

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO APLICADO A
SUSPENSÃO INJETÁVEL INTRAMUSCULAR DE DIPROPIONATO DE
BETAMETASONA ASSOCIADO A FOSFATO DISSÓDICO DE BETAMETASONA**

Alice Simon

Rio de Janeiro

2011

ALICE SIMON

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO APLICADO A
SUSPENSÃO INJETÁVEL INTRAMUSCULAR DE DIPROPIONATO DE
BETAMETASONA ASSOCIADO A FOSFATO DISSÓDICO DE BETAMETASONA**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Valéria Pereira de Sousa

Rio de Janeiro

2011

ALICE SIMON

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO APLICADO A
SUSPENSÃO INJETÁVEL INTRAMUSCULAR DE DIPROPIONATO DE
BETAMETASONA ASSOCIADO A FOSFATO DISSÓDICO DE BETAMETASONA**

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.

Aprovada em 26 de agosto de 2011.

Orientadora:

Prof.a. Dra. Valéria Pereira de Sousa
Departamento de Medicamentos - Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ

Banca examinadora:

Prof. Dr. Lúcio Mendes Cabral
Departamento de Medicamentos - Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ

Prof. Dr. Marcelo de Pádua
Departamento de Medicamentos - Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ

Prof.a. Dra. Nádia Maria Volpato
Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS

À minha família pelo apoio, amor, orações e incentivo diário para que esta dissertação fosse realizada. Aos meus pais, Marilene e Neldo, meus exemplos de perseverança, garra e trabalho, aos quais eu serei eternamente grata.

"Transportai um punhado de terra todos os dias e farás uma montanha"

Confúcio

"A hora mais escura da noite é justamente aquela que nos permite ver melhor as estrelas"

Charles A. Beard

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida maravilhosa que Ele me deu.

Ao meu pai pelos exemplos de luta, trabalho, sabedoria e perseverança. A minha mãe pelas eternas conversas no telefone, pelos exemplos de amor, honestidade e fé. Pai e mãe obrigada pelo carinho, incentivo e apoio em todas as horas. Aos meus irmãos Júlio César e Luciane, e minha sobrinha Helena por todo carinho, amor e torcida. A vocês por serem essenciais em minha vida.

Aos meus familiares que sempre torceram e rezaram por mim.

As minhas amigas Luana, Isabelli, Samanta pela amizade e convivência diária. Em especial a Samanta, pelas horas de conversa, apoio e alegrias.

A equipe do LabCQ/UFRJ: Juliana, Gisele, Gleiciane, João, Eliane, Luís, Taylane, Mayre, Ana e Eduardo pela convivência diária e pelo companheirismo.

Aos meus amigos Juliana, Gisele, Gleiciane, Maíra e Eduardo pela amizade, várias ajudas e por todos os momentos de alegria.

A Maria pelo pensar positivo e pelo modo leve de encarar a vida com um sorriso no rosto. Pelas conversas descontraídas e ensinamentos de vida regados por um ótimo café.

Ao meu companheiro de laboratório, e acima de tudo, meu grande amigo Vinícius Raphael de Almeida Borges, pelos muitos conselhos, amizade, risos e por sempre estar disposto a me ajudar.

Ao professor Octávio Augusto Ceva Antunes (*in memoriam*) pelo apoio como professor e amigo, e pelas oportunidades concedidas.

A comissão de acompanhamento, os professores Lúcio Mendes Cabral e Marcelo de Pádua, pelos ensinamentos, dicas, cobranças e pelo apoio durante a realização deste trabalho.

A minha orientadora professora Valéria Pereira de Sousa por acreditar no meu trabalho, na minha vontade de aprender, e pela paciência e ajuda nos momentos de dificuldades. Agradeço por todas as oportunidades.

RESUMO

SIMON, A. Desenvolvimento de método de dissolução aplicado a suspensão injetável intramuscular de dipropionato de betametasona associado a fosfato dissódico de betametasona. Rio de Janeiro, 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

A betametasona é um corticosteróide com principal atividade glicocorticóide. Uma importante forma farmacêutica é a suspensão injetável da associação de ésteres de betametasona que são responsáveis por causar efeitos antiinflamatório, antialérgico e anti-reumático. A atividade terapêutica imediata é fornecida pelo éster solúvel, o fosfato dissódico de betametasona (FB), o qual é rapidamente absorvido. Os microcristais do dipropionato de betametasona (DB) liberam lentamente a betametasona, sendo responsável pela atividade prolongada do fármaco, controlando os sintomas durante longo período. Um método por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa foi desenvolvido e validado, o qual pode separar e quantificar simultaneamente a associação FB e DB em suspensões injetáveis. A separação cromatográfica dos dois sais foi obtida através de um gradiente de eluição (metanol, acetonitrila e tampão fosfato de potássio monobásico 0,07 M, pH 4,5) a uma vazão de 1,6 mL/min em uma coluna Kromasil C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm). O tempo de execução foi fixado em 17 minutos, utilizando detecção UV a 254 nm. Os tempos de retenção foram de 6,93 e 12,94 minutos para FB e DB, respectivamente. A linearidade do método foi estabelecida na faixa de 120 - 280 µg/mL de DB, e 48 - 112 µg/mL de FB. O DPR encontrado na avaliação da precisão intermediária do método foi <1% e os valores de recuperação obtidos foram entre 99 - 101%, para ambas os

fármacos. O método proposto é seletivo, linear, preciso, exato, robusto e eficiente na separação e quantificação de FB e DB nas suspensões injetáveis comercialmente disponíveis. A distribuição do tamanho de partícula do DB nas suspensões foi realizada a partir da técnica de difração a laser. Os produtos comerciais apresentaram diferentes tamanhos médios de partícula, variando entre 7,43 e 40,25 μm , e também entre diferentes lotes de um mesmo produto. A concentração de saturação do DB foi determinada em vários meios biorrelevantes, utilizando-se diferentes tipos e concentrações de tensoativos. Para o desenvolvimento do ensaio de dissolução *in vitro* do DB a partir da suspensão injetável utilizou-se o aparato pás com velocidades de agitação de 25 e 50 rpm, o volume de dissolução foi de 300 mL mantido à temperatura de $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Os meios utilizados foram tampão fosfato de sódio; fluidos corporal, muscular e sinovial simulados, com pH 7,4. Os perfis de dissolução foram analisados estatisticamente através de One-way ANOVA – Teste de Tukey ($\alpha = 5$), e também pela determinação dos fatores f_1 e f_2 . Diferentes perfis de dissolução do DB foram encontrados. O meio de dissolução e a velocidade de agitação do aparato influenciaram nas taxas de liberação do fármaco. Diferentes tamanhos de partícula presentes nas suspensões resultaram em diferenças significativas nos perfis de dissolução do DB. Este trabalho, portanto, desenvolveu e validou um método de quantificação simultâneo dos fármacos FB e DB, e também um método de dissolução *in vitro* para avaliar a performance da suspensão injetável destes fármacos. Os métodos são eficientes e tornam-se uma ferramenta para análises rotineiras de controle de qualidade desta forma farmacêutica.

Palavras-chave: betametasona, suspensão injetável, CLAE, dissolução *in vitro*.

ABSTRACT

SIMON, A. Dissolution method development applied to intramuscular injectable suspension of betamethasone dipropionate associated the betamethasone sodium phosphate. Rio de Janeiro, 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

Betamethasone is a corticosteroid with glucocorticoid activity. A major pharmaceutical form containing esters of betamethasone is aqueous injectable suspension that produces anti-inflammatory, anti-allergy and anti-rheumatic effects. The immediate therapeutic activity is provided by soluble ester, sodium phosphate betamethasone (FB), which is rapidly absorbed. The microcrystals of betamethasone dipropionate (DB) slowly release betamethasone and is responsible for the prolonged activity of the drug, that control the symptoms for a long period. A reversed-phase high performance liquid chromatography method has been developed and validated which can separate and quantify simultaneously the association of FB and DB in injectable suspensions. Chromatographic separation of both salts was achieved by using a gradient elution (acetonitrile, methanol and potassium phosphate monobasic buffer; pH 4.5) at a flow rate of 1.6 mL/min on a Kromasil 100-5 C18 column (150 x 4.6 mm; 5 μ m). The running time was set at 17 min, using UV detection at 254 nm. Retention times were 6.93 and 12.94 min for FB and DB, respectively. The linearity of the method was established in the range from 120 to 280 μ g/mL DB, and 48 to 112 μ g/mL of FB. The DPR found in the evaluation of intermediate precision of the method was < 1% and the recovery values obtained were between 99-101%, for both drugs. The proposed method is selective, linear, precise, accurate, robust and efficient in the separation and quantification of FB and DB in commercial injectable suspensions. The particle size distribution of the DB in suspensions was obtained

from the laser diffraction technique. The commercial products exhibited different particle sizes average, ranging between 7.43 and 40.25 μm , and also between different batches of the same product. The DB saturation concentration was determined in several biorrelevant dissolution media, with different types and concentrations of surfactants. Development of *in vitro* release method of the DB from the injectable suspension employed the paddles apparatus with stirring speeds of 25 and 50 rpm and dissolution volume was of 300 mL maintained at $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$. The dissolution media evaluated were sodium phosphate buffer and body, muscle and synovial simulated fluids, pH 7.4. The release profiles were statistically analyzed by One-way ANOVA - Tukey's test ($\alpha = 5$), and also by factors f_1 and f_2 . Different release profiles of DB were found. The dissolution media and stirring speed of the apparatus influence the rates of drug release. The different particle sizes observed in the suspensions resulted in significant differences in the release profiles of the DB. This study therefore, developed and validated a method for simultaneous quantification of FB and DB drugs, and also an *in vitro* release method to evaluate the performance of these injectable suspension. These methods are efficient and are a tool for routine analysis of quality control of this pharmaceutical form.

Keywords: betamethasone, injectable suspension, HPLC, *in vitro* release.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CIVIV	Correlação <i>in vitro/in vivo</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	Detector de arranjo de fotodiodos
DB	Dipropionato de betametasona
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
FB	Fostato dissódico de betametasona
FCS	Fluido corporal simulado
FDA	Food and Drug Administration
FMS	Fluido muscular simulado
FSS	Fluido sinovial simulado
ICH	International Conference on Harmonization
LSS	Lauril sulfato de sódio
PA	Padrão analítico
P20	Polissorbato 20
P80	Polissorbato 80
SQR	Substância química de referência
TFP	Tampão fosfato de potássio
TFS	Tampão fosfato de sódio
UV	Ultravioleta
USP	United States Pharmacopeia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do dipropionato de betametasona (DB).....	23
Figura 2. Estrutura química do fosfato dissódico betametasona (FB).....	24
Figura 3. Representação de modelo da difusão em camada.	37
Figura 4. Espectros de infravermelho do DB: (a) substância química de referência e (b) matéria-prima, obtidos experimentalmente. As setas indicam as principais bandas características do DB.	79
Figura 5. Espectros de infravermelho do FB: (a) substância química de referência e (b) matéria-prima, obtidos experimentalmente. As setas indicam as principais bandas características do FB.....	83
Figura 6. Cromatogramas obtidos com as condições 1 a 5 da tabela 11.....	89
Figura 7. Cromatogramas obtidos com as condições 6 a 8 da tabela 11.....	90
Figura 8. Cromatogramas obtidos com as condições 9 e 10 da tabela 11.....	90
Figura 9. Cromatogramas obtidos com as condições 11 a 13 da tabela 11.....	91
Figura 10. Cromatogramas obtidos com as condições 14 e 16 da tabela 11.....	92
Figura 11. Representação gráfica da fase móvel em sistema ternário.....	93
Figura 12. Cromatogramas obtidos com a injeção do placebo do medicamento referência (A), padrões de FB e DB associados (B), FB (C) e DB (D) isolados, medicamento referência (E).	96
Figura 13. Cromatogramas tridimensionais de varredura da análise de FB e DB por CLAE: (a) FB e DB matéria-prima, (b) placebo do produto e (c) produto - suspensão injetável comercializada.	99
Figura 14. Pureza cromatográfica obtida por similaridade de espectros em diferentes tempos de retenção para FB (a) e DB (b).	100
Figura 15. Pureza cromatográfica obtida pela razão cromatográfica para FB (a) e DB (b).....	101
Figura 16. Curva padrão média da linearidade do FB.....	102
Figura 17. Curva padrão média da linearidade do DB.	103
Figura 18. Representação da curva padrão e equação da reta do FB e DB para o doseamento dos produtos.....	111

- Figura 19. Representação gráfica da distribuição do tamanho de partícula para os produtos A, B, C e D do lote 1 (n = 3). 116
- Figura 20. Comparação gráfica da distribuição granulométrica média das partículas de diferentes produtos..... 117
- Figura 21. Representação gráfica da solubilidade do DB em diferentes meios, na presença de diferentes concentrações de tensoativos..... 121
- Figura 22. Perfil de dissolução do medicamento R em meio de dissolução (a) tampão fosfato de sódio contendo lauril sulfato de sódio e (b) tampão fosfato de sódio contendo polissorbato 80, em diferentes concentrações dos tensoativos, utilizando velocidade de agitação de 50 rpm..... 125
- Figura 23. Perfil de dissolução do medicamento S em meio de dissolução (a) tampão fosfato de sódio contendo lauril sulfato de sódio e (b) tampão fosfato de sódio contendo polissorbato 80, em diferentes concentrações dos tensoativos, utilizando velocidade de agitação de 50 rpm..... 126
- Figura 24. Perfis de dissolução do DB dos produtos R e S nas velocidades de agitação de 25 e 50 rpm, nos meios tampão fosfato de sódio contendo lauril sulfato de sódio a 0,1% (a) e tampão fosfato de sódio contendo polissorbato 80 a 0,5% (b). 128
- Figura 25. Perfis de dissolução do DB dos produtos R e S nas velocidades de agitação de 25 e 50 rpm, nos meios fluido corporal simulado contendo lauril sulfato de sódio a 0,1% (a) e fluido corporal simulado contendo polissorbato 80 a 0,5% (b). 129
- Figura 26. Perfis de dissolução do DB dos produtos R e S nas velocidades de agitação de 25 e 50 rpm, nos meios fluido muscular simulado contendo lauril sulfato de sódio a 0,1% (a) e fluido muscular simulado contendo polissorbato 80 a 0,5% (b). 130
- Figura 27. Perfis de dissolução do DB dos produtos R e S nas velocidades de agitação de 25 e 50 rpm, nos meios fluido sinovial simulado contendo lauril sulfato de sódio a 0,1% (a) e fluido sinovial simulado contendo polissorbato 80 a 0,5% (b). 131
- Figura 28. Comparação dos perfis dos produtos R e S em diferentes meios de dissolução (FCS, FMS, FSS, TFS) contendo LSS 0,1%, utilizando velocidade de agitação de 50 rpm..... 133
- Figura 29. Cromatogramas obtidos com a injeção do meio de dissolução TFS LSS 0,1% (a), do placebo do medicamento referência (b) e do medicamento referência (c). As amostras foram diluídas com o meio de dissolução. 136
- Figura 30. Cromatogramas tridimensionais de varredura da análise de FB e DB por CLAE: (a) meio de dissolução (b) FB e DB diluídos no meio de dissolução. 137

Figura 31. Pureza cromatográfica obtida por similaridade de espectros em diferentes tempos de retenção para FB (a) e DB (b).	138
Figura 32. Pureza cromatográfica obtida pela razão cromatográfica para FB (a) e DB (b).	139
Figura 33. Curva padrão média da linearidade do DB.	140
Figura 34. Perfis de dissolução obtidos com diferentes lotes de um mesmo medicamento (E), utilizando meio tampão fosfato de sódio contendo lauril sulfato de sódio a 0,1%, e velocidade de agitação do meio de 25 e 50 rpm.	146
Figura 35. Perfis de dissolução do DB obtidos com os produtos A, B, C, D e E, em meio tampão fosfato de sódio contendo lauril sulfato de sódio a 0,1%, utilizando velocidade de agitação de 50 rpm.....	148
Figura 36. Perfis de dissolução do DB obtidos com os produtos A e C, em meio tampão fosfato de sódio contendo lauril sulfato de sódio a 0,1%, utilizando velocidade de agitação de 25 e 50 rpm.....	153

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Testes realizados na matéria prima DB.....	54
Tabela 2. Testes realizados na matéria-prima FB.....	56
Tabela 3. Descrição da composição dos meios de dissolução e do percentual de tensoativo utilizado em cada meio	66
Tabela 4. Condições dos ensaios de dissolução.....	75
Tabela 5. Rotação específica da matéria- prima DB (n = 3).....	81
Tabela 6. Percentual da perda de massa da matéria prima DB.....	81
Tabela 7. Análise quantitativa do teor de DB na matéria-prima (n = 6).....	82
Tabela 8. Rotação específica da matéria- prima FB (n = 3).....	84
Tabela 9. Determinação do conteúdo de água presente na SQR e na matéria-prima de FB.....	85
Tabela 10. Análise quantitativa do teor de FB na matéria-prima (n = 6)	86
Tabela 11. Condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento do método e parâmetros cromatográficos obtidos para FB e DB.....	88
Tabela 12. Gradiente da fase móvel	95
Tabela 13. Análise estatística do estudo da linearidade	103
Tabela 14. Resultados obtidos na análise da repetibilidade e precisão intermediária	105
Tabela 15. Resultados do teste de precisão de injeção	106
Tabela 16. Porcentagem de recuperação dos fármacos.....	107
Tabela 17. Parâmetros cromatográficos e teor dos fármacos obtidos no estudo da robustez	108
Tabela 18. Doseamento de diferentes marcas da suspensão injetável comercialmente disponível e parâmetros cromatográficos dos picos dos fármacos.	110
Tabela 19. Doseamento de produtos comercializados: referência, genérico e similares	112
Tabela 20. Média da distribuição do tamanho de partícula de diferentes produtos.	115

Tabela 21. Concentração de saturação do DB em diferentes meios de dissolução	120
Tabela 22. Análise estatística do estudo da linearidade do DB	140
Tabela 23. Resultados obtidos na análise da repetibilidade e precisão intermediária	142
Tabela 24. Resultados do teste de precisão de injeção para quantificação do DB.	143
Tabela 25. Porcentagem média de recuperação no teste de exatidão (n = 3)	144
Tabela 26. Medidas da perda de soluto por adsorção no filtro.....	145
Tabela 27. Análise comparativa dos perfis de dissolução pelo modelo independente, f_1 e f_2	147
Tabela 28. Percentual dissolvido de DB após ensaio de dissolução <i>in vitro</i> , tamanho médio de partícula e Span nos diferentes produtos	149
Tabela 29. Análise comparativa dos perfis de dissolução pelo modelo independente, f_1 e f_2	150
Tabela 30. Tratamento estatístico (one way Anova – Teste de Tukey) dos resultados obtidos nos estudos de dissolução <i>in vitro</i> nos produtos A, B, C, D e E, considerando significativo para $P < 0,05$	152
Tabela 31. Percentual dissolvido de DB dos produtos A e C obtidos nos ensaio de dissolução <i>in vitro</i> utilizando velocidade de agitação de 25 e 50 rpm	154
Tabela 32. Análise comparativa dos perfis de dissolução obtidos com os produtos A e C utilizando velocidade de agitação de 25 e 50 rpm, através do modelo independente f_1 e f_2 , e tratamento estatístico One-way Anova – Teste de Tukey, considerando significativo para $P < 0,05$	155

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 OS GLICOCORTICÓIDES.....	21
1.1.1 Betametasona	22
1.2 ADMINISTRAÇÃO INTRAMUSCULAR DE FÁRMACOS.....	25
1.3 SUSPENSÕES INJETÁVEIS.....	27
1.3.1 Distribuição do tamanho de partícula	29
1.3.2 Considerações biofarmacêuticas	31
1.4 CONTROLE DE QUALIDADE	33
1.4.1 Equivalência Farmacêutica de medicamentos	35
1.5 TEORIA DA DISSOLUÇÃO	37
1.5.1 Teste de dissolução	38
1.5.2 Dissolução de suspensões	41
1.5.3 Estudo do perfil de dissolução	42
1.6 JUSTIFICATIVA.....	45
2 OBJETIVOS	47
2.1 OBJETIVOS GERAIS	47
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
3 MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1 MATERIAL.....	49
3.1.1 Equipamentos e acessórios	49
3.1.2 Reagentes	50
3.1.3 Substâncias químicas de referência, matérias primas e produtos farmacêuticos	51
3.2 MÉTODOS.....	53
3.2.1 Caracterização das matérias primas	53
3.2.2 Desenvolvimento de metodologia de quantificação de FB e DB nas suspensões injetáveis	58
3.2.3 Validação do método de quantificação de FB e DB nas suspensões injetáveis	60
3.2.4 Doseamento dos fármacos FB e DB na suspensão injetável	63
3.2.5 Análise da distribuição do tamanho de partícula de DB nas suspensões injetáveis	64
3.2.6 Composição dos meios de dissolução	65
3.2.7 Determinação da solubilidade de DB em diferentes meios de dissolução	67

3.2.8 Desenvolvimento do ensaio de dissolução para as suspensões injetáveis	68
3.2.9 Validação do método de quantificação de DB nos ensaios de dissolução	71
3.2.10 Aplicação do ensaio de dissolução <i>in vitro</i> em produtos comercializados	75
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS	78
4.1.1 Dipropionato de betametasona	78
4.1.2 Fosfato dissódico de betametasona	82
4.2 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO DE FB E DB NAS SUSPENSÕES INJETÁVEIS	87
4.2.1 Fase móvel e vazão de fluxo	87
4.2.2 Fase estacionária	93
4.2.3 Volume de injeção, detecção e diluente	94
4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE FB E DB NAS SUSPENSÕES INJETÁVEIS	97
4.3.2 Especificidade e seletividade	98
4.4.2 Linearidade	102
4.4.3 Precisão intermediária e repetibilidade	104
4.4.4 Precisão de injeção	106
4.4.5 Limite de quantificação e Limite de detecção	106
4.4.6 Exatidão	107
4.4.7 Robustez	107
4.5 DOSEAMENTO DOS FÁRMACOS FB E DB NA SUSPENSÃO INJETÁVEL	109
4.5.1 Aplicação do ensaio de quantificação em diferentes produtos	109
4.5.2 Doseamento de produtos	111
4.6 DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA DE DB NAS SUSPENSÕES INJETÁVEIS	113
4.7 DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DE DB EM DIFERENTES MEIOS	118
4.8 DESENVOLVIMENTO DO ENSAIO DE DISSOLUÇÃO PARA AS SUSPENSÕES INJETÁVEIS	122
4.9 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE DB NOS ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO <i>IN VITRO</i>	135
4.9.1 Especificidade e Seletividade	135
4.9.2 Linearidade	139
4.9.3 Precisão intermediária e repetibilidade	141
4.9.4 Precisão de injeção	142

4.9.5 Limite de quantificação e Limite de detecção	143
4.9.6 Exatidão	143
4.9.7 Adsorção nos filtros	144
4.10 APLICAÇÃO DO ENSAIO DE DISSOLUÇÃO <i>IN VITRO</i> EM PRODUTOS COMERCIALIZADOS	145
5 CONCLUSÕES	158
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	161

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 OS GLICOCORTICÓIDES

O uso terapêutico de esteróides começou no início da década de 30, mesmo antes da identificação dos hormônios adrenocorticais ser conhecida. Hench, em 1948, faz a observação clínica de que os sintomas da artrite em mulheres eram aliviados quando elas ficavam grávidas. Ele admitiu que a remissão desses sintomas fosse o resultado da hipersecreção adrenocortical durante a gestação (CRAIG & STITZEL, 1996).

O córtex supra-renal sintetiza duas classes de esteróides: os corticosteróides, glicocorticóides e mineralocorticóides, que possuem 21 átomos de carbono, e os androgênicos, que possuem 19 átomos de carbono. Historicamente, as ações dos corticosteróides foram descritas como glicocorticóides que influenciam em vários processos metabólicos no organismo, regulando o metabolismo dos carboidratos, e mineralocorticóides que regulam o equilíbrio eletrolítico e causam uma retenção de sódio e água no túbulo distal do néfron. Nos seres humanos, a hidrocortisona (cortisol) é o principal glicocorticóide, enquanto a aldosterona é o principal mineralocorticóide (GOODMAN & GILMAN, 2005).

Esses hormônios esteróides interagem com receptores intracelulares para facilitar a síntese da lipocortina, que inibe a fosfolipase A_2 . Assim, impedem a formação de todos os endoperóxidos cíclicos de prostaglandinas e dos leucotrienos. O início de sua ação, entretanto, é bastante lento, graças aos seus mecanismos de ação (SCHELLACK, 2006).

Esses fármacos têm um significativo valor de aplicação clínica porque apresentam grande habilidade terapêutica. Os glicocorticóides são importantes hormônios de estresse e, quando administrados em doses suprafisiológicas, exibem também efeitos anti-inflamatórios, antialérgicos e antirreumáticos terapêuticamente úteis. Estes fármacos também suprimem a imunidade mediada por células e são benéficos no controle das reações auto-imunes (SCHELLACK, 2006).

Os vários derivados glicocorticóides atualmente empregados como agentes farmacológicos apresentam efeitos colaterais sobre os processos fisiológicos que acompanham sua eficácia terapêutica. Por conseguinte, à exceção da terapia de reposição nos estados de deficiência, o uso de glicocorticóides é em grande parte empírico. Com base em uma extensa experiência clínica, pode-se propor diversos princípios terapêuticos, considerando-se, o número e a gravidade dos efeitos colaterais potenciais, considerando os riscos e benefícios relativos em cada paciente (GOODMAN e GILMAN, 2005).

Os corticosteróides de ação longa, como a betametasona e a dexametasona, apresentam efeitos antiinflamatórios mais potentes e não causam retenção de sódio e água (SCHELLACK, 2006).

1.1.1 Betametasona

A betametasona é um corticosteróide com principal atividade glicocorticóide, na qual aproximadamente 750 µg de betametasona são equivalentes, em atividade antiinflamatória, a 5 mg de prednisolona. Tem sido utilizada, quer sob a forma de álcool livre ou em uma das formas esterificadas, no tratamento de condições para as quais a corticoterapia está indicada, exceto em estados de deficiência adrenal, na qual a hidrocortisona com fludrocortisona complementar é preferida. Praticamente a quase ausência de propriedades mineralocorticóides da betametasona, torna-a adequada para o tratamento de condições em que a retenção de água seria uma desvantagem (PARFITT, 1999).

Estruturalmente, a betametasona é análogo a dexametasona, sendo comercializada na forma livre e também como acetato, benzoato, dipropionato, fosfato sódico e valerato. Na forma livre é administrada oral ou topicamente. Os ésteres de fosfato sódico podem ser administrados por injeção intramuscular, quando se deseja efeito rápido (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988).

O dipropionato de betametasona (DB) de fórmula estrutural igual a $C_{28}H_{37}FO_7$ possui peso molecular igual a 504,6 e sua estrutura química está apresentada na

figura 1. É um pó cristalino branco ou branco amarelado, inodoro. Praticamente insolúvel em água, solubilidade limitada em álcool, livremente solúvel em acetona, diclorometano, e em clorofórmio. Aproximadamente 1,3 mg de dipropionato de betametasona é equivalente a 1 mg de betametasona (PARFITT, 1999; MOFFAT, OSSELTON, WIDDOP, 2004). O DB possui alta estabilidade em suspensões aquosas quando comparado com outros corticosteróides. Isso pode ser atribuído a sua estrutura diéster e correspondente a baixa solubilidade em água. O composto é mais estável em pH 4, com qualquer hidrólizaç o resultando na formação de álcool betametasona (FERRANTE & RUDY, 1977).

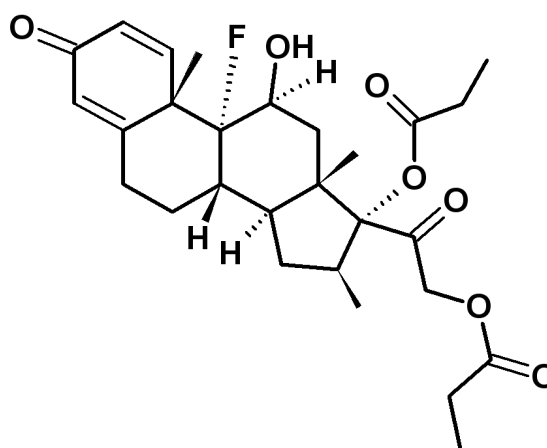


Figura 1. Estrutura química do dipropionato de betametasona (DB).

A estrutura química do fosfato dissódico de betametasona (FB), também conhecido como fosfato dissódico de betametasona,   observada na Figura 2. A fórmula estrutural do FB   $C_{22}H_{28}FNa_2O_8P$, possuindo este éster peso molecular igual a 516,4.   um p  branco ou quase branco, inodoro, e muito higroscópico. Solúvel em água (1:2), álcool dihidratado (1:350), livremente solúvel em metanol, praticamente insolúvel em acetona, diclorometano,  ter e em clorofórmio. Aproximadamente 1,3 mg de fosfato de sódio de betametasona é equivalente a 1 mg de betametasona (PARFITT, 1999; MOFFAT, OSSELTON, WIDDOP, 2004).

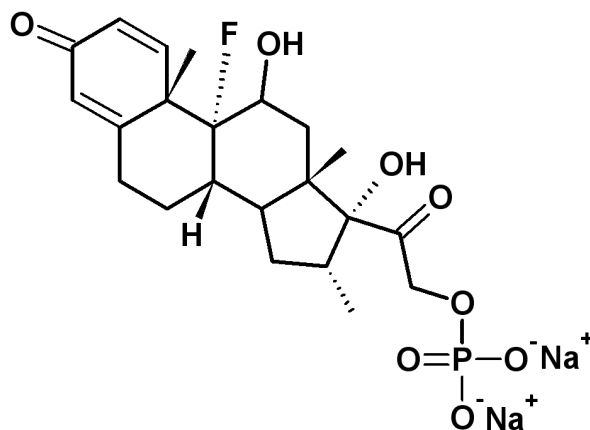


Figura 2. Estrutura química do fosfato dissódico betametasona (FB).

O coeficiente de partição P , normalmente expresso na forma logarítmica, é determinado por meio da medida da distribuição do fármaco entre a água e um solvente orgânico adequado, e é definido como a medida do caráter lipofílico da substância. Fármacos com características lipossolúveis apresentam valores de $\log P > 0$, sendo que os valores de $\log P > 3$ indicam que o fármaco é muito lipossolúvel. (AULTON, 2005). O coeficiente de partição em octanol e água da betametasona é corresponde a 1,9 (MOFFAT, OSSELTON, WIDDOP, 2004). O éster dipropionato de betametasona possui $\log P = 3,24$ em acetato de etila e água, sugerindo a solubilidade lipídica do fármaco. O DB em solução pH 7,4 apresenta suas moléculas na forma neutra, ou seja, não ionizadas (GROTH & JORGENSEN, 1997).

O medicamento referência é o Diprospan® Injetável. Segundo o fabricante do medicamento, a formulação é constituída da associação de ésteres de betametasona que são responsáveis por causar efeitos antiinflamatório, antialérgico e anti-reumático. A atividade terapêutica imediata através da suspensão é fornecida pelo éster solúvel, o fosfato dissódico de betametasona, o qual é rapidamente absorvido após administração. Os microcristais do dipropionato de betametasona, liberam lentamente a betametasona, sendo responsável pela atividade prolongada do fármaco, que por ser de absorção lenta, controla os sintomas durante longo período (DIPROSPAN®, 2011).

O medicamento é administrado como uma suspensão aquosa injetável estéril, tendo um efeito imediato e sustentado. A betametasona apresenta início de ação

rápido, e possui alta ligação às proteínas. Seu efeito máximo é atingido em 1 a 2 horas após administração, com a qual a duração da ação é estendida até 3,25 dias. Sua meia-vida plasmática é de cerca de 3 a 5 horas, e sua meia-vida biológica (tecidual) é de cerca de 36 a 54 horas. A betametasona sofre biotransformação hepática, e a excreção ocorre através da urina (BECLONATO®, 2011).

1.2 ADMINISTRAÇÃO INTRAMUSCULAR DE FÁRMACOS

Vários importantes grupos terapêuticos, como os analgésicos são administrados por via parenteral. A administração intravenosa resulta em um rápido aumento da concentração do fármaco no sangue. Assim, esta via de administração tem vantagens sobre a administração parenteral local nos casos em que a ação rápida é essencial. Administração local inclui a injeção subcutânea e intramuscular e injeção direta em órgãos-alvo, tais como os olhos, sistema nervoso central e coração. Quando o fármaco é destinado para o efeito local, para a liberação prolongada e sustentada, ou para a entrega do fármaco para os gânglios linfáticos, a administração subcutânea e intramuscular são preferidas. Vantagens clínicas da administração local do fármaco podem incluir evitar altas concentrações de pico sistêmico dos fármacos, a administração menos freqüente, menores problemas com a compatibilidade dos componentes de injeção em comparação com a administração intravenosa e a redução de efeitos tóxicos para os tecidos sensíveis (OUSSOREN *et al*, 2005).

As injeções intramusculares e subcutâneas superam em muito as demais formas de administração parenterais de drogas. Tendo em vista o fluxo sanguíneo tecidual elevado e a capacidade de difusão lateral da solução injetada, a absorção da droga costuma ser mais rápida após administração intramuscular do que a injeção subcutânea. A absorção da droga a partir de localizações intramusculares depende da quantidade e da composição do tecido conjuntivo, da densidade capilar e da taxa de perfusão vascular na região (ZUDEIMA, PIETERS, DUCHATEAU, 1988; CRAIG & STITZEL, 1996). O pH normal do sangue arterial é 7,4, enquanto o

pH do sangue venoso e dos líquidos intersticiais é de cerca de 7,35, devido às quantidades extras de dióxido de carbono liberados pelos tecidos para formar H_2CO_3 nesses líquidos (GUYTON & HALL, 2006).

A taxa de ação de fármacos injetáveis intramusculares depende muito da liberação do fármaco a partir da formulação e da absorção a partir do local da injeção. Variáveis que afetam a liberação da droga e absorção após injeção incluem aspectos da formulação farmacêutica, por exemplo, a concentração inicial do fármaco, as propriedades do veículo em que o fármaco é formulado, e as propriedades físico-químicas do fármaco. Aspectos bio-farmacêuticos, por exemplo, a via de administração local da injeção, técnica de injeção e profundidade, também afetam a absorção do fármaco. Além disso, aspectos fisiológicos como o abastecimento de sangue e temperatura no local da injeção e movimento do corpo podem influenciar a absorção do fármaco após a administração local (ZUDEIMA, PIETERS, DUCHATEAU, 1988; OUSSOREN *et al*, 2005).

Embora a administração parenteral da solução aquosa do fármaco costume resultar em rápida absorção, a partir de localizações intramusculares e subcutâneas, a absorção pode ser retardada para prolongar os efeitos sistêmicos. Isto é realizado mediante a administração de formas de dissolução lenta da droga, que atuam como depósitos ou reservatórios do fármaco. Tais procedimentos incluem a injeção intramuscular de suspensões aquosas de drogas, a implantação subcutânea de *pellets* comprimidos e a injeção de drogas em meio oleoso (CRAIG & STITZEL, 1996).

A partir de um estudo de revisão sobre as informações relevantes para a absorção de fármacos, parece que o tempo médio de absorção de fármacos em suspensão aquosa ou oleosa de administração intramuscular é maior (semanas a meses) do que dos fármacos em solução (minutos a horas, ou semanas, dependendo da lipofilicidade do fármaco). Fármacos lipofílicos parecem mostrar um efeito de depósito, resultando em tempos médios de absorção maiores do que os fármacos hidrofílicos (ZUDEIMA, PIETERS, DUCHATEAU, 1988).

As vantagens das vias intramusculares e subcutâneas incluem maior confiabilidade e precisão dos níveis finais atingidos no sangue, absorção e instalação razoavelmente rápida da ação da droga e a possibilidade de

administração de grandes volumes de solução. Entretanto, existem grandes desvantagens também, como dor, hipersensibilidade, necrose tecidual local, contaminação microbiana e lesão neural podem associar-se com estas formas de administração (CRAIG & STITZEL, 1996).

1.3 SUSPENSÕES INJETÁVEIS

Uma suspensão farmacêutica é uma dispersão grosseira, na qual as partículas sólidas insolúveis, geralmente na faixa de 1 a 50 μm de diâmetro, encontram-se dispersas em um meio líquido aquoso ou não aquoso (AULTON, 2005). Além das suspensões de uso oral, existem também preparações de suspensões injetáveis, principalmente para aplicação intramuscular, para as quais a dissolução é um fator importante a ser determinado (ZUDEIMA, PIETERS, DUCHATEAU, 1988). Suspensões farmacêuticas grosseiras de uso parenteral são geralmente administradas por via intramuscular, subcutânea, intra-articular ou por via intradérmica. Suspensões grosseiras nunca devem ser administradas por via intravenosa ou intra-arterial, uma vez que as partículas em suspensão são grosseiras e são geralmente maiores que o diâmetro dos vasos capilares, podendo levar o paciente a morte (NAIL & STICKELMEYER, 2005).

Suspensões parenterais são normalmente utilizadas como forma farmacêutica quando o fármaco tem limitada solubilidade em água, e as tentativas para solubilizar o fármaco iriam comprometer a segurança, a liberação sustentada quando esta é necessária, ou quando um efeito local é desejado (NAIL & STICKELMEYER, 2005). A capacidade destas suspensões injetáveis agirem como sistema de liberação sustentado as tornam eficientes para a administração um fármaco insolúvel ou escassamente solúvel (OUSSOREN *et al*, 2005; AULTON, 2005). Um exemplo comum de uma suspensão injetável intra-articular para efeito local (dentro do saco sinovial das articulações) é a administração de suspensões de esteróides, que geralmente resultam em alívio prolongado dos efeitos inflamatórios da artrite (NAIL & STICKELMEYER, 2005).

A pesquisa e o desenvolvimento farmacêutico de sistemas dispersos injetáveis como sistemas de liberação sustentada após a administração local estão voltados principalmente para alterar a farmacocinética do fármaco, para que o agente terapêutico seja liberado durante um período de tempo prolongado. Assim, as suspensões injetáveis podem ser utilizadas principalmente para administração de substâncias medicamentosas insolúveis através da via intravenosa, proporcionando liberação prolongada e sustentada, sendo essencial a distribuição granulométrica submicron das partículas em suspensão na formulação injetável (OUSSOREN *et al*, 2005).

São de diversos tipos as suspensões empregadas para administração intramuscular cuja absorção do fármaco processa-se vagarosamente, conseguindo-se um injetável de ação prolongada (PRISTA, ALVES, MORGANO, 2000). De um modo geral, a grande área superficial do fármaco disperso assegura a alta disponibilidade para dissolução e, portanto, absorção (AULTON, 2005). Entretanto, a velocidade de absorção depende do coeficiente de solubilidade, ou seja, a velocidade de absorção do fármaco suspenso depende, fundamentalmente, das suas características de solubilidade na água (PRISTA, ALVES, MORGANO, 2000).

