimido revestido de Azulfin® 500 mg usando pá rotatória (aparato 2) em meio tampão 7,4 à 100 rpm.

Segundo a RDC 31 de agosto de 2010 (ANVISA), que regulamenta a realização dos estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo, o DPR nos primeiros tempos, que representa 40% do total de pontos, deve ser menor que 20% e os demais menores que 10%, nesse caso o total de pontos coletados foram 6, desta forma, os dois primeiros pontos o DPR máximo deve ser valor de DPR menor que 20% e os demais pontos, menor que 10%.

Os resultados na tabela 48, mostram que, para o tempo de 10 minutos, o DPR apresentou-se alto, por ser o início da dissolução e a liberação ainda está muito instável. Para os demais tempos, o DPR apresentou-se dentro da especificação.

Tabela 48 - percentual total dissolvido do comprimido de liberação retardada Azulfin® 500 mg – estágio II

% dissolvido de Azulfin® 500 mg		
Tempo	% dissolvido	DPR (%)
0	0	0
10	4,80	40,39
15	30,24	16,38
30	101,05	2,30
60	104,99	2,03
90	105,30	2,14
120	104,40	0,71

Segundo a especificação, o valor de Q +5 deve ser 90% em 60 minutos, o valor atingido foi 104,99%, portanto atendeu a especificação.

O perfil de dissolução do comprimido de referência da Sulfassalazina – Azulfín® 500 mg, mostrou que a dissolução é mais lenta do que na suspensão. O tipo da forma farmacêutica influencia na biodisponibilidade do fármaco, ou seja, na velocidade e na extensão que vai ser absorvido no trato gastrointestinal. Os fármacos para serem absorvidos, devem estar em solução nos fluidos, por isso, quanto maior for o número de etapas que intervêm no processo de absorção, mais lenta é a sua biodisponibilidade. Dentro deste contexto, a biodisponibilidade de um determinado fármaco tende a diminuir segundo a seguinte ordem de tipo de forma farmacêutica: solução aquosa>suspensão aquosa>formas farmacêuticas sólidas. As formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata passam inicialmente pela desintegração, formando um aglomerado de grânulos, que desagregam para liberar as partículas finas do fármaco nos fluidos gastrointestinais. No caso de suspensões, as partículas finas do fármaco entram em contato imediato com os fluidos gastrointestinais, favorecendo a dissolução, e conseqüentemente, a absorção do fármaco, portanto, as suspensões iniciam o processo de dissolução de forma imediata (AULTON, 2005; SINKO, 2008).

5.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO APLICADO À DISSOLUÇÃO

A validação do método para quantificação da sulfassalazina no ensaio de dissolução foi avaliada através do método espectrofotométrico UV/Vis e o meio escolhido foi o tampão fosfato pH 7,4. Dentre os meios avaliados, o tampão fosfato pH 7,4 foi o escolhido por ser o mais característico no cólon e por apresentar os melhores resultados para as formulações estudadas.

5.8.1 Especificidade

A especificidade foi avaliada através da varredura do placebo em meio tampão fosfato pH 7,4 e da amostra entre 200 a 600 nm (figura 35). A comparação dos espectros obtidos mostrou que não houve interferência dos excipientes da suspensão no comprimento de onda 359 nm. A varredura do placebo foi realizada em todos os meios de dissolução. Em nenhum dos meios

estudados, os excipientes da suspensão mostraram interferentes no comprimento de onda de 359 nm.

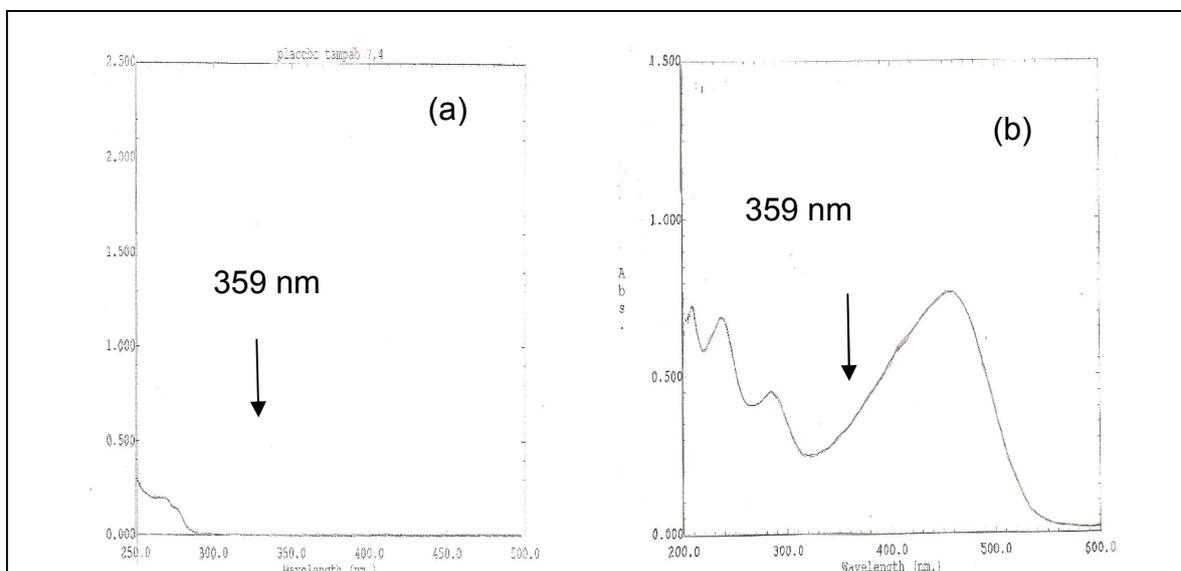


Figura 35: Espectro de absorção do placebo (a) e de amostra de SSZ (b) em tampão fosfato pH 7,4.

5.8.2 Linearidade

Na determinação desse parâmetro, foram utilizadas três curvas de calibração em cinco níveis na faixa de concentração de 1,4 a 11,2 $\mu\text{g/mL}$. As curvas padrão são mostradas na figura 36.

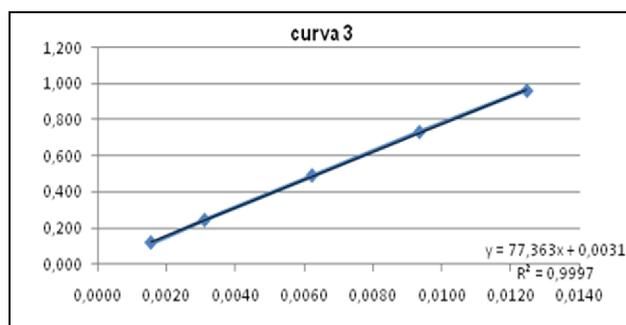
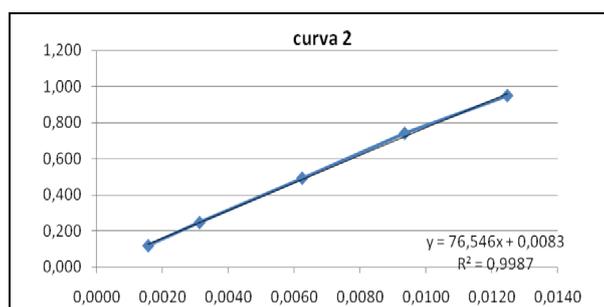
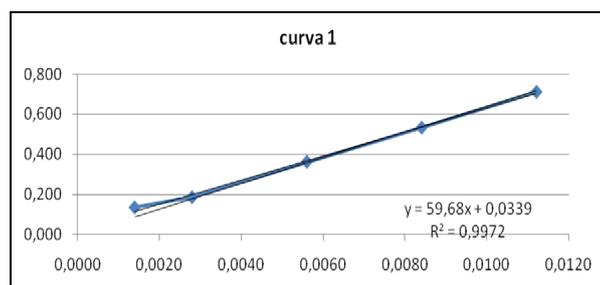


Figura 36: Curvas padrão obtidas do estudo da linearidade no meio tampão fosfato pH 7,4.

Os dados das curvas padrão no meio tampão fosfato pH 7,4 também foi avaliado pela análise da variância (ANOVA) e estão demonstrados na tabela 49:

Tabela 49 - Confirmação da linearidade por ANOVA – método espectrofotométrico aplicado à dissolução.

ANOVA					
Parâmetros ANOVA	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1,19059	1,19059	447,77	$1,861 \cdot 10^{-11}$
Resíduo	13	0,03456	0,002658		
Total	14	1,22516			

Nota: gl = graus de liberdade; SQ = soma quadrática; MQ = média quadrática; F = F calculado; E = exponencial

As três curvas de calibração apresentaram coeficiente de correlação próximo a 1, mostrando-se lineares. A análise da variância (ANOVA) permite avaliar a linearidade do método e a validade da regressão (POLONINI *et al.*, 2011; ABNT, 2000). Através do teste F é possível confirmar o modelo linear da curva, considerando a hipótese de que o coeficiente angular da curva seja diferente de zero. O valor de F calculado deve ser maior que o F crítico ou de significação. Nesse caso, o valor encontrado para F calculado foi de 447,77 e o F de significação ou crítico igual a $1,86 \times 10^{-11}$, confirmando assim, a regressão nas três curvas de calibração. Assim, foi possível confirmar, com 95% de confiança, que o modelo é linear e que a inclinação da reta não é nula.

Tabela 50 - Dados para o cálculo do intervalo de confiança do intercepto (b) e da inclinação da curva (a) dos coeficientes da reta.

Dados da curva	Coefficientes	95% inferiores	95% superiores
Intersecção (b)	0,0079278	-0,047137	0,06299
Variável x 1 (a)	72,73325	65,30768	80,15882

Os coeficientes da reta e os valores máximo e mínimo para um nível de significância (α) igual a 0,05 (95% grau de confiança) foram usados no cálculo dos intervalos de confiança para os coeficientes da reta.

Um resumo dos valores encontrados para o coeficiente angular (a), linear (b) e o R^2 e seus respectivos erros padrão estão mostrados na tabela 51.

Tabela 51 - Estatística da regressão – método espectrofotométrico aplicado ao ensaio dissolução.

Linearidade (método espectrofotométrico para ensaio de dissolução)			
Dados da regressão			
Coeficiente angular (a)	59,680	76,546	77,363
Coeficiente linear (b)	0,00339	0,0083	0,0031
R Quadrado (R^2)	0,9972	0,9987	0,9997
Erro padrão regressão	0,051564		
Erro padrão intercepto (b)	0,025489		
Erro padrão inclinação (a)	3.34717		

A linearidade foi comprovada, com valores de erros padrão baixos e coeficiente de correlação maior que 0,99, mostrando uma baixa dispersão dos resultados (RIBANI *et al.*, 2004; POLONONI *et al.*, 2011; BRASIL, 2003; ABNT, 2000).

Tabela 52 - Parâmetros obtidos das curvas padrão (5 níveis) utilizadas no doseamento por espectrofotometria UV/Vis nos quatro diferentes meios de dissolução.