Estas suspensões destinadas à administração parenteral podem ser formuladas visando o controle da velocidade de absorção do fármaco, na qual o tempo de duração da atividade do fármaco pode ser controlado por meio do ajuste do tamanho das partículas dispersas. Nesse caso, a velocidade com que o fármaco é absorvido para a circulação sanguínea dependerá, simplesmente, da sua velocidade de dissolução (AULTON, 2005).

A taxa de liberação do fármaco a partir da suspensão pode ser afetada por diferentes etapas envolvidas no processo. Estas incluem a dissolução das partículas do fármaco, a área de perfusão do sangue, coeficiente de partição óleo/água e de difusão através da camada adiposa altamente viscosa para o sistema vascular, a estrutura específica histológica do músculo e tecido adiposo, também influenciam a solubilidade lipídica e a ligação protéica, além disso, a profundidade de injeção é uma variável importante, pois os tempos médios de absorção são consideravelmente maiores quando os medicamentos são injetados superficialmente na camada do tecido adiposo (PATEL, 2010).

Em uma suspensão injetável aquosa, a taxa de dissolução de um fármaco será mais rápida, isso quando comparada a de um fármaco suspenso em veículo oleoso, uma vez que haverá uma área superficial maior, a partir do qual o fármaco poderá ser liberado e, em algum grau, poderá difundir nas fibras musculares, tornando-se miscível com os fluídos tissulares (AULTON, 2005; PATEL, 2010).

Os fatores associados a essa formulação farmacêutica que podem interferir nesse processo de liberação e absorção são o tamanho da partícula, forma cristalina do fármaco, complexação, adição de tensoativos e viscosidade da suspensão. Deste modo, estudos de caracterização da dimensão das partículas, distribuição, e o coeficiente de partição da substância medicamentosa entre sólido e solução devem ser considerados (BURGESS, 2005; PATEL, 2010).

1.3.1 Distribuição do tamanho de partícula

Suspensões grosseiras parenterais são, em geral, difíceis de formular e de fabricar em relação a outras formas farmacêuticas. Isto ocorre em grande parte porque tais sistemas tendem a ser fisicamente instáveis, resultando em perda de atributos de qualidade essenciais para um produto farmacêutico aceitável (NAIL & STICKELMEYER, 2005).

A velocidade de dissolução de um fármaco através de sistemas dispersos de administração parenteral, conseqüentemente, a sua biodisponibilidade, podem ser controladas por meio da escolha de uma determinada faixa de tamanho de partícula (AULTON, 2005).

Estes sistemas dispersos podem conter uma faixa maior de tamanho de partículas que é limitado por critérios de desempenho, tais como taxas de liberação, considerações biofarmacêuticas e potencial de irritação; e a necessidade de agulhas maiores, na qual podem resultar em injeções mais dolorosas (BURGESS, 2005). O potencial de partículas maiores causarem dificuldade na seringabilidade (capacidade de facilmente retirar o conteúdo de um frasco através de uma agulha) e na injetabilidade (refere-se ao desempenho da suspensão durante a injeção e inclui

fatores como pressão ou força necessária para expelir o conteúdo da seringa no local da injeção), podem causar o entupimento da agulha durante a administração, podendo ser traumático para o paciente (NAIL & STICKELMEYER, 2005; PATEL, 2010).

O tamanho de partícula do fármaco na suspensão é fundamental para o desempenho do medicamento, isto é, as partículas devem ser pequenas o suficiente para facilmente passar através de uma agulha de seringa, e assim permanecerem ao longo da vida útil do produto. No entanto, devido a efeitos de degradação difusional (*Ostwald ripening*), a distribuição do tamanho das partículas tende a mudar ao longo do tempo. O processo de moagem necessário para a redução do tamanho de partícula tende a criar material amorfo, e isso pode dar origem a instabilidades físicas e químicas. Sólidos amorfos têm demonstrado ser quimicamente menos estáveis que o estado sólido cristalino. Além disso, sólidos amorfos tendem a cristalizar ao longo do tempo, e essa cristalização não só pode levar ao crescimento da partícula, mas também pode alterar a biodisponibilidade dos fármacos do produto, uma vez que pode alterar as características de liberação do fármaco a partir do local da injeção (NAIL & STICKELMEYER, 2005).

A distribuição do tamanho de partícula é um aspecto crítico da avaliação da qualidade dos sistemas dispersos injetáveis, uma vez que podem afetar o perfil de dissolução do fármaco no local de injeção. Problemas de tendência a sedimentação e ou *creaming* podem ser minimizados alterando o tamanho das partículas do sistema. A estabilidade do sistema injetável pode ser convenientemente monitorada medindo alterações no tamanho e distribuição das partículas (JIAO & BURGESS, 2005).

A uniforme da distribuição das partículas nas suspensões pode ser um desafio, portanto, o sistema deve ser devidamente agitado, e o processo cuidadosamente monitorado, a fim de evitar problemas de uniformidade de dose nas ampolas das suspensões injetáveis que possam afetar a qualidade do produto (NAIL & STICKELMEYER, 2005).

1.3.2 Considerações biofarmacêuticas

Quando um medicamento é administrado por via intravenosa, o início de ação é rápido, uma vez que a droga é injetada diretamente na corrente sanguínea e não há qualquer etapa de absorção, mas sim, há apenas um breve intervalo de 2 – 3 minutos durante o qual o fármaco é misturado na corrente sanguínea, tornando-se 100% biodisponível (NAIL & STICKELMEYER, 2005). Para suspensões grosseiras parenterais, no entanto, a via intravenosa não é uma opção.

A biodisponibilidade é definida como a velocidade e a extensão da absorção de um fármaco, a partir de uma forma farmacêutica que se torna disponível, para exercer o efeito farmacológico pretendido. A avaliação da biodisponibilidade é realizada com base em parâmetros farmacocinéticos calculados a partir dos perfis de concentração plasmática do fármaco ao longo do tempo, que expressa a quantidade de fármaco absorvido (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Por essa razão, a biodisponibilidade apresentada por um fármaco é muito importante no sentido de determinar se o fármaco alcançou o sítio de ação em uma concentração terapeuticamente eficaz (AULTON, 2005).

Se a suspensão é administrada para efeito sistêmico - geralmente por via subcutânea ou intramuscular – existe uma fase de absorção necessária para o fármaco atingir a corrente sanguínea. A biodisponibilidade de um fármaco de injeção subcutânea ou intramuscular é dependente dos fatores fisiológicos e das propriedades físico-químicas do fármaco e do medicamento. A taxa de absorção de um fármaco a partir de um local de depósito é comumente limitada pela dissolução (NAIL & STICKELMEYER, 2005).

A taxa de dissolução do fármaco a partir de um depósito de injeção do fármaco é influenciada pela área de superfície do fármaco exposto ao líquido intersticial, que é afetada pelo tamanho médio de partícula do fármaco. Esta relação é dada pela conhecida equação de Noyes e Whitney:

$$dC / dt = KDS (C_s - C)$$

onde, dC/dt é a taxa de dissolução, K é uma constante, D é o coeficiente de difusão do fármaco no fluido intersticial, S é a área de superfície do fármaco exposta ao meio, C_s é a solubilidade de equilíbrio do fármaco no fluido intersticial, e C é a concentração do fármaco no fluido intersticial em um dado tempo (NAIL & STICKELMEYER, 2005; AULTON, 2005; STORPIRTS *et al*, 2009).

A influência da distribuição do tamanho da partícula na biodisponibilidade foi estudada por Buckwalter e Dickinson, na qual verificaram que suspensões de procaína e penicilina G com diferentes distribuições de tamanho de partículas, após a administração intramuscular, resultaram em diferentes níveis máximos na circulação sistêmica. Os níveis máximos no sangue variaram de 1,37 unidades/mL para os tamanhos de partículas na faixa de 150 a 250 μm , a 2,14 unidades/mL para partículas na faixa de tamanho de 1 a 2 μm (BUCKWALTER & DICKINSON *appud* NAIL & STICKELMEYER, 2005).

A solubilidade e biodisponibilidade, também podem ser influenciadas pelo estado físico de um fármaco. A forma amorfa é metaestável, e tem maior solubilidade do que as formas cristalinas do mesmo medicamento. Cloranfenicol e novobiocina são exemplos de fármacos, onde apenas a forma amorfa mostra biodisponibilidade (NAIL & STICKELMEYER, 2005). Ballard e Nelson em 1962, estudaram o efeito do polimorfismo na taxa de absorção da metilprednisolona em implante subcutâneo de duas formas de cristais (polimorfos I e II). A taxa de dissolução *in vitro* foi cerca de 1,2 vezes mais rápida para a forma menos estável a forma II do que a forma I, e a taxa absorção do implante da forma II foi de cerca de 1,7 vezes mais rápida do que a forma I (BALLARD & NELSON, 1962).

A equação de Noyes e Whitney prevê que o aumento da viscosidade do veículo pode retardar a dissolução da droga, pois o coeficiente de difusão do fármaco diminuiria em função do aumento da viscosidade do veículo. Assim, uma medida de controle sobre o taxa de dissolução pode ser alcançada pela manipulação da viscosidade do veículo utilizado no sistema disperso. O uso de um óleo, como o óleo de gergelim, como veículo pode resultar em uma dissolução retardado do fármaco a partir de um injeção de depósito (NAIL & STICKELMEYER, 2005).

Além de propriedades físico-químicas do fármaco e da formulação, alguns fatores fisiológicos influenciam a absorção do fármaco a partir das suspensões parenterais. Os fármacos administrados por via intramuscular ou subcutânea requerem uma fase de absorção, a fim de serem biodisponíveis. Dado que o fármaco é absorvido principalmente por difusão para os capilares no local da injeção, então quanto maior o fluxo sanguíneo no local da injeção, mais rápida será a absorção do fármaco. Assim, qualquer fator que influencia o fluxo de sangue no local da injeção também influencia a taxa de absorção do fármaco (NAIL & STICKELMEYER, 2005).

1.4 CONTROLE DE QUALIDADE

Há alguns anos atrás, a preocupação do controle de qualidade de produtos farmacêuticos restringia-se às análises físico-químicas a fim de atestar o teor do fármaco e sua uniformidade. Não se questionava a capacidade da forma farmacêutica em liberar o fármaco para que fosse absorvido em quantidade e taxa de velocidade adequadas para o alcance do efeito terapêutico seguro e eficaz.

Hoje, é possível compreender a importância do teste de dissolução, pois um comprimido tecnicamente perfeito não garante sua eficácia, pois além das fases farmacocinéticas (absorção, distribuição, biotransformação e excreção) e da fase farmacodinâmica (interação fármaco-receptor), existe a fase biofarmacotécnica cujo objetivo é a liberação do fármaco a partir do medicamento, tornando-o solúvel e disponível para ser absorvido (STORPIRTIS & CONSIGLIERI, 1995). Desta forma, a experiência resultante de estudos biofarmacotécnicos comprova que o conceito de qualidade de medicamentos vai além dos aspectos técnicos considerados essenciais, tais como a identidade, pureza, teor, potência, entre outros, sendo indispensável que o medicamento libere o fármaco na quantidade e na velocidade adequadas ao objetivo terapêutico pretendido (STORPIRTIS *et al.*, 1999).

Rotineiramente o controle de qualidade de muitos produtos farmacêuticos é baseado na cinética de dissolução *in vitro* do fármaco, a fim de predizer a eficiência

das formulações, sendo assim, o teste de dissolução de medicamentos torna-se uma excelente ferramenta na detecção de problemas na formulação que poderiam alterar a liberação do fármaco no organismo, e conseqüentemente, a biodisponibilidade.

Embora grande parte dos estudos sobre dissolução durante as últimas duas décadas tenha-se concentrado em comprimidos e cápsulas, alguns autores apontam a importância das características de dissolução de fármacos administrados em suspensão. Isso não é de causar surpresa, pois as suspensões são semelhantes à forma desintegrada de comprimidos e cápsulas; se a dissolução se tornou uma prioridade para essas formulações, é lógico se estender o seu conceito para suspensões, uma vez que, vários estudos demonstraram que a absorção de vários fármacos pouco solúveis administrados em formulações por suspensão é limitada pela taxa de dissolução (BISRAT & NYSTRÖM, 1988; SIMÕES, SOUSA, FIGUEIREDO, 1996; GENNARO, 2004).

O ensaio de dissolução deste tipo de formulação pode ser considerado adequado para comparar a cinética de dissolução do fármaco lote a lote e também entre produtos, sendo uma forma de garantir a qualidade da formulação, além de também ser uma forma de verificar a equivalência farmacêutica entre os produtos disponíveis comercialmente. Desta forma, o estudo de dissolução aplicado a suspensões injetáveis merece atenção, a fim de averiguar a cinética de dissolução dos fármacos, a partir desta forma farmacêutica.

Os estudos de dissolução representam uma ferramenta indispensável para as várias etapas dos processos de desenvolvimento farmacotécnico de medicamentos, permitindo verificar a estabilidade dessas formulações. Na área de produção farmacêutica e controle de qualidade, os resultados do teste de dissolução podem ser empregados para detectar desvios de fabricação, para assegurar uniformidade durante a produção de um lote e a reprodutibilidade lote a lote. Testes de dissolução também podem ser utilizados para avaliar mudanças após o registro do produto e podem auxiliar na decisão para a realização de estudos de bioequivalência e no desenvolvimento de CIVIV (MARQUES & BROWN, 2002; SHAH, 2005).

O teste de dissolução é um ensaio relativamente simples de ser realizado em laboratório. Entretanto é importante que as condições empregadas sejam

adequadas às formulações, de modo a apresentar relevância para o controle de qualidade dos produtos e, quiçá, predizer o desempenho *in vivo* destes. Pelo fato desse tipo de controle em suspensões estar presente nos fóruns de discussões da Anvisa e das Farmacopéias, como a Brasileira e a Americana, acredita-se que brevemente o teste de dissolução para suspensões injetáveis seja preconizado oficialmente para controle da qualidade destas formas farmacêuticas e para o registro de medicamentos.

1.4.1 Equivalência Farmacêutica de medicamentos

No Brasil, em 1993, houve a publicação do decreto 793 que determinou a prescrição de medicamentos sob denominação genérica, bem como o destaque do nome genérico em relação à marca comercial nas embalagens. Na prática, essa obrigatoriedade visava permitir a substituição de medicamentos nas farmácias, possibilitando que o consumidor pudesse optar pelo menor custo dentre os similares do mercado. Entretanto, essa substituição deveria ter como base a garantia de que a eficácia terapêutica e a segurança de utilização fossem mantidas, independentemente do produto selecionado, fato que gerou ampla discussão no País (STORPIRTIS *et al.*, 1999).

Os medicamentos genéricos foram implantados no Brasil em 1999, enquanto que em 2003 publicou-se regulamentação técnica específica para o registro e para a adequação do registro de medicamentos similares que já eram comercializados no país. As novas regulamentações determinam a apresentação dos resultados de ensaios *in vitro* e/ou *in vivo* relacionados à comprovação da eficácia, segurança e da garantia da qualidade. Assim, estudos de Equivalência Farmacêutica (*in vitro*) e de Bioequivalência (*in vivo*) comparativos com o medicamento referência são critérios aplicáveis a medicamentos genéricos e similares (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

A Equivalência Farmacêutica corresponde à comprovação de que dois medicamentos são equivalentes em relação aos resultados dos testes *in vitro*. Por definição, Equivalentes Farmacêuticos são medicamentos que contém o mesmo

fármaco, isto é, mesmo sal ou éster da mesma molécula terapeuticamente ativa, mesma forma farmacêutica e via de administração e são idênticos em relação a potência ou concentração (STORPIRTIS *et al.*, 2009; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010)

Os estudos de Equivalência Farmacêutica destinam-se a avaliação minuciosa da qualidade dos medicamentos por meio de análise comparativa entre o medicamento teste e o medicamento referência, principalmente dos parâmetros relacionados ao teor e a dissolução do fármaco da forma farmacêutica. É importante ressaltar que o medicamento em teste não deve ser superior ao medicamento referência, mas sim apresentar as mesmas características relacionadas a liberação e dissolução do fármaco e a qualidade já estabelecidas para o medicamento referência. A demonstração da Equivalência Farmacêutica entre dois medicamentos é um indicativo de que o candidato a genérico, ou similar, poderá apresentar a mesma eficácia e segurança do medicamento referência (STORPIRTIS *et al.*, 2009; BRASIL, 2010; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

No caso de soluções aquosas injetáveis por via intravenosa, o fármaco já se encontra dissolvido e toda a dose é administrada diretamente na corrente sanguínea, garantindo 100% de biodisponibilidade do fármaco. Para medicamentos administrados por outras vias parenterais, como a intramuscular, subcutânea ou intratecal, em geral, a absorção não consiste em um processo crítico para biodisponibilidade do fármaco (STORPIRTIS *et al.*, 1999). Entretanto, as suspensões intramusculares ou de uso oral podem ocasionar problemas de biodisponibilidade, uma vez que o processo de dissolução do fármaco ocorre e sofre a influência de fatores como características do fármaco, da formulação, dos processos empregados na fabricação e da via de administração (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Apesar destas formas farmacêuticas administradas por vias parenterais serem comumente isentas de estudos de bioequivalência, a intercambialidade com o medicamento referência é verificada pelo teste de Equivalência Farmacêutica (STORPIRTIS *et al.*, 1999).

1.5 TEORIA DA DISSOLUÇÃO

A cinética de dissolução foi descrita pela primeira vez em 1897 pela equação de Noyes e Whitney, a qual é baseada na segunda lei de Fick. Nesta equação, a área superficial foi considerada constante, porém nem sempre tal condição é aplicável, então em 1900, Brunner e Tolloczko inseriram a área superficial do fármaco (A) na equação, uma vez que esta pode não ser constante (equação 1) (ABDOU, 1995).

$$\frac{dC}{dt} = KA (C_s - C_t) \quad (\text{equação 1})$$

Para explicar o mecanismo de dissolução, Nernst propôs, em 1904, a teoria do filme – modelo da difusão em camada, demonstrado na Figura 3, o qual consiste na dissolução do fármaco na superfície da partícula sólida, formando uma solução saturada ao nível de uma interface sólido - líquido. O fármaco dissolvido ao nível de interface forma uma camada conhecida como camada ou filme estagnante, que se difunde para o seio do solvente, sempre das regiões de maior concentração do fármaco para as de menor concentração (ABDOU, 1995).

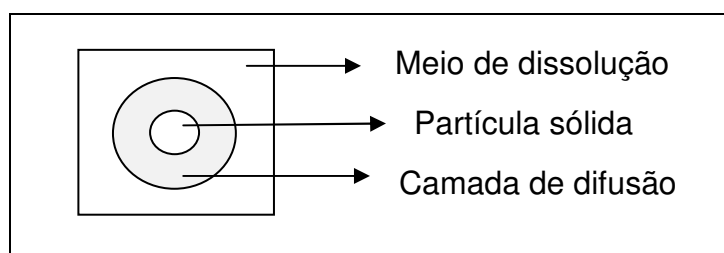


Figura 3. Representação de modelo da difusão em camada.

Neste mesmo ano, Bruner baseando-se no modelo de difusão em camada proposto por Nernst e na 1ª Lei de Fick que descreve o processo de difusão passiva, inclui na equação o coeficiente de difusão (D), a espessura da camada estagnante (h), e o volume do meio de dissolução (V), originando a equação 3 (ABDOU, 1995).

$$\frac{dC}{dt} = k \frac{DA}{Vh} (C_s - C_t)$$

(equação 3)

Dessa forma, a dissolução em função do tempo pode ser vista como um fenômeno de difusão, no qual as moléculas difundem a partir da superfície de um sólido. O processo de difusão produz um gradiente de concentração, no qual a concentração sobre a superfície é correspondente a concentração de saturação. Após o limite externo da camada de solvatação, que é dependente do sistema soluto - solvente, a concentração torna-se constante. Essa relação permite estimar a velocidade e a cinética de dissolução de um fármaco em um determinado meio.

1.5.1 Teste de dissolução

O teste de dissolução possibilita determinar a quantidade de substância ativa dissolvida no meio de dissolução quando o produto é submetido à ação de aparelhagem específica, sob condições experimentais descritas. O resultado é expresso em porcentagem da quantidade declarada no rótulo. O teste se destina a demonstrar se o produto atende às exigências constantes na monografia do medicamento em comprimidos, cápsulas e outros casos em que o teste seja requerido (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Embora o teste de dissolução *in vitro* tenha sido primeiramente desenvolvido e seja reconhecidamente importante para as formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata, nos últimos anos a aplicação desses testes foi estendida a uma grande variedade de formas farmacêuticas de liberação modificada (SIEWERT *et al*, 2003).

É comum que os ensaios que avaliam a dissolução de fármacos *in vitro* sejam denominados de “testes de dissolução”, porém, para formas farmacêuticas administradas por via não oral, o termo “liberação do fármaco” ou “teste de liberação *in vitro*” é preferido (SIEWERT *et al*, 2003; CLARK, DICKINSON, PYRAH, 2005).

A orientação atual é que nenhum produto farmacêutico, no qual exista uma fase sólida, isso inclui as suspensões, seja desenvolvido sem a caracterização da dissolução do fármaco. No contexto de sistemas dispersos injetáveis, é adequado aplicar um teste de dissolução do fármaco (SIEWERT *et al.*, 2003; CLARK, DICKINSON, PYRAH, 2005; BRASIL, 2010), uma vez que a absorção efetiva de um fármaco depende da liberação e da dissolução das partículas no sítio de absorção (STORPIRTIS *et al.*, 1999).

De uma maneira simples, a dissolução pode ser definida como o processo pelo qual as partículas de um fármaco dissolvem-se, e esse, que antes se encontrava no estado sólido, libera-se de sua forma farmacêutica de administração, sendo as moléculas da superfície as primeiras a entrarem em solução. Na interface fármaco-solução forma-se uma camada dita estagnante, a partir da qual as moléculas do fármaco difundem através do líquido solvente e entram em contato com as membranas biológicas, ocorrendo a absorção do fármaco (ANSEL, POPOVICH, ALLEN, 2000).

Os testes de dissolução proporcionam uma avaliação *in vitro* da razão e extensão de liberação do fármaco e podem ser utilizados como uma prerrogativa para estudos de bioequivalência *in vivo* entre formulações teste e referência (LIU, MA, CHOW, 1997). Sendo assim, a meta primordial do ensaio de dissolução *in vitro* seria indicar potenciais problemas de biodisponibilidade do fármaco em uma determinada formulação farmacêutica (BRASIL, 2002).

Os testes de dissolução constituem, ainda, um método padronizado usado para garantir a qualidade lote a lote de produtos farmacêuticos (LÖBENBERG, KRÄMER, SHAH, 2000), para verificar a estabilidade durante o tempo de validade, assegurar a manutenção da qualidade e da performance após alterações na formulação ou no processo de produção e, também, no desenvolvimento de novos medicamentos (PILLAY & FASSIHI, 1999; YUKSEL, KANIK, BAYKARA, 2000).

Entretanto, os princípios que norteiam o teste de dissolução para formas sólidas orais também podem ser aplicados no desenvolvimento de um ensaio de dissolução *in vitro* de formas farmacêuticas especiais, como em suspensões, sistemas transdérmicos, preparações tópicas semi-sólidas, implantes e as formulações microparticuladas injetáveis. Nestes casos, recomenda-se a

padronização dos ensaios de dissolução do fármaco, já que as diferentes propriedades entre as formas de dosagens, seus sítios e modelos de aplicação serão essenciais para a seleção do aparato, composição do meio, agitação e temperatura. A validação do estudo terá como objetivo demonstrar que o novo método garanta exatidão, precisão, reprodutibilidade e, de preferência, que permita uma correlação com o desempenho *in vivo* do medicamento (SIEWERT *et al.*, 2003; CLARK, DICKINSON, PYRAH, 2005).

O desenvolvimento do teste de dissolução deve ser baseado em um conhecimento do fármaco, da forma farmacêutica e da via de administração, e este procedimento *in vitro* deve mimetizar as condições *in vivo* tanto quanto ser razoavelmente prático. Para formas de dosagem de liberação prolongada, que pode ser projetado para liberação do fármaco por períodos prolongados de até 12 meses (hormônios), o desenvolvimento de um teste de dissolução *in vitro* acelerado podem oferecer vantagens consideráveis na redução do tempo de desenvolvimento e para produtos comercializados, em termos de eficiência de recursos e resposta melhorada para problemas de fabricação (CLARK, DICKINSON, PYRAH, 2005). A dissolução *in vitro* pode ser acelerada por meio da escolha de condições adequadas, em particular aumento de temperatura, pH extremo, uso de surfactantes, desde que os requisitos para biorrelevância sejam cumpridos (SIEWERT *et al.*, 2003; CLARK, DICKINSON, PYRAH, 2005).

Qualquer que seja o aparato de dissolução utilizado, um controle rígido deve ser aplicado a vários parâmetros, incluindo a geometria, dimensões, ambiente, temperatura e tempo, para que resultados confiáveis possam ser obtidos. O teste de dissolução é realizado a uma temperatura constante, normalmente 37°C, temperatura do corpo, para formas de dosagem oral e parenteral, na qual deve ser controlada ao longo da duração do teste com uma tolerância de $\pm 0,5^\circ\text{C}$. O meio pode ser constituído de água ou outro meio escolhido para mimetizar as condições fisiológicas, na qual pode incluir um sistema de tampão para manter o pH, e aditivos, tais como os surfactantes. O volume do meio de dissolução deve garantir que, quando todo o fármaco estiver dissolvido, a concentração da solução resultante seja menor do que a solução saturada (CLARK, DICKINSON, PYRAH, 2005; STORPIRTS *et al.*, 2009).

As condições de ensaio experimental devem ser suficientemente discriminatórias (condições brandas) para detectar as variáveis de fabricação que podem afetar o desempenho biofarmacêutico dos produtos. Condições de ensaio que são incapazes de discriminar adequadamente entre produtos ou lotes que apresentam diferentes perfis de dissolução *in vivo*, incluem a alta agitação, o uso de soluções fortemente alcalinas para dissolver os ácidos pouco solúveis, e o uso de tensoativos em altas concentrações no meio de dissolução para criar condições *sink* (SIEWERT *et al.*, 2003).

1.5.2 Dissolução de suspensões

A aplicação dos ensaios de dissolução *in vitro* na avaliação da qualidade de suspensões ainda é recente, e recomendada em apenas nove monografias da Farmacopéia Americana para suspensões orais de cefdinir, cefuroxima, fenitoína, ibuprofeno, indometacina, megestrol, meloxicam, micofenolato e nevirapina, porém, constatou-se a ausência de monografia que inclua ensaios de dissolução para suspensões injetáveis (USP, 2011). Apesar da ausência de ensaios de dissolução *in vitro* para suspensões injetáveis descritos em compêndios oficiais ou também, descritos através de artigos científicos, observa-se a crescente preocupação dos órgãos oficiais em estabelecer metodologias para avaliar a liberação de fármacos a partir desta forma farmacêutica injetável, uma vez que, são consideradas formas parenterais de depósito, na qual sua atividade terapêutica é dependente da etapa de dissolução para que ocorra a absorção do fármaco.

Apesar das suspensões constituírem um sistema disperso, a absorção do fármaco, a partir desta forma farmacêutica, estará também condicionada pela velocidade de dissolução. Os fatores associados a essa formulação que podem interferir nesse processo são (AULTON, 2005):

- Tamanho de partícula;
- Forma cristalina do fármaco;
- Complexação (exemplo: entre o fármaco e o agente suspensor);
- Adição de tensoativos;

- Viscosidade da suspensão.

Em geral, a metodologia recomendada para os ensaios de dissolução de suspensões é o método pá rotativa, aparato 2, usando um meio de dissolução aquoso. Parâmetros do método tais como a introdução da amostra e a taxa de agitação, devem ser estabelecidos com base na viscosidade e composição da matriz da suspensão. A técnica de introdução da amostra deve ser exata, precisa e reprodutível, e idealmente, o volume/peso de amostra deve refletir uma dose típica do produto. Apesar das suspensões orais de qualquer viscosidade serem expostas às variações semelhantes às forças de cisalhamento após a administração *in vivo*, a taxa de agitação *in vitro* deve ser selecionada para facilitar a discriminação entre lotes com diferentes propriedades de liberação. Para suspensões de baixa viscosidade, uma dose precisa pode ser entregue no fundo da cuba de dissolução utilizando uma pipeta volumétrica. A taxa de agitação lenta, de 25 rpm, é geralmente recomendada para suspensões menos viscosas, uma taxa de agitação mais rápida, como 50 ou 75 rpm, também pode ser exigida para suspensões de alta viscosidade. A amostragem pode ser equivalente à dose ou a uma fração desta, caso a condição *sink* não esteja contemplada (SIEWERT *et al.*, 2003; GRAY, 2005; BROWN, 2005).

Idealmente, as condições fisiológicas do local da administração devem ser levadas em conta ao selecionar as condições do teste de dissolução / liberação *in vitro*. A composição do meio de dissolução de formulações parenterais deve levar em consideração a osmolaridade, pH, e a capacidade de tampão dos fluidos no local da administração, que são geralmente semelhantes aos do plasma ou músculo. No entanto, os principais desafios para a forma farmacêutica de administração parenteral é determinar a duração apropriada do teste e tempos de coletas das amostras, na qual deverão caracterizar adequadamente o perfil de dissolução do fármaco. A possibilidade de executar o teste sob condições aceleradas é atraente e tem sido aplicada com sucesso através de elevadas temperaturas e utilização de valores de pH oferecendo liberação mais rápida da droga (SIEWERT *et al.*, 2003).

1.5.3 Estudo do perfil de dissolução

O perfil de dissolução pode ser definido como um ensaio *in vitro* que permite a construção da curva de porcentagem de fármaco dissolvido em função do tempo, empregando-se, geralmente, as condições estabelecidas no teste de dissolução descrito na monografia do medicamento inscrita na Farmacopéia Brasileira ou, na sua ausência, em outros compêndios autorizados pela legislação vigente (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

As metodologias para os testes de dissolução descritas nos compêndios oficiais indicam como especificação um único ponto de amostragem, e o tempo da amostragem é estabelecido para cada monografia. No tempo indicado é realizada a coleta e quantifica-se o fármaco dissolvido, verificando se está de acordo com as especificações preconizadas na monografia. Porém, segundo a RE nº 482 da Anvisa, para uma análise mais detalhada de desempenho do produto, na qual se avalia um perfil de dissolução do fármaco em função do tempo é necessária a realização de várias tomadas de amostras do meio de dissolução. Para o estabelecimento de uma CIVIV com estudos de biodisponibilidade é necessária a realização de estudos de perfis de dissolução do medicamento (BRASIL, 2002).

O perfil de dissolução, por demonstrar através de uma curva a dissolução do fármaco em função do tempo, pode ser utilizado na comparação entre medicamentos. A RDC nº 31 da Anvisa recomenda a realização do estudo de perfil de dissolução comparativo para várias formas farmacêuticas, entre elas as suspensões. A comparação dos perfis de dissolução torna-se aplicável em casos de desenvolvimento de formulações, no controle de qualidade lote a lote, em alterações pós-registro, quando se deseja conhecer o comportamento de dois medicamentos antes de submetê-los a estudo de biodisponibilidade relativa e para isenção de estudo em menores dosagens (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; BRASIL, 2010).

O número de pontos de coleta deve ser representativo do processo de dissolução até que se obtenha platô na curva, sendo obrigatória a quantificação de amostras de no mínimo cinco tempos de coleta, sendo um ponto acima de 85% de dissolução. O coeficiente de variação entre as seis cubas deve ser inferior a 20% nos primeiros tempos, e inferior a 10% nos últimos tempos de coleta. Na comparação dos perfis avalia-se a curva como um todo, no qual é empregado

método de modelo independente simples, utilizam-se os fatores de diferença - f_1 e semelhança - f_2 (BRASIL, 2010).

Os vários métodos propostos para a realização da comparação de perfis de dissolução podem ser classificados em duas categorias: modelo independente e modelo dependente. O primeiro podem ainda ser dividido em procedimentos baseados na análise de variância (ANOVA), testes de razão (razão de porcentagem dissolvida, área sob curva ou tempo de dissolução médio) ou testes combinados (fatores f_1 e f_2) (POLLI, REKHI, SHA, 1996).

A aplicação do método modelo independente permite a determinação da similaridade de cada par de valores, obtidos com os medicamentos em teste e de referência, em cada ponto da curva de dissolução, por meio da utilização dos fatores f_1 e f_2 . O fator f_1 calcula a porcentagem de diferença através da equação 1, entre os dois perfis avaliados a cada tempo de coleta e corresponde a uma medida do erro relativo entre os perfis (STORPIRTIS *et al.*, 2009).

$$f_1 = \left\{ \frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \right\} \cdot 100$$

(equação 1)

Enquanto que o fator f_2 corresponde a uma medida de semelhança entre as porcentagens dissolvidas em cada tempo nos perfis de dissolução (equação 2). Valores de f_1 entre 0 e 15 e valores de f_2 entre 50 e 100 asseguram equivalência entre as curvas de dissolução obtidas e são considerados indicativos de semelhança em relação a eficácia e a segurança dos medicamentos em teste e de referência (STORPIRTIS *et al.*, 2009).

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n w_t (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \cdot 100 \right\}$$

(equação 2)

Para a realização da comparação de perfis de dissolução, julga-se que, os fatores de semelhança e diferença são os de mais fácil aplicação e interpretação, razões que levaram vários órgãos regulatórios, como FDA e ANVISA, a adotá-los como indicativo de semelhança e similaridade entre perfis de dissolução. Porém, atualmente apenas o fator f_2 é preconizado pela ANVISA através da Resolução nº 31 de 2010.

1.6 JUSTIFICATIVA

Diante do exposto, ressalta-se a importância do conhecimento da influência dos fatores biofarmacotécnicos sobre a liberação, dissolução e absorção de fármacos a partir de formas farmacêuticas e, portanto, sobre a eficácia e segurança terapêutica de medicamentos. Neste contexto, pretendeu-se desenvolver uma metodologia para avaliar a dissolução do fármaco dipropionato de betametasona a partir de suspensões injetáveis de administração intramuscular, ainda não oficializado por qualquer compêndio oficial, estabelecendo-se condições que *in vitro* poderão servir de base para prever o desempenho dessas suspensões injetáveis no organismo e, conseqüentemente, utilizar este método de dissolução *in vitro* em análises rotineiras de controle de qualidade de medicamentos, a fim de distinguir, antes do uso clínico, lotes que apresentariam diferentes perfis de dissolução do fármaco dipropionato de betametasona.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver e avaliar a aplicabilidade de um método de dissolução *in vitro* para a suspensão injetável da associação de dipropionato de betametasona e fosfato dissódico de betametasona, e desenvolver um método de quantificação para os fármacos, na qual possam ser utilizados no controle de qualidade produto.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a distribuição granulométrica das partículas do fármaco dipropionato de betametasona na suspensão injetável;
- Desenvolver e validar um método de quantificação simultânea dos fármacos FB e DB na suspensão injetável;
- Verificar a aplicação da metodologia de quantificação em diferentes produtos;
- Estabelecer as condições do teste de dissolução *in vitro* do fármaco DB a partir da suspensão injetável;
- Validar o método de quantificação para quantificar o fármaco DB nos ensaios de dissolução *in vitro*;
- Aplicar o teste de dissolução *in vitro* em diferentes produtos e avaliar os resultados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Equipamentos e acessórios

- Analisador de tamanho de partícula Mastersizer 2000 – Malvern, unidade de medida Hydro SM;
- Balança analítica Mettler Toledo – AG204;
- Balança de precisão Mettler Toledo – PB3002;
- Banho de ultra-som Unique - Ultra Cleaner 1400;
- Bomba a vácuo;
- Centrífuga Eppendorf 5430R;
- Coluna cromatográfica Kromasil 100-5 C18, 4,6 x 150 mm, série nº E49000;
- Coluna cromatográfica Shimadzu Shim-pack CLC ODS 4,6 x 250 mm, série nº 4256995;
- Coluna cromatográfica Kromasil 100 C8, 4,6 x 150 mm, série nº101117;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Elite LaChrom – bomba modelo L-2455, auto-injetor modelo L-2200, detector de arranjo de fotodiodos modelo L-2130 e sistema de dados (software) EzeChrom;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu – bomba modelo LC-10AD, auto-injetor modelo SIL-10AD, detector de arranjo de fotodiodos modelo SPD-M10A, e sistema de dados (software) modelo CLASS-VP versão 6.1;

- Dessecador Vidrolabor;
- Destilador Novatécnica NT 425;
- Dissolutor Hanson Research SR6;
- Espectrofotômetro de Infravermelho Shimadzu IR Prestige – 21;
- Estufa Quimis Q-317B;
- Filtro de amostra 10 µm Hanson Research;
- Membrana filtrante 0,45 µm Millipore;
- Membrana filtrante 0,1 µm Millipore;
- Placa de agitação multipontos – Mettler;
- Placa de agitação magnética e aquecimento – Corning;
- Polarímetro Schmidt + Haensch Polartronic NH8;
- Potenciômetro Mettler Toledo MPC 227;
- Titulador Karl Fischer Mettler DL18.

3.1.2 Reagentes

- Acetonitrila grau cromatográfico – Tedia;
- Acetonitrila grau espectroscópico – Tedia;
- Ácido fosfórico P.A. – Vetec;
- Ácido hialurônico – Galena;
- Bicarbonato de sódio P.A. – Vetec;
- Brometo de potássio – Shimadzu;
- Cloreto de cálcio P.A. – Vetec;
- Cloreto de magnésio P.A. – Vetec;

- Cloreto de potássio P.A – Vetec;
- Cloreto de sódio – Merck;
- Dioxano P.A. – Vetec;
- Fosfato de potássio dibásico – Merck;
- Fosfato de potássio monobásico P.A. anidro – Vetec;
- Fosfato de sódio dibásico P.A. – Vetec;
- Fosfato de sódio monobásico P.A. – Merck;
- Hidróxido de sódio P.A. – Vetec;
- Imidazol P.A. – Vetec;
- Lauril Sulfato de Sódio – Vetec;
- Lecitina de soja – Gerbras;
- Metanol para CLAE – Tedia;
- Metanol para espectroscopia – Tedia;
- Reagente de Karl Fischer – Merck;
- Solução tampão pH 4,01 e 7,00 – Tedia;
- Sulfato de sódio P.A. – Vetec;
- Tween 20 – Vetec;
- Tween 80 – Vetec.