Meio	Equação da reta	Coefficiente de correlação	Coefficiente de determinação R ²
Tampão fosfato 5,8	$y = 51,4554x + 0,0074$	0,9993	0,9986
Tampão fosfato 5,8 poli 0,5%	$y = 57,0598x + 0,0133$	0,9996	0,9992
Tampão 6,8	$y = 62,5443x + 0,0083$	0,9999	0,9999
Tampão 7,4	$y = 59,6800x + 0,0339$	0,9986	0,9972

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que além do meio tampão fosfato pH 7,4, os outros meios estudados apresentaram correlação linear, uma vez que, os valores obtidos para o coeficiente de correlação foram maiores que 0,99, estando de acordo com a resolução 899 da ANVISA (BRASIL, 2003).

5.8.3 Exatidão/recuperação

A exatidão foi calculada a partir do preparo de três soluções em três níveis de concentração: baixa, média e alta. As amostras em concentrações de 2,5 µg/mL, 5,0 µg/mL e 7,5 µg/mL, foram analisadas e a recuperação calculada. Este ensaio foi realizado apenas no meio tampão fosfato pH 7,4. Os dados são mostrados na tabela 53.

Os resultados obtidos mostraram que a recuperação para as três concentrações estudadas, estão dentro do limite de 98,0 a 102,0%. Na tabela 51, estão representadas as médias obtidas para cada nível de concentração 80, 100 e 120%. Os valores obtidos encontram-se dentro do limite especificado e com DPR < 2,0% em cada nível de concentração, sendo assim considerados satisfatórios (BRASIL, 2003).

Tabela 53: Resultados da exatidão obtidos em meio tampão fosfato pH 7,4 por espectrofotometria UV/Vis.

EXATIDÃO					
Nível	peso amostra	concentração final (mg/mL)	leitura	%	DPR
1	25,1	0,00251	0,139	100,9	1,43
	25,3	0,00253	0,144		
	25,1	0,00251	0,142		
2	50,4	0,00504	0,282	99,9	0,88
	50,0	0,00500	0,280		
	49,7	0,00497	0,274		
3	25,6	0,00768	0,422	98,8	0,34
	25,2	0,00756	0,418		
	25,1	0,00753	0,414		

5.8.4 Precisão e Precisão intermediária

Os resultados de precisão intra-ensaio e precisão inter-ensaio (intermediária) estão apresentados na tabelas 54.

Os resultados mostraram que as medidas para avaliação da precisão intra e inter-ensaio foram satisfatórias, uma vez que os valores de DPR encontrados foram menores que 5% (BRASIL, 2003; MENDONÇA *et al.*, 2011).

Tabela 54: Resultados da precisão intermediária (inter-ensaio) e precisão (intra-ensaio) obtido do doseamento das suspensões no meio de dissolução empregando espectrofotometria UV/Vis.

Meios	Precisão intra-ensaio	Precisão inter-ensaio
Tampão fosfato pH 5,8	95,34	99,53
	93,64	110,72
	99,86 ± 4,46%	101,89 ± 4,35%
	96,21	100,16
	103,04	99,64
	91,10	99,35
Tampão fosfato pH 5,8 tween 80 0,5%	94,84	87,93
	88,02	78,73
	92,45 ± 2,72%	88,43 ± 4,35%
	94,52	82,72
	91,26	82,76
	93,14	85,30
Tampão fosfato pH 6,8	98,55	98,67
	97,34	94,64
	99,86 ± 1,29%	87,89 ± 3,99%
	100,74	92,46
	100,51	93,06
	99,30	96,75
Tampão fosfato pH 7,4	100,00	101,77
	100,27	94,25
	99,87 ± 2,12%	98,88 ± 2,45%
	96,57	98,09
	96,76	98,68
	101,86	98,56

5.8.5 Estabilidade das soluções da dissolução

Os resultados obtidos da avaliação da estabilidade das soluções da dissolução estão na tabela 55.

Tabela 55: Coeficientes de correlação de curvas de calibração lidas por um período de 48 horas (armazenadas em temperatura ambiente).

Tempo inicial	15 horas	24 horas	38 horas	48 horas
0,9996	0,9995	0,9995	0,9997	1,0000

As soluções se mantiveram estáveis por um período de 48 horas à temperatura ambiente. No tempo de 38 horas foi observado fungos na solução branco e na solução padrão na concentração de 3,1 µg/mL. As soluções foram lidas no comprimento de onda de 359 nm, usando tampão fosfato pH 7,4 como branco e os resultados foram satisfatórios. Recomenda-se que as soluções de dissoluções sejam estocadas por um período máximo de 24 horas em refrigerador a fim de evitar a contaminação por fungos (HANSON, 2004). O resultados mostram que, mesmo em temperatura ambiente, como foram submetidas as amostras, as soluções se mostraram estáveis.

5.8.6 Limite inferior de quantificação (LQ) e limite inferior de detecção (LD)

Os resultados para os limites de quantificação e detecção foram obtidos a partir das curvas analíticas e estão apresentados na tabela 56 abaixo. Dois meios de dissolução foram avaliados: tampão fosfato pH 5,8 e tampão fosfato pH 7,4.

Tabela 56: Resultados do limite de quantificação e detecção (valores médios de 3 curvas de calibração).

Meios de dissolução	Limite de Quantificação (µg/mL)	Limite de Detecção (µg/mL)
Tampão fosfato pH 5,8	0,56	0,17
Tampão fosfato pH 7,4	2,32	0,69

5.9 ESTUDO DE ESTABILIDADE

O planejamento do estudo de estabilidade foi realizado seguindo o cronograma mostrado no quadro 3.

Quadro 3 - Planejamento estudo estabilidade 40°C por 90 dias.

Produto	suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL
Inicial	28/02/2011
15 dias	15/03/2011
30 dias	30/03/2011
60 dias	29/04/2011
90 dias	30/05/2011

Foram preparados três lotes de suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL dos fornecedores D, H e P. As amostras foram envasadas em frasco de vidro âmbar de 250 mL, tampadas com rolha plástica de polietileno.

No tempo inicial, a suspensão apresentava-se como suspensão amarela, com sabor adocicado e leve sabor cítrico de laranja.



Figura 37 – Aspecto da suspensão de sulfassalazina no tempo inicial do estudo de estabilidade

O tamanho inicial das partículas é apresentado na tabela 57:

Tabela 57 - resultados do tamanho de partícula nas suspensões D, H e P no tempo inicial para estudo de estabilidade.

Formulação	D ₁₀ µm	D ₅₀ µm	D ₉₀ µm	span
D	0,95	2,01	6,86	2,94
H	0,87	2,05	6,13	2,56
P	0,88	2,44	7,42	2,68

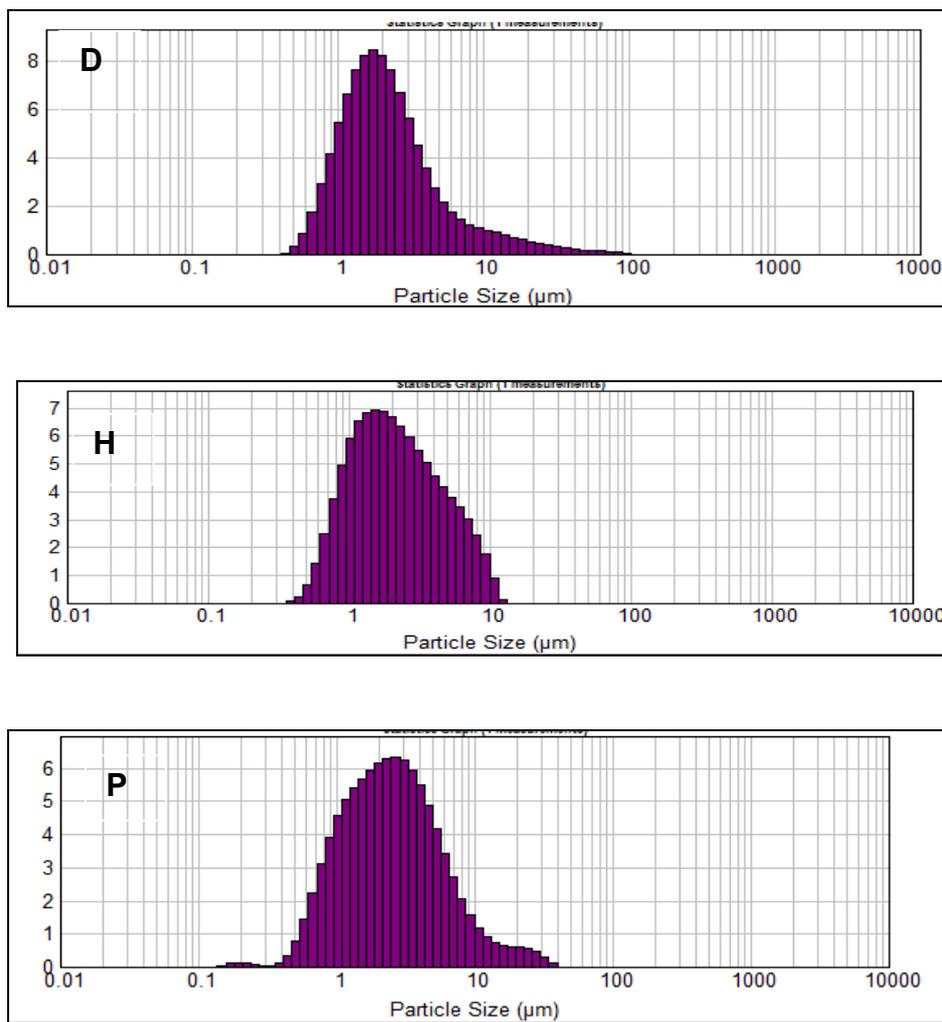


Figura 38: Distribuição do tamanho de partículas das suspensões D, H e P no tempo inicial da estabilidade.

Observamos que as partículas, nos três lotes em estudo, apresentaram para os três fornecedores tamanhos de partículas bem próximos. O *span*, que é um parâmetro estatístico útil na determinação da distribuição das partículas, foi calculado pela fórmula $(D_{90} - D_{10})/D_{50}$. Um *span* alto, pode ser devido a um alto valor de D_{90} e baixo D_{10} ou, a um valor moderado de D_{90} e D_{10} ou seja, se a diferença entre D_{90} e D_{10} for alto, o valor de *span* é alto. Por outro lado, um valor baixo de *span*, pode resultar de moderado valor de D_{90} , D_{50} e comparativamente baixo D_{10} . Alto valor de *span* pode representar valor alto de D_{90} que pode significar partículas grandes susceptíveis à sedimentação. Dessa forma, devemos avaliar cada valor de D_{10} , D_{50} e D_{90} para avaliar o *span* (SARKAR *et al*, 2005). Se considerarmos a curva Gaussiana e sua simetria em torno da média (figura 38),

podemos verificar que não houve uma simetria em torno da média, refletindo assim, nos valores altos de *span*, esses resultados mostram presença de aglomerados. O único procedimento mecânico realizado para redução do tamanho da partícula nesse trabalho foi a trituração do fármaco com o tensoativo. Partimos de matérias-primas micronizadas, mas que apresentaram distribuição de partículas irregulares, devido a aglomeração, com valores de *span* altos. Dentro deste contexto, não pode-se esperar *span* com valores menores que 1,5 nas suspensões preparadas (JUNYAPRESERT *et al.*, 2008).

O tamanho da partícula das suspensões armazenadas à 40°C foi avaliado após 90 dias (figura 39). As formulações D e P apresentaram valores de *span* próximos ao tempo inicial, enquanto a formulação H apresentou *span* alto, que pode ser confirmado pelo gráfico de distribuição das partículas. O *span* elevado da formulação H pode ser devido à presença de aglomerados, caracterizando partículas maiores na suspensão H, devido a formação de aglomerados.

Os valores encontrados para o tamanho de partícula após 90 dias de teste de estabilidade estão mostrados na tabela 58:

Tabela 58 - Resultados do tamanho de partícula nas suspensões D, H e P após 90 dias armazenadas à 40°C para estudo de estabilidade.

Formulação	D₁₀ µm	D₅₀ µm	D₉₀ µm	<i>span</i>
D	0,79	2,41	8,70	3,28
H	0,77	2,60	26,11	9,73
P	0,78	2,29	6,61	2,54

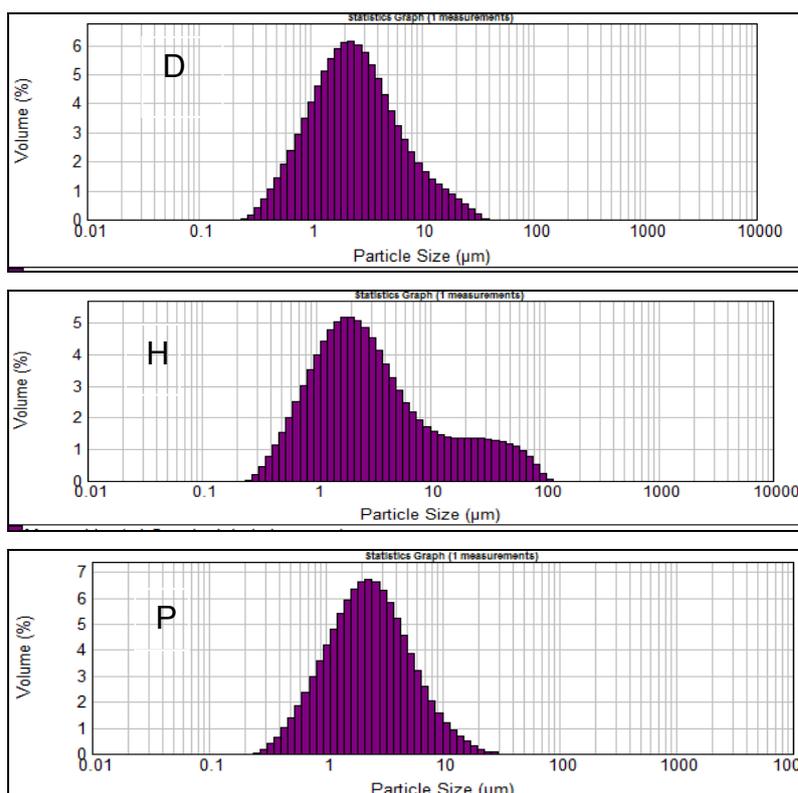


Figura 39 - distribuição do tamanho de partícula das suspensões D, H e P após 90 dias à 40°C.

Para confirmar a distribuição das partículas e o *span* elevado foi realizada a microscopia ótica em dois aumentos (50 µm e 100 µm) de cada suspensão (D, H e P) após 90 dias de estudo de estabilidade à 40°C.

Fornecedor D

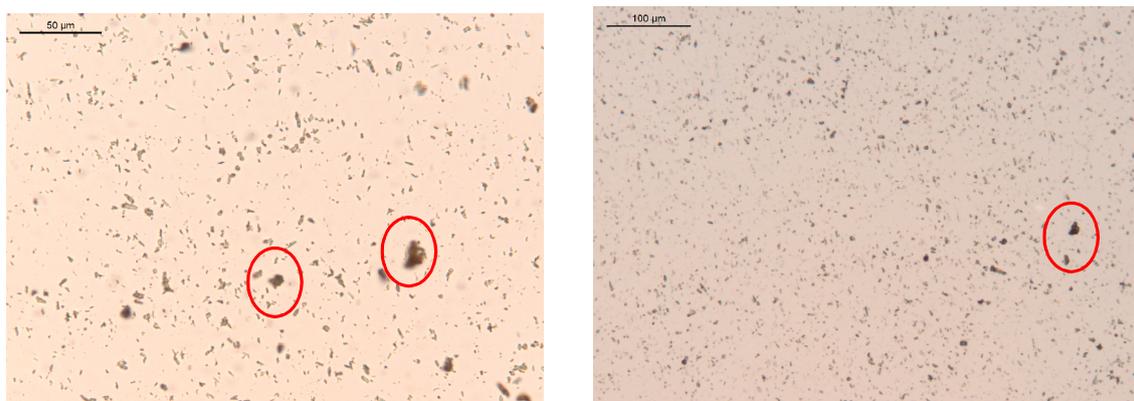
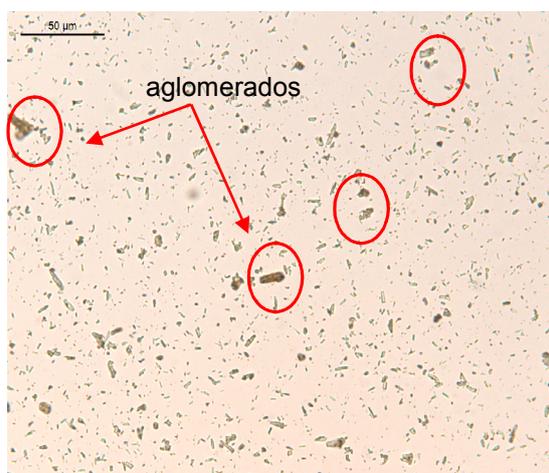


Figura 40 - Microscopia ótica das suspensões de sulfassalazina 250 mg/5 mL, fornecedor D, após 90 dias à 40°C em duas escalas (50 µm e 100 µm).

Fornecedor H



Fornecedor P

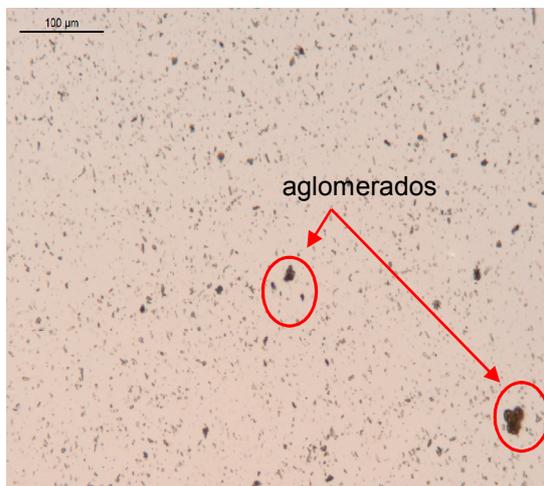
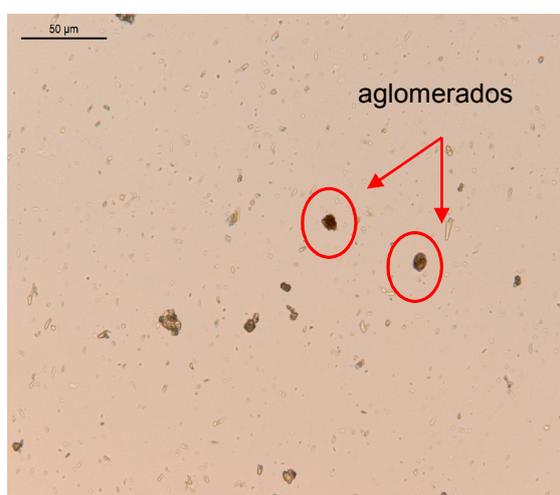


Figura 41 - Microscopia ótica das suspensões de sulfassalazina 250 mg/5 mL, fornecedor H e P, após 90 dias à 40°C em duas escalas (50 µm e 100 µm).

Pela microscopia ótica (figura 40 e 41) é possível observar que as três suspensões D, H e P apresentaram aglomerados, que são as partículas maiores, o que justifica os valores altos de span. Devido ao perfil do gráfico de distribuição do fornecedor H, onde foram encontradas partículas de 26 µm (D_{90}), elevando assim o valor de span, o que pode ser observado na foto da microscopia ótica. Porém, não foram encontradas em nenhuma das três suspensões, partículas maiores que 50 µm, situação crítica no caso de dispersões grosseiras (AULTON, 2005; SINKO, 2008; ANSEL, 2006).

Devido à presença desses aglomerados, houve preocupação com o comportamento das suspensões frente aos valores de potencial zeta ζ , que foi medido nas suspensões armazenadas à 40°C por 90 dias. Os resultados estão apresentados na tabela 59 a seguir:

Tabela 59 – Valores de potencial zeta ζ (média de 3 medições em mV \pm dp) obtidos para as 3 suspensões de SSZ dos fornecedores D, H e P após armazenamento à 40°C por 90 dias.

D	H	P
- 51,37 \pm 2,21	- 55,60 \pm 3,28	- 56,23 \pm 1,18

De acordo com os resultados do potencial zeta ζ verifica-se que as forças de repulsão predominam sobre as de atração, evitando assim a formação de caking, caracterizando assim a suspensão como defloculada.

Os valores de pH (figura 39a) se mantiveram constantes durante todo o estudo de estabilidade para os lotes das suspensões D, H e P. Houve diminuição significativa do valor da viscosidade (figura 39b) nos 30 dias iniciais de estudo de estabilidade e depois se manteve constante. A queda no valor da viscosidade (cps) pode ter sido provocada por aglomerados de partículas e também devido ao aumento da temperatura. Essa teoria leva em consideração que, ao invés de ter um número maior de partículas promovendo a repulsão, temos um número maior de aglomerados, que alteram a energia de repulsão entre as partículas, ocasionando sedimentação mais rápida por serem partículas maiores, têm velocidade de sedimentação maior (HERNÁNDEZ *et al.*, 2006).

Com relação às propriedades organolépticas, o sabor adocicado de laranja se manteve, porém o odor de laranja se apresentou mais pronunciado a partir de 30 dias de estudo, possivelmente devido a volatilização do aromatizante óleo essencial de laranja. Óleos essenciais são uma mistura de substâncias voláteis, lipofílicas, odoríferas e líquidas. Os óleos voláteis, como os extraídos da casca da laranja, são usados principalmente em alimentos, bebidas e medicamentos. São compostos voláteis e instáveis em temperatura mais elevada (SIMÕES, 2007).

Os resultados de teor pela metodologia UV/Vis e CLAE estão apresentados na figura 42 a seguir. Os dois métodos, CLAE e UV/Vis foram usados para a determinação do teor da suspensão.

Os resultados por CLAE mostram que no tempo inicial houve uma diferença significativa com relação aos resultados obtidos para UV/Vis. Estes resultados podem ter sido ocasionados pela baixa homogeneização das amostras. Desta forma, foi padronizado o tempo de agitação de dois minutos para cada suspensão antes de serem efetuados os testes de estabilidade.

Para os períodos de 15, 30, 45 e 90 dias, ambos os métodos analíticos apresentaram resultados bem próximos, mostrando assim que, mesmo com custos diferentes, podem ser utilizados no estudo de estabilidade. Vale ressaltar que, o método cromatográfico tem a vantagem sobre o espectrofotométrico, devido a possibilidade da determinação da pureza cromatográfica do pico, útil em estudos de estabilidade na determinação de possíveis produtos de degradação. Em todos os testes foi acompanhada ao longo do tempo, a pureza cromatográfica dos picos das suspensões de sulfassalazina preparadas através do detector DAD e não foi observada alteração aparente na pureza do pico para as três suspensões, comparativamente com o padrão.