3.1.3 Substâncias químicas de referência, matérias primas e produtos farmacêuticos

- USP - Substância Química de Referência (SQR) - Fosfato de sódio de betametasona, lote L0G223;
- USP - SQR - Dipropionato de betametasona, lote L0G377;

- Fosfato de sódio de betametasona matéria prima fornecida pela Mantecorp Indústria Química e Farmacêutica Ltda, código CFOP5910;
- Dipropionato de betametasona matéria prima fornecida pela Mantecorp Indústria Química e Farmacêutica Ltda, código CFOP5910;
- Medicamento Diprospan® - produto a granel fornecido pela Mantecorp Indústria Química e Farmacêutica Ltda.
- Placebo do medicamento referência - fornecido pela Mantecorp Indústria Química e Farmacêutica Ltda.

Foram adquiridas no mercado diversas formulações de diferentes lotes da suspensão injetável de dipropionato de betametasona e fosfato de sódio de betametasona nas concentrações de 5 mg e 2 mg/ml, respectivamente.

- Beclonato ® - fabricado pela Ducto;

Veículo: bissulfito de sódio, creatinina, citrato de sódio, metilparabeno, hidróxido de sódio, água para injeção, povidona.

- Betaprospan ® - fabricado pela União Química;

Veículo: cloreto de sódio, edetato dissódico dihidratado, polissorbato 80, hidróxido de sódio, bissulfito de sódio, fosfato de sódio dibásico anidro, carboximetilcelulose sódica e água para injeção.

- Betaspan ® - fabricado pela União Química;

Veículo: fosfato dibásico de sódio, fosfato monobásico de sódio, edetato dissódico dihidratado, cloreto de sódio, álcool benzílico, carbowax 300, carbowax 400, polissorbato 80, nipagin, nipazol, carboximetilcelulose e água para injeção.

- Betatrinta ® - fabricado pela Eurofarma;

Veículo: edetato dissódico dihidratado, carmelose, macrogol 4000, fosfato monossódico, fosfato dissódico, cloreto de benzalcônio e água para injeção.

- Diprobeta ® - fabricado pela Bunker;

Veículo: fosfato dibásico de sódio, fosfato monobásico de sódio, edetato dissódico dihidratado, cloreto de benzalcônio, PEG 300, PEG 400 e água para injeção.

- Diprocort ® - fabricado pela Mabra;

Veículo: polissorbato 20, edetato dissódico dihidratado, álcool benzílico, propilenoglicol 6000 e água para injeção.

- Diprospan ® - fabricado pela Mantecorp;

Veículo: fosfato de sódio dibásico, cloreto de sódio, edetato dissódico, polissorbato 80, álcool benzílico, metilparabeno, propilparabeno, carboximetilcelulose sódica, polietilenoglicol e água para injeção.

- Duoflam ® - fabricado pela Cristália;

Veículo: álcool benzílico, edetato dissódico, cloreto de sódio, macrogol 4000, polissorbato 80, carboximetilcelulose sódica, fosfato de sódio dibásico, ácido clorídrico, hidróxido de sódio e água para injeção.

- Genérico – fabricado pela Brainfarma;

Veículo: fosfato de sódio dibásico, cloreto de sódio, edetato dissódico, polissorbato, álcool benzílico, metilparabeno, propilparabeno, carboximetilcelulose, macrogol e água para injeção.

- Genérico – fabricado pela Eurofarma;

Veículo: edetato dissódico, carboximetilcelulose, polietilenoglicol 4000, fosfato monossódico, fosfato dissódico, cloreto de benzalcônio e água para injeção.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Caracterização das matérias primas

Para a padronização das matérias primas dos fármacos FB e DB a serem utilizadas como padrão de trabalho neste estudo foram realizadas análises segundo os critérios estabelecidos em suas respectivas monografias descritas na *United States Pharmacopeia – USP 34 (2011)*. A análise dos espectros de infravermelho foi realizada de acordo com a USP 34 (2011) e MOFFAT e colaboradores (2004).

3.2.1.1 Dipropionato de betametasona

Na Tabela 1 estão apresentados os ensaios realizados a fim de caracterizar e verificar a qualidade da matéria-prima DB.

Tabela 1. Testes realizados na matéria prima DB

Testes	Metodologia	Referência
Identificação por IV	Espectrofotometria IV	USP 34; MOFFAT <i>et al.</i> , 2004
Rotação específica	Polarimetria	USP 34
Perda por dessecação	Gravimetria	USP 34
Doseamento	Cromatografia líquida de alta eficiência	USP 34

3.2.1.1.1 Espectrofotometria no infravermelho

Foram preparadas pastilhas de brometo de potássio contendo 1% (p/p) de DB SQR e matéria prima, as quais foram analisadas em espectrofotômetro de infravermelho, realizando-se varredura do espectro entre 500 e 4000 cm^{-1} . As bandas observadas foram caracterizadas de acordo com os grupos funcionais que a representam, e os máximos de absorção da SQR comparados com os da matéria prima.

3.2.1.1.2 Rotação específica

A análise foi realizada conforme método de polarimetria <781S> descrito na USP 34. As amostras foram diluídas em solvente orgânico dioxano obtendo-se uma solução de 10 mg/mL de DB.

3.2.1.1.3 Perda por dessecação

Para esta análise foi seguido o procedimento geral <731> e as especificações presentes na monografia do fármaco descritas na USP 34.

3.2.1.1.4 Determinação do teor

Para a quantificação do DB foi utilizado o método de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) descrito na monografia na USP 34.

3.2.1.1.4.1 Preparo da solução padrão

Foi pesada, precisamente, uma quantidade de DB SQR e dissolvida utilizando como diluente uma solução de ácido acético em metanol (1:1000), na qual foi diluída quantitativamente até obtenção de uma solução de concentração conhecida de aproximadamente 0,3 mg/mL.

3.2.1.1.4.2 Preparo da solução amostra

Foi pesado, com precisão, aproximadamente de 60 mg de DB matéria prima, a qual foi dissolvida e diluída, quantitativamente, com uma solução de ácido acético e metanol (1:1000) até obtenção de uma solução de concentração aproximada de 0,3 mg/mL. O doseamento foi realizado em sextuplicata.

3.2.1.1.4.3 Condições cromatográficas

Foi utilizada como fase estacionária uma coluna cromatográfica C18 Shimadzu com tamanho de partícula de 5 μm , 4,6 de diâmetro interno e 250 mm de comprimento. A fase móvel era constituída de uma solução de acetonitrila (1 em 2) desgaseificada. O fluxo da fase móvel era de 1,2 mL/min. O volume de injeção das amostras foi de 20 μL . Os dados foram adquiridos em comprimento de onda de 254 nm.

3.2.1.2 Fosfato de sódio de betametasona

Os ensaios realizados para caracterizar e verificar a qualidade da matéria-prima FB estão apresentados na Tabela 2, e foram realizados de acordo com a USP 34 (2011). Os espectros de infravermelhos foram analisados segundo USP 34 e MOFFAT e colaboradores (2004).

Tabela 2. Testes realizados na matéria-prima FB

Testes	Metodologia	Referência
Identificação por IV	Espectrofotometria IV	USP 34; MOFFAT <i>et al.</i> ,2004
Rotação específica	Polarimetria	USP 34
Conteúdo de água	Aquametria por Karl Fischer	USP 34
Doseamento	Cromatografia líquida de alta eficiência	USP 34

3.2.1.2.1 Espectrofotometria no infravermelho

Foram preparadas pastilhas de brometo de potássio contendo 1% p/p de FB SQR e matéria prima, as quais foram analisadas em espectrofotômetro de infravermelho, realizando-se a varredura do espectro entre 500 e 4000 cm^{-1} . As bandas observadas foram caracterizadas de acordo com os grupos funcionais que a representam, e a matéria prima foi comparada com os máximos de absorção da SQR.

3.2.1.2.2 Rotação específica

A análise foi realizada conforme método geral de polarimetria <781S> descrito na USP 34. As amostras foram diluídas em água obtendo-se uma solução de 10 mg/mL de FB.

3.2.1.2.3 Conteúdo de água

Os teores de umidade presentes na SQR e na matéria prima foram determinados através do método geral I <921> descrito na USP 34, o qual é baseado na técnica de aquimetria com reagente de *Karl Fischer*.

3.2.1.2.4 Determinação do teor

Através do método de doseamento por CLAE descrito na monografia da USP 34 foi determinado o teor do FB na matéria prima.

3.2.1.2.4.1 Preparo da solução padrão

Uma quantidade precisamente pesada de FB SQR foi dissolvida em uma mistura de metanol e água (3:2), e diluída quantitativamente até obtenção de uma solução de concentração conhecida de aproximadamente 0,17 mg/mL.

3.2.1.2.4.2 Preparo da solução amostra

Foi pesado com precisão aproximadamente 34 mg de FB matéria prima e transferido para balão volumétrico de 200 mL. Foi dissolvido e diluído com uma mistura de metanol e água (3:2) até obtenção de uma solução de concentração aproximada de 0,17 mg/mL. O doseamento foi realizado em sextuplicata.

3.2.1.2.4.3 Condições cromatográficas

Como fase estacionária foi utilizada uma coluna cromatográfica C18 Shimadzu com tamanho de partícula de 5 µm, 4,6 de diâmetro interno e 250 mm de comprimento. A fase móvel era constituída de uma mistura filtrada e desgaseificada de metanol e fosfato de potássio monobásico anidro 0,07 M (60:40). O fluxo da fase móvel foi de 1,2 mL/min. O volume de injeção das amostras foi de 20 µL. Os dados foram adquiridos em comprimento de onda de 254 nm.

3.2.2 Desenvolvimento de metodologia de quantificação de FB e DB nas suspensões injetáveis

O desenvolvimento do método de quantificação de FB e DB nas suspensões injetáveis foi baseado nas variadas condições cromatográficas descritas na Farmacopéia Americana, na qual as monografias estabelecem o método de doseamento destes fármacos como matéria prima, e também quando associados a diferentes fármacos em outras formulações (USP, 2010).

3.2.2.1 Fase móvel, vazão de fluxo e temperatura

No desenvolvimento do método cromatográfico foram aplicadas análises com eluição isocrática, na qual a composição da fase móvel permaneceu inalterada, e análises em modo de eluição com gradiente, ou seja, a composição da fase móvel foi alterada durante o processo de separação. Para a composição da fase móvel foram avaliadas misturas binárias e ternárias de fase orgânica constituída de metanol (MeOH) e/ou acetonitrila (ACN), e de fase aquosa, como tampão fosfato de potássio 0,07 M (TFP), água ou água acidificada com ácido acético (1:1000). A solução de TFP 0,07 M foi preparada conforme descrito na USP (2010). A fase móvel foi filtrada em membrana 0,45 µm e desgaseificada antes do uso.

Associado a escolha da fase móvel, velocidades de fluxo de 1,0 a 1,6 mL/min foram testadas levando em conta o tempo de retenção dos fármacos, resolução e a pressão do sistema cromatográfico, a fim de se obter um sinal cromatográfico adequado para os fármacos em um tempo de corrida satisfatório. Todas as análises foram realizadas em temperatura de 25°C.

3.2.2.2 Fase estacionária

Escolher a melhor coluna para aplicação em uma análise requer considerações sobre a estrutura química da fase estacionária, capacidade de retenção, tamanho de partícula e dimensões da coluna. Para identificar a melhor fase estacionária para a separação dos fármacos FB e DB na suspensão injetável, foram testadas colunas cromatográficas ligadas quimicamente a grupos octadecilsilano (C18) e a grupos octilsilano (C8), ambas com dimensões de 4,6 x 150 mm e partículas de 5 µm. A performance das colunas foi avaliada através dos parâmetros cromatográficos assimetria, pratos teóricos e resolução entre os picos.

3.2.2.3 Volume de injeção, detecção e diluente

O volume de injeção foi selecionado observando-se a integração do pico e o limite de quantificação dos fármacos.

Foi realizada uma varredura nos comprimentos de onda entre 200 e 400 nm no cromatógrafo Elite LaChrom que possui detector de arranjo de fotodiodos, com o objetivo de verificar as características de absorção dos fármacos na região ultravioleta (UV) e assim selecionar o comprimento de onda (λ) mais adequado, além de garantir que nenhum excipiente da formulação iria interferir na absorção do fármaco. Para a escolha do diluente considerou-se a solubilidade dos fármacos de forma a proporcionar uma adequada solvatação.

3.2.3 Validação do método de quantificação de FB e DB nas suspensões injetáveis

Os ensaios para a validação da metodologia proposta foram realizados conforme as recomendações contidas na legislação vigente, a resolução RE 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Guia do Internacional Conference on Harmonisation (ICH), os quais descrevem que testes de quantificação para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos devem apresentar especificidade, linearidade, precisão, limite de quantificação, limite de detecção, exatidão e robustez adequados a análise pretendida (ICH, 1996; BRASIL, 2003). Na validação do método analítico foi utilizado o medicamento referência (produto a granel) e seu placebo, doados pela empresa produtora.

3.2.3.1 Preparo da solução estoque padrão e solução padrão

Transferiu-se cerca de 50 mg, precisamente pesado, de padrão de dipropionato de betametasona e 20 mg de padrão de fosfato de sódio de betametasona para balão volumétrico de 100 mL. Adicionou-se 50 mL de acetonitrila e 30 mL de água. Após 15 min no ultrassom, ou até a completamente solubilização, o volume foi completado com água obtendo-se uma solução estoque padrão de 500 e 200 µg/mL dos fármacos, respectivamente. A partir de uma alíquota da solução estoque padrão diluída com acetonitrila e água (50:50) foi obtida a solução padrão de 200 e 80 µg/mL dos fármacos, respectivamente, na qual foi filtrada em filtro de membrana de 0,45 µm antes das injeções.

3.2.3.2 Preparo da solução amostra

Transferiu-se o volume de uma ampola equivalente a 5 mg de dipropionato de betametasona e 2 mg de fosfato de sódio de betametasona para balão volumétrico

de 25 mL. Adicionou-se 12,5 mL de acetonitrila e 7,5 mL de água. O mesmo procedimento adotado para o preparo da solução padrão foi seguido obtendo-se uma solução de 200 e 80 µg/mL dos fármacos, respectivamente. As soluções foram filtradas em filtro de membrana de 0,45 µm antes das injeções.

3.2.3.3 Especificidade e seletividade

A especificidade e seletividade do método foram determinadas em um cromatógrafo à líquido acoplado a detector de arranjo de fotodiodos (DAD) e analisada através do *software* EZChrom Elite. Para isso, foram injetadas soluções dos padrões de DB e FB, do produto e do placebo nas concentrações de 200 e 80 µg/mL, respectivamente. Para verificar a especificidade foram realizadas sobreposições das varreduras espectrais do início, meio e fim dos picos dos fármacos. Os espectros resultantes do padrão e da amostra foram comparados e o índice de similaridade determinado. Determinou-se o índice de pureza dos picos através de *radiogram*, o qual define a razão da relação das absorbâncias em função do tempo de eluição. Para procedimentos cromatográficos, cromatogramas representativos foram utilizados para demonstrar a especificidade (ICH, 1996).

3.2.3.4 Linearidade

A linearidade do método foi verificada a partir de três curvas com cinco níveis de concentrações. A solução estoque padrão foi diluída com acetonitrila e água (50:50; v/v), a fim de obter-se concentrações aproximadas de 120, 160, 200, 240 e 280 µg/mL de dipropionato de betametasona, e concentrações aproximadas de 48, 64, 80, 96 e 112 µg/mL de fosfato sódico de betametasona. Todas as soluções finais foram filtradas em filtro de membrana Millipore de 0,45 µm antes das injeções e os resultados obtidos foram tratados estatisticamente através de análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e análise de variância (ANOVA) através do *software* GraphPad Prism, com nível de significância de $\alpha < 0,05$.

3.2.3.5 Precisão intermediária e repetibilidade

A precisão foi avaliada em dois níveis, repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdias) em dias consecutivos, para as soluções do medicamento referência nas concentrações de 80, 100 e 120% com três réplicas cada. As soluções foram analisadas e a seguir o desvio padrão relativo (DPR) entre as medidas foi calculado.

3.2.3.6 Precisão de injeção

A precisão de injeção foi avaliada através de 5 injeções na concentração de trabalho dos fármacos. Foi calculado o desvio padrão (DP) e o DPR a partir das áreas obtidas.

3.2.3.7 Limite de quantificação e Limite de detecção

Os limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD) foram estimados com base no desvio padrão da resposta e da inclinação da curva de calibração dos analitos através das equações $LQ = DP \times 10/IC$ e $LC = DP \times 3/IC$, no qual DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo y de três curvas de calibração e IC é a média dos coeficientes angulares das respectivas curvas (ICH, 1996; BRASIL, 2003).

3.2.3.8 Exatidão

A exatidão foi calculada como porcentagem de recuperação, através da relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (BRASIL, 2003). O estudo da exatidão foi realizado pela adição de padrão à solução de placebo do medicamento referência

nas concentrações de 80, 100 e 120% com três réplicas cada. As soluções foram analisadas e posteriormente calculou-se o percentual de recuperação.

3.2.3.9 Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada através da análise do teor dos fármacos no medicamento referência em diferentes condições cromatográficas, produzidas através de alterações no pH da fase móvel (4,01 - 4,45 - 4,97), na temperatura (25 - 30 °C), na vazão de fluxo (1,5 - 1,6 mL/min) e na mudança de cromatógrafo (Elite LaChrom para Shimadzu 10A).

3.2.4 Doseamento dos fármacos FB e DB na suspensão injetável

3.2.4.1 Aplicação do ensaio de quantificação em diferentes produtos

A quantificação foi realizada em amostra de dez diferentes produtos disponíveis no mercado, incluindo o medicamento referência, genéricos e similares, no qual foram nomeados de A à J. As amostras foram preparadas conforme descrito em *Preparo da solução amostra* (ver item 3.2.3.2). Foi determinada a equação da reta pela concentração *versus* área para cada fármaco através de cinco diferentes concentrações do padrão. A massa dos fármacos presente na ampola foi calculada utilizando a equação da reta em cinco níveis, obtida por regressão linear.

O principal intuito desta análise de doseamento em variados produtos foi verificar qualitativamente a especificidade e a seletividade da metodologia de quantificação frente aos diferentes constituintes presentes nas formulações. Desta forma, foi verificado se os parâmetros cromatográficos tempo de retenção, assimetria, pureza de pico e resolução foram mantidos e considerados adequados para a análise do teor dos fármacos nos diferentes produtos.

3.2.4.2 Doseamento de produtos

Foi realizado o ensaio de doseamento dos fármacos FB e DB na suspensão injetável, a fim de quantificar a massa presente no volume de uma ampola. As amostras foram preparadas conforme descrito em *Preparo da solução amostra* (ver item 3.2.3.2), sendo o ensaio realizado em sextuplicata ($n = 6$). A massa dos fármacos foi calculada utilizando a equação da reta em três níveis, obtida por regressão linear.

Foram analisadas quatro diferentes formulações disponíveis no mercado, na qual inclui o medicamento referência, um genérico e dois similares.

3.2.5 Análise da distribuição do tamanho de partícula de DB nas suspensões injetáveis

Uma das técnicas mais indicadas para a determinação da distribuição granulométrica em suspensões é a de difração a laser, que possui como princípio de medição o espalhamento de luz. Este método permite que as partículas em suspensão recirculem em frente ao feixe do laser, garantindo que todas as partículas sejam medidas, refletindo em elevada reprodutibilidade dos resultados (RAWLE, 2011). Neste estudo, a determinação da distribuição do tamanho de partícula foi realizada através da técnica de difração a laser.

Durante a medição por difração a laser, um feixe de laser focalizado passa através das partículas. Estas partículas dispersam a luz em um ângulo que é inversamente proporcional ao seu tamanho, sendo assim, o tamanho da partícula é calculado com base na intensidade angular da luz espalhada recebida pelos detectores fotossensíveis. Nesse cálculo foi empregada a aproximação de Fraunhofer, que assume que todos os tamanhos de partícula espalham a luz com a mesma eficiência e que as partículas analisadas são opacas, não transmitindo assim a luz incidida (RAWLE, 2011).

O equipamento empregado nas análises foi o analisador de tamanho de partícula *Mastersizer 2000/2000E* (Malvern) com faixa de leitura de 0.02 μm a 2000 μm . A unidade de dispersão para amostras de pequeno volume, *Hydro SM*, foi utilizada, na qual as partículas presentes em uma suspensão são medidas devido a técnica permitir a recirculação da amostra em frente ao feixe do laser. O meio dispersante utilizado foi água destilada, e a agitação, permitindo a recirculação, foi de 1500 rpm. Os dados foram coletados e analisados a partir do software *Mastersizer 2000* versão 5.6.

Para verificar se o meio dispersante era adequado, ou seja, se as partículas de DB não solubilizavam durante a recirculação do meio dispersante na unidade *Hydro SM*, após adição da suspensão na unidade contendo água, foram retiradas alíquotas nos tempos de 0, 15 e 30 minutos após início da agitação, na qual foram filtradas em filtro de membrana Millipore 0,1 μm e analisadas qualitativamente através da análise por CLAE validada no item 3.2.3.

3.2.6 Composição dos meios de dissolução

A composição dos diferentes meios empregados para avaliar a solubilidade do fármaco DB (ver item 3.2.3), e para o desenvolvimento do ensaio de dissolução do DB a partir da suspensão injetável, está descrita na tabela 3.

Tabela 3. Descrição da composição dos meios de dissolução e do percentual de tensoativo utilizado em cada meio

Meio de dissolução	Composição química	Tensoativos / concentração (%)
Tampão fosfato de potássio 0,1 M (TFP)	Um volume de 50 mL de solução de KH_2PO_4 0,2 M, e de 39,1 mL de solução de NaOH 0,2 M, foram misturados em água destilada completando o volume para 200 mL (USP, 2010)	LSS 0,5%; P80 0,5; 1; 1,5%; P20 0,5; 1; 1,5%
Tampão fosfato de sódio 0,1 M (TFS)	Um volume de 57 mL de solução NaH_2PO_4 0,2 M, e de 243 mL de solução Na_2HPO_4 0,2 M, foram misturados em água destilada completando o volume para 200 mL (USP, 2010)	LSS 0,05; 0,1; 0,5%; P80 0,5, 1 1,5%; P20 0,5, 1 e 1,5%
Fluido corporal simulado (FCS)	NaCl 136,8 mM - NaHCO_3 4,2 mM – KCl 3 mM – $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1 mM – $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1,5 mM – $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5 mM – Na_2SO_4 0,5 mM – H_2O (CHO <i>et al.</i> , 1996)	LSS 0,1; 0,5%; P80 0,5, 1 1,5%; P20 0,5, 1 e 1,5%
Fluido muscular simulado (FMS)	Cloreto de sódio (NaCl) 160 mM e Imidazol ($\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$) 20 mM em água destilada (SORENSEN <i>et al.</i> , 1995)	LSS 0,1; 0,5%; P80 0,5, 1 1,5%; P20 0,5, 1 e 1,5%
Fluido sinovial simulado (FSS)	Solução de tampão fosfato salino – PBS, Ácido Hialurônico 0,3 g% (CONZONE <i>et al.</i> , 2002)	LSS 0,1%; P80 0,5%;

LSS – Lauril sulfato de sódio; P80 – Polissorbato 80; P20 – Polissorbato 20.

O percentual de 0,05 a 1,5% (p/v), relativo às concentrações dos tensoativos adicionados aos meios, foi selecionado com o intuito de avaliar a influência das concentrações dos tensoativos na promoção da solubilidade do fármaco em estudo. Os tensoativos utilizados foram o lauril sulfato de sódio (LSS), o polissorbato 80 (P80) e o polissorbato 20 (P20).

O pH dos meios foi determinado através de potenciômetro, previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 (Merck) à temperatura ambiente. As leituras de pH foram feitas antes da adição dos tensoativos ao meio, quando da

adição dos mesmos. Para todos os meios, o pH foi ajustado com hidróxido de sódio 3 M ou solução de ácido fosfórico (1:1) para pH $7,4 \pm 0,1$.

3.2.7 Determinação da solubilidade de DB em diferentes meios de dissolução

Para a realização do teste de solubilidade, os meios de escolha foram: tampão fosfato de potássio 0,1 M, tampão fosfato de sódio 0,1 M, fluido corporal simulado, fluido muscular simulado, fluido sinovial simulado. Inicialmente a solubilidade foi determinada sem a adição de tensoativos aos meios, posteriormente, foram utilizados tensoativos como LSS, Poli 80 e Poli 20 em concentrações variando de 0,05 a 2% (p/v). A composição dos meios e as concentrações de tensoativo utilizadas estão descritas no item 3.2.6.

O pH dos meios foi mantido em $7,4 \pm 0,05$, sendo determinado em potenciômetro previamente calibrado com soluções tampão padrão pH 4,0 e 7,0.

3.2.7.1 Procedimento

Em cada bécker contendo aproximadamente 150 mg de DB foram adicionados 10 mL de cada meio a ser avaliado, garantindo assim um excesso de fármaco no sistema. Os béckeres foram colocados sob agitação magnética constante de aproximadamente 500 rpm, por um período de 24 horas. Posteriormente, as soluções foram então centrifugadas por 15 minutos, a uma velocidade de 5000 rpm. Imediatamente, o sobrenadante foi filtrado através de membrana com poro de $0,45 \mu\text{m}$. A solução resultante contendo o fármaco DB foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência, conforme a metodologia para quantificação da matéria prima descrita na monografia (ver item 3.2.1.1.4). O teste foi realizado em duplicata para cada meio.

3.2.7.2 Curva Padrão

Para cada meio testado, preparou-se uma curva padrão para a quantificação do DB solubilizado. As concentrações definidas foram escolhidas de forma a englobar pontos de baixa, média e alta solubilidade do fármaco na solução em teste.

Para a obtenção desses pontos pesou-se, aproximadamente, cerca de 50 mg de DB padrão de trabalho, transferidos para balão volumétrico de 50 mL e completando-se o volume com acetonitrila e água (50:50). A partir dessa solução padrão estoque foram realizadas diluições de forma a obter soluções de concentrações entre 1 a 100 µg/mL do fármaco no meio testado, de acordo com a necessidade do meio.

3.2.7.3 Cálculos

Através da equação da reta obtida pela curva padrão de cada meio, e com os valores de áreas obtidos para cada amostra, foram calculadas as concentrações em µg/mL de DB solubilizado no meio, fornecendo, assim, a concentração de saturação do fármaco no meio testado, nas condições empregadas.

3.2.8 Desenvolvimento do ensaio de dissolução para as suspensões injetáveis

No desenvolvimento do ensaio de dissolução *in vitro* algumas condições de ensaio foram aplicadas, de forma a avaliar quais foram as condições que forneceram um teste de dissolução com poder de discriminação satisfatório.

Os estudos dos perfis de dissolução do fármaco DB a partir das suspensões injetáveis foram realizados através de Dissolutor de cubas Hanson Research, cujo sistema de coleta é manual.

3.2.8.1 Meios de dissolução e volume

A escolha dos meios apropriados para o teste de dissolução levou em consideração a solubilidade do fármaco. Os meios de dissolução empregados nos testes foram:

- Tampão fosfato de sódio
- Tampão fosfato de sódio + LSS 0,05%
- Tampão fosfato de sódio + LSS 0,1%
- Tampão fosfato de sódio + LSS 0,5%
- Tampão fosfato de sódio + P80 0,5%
- Tampão fosfato de sódio + P80 1%
- Fluido muscular simulado + LSS 0,1%
- Fluido muscular simulado + P80 0,5%
- Fluido corporal simulado + LSS 0,1%
- Fluido corporal simulado + P80 0,5%
- Fluido sinovial simulado + LSS 0,1%
- Fluido sinovial simulado + P80 0,5%

O volume de meio de dissolução utilizado nos ensaios de dissolução *in vitro* era de 300 mL. Os meios de dissolução não passaram pelo processo de desaeração.

3.2.8.2 Escolha do aparato e velocidade de agitação

O aparato utilizado foi pás, sendo descrito como *Método 2* na Farmacopeia Brasileira . As velocidades empregadas nos ensaios de dissolução foram de 25 e 50 rpm ($\pm 4\%$). Essas condições são as recomendadas para métodos de dissolução aplicados a suspensões (SIEWERT *et al.*, 2003; HANSON & GRAY 2004; BROWN, 2005; USP, 2010).

3.2.8.3 Tempos de coletas e procedimento do ensaio de dissolução

Neste estudo foi considerado um tempo de ensaio que permitisse a construção do perfil de dissolução do DB das suspensões com o objetivo de se fazer uma análise mais detalhada da dissolução deste fármaco a partir desta forma farmacêutica. Os ensaios de dissolução tiveram duração máxima de até 2 horas, cujas alíquotas foram retiradas nos seguintes períodos de tempo: 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos.

O meio de dissolução era transferido para as cubas do dissolutor, o qual permanecia por um período de 2 horas para estabilização da espuma formada. Posteriormente, era iniciado o aquecimento do meio, e o estudo iniciava-se após a estabilização da temperatura em $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

A suspensão injetável era retirada da ampola através de uma seringa acoplada a agulha e adicionada a cada cuba. A coleta das amostras do ensaio de dissolução foi realizada com a utilização de seringas e através de cânulas de amostragem manual, nos tempos estabelecidos, o volume coletado era de 2 mL e não houve reposição do meio. O processo de filtração foi realizado empregando-se os filtros cilíndricos de polietileno Hanson Research de 10 μm acoplados às cânulas e, logo após a coleta, era conectado na seringa um filtro de membrana Millipore de 0,1 μm , cuja amostra era filtrada para *vial* e levada para a quantificação por CLAE. As amostras coletadas durante o ensaio de dissolução não sofreram diluição.

3.2.8.5 Análise quantitativa do DB por CLAE

A quantificação de DB nos meios empregados no ensaio de dissolução foi realizada por CLAE, tomando-se por base as condições cromatográficas desenvolvidas e validadas neste estudo para o doseamento de FB e DB nas suspensões injetáveis.

Com o auxílio do cromatógrafo líquido acoplado a detector de arranjo de fotodiodos, foram injetadas amostras do meio de dissolução, do placebo do medicamento referência e do padrão dos fármacos, na qual foram diluídos no meio a

ser testado. Os resultados obtidos foram analisados com o auxílio do *software* EzChrom Elite com o intuito de verificar a especificidade do método em relação a cada meio testado.

3.2.8.5.1 Curva Padrão

A cada dia de análise e meio de dissolução testado, realizava-se a construção de uma curva padrão para obtenção da equação da reta.

Uma solução estoque de FB e DB era preparada inicialmente. Foram pesados, com precisão analítica, cerca de 50 mg de DB padrão de trabalho e 20 mg de FB padrão de trabalho, transferidos para balão volumétrico de 100 mL, adicionando-se 50 mL de acetonitrila e 30 mL de água. Após 15 min no ultrassom, ou até a completamente solubilização, o volume foi completado com água obtendo-se uma solução estoque padrão de 500 e 200 µg/mL dos fármacos, respectivamente. A partir desta solução estoque eram retiradas 5 alíquotas, a fim de se obter uma curva com 5 pontos com as concentrações aproximadas de 3 – 8,3 – 12,5 – 16,6 - 20 µg/mL de DB, diluídas no meio de dissolução em análise. Para meios sem adição de tensoativo a concentração de 1,6 µg/mL foi adicionada na curva.

3.2.9 Validação do método de quantificação de DB nos ensaios de dissolução

Os ensaios para a validação da metodologia proposta para a quantificação de DB nos ensaios de dissolução foram realizados conforme as recomendações contidas na legislação vigente, a resolução RE 899 da ANVISA e as normas do ICH, as quais preconizam que os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação devem ser determinados (ICH, 1996; BRASIL, 2003).

3.2.9.1 Preparo da solução estoque padrão e da solução padrão

Transferiu-se exatamente cerca de 50 mg do padrão de DB e 20 mg do padrão de FB para balão volumétrico de 100 mL. Adicionou-se 50 mL de acetonitrila e 30 mL de água. Após 15 min no ultrassom, ou até a completamente solubilização, o volume foi completado com água obtendo-se uma solução estoque padrão de 500 e 200 µg/mL dos fármacos, respectivamente. A partir de uma alíquota da solução estoque padrão diluída com o meio de dissolução selecionado nos ensaios de dissolução, foi obtida a solução padrão de 16 e 6,4 µg/mL dos fármacos, respectivamente, na qual foi filtrada em filtro de membrana de 0,1 µm antes das injeções.

3.2.9.2 Preparo da solução amostra

A *Solução 1* foi preparada transferindo-se o volume de uma ampola equivalente a 5 mg de DB e 2 mg de FB para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se 12,5 mL de acetonitrila e 7,5 ml de água. O mesmo procedimento adotado para o preparo da solução padrão foi seguido obtendo-se concentração de 200 e 80 µg/mL dos fármacos respectivamente. Posteriormente, transferindo-se uma alíquota de 2 mL da solução 1 para balão volumétrico de 25 mL, cujo volume foi completado com o meio de dissolução, obtendo-se a *Solução 2* com concentração de 16 µg/mL de DB e 6,4 µg/mL de FB . As soluções foram filtradas em filtro de membrana de 0,1 µm antes das injeções.

3.2.9.3 Especificidade

A especificidade do método para a quantificação de DB nos ensaios de dissolução foi determinada em cromatógrafo líquido acoplado a DAD e analisada através do *software* EZChrom Elite. Para isso, foram injetadas soluções do padrão

DB e FB, do produto e do placebo nas concentrações de 16,6 para o DB e 6,6 µg/mL para o FB. Para verificar a especificidade foram realizadas sobreposições das varreduras espectrais do início, meio e fim do pico dos fármacos. Os espectros resultantes do padrão e da amostra foram comparados e o índice de similaridade determinado. Determinou-se o índice de pureza dos picos através de *ratioqram*. Para procedimentos cromatográficos, cromatogramas representativos foram utilizados para demonstrar a especificidade (ICH, 1996).

3.2.9.4 Linearidade

A linearidade do método foi verificada a partir de três curvas com seis níveis de concentrações. Alíquotas da solução estoque padrão foram diluídas com o meio de dissolução obtendo-se concentrações aproximadas de 1,6 – 4,1 – 8,3 – 12,4 – 16,6 - 20 µg/mL de DB, equivalentes as 10, 25, 50, 75, 100 e 120%. Todas as soluções finais foram filtradas em filtro de membrana de 0,1 µm antes das injeções e os resultados obtidos foram tratados estatisticamente através de análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e análise de variância (ANOVA) através do *software GraphPad Prism*, com nível de significância de $\alpha < 0,05$.

3.2.9.5 Precisão intermediária e repetibilidade

A precisão do método foi avaliada em dois níveis, repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdias) em dias consecutivos, para soluções do medicamento referência nas concentrações de 20, 50, 100 e 120% de DB diluídas no meio de dissolução, com três réplicas cada. As soluções foram analisadas e a seguir o DPR foi calculado.

3.2.9.6 Precisão de injeção

A precisão de injeção foi avaliada através de 5 injeções de uma solução na concentração de 16,6 µg/mL de DB. Foi calculado o DP e o DPR a partir das áreas obtidas.

3.2.9.7 Limite de quantificação e Limite de detecção

Os limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD) do DB foram estimados com base no desvio padrão da resposta e da inclinação da curva de calibração do analito através das equações $LQ = DP \times 10/IC$ e $LC = DP \times 3/IC$, no qual DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo y de três curvas de calibração e IC é a média dos coeficientes angulares das respectivas curvas (ICH, 1996; BRASIL, 2003).

3.2.9.8 Exatidão

O estudo da exatidão foi realizado pela adição de padrão ao placebo do medicamento referência nas concentrações de 20, 50, 100 e 120% com três réplicas cada, na qual foram diluídas no meio de dissolução. As soluções foram analisadas e posteriormente calculou-se o percentual de recuperação, através da relação entre a concentração encontrada experimentalmente e a concentração teórica adicionada.

3.2.9.9 Adsorção nos filtros

Para avaliar a adsorção do fármaco na superfície dos filtros, o procedimento empregado foi a preparação de duas soluções padrão de DB e FB nas concentrações de 1,6 e 16 µg/mL e de 0,66 e 6,6 µg/mL diluídas em meio de dissolução. As soluções sem o processo de filtração e após sofrerem o processo de

filtração foram quantificadas através da metodologia descrita neste estudo (item 4.9). O processo de filtração foi exatamente o mesmo empregado nos ensaios de dissolução, ou seja, as amostras foram submetidas a um filtro cilíndrico de polietileno com porosidade de 10 μm da Hanson Research, seguida de uma segunda filtração em filtro de membrana Millipore de 0,1 μm .

Os valores de adsorção das amostras com e sem filtração foram obtidos através da seguinte equação: $\%R = (\text{valor da solução filtrada} / \text{valor da solução não filtrada}) \times 100$. Posteriormente foram comparados e os resultados relatados como percentual de recuperação ($\%R$) (LINDENBERG, WIEGAND, DRESSMAN, 2005).

3.2.10 Aplicação do ensaio de dissolução *in vitro* em produtos comercializados

Para avaliar a cinética de dissolução do DB da suspensão injetável através do ensaio de dissolução *in vitro* desenvolvido neste trabalho, foram adquiridos cinco diferentes produtos comercialmente disponíveis, entre eles o medicamento referência, um genérico e dois similares. Os produtos foram nomeados A, B, C e D identificados como lote nº 1 nos estudos de distribuição de tamanho de partícula, e produto E lote nº 1 e 2. O ensaio foi realizado em dissolutor de cubas Hanson Research SR6 e as condições utilizadas na análise estão descritas na tabela 4.

Tabela 4. Condições dos ensaios de dissolução

Aparelhagem	Pás – 25 e 50 rpm
Meio de dissolução	Tampão fosfato de sódio pH 7,4 - 300 mL - $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$
Tempos de coleta	5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos

O procedimento do ensaio de dissolução foi realizado conforme descrito no item 3.2.8.4. A quantificação do DB liberado no meio foi realizada através do método de quantificação por CLAE validado no item 3.2.9 deste trabalho.

Para expressar matematicamente as diferenças entre os perfis de dissolução obtidos foram utilizados modelos independentes como os fatores f_1 e f_2 , denominados, fator de diferença e semelhança, respectivamente. A análise estatística foi realizada empregando-se o teste *One-way ANOVA* pelo método de múltiplas comparações de *Tukey*, com o auxílio do software *GraphPad Prisma*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS

4.1.1 Dipropionato de betametasona

4.1.1.1 Espectrofotometria no infravermelho

As técnicas analíticas modernas incorporam uma série de metodologias capazes de determinar a pureza de fármacos. A espectroscopia no infravermelho, baseada em medidas de refletância, apresenta estas características e se mostra com potencial para ser empregada na monitoração da qualidade de fármacos de forma rápida e sem pré-tratamento (SCAFI & PASQUINI, 2000).