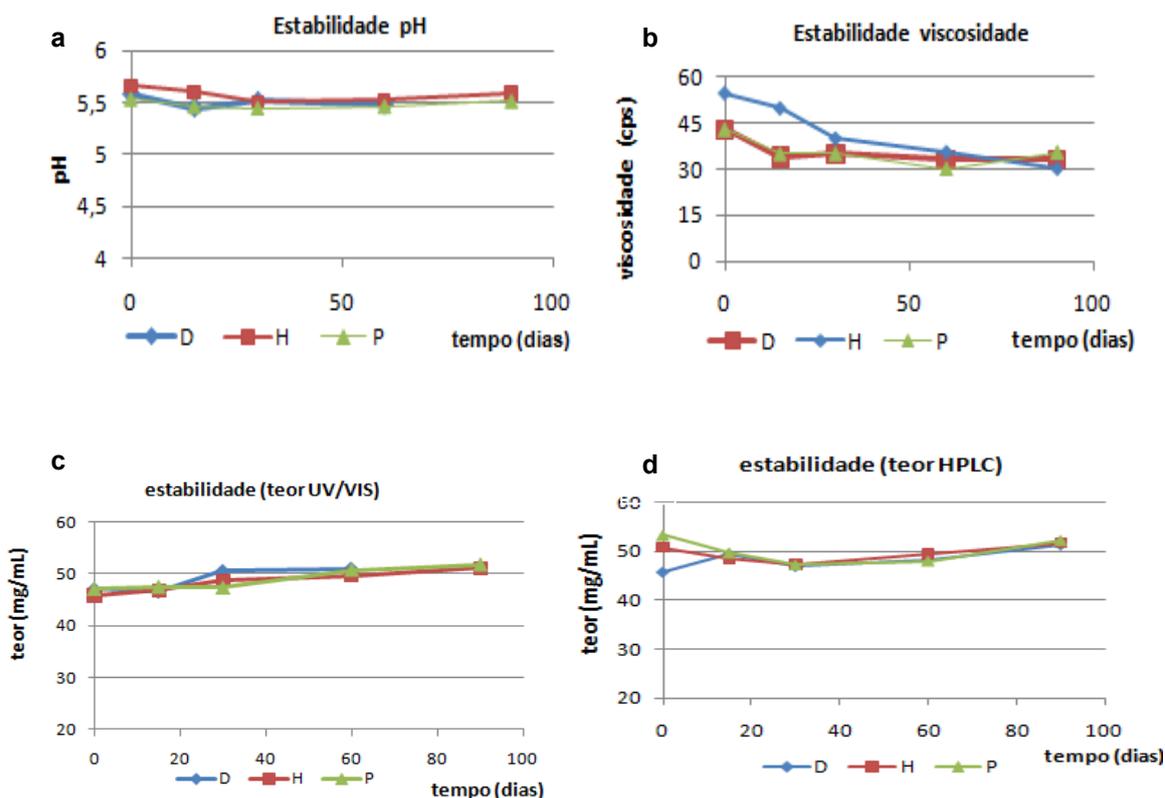


Figura 42 - Gráfico de valores de pH durante 90 dias de estudo de estabilidade (a); gráfico de valores de viscosidade (b); gráfico de teor por metodologia UV/VIS (c) e teor por CLAE (d).

A análise microbiológica foi realizada nas suspensões após 90 dias à 40°C conforme Procedimento Operacional Padrão (POP 5.102 rev. 03) do Laboratório de Microbiologia (LACMAC). Foi realizada a determinação do número total de bactérias mesófilas e fungos em produtos não estéreis e pesquisa de microrganismos patogênicos: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e

Staphylococcus aureus (FB 5ªEd., 2010e). Não houve crescimento de fungos e leveduras no caldo lactosado e de patógenos totais em caseína-soja. A pesquisa específica para os patógenos mostrou ausência de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

Os resultados do estudo de estabilidade físico-química e microbiológica estão representados nas tabelas 60, 61, 62:

Tabela 60 - Estabilidade à 40°C da suspensão de sulfassalazina 250 mg/ 5 mL (fornecedor D lote: 20090712).

Produto	Suspensão de Sulfassalazina 250 mg/5 mL				
	28/02/2011				
TESTES	Inicial	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Data de preparo/início estudo	28/02/2011				
Aspecto	De acordo	De acordo	obs*	obs*	obs*
pH	5,58	5,45	5,51	5,48	5,50
Densidade	1,0179	1,0186	1,0167	1,0188	1,0170
Viscosidade	43	34,0	35	33	33
Teor (mg/mL) UV/Vis	44,90	47,06	46,55	50,54	50,99
Teor (mg/mL) CLAE	45,72	49,36	46,87	48,33	51,23
Dissolução pontual	x	x	x	x	86,4 ± 3,6%
Tamanho de Partícula (µm)	6,96				8,70
(span)	(2,94)	x	x	x	(3,28)
<i>Escherichia coli</i>	x	x	x	x	Ausência em 1 mL
Bolores e Leveduras	x	x	x	x	< 10 UFC/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	x	x	x	x	Ausência em 1 mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	x	x	x	x	Ausência em 1 mL
Contagem padrão em placa	x	x	x	x	< 10 UFC/mL

Nota: obs*: acentuado odor cítrico de laranja, sabor adocicado e cor amarela.

Tabela 61 - Estabilidade à 40°C da suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL (fornecedor H lote: 90702).

Produto	Suspensão de Sulfassalazina 250 mg/5 mL				
Data de preparo	28/02/2011				
TESTES	Inicial	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Aspecto	De acordo	De acordo	obs*	obs*	obs*
pH	5,66	5,60	5,50	5,52	5,59
Densidade	1,0183	1,0186	1,0153	1,0181	1,0180
Viscosidade	55	50,0	40,0	35,5	35,5
Teor (mg/mL) UV/Vis	45,87	46,85	48,7	49,71	51,06
Teor (mg/mL) CLAE	50,80	48,48	47,34	49,34	51,68
Dissolução pontual	x	x	x	x	94,4 ± 3,0%
Tamanho de Partícula (µm)	6,13				26,11
(span)	(2,56)	x	x	x	(9,73)
<i>Escherichia coli</i>	x	x	x	x	Ausência em 1 mL
Bolores e Leveduras	x	x	x	x	< 10 UFC/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	x	x	x	x	Ausência em 1 mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	x	x	x	x	Ausência em 1 mL
Contagem padrão em placa	x	x	x	x	< 10 UFC/mL

Nota: obs*: acentuado odor cítrico de laranja, sabor adocicado e cor amarela.

Tabela 62 - estabilidade à 40°C da suspensão de sulfassalazina 250 mg/ 5 mL (fornecedor P lote: 20071214).

Produto	Suspensão de Sulfassalazina 250 mg/5 mL				
Data de preparo/início estudo	28/02/2011				
TESTES	Inicial	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Aspecto	De acordo	De acordo	obs*	obs*	obs*
pH	5,54	5,47	5,45	5,47	5,52
Densidade	1,0190	1,0163	1,0149	1,0176	1,0170
Viscosidade	43	35,0	35	30	30
Teor (mg/mL) UV/Vis	47,04	47,48	47,32	50,77	51,80
Teor (mg/mL) CLAE	53,28	49,64	47,15	47,95	52,28
Dissolução pontual	x	x	x	x	95,6 ± 2,5%
Tamanho de Partícula (µm)	7,42				6,61
(span)	(2,68)	x	x	x	(2,54)
<i>Escherichia coli</i>	x	x	x	x	Ausência em 1 mL
Bolores e Leveduras	x	x	x	x	< 10 UFC/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	x	x	x	x	Ausência em 1 mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	x	x	x	x	Ausência em 1 mL
Contagem padrão em placa	x	x	x	x	< 10 UFC/mL

Nota: obs*: acentuado odor cítrico de laranja, sabor adocicado e cor amarela.

5.10 DISCUSSÃO GERAL

As primeiras análises realizadas foram a caracterização das matérias-primas obtidas dos três fornecedores diferentes D, H e P. Foi importante avaliar a pureza das amostras dos fornecedores D, H e P e também avaliar itens que não são avaliados pelos fornecedores e que são fundamentais para as formulações como: tamanho de partículas, difração por raio X e DSC. Esses últimos, importantes para avaliação da presença de polimorfos (JUNYAPRASERT *et al.*, 2007; SOLIMAN, 2006; SINGHAL *et al.*, 2004). A partir dos resultados obtidos foi constatado falta do controle no tamanho das partículas para os três fornecedores. A amostra que apresentou maior valor de *span* foi a do fornecedor H, com valor de 89,32 e com tamanho médio de 6,68 µm. A amostra com melhor distribuição foi a do fornecedor P, com valor de *span* 14,54 e tamanho médio de partícula 4,67 µm. Nenhuma das amostras estudadas apresentou presença de polimorfos.

Apresentaram ainda pureza acima de 99% e forma cristalina, evidenciadas pelas técnicas de IV, DSC, Difração por raio X e ponto de fusão.

O agente suspensor escolhido foi a carboximetilcelulose sódica de alta viscosidade e a concentração foi de 0,3%, selecionado a partir dos valores de volume de sedimentação (F) obtidos. Nessa concentração de CMC, a viscosidade da suspensão foi satisfatória, apresentando facilidade de escoamento e boa redispersibilidade, características importantes para a administração de suspensões (PRISTA, 2008; AULTON, 2005). Na caracterização das partículas, o potencial zeta ζ foi um parâmetro importante, pois mostrou que houve predominância de partículas com carga negativa, importante para o controle de sedimentação e *caking*. Observou-se, considerável diminuição do tamanho das partículas na suspensão após a trituração, principalmente na amostra do fornecedor H, que teve redução de tamanho médio de 6,68 μm e *span* 89,51 para 6,43 μm e *span* 2,38. As suspensões das três amostras apresentaram valores próximos de pH, viscosidade, densidade e potencial zeta ζ .

Ambos os métodos analíticos validados para determinação do teor de sulfassalazina, apresentaram boa *performance*. Os métodos apresentaram limite de quantificação inferior à concentração da amostra para teste. O método espectrofotométrico é rápido e de baixo custo sendo acessível a todos os níveis de controle de qualidade, enquanto que o método de CLAE, embora apresente um custo mais alto, devido aos reagentes e ao equipamento, é rápido e capaz de detectar possíveis impurezas presentes, através do uso do detector de DAD para determinação da pureza cromatográfica. Foi validado também o método espectrofotométrico para o ensaio de dissolução. Essa validação foi adequada à análise quantitativa do fármaco na dissolução, tendo em vista a rapidez da análise, levando-se em conta o grande número de amostras que o perfil de dissolução proporciona (BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; POLONONI *et al.*, 2011).

O estudo da solubilidade em diferentes meios de dissolução mostrou que, com aumento do pH a solubilidade aumenta, devido ao caráter ácido da SSZ, o que foi a base para a escolha dos meios estudados (DRESSMAN *et al.*, 2007; HÖRTER *et al.*, 2001). A diferença no tamanho das partículas também refletiu em diferenças nos resultados de solubilidade entre os fornecedores.

O teor das suspensões foi medido após agitação por um minuto. A amostragem foi realizada no frasco, no topo, meio e fundo, em triplicata e duas vezes ao dia, simulando o uso. Observamos uma boa homogeneidade das suspensões preparadas, importante para a administração de doses mais exatas (PRISTA, 2008; TRINCHES *et al.*, 2004).

O estudo do perfil de dissolução mostrou que o meio mais representativo e com bom poder discriminatório foi o que usou tampão fosfato pH 7,4. As suspensões apresentaram boa *performance* na dissolução com a velocidade de rotação de 50 rpm. Embora a distribuição das partículas tenha melhorado após a trituração, o melhor *span* é com valor menor que 1 (JUNYAPRASERT *et al.*, 2008; SARKAR *et al.*, 2005), assim o valor da diferença de D_{90} e D_{10} é menor e próximo de D_{50} , suficiente para que o *span* seja menor que 1,0, caracterizando curvas gaussianas simétricas.

Dentre as inúmeras variáveis que influenciam o ensaio de dissolução, destacamos, neste trabalho, o tamanho de partículas, que no caso das suspensões, atendeu a equação de Noeys-Whitney, de que quanto menor for o tamanho da partícula, maior será sua área susperficial e mais facilmente ocorre a dissolução (FRIZON, 2011; SINKO, 2008).

O estudo de estabilidade foi muito importante para avaliarmos o comportamento das suspensões ao longo de 90 dias, armazenadas à 40°C. Todas mantiveram o teor dentro do limite esperado. As características físicas, como odor, sabor e aspecto também se mantiveram, assim como a redispersibilidade. A preocupação com o tamanho das partículas e formação de aglomerados pelo aumento da temperatura, foi avaliado através do potencial zeta (ζ) que demonstrou que as suspensões apresentaram comportamento defloculado. Os aglomerados não atingiram tamanhos superiores à 50 μm , parâmetro satisfatório para as suspensões (ANSEL, 2007; PRISTA, 2008). O teste de *performance* da dissolução, demonstrou que em 15 minutos a liberação fica acima de 85%, caracterizando a formulação como de liberação muito rápida (BRASIL, 2010). A análise microbiológica mostrou que o conservante utilizado (benzoato de sódio) foi adequado ao uso pretendido.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que:

As três matérias-primas obtidas não possuem controle de qualidade em relação à distribuição das partículas. Existe a necessidade de incluir este parâmetro de tamanho de partícula na especificação técnica das matérias-primas dos fornecedores avaliados. Para os demais requisitos, pureza, teor, ausência de polimorfismo, os três lotes analisados atenderam aos requisitos de controle de qualidade.

O controle do tamanho de partículas é importante pois podem ocorrer diferenças nas características físico-químicas como: solubilidade, viscosidade e homogeneidade das suspensões. Foi observado que o tamanho das partículas influenciou nos resultados de solubilidade, devido a presença de aglomerados. Diferenças menores de solubilidade entre os fornecedores foram evidenciadas nos meios com surfactante.

A suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL representa uma formulação de rápido preparo para uma farmácia com manipulação e para a indústria.

O método espectrofotométrico foi aplicável à quantificação de sulfassalazina na matriz da suspensão, podendo ser usado para atender um dos requisitos para o controle de qualidade da suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL.

O método cromatográfico com uso de detector de DAD também foi rápido e pode ser aplicado nos estudos de estabilidade e determinação de impurezas.

O método espectrofotométrico aplicado à análise quantitativa de sulfassalazina nos meios de dissolução apresentou especificidade e linearidade em todos os meios estudados, sendo adequado ao ensaio de dissolução.

Os métodos analíticos de quantificação de sulfassalazina na suspensão e de quantificação no ensaio de dissolução podem ser submetidos à apreciação da Farmacopéia Brasileira.

O estudo de dissolução das suspensões mostrou que a formulação apresentou dissolução muito rápida, com valor de $Q > 85\%$ em 15 minutos nos meios tampão fosfato pH 5,8, tampão fosfato pH 5,8 com tween 80 0,5%, tampão fosfato pH 6,8 e tampão fosfato pH 7,4, a uma velocidade de rotação de 50 rpm.

As suspensões dos três fornecedores apresentaram perfis de dissolução semelhantes, pois não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre os fornecedores D, H e P nos meios tampão fosfato pH 5,8, tampão fosfato pH 5,8 com tween 80 0,5%, tampão fosfato pH 6,8 e tampão fosfato pH 7,4, a uma velocidade de rotação de 50 rpm.

A suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 mL, formulada com CMC como agente suspensor a CMC, apresentou dissolução muito mais rápida quando comparada ao perfil de dissolução do comprimido referência de liberação retardada Azulfina® 500 mg.

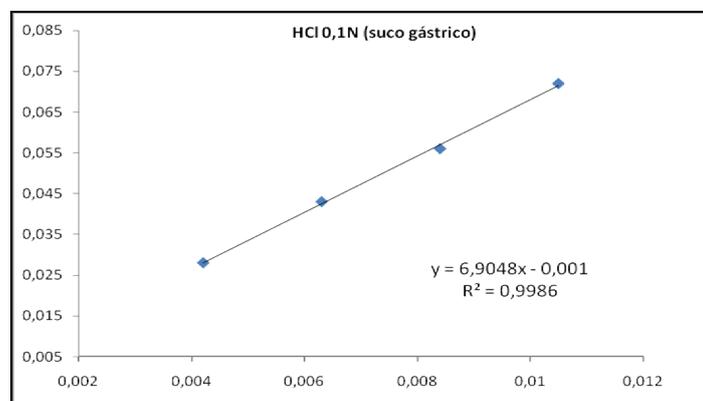
A equação matemática de Weibull, foi uma boa ferramenta para avaliar a característica das curvas de dissolução da suspensão, que se mostrou do tipo parabólica ($\beta < 1$).

As suspensões apresentaram estabilidade por um prazo de 90 dias, com características físico-químicas, microbiológicas e de performance satisfatório.

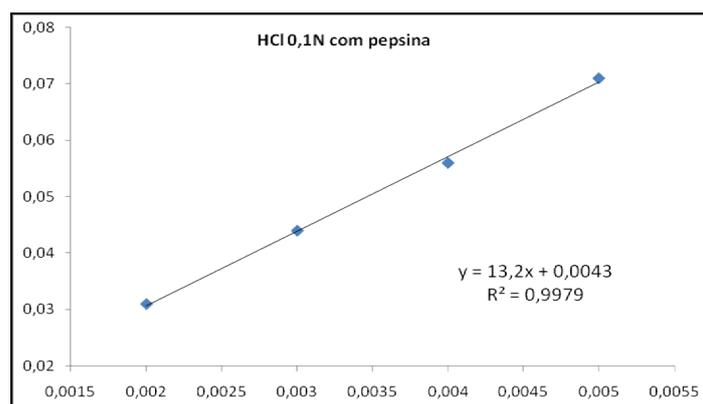
Uma suspensão oral de sulfassalazina foi desenvolvida na apresentação de 250 mg/5 mL como apresentação líquida, ainda indisponível no mercado brasileiro. Estes resultados são apresentados pela primeira vez neste trabalho.

ANEXO 1 - Curva de calibração nos diferentes meios para determinação da solubilidade em mg/mL.

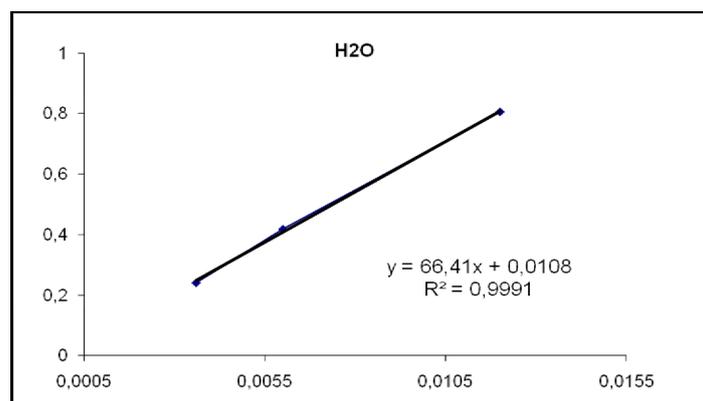
HCl 0,1N (suco gástrico)



HCl 0,1N com pepsina (suco gástrico com enzima)