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica analítica que se baseia em medidas de refletâncias ocasionadas pelas frequências vibracionais específicas de ligações químicas das substâncias (MOFFAT, OSSELTON, WIDDOP, 2004). Uma correlação das deformações resultantes é uma excelente evidência para a identidade das amostras em comparação com a SQR (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 1994).

Desta forma, os espectros de varredura no infravermelho da SQR e da matéria-prima de DB foram realizados a fim de verificar a identidade da substância, os espectros estão representados na figura 4 (a) e (b), respectivamente.

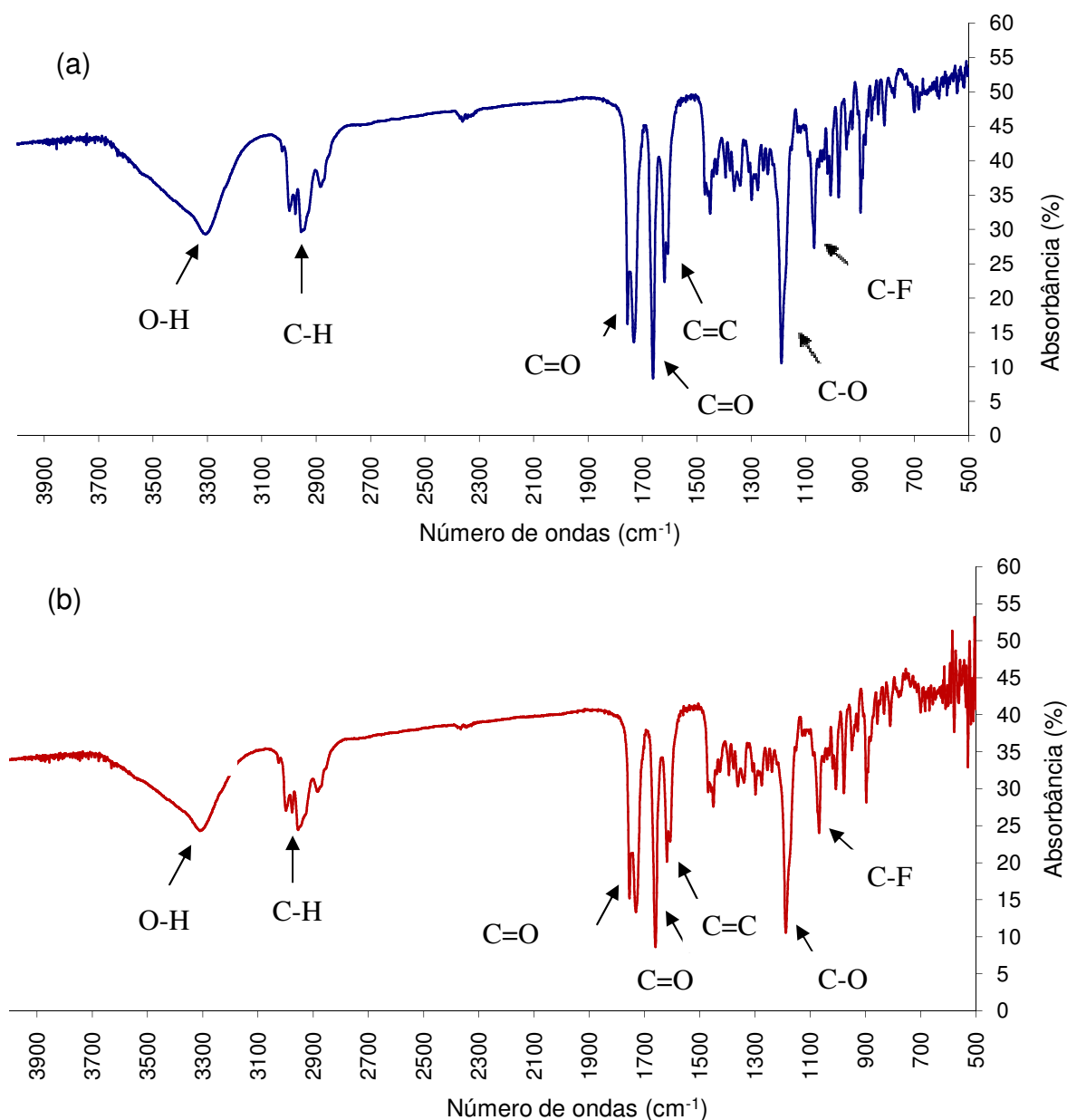


Figura 4. Espectros de infravermelho do DB: (a) substância química de referência e (b) matéria-prima, obtidos experimentalmente. As setas indicam as principais bandas características do DB.

A identidade do DB é verificada através das principais bandas características da betametasona, presentes em: 907, 1056, 1606, 1617, 1660 e 1710 cm⁻¹. O sinal em 907 cm⁻¹ é atribuído ao anel aromático, assim como, a deformação forte e duplicada da ligação C=C do anel aromático é identificada em 1606 e 1617 cm⁻¹. Em 1660 cm⁻¹ observa-se a absorção da carbonila 3-cetona. A ligação halógena C-F é observada em 1056 cm⁻¹ (FERRANTE & RUDY, 1977; SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 1994; MOFFAT, OSSELTON, WIDDOP, 2004).

A banda forte e duplicada da carbonila 20-cetona é observada em 1728 cm^{-1} . Em 1186 cm^{-1} é observada a forte deformação axial de C-O com função éster, na qual é característica da molécula do DB. Em 3280 cm^{-1} é observada a deformação axial média aberta da ligação O-H. As ligações C-H promovem deformações fracas em 2930 cm^{-1} (FERRANTE & RUDY, 1977; SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 1994).

Através da análise comparativa dos espectros obtidos (figura 4), observa-se que a matéria-prima apresenta máximos de absorção nos mesmos comprimentos de onda e com intensidades relativas daqueles observados no espectro da SQR. Desta forma, a análise dos espectros de DB SQR e da matéria-prima corrobora com os dados da literatura, enfatizando a identidade molecular da amostra devido à ausência de bandas que pudessem ser atribuídas a grupos funcionais não presentes na estrutura do fármaco DB.

4.1.1.2 Rotação específica

A rotação específica é determinada através da polarimetria. A base da polarimetria está no fato de que, para algumas substâncias, a extensão dos processos de absorção e reflexão difere para luz polarizada de sentidos opostos. Tais substâncias são chamadas de opticamente ativas e podem ser identificadas pela determinação do poder rotatório (GIL, 2007). A rotação específica é utilizada como critério de identidade e pureza ótica de algumas substâncias, na qual os compêndios oficiais estabelecem os limites específicos nas monografias.

Os valores de rotação específica obtidos com a solução da matéria-prima DB em solvente dioxano estão representados na tabela 5.

Tabela 5. Rotação específica da matéria- prima DB (n = 3)

Amostra	Rotação específica	DPR
1	68,82°	
2	69,11°	0,21%
3	68,97°	

Em ensaios de polarimetria, o ângulo que a luz polarizada forma com o plano de polarização ao atravessar um líquido ou solução é responsável pela identificação de substâncias. Além de sua utilidade em ensaios de identificação, a polarimetria é útil para avaliar pureza de fármacos (GIL, 2007). Os resultados demonstrados na tabela 5 estão dentro da faixa limite entre + 63° a + 70° descrita no compêndio oficial utilizado como referência (USP, 2011), o que indica a identidade da matéria-prima DB.

4.1.1.3 Perda por dessecação

Perda por dessecação é um ensaio que determina a perda de massa da matéria prima quando submetida a determinadas condições nas quais a água é removida. O valor em porcentagem de massa perdida está representado na tabela 6.

Tabela 6. Percentual da perda de massa da matéria prima DB

Amostra	Perda de massa	DPR
1	0,2395%	
2	0,2487%	1,95%
3	0,2463%	

A matéria-prima DB está em conformidade, pois os valores apresentados na tabela 6 encontram-se abaixo do valor de < 1,0% especificado no compêndio de referência (USP, 2011).

4.1.1.4 Determinação do teor

A tabela 7 apresenta os resultados da quantificação da matéria-prima DB por CLAE.

Tabela 7. Análise quantitativa do teor de DB na matéria-prima (n = 6)

Amostra	Teor (%)	Teor médio (%)	DP	DPR (%)
1	103,15			
2	103,50			
3	103,78	103,24	0,81	0,78
4	102,52			
5	104,33			
6	102,15			

A USP (2011) especifica que a matéria-prima deve conter um percentual maior que 97% e menor que 103% de DB calculado a partir da base seca. Diante dos resultados satisfatórios de caracterização da matéria-prima DB, a mesma foi utilizada como padrão de trabalho neste estudo. A pureza ficou estabelecida em 103,24%.

4.1.2 Fosfato dissódico de betametasona

4.1.2.1 Espectrofotometria no infravermelho

Os espectros de varredura no infravermelho da SQR e da matéria-prima de FB foram realizados e estão representados na figura 5.

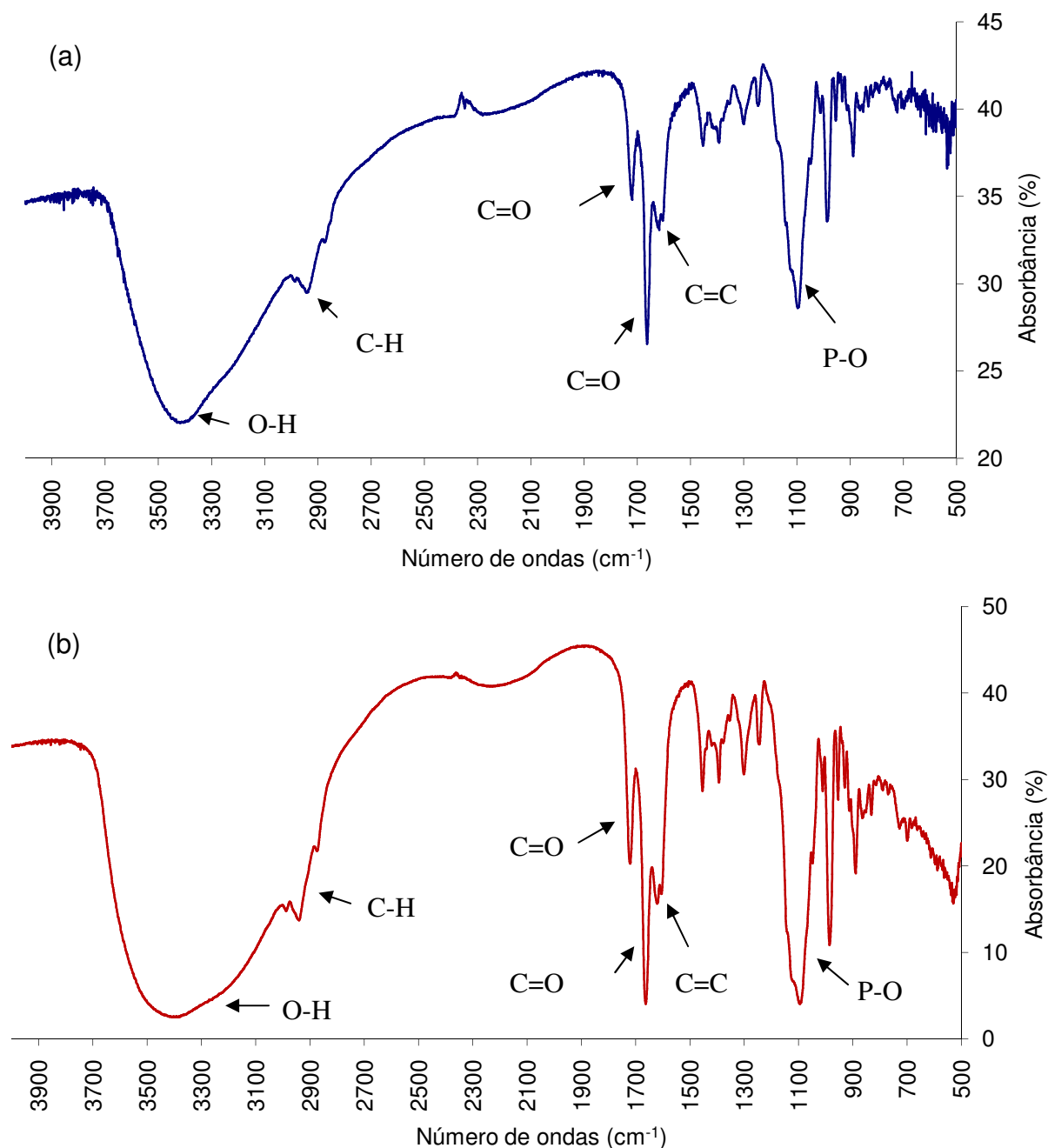


Figura 5. Espectros de infravermelho do FB: (a) substância química de referência e (b) matéria-prima, obtidos experimentalmente. As setas indicam as principais bandas características do FB.

Através da correlação das bandas de máxima absorção das amostras foi possível verificar a identidade de FB a partir das principais bandas características da betametasona, presentes em: 907, 1056, 1606, 1617, 1660 e 1710 cm^{-1} . Os sinais

de absorção foram identificados de acordo com a estrutura química do fármaco e estão descritos no item 4.1.1.1 (FERRANTE & RUDY, 1977; SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 1994; MOFFAT, OSSELTON, WIDDOP, 2004).

A banda característica para o FB é observada em 1150 cm^{-1} na qual promove uma deformação axial intensa em função das ligações P–O. Uma banda maior que a identificada no DB é observada em 3380 cm^{-1} , na qual corresponde a uma deformação axial aguda aberta referente às ligações O–H, isso é devido a presença de 2 hidroxilas na molécula de FB enquanto que é observada apenas 1 hidroxila na molécula do DB, e também é justificado pelo alto conteúdo de água presente na matéria-prima. As ligações C–H promovem deformações em 2925 cm^{-1} (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 1994).

A análise comparativa dos espectros obtidos (figura 5) demonstrou que a matéria-prima apresenta máximos de absorção nos mesmos comprimentos de onda e com intensidades relativas aproximadas daquelas observadas no espectro da SQR. Assim, as características dos espectros corroboram com os dados da literatura, enfatizando a identidade molecular da amostra.

4.1.2.2 Rotação específica

Os valores de rotação específica obtidos com a matéria-prima FB estão representados na tabela 8.

Tabela 8. Rotação específica da matéria- prima FB (n = 3)

Amostra	Rotação específica	DPR
1	103,64 ^o	
2	103,71 ^o	0,15%
3	103,42 ^o	

A rotação específica é utilizada como critério de identidade e pureza da matéria-prima FB. Os resultados demonstrados na tabela 8 estão dentro da faixa

limite entre +99° a +105° descrita no compêndio oficial utilizado como referência (USP, 2011), o que auxilia na confirmação da identidade da matéria-prima FB.

4.1.2.3 Conteúdo de água

As impurezas inorgânicas são, geralmente, decorrentes do processamento da matéria-prima. Considerando o número reduzido de espécies de contaminantes inorgânicos, a água destaca-se pela sua frequência na natureza, logo, é comumente encontrada no controle de qualidade de diversas matérias-primas. Ensaio de teor de umidade através de métodos gravimétricos (perda por dessecação) e métodos volumétricos (Karl Fischer) são relevantes para definir a dosagem e a estabilidade das substâncias (GIL, 2007).

A quantificação do conteúdo de água foi realizada pelo método volumétrico, e baseou-se na aquametria com reagente de *Karl Fischer*, na qual a água é determinada pela reação com iodo em uma solução alcoólica. O conteúdo em porcentagem é determinado volumetricamente tomando-se por base a quantidade de reagente necessária para titular a água presente na amostra ensaiada (USP, 2010).

Os percentuais para o conteúdo de água na SQR e na matéria-prima de FB estão representados na tabela 9.

Tabela 9. Determinação do conteúdo de água presente na SQR e na matéria-prima de FB

Amostra	SQR		Matéria-prima	
	Umidade (%)	Média ± DPR (%)	Umidade (%)	Média ± DPR (%)
1	9,3928		12,1370	
2	9,1508	9,5135 ± 4,58%	11,8090	12,4176 ± 4,32%
3	9,9970		12,7613	
4	--		12,9630	

De acordo com a monografia presente na USP (2011), o conteúdo de água especificado para este ensaio é de no máximo 10%. A SQR e a matéria-prima apresentaram altos teores de umidade, isso pode ser justificado por se tratar de um

sal altamente higroscópico, na qual as condições de transporte e armazenamento deste fármaco podem ter influenciado diretamente no aumento dos percentuais de umidade que foram encontrados na substância. A determinação do teor de umidade é um parâmetro que pode ser utilizado como indicativo das condições de armazenamento da matéria-prima. Os percentuais de umidade obtidos para a SQR e matéria-prima FB neste ensaio foram considerados de caráter quantitativo, os quais foram importantes para o ajuste da massa de fármaco utilizada em outros ensaios com determinações quantitativas.

A massa pesada do fármaco FB SQR e matéria-prima foram corrigidas anteriormente a pesagem, descontando-se o percentual de água encontrado de 9,51% e 12,42%, respectivamente, da massa a ser pesada.

4.1.2.4 Determinação do teor

A tabela 10 apresenta os resultados da quantificação da matéria-prima FB por CLAE.

Tabela 10. Análise quantitativa do teor de FB na matéria-prima (n = 6)

Amostra	Teor (%)	Teor médio (%)	DP	DPR (%)
1	105,2			
2	106,1			
3	99,9	100,31	4,34	4,30
4	96,3			
5	97,9			
6	96,5			

A USP (2011) especifica que a matéria-prima deve conter um percentual maior que 97% e menor que 103% de FB calculado a partir da base anidra. Os resultados de caracterização da matéria-prima FB foram considerados satisfatórios, e a mesma foi utilizada como padrão de trabalho neste estudo. A pureza ficou estabelecida em 100,31%.

4.2 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO DE FB E DB NAS SUSPENSÕES INJETÁVEIS

É fundamental que um método de quantificação por CLAE empregado para análise de produtos farmacêuticos de diferentes procedências seja seletivo, pois as formulações comerciais normalmente apresentam diferentes características e constituintes. Com a finalidade de se desenvolver um método único e de fácil aplicação para a análise simultânea dos fármacos FB e DB na suspensão injetável foram realizados diversos testes, na qual variadas condições cromatográficas foram modificadas. As variações incluem modificações na composição e na proporção da fase móvel, na fase estacionária e na vazão de fluxo, levando a diferentes tempos de análise. Parâmetros cromatográficos como a assimetria, a pureza dos picos, os pratos teóricos e a resolução entre os fármacos e os constituintes da formulação injetável foram considerados fatores importantes durante a escolha das melhores condições cromatográficas para a análise dos fármacos na suspensão injetável.

4.2.1 Fase móvel e vazão de fluxo

Foram testadas condições utilizando de 30 a 70% de ACN com água ou tampão em modo isocrático, e também diversas proporções de ACN na faixa de 10 a 75% com água em modo gradiente, com diferentes programações de tempo. Porém, em ambas as condições observou-se que o sinal cromatográfico do FB elui no volume morto e o pico do DB apresenta parâmetros cromatográficos inadequados em um tempo de retenção elevado.

Posteriormente, diversas condições utilizando modo gradiente foram testadas para a quantificação de FB e DB. A tabela 11 apresenta um resumo destes gradientes testados, assim como os parâmetros cromatográficos obtidos com cada um deles.

Tabela 11. Condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento do método e parâmetros cromatográficos obtidos para FB e DB

Condições cromatográficas				Parâmetros cromatográficos								
	T	ACN	TP	F	FB			DB			R	
	(min)	%	%		TR	A	PT	TR	A	PT		
1	0-13	30	70	1,5	3,50	0,89	623	23,37	1,22	30393	28,36	
	13-30	50	50									
2	0-10	25	75	1,5	6,40	0,72	983	23,92	1,22	31030	25,79	
	10-30	50	50									
3	0-10	25	75	1,5	6,57	1,54	4051	18,85	1,18	52984	33,18	
	12-22	60	40									
4	0-6	25	75	1,5	6,76	1,94	5732	13,72	1,50	34085	21,26	
	6-13	60	40									
	13-17	25	75									
5	0-7	40	60	1,2	2,52	1,25	340	13,01	0,58	2779	13,67	
	8-20	60	40									
	T	ACN	AA	F	FB			DB			R	
	(min)	%	%		TR	A	PT	TR	A	PT		
6	0-6	20	80	1,2	9,97	1,07	600	15,87	0,61	25249	5,82	
	13-17	70	30									
7	0-10	40	60	1,2	--	--	--	11,83	0,60	3755	--	
	15-17	60	40									
8	0-3	20	80	1,2	6,51	1,55	886	10,10	0,79	18596	6,12	
	7-12	75	25									
	15-20	20	80									
	T	MET%	AA	F	FB			DB			R	
	(min)		%		TR	A	PT	TR	A	PT		
9	0-2	30	70	1,2	7,61	1,90	338	10,68	0,75	6497	2,80	
	6-12	80	20									
	14-17	30	70									
10	0-17	60	40	1,2	--	--	--	13,58	0,65	3037	--	
		80	20									
	T	MET	TP	F	FB			DB			R	
	(min)	%	%		TR	A	PT	TR	A	PT		
11	0-8	50	25	1,2	5,99	0,68	436	15,54	1,31	36561	20,15	
	9-25	75	50									
12	0-8	45	55	1,2	10,9	0,79	2684	14,07	1,59	60322	13,63	
	9-17	80	20									
13	0-8	50	50	1,2	6,24	0,72	1078	13,81	1,41	59569	15,33	
	9-17	80	20									
	T	MET	ACN	TP	F	FB			DB			R
	(min)	%	%	%		TR	A	PT	TR	A	PT	
14	0-6	55	--	55	1,2	6,30	0,92	1728	13,53	1,58	41504	16,59
	7-13	--	60	40								
	14-17	55	--	55								
15	0-6	60	--	40	1,2	4,10	1,0	1349	13,25	1,55	37827	25,47
	7-13	--	60	40								
	14-17	60	--	40								
16	0-6	50	--	50	1,6	6,93	1,10	4648	12,95	1,02	64886	19,73
	7-13	--	60	40								
	14-17	50	--	50								

T – tempo de corrida; ACN – acetonitrila; MET – metanol; TP – tampão fosfato de potássio 0,07M; AA – água acidificada; F – fluxo da fase móvel (mL/min); TR – tempo de retenção; A – assimetria; PT – pratos teóricos; R – resolução.

Pode ser observado na condição 3 da tabela 11 que o gradiente que utilizou uma programação de 25 a 60% de ACN com fluxo de 1,5 mL/min resultou na eluição dos dois picos em tempos de corrida satisfatórios, porém com picos sem adequada simetria e pureza. Alterações no gradiente não foram eficientes para se obter uma separação adequada, como pode ser visto nos cromatogramas obtidos nas condições 1, 2, 4 e 5 da tabela 11 representados na figura 6.

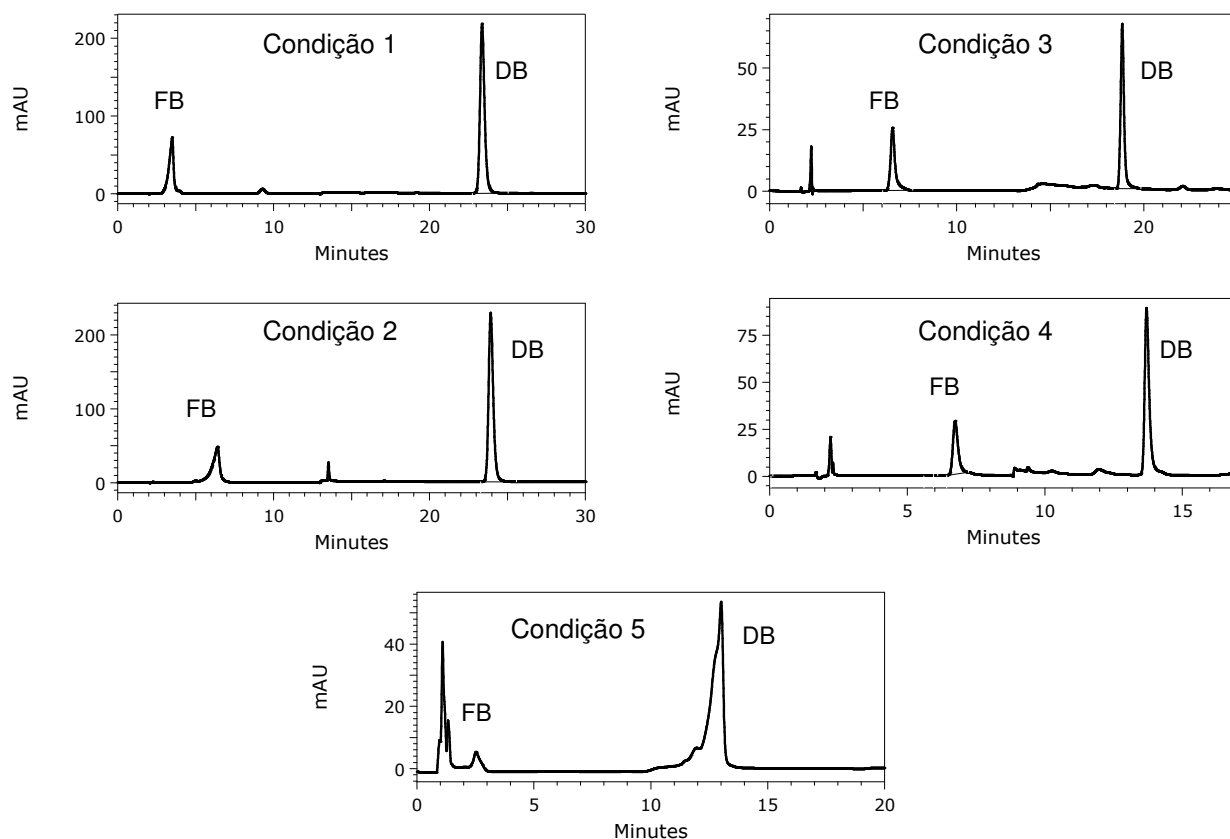


Figura 6. Cromatogramas obtidos com as condições 1 a 5 da tabela 11.

Gradientes em sistema binário utilizando ACN e água acidificada em diferentes proporções, tempo e fluxo (tabela 11, condições 6 a 8) foram avaliados a fim de melhorar os parâmetros cromatográficos, porém, de acordo com a figura 7 não foram obtidas melhoras significativas.

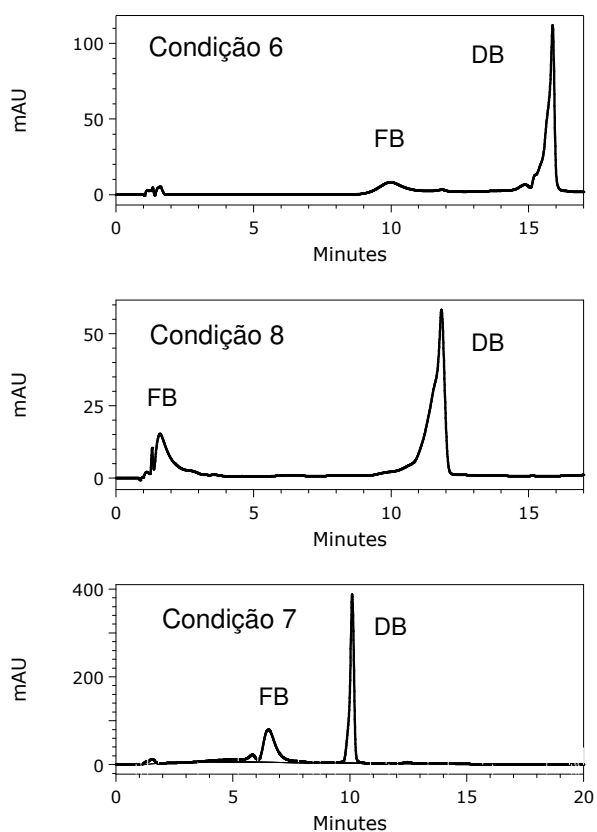


Figura 7. Cromatogramas obtidos com as condições 6 a 8 da tabela 11.

Testes utilizando água acidificada num sistema binário isocrático e em gradiente (tabela 11, condição 9 e 10) com metanol apresentaram resultados insatisfatórios representados pelos cromatogramas da figura 8.

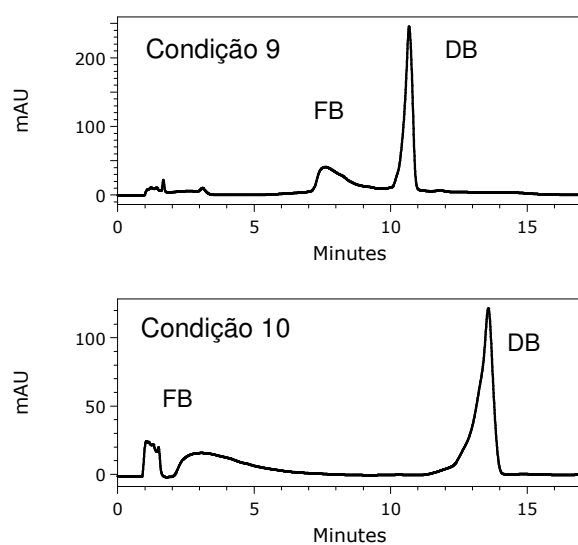


Figura 8. Cromatogramas obtidos com as condições 9 e 10 da tabela 11.

Novos testes foram realizados com a fase orgânica metanol. Numa proporção de 50% de metanol com água ou tampão em modo isocrático, o FB em ambos os casos elui próximo ao volume morto e o pico do DB não é observado. Em gradientes com diferentes fluxos e proporções de 45 a 80% de metanol com tampão (tabela 11, condições 11 a 13), observou-se a eluição de picos sem simetria e resolução adequadas, conforme pode ser visto na figura 9.

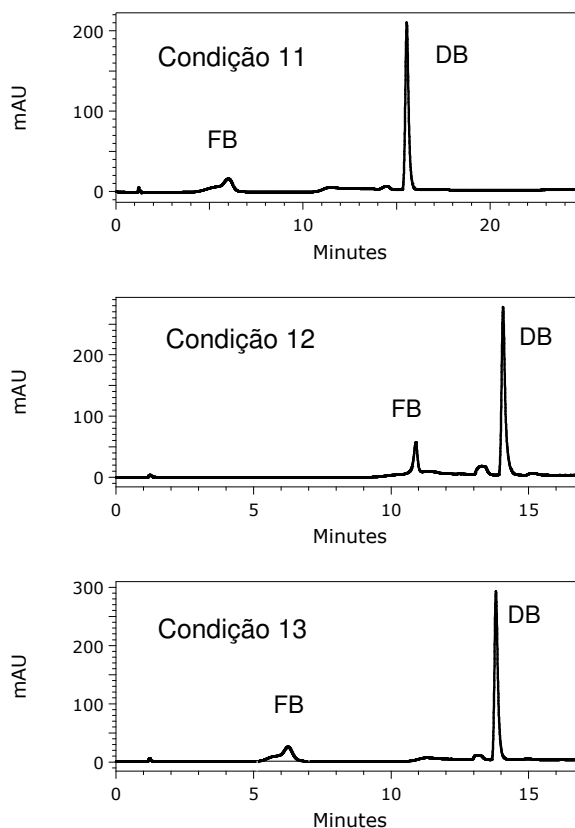


Figura 9. Cromatogramas obtidos com as condições 11 a 13 da tabela 11.

Foram testados sistemas ternários contendo ACN, metanol e tampão em diferentes proporções e fluxos (tabela 11), a fim de obter melhores parâmetros cromatográficos na separação dos fármacos. Os cromatogramas obtidos com os gradientes 14 a 16 (tabela 11) estão representados na figura 10.

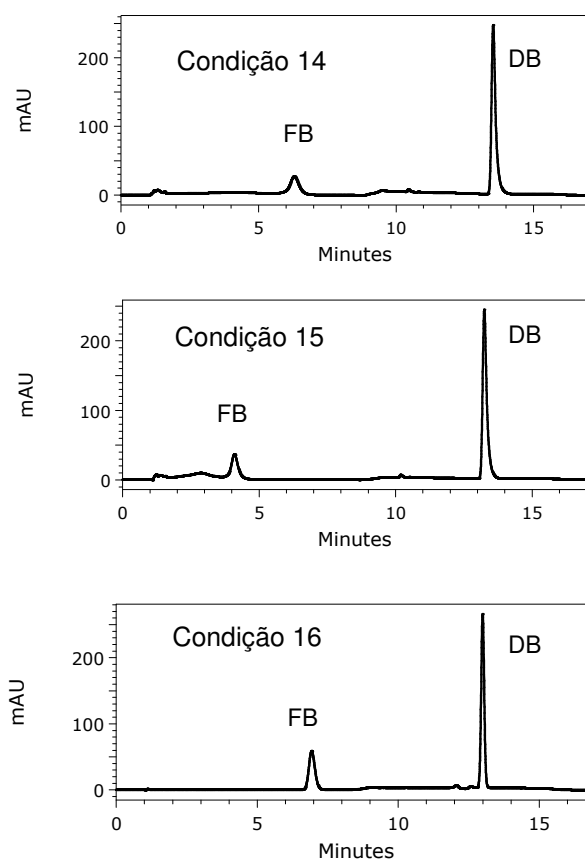


Figura 10. Cromatogramas obtidos com as condições 14 e 16 da tabela 11.

O sistema de gradiente obtido na condição 16 (tabela 11) utilizando fluxo de 1,6 mL/min está representado graficamente na figura 11. Esta fase móvel apresentou os parâmetros cromatográficos mais adequados para a separação dos fármacos. A utilização de tampão pH 4,5 levou a uma melhor assimetria aos picos dos fármacos provavelmente pela supressão iônica por se tratarem de ácidos fracos. Outros artigos também demonstraram a necessidade de se utilizar sistema acidificado para obtenção de melhores separações cromatográficas da betametasona e seus sais (KEDOR-HACKMANN, GIANOTTO, SANTORO, 1998; SAMTANI *et al*, 2004; SHOU *et al*, 2009; LU, WEI, RUSTUM, 2010).

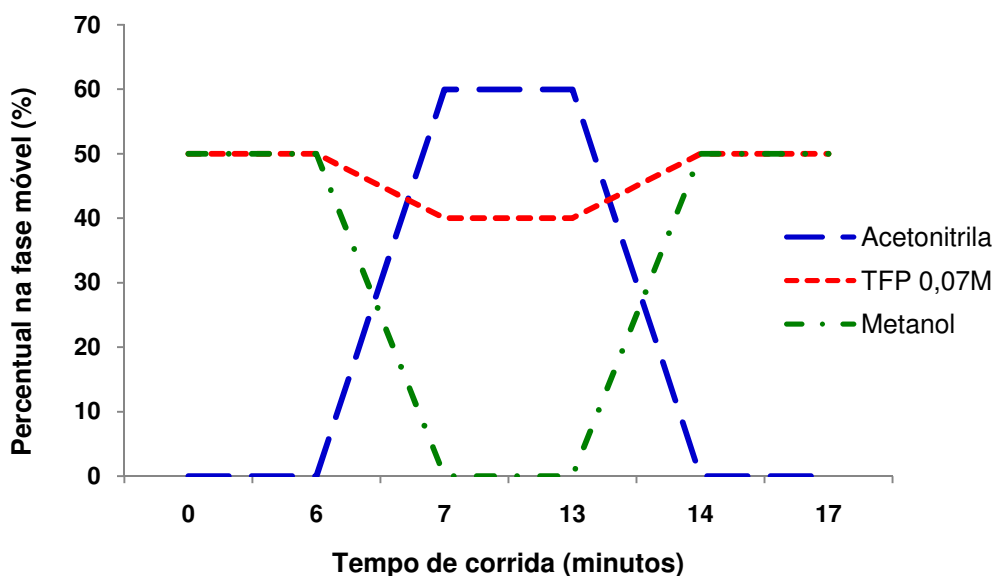


Figura 11. Representação gráfica da fase móvel em sistema ternário e modo gradiente (condição 16, tabela 11).

4.2.2 Fase estacionária

A fase móvel em gradiente condição 16 foi testada em coluna cromatográfica octilsilano (C8), porém foi observado um alargamento na base dos picos a qual proporcionou valores menores de pratos teóricos e o aumento nos valores de assimetria, resultando, assim, em uma menor eficiência cromatográfica para análise dos fármacos. Desta forma, optou-se por mater a utilização de coluna cromatográfica ligada quimicamente a grupos octadecilsilano (C18) com dimensões de 150 x 4,6 mm e partículas de 5 μ m. Esta fase estacionária é descrita por alguns autores como a mais adequada para análises envolvendo a betametasona e seus sais, e também é a fase estacionária de escolha na quantificação do FB e DB isoladamente como matéria-prima nos compêndios oficiais (KEDOR-HACKMANN, GIANOTTO, SANTORO, 1998; SAMTANI *et al*, 2004; SHOU *et al*, 2009; LU, WEI, RUSTUM, 2010; USP, 2010).

4.2.3 Volume de injeção, detecção e diluente

Através da análise de varredura nos comprimentos de onda entre 200 e 400 nm, observou-se que a maior sensibilidade analítica para os dois fármacos foi observada em comprimentos de onda na faixa de 240 a 245 nm. A Farmacopéia Americana, na monografia das matérias-primas de ambos os fármacos, estabelece o comprimento de onda de 254 nm para detecção nos métodos de quantificação (USP, 2010). Desta forma optou-se pelo comprimento de onda de 254 nm para a detecção e quantificação dos fármacos FB e DB.

O volume de injeção de 10 µL selecionado foi adequado e eficiente para a integração dos picos de FB e DB durante as análises de quantificação para diferentes concentrações dos fármacos.

O DB é praticamente insolúvel em água e o FB possui solubilidade limitada em álcool, essa diferença de solubilidade dos fármacos interferiu na escolha do diluente, por conseguinte, uma mistura de ACN e água na proporção de 50:50 foi escolhida como diluente, pois proporcionou a dissolução de ambos os fármacos.

4.2.4 Condições cromatográficas estabelecidas

As condições cromatográficas do método de quantificação de FB e DB nas suspensões injetáveis estão descritas a seguir:

- Coluna cromatográfica: C18 4,6 mm x 150 mm, 5 µm
- Comprimento de onda: 254 nm
- Volume de injeção: 10 µL
- Temperatura: 25°C
- Diluente: mistura de acetonitrila e água (50:50; v/v)
- Vazão de fluxo: 1,6 mL/min
- Concentração de trabalho: 80 µg/mL de FB e 200 µg/mL de DB

- Fase móvel em modo gradiente descrita na tabela 12

Tabela 12. Gradiente da fase móvel

Tempo (min)	Composição da fase móvel (%)		
	Acetonitrila	TFP 0,07M	Metanol
0	--	50	50
6	--	50	50
7	60	40	--
13	60	40	--
14	--	50	50
17	--	50	50

TFP – tampão fosfato de potássio.