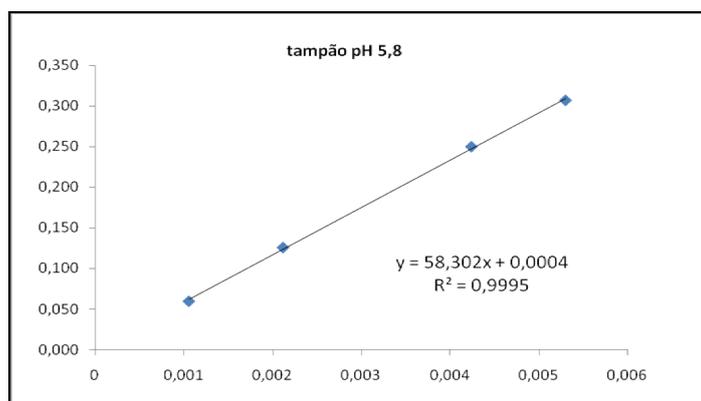


H₂O

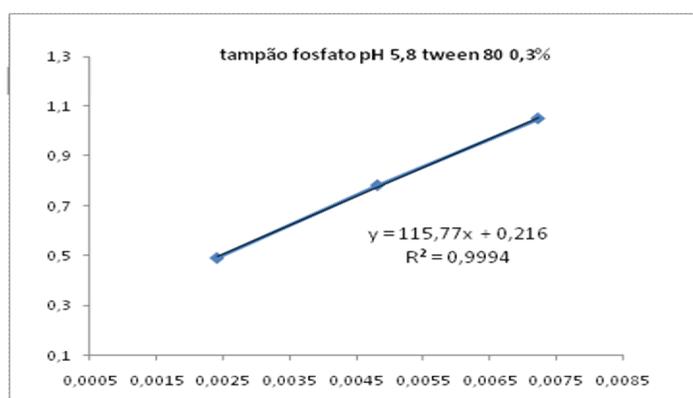


Continuação do anexo 1

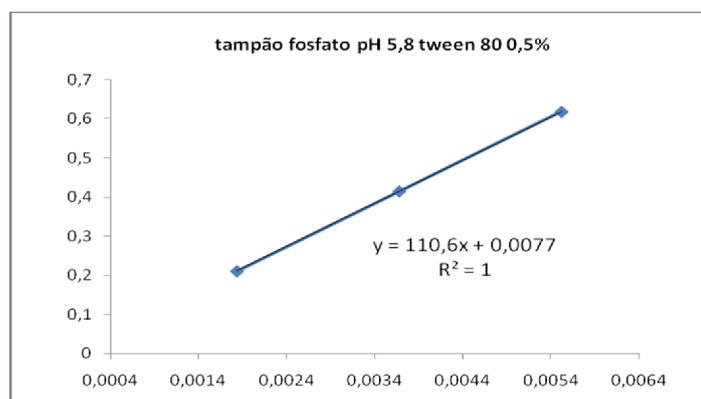
Tampão fosfato pH 5,8



Tampão fosfato pH 5,8 tween 80 0,3%

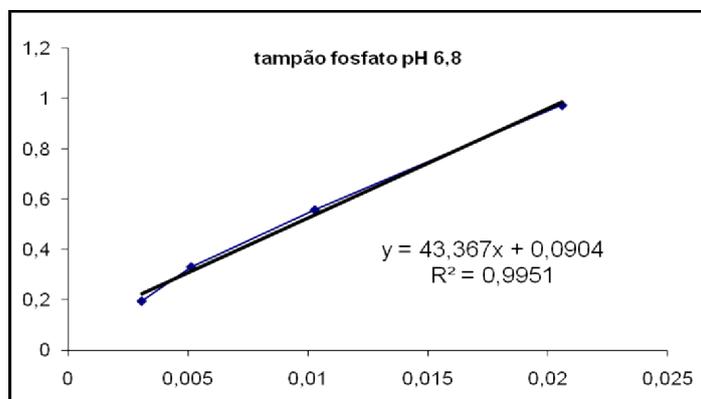


Tampão fosfato pH 5,8 tween 80 0,5%

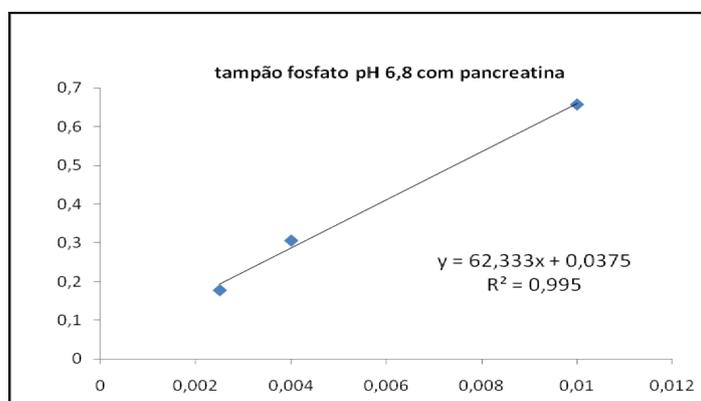


Continuação do anexo 1

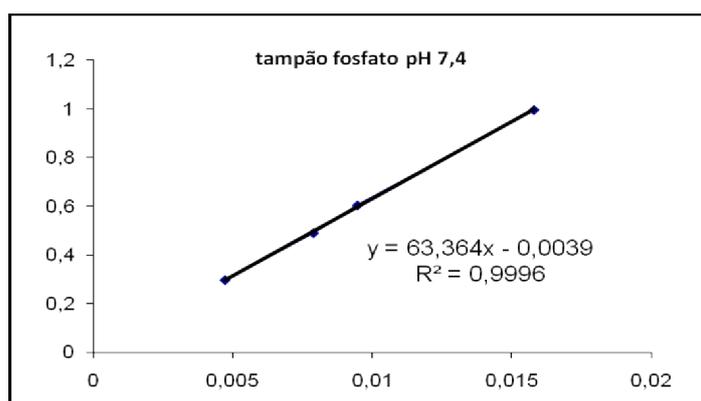
Tampão fosfato pH 6,8



Tampão fosfato pH 6,8 com pancreatina

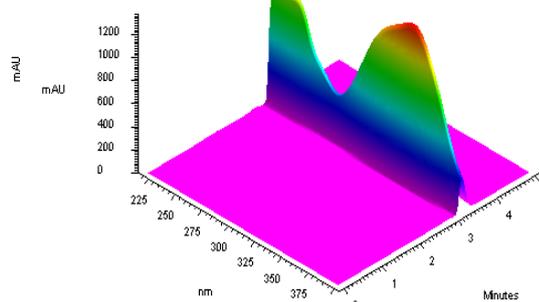
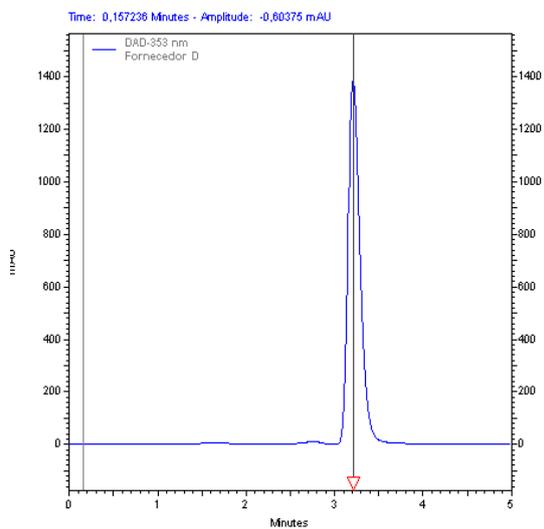


Tampão fosfato pH 7,4

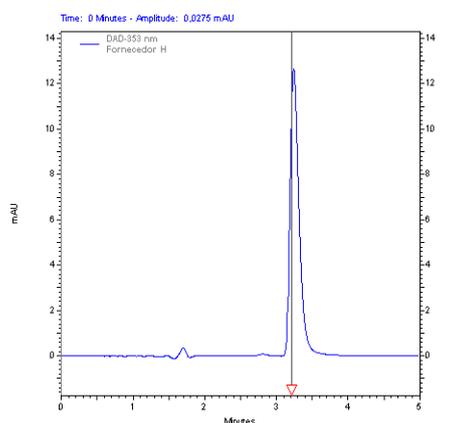
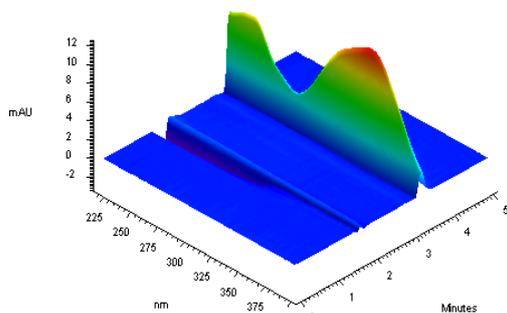


ANEXO 2 – Cromatogramas da SSZ das suspensões fabricadas com amostras dos fornecedores D, H e P e seus respectivos espectros de absorção tridimensional.

Fornecedor D

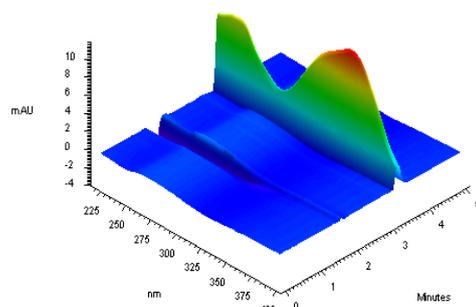
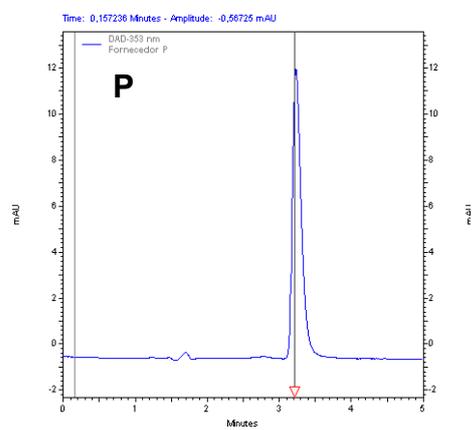


Fornecedor H



continuação do anexo 2

Fornecedor P



ANEXO 3 - Resultados do perfil de liberação das suspensões D, H e P**Meio: HCl 0,1N - 25 rpm**

25 rpm HCl 0,1N						
tempo	% diss med D	DPR (%)	% diss med H	DPR (%)	% diss med P	DPR(%)
5	10,68	25,9	8,21	22,09	7,54	25,33
10	9,00	7,5	8,90	26,48	8,04	24,11
15	8,79	6,5	9,12	27,08	8,49	28,27
30	8,74	4,7	9,11	25,36	8,51	25,74
45	9,01	3,8	9,29	28,19	8,62	30,06
60	9,02	7,6	9,27	26,09	8,63	27,30
90	10,18	7,2	10,01	26,15	9,25	28,83
120	9,47	3,9	9,89	27,40	9,40	28,37

Meio: HCl 0,1N - 50 rpm

50 rpm HCl 0,1N						
tempo	% diss med D	DPR	% diss med H	DPR	% diss med P	DPR
5	7,64	7,78	7,48	4,66	7,14	8,8
10	8,98	8,82	8,78	2,44	7,91	6,3
15	8,99	6,26	8,81	5,62	8,00	9,2
30	9,82	5,73	9,63	6,06	8,24	17,3
45	10,02	10,21	9,81	8,47	8,55	17,8
60	10,77	7,75	10,53	2,84	8,87	16,3
90	11,71	6,91	11,46	3,34	8,88	17,2
120	10,90	6,81	10,68	6,41	8,62	16,1

Meio: tampão fosfato 5,8 - 25 rpm

TAMPÃO 5,8 / 25 rpm						
tempo	% diss med D	DPR	% diss med H	DPR	% diss med P	DPR
1	66,69	10,7	84,51	6,9	90,53	8,6
5	77,70	5,5	92,52	7,3	95,43	9,2
10	79,75	3,8	95,77	5,4	98,24	8,9
15	82,26	4,3	96,53	4,5	100,14	8,1
30	82,58	4,5	97,74	4,4	101,21	7,8
60	85,19	4,1	98,66	4,7	102,21	8,6
90	83,69	4,7	95,48	11,6	102,10	8,5

Continuação do anexo 3

Meio: tampão fosfato 5,8 - 50 rpm

TAMPÃO 5,8 / 50 rpm						
tempo	% diss med D	DPR	% diss med H	DPR	% diss med P	DPR
1	78,86	17,3	81,22	8,7	79,85	6,4
5	86,61	14,5	92,56	7,2	89,16	6,5
10	89,15	13,3	96,41	5,5	99,65	6,0
15	90,16	13,0	99,13	5,6	101,88	4,4
30	89,99	13,0	100,05	5,8	102,38	6,0
60	91,48	12,3	100,84	6,3	102,25	3,1
90	91,54	12,4	100,87	6,2	101,83	2,7

Meio: tampão fosfato 5,8 tween 80 0,5% - 25 rpm

Tampão 5,8 0,5% tween 80 / 25 rpm						
tempo	% diss med H	DPR	% diss med D	DPR	% diss med P	DPR
1	82,68	6,15	60,46	32,65	79,61	7,45
5	86,23	6,91	76,62	4,83	89,40	11,57
10	86,26	6,64	79,93	6,04	93,69	9,63
15	85,93	7,72	82,74	6,27	95,27	8,87
30	84,48	7,71	82,64	3,76	96,06	7,09
60	85,48	8,77	82,75	3,51	95,75	6,05
90	86,58	6,87	83,93	4,53	96,66	6,96
120	87,00	6,49	84,01	5,06	93,21	15,30

Meio: tampão fosfato 5,8 tween 80 0,5% - 50 rpm

Tampão 5,8 0,5% tween 80 / 50 rpm						
tempo	% diss med D	DPR	% diss med H	DPR	% diss med P	DPR
1	91,49	5,50	94,46	7,15	91,00	8,40
5	94,64	4,32	98,10	8,02	93,25	8,17
10	95,61	4,89	99,50	8,14	93,93	8,09
15	92,85	7,43	101,89	9,34	93,18	8,45
30	95,51	6,01	101,82	9,02	93,15	6,89
60	95,01	4,68	102,71	9,24	94,36	7,18
90	92,37	2,72	102,33	9,25	94,29	7,56