A figura 12 apresenta os cromatogramas obtidos com a aplicação das condições cromatográficas estabelecidas acima: (A) corresponde ao cromatograma da injeção do placebo do medicamento referência, (B) é referente aos padrões dos fármacos FB e DB, (C) é o cromatograma obtido com a injeção de FB isolado, (D) corresponde ao DB isolado, e (E) é o cromatograma referente a injeção do medicamento referência .

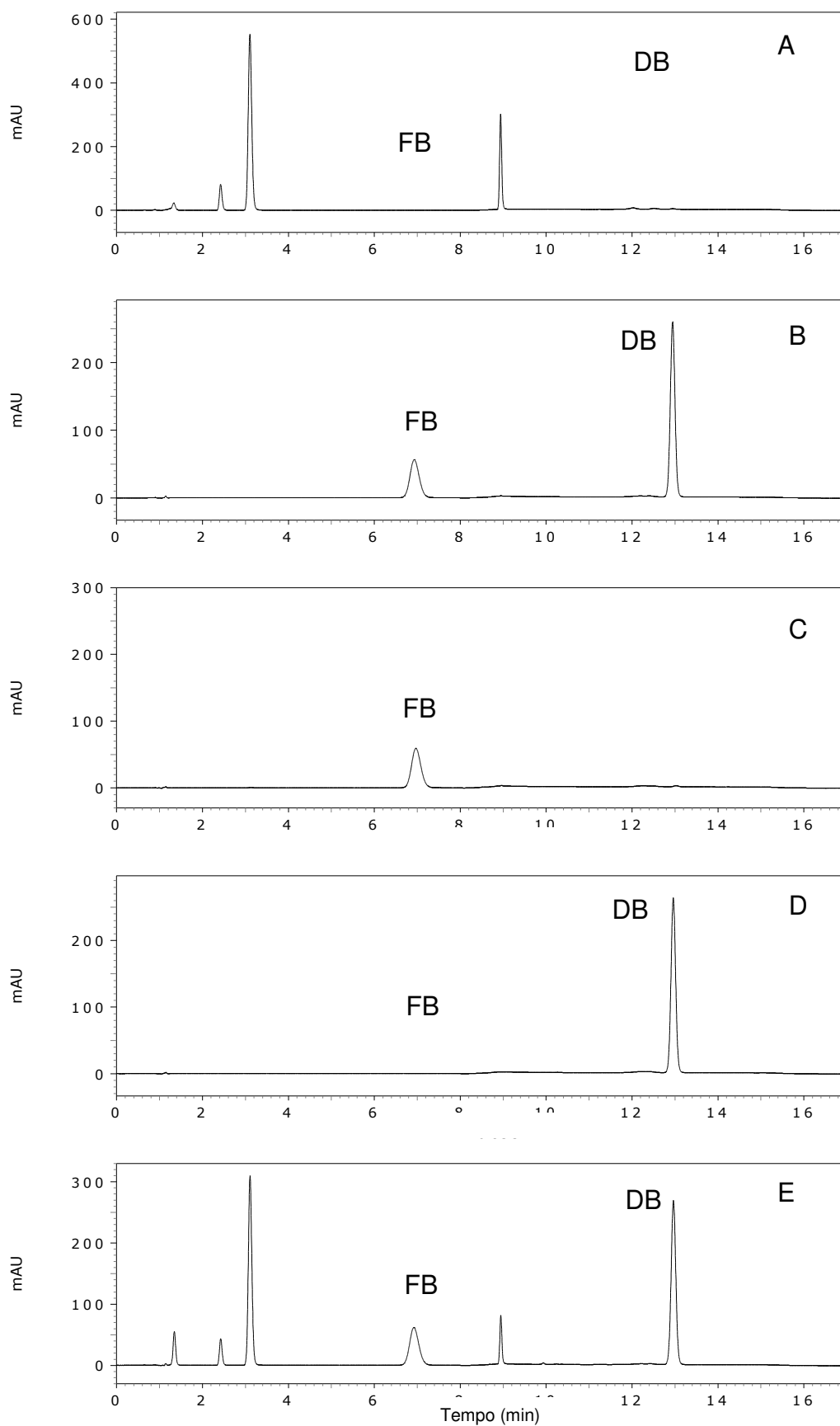


Figura 12. Cromatogramas obtidos com a injeção do placebo do medicamento referência (A), padrões de FB e DB associados (B), FB (C) e DB (D) isolados, medicamento referência (E).

No cromatograma C, o pico do FB é observado no tempo de 6,93 min, apresentou pratos teóricos de 4660 e assimetria de 1,10. O pico do DB (D), observado no tempo de 12,94 min, apresentou pratos teóricos de 64517 e assimetria igual a 1,01. O valor de resolução de 19,74 foi superior a 2,0 demonstrando a completa separação entre os fármacos mesmo na presença dos excipientes da formulação, sugerindo a seletividade do método desenvolvido neste trabalho.

A identificação de cada fármaco no cromatograma (B) e (E) foi possível pela comparação do tempo de retenção obtido no cromatograma dos respectivos padrões analisados isoladamente (C) e (D). A confirmação da identificação foi estabelecida pela comparação do espectro de absorvância no UV dos picos dos fármacos no cromatograma da amostra com seus respectivos padrões, neste caso o software indicou um alto índice de similaridade, variando entre 1 e 0,9999, entre a solução do padrão e a solução do produto, para ambos os fármacos. Os parâmetros cromatográficos calculados para os picos foram considerados satisfatórios, demonstrando que as condições cromatográficas são adequadas para a quantificação dos fármacos na suspensão injetável.

4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE FB E DB NAS SUSPENSÕES INJETÁVEIS

A validação do método analítico é realizada para assegurar que uma metodologia analítica é precisa, específica, reprodutível e robusta ao longo do intervalo especificado que uma substância será analisada. A validação do método fornece uma garantia de confiabilidade durante o seu uso, e é por vezes referido como "o processo de prestação de provas documentais de que o método faz o que se destina a fazer" (SHABIR, 2003). A fim de garantir que o método analítico desenvolvido neste trabalho (ver item 4.2.4) forneça informações confiáveis e que os resultados obtidos reflitam a operação de procedimentos analíticos, foram avaliados os parâmetros de validação especificados pela legislação vigente: especificidade e

seletividade, linearidade, precisão, limite de quantificação e de detecção, exatidão e robustez.

4.3.2 Especificidade e seletividade

A especificidade e seletividade de um método são entendidas como a capacidade de uma metodologia analítica em medir com precisão a resposta do analito na presença de todos os diferentes componentes de uma amostra (BRASIL, 2003; SHABIR, 2003).

A seletividade do método é observada pelo cromatograma tridimensional da análise de FB e DB por CLAE representado na figura 13 (a), o qual demonstrou apenas a presença dos fármacos sem interferentes. A figura 13 (b) é referente ao placebo do produto, na qual é observada a ausência dos picos dos fármacos, por conseguinte, a figura 13 (c) representa a análise do produto na qual é possível identificar os picos dos fármacos na presença dos constituintes do placebo.

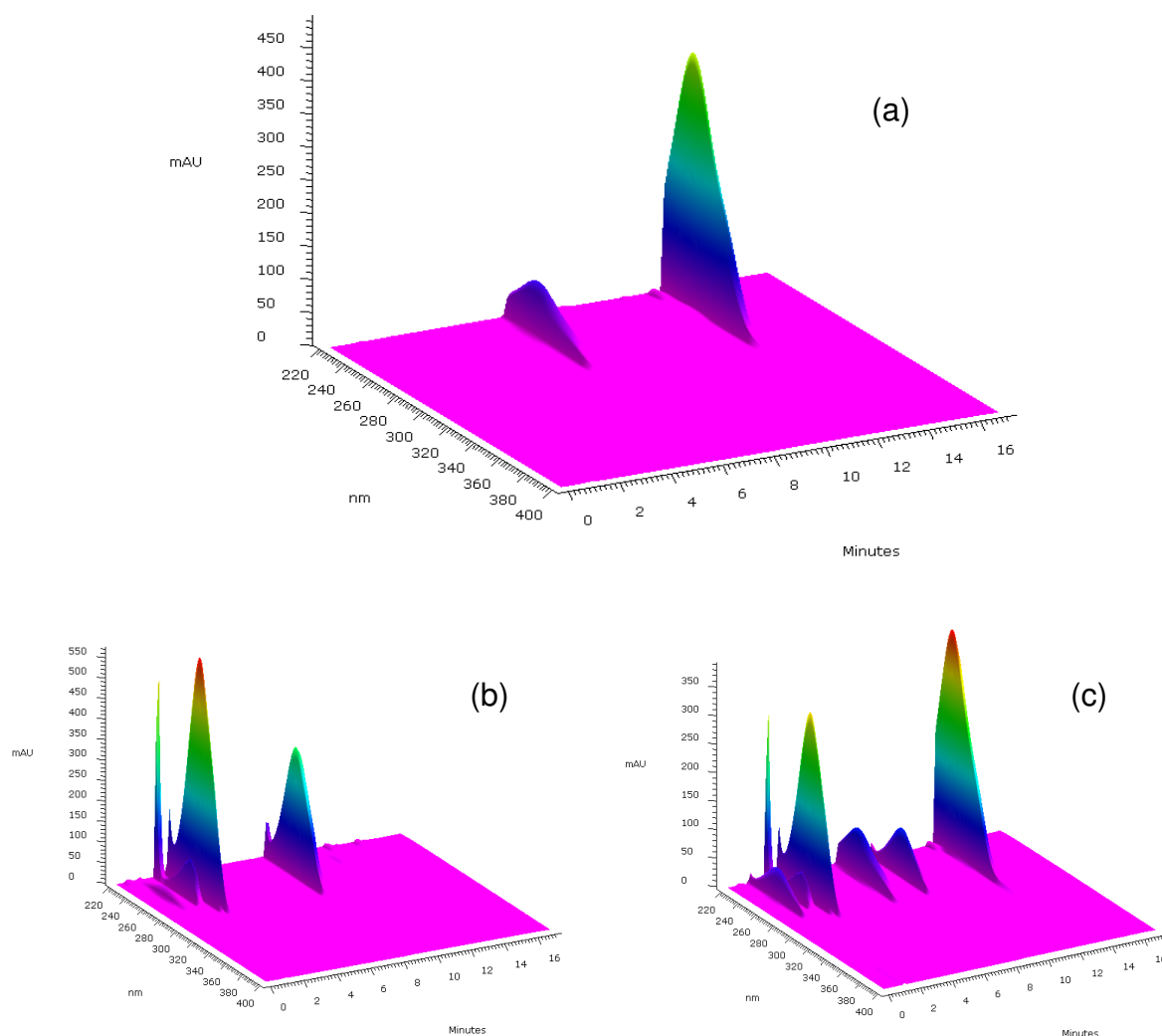


Figura 13. Cromatogramas tridimensionais de varredura da análise de FB e DB por CLAE: (a) FB e DB matéria-prima, (b) placebo do produto e (c) produto - suspensão injetável comercializada.

A análise de pureza de pico é uma técnica de avaliação para detectar a presença de impurezas coeluídas com o pico do analito na cromatografia líquida. Um detector de arranjo de fotodiodos fornece informações através da aquisição de espectros UV-Visível na qual a pureza do pico pode ser determinada (GIKA, 2009). A análise empregando detector DAD permitiu que fossem traçados os espectros no UV do pico dos fármacos em três tempos diferentes: 6,83 - 6,93 - 7,03 min para o FB e 12,86 - 12,96 - 13,06 min para o DB, os espectros são observados na figura 14.

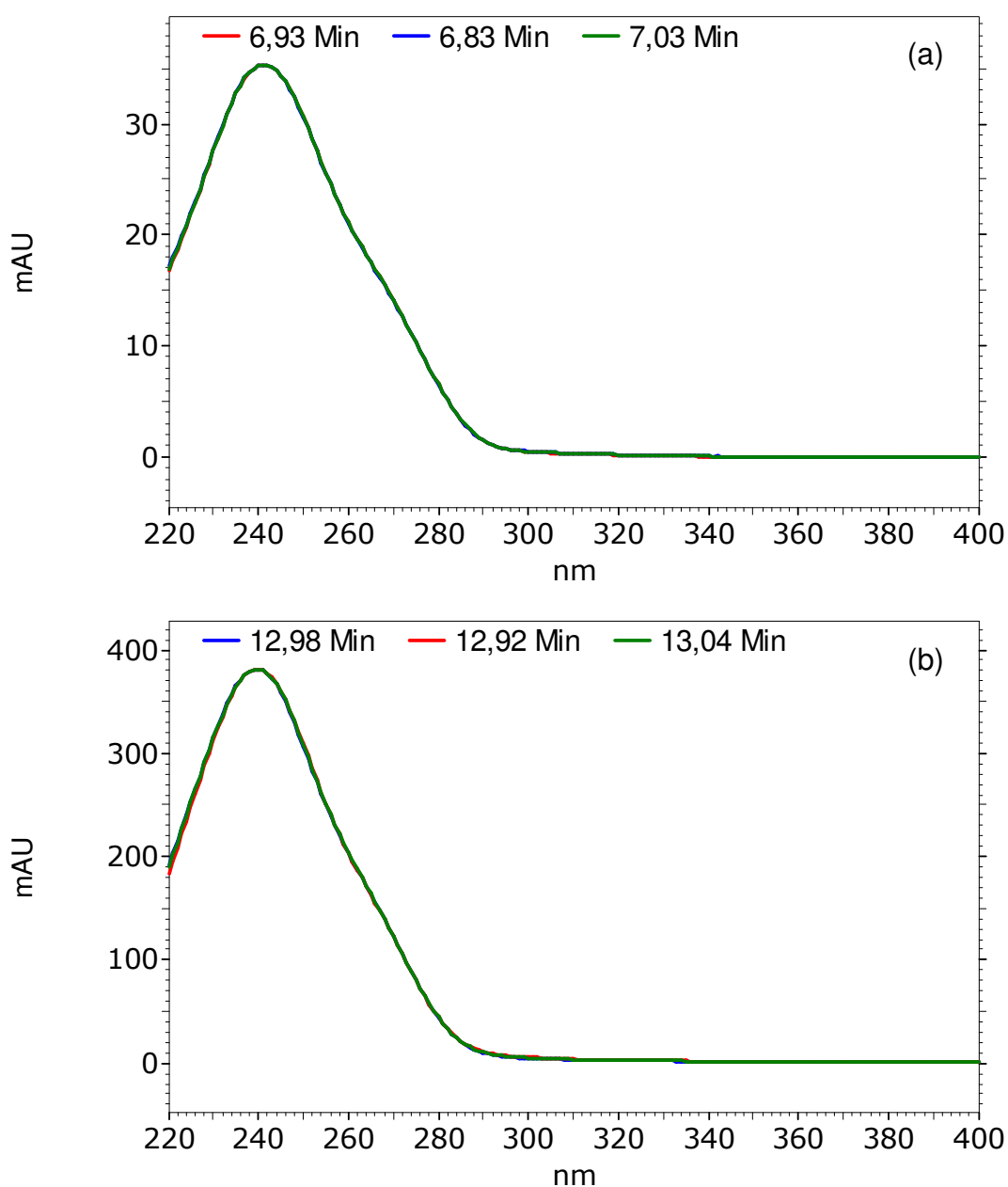


Figura 14. Pureza cromatográfica obtida por similaridade de espectros em diferentes tempos de retenção para FB (a) e DB (b).

A partir da análise da figura 14 a especificidade do método é comprovada, pois ambos os fármacos apresentaram espectros sobrepostos nos diferentes tempos em que seus picos foram analisados, assim demonstrando que não apresentam diferenças significativas nos espectros. A sobreposição dos espectros comprova a ausência de substâncias interferentes e demonstra que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente (SNYDER, KIRKLAND, GLAJCH, 1997). A obtenção

de altos índices de similaridade, variando entre 1 e 0,9999, na comparação dos espectros da SQR, da matéria-prima e do produto também demonstram a especificidade do método para a quantificação de FB e DB nas suspensões.

A avaliação da pureza dos picos de FB e DB também foi feita pela construção de “*radiograms*”, que são apresentados na figura 15 (a) e (b), respectivamente.

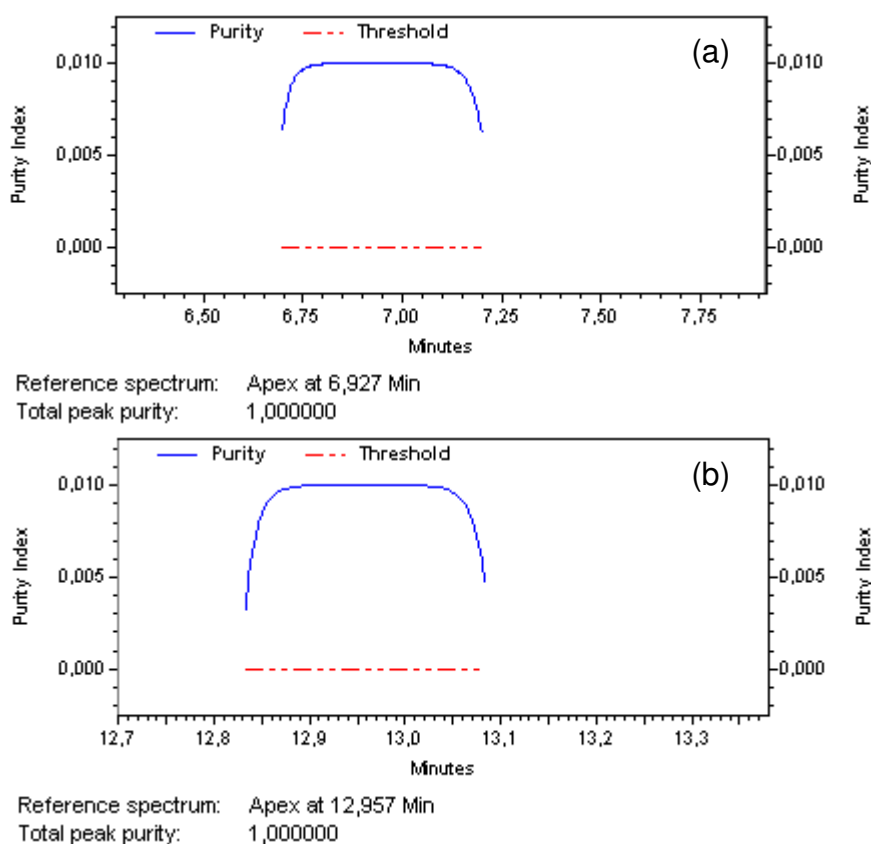


Figura 15. Pureza cromatográfica obtida pela razão cromatográfica para FB (a) e DB (b).

Com o auxílio do software Elite LaChrom a razão entre as absorvâncias em dois comprimentos de onda em função do tempo de eluição gerou os *radiograms* (a) e (b), os quais demonstram que a razão cromatográfica foi constante e próxima de zero, porém maior que o ruído (SNYDER, KIRKLAND, GLAJCH, 1997). O índice de pureza é de 1,000 para ambos os fármacos, demonstrando que os picos

cromatográficos do FB e do DB são atribuídos a um só componente e comprovando, mais uma vez, a seletividade e especificidade do método.

4.4.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo de concentração especificado (BRASIL, 2010). Na figura 16 e 17, estão representadas as curvas padrão média obtida para o FB e para o DB em triplicata, com cinco níveis de concentração, respectivamente, na qual representa a relação diretamente proporcional entre o sinal emitido pelo detector e a concentração do analito na amostra padrão.

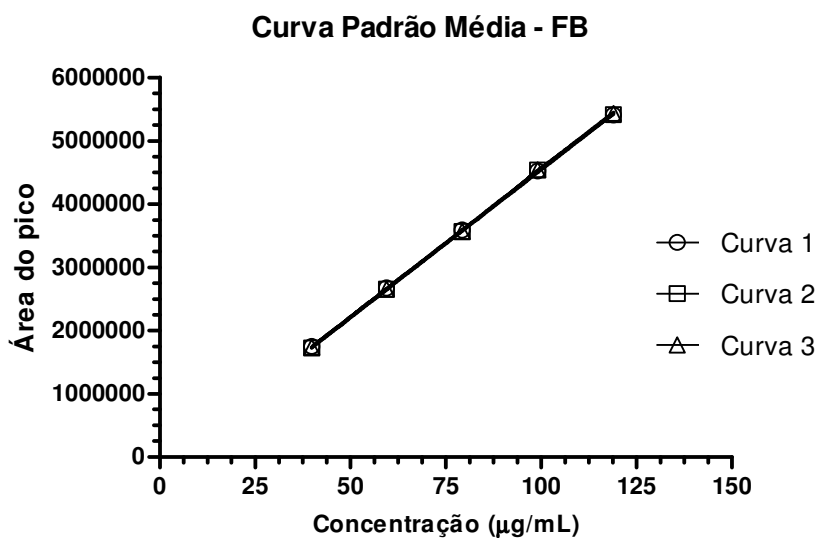


Figura 16. Curva padrão média da linearidade do FB.

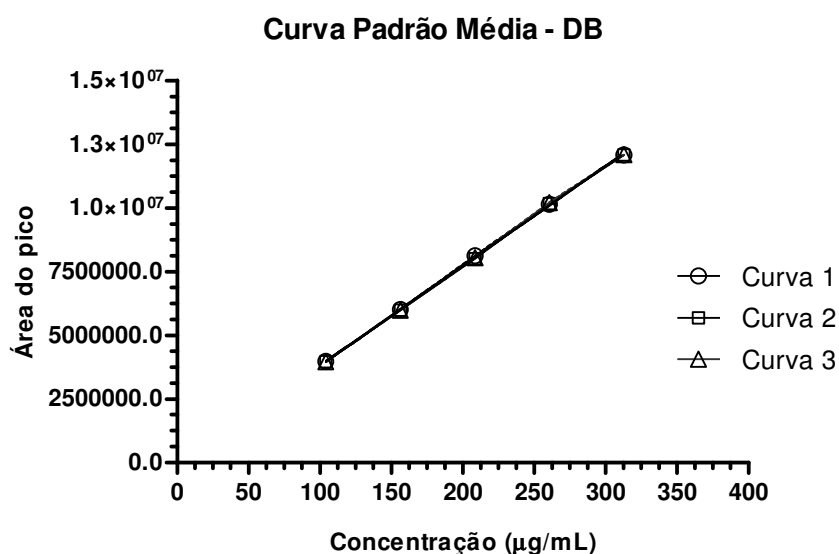


Figura 17. Curva padrão média da linearidade do DB.

A tabela 13 apresenta os resultados obtidos no tratamento estatístico com o intuito de comprovar a linearidade do método proposto.

Tabela 13. Análise estatística do estudo da linearidade

Fármacos	Intervalo	Parâmetros	Resultados	Estatística $\alpha < 0,05$
FB	40 - 120 µg/mL	Inclinação	$46580435,3 \pm 142716,1$	F calc = 2,61 F tab = 4,06
		Intercepto	$-112304,5 \pm 2244,7$	F calc = 1,51 F tab = 4,04
		R ²	$0,9999 \pm 1,10E-04$	
		Regressão	Fcalc = 72063,3 Ftab = 6,41	$P < 0,0001$
DB	100 - 300 µg/mL	Inclinação	$39171243,4 \pm 62782,7$	F calc = 0,59 F tab = 4,06
		Intercepto	$-116367,8 \pm 25588,7$	F calc = 0,89 F tab = 4,04
		R ²	$0,9999 \pm 3,72E-05$	
		Regressão	F calc = 51473,3 F tab = 6,41	$P < 0,0001$

A análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados para as curvas dos fármacos FB e DB apresentaram coeficientes de correlação acima de 0,999 evidenciando uma alta correlação linear dentro dos limites das concentrações estudadas. Através da análise de variância pelo teste F foi analisada a validade da regressão e o modelo linear da curva analítica comparando os valores de F calculado (F_{calc}) e F tabelado (F_{tab}).

A validade da regressão é observada quando a inclinação da curva for significativamente diferente de zero, no qual é representada por valores de F_{calc} superiores ao de F_{tab} (CALLEGARI-JACQUES, 2004). Os valores calculados para F foram $F_{cal} = 51473,3$ para o FB e $F_{calc} = 72063,3$ para o DB, logo são superiores ao valor de F_{tab} de 6,41 ($F_{calc} \gg F_{tab}$), assim admite-se que a inclinação da reta não é nula e o ajuste linear da curva é aceito para ambos os fármacos com $P < 0,0001$.

Para avaliar o modelo linear, foi comparado F_{calc} obtido pela linearidade com o F_{tab} , de forma que para comprovar a linearidade deve ser encontrado valores de F_{cal} menores que o F_{tab} (CALLEGARI-JACQUES, 2004). Os resultados obtidos na análise do desvio da inclinação e do intercepto da curva demonstram que o F_{calc} foi menor que o F_{tab} para ambos os fármacos, desta maneira pode-se afirmar com 95% de confiança que o modelo é linear e está bem ajustado na faixa de concentração estudada (NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2003; CALLEGARI-JACQUES, 2004).

4.4.3 Precisão intermediária e repetibilidade

O ensaio de precisão de uma metodologia analítica é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas repetidas de uma mesma amostra e expresso como desvio padrão relativo. Para o método ser considerado preciso, os valores de DPR devem permanecer abaixo de 5% (BRASIL, 2003). Estão apresentados na tabela 14 os valores obtidos na quantificação dos fármacos FB e DB na formulação injetável.

Tabela 14. Resultados obtidos na análise da repetibilidade e precisão intermediária

Concentração (%)	Dia	Fosfato sódico betametasona			Dipropionato betametasona		
		Massa (mg)**	Intradia (DPR%)	Interdia (DPR%)	Massa (mg)**	Intradia (DPR%)	Interdia (DPR%)
80	1	1,94			6,02		
		1,95	0,35		6,01	0,31	
		1,93		0,59	5,99		0,82
	2	1,92			6,00		
		1,93	0,86		5,98	1,21	
		1,96			6,11		
100	1	1,93			6,03		
		1,93	0,21		6,02	0,15	
		1,93		0,62	6,03		0,46
	2	1,94			6,05		
		1,96	0,55		6,09	0,36	
		1,95			6,07		
120	1	1,92			6,00		
		1,90	1,24		5,97	1,00	
		1,95		0,83	6,08		0,71
	2	1,93			6,05		
		1,93	0,39		6,05	0,41	
		1,92			6,01		

** A massa é relativa a uma alíquota de 1 mL.

Os resultados de DPR das análises intradia revelaram que o método proposto apresenta boa repetibilidade, na qual o maior DPR encontrado foi de 1,00% para FB e 1,24% para DB, logo os valores estão abaixo do exigido pela legislação vigente (ICH, 1996; BRASIL, 2003). A reprodutibilidade do método foi comprovada pelo grau de concordância entre os resultados das medições das amostras efetuadas em dias alternados, sendo que o maior DPR encontrado foi de 0,83% para o FB e de 0,82% para o DB. De acordo com os resultados apresentados, pode-se afirmar que a metodologia proposta é precisa.

4.4.4 Precisão de injeção

De acordo com os resultados apresentados na tabela 15, a precisão do volume de injeção do sistema cromatográfico também demonstrou ser adequada, uma vez que o valor de DPR encontrado para a concentração de trabalho analisada foi menor que 2% (USP, 2010).

Tabela 15. Resultados do teste de precisão de injeção

Injeção	FB			DB		
	Área	Média	DPR (%)	Área	Média	DPR (%)
1	3589061			8131351		
2	3585952			8127942		
3	3606488	3600176	0,33	8141989	8139939	0,12
4	3610395			8150410		
5	3608982			8148003		

4.4.5 Limite de quantificação e Limite de detecção

A partir das curvas de calibração dos fármacos foram estimados os limites de detecção e os limites de quantificação. Os resultados encontrados para o DB foram de LD = 1,96 µg/mL e LQ = 6,53 µg/mL, e para o FB foram de LD = 0,14 µg/mL e LQ = 0,48 µg/mL. Considerando a concentração de trabalho de 200 µg/mL para o DB e de 80 µg/mL para o FB, os valores encontrados para os limites de detecção e quantificação demonstram que o método tem sensibilidade adequada para a análise proposta.

4.4.6 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro, no qual é calculada como porcentagem de recuperação, expressando a relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (BRASIL, 2003). O critério de aceitação para a recuperação obtida é de $\pm 2\%$, ou seja, entre 98,0 e 102,0% (ICH, 1996). A exatidão foi calculada através da porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado ao placebo do medicamento, e os resultados estão apresentados na tabela 16.

Tabela 16. Porcentagem de recuperação dos fármacos

Fármaco	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%) [*]
FB	60	99,95 \pm 0,22
	80	100,18 \pm 0,14
	100	99,80 \pm 0,37
DB	150	98,99 \pm 0,35
	200	99,09 \pm 0,07
	250	99,02 \pm 0,35

^{*}Média \pm DPR, n=3

Conforme observado na tabela 16, a porcentagem de recuperação dos fármacos ficou entre 99 e 101%, dentro do critério de aceitação, demonstrando que o método é capaz de medir com exatidão os fármacos FB e DB na presença de outros componentes da suspensão injetável.

4.4.7 Robustez

A robustez de um método analítico deve mostrar a confiabilidade de uma análise com relação a deliberadas variações dos parâmetros do método. Se as

medições são suscetíveis a variações nas condições analíticas, as condições de análise devem ser adequadamente controladas ou uma declaração de precaução devem ser incluída no procedimento (ICH, 1996; BRASIL, 2003). O método foi avaliado através da análise de quantificação dos fármacos no medicamento referência, em um lote piloto da suspensão injetável, em diferentes condições cromatográficas, produzidas por alterações no pH da fase móvel, temperatura, fluxo e mudança de equipamento. Os resultados deste estudo estão representados na tabela 17.

Tabela 17. Parâmetros cromatográficos e teor dos fármacos obtidos no estudo da robustez

Parâmetro cromatográfico alterado	FB			DB			R	
	T (%)	TR	A	T (%)	TR	A		
Tampão pH	4,01	100,43 ¹	6,95	1,11	118,44 ¹	12,92	1,17	19,12
		99,72 ²	6,96	1,10	118,12 ²	12,92	1,18	19,15
		100,00 ³	6,96	1,10	117,54 ³	12,92	1,17	19,18
	4,45	99,63	6,95	1,09	119,50	12,94	1,04	19,54
		99,55	6,95	1,08	119,02	12,94	1,05	19,48
		99,94	6,94	1,09	119,24	12,95	1,06	19,52
	4,97	100,04	6,85	1,10	117,93	12,95	1,06	19,98
		99,51	6,84	1,10	118,00	12,94	1,06	20,01
		99,86	6,85	1,10	118,62	12,94	1,06	19,94
Fluxo 1,5 mL/min	100,16	7,38	1,09	120,18	13,40	1,03	18,99	
	100,21	7,38	1,09	120,19	13,40	1,03	18,96	
	100,10	7,38	1,09	119,94	13,41	1,03	18,98	
Temperatura 30°C	100,54	5,98	1,08	121,85	12,66	1,02	24,82	
	99,88	5,98	1,08	119,87	12,66	1,04	24,84	
	100,25	5,97	1,09	119,76	12,65	1,03	24,81	
CLAE Shimadzu 10A	100,03	8,78	1,07	120,52	14,94	1,01	15,53	
	97,12	8,81	1,07	117,91	14,95	1,00	15,61	
	99,77	8,75	1,06	121,32	14,91	1,00	15,93	
Média	99,82			119,33				
DPR (%)	0,73			1,03				

^{1,2,3} - número de amostras (n = 3); T(%) – Teor dos fármacos na amostra; TR – Tempo de retenção (min); A – Assimetria; R – Resolução; DPR – Desvio Padrão Relativo.

De acordo com os resultados apresentados na tabela 17, observa-se que o teor médio (%) e o DPR para o FB foi de $99,8 \pm 0,73\%$, e para o DB foi de $119,3 \pm 1,03\%$. Os baixos valores de DPR ($< 2\%$) encontrados na quantificação dos fármacos com a utilização de diferentes condições cromatográficas demonstram a robustez do método. Em relação aos parâmetros cromatográficos, observa-se que os valores de resolução foram superiores a 2, indicando adequada separação dos picos, e os valores de assimetria ficaram próximos de 1, indicando simetria dos picos nas diferentes condições aplicadas durante o estudo. Desta forma, o método foi considerado robusto para análise de quantificação dos fármacos na suspensão injetável.

O método analítico empregando cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa e modo gradiente permitiu a detecção e quantificação simultânea dos fármacos FB e DB. A validação deste método demonstrou a sua seletividade e especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. Podendo ser considerado uma ferramenta eficiente para o controle de qualidade das suspensões injetáveis desta associação de fármacos, uma vez que não há método oficial para avaliar o teor destes fármacos nesta forma farmacêutica.

4.5 DOSEAMENTO DOS FÁRMACOS FB E DB NA SUSPENSÃO INJETÁVEL

4.5.1 Aplicação do ensaio de quantificação em diferentes produtos

São comercializados mais de 20 produtos dessa associação de fármacos, e cada suspensão injetável possui uma formulação específica que é desenvolvida pelo seu fabricante, logo, é conhecido que estas formulações podem apresentar diferentes excipientes farmacêuticos. A fim de verificar a seletividade do método de quantificação desenvolvido e validado neste estudo frente aos variados constituintes das formulações, foram realizados ensaios para determinar a massa dos fármacos

em dez produtos comercialmente disponíveis, na qual inclui o medicamento referência, genéricos e similares. Os resultados estão representados na tabela 18.

Tabela 18. Doseamento de diferentes marcas da suspensão injetável comercialmente disponível e parâmetros cromatográficos dos picos dos fármacos.

Produto	FB			DB			Resolução
	Massa (mg/ampola)	TR	A	Massa (mg/ampola)	TR	A	
A	2,44	6,93	1,12	6,41	12,97	1,02	19,70
B	2,12	6,93	1,09	5,44	12,97	1,01	19,81
C	2,18	6,92	1,10	5,41	12,94	1,02	19,76
D	2,45	6,92	1,10	6,20	12,96	1,02	19,80
E	2,11	6,93	1,09	4,38	12,95	1,02	19,75
F	2,31	6,93	1,10	5,26	12,93	1,01	19,79
G	2,04	6,92	1,09	5,28	12,93	1,01	19,74
H	1,89	6,93	1,09	5,32	12,97	1,01	19,82
I	2,01	6,94	1,09	6,19	12,97	1,02	19,76
J	2,46	6,93	1,11	7,14	12,97	1,02	19,74
Média	2,23	6,93	1,10	5,77	12,96	1,02	19,77
DPR	10,83	0,09	0,94	14,64	0,11	0,51	0,19

TR – tempo de retenção; A – assimetria.

Nos resultados apresentados na tabela 18 para os fármacos FB e DB observa-se que a média do tempo de retenção é de $6,93 \pm 0,09\%$ e $12,96 \pm 0,11\%$, e para a assimetria a média é de $1,10 \pm 0,94\%$ e $1,02 \pm 0,51\%$, respectivamente, e a resolução entre os picos foi $19,77 \pm 0,19\%$. A pureza de pico foi mantida acima de 0,99 para ambos os fármacos. Portanto, os parâmetros cromatográficos monitorados não sofreram alterações significativas, com $DPR < 1\%$, mesmo na presença de diferentes constituintes presentes nas formulações dos dez produtos analisados (A à J). Por conseguinte, a metodologia aplicada é considerada seletiva para a quantificação dos fármacos FB e DB em diferentes produtos.

4.5.2 Doseamento de produtos

O doseamento dos produtos foi realizado com o objetivo de determinar a massa de cada fármaco contida nas ampolas dos produtos. Quatro produtos foram analisados em sextuplicata. Os cálculos foram realizados através da equação da reta da curva padrão do FB e do DB que estão representadas na figura 18.

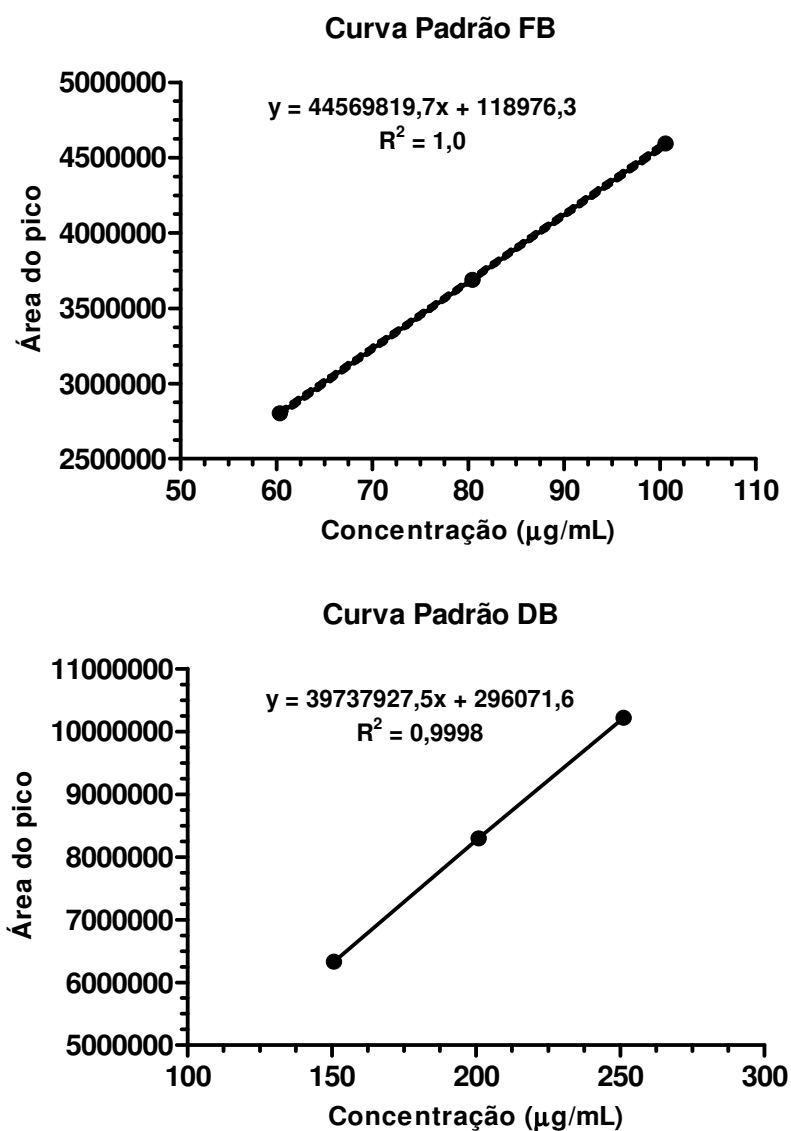


Figura 18. Representação da curva padrão e equação da reta do FB e DB para o doseamento dos produtos.