Continuação do anexo 3

Meio: tampão fosfato 6,8 – 25 rpm

tampão 6,8 / 25 rpm						
tempo	% diss med D	DPR	% diss med H	DPR	% diss med P	DPR
1	95,57	1,66	87,15	5,63	83,25	6,68
5	98,27	0,94	89,97	5,22	92,22	3,06
10	99,38	1,09	92,96	4,31	94,38	4,74
15	99,38	1,29	94,55	4,18	93,91	3,99
30	99,87	1,10	94,95	4,59	94,24	6,22
60	100,90	1,73	95,91	3,92	95,27	4,81
90	100,81	1,67	96,14	3,49	95,17	4,80
120	100,68	1,51	96,02	3,49	95,16	4,86

Meio: tampão fosfato 6,8 – 50 rpm

tampão 6,8 / 50 rpm						
tempo	% diss med D	DPR	% diss med H	DPR	% diss med P	DPR
1	96,31	3,47	91,99	3,29	95,09	4,85
5	98,97	1,54	95,97	6,13	98,17	4,16
10	99,55	1,35	97,87	4,98	98,82	4,45
15	100,36	2,08	97,04	4,13	98,16	5,28
30	101,16	1,20	98,23	3,97	98,63	5,91
60	101,48	1,53	99,01	4,39	99,38	5,01
90	101,73	1,49	99,64	3,99	99,78	4,33
120	100,91	1,95	99,33	3,47	100,29	4,83

Meio: tampão fosfato 7,4 – 25 rpm

tampão 7,4 / 25 rpm						
tempo	% diss med D	DPR	% diss med H	DPR	% diss med P	DPR
1	93,31	4,10	91,82	1,24	95,73	4,52
5	97,32	3,10	96,07	2,15	97,24	4,51
10	98,69	3,13	97,75	1,09	97,84	4,10
15	99,22	2,30	98,37	2,45	98,03	4,82
30	98,60	2,74	98,58	2,51	98,14	4,55
60	99,65	2,36	99,71	1,67	98,93	4,17
90	99,41	2,28	99,88	2,46	99,13	4,20
120	98,51	2,76	99,83	2,36	99,36	4,79

Continuação do anexo 3

Meio: tampão fosfato 7,4 – 50 rpm

tampão 7,4 / 50 rpm						
tempo	% diss med D	DPR	% diss med H	DPR	% diss med P	DPR
1	92,85	4,29	93,17	2,12	98,02	6,62
5	97,76	4,65	98,78	0,89	99,95	6,54
10	99,23	5,75	99,51	1,38	100,34	4,17
15	100,09	5,85	100,05	1,88	100,77	5,43
30	100,07	5,05	99,88	2,46	101,10	6,75
60	100,89	6,32	100,64	1,44	101,61	5,00
90	101,61	6,27	101,00	2,20	101,70	5,12
120	100,26	6,44	101,77	1,13	101,15	5,53

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, E.; COOMANS, D.; VERBEKE-SMEYERS, J.; MASSART, D.L. Non-linear mixed effects models for the evaluation of dissolution profiles. **International Journal of Pharmaceutics**, 240, p. 37-53, 2002.

AGUIAR, G.; FARIA, L.G.; FERRAZ, H.G.; SERRA, C.H.R.; PORTA, V. Avaliação biofarmacotécnica in vitro de formas farmacêuticas sólidas contendo doxiciclina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 41, p. 451-458, 2005.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de liberação de Fármacos**. 8. ed. Editoria Artmed, p. 415 - 424, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR14597**: Precisão de métodos analíticos – Determinação da repetibilidade e reprodutibilidade de métodos para ensaios de produtos químicos – Estudo intralaboratorial. Rio de Janeiro, 2000. 31 p.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. trad. ORTEGA, *et al.* 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

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

AZEVEDO, R.C.P; RIBEIRO,P.G.; ARAÚJO.M.B. Desenvolvimento e validação do ensaio de dissolução para captopril em cápsulas magistrais por CLAE. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 44(2), p. 260-269, 2008.

AZULFIN[®] Sulfassalazina. Farmacêutico responsável: Eduardo Sérgio Medeiros Magliano. São Paulo; Apsen Farmacêutica S/A, Bula.

BAKAR, O.; GURBUZ, O. Is there a role for Sulfasalazine in the treatment of alopecia areata? **Journal American Academy of Dermatology**, 57, p.703–706, 2007.

BAXTER, J.L.; KUKURA, J.; MUZZIO, F.J. Hydrodynamics-induced variability in the USP apparatus II dissolution test. **International Journal of Pharmaceutics**, 292, p. 17-28, 2005.

BEBBIINGTON, M.; LAI, C.D.; ZITIKIS, R. A Flexible Weibull extension. **Reliability Engineering and System Safety**, 92, p.719-726, 2007.

BHARDWAJ, U.; BURGESS, D.J. A novel USP apparatus 4 based release testing method for dispersed systems. **International Journal of Pharmaceutics**, 388, p.287 – 294, 2010.

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 jun. 2003. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br>: último acesso em 07/03/10.

BRASIL. Resolução nº 31, de 11 de agosto de 2010. Dispõe sobre estudos de equivalência farmacêutica e de perfil de dissolução comparativo. **Diário Oficial da União**, Brasília, 12 agosto. 2010. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br>: último acesso em 12/06/11.

BRASIL. Resolução nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para realização de estudos de estabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, 01 agosto 2005. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br>: último acesso em 28/02/11.

CDER/FDA. Guidance for Industry. dosage forms, 2005. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>.

CLARYSSE, S.; BROUWERS, J.; TACK, J.; ANNAERT, P.; AUGUSTIJNS, P. Intestinal drug solubility estimation based on simulated intestinal fluids: Comparison with solubility in human intestinal fluids. **European Journal of Pharmaceutics Sciences**, 43, p. 260- 269, 2011

COSTA, P.; LOBO, J.M.S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutics Sciences**, 13, p.123 –133, 2001.

CHUNG, M.; SILVA, A.T.A.; CASTRO, L.F.; GUIDO, V.C.; NASSUTE, J.C.; FERREIRA, E.I. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 41 (2), p. 155-179, 2005.

DAHAN, A.; AMIDON, G.L. MRP2 mediated drug–drug interaction: Indomethacin increases sulfasalazine absorption in the small intestine, potentially decreasing its colonic targeting. **International Journal of Pharmaceutics**, 386, p. 216–220, 2010.

DOKOUMETZIDIS, A.; PAPADOPOULOU, V.; MACHERAS, P. Analysis of Dissolution Data Using Modified Versions of Noyes-Whitney Equation and the Weibull Function. **Pharmaceutical Research**, 23 (2), p. 256-261, 2006.

DRESSMAN, J.B.; VERTZONI, M.; GOUMAS, K.; REPPAS, C. Estimating drug solubility in the gastrointestinal tract. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 59, p. 591-602, 2007.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5. edição. Brasília: 2010a. 5.2.2 **Determinação do ponto ou intervalo de fusão.**

_____. 5. edição. Brasília: 2010b. 4. **Generalidades.**

_____. 5. edição. Brasília: 2010c. 5.2.7 **Determinação de viscosidade.**

_____. 5. edição. Brasília: 2010d. 5.1.5 **Teste de Dissolução.**

_____. 5. edição. Brasília: 2010e. 5.5.3 **Ensaio Microbiológicos.**

FONSECA, L.B. **Desenvolvimento e validação de método de dissolução aplicado a suspensões orais de nimesulida.** Rio de Janeiro: 2007, 151 p. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

FRIZON, F. **Obtenção e caracterização das propriedades de dispersões sólidas de loratadina em polivinilpirrolidona.** São Paulo: 2011, 102 p. Dissertação (mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

GARCIA, V.C.; PAIM, C.C.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E.S.E. Development and validation of a dissolution test for rabeprazole sodium in coated tablets. **Journal of Pharmaceuticals and Biomedical Analysis**, 41, p. 833-837, 2006.

GEHRING, P.A.F.; SANTOS, O.M.M.; PEREIRA, G.R.; ARAÚJO, M. B.; BONFILIO, R. Estabelecimento de condições para ensaio de dissolução de cápsulas de Cinarizina empregando planejamento fatorial. **Química Nova**, 34 (3), p. 455-461, 2011.

GENC,H.; CAKIT,B.D.; NACIR,B.; SARACOGLU,M.; KACAR,M.; ERDEM,H.R. The effects of Sulfasalazine treatment on enthesal abnormalities of inflammatory rheumatic diseases. **Clinical Rheumatology**, 26, p.1104 – 1110, 2007.

GIL, E. S. **Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos**. São Paulo: Editora Phamabooks, 2010. 511 p.

GLASS, B.D.; HAYWOOD, A. Stability considerations in liquid dosage forms extemporaneously prepared from commercially available products. **Journal Pharmaceutical Sciences**, 9 (3), p. 398-426, 2006.

HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS. 2° Ed. Edited by Ainley Wade, Paul J Wellwe, London, 1994.

<http://www.usp.org/USPNF/submitMonograph/newMon.html>, acessada em Junho 2011.

http://www.malvern.com/LabEng/education/elearning/mastersizer/mastersizer_elearning.htm, acessada em maio de 2011

<http://portal.anvisa.gov.br/home/medicamentos>, acessada em Junho 2011.

HANH, D.B.; NEUBERT, R.H.H.; WARTEWIG, S. Investigation of drug release from suspension using FTIR-ATR technique: part II. Determination of dissolution coefficient of drugs. **International Journal of Pharmaceuticals**, 204, p.151-158, 2000.

HANSON, R.; GRAY, V. **Handbook of Dissolution Testing**. USA: Dissolution Technologies, Incorporated, 2004, 199 p.

HEIGOLDT, U.; SOMMER, F.; DANIELS, R.; WAGNER, K.G. Predicting in vivo absorption behavior of oral modified release dosage form containing pH-dependent poorly soluble drugs using a novel pH-adjusted biphasic in vitro dissolution test. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 76, p.105-111, 2010.

HERNÁNDEZ, F.J.R.; RUBIO, M.F.; NAVARRO, J.F.; ROSALES, F.J. Intrinsic viscosity of SiO₂, Al₂O₃ and TiO₂ aqueous suspensions. **Journal of Colloid and Interface Science**, 298, p. 967 – 972, 2006.

HÖRTER, D.; DRESSMAN, J.B. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 46, p.75-87, 2001.

HOTZA, D. Colagem de folhas cerâmicas. **Cerâmica**, 43, p. 283–284, 1997.

HOYT, J.A.; FISHER, L.F.; SWISHER, D.K. Short-term male reproductive toxicity study with Sulfasalazine in the rat. **Reproductive Toxicology**, 9 (3), p. 315-326, 1995.

HUANG, L.; TONG, W.T. Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 56, p. 321-334, 2004.

ICH; International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Q2B(R1): **Guideline on Validation of Analytical Procedure-Methodology**, 2005.

JILLAVENKATES, A.; DAPKUNAS, S. J.; LUN, S. Particle size Characterization. Special Publication 960-1, NIST – National Institute of standards and Technology, 2001.

JUNYAPRESERT, V.,B.; MANWIWATTANAKUL, G. Release profile comparison and stability of diltiazem-resin microcapsules in sustained release suspensions. **International Journal of Pharmaceutics**, 352, p. 81-91, 2008.