As curvas apresentaram coeficiente de correlação acima de 0,999, assim, foram consideradas adequadas para a quantificação do FB e DB nos produtos. Os resultados da quantificação estão apresentados na tabela 19.

Tabela 19. Doseamento de produtos comercializados: referência, genérico e similares

	Produto A		Produto B		Produto C		Produto D	
	Massa (mg/ampola)		Massa (mg/ampola)		Massa (mg/ampola)		Massa (mg/ampola)	
Amostra	FB	DB	FB	DB	FB	DB	FB	DB
1	2,44	6,46	1,87	4,69	2,10	5,31	2,14	4,71
2	2,47	6,48	1,83	4,64	1,90	5,43	2,33	5,43
3	2,49	6,52	1,75	4,35	1,89	4,82	2,30	5,32
4	2,49	6,56	1,83	4,66	1,97	4,92	2,50	5,82
5	2,46	6,45	1,84	4,66	1,91	4,86	2,37	5,61
6	2,44	6,41	1,82	4,55	1,88	4,71	2,45	5,44
Média	2,46	6,48	1,82	4,59	1,94	5,01	2,35	5,39
DPR (%)	0,91	0,84	2,23	2,80	4,44	5,82	5,52	6,96

A análise de doseamento foi realizada utilizando-se o conteúdo inteiro das ampolas, sendo este volume desconhecido. Segundo a Farmacopéia Brasileira, as ampolas devem ser preenchidas com um pequeno excesso de volume de acordo com as características do produto, para permitir a administração do volume declarado. Para líquidos injetáveis contendo 1 mL, deve haver um excesso mínimo de volume de 0,10 mL para líquidos móveis e de 0,15 mL para líquidos viscosos. O volume de cada recipiente examinado não é inferior ao volume declarado. No caso de recipientes com volume declarado de 2 mL ou menos, o volume dos conteúdos reunidos não é inferior à soma dos volumes declarados dos recipientes utilizados no teste (12 unidades) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

A concentração declarada no rótulo dos medicamentos é de 2 mg/mL para o FB e de 5 mg/mL para o DB. A Farmacopeia Brasileira preconiza um excesso mínimo de volume de 0,1 mL nas ampolas de 1 mL, logo, na análise de doseamento

deveriam ser encontrados massas mínimas de 2,2 mg para FB e 5,5 mg para DB, uma vez que, o doseamento foi realizado com o volume total da ampola.

Os valores apresentados na tabela 19 foram expressos como massa de fármaco contida em uma ampola. O intuito deste ensaio foi verificar se a alta variação na uniformidade de dose entre as ampolas e entre os produtos está relacionada a diferentes volumes contidos nas ampolas, uma vez que a concentração dos fármacos é declarado no rótulo do medicamento em mg/mL.

Desta forma, os valores encontrados não devem ser interpretados como valores de percentual em relação ao declarado, porém, a variação nos valores de massa presentes em cada ampola, representado pelos altos valores de DPR, indicam a necessidade de se realizar ensaios de determinação do volume para o controle de qualidade desta forma farmacêutica.

Os diferentes valores de massa encontrados para os fármacos FB e DB nos produtos sugerem que é possível existir diferentes doses dos fármacos nas ampolas, porém, é necessários realizar uma análise de doseamento levando em consideração o volume da alíquota retirada ou o volume da suspensão contido na ampola para uma conclusão definitiva.

A determinação da massa de fármaco DB nas ampolas foi importante para os ensaios de dissolução, uma vez que foi adicionado nas cubas do dissolutor o volume contido em uma ampola, por conseguinte, o percentual de fármaco dissolvido foi calculado em relação a média do teor de DB encontrado na análise de doseamento dos produtos.

4.6 DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA DE DB NAS SUSPENSÕES INJETÁVEIS

Além dos efeitos sobre as propriedades físicas de uma suspensão, o tamanho de partícula apresenta importantes implicações sobre perfil de dissolução do

fármaco e no desempenho biofarmacêutico do medicamento (MOSHARRAF & NYSTRÖM, 1995; SIMÕES, SOUSA, FIGUEIREDO, 1996; FONSECA *et al.*, 2009).

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 absorção. Contudo é importante conhecer e controlar o tamanho de partícula, tanto no que tange à produção de medicamentos contendo sólidos particulados como em relação à eficácia do medicamento administrado (AULTON, 2005).

Uma das técnicas mais indicadas para a determinação da distribuição granulométrica em suspensões é a de difração a laser, que possui como base a premissa de que o ângulo de difração do laser é inversamente proporcional ao tamanho da partícula por ele incidida. Este método também permite que as partículas em suspensão recirculem em frente ao feixe do laser, garantindo que todas as partículas sejam medidas, refletindo em elevada reprodutibilidade dos resultados (RAWLE, 2011).

Diante da influência da distribuição do tamanho de partícula no processo de dissolução de fármacos, a distribuição do tamanho das partículas nas suspensões injetáveis foi verificada através da técnica de difração a laser. O DB é praticamente insolúvel em água, desta forma, optou-se pela utilização de água como meio dispersante durante a análise. A fim de verificar se o DB era dissolvido no meio dispersante, alíquotas foram coletadas durante a recirculação do meio aquoso contendo a suspensão nos tempos de 0, 15 e 30 minutos, na qual foram submetidas à análise de quantificação cromatográfica. Em todas as alíquotas coletadas observou-se a ausência do pico de DB, sugerindo que o meio dispersante é adequado para análise do tamanho de partícula do DB nas suspensões.

Os resultados obtidos na análise de tamanho de partícula do DB em diversos produtos e em lotes diferentes de um mesmo produto disponíveis comercialmente estão representados na tabela 20. Os gráficos obtidos com os dados dos lotes de nº1 para os produtos A, B, C e D são observados na figura 19.

A tabela 20 demonstra que as suspensões apresentam valores variados de tamanho médio de partícula e de polidispersibilidade (Span). O tamanho médio de partícula encontrado durante as análises foi diferente quando foi avaliado diferentes produtos, sendo que os tamanhos médios tiveram variação de 7,43 μm à 40,25 μm , demonstrando a grande variabilidade de tamanhos de partículas presentes nas suspensões.

Tabela 20. Média da distribuição do tamanho de partícula de diferentes produtos e em variados lotes de um mesmo produto

Produto	Lote nº	Diâmetro máximo (μm)			Média (μm)	Moda (μm)	DPR (%)	Span
		D10	D50	D90				
A	1	5,46	14,54	93,88	40,25	14,86	15,81	6,04
	1	1,12	5,19	16,07	10,93	7,80	8,61	2,87
B	2	1,04	4,70	26,25	14,91	6,57	8,13	5,46
	3*	1,14	5,74	13,74	7,48	7,62	0,41	2,19
C	1	4,37	11,88	22,51	12,92	12,94	5,20	1,53
	2	5,10	12,17	22,21	13,04	12,94	2,99	1,40
	3*	6,51	16,71	32,84	23,76	17,46	16,53	1,59
	4*	4,79	16,12	35,70	26,18	18,66	17,58	1,90
D	1	2,35	11,64	25,01	13,82	14,25	12,87	1,95
	2	2,16	12,66	27,92	14,51	16,25	12,18	2,04
	3	1,80	10,30	23,08	13,50	12,45	16,62	2,06
E	1	1,25	5,20	11,55	7,43	5,91	8,75	1,98
	2	6,27	17,05	31,45	18,06	18,78	11,16	1,48
F	1*	1,05	4,58	39,97	15,37	6,24	17,34	2,96
	2*	1,20	6,41	16,52	11,82	8,75	3,38	2,38
G	1	9,72	19,37	33,40	20,39	20,51	10,72	1,23

* Análise com n=2

Quando avaliou-se diferentes lotes de um mesmo produto, produtos B à F como demonstrado na tabela 20, também foram encontrados diferentes tamanhos médios de partícula. Diante da influência da granulometria no processo de dissolução, torna-se de grande importância a qualificação de fornecedores da matéria prima, pois a variabilidade no tamanho das partículas depende do fabricante, fato que pode implicar no comportamento da suspensão no que tange à resposta terapêutica (ANSEL, 2000).

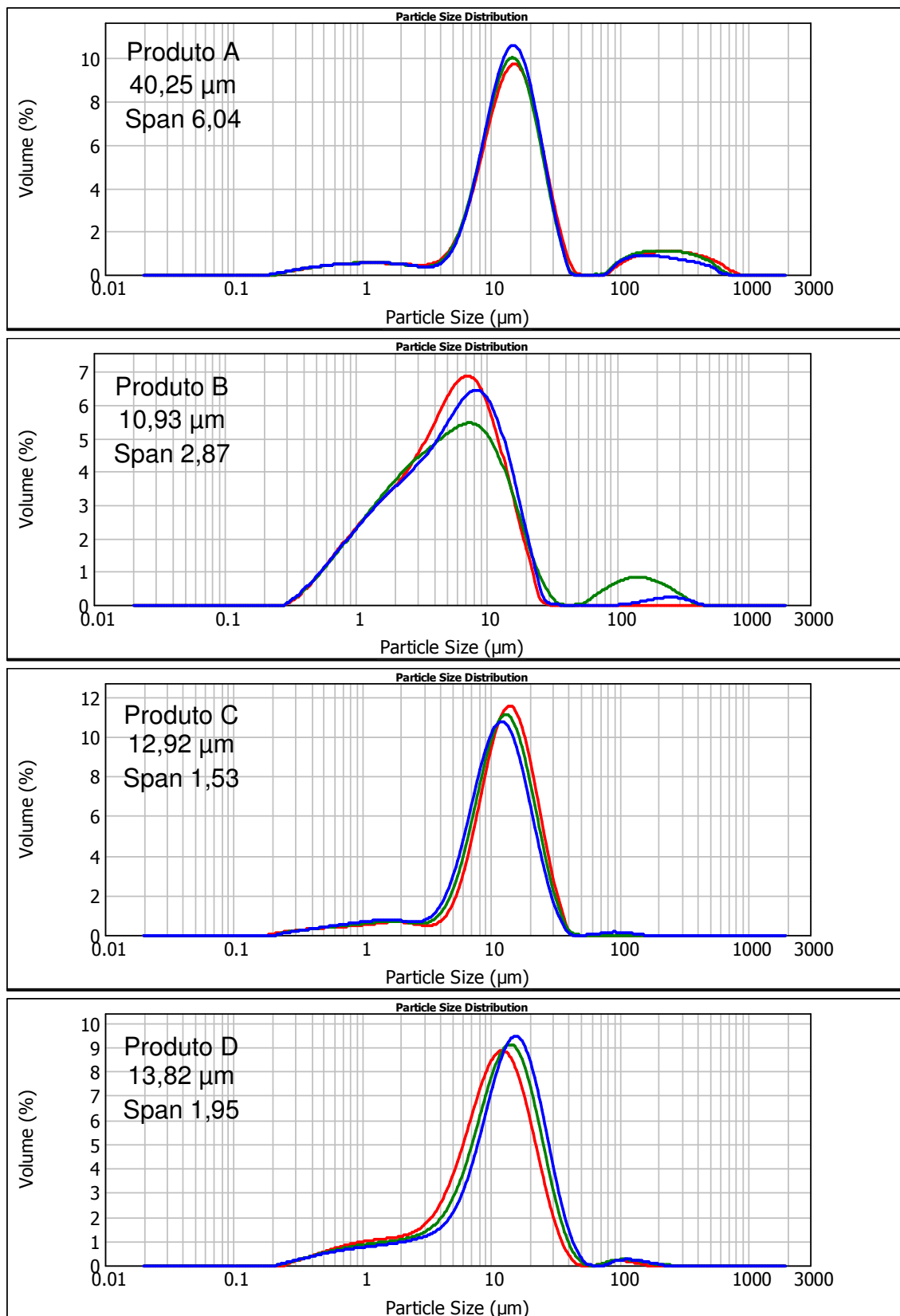


Figura 19. Representação gráfica da distribuição do tamanho de partícula para os produtos A, B, C e D do lote 1 ($n = 3$).

Em suspensões, uma característica de grande relevância no controle de qualidade é a polidispersibilidade do tamanho das partículas. O valor de Span é calculado através dos valores de $\{D90 - D10 / D50\}$, e o valor encontrado é referente a largura da distribuição do tamanho das partículas independente do tamanho da mediana, que é a medida de tendência central. Um valor de Span muito alto com uma D90 muito elevada é indesejável, pois indica a presença de uma percentagem consideravelmente maior de partículas mais grossas (SARKAR *et al.*,2005).

Foi observado na tabela 20, que os valores de Span diferem para cada amostra analisada e são proporcionais aos valores de diâmetro máximo e mínimo encontrado. O produto A lote1, B lote 2 e F lote 1 apresentam valores de Span maiores, pois apresentam maior polidispersibilidade no tamanho da partícula determinado.

Na figura 19 é possível observar e associar os valores de Span encontrados nos produtos A, B, C e D do lote 1 com a distribuição granulométrica das partículas no gráfico. Desta forma, verifica-se que valores maiores de Span obtidos para A e B são proporcionais a larga distribuição no tamanho das partículas, por conseguinte, o produto C apresenta a menor faixa de distribuição das partículas resultando no menor valor de Span.

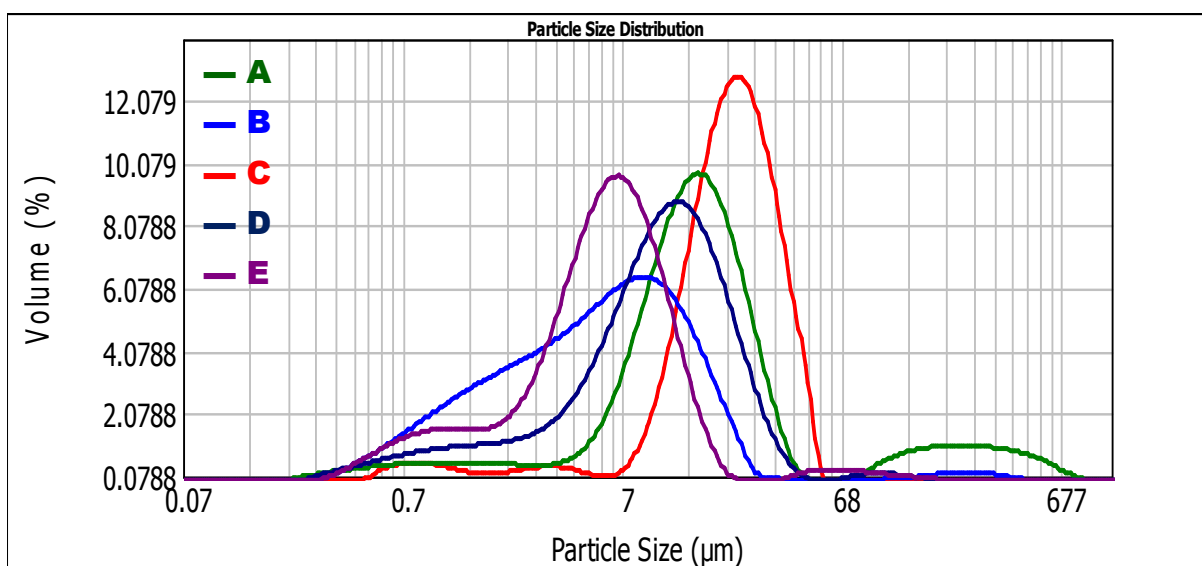


Figura 20. Comparação gráfica da distribuição granulométrica média das partículas de diferentes produtos.

Pode ser observado que os produtos A, B, C, D, E (lote 1) apresentaram distribuição granulométrica distintas, de acordo com as curvas de distribuição apresentadas na figura 20. Esse fato foi importante por tornar os produtos uma ferramenta que permitirá indicar se o método de dissolução *in vitro* é discriminativo para as suspensões com diferentes tamanhos de partícula. Quando as partículas de um fármaco são reduzidas, a velocidade de dissolução tende a acelerar; a explicação está no aumento da área superficial em contato com o solvente. Através da equação de Noyes e Whitney (ver item 1.5), pode-se demonstrar a relação direta do tamanho da partícula *versus* a área superficial com a taxa de dissolução (ABDOU, 1995; ANSEL, POPOVICH, ALLEN, 2000).

4.7 DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DE DB EM DIFERENTES MEIOS

A solubilidade intrínseca de um fármaco desempenha importante papel na sua dissolução a partir de uma forma farmacêutica sólida. Logo, torna-se fundamental conhecer a solubilidade do mesmo em diferentes solventes, de modo a selecionar meios de dissolução adequados para as formulações que o contenham (SILVA & VOLPATO, 2002).

A principal característica que um meio de dissolução deve possuir é a biorrelevância, ou seja, que apresente composição e característica similar ao fluido corporal a que se destina nos estudos *in vitro* (SIEWERT *et al.*, 2003). Tendo em vista que a suspensão injetável em estudo é administrada por via intramuscular, e o pH normal do sangue arterial é de 7,4 e o pH dos líquidos intersticiais é de cerca de 7,35 (GUYTON & HALL, 2006), o pH dos meios de dissolução foram mantidos em $7,4 \pm 0,1$.

Para fármacos de baixa hidrosolubilidade e de caráter fracamente ácido, como é o caso do DB de acordo com a sua estrutura química, algumas dificuldades apresentam-se na seleção de meios para dissolução, de modo que estes propiciem, na medida do possível, a condição *sink*, sem necessariamente, envolver um grande volume de meio (U.S. FDA, 1997; SILVA & VOLPATO, 2002).

A utilização de tensoativos em meios de dissolução é uma das estratégias para aumentar a hidrossolubilidade de fármacos. Segundo recomendação do FDA, soluções tamponadas contendo até 5% (p/v) de tensoativos podem ser utilizadas como meio de dissolução em estudos de dissolução *in vitro* (U.S. FDA, 1997).

Desta forma, a solubilidade da DB foi avaliada em diferentes soluções biorrelevantes candidatas à serem os meios de dissolução utilizados no desenvolvimento do ensaio de dissolução *in vitro*. Os meios de dissolução e o percentual de tensoativos utilizados para determinar a solubilidade estão descritos na tabela 3 no item 3.2.6.

Um dos critérios de escolha do meio de dissolução é a verificação da solubilidade em caso de dissolução total do fármaco no meio. Neste quesito, todos os meios que apresentarem concentração de saturação maior que 16,6 µg/mL podem ser utilizados nos ensaios de dissolução, uma vez que proporcionam um volume de meio maior que o volume de saturação do fármaco, isso quando avalia-se 5 mg de DB, equivalente a uma ampola do medicamento, em um volume de dissolução de 300 mL. As concentrações de saturação de DB nos respectivos meios de dissolução apresentadas na tabela 21, estão representadas graficamente na figura 21.

Tabela 21. Concentração de saturação do DB em diferentes meios de dissolução

Meio de dissolução	Tensoativo % (p/v)	Concentração de saturação do DB ($\mu\text{g/ml}$)
Tampão fosfato potássio (TFP) pH 7,4	Sem tensoativo	2,89
	LSS 0,5%	164,20
	P80 0,5%	20,47
	P80 1%	42,85
	P80 1,5%	58,87
	P20 0,5%	12,63
	P20 1%	19,49
	P20 1,5%	31,86
Fluído Muscular Simulado (FMS) pH 7,4	Sem tensoativo	1,59
	LSS 0,1%	22,69
	LSS 0,5%	111,90
	P80 0,5%	26,32
	P80 1%	30,47
	P80 1,5%	67,88
	P20 0,5%	17,62
	P20 1%	26,44
Tampão fosfato sódio (TFS) pH 7,4	Sem tensoativo	0,84
	LSS 0,1%	30,04
	LSS 0,5%	145,49
	P80 0,5%	22,48
	P80 1%	47,00
	P80 1,5%	58,52
	P20 0,5%	16,15
	P20 1%	27,73
Fluido Corporal Simulado (FCS) pH 7,4	Sem tensoativo	0,38
	LSS 0,1%	26,67
	LSS 0,5%	159,74
	P80 0,5%	20,17
	P80 1%	42,39
	P80 1,5%	55,41
	P20 0,5%	18,24
	P20 1%	33,25
Fluido Sinovial Simulado (FSS) pH 7,4	LSS 0,1%	29,16
	P80 0,5%	26,36

LSS – lauril sulfato de sódio; P80 – polissorbato 80; P20- polissorbato 20.

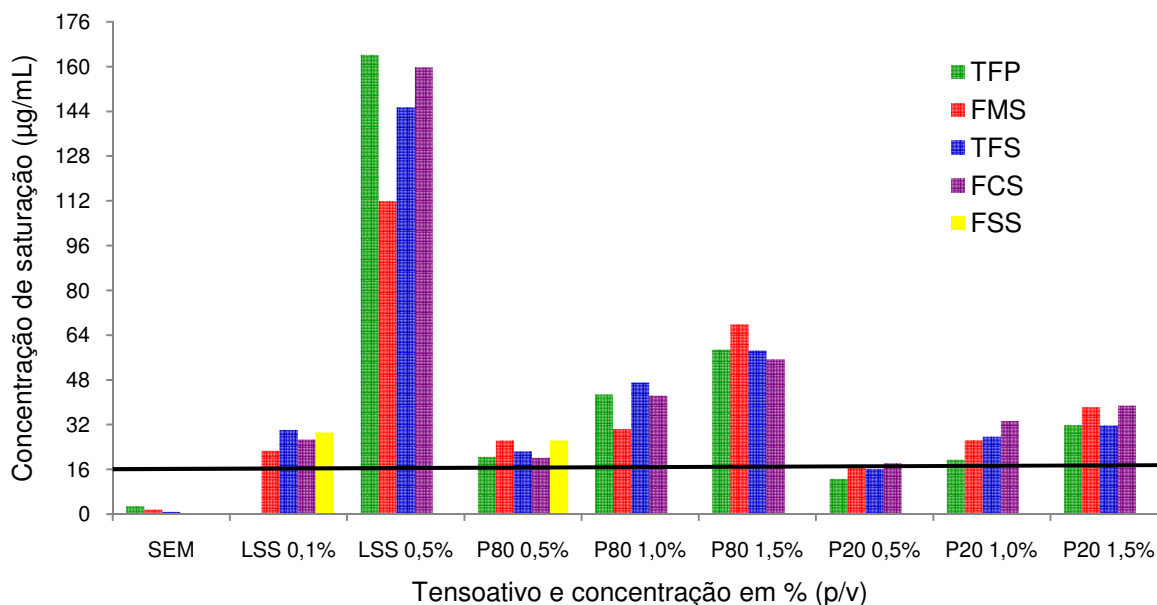


Figura 21. Representação gráfica da solubilidade do DB em diferentes meios, na presença de diferentes concentrações de tensoativos.

O meio tampão fosfato de potássio (TFP) foi substituído pelo tampão contendo sais de fosfato de sódio (TFS), na qual é normalmente utilizado, em função da incompatibilidade física entre os íons potássio e o tensoativo LSS observada durante os ensaios de solubilidade, sendo também relatada por outros autores (WADE & WELLER, 1994; SILVA & VOLPATO, 2002).

De acordo com o exposto no gráfico da figura 21, todos os meios sem tensoativo ou contendo P20 0,5% não são satisfatórios para os estudos de dissolução do DB, pois a concentração de saturação do meio foi menor que 16,6 µg/mL.

Os meios testados neste ensaio possuem diferentes composições, porém, todos foram considerados meios biorrelevantes. Uma vez que a via de administração da suspensão é a intramuscular, optou-se por meios que simulassem as condições musculares ou articulares. Os meios TFS, FMS, FCS e FSS com pH de 7,4 associados aos tensoativos LSS e P80 serão utilizados no desenvolvimento do ensaio de dissolução *in vitro* do DB.

A escolha dos tensoativos e suas concentrações levou em conta os mais utilizados em métodos de dissolução oficiais, bem como a solubilidade do DB no

meio. O LSS 0,1 e 0,5% e P80 0,5 e 1% foram considerados adequados, uma vez que a concentração de saturação é maior que 16,6 µg/mL, além de serem mais comumente utilizados.

4.8 DESENVOLVIMENTO DO ENSAIO DE DISSOLUÇÃO PARA AS SUSPENSÕES INJETÁVEIS

Os ensaios de dissolução *in vitro* objetivam avaliar a liberação do fármaco contido em forma farmacêutica para um meio similar aos líquidos corpóreos (SOUZA, FREITAS, STORPIRTIS, 2007). Apesar de sua significativa importância, atualmente não há qualquer compêndio oficial que preconize uma metodologia para avaliação da dissolução *in vitro* de fármacos a partir de suspensões injetáveis.

No processo de dissolução é fundamental que o método empregado seja discriminativo para formulações com características diferentes (BROWN, 2005). Diante disso, foi utilizado o medicamento referência (lote a granel) e um medicamento similar, identificados como R e S, respectivamente, no desenvolvimento do ensaio de dissolução *in vitro* do fármaco DB a partir das suspensões injetáveis.

Para o desenvolvimento do ensaio de dissolução foi necessário definir condições que seriam aplicadas durante as análises, como o aparelho empregado, a velocidade de agitação, o volume e composição do meio de dissolução e a necessidade de desaeração, adição e coleta das amostras, tempos de coleta e análise, e principalmente o método analítico para a quantificação do fármaco DB. Contudo, é importante que estas condições forneçam um teste de dissolução *in vitro* com poder de discriminação satisfatório.

Na quantificação de fármacos que apresentam baixa concentração alterações no método analítico geralmente são suficientes, no caso de CLAE, alteração do comprimento de onda ou aumento do volume injeção são utilizados para melhorar a sensibilidade. Porém, quando estas alternativas são limitadas ou já foram utilizadas,

uma redução do volume do meio de dissolução pode ser a solução mais robusta (CRIST, 2009). Para uma cuba de 1000 mL, um volume mínimo de 500 mL é recomendado, apesar de que volumes menores têm sido utilizados para diversos fins, como a dissolução do esomeprazol magnésio e o magnésio omeprazol, que são realizadas na fase de ácido usando apenas 300 mL de meio HCl 0,1 M (U.S.FDA, 2011).

Tendo em vista que as ampolas da suspensão contendo DB apresentam uma concentração de fármaco baixa, equivalente a 5 mg/mL de DB, e cada unidade do medicamento contem o volume declarado de 1 mL. As vias de administração desta suspensão injetável são a intramuscular e a intra-articular. Após a administração ocorre a formação de um efeito de depósito local do fármaco devido à baixa circulação de fluídos biológicos. Assim, optou-se pela utilização de um volume de meio de dissolução de 300 mL, sendo menor que o usual, todavia considerado adequado para os ensaios. Os meios de dissolução não passaram pelo processo de desaeração, visto que meios contendo tensoativos, quando filtrados a vácuo, produzem uma quantidade excessiva de espuma.

O originalmente desenvolvido por Poole em 1969, o método de pás foi modificado através do trabalho de cientistas da Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos. Consiste essencialmente de uma pá rotativa com dimensões específicas em conformidade com o raio de um frasco de fundo redondo. Este método supera muitas das desvantagens da cesta de rotação, mas requer cuidada precisão na geometria da pá e do frasco (HANSON & GRAY, 2004).

O aparato pás é simples e robusto, e é apoiado por uma ampla experiência de uso experimental comparado com os outros tipos de aparatos. Por causa dessas vantagens, este aparato é geralmente a primeira escolha para os ensaios de dissolução *in vitro* (KRÄMER, GRADY, GAJENDRAN, 2005). Em geral, a metodologias de dissolução empregadas para suspensões fazem o uso do aparato 2, pá rotatória, em um meio de dissolução aquoso. As demais condições do método são estabelecidas de acordo com a viscosidade e com a composição das suspensões. A velocidade de agitação recomendada é 25 rpm para suspensões de baixa viscosidade, e para suspensões de alta viscosidade variando de 50 a 75 rpm (SIEWERT *et al.*, 2003; USP, 2011).

Partindo do princípio de que a dose a ser ensaiada, a qual corresponde ao volume contido em uma ampola, deveria ser introduzido na cuba da forma mais conjunta possível, isto é, uma introdução imediata, assim, padronizou-se uma velocidade de adição rápida e constante com o objetivo de minimizar qualquer variação decorrente do processo de adição da amostra. Após homogeneização, a suspensão foi retirada das ampolas com auxílio de uma seringa acoplada a uma agulha, e posteriormente, o conteúdo foi transferido para o fundo da cuba do dissolutor. Todos os cálculos dos perfis de dissolução apresentados foram feitos em função da massa de DB adicionada por cuba, previamente quantificada na suspensão através do método de quantificação desenvolvido e validado neste estudo (item 4.3).

A concentração de tensoativo no meio de dissolução dever ser a menor quantidade possível, pois o uso de tensoativos em altas concentrações nos meios de dissolução, com o intuito de criar condições *sink*, pode levar a condições de ensaio que são incapazes de discriminar adequadamente as variáveis de fabricação que podem afetar o desempenho dos produtos (SIEWERT *et al.*, 2003).

Para verificar a influência do tensoativo e sua concentração no perfil de dissolução do DB, ensaios foram realizados com o meio TFS sem a adição de tensoativo, e com a adição de LSS nas concentrações de 0,05 – 0,1 – 0,5% (p/v) e com a adição de P80 nas concentrações de 0,5 e 1% (p/v). Os resultados destes ensaios para os medicamentos A e B estão apresentados nas figuras 22 e 23, respectivamente.

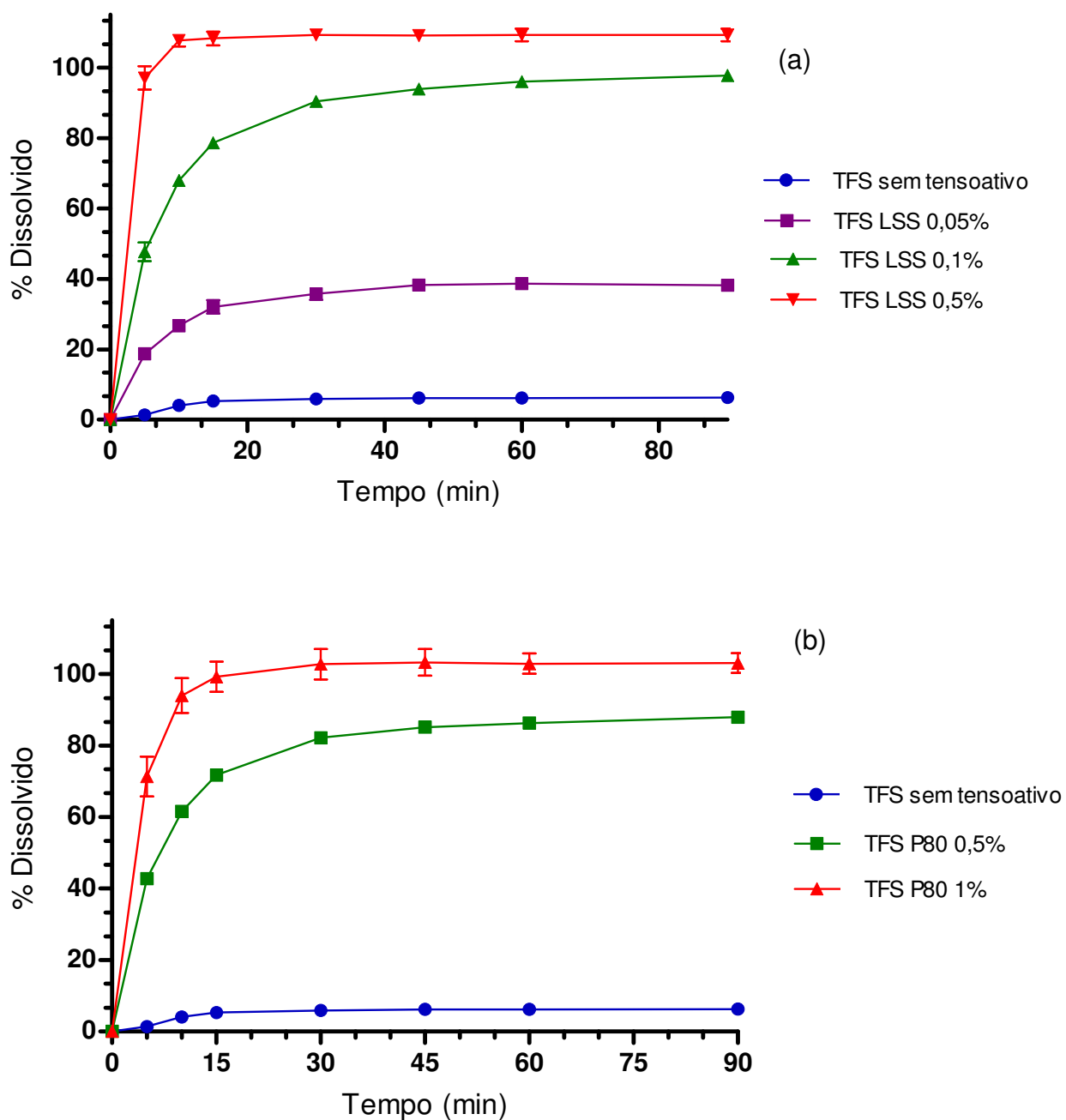


Figura 22. Perfil de dissolução do medicamento R em meio de dissolução (a) tampão fosfato de sódio contendo lauril sulfato de sódio e (b) tampão fosfato de sódio contendo polissorbato 80, em diferentes concentrações dos tensoativos, utilizando velocidade de agitação de 50 rpm.

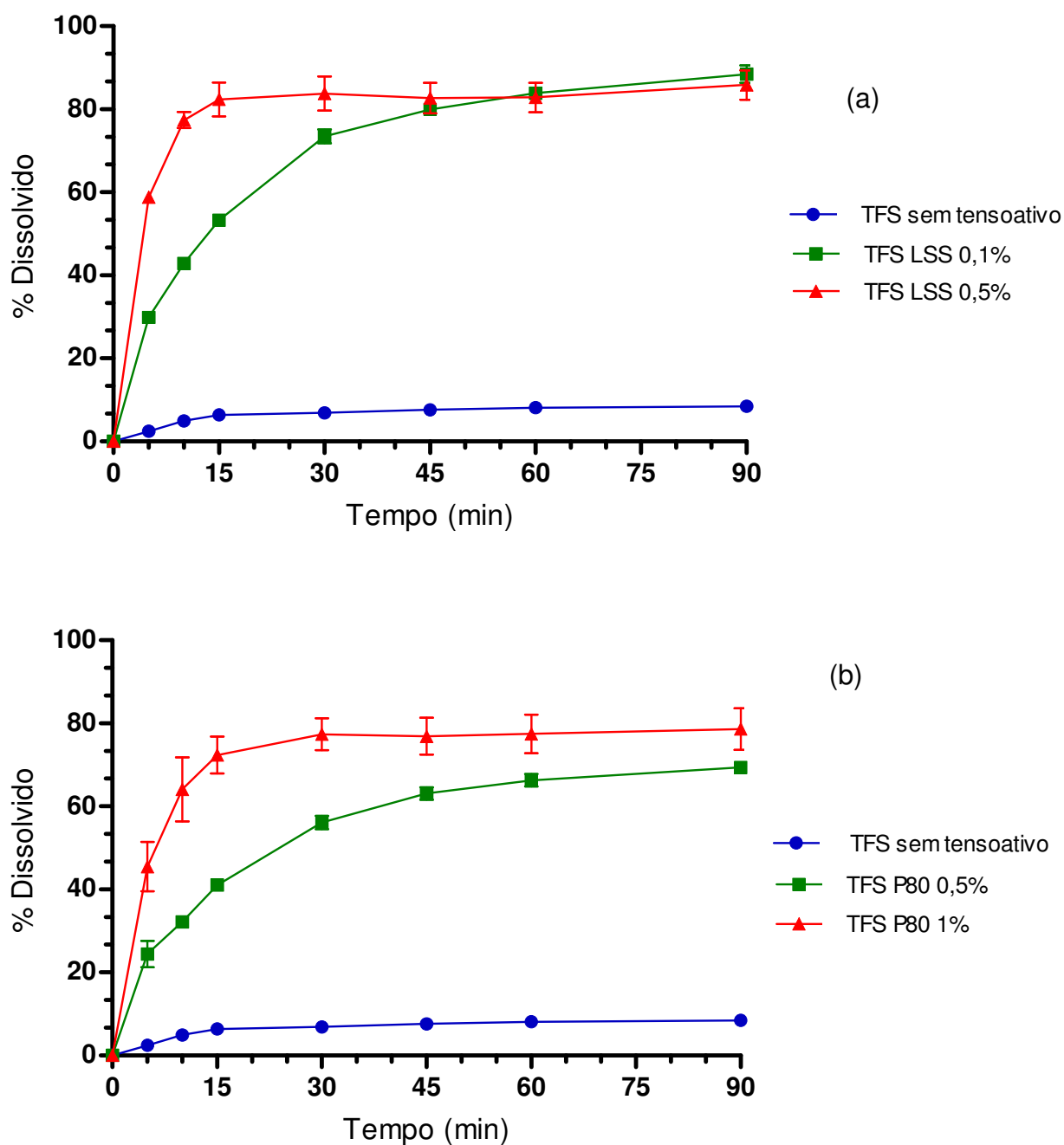


Figura 23. Perfil de dissolução do medicamento S em meio de dissolução (a) tampão fosfato de sódio contendo lauril sulfato de sódio e (b) tampão fosfato de sódio contendo polissorbato 80, em diferentes concentrações dos tensoativos, utilizando velocidade de agitação de 50 rpm.

A escolha do meio se baseia, em parte, com os dados de solubilidade e da dose do medicamento, a fim de assegurar que as condições *sink* sejam cumpridas. A condição *sink* é definida como o volume de meio, pelo menos, superior a três vezes o volume necessário para formar uma solução saturada do fármaco. A

escolha de um meio que não oferece condições *sink* pode ser justificável se for demonstrado ser mais seletivo (BROWN, 2005).

Os meios de dissolução TFS LSS 0,5% e TFS P80 1% de acordo com os valores de solubilidade de 145 µg/mL e 47 µg/mL respectivamente, proporcionam condições *sink* ao ensaio, entretanto, como é observado nos perfis de dissolução do medicamento R e S nas figura 22 e 23, a alta concentração de tensoativo proporcionou a rápida dissolução do DB, onde um platô da curva é alcançado em 15 minutos de análise, demonstrando não ser discriminativo. Na figura 22 (a) o meio TFS LSS 0,05%, o qual possui baixas concentrações de tensoativo atingiu rapidamente a concentração de saturação, causando a paralisação do processo de dissolução do fármaco no ensaio.

A condição *sink* não foi contemplada nos meios TFS LSS 0,1% e P80 0,5% testados, porém, mesmo assim, a completa dissolução do DB pôde ser obtida para o medicamento R, representado na figura 22. Na figura 23 observa-se que o medicamento S não apresentou uma dissolução completa, todavia teve aproximadamente 80% da dose solubilizada. Ambos os tensoativos LSS 0,1% e P80 0,5% demonstraram serem adequados para a utilização nos ensaios de dissolução *in vitro* de acordo com as análises realizadas, desta forma, a concentração destes tensoativos serão testadas em outros meios de dissolução biorrelevantes.

Um desenvolvimento recente e importante introduziu o conceito da utilização de meios de dissolução mais biorrelevantes. Os ensaios de dissolução, assim, proporcionam uma forte capacidade para prever o desempenho *in vivo* do fármaco a partir do produto, com o objetivo de detectar lotes não bioequivalentes durante o desenvolvimento e no controle de qualidade rotineiro de lotes na indústria (KRÄMER, GRADY, GAJENDRAN, 2005). Os meios de dissolução TFS, FMS, FCS e FSS possuem características biorrelevantes, assim foram utilizados nos estudos de dissolução *in vitro*, com a adição dos tensoativos anteriormente definidos.

Na determinação do perfil de dissolução além de diferentes meios de dissolução, foram utilizadas duas velocidades de agitação, 25 e 50 rpm, que são recomendadas para suspensões (SIEWERT *et al.*, 2003; USP, 2010). Os resultados obtidos com os diferentes meios e diferentes velocidades estão expostos nas figuras 24, 25, 26 e 27.

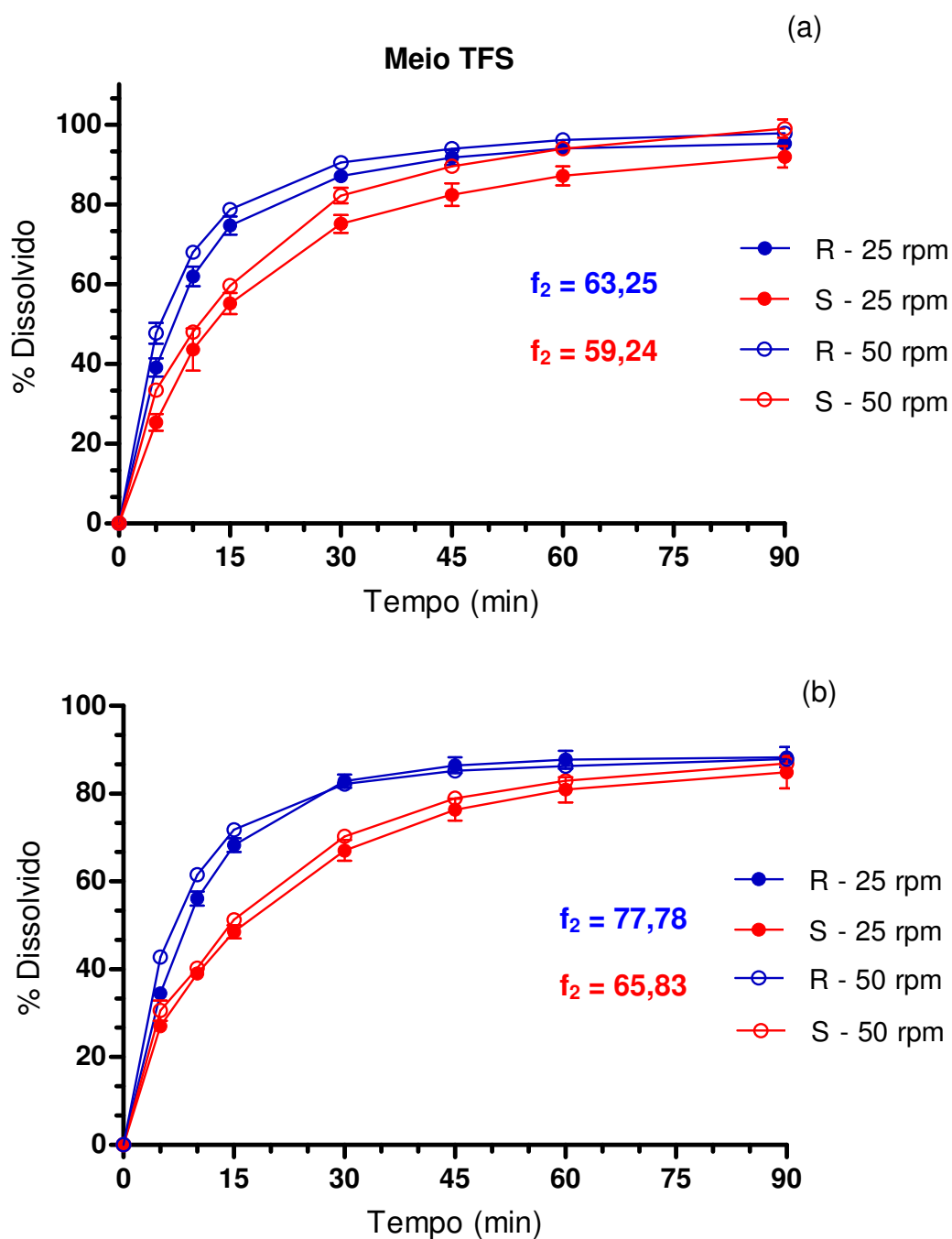


Figura 24. Perfis de dissolução do DB dos produtos R e S nas velocidades de agitação de 25 e 50 rpm, nos meios: tampão fosfato de sódio contendo lauril sulfato de sódio a 0,1% (a) e tampão fosfato de sódio contendo polissorbato 80 a 0,5% (b).

Ao comparar-se o comportamento de dissolução dos produtos obtidos no meio TFS (figura 24), observa-se que houve pequenas alterações nos perfis de dissolução em relação ao uso dos tensoativos LSS ou P80. Quando foram realizadas alterações na velocidade de agitação de 25 para 50 rpm, observa-se um

pequeno aumento da velocidade de dissolução do DB nos meios, todavia os valores de f_2 permanecem acima de 50 demonstrando que existe semelhança entre os perfis de dissolução do DB quando são utilizadas diferentes velocidades de agitação.

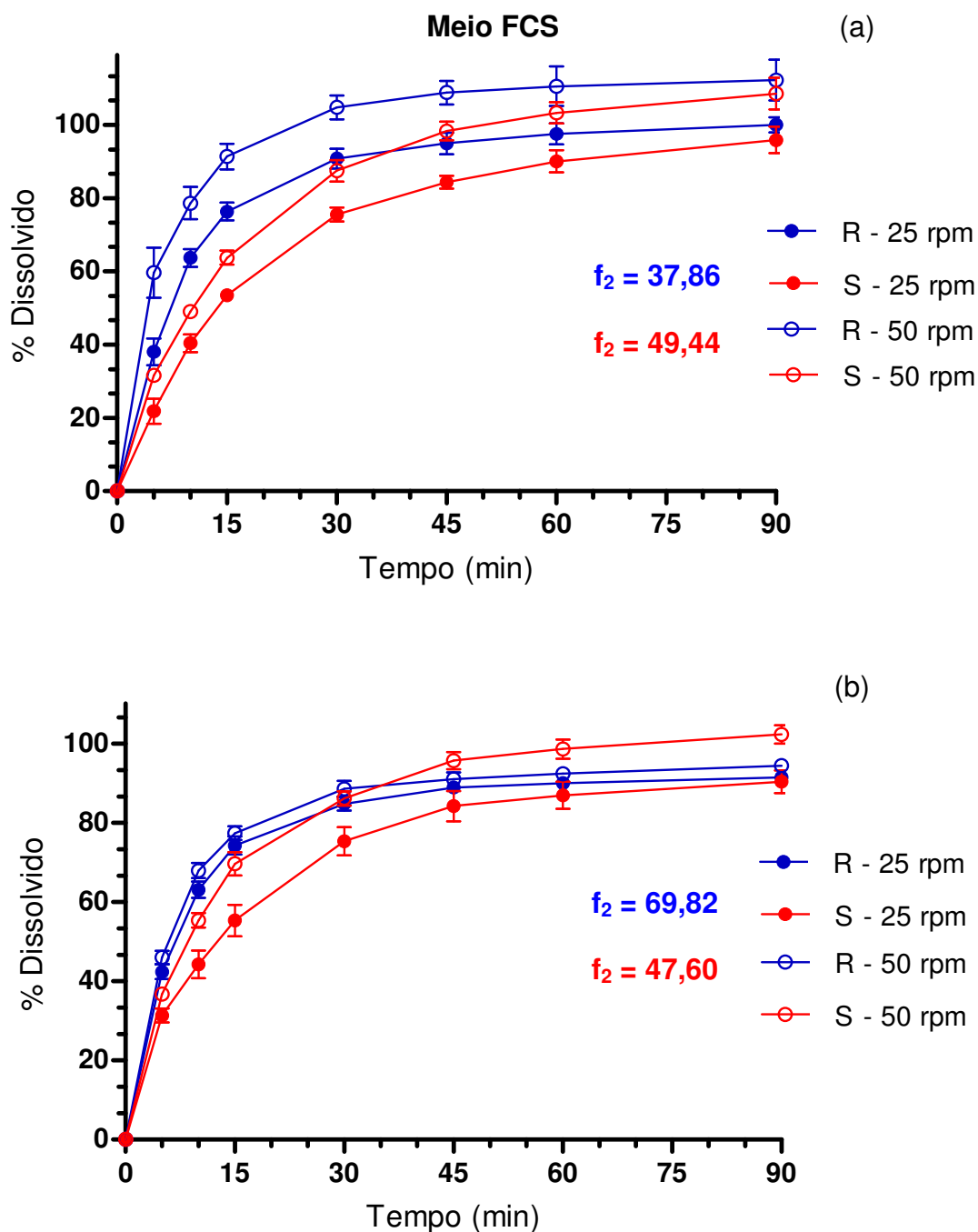


Figura 25. Perfis de dissolução do DB dos produtos R e S nas velocidades de agitação de 25 e 50 rpm, nos meios: fluido corporal simulado contendo lauril sulfato de sódio a 0,1% (a) e fluido corporal simulado contendo polissorbato 80 a 0,5% (b).

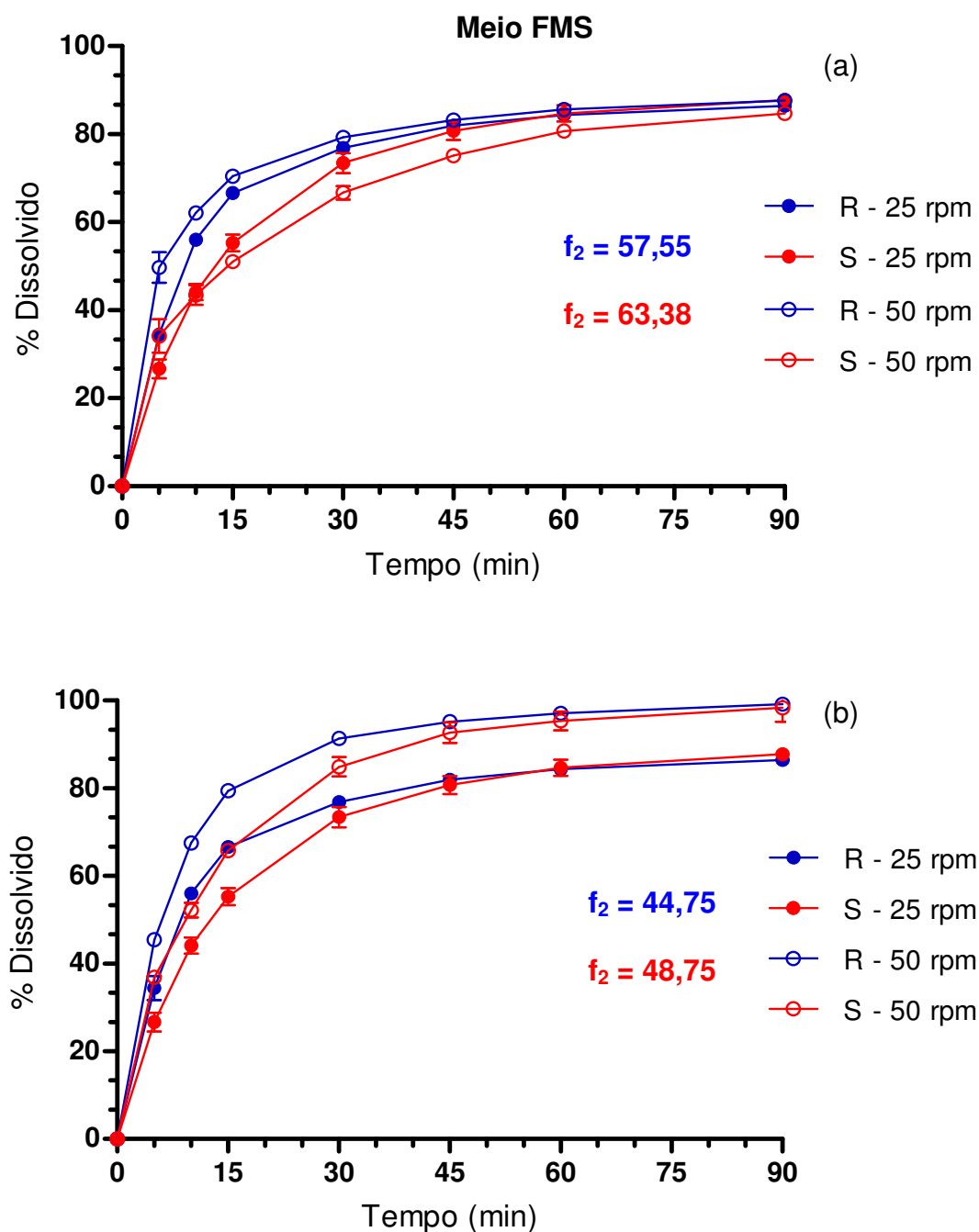


Figura 26. Perfis de dissolução do DB dos produtos R e S nas velocidades de agitação de 25 e 50 rpm, nos meios: fluido muscular simulado contendo lauril sulfato de sódio a 0,1% (a) e fluido muscular simulado contendo polissorbato 80 a 0,5% (b).

Diferenças na velocidade de dissolução em relação ao tensoativo empregado foram observadas, quando foram comparados os perfis obtidos com o meio FCS na figura 25. O meio FCS LSS 0,1% a 50 rpm promove um percentual de liberação maior do fármaco que em 25 rpm, resultando em perfis de dissolução não

semelhantes com $f_2 = 37,86$. Para o medicamento S não foi observada alterações significativas, os perfis foram considerados semelhantes com valores de f_2 próximos ao especificado.

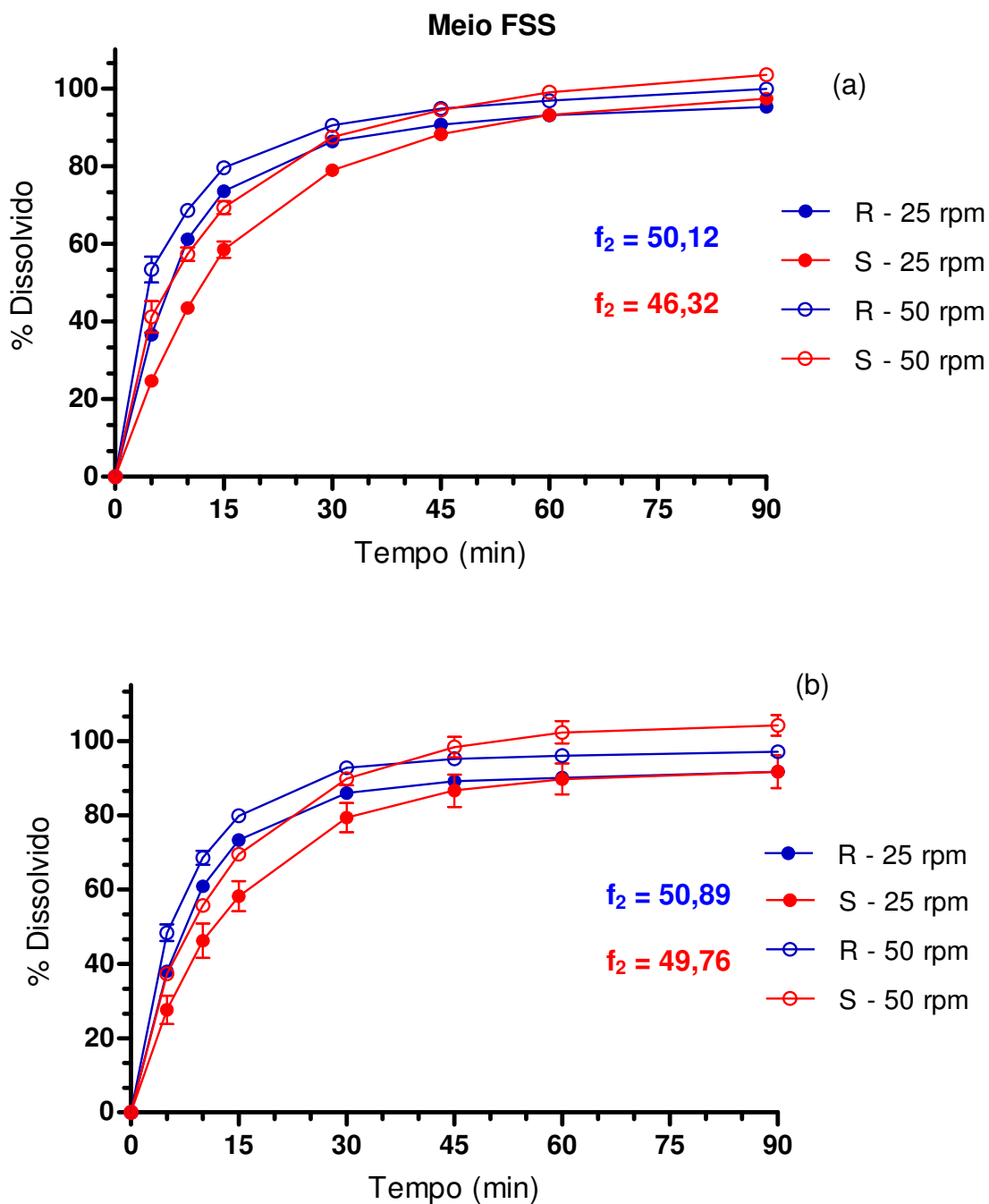


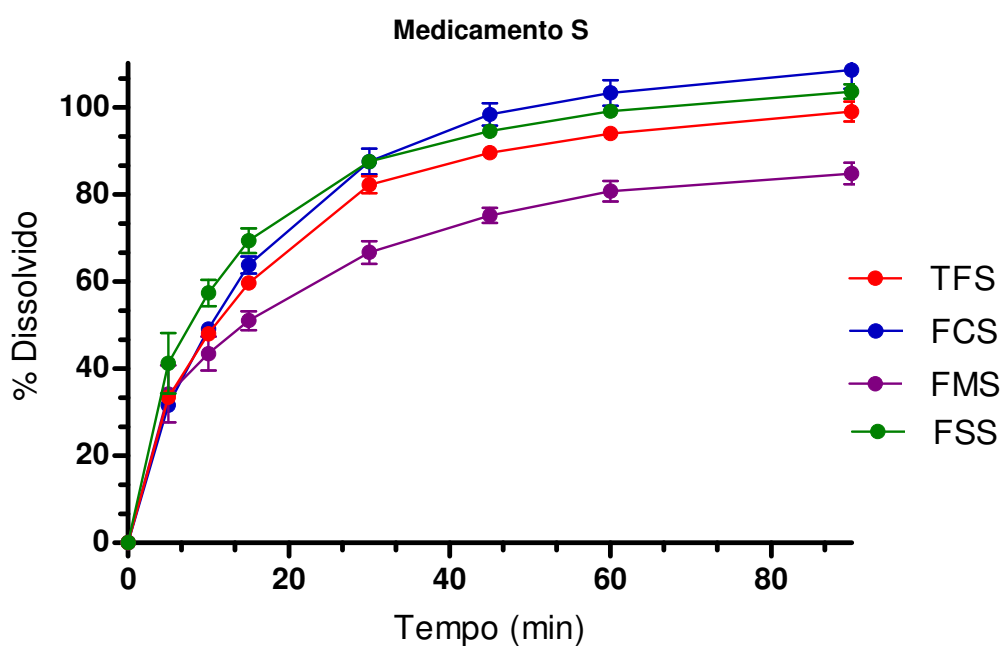
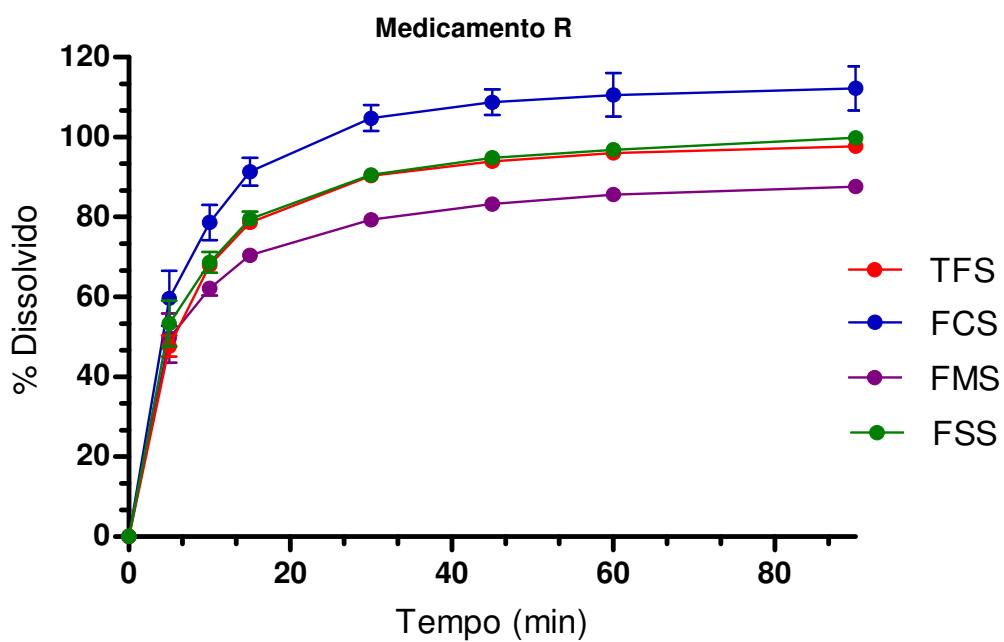
Figura 27. Perfis de dissolução do DB dos produtos R e S nas velocidades de agitação de 25 e 50 rpm, nos meios: fluido sinovial simulado contendo lauril sulfato de sódio a 0,1% (a) e fluido sinovial simulado contendo polissorbato 80 a 0,5% (b).

Na figura 26, observa-se uma maior dissolução de DB para o meio FMS P80 0,5%, este fato corrobora com os resultados obtidos nos estudos de solubilidade do DB. O aumento da velocidade de agitação influenciou no aumento da taxa de dissolução do DB no meio contendo P80 0,5%, porém os valores de f_2 demonstram semelhança entre os perfis de dissolução para os medicamentos R e S. Os perfis de dissolução obtidos com FMS LSS 0,1% foram considerados semelhantes com valores de $f_2 > 50$.

Nos perfis de dissolução do fármaco no meio FSS (figura 27) não são observadas diferenças significativas em relação ao tensoativo utilizado. Observa-se um aumento na velocidade de dissolução referente ao aumento na velocidade de agitação, todavia, os valores de f_2 demonstram semelhança entre os perfis de dissolução obtidos.

Em relação aos tensoativos utilizados nos ensaios de dissolução *in vitro*, observou-se que o LSS 0,1% proporciona maiores percentuais de fármaco liberado que o tensoativo P80 0,5%, assim, foi empregado neste trabalho o tensoativo LSS 0,1%, pois apresentou maior poder discriminativo, mostrando-se adequado e por ser amplamente utilizado como tensoativo em meios de dissolução.

Após a escolha do tensoativo LSS 0,1%, foram realizadas comparações dos perfis de dissolução obtidos com os produtos R e S em diferentes meios de dissolução biorrelevantes tais como o FCS, FMS, FSS e TFS. A velocidade de agitação utilizada neste ensaio foi de 50 rpm, e os resultados obtidos estão apresentados na figura 28.



TFS	FCS	FMS	FSS
$f_2 = 39,34$	$f_2 = 29,16$	$f_2 = 42,24$	$f_2 = 52,58$
$f_1 = 28,06$	$f_1 = 44,22$	$f_1 = 22,64$	$f_1 = 10,60$

Figura 28. Comparação dos perfis dos produtos R e S em diferentes meios de dissolução (FCS, FMS, FSS, TFS) contendo LSS 0,1%, utilizando velocidade de agitação de 50 rpm.

O meio FMS apresenta a menor taxa de dissolução, enquanto que o FCS apresenta a maior taxa de dissolução de DB, como é observado na figura 28. Os produtos nos meios TFS e FSS não apresentaram uma dissolução completa, todavia apresentaram pelo menos 80% da dose solubilizada nas diferentes velocidades de agitação. Os produtos R e S apresentam diferentes perfis de dissolução nos quatro meios testados, sugerindo que o método tem poder discriminatório frente a diferentes formulações.

De acordo com os dados expostos anteriormente, a velocidade de 50 rpm promoveu um maior percentual de fármaco dissolvido, e também demonstrou ser discriminativa frente a dois diferentes produtos, como é observado na figura 28. Por conseguinte, a velocidade de agitação de 50 rpm, o meio de dissolução de TFS contendo LSS 0,1% (p/v) como tensoativo, demonstraram serem condições adequadas para serem aplicadas nos ensaios de dissolução do DB. A concentração de saturação do meio TFS LSS 0,1% é $> 30 \mu\text{g/mL}$, desta forma, o volume de dissolução de 300 mL utilizado no ensaio forneceu cerca de duas vezes o volume necessário para formar uma solução saturada do fármaco. Meios com sistema tamponado, como o TFS pH 7,4, são amplamente utilizados como meio de dissolução nos métodos oficiais, desta forma, associado a outras vantagens, como a praticidade de preparo da solução, o TFS pH 7,4 com LSS 0,1% será utilizado como meio de dissolução nos estudos envolvendo outros produtos desta suspensão que são amplamente comercializados.

Um teste de liberação/dissolução deverá discriminar produtos que sejam diferentes entre lotes de um mesmo produto ou de produtos diferentes, como para verificar possíveis diferenças na performance entre medicamento referência, genéricos e similares. Um método de dissolução discriminatório, por sua vez, deverá diferenciar produtos com base na sua formulação e/ou nos processos de fabricação, assim, pequenas diferenças presentes devem ser facilmente detectadas quando é avaliado a performance de dissolução do fármaco.

4.9 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE DB NOS ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO *IN VITRO*

Conforme visto anteriormente, a validação da metodologia analítica por CLAE para a quantificação de FB e DB na suspensão injetável demonstrou que o método é eficiente nas condições estabelecidas. Entretanto, qualquer variação nas especificações a partir de um método validado, resulta em um procedimento analítico diferente ou a alteração deste procedimento, assim, este método também devem ser validado (HANSON & GRAY, 2004).

Com o intuito de aplicar esta metodologia para a quantificação de DB nos estudos de dissolução *in vitro* é necessário comprovar a sua eficácia frente a novas condições de análise, como a aplicação de um maior faixa de concentração para linearidade e a utilização do meio de dissolução como diluente das amostras, no caso, o TFS LSS 0,1% pH 7,4.

As condições cromatográficas do método de quantificação de FB e DB nos ensaios de dissolução *in vitro* estão descritas a seguir:

- Coluna cromatográfica: C18 4,6 mm x 150 mm, 5 µm;
- Comprimento de onda: 254 nm;
- Volume de injeção: 99,5 µL;
- Temperatura: 25°C;
- Diluente: tampão fosfato de sódio 0,1 M contendo lauril sulfato de sódio 0,1%;
- Vazão de fluxo: 1,6 mL/min;
- Concentração de trabalho: 6,6 µg/mL de FB e 16,6 µg/mL de DB;
- Fase móvel em modo gradiente descrita na tabela 12.

4.9.1 Especificidade e Seletividade

A Figura 29 representa os cromatogramas obtidos com de injeção do meio de dissolução TFS LSS 0,1%, do placebo e do padrão de FB e DB diluídos no meio de dissolução.

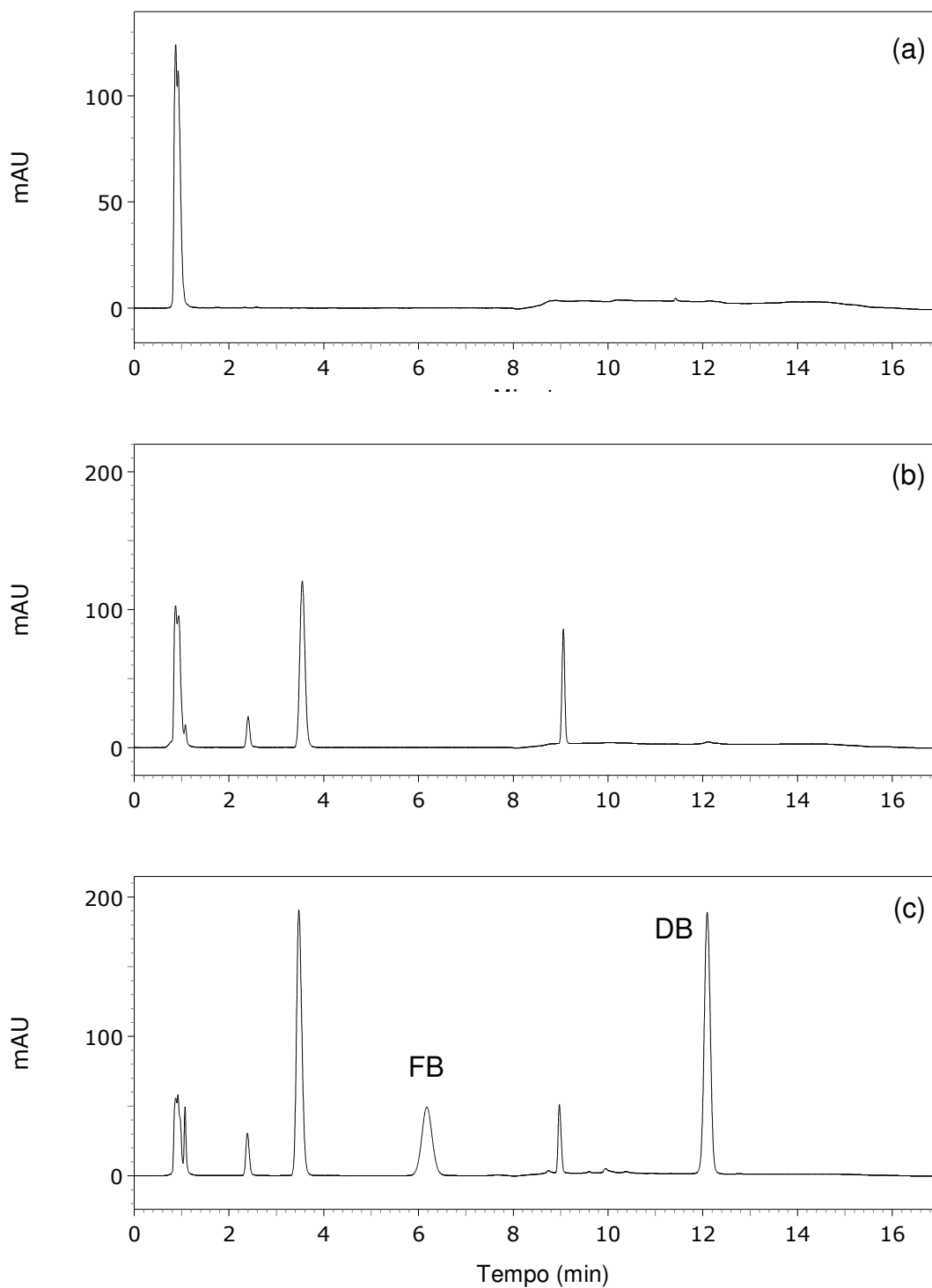


Figura 29. Cromatogramas obtidos com a injeção do meio de dissolução TFS LSS 0,1% (a), do placebo do medicamento referência (b) e do medicamento referência (c). As amostras foram diluídas com o meio de dissolução.

O cromatograma obtido na figura 29 (c) pela injeção do medicamento referência diluído no meio de dissolução, quando comparado com o cromatograma (a) na qual é referente ao meio de dissolução TFS LSS 0,1% e ao (b) referente ao placebo do medicamento, observa-se que não há interferentes derivados dos constituintes meio de dissolução e do placebo nos tempos de retenção do FB e DB. Os resultados da análise de pureza, realizado com auxílio do detector de arranjos de fotodiodo estão representados nas Figuras 30, 31 e 32.

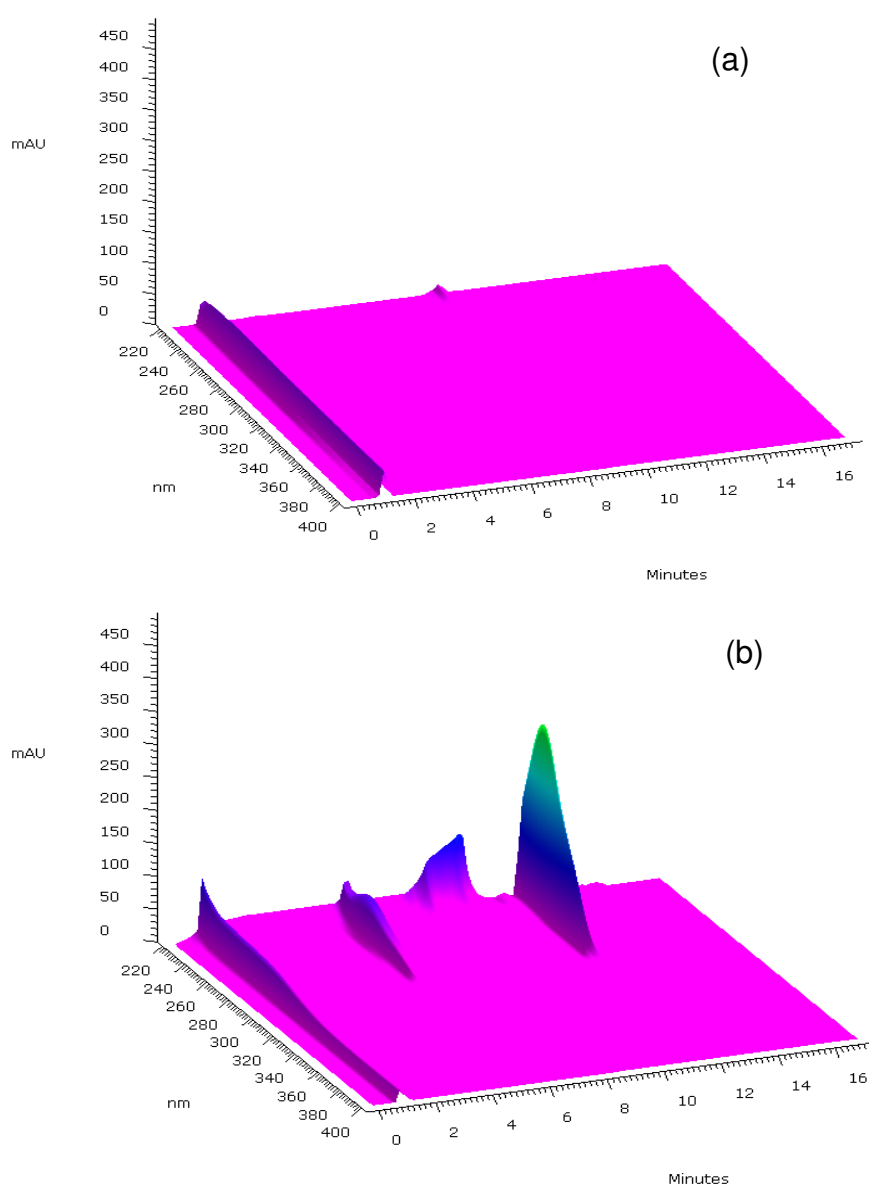


Figura 30. Cromatogramas tridimensionais de varredura da análise de FB e DB por CLAE: (a) meio de dissolução (b) FB e DB diluídos no meio de dissolução.

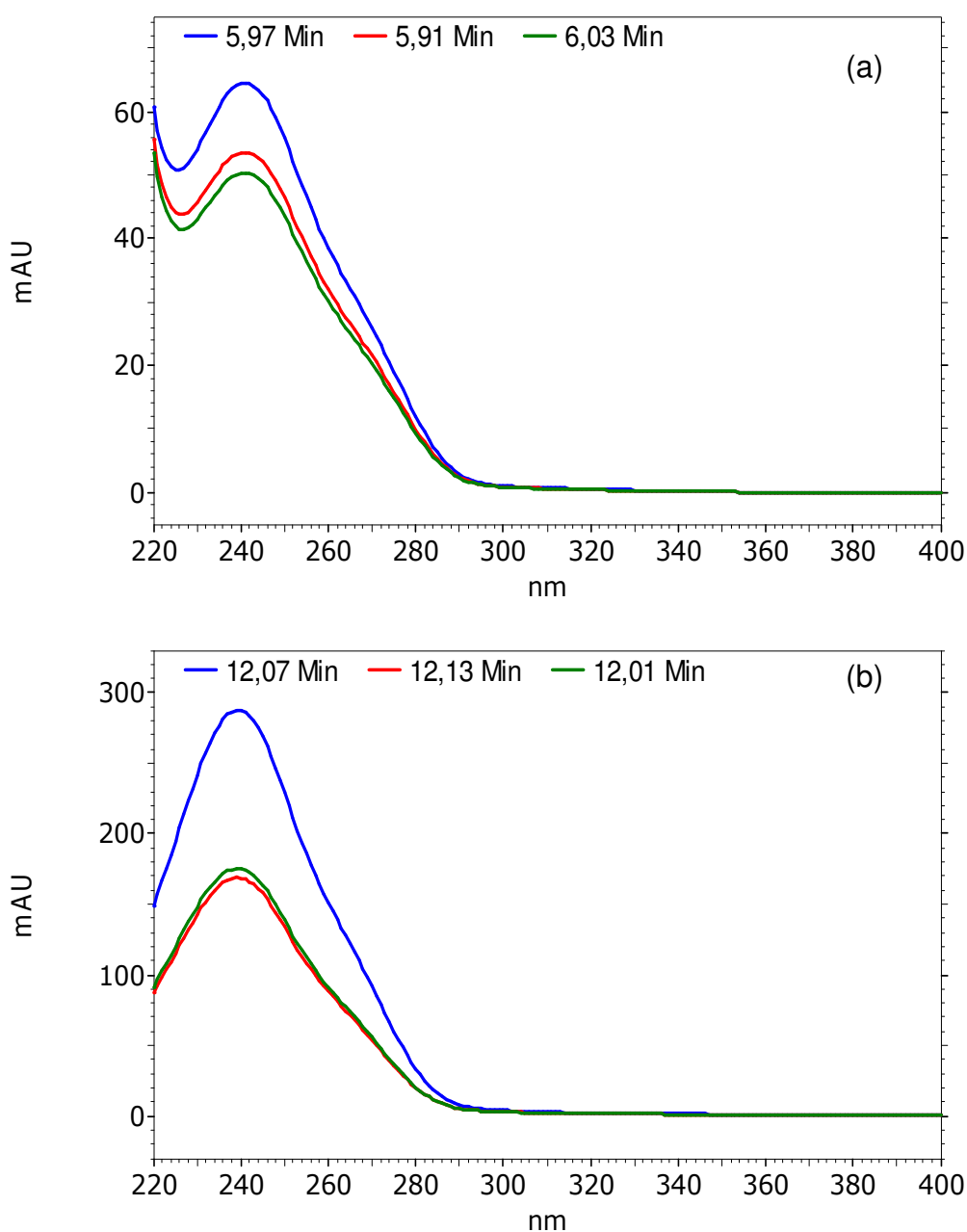


Figura 31. Pureza cromatográfica obtida por similaridade de espectros em diferentes tempos de retenção para FB (a) e DB (b).