JUNIOR, J.C.M.S. Doença Intestinal Inflamatória – Retocolite Ulcerativa II. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, 19, p. 29-34, 1999.

KANO, E.K.; CHANG, K.H.; ROLIM, C.M.B.; KOONO, E.E.; BENASSI, E.M.; PORTA, V.; SERRA, C.H.R. Avaliação dos perfis de dissolução do Cefadroxil a partir de formas farmacêuticas Sólidas de liberação imediata. **Latin American Journal of Pharmacy**, 26 (3), p.375-381, 2007.

KASIM, N. A.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAN C.; BERMEJO M.; LENNERVA H.; HUSSAIN, A. S.; JUNGINGER, H. E.; STAVCHANSKY, S. A.; MIDHA, K. K.; SHAH, V. P.; AMIDON, G. L.; Molecular Properties of WHO Essential and Provisional Biopharmaceutical Classification. **Mol. Pharm**; **2004**, 1 (1), p. 85-96, 2004.

KIEHM, K.; DRESSMAN, J. Evaluation of Drug Adsorption to Membrane Filters under Biowaiver Test Conditions. **Dissolution Technologies**, 2008.

KOSMIDIS, K.; MACHERAS, P. Monte Carlo simulations for the study of drug release from matrices with high and low diffusivity areas. **International Journal of Pharmaceutics**, 343, p.166-172, 2007.

KUMAGAI,S.; KOMADA, F.; KITA, T.; MORINOBU, A.; OZAKI,S.; ISHIDA, H.; SANO, H.; MATSUBARA, T.; OKUMURA, K. N-Acetyltransferase 2 Genotype-Related Efficacy of Sulfasalazine in Patients with Rheumatoid Arthritis. **Pharmaceutical Research**, 21 (2), p. 324-329, 2004.

LAMPRECHT, A.; TORRES, H. R.; SCHÄFER, U.; LEHR, C-M. Biodegradable microparticles as a two-drug controlled release formulation: a potential treatment of inflammatory bowel disease. **Journal of Controlled Release**, 69, p.445-454, 2000.

LANÇAS, F.M. **Cromatografia Líquida Moderna HPLC/CLAE**. São Paulo: Editora Átomo, 2009. 382 p.

LIANG, E.; PROUDFOOT, J.; YAZDANIAN,M. Mechanisms of Transport and Structure-Permeability Relationship of Sulfasalazine and Its Analogs in Caco-2 Cell Monolayers. **Pharmaceutical Research**,17 (10), p. 1169 – 1174, 2000.

MANADAS, R.; PINA, M.E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Brazilian Journal of Pharmaceutics Sciences**, 38 (4), p. 375-399, 2002.

MARTINS, P.; BORREGO, L.M.; PRATES, S.; PIRES, G.; SANTA MARTA, C.; PINTO, P.L.; PINTO, J.R. Sulfasalazine use in treatment of chronic idiopathic urticaria – Experience of an outpatient immunoallergy clinic. **Revista Portuguesa imunoalergologia**, 13 (2), p. 165-170, 2005.

MENDONÇA, T.F.; BARROS, E. G.; PEREIRA, G.R.; ARAÚJO, M. B.; BONFILIO, R. MENEGOLA, J.; STEPPE. M.; SCHAPOVAL, E.E.S. Dissolution test for citalopram in tablets and comparison of in vitro dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 67, p. 524-530, 2007.

MENDONÇA, T.F.; BARROS, E. G.; PEREIRA, G. R.; ARAÚJO, M. G.; BONFILIO, R. Development and Validation of a Dissolution test for Diltiazem Hydrochloride in Immediate Release Capsules. **Química Nova**, 34 (3), p. 520-526, 2011

MERCK INDEX. 13.Ed. New Jersey: Merck & Co, p. 9028, 2001

MIKULÁSEK, P.; WAKEMAN, R. J.; MARCHANT, J.Q. The influence of pH and temperature on the rheology and stability of aqueous titanium dioxide dispersions. **Chemical Engineering Journal**, 67, p.97-102, 1997.

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

MOFFAT, C.A.; OSSELTON M. D.; WIDDOP, B. *Clarke's Analysis drugs and Poison*, 3 Ed., Vol.2, Pharmaceutical Press, 2004.

MOHAMED, G. G.; SOLIMAN, A. A.; EL-MAWGOOD, M, A. Structural and thermal characterization of cerium, thorium and uranyl complexes of sulfasalazine. **Spectrochimica acta part A**, 62, p. 1095-1101, 2005.

MOSHARRAF, M.; NYSTROM, C. The effect of particle size and shape on the surface specific dissolution rate of microsized practically insoluble drugs. **International Journal of Pharmaceuticals**, 122, p.35-47, 1995.

MOTHÉ, C.G.; AZEVEDO, A.D. **Análise Térmica de Materiais**. São Paulo: Editora Artliber, 2009. 324 p.

OKUBO, S.; NAKATANI, K.; NISHIYA, K. Gastrointestinal symptoms associated with enteric-coated sulfasalazine (Azulfidine EN tablets). **Mod. Rheumatology**, 12, p. 226-229, 2002.

OLIVEIRA, A. M. C.; LOWEN, T.C.R.; CABRAL, L. M.; SANTOS, E. M.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C.; SANTOS, T. C. Development and validation of a HPLC-UV method for the determination in Didanosine tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 38, p. 751-756, 2005.

PAPADOPOULOU, V.; KOSMIDIS, K.; VLACHOU, M.; MACHERAS, P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **International Journal of Pharmaceuticals**, 309, p. 44-50, 2006.

PATEL, N.; CHOTAL, N.; PATEL, J.; SANI, T.; DESAL J.; PATEL, R. Comparison of in Vitro Dissolution Profiles of Oxcarbazepine-HP β -CD Tablet formulations with marketed Oxcarbazepine Tablets. **Dissolution Technologies**, 2008.

POLONINI, H.C.; SANTOS, F.C.; VAZ, U. P.; BRANDÃO, M.A.F.; RAPOSO, N.R.B.; FERREIRA, A.O. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de teor de Sinvastatina em cápsulas magistrais. **Química Nova**, 34 (3), p. 516-519, 2011.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. R. **Tecnologia Farmacêutica**. Ed. Fundação Calouste Gulbenkian. v. 1., 7. ed. 2008. p. 683 – 732

QURESHI, A. I.; COHEN, R. D. Mesalamine delivery systems: do they really make much difference? **Advanced Drug Delivery Reviews**, 57, p.281-302, 2005.

REFAT, M. S.; MOHAMED, S. F. Spectroscopic, thermal and antitumor investigations of sulfasalazine drug in situ complexation with alkaline earth metal ions. **Spectrochimica Acta Part A**, 11, p.1386 – 1425, 2011.

RIBANI, M.; BOTOLLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação de métodos analíticos e eletroforéticos. **Química Nova**, 27 (5), p. 771-780, 2004.

RUELA, A. L. M.; ARAÚJO, M. B.; PEREIRA, G. R. Desenvolvimento e validação de um método analítico rápido por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de nimesulida em estudos de liberação in vitro. **Química Nova**, Vol. 32 (1), p. 165-168, 2009.

SARKAR, A.; RANO, R.; MISHRA, K. K.; SINHA, I. N. Particle size distribution profile of some Indian fly ash – a comparative study to assess their possible uses. **Fuel Processing Technology**, 86, p. 1221-1238, 2005.

SEHIC, S.; BETZ, G.; HADZIDEDIC, S.; EL-ARINI, S. K.; LEUENBERGER, H. Investigation of intrinsic dissolution behavior of different Carbamazepine tablets. **International Journal of Pharmaceutics**, Switzerland, 386, p. 77-90, 2009.

SHAH, V. P.; SIEWERT, M.; DRESSMAN, J.; MOELLER, H.; BROWN, C. K. Dissolution/In Vitro Release Testing of Special Dosage Forms. **Dissolution Technologies**, 2002.

SIEWERT, M.; DRESSMAN, J.; BROWN, C.K.; SHAH, V. P. Guidelines to Dissolution/in Vitro Release Testing of Novel/Special Dosage Forms. **AAPS PharmSciTech**, 4 (1), p. 1-10, 2003.

SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Santa Catarina: Ed. da UFSC, 2007. 1104 p.

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

SILVA, A. M. **Estudo para o desenvolvimento de comprimidos dose fixa combinada (DFC) 3 em 1 para o tratamento da tuberculose**. Rio de Janeiro: 2010, 156 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SINKO, P. J. **Físico-farmácia e Ciências Farmacêuticas**. Porto Alegre: Artmed, 2008, 809 p.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. Porto Alegre, Bookman – Artmed, 2007, 1055 p.

SOLIMAN, A. A. Spectral and thermal study of the ternary complexes of nickel with sulfasalazine and some amino acids. **Spectrochimica Acta Part A**, 65, p. 1180-1185, 2006.

STEINHART, A. H.; HEMPHILL, D.; GREENBERG, G. R. Sulfasalazine and Mesalazine for the Maintenance Therapy of Crohn's Disease: A Meta-Analysis. **American Journal Gastroenterology**, 89, p. 2116-2124, 1994.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009, 316 p.

TAGLIARI, M. P.; STULZER, H. K.; ASSREUY, J.; BRESOLIN, T. M. B.; SILVA, M. A. S. Evaluation of Physicochemical Characteristics of Suspensions Containing Hydrochlorothiazide Developed for Pediatric Use. **Latin American Journal of Pharmacy**, 28 (5), p. 734-40 , 2009.

TRINCHES, R. C.; SAEGER, S. C.; PEREIRA, S. N.; BARROS, R. C.; CHIAVEGATTO, L.F.; LIMA, L. M. T. Desenvolvimento e estabilidade de suspensões

de Sulfassalazina em xarope. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, Brasil, 6 (4), p.198–201, 2004.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. Official monographs, Validation of compendial methods. 34. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2011. Cap.1225, p. 778-782.

_____. Official monographs, *Sulfassalazine*. 34. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2011a. p. 4309.

_____. Official monographs, *loss on drying*. 34. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2011b. Cap. 731, p. 304.

_____. Official monographs, *Total ash*. 34. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2011c. Cap. 561, p.193.

_____. Official monographs, *reagents and solutions*. 34. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2011d. p. 964 – 965.

_____. Official monographs, *Sulfassalazine tablets*. 34. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2011e. p. 4310.

VOLPATO, N. M.; SILVA, R. L. Meios para dissolução de comprimidos de nimesulida: ação dos tensoativos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 38 (2), p.163-172, 2002.

WONG, D.; LARRRABEE, S.; CLIFFORD, K.; TREMBLAY, J.; FRIEND, D. R. USP Dissolution Apparatus III (reciprocating cylinder) for screening of guar-based colonic delivery formulations. **Journal of controlled release**, 47, p.173 – 179,1996.

WU, D.; ZHOU, J.; LI, Y. Unbiased estimation of Weibull parameters with the linear regression method. **Journal of the European Ceramic Society**, 26, p. 1099-1105, 2006.

YANG, L.; CHU, J. S.; FIX, J. A. Colon-specific drug delivery: new approaches and in vitro/in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceuticals**, 235, p.1-15, 2002.

YUKSEL, N.; KANIK, A. E.; BAYKARA, T. Comparison of in vitro dissolution profiles by ANOVA-based, model-dependent and -independent methods. **International Journal of Pharmaceutics**, 209, p. 57-67, 2000.