Na figura 30 (a) e (b), a seletividade pode ser demonstrada pela ausência de interferência no sinal cromatográfico. Os espectros de varredura (figura 31) obtidos em diferentes tempos de retenção do sinal cromatográfico variaram apenas pela sua intensidade. A razão cromatográfica (figura 32) foi constante e próxima de 0,00, e o índice de pureza observado foi $> 0,99$. Estes resultados confirmam que o método é

seletivo e específico para a quantificação de DB no meio de dissolução TFS LSS 0,1% utilizado nos estudos de dissolução *in vitro*.

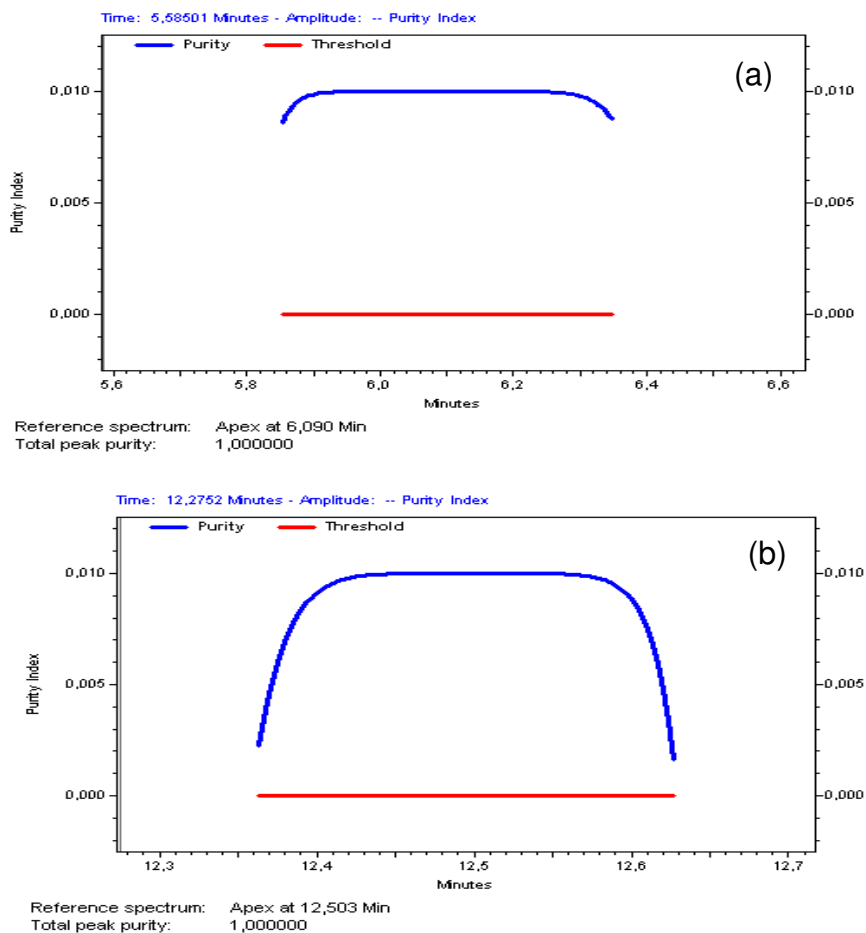


Figura 32. Pureza cromatográfica obtida pela razão cromatográfica para FB (a) e DB (b).

4.9.2 Linearidade

Na figura 33 está representada a curva padrão média ($n = 3$) obtida com seis níveis de concentração na faixa de 1,6 a 20 $\mu\text{g/mL}$ de DB no TFS LSS 0,1%, e na tabela 22 observa-se a análise estatística da linearidade com o intuito de comprovar a linearidade do método nesta faixa de concentração.

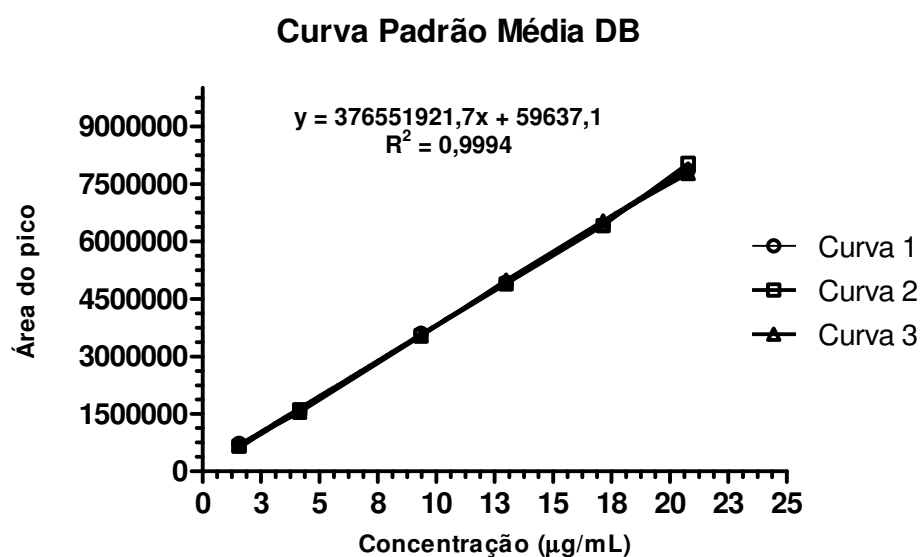


Figura 33. Curva padrão média da linearidade do DB.

Tabela 22. Análise estatística do estudo da linearidade do DB

Fármaco	Intervalo	Parâmetros	Resultados	Estatística $\alpha < 0,05$
DB	1,6 - 20 $\mu\text{g/mL}$	Inclinação	375200 ± 3736	F calc = 2,60 F tab = 3,20
		Intercepto	52980 ± 41179	F calc = 0,39 F tab = 3,19
		R^2	$0,9994 \pm 3,51\text{E-}04$	
		Regressão	F calc = 32343 F tab = 4,49	$P < 0,0001$

A análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados para as curvas do DB apresentaram coeficientes de correlação acima de 0,999 evidenciando uma alta correlação linear, na qual é diretamente proporcional à concentração do fármaco dentro dos limites estudados.

A validade da regressão para a curva do DB é representada pelo valor de $F_{\text{calc}} = 32343$ superior ao valor de $F_{\text{tab}} = 4,49$ ($F_{\text{calc}} \gg F_{\text{tab}}$) indicando que a inclinação da curva é significativamente diferente de zero, assim admite-se que a

inclinação da reta não é nula e o ajuste linear da curva é aceito para ambos os fármacos com $P < 0,0001$.

Os resultados obtidos na análise do desvio da inclinação e do intercepto da curva do DB demonstram que o F_{calc} foi menor que o F_{tab} , desta maneira pode-se afirmar com 95% de confiança que o modelo é linear e está bem ajustado na faixa de concentração estudada (NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2003; CALLEGARI-JACQUES, 2004).

4.9.3 Precisão intermediária e repetibilidade

Estão representados na tabela 23 os valores obtidos na quantificação do DB na formulação injetável para os ensaios de precisão intradia (repetibilidade) e interdia (precisão intermediária) em quatro níveis de concentração 10, 50, 100, 120%.

Tabela 23. Resultados obtidos na análise da repetibilidade e precisão intermediária

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Dia	Massa (mg/ampola)	DP	Precisão intradia DPR (%)	Precisão interdia DPR (%)
1,6	1	6,64	0,14	2,3	3,34
		6,37			
		6,33			
	2	6,52	0,17	2,51	
		6,82			
6,89					
8	1	6,53	0,03	0,46	0,86
		6,46			
		6,49			
	2	6,61	0,07	1,03	
		6,49			
6,50					
16	1	6,50	0,03	0,50	1,44
		6,46			
		6,42			
	2	6,57	0,04	0,65	
		6,64			
6,66					
20	1	6,48	0,02	0,35	1,37
		6,44			
		6,48			
	2	6,56	0,10	1,53	
		6,48			
6,66					

Os valores de DPR das análises intradia e interdia são inferiores aos 5,0% aceitáveis para o teste. Os resultados da tabela 23 revelaram que o método proposto apresenta boa repetibilidade e reprodutibilidade, ou seja, o método é capaz de apresentar concordância de seus resultados tanto em mesmo dia quanto em dias diferentes, por conseguinte, considera-se a metodologia precisa na faixa de concentração analisada.

4.9.4 Precisão de injeção

De acordo com os resultados apresentados na tabela 24, a precisão do volume de injeção do sistema cromatográfico também demonstrou ser adequada, uma vez que o valor de DPR encontrado para os níveis de concentração de 20 e 100% foram menores que 2% (USP, 2010).

Tabela 24. Resultados do teste de precisão de injeção para quantificação do DB

Injeção	Concentração de DB					
	16,6 µg/mL			3,3 µg/mL		
	Área	Média	DPR (%)	Área	Média	DPR (%)
1	6372094			1672320		
2	6416996			1659190		
3	6442114	6456247	1,06	1646890	1655947	0,62
4	6513216			1652037		
5	6536815			1649297		

4.9.5 Limite de quantificação e Limite de detecção

O ensaio de dissolução *in vitro* é considerado um teste de performance e, portanto, são de fundamental importância as determinações de LQ e LD para garantir a quantificação e a detecção do fármaco desde os pontos iniciais de amostragem. Os valores estimados de LD e LQ foram de 0,29 µg/mL e 0,98 µg/mL, respectivamente, sendo considerados satisfatórios.

4.9.6 Exatidão

A tabela 25 apresenta os resultados do ensaio de exatidão realizado pelo método do placebo contaminado.

Tabela 25. Porcentagem média de recuperação no teste de exatidão (n = 3)

Nível (%)	Concentração adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	DPR (%)
10	1,68	1,69	100,27	1,36
50	9,12	9,19	100,81	0,66
100	16,94	17,01	100,47	1,35
120	20,84	20,67	99,15	1,54

Os resultados apresentados na tabela 25 para a verificação da exatidão do método demonstram que nos quatro níveis de concentração avaliados os percentuais de recuperação são satisfatórios, pois os valores encontram-se dentro de $100 \pm 2\%$ preconizados pela legislação vigente, e os valores de DPR foram inferiores a 2,0%. Isto demonstra que o método é exato para análise de DB na faixa de concentração analisada.

O método analítico empregando CLAE, anteriormente validado para a quantificação simultânea de FB e DB nas suspensões injetáveis, também demonstrou-se adequado para a quantificação de DB no meio de dissolução TFS LSS 0,1% utilizado nos estudos de dissolução *in vitro*, visto que foi comprovada a sua seletividade, especificidade, linearidade, precisão e exatidão.

4.9.7 Adsorção nos filtros

Em ensaios de dissolução filtros eficazes são necessárias para preparar a amostra coletada para a análise, caso contrário, o material não dissolvido no o meio pode influenciar os resultados. É importante que os materiais dos filtros tenham pouca ou nenhuma tendência para adsorver o fármaco, uma vez que a adsorção no filtro pode resultar em resultados fora do especificado para o ensaio de dissolução (LINDENBERG, WIEGAND, DRESSMAN, 2005).

Segundo Brown, a adsorção dos fármacos na membrana de filtração deve ser avaliada. A validação desse sistema tem a finalidade de garantir que não vai ocorrer

adsorção apreciável do fármaco ao material polimérico do filtro (BROWN, 2005). A especificação para esse teste é de que se tenha um máximo de 5% de perda do soluto por adsorção ao material filtrante (LINDENBERG, WIEGAND, DRESSMAN, 2005).

Os filtros utilizados nos ensaios de dissolução *in vitro* foram filtros de polietileno de 10 µm de porosidade e filtros de membrana PVDF com 0,1 µm de poro. Os resultados estão expostos a seguir na Tabela 26.

Tabela 26. Medidas da perda de soluto por adsorção no filtro

	Concentração de DB	
	16 µg/mL	1,6 µg/mL
Média	0,41%	2,53%
DP	0,18%	1,80%

Os resultados presentes na tabela 26 foram relatados como média e desvio padrão, e verifica-se que os valores encontrados estão abaixo do máximo recomendado como critério de adsorção aceitável (< 5%), representando uma recuperação de > 95%, demonstrando que os filtros empregados no estudo não implicam em perda apreciável do fármaco durante os ensaios de dissolução *in vitro*.

4.10 APLICAÇÃO DO ENSAIO DE DISSOLUÇÃO *IN VITRO* EM PRODUTOS COMERCIALIZADOS

As condições aplicadas no ensaio de dissolução do DB a partir da suspensão injetável estão descritas a seguir:

- Aparelho: pás, velocidade de agitação de 25 e 50 rpm
- Meio de dissolução: tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4 contendo lauril sulfato de sódio 0,1% (p/v), 300 mL

- Tempos de coleta: 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos

Cinco diferentes produtos foram adquiridos no mercado nomeados A, B, C, D (lote 1) e E (lote 1 e 2), entre eles o medicamento referência, um genérico e três similares, na qual foram submetidos aos estudos de dissolução *in vitro*. Os mesmos procedimentos adotados durante o desenvolvimento do método foram aplicados neste ensaio. A determinação de DB liberado no meio foi realizada através da metodologia de quantificação por CLAE validada anteriormente no item 4.9.

A figura 34, apresenta os perfis de dissolução obtidos a partir de dois lotes diferentes do medicamento E, utilizando meio de dissolução TFS LSS 0,1%, nas velocidades de agitação de 25 e 50 rpm.

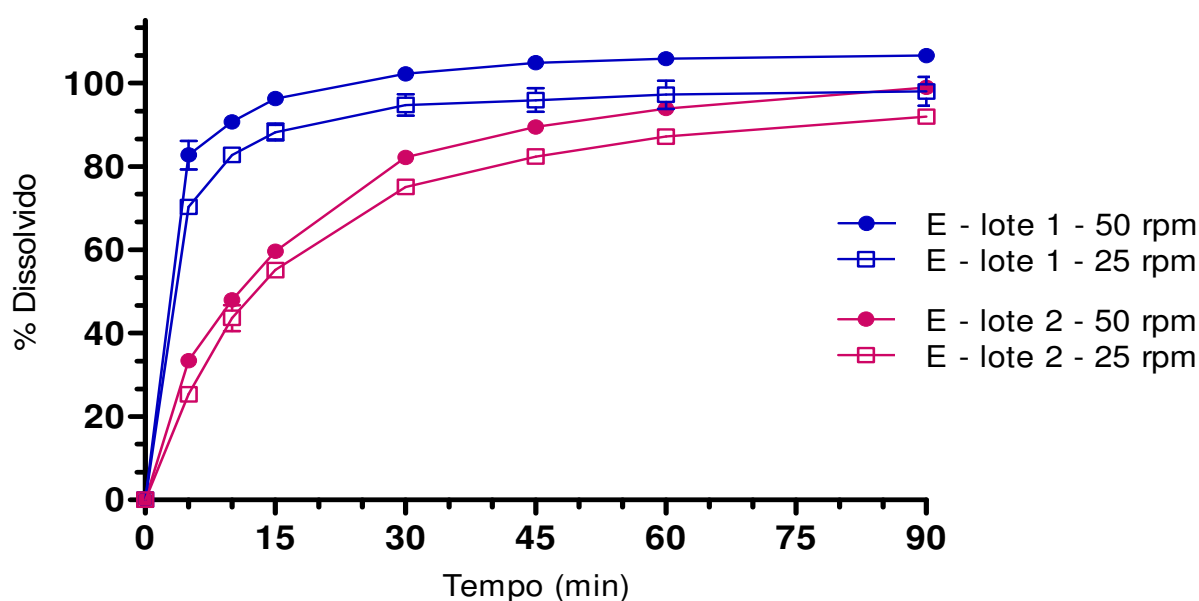


Figura 34. Perfis de dissolução obtidos com diferentes lotes de um mesmo medicamento (E), utilizando meio tampão fosfato de sódio contendo lauril sulfato de sódio a 0,1%, e velocidade de agitação do meio de 25 e 50 rpm.

De acordo com o apresentado na figura 34 e na tabela 27, é observado que o lote 1 do medicamento E apresenta maior velocidade de dissolução do DB a partir da suspensão injetável em ambas as velocidades de agitação apresentando valores de f_1 e f_2 fora da faixa especificada para perfis de dissolução semelhantes, isso é

devido ao fato de que este lote 1 possui um tamanho médio de partícula menor, sendo igual a 7,43 μm , enquanto que o lote 2 apresenta tamanho médio de partícula maior de 18,06 μm . Observa-se que de acordo com a moda, o tamanho de partícula com maior frequência para o lote 1 é de 5,91 μm e de 18,78 μm para o lote 2, assim, os valores encontrados para o lote 1 também justificam a ocorrência de maior velocidade de dissolução do DB a partir do medicamento E lote 1.

A velocidade de agitação de 50 rpm em comparação com a velocidade de 25 rpm, proporciona maior hidrodinâmica no meio de dissolução, promovendo uma dissolução inicial maior para os lotes 1 e 2, e também, é alcançado um percentual maior de fármaco dissolvido utilizando esta velocidade. Os valores de f_1 e f_2 apresentados na tabela 27 demonstram que para um mesmo lote do medicamento E quando submetido a diferentes velocidades de 25 e 50 rpm, os perfis de dissolução resultantes não são diferentes e apresentam semelhança.

Tabela 27. Análise comparativa dos perfis de dissolução pelo modelo independente, f_1 e f_2

Comparação	Análise do perfil de dissolução	
	f_1 (%)	f_2 (%)
E1 x E2 (25 rpm)	30,33	26,28
E1 x E2 (50 rpm)	52,47	22,60
E1 – 25 x 50 rpm	10,63	51,80
E2 – 25 x 50 rpm	9,31	59,24

Através da figura 34, também é possível observar que diferentes lotes de um mesmo medicamento promovem diferentes perfis de dissolução do fármaco DB a partir da suspensão injetável, logo, as condições empregadas no ensaio de dissolução tornam-se adequadas para avaliar o perfil de dissolução deste fármaco em diferentes formulações presentes no mercado. O método de dissolução *in vitro* aplicado demonstrou ter poder discriminatório adequado para avaliar suspensões com diferentes características.

Os resultados obtidos nos ensaios de dissolução *in vitro* com diferentes produtos estão representados graficamente na figura 35, e os percentuais dissolvidos estão descritos na tabela 28.

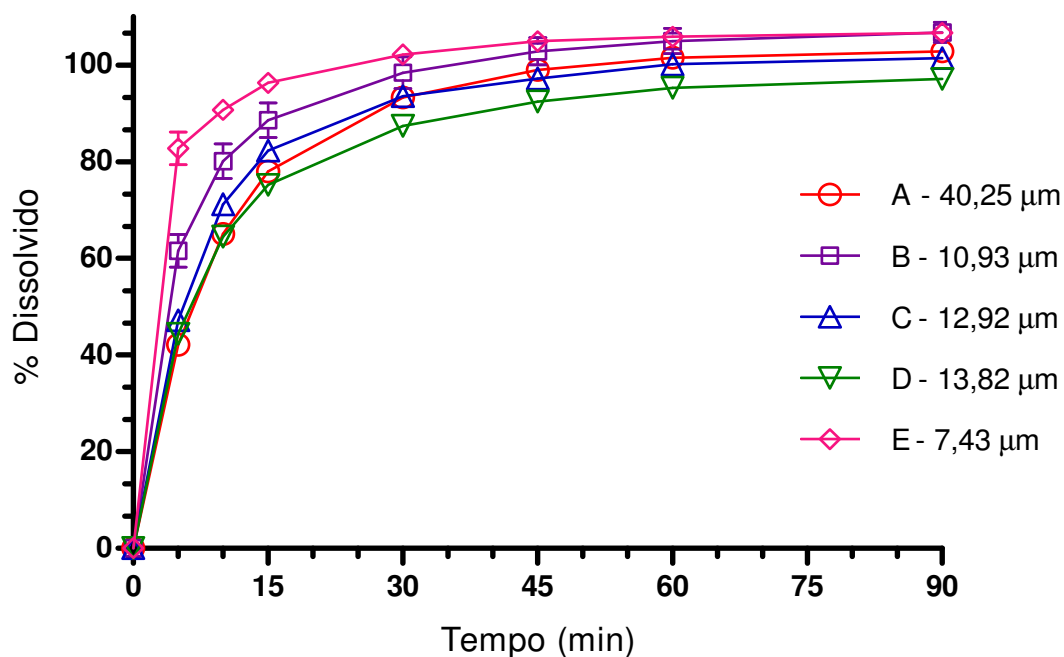


Figura 35. Perfis de dissolução do DB obtidos com os produtos A, B, C, D e E, em meio tampão fosfato de sódio contendo lauril sulfato de sódio a 0,1%, utilizando velocidade de agitação de 50 rpm.

A figura 35 demonstra o comportamento de liberação do DB das cinco diferentes formulações. O produto A, C e D, apesar das diferentes médias de tamanho de partícula, apresentaram perfis de dissolução semelhantes. O produto B e principalmente o produto E, apresentaram perfis de dissolução significativamente diferentes aos outros produtos analisados, demonstrando maior velocidade de dissolução do fármaco DB.

Tabela 28. Percentual dissolvido de DB após ensaio de dissolução *in vitro*, tamanho médio de partícula e Span nos diferentes produtos

Tempo (min)	Média do percentual de DB dissolvido (% \pm DPR)				
	Produto A	Produto B	Produto C	Produto D	Produto E
5	42,16 \pm 6,56	61,53 \pm 13,58	47,17 \pm 3,16	44,39 \pm 8,81	82,13 \pm 7,16
10	65,01 \pm 5,90	80,07 \pm 10,90	71,18 \pm 3,56	64,45 \pm 6,09	90,69 \pm 1,69
15	77,96 \pm 4,59	88,58 \pm 9,82	82,30 \pm 3,54	75,18 \pm 5,65	96,25 \pm 1,74
30	93,23 \pm 4,22	98,43 \pm 8,25	93,51 \pm 3,85	87,43 \pm 4,67	102,18 \pm 1,44
45	98,96 \pm 4,16	102,83 \pm 6,68	97,24 \pm 3,89	92,42 \pm 5,00	104,91 \pm 1,36
60	101,49 \pm 4,13	104,94 \pm 6,11	100,12 \pm 4,31	95,26 \pm 5,41	105,85 \pm 0,57
90	102,83 \pm 4,23	106,71 \pm 4,82	101,41 \pm 5,02	97,09 \pm 5,33	106,65 \pm 1,07
Tamanho Partícula	40,25 μ m	10,93 μ m	12,92 μ m	13,82 μ m	7,43 μ m
Span	6,04	2,87	1,53	1,95	1,98

A comparação entre dois produtos considerados similares deve possuir f_1 menor que 15 e f_2 maior que 50, lembrando que os dois medicamentos devem ser submetidos às mesmas condições de ensaio e com os mesmos tempos de coleta. A sensibilidade do teste diminui fortemente no caso de vários resultados quando comparados na zona de convergência, ou seja, no platô da curva, por isso é necessário que as amostragens sejam feitas entre 30 e 65% do percentual dissolvido, pois quando as duas formulações comparadas apresentarem percentual de dissolução superior a 80%, em 15 minutos, f_1 e f_2 perdem seu poder discriminativo (STORPIRTS *et al*, 2009; BRASIL, 2010).

Para expressar matematicamente as diferenças entre os perfis de dissolução obtidos com o ensaio *in vitro*, foram utilizados como ferramenta os fatores f_1 e f_2 denominados, fator de diferença e semelhança, respectivamente, na qual os valores encontrados estão apresentados na tabela 29.

Tabela 29. Análise comparativa dos perfis de dissolução pelo modelo independente, f_1 e f_2

Comparação entre Produtos	Análise do perfil de dissolução	
	f_1 (%)	f_2 (%)
A x B	18,04	43,24
A x C	4,47	68,61
A x D	4,09	72,37
A x E	33,56	29,18
B x C	11,71	51,36
B x D	18,57	43,01
B x E	11,62	44,92
C x D	7,04	61,78
C x E	26,40	32,98
D x E	31,02	30,62

f_1 = fator de diferença (0 – 15%);
 f_2 = fator de semelhança (50 – 100%)

De acordo com as análises de tamanho de partícula apresentadas anteriormente na tabela 20 e na figura 20, observa-se que o produto A apresenta uma distribuição de tamanho de partícula bimodal, assim, apresenta tamanho médio de partícula de 40,25 μm e a moda é de 14,86 μm . O tamanho médio apresentado pelo produto C é de 12,92 μm e pelo produto D de 13,82 μm , e a moda apresentada é de 12,94 e 14,25 μm , respectivamente. Mesmo com diferenças no tamanho médio das partículas, os perfis de dissolução para os produtos A, C e D são semelhantes apresentando valores de $f_2 \gg 50$ (tabela 29). A obtenção de perfis de dissolução semelhantes entre o produto A comparativamente com os produtos C e D pode ser atribuída ao alto índice de polidispersibilidade apresentado pelo produto A, Span igual a 6,04, na qual permite que os valores de D10 e D50 sejam próximos entre os três produtos, promovendo perfis de dissolução semelhantes entre os produtos. A semelhança entre os perfis de dissolução dos três produtos também é justificada através dos valores encontrados para o tamanho de partícula com maior frequência (moda) a qual apresentam valores aproximados entre os produtos.

A alta velocidade de dissolução do produto E comparado aos outros produtos, é explicada pelos baixos valores apresentados no tamanho médio de partícula de

7,43 μm , no valor de moda de 5,91 μm , e também pelos valores de D10 de 1,25 μm e D90 de 11,55 μm . Assim, o diâmetro máximo que 90% das partículas desta formulação E apresentam é inferior aos valores de tamanho médio de partícula e valores de moda para os produtos A, C e D. Estes baixos valores encontrados para o produto E são responsáveis por aumentar a área superficial da partícula em contato com o meio de dissolução promovendo, assim, uma velocidade de dissolução inicial rápida do DB a partir da suspensão.

O produto B, assim como o E, também apresenta uma velocidade de dissolução maior que os outros produtos, na qual também é explicada por apresentar um tamanho médio de 10,93 μm e moda de 7,80 μm , a qual são valores menores que os encontrados para A, C e D. Os valores baixos de D10 e D90, de 1,12 e 16,07 μm , respectivamente, também justificam a apresentação de uma taxa de dissolução inicial maior que os produtos A, C e D, cujos valores aproximam-se dos percentuais obtidos com o produto E.

Analisando os dados apresentados na tabela 29, podemos observar que, de acordo com o modelo matemático aplicado, o produto E em comparação com os demais produtos apresenta valores de f_1 e f_2 fora dos limites especificados para ambos os fatores, demonstrando que o perfil de dissolução obtido pelo produto E é diferente e não possui semelhanças com os perfis de dissolução dos demais produtos.

O produto B que também apresentou uma taxa de dissolução maior em relação aos produtos A, C e D, também apresenta valores de f_1 e f_2 fora dos limites especificados em relação aos produtos A e D, demonstrando que os perfis de dissolução são diferentes e não possuem semelhanças. Quando comparado ao produto C, verifica-se que o valor de $f_2 = 51,36$ está próximo ao valor limite especificado ($f_2 = 50$) para fator de semelhança.

Os perfis de dissolução dos produtos foram analisados estatisticamente através da análise estatística empregando-se o teste *One-way* ANOVA pelo método de múltiplas comparações de Tukey, e os resultados estão apresentados na tabela 30.

Tabela 30. Tratamento estatístico (one way Anova – Teste de Tukey) dos resultados obtidos nos estudos de dissolução in vitro nos produtos A, B, C, D e E, considerando significativo para $P < 0,05$

Comparação entre produtos	Significância $P < 0,05$
A x B	$P > 0,05$
A x C	$P > 0,05$
A x D	$P > 0,05$
A x E	$P < 0,05^{***}$
B x C	$P > 0,05$
B x D	$P < 0,05^{**}$
C x D	$P > 0,05$
C x E	$P > 0,05$
C x E	$P < 0,05^{**}$
D x E	$P < 0,05^{***}$

** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Os resultados estatísticos apresentados na tabela 30 corroboram com os resultados obtidos com a aplicação da ferramenta matemática dos fatores de diferença e semelhança (f_1 e f_2) apresentados na tabela 29.

A comparação entre os produtos A x E, e entre os produtos D x E demonstram que os perfis de dissolução do fármaco são significativamente diferentes com $P < 0,001$. Na comparação dos perfis de dissolução dos produtos B x D e de C x E, foi observado que estes perfis de dissolução são significativamente diferentes com $P < 0,01$.

O produto B que também apresentou uma taxa de dissolução maior em relação aos produtos A, C e D, também apresenta valores de f_1 e f_2 fora dos limites especificados em relação aos produtos A e D, demonstrando que os perfis de dissolução são diferentes e não possuem semelhanças. Quando comparado o produto B ao produto C, verifica-se que o valor de $f_2 = 51,36$ está próximo ao valor limite especificado ($f_2 = 50$) para o fator que determina a semelhança entre os perfis.

Os produtos A e C foram escolhidos para a realização de ensaios de dissolução utilizando velocidade de agitação de 25 rpm. Esta análise teve o intuito de verificar se a redução na velocidade de agitação do meio de dissolução de 50 para 25 rpm iria proporcionar um poder de discriminação maior quando suspensões com diferentes tamanhos médios de partícula fossem comparadas. Os resultados obtidos neste ensaio estão apresentados na figura 36 e os percentuais dissolvidos estão apresentados na tabela 31.

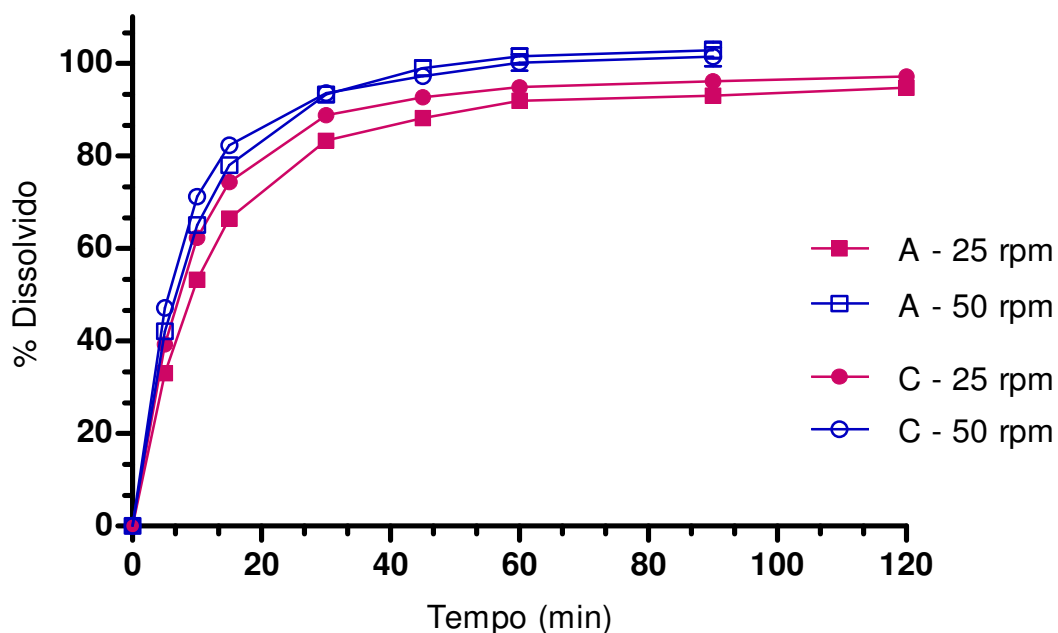


Figura 36. Perfis de dissolução do DB obtidos com os produtos A e C, em meio tampão fosfato de sódio contendo lauril sulfato de sódio a 0,1%, utilizando velocidade de agitação de 25 e 50 rpm.

Tabela 31. Percentual dissolvido de DB dos produtos A e C obtidos nos ensaio de dissolução *in vitro* utilizando velocidade de agitação de 25 e 50 rpm

Tempo (min)	Média do percentual de DB dissolvido (% \pm DPR)			
	Velocidade de agitação 25 rpm		Velocidade de agitação 50 rpm	
	Produto A	Produto C	Produto A	Produto C
5	33,05 \pm 8,27	39,31 \pm 4,58	42,16 \pm 6,56	47,17 \pm 3,16
10	53,20 \pm 5,05	62,25 \pm 0,98	65,01 \pm 5,90	71,18 \pm 3,56
15	66,39 \pm 2,34	74,31 \pm 2,34	77,96 \pm 4,59	82,30 \pm 3,54
30	83,31 \pm 0,91	88,73 \pm 2,63	93,23 \pm 4,22	93,51 \pm 3,85
45	88,17 \pm 0,93	92,65 \pm 2,94	98,96 \pm 4,16	97,24 \pm 3,89
60	91,94 \pm 1,16	94,79 \pm 3,35	101,49 \pm 4,13	100,12 \pm 4,31
90	92,97 \pm 1,60	96,11 \pm 2,45	102,83 \pm 4,23	101,41 \pm 5,02
120	94,77 \pm 1,56	97,12 \pm 3,05	--	--

De acordo com os resultados apresentados na figura 36 e na tabela 31, foi observado que ocorre uma redução na velocidade de dissolução do DB quando foi reduzida a velocidade de agitação para 25 rpm. Essa redução na velocidade de dissolução nos tempos iniciais é mais pronunciada no produto A, na qual apresenta maior tamanho médio de partícula.

A análise estatística dos perfis de dissolução de A e C utilizando diferentes velocidades de agitação (25 e 50 rpm) está representada na tabela 32.

Tabela 32. Análise comparativa dos perfis de dissolução obtidos com os produtos A e C utilizando velocidade de agitação de 25 e 50 rpm, através do modelo independente f_1 e f_2 , e tratamento estatístico One-way Anova – Teste de Tukey, considerando significativo para $P < 0,05$

Comparação	f_1 (%)	f_2 (%)
A x C (25 rpm)	10,83	56,63
A - 25 rpm x A - 50 rpm	15,24	48,50
C - 25 rpm x C - 50 rpm	10,05	55,90

Comparação	One-way ANOVA - Teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)
A x C (25 rpm)	$P < 0,05^{**}$
A x C (50 rpm)	$P > 0,05$
A 25 rpm x A 50 rpm	$P < 0,05^{***}$
C 25 rpm x C 50 rpm	$P < 0,05^{***}$

** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

De acordo com os resultados apresentados na tabela 32, podemos observar que o produto A, o qual apresenta tamanho médio de partícula maior ($40,25 \mu\text{m}$) que o produto C ($12,92 \mu\text{m}$), sofre variação significativa no seu perfil de dissolução quando a velocidade de agitação foi reduzida de 50 para 25 rpm. Os valores de f_1 e f_2 encontram-se fora dos limites especificados para ambos os fatores, demonstrando que o perfil de dissolução obtido com produto A na velocidade de agitação de 25 rpm é diferente e não possui semelhanças com o perfil de dissolução obtido com o produto na velocidade de 50 rpm.

Os perfis de dissolução do produto C obtidos com as velocidades de 25 e 50 rpm são significativamente diferentes com $P < 0,001$, porém apresentam valores de f_1 e f_2 dentro dos limites especificados, sugerindo que não há diferença entre os perfis, e estes são semelhantes. Vale ressaltar que os valores de f_2 , a qual indicam semelhança entre os perfis, encontram-se próximos ao limite mínimo especificado de 50.

Na comparação entre os produtos A e C utilizando velocidade de agitação de 25 rpm, os resultados apresentados na tabela 32 demonstram diferenças nos percentuais liberados, porém, os fatores f_1 e f_2 sugerem que não há diferença entre os perfis, sendo estes semelhantes. Contudo, através da análise de variância com

nível de significância de $P < 0,01$ sugerem que os perfis de dissolução dos produtos A e C são significativamente diferentes.

5 CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

- Uma metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvida para a quantificação simultânea dos fármacos FB e DB, a qual foi validada, demonstrando ser linear, precisa, seletiva, exata, robusta e eficiente na separação e quantificação dos fármacos nas diferentes suspensões injetáveis comercialmente disponíveis. Este método torna-se uma ferramenta para o controle de qualidade destes produtos.
- A análise da distribuição do tamanho de partícula nas suspensões demonstrou que os produtos apresentam uma variabilidade nos tamanhos médios de partícula. Diferentes lotes de um mesmo medicamento também apresentaram diferentes tamanhos médios de partícula. O tamanho de partícula foi determinante nos perfis de dissolução obtidos para as suspensões comerciais de betametasona.
- A validação do método analítico para a quantificação do DB nos ensaios de dissolução *in vitro* demonstrou que o método é linear, preciso, seletivo e exato para a quantificação do fármaco DB em baixas concentrações obtidas com as amostras coletadas durante os diferentes tempos nos ensaios de dissolução *in vitro*, sendo considerada adequada para os devidos fins.
- Os estudos de dissolução *in vitro* mostraram que tamanhos de partículas menores promovem um aumento na velocidade de dissolução do DB. Verificou-se que não apenas o tamanho médio das partículas influencia na velocidade de dissolução, mas também o índice de polidispersibilidade (Span) das partículas.
- Diferentes velocidades de agitação empregadas nos ensaios podem gerar diferentes taxas de dissolução do fármaco. A velocidade de agitação de 25 rpm se mostrou mais adequada, pois mostrou maiores diferenças nas velocidades de dissolução do DB frente a diferentes produtos contendo diferentes tamanhos médios de partícula. Entretanto, a velocidade de 50 rpm promove uma dissolução inicial maior, podendo reduzir o poder discriminatório do método.

- O método de dissolução *in vitro* utilizando tampão fosfato de sódio 0,1 M contendo lauril sulfato de sódio a 0,1%, velocidade de agitação de 25 rpm, apresentou poder discriminatório capaz de caracterizar os perfis de dissolução do DB a partir de suspensões injetáveis, sugerindo sua utilização como ferramenta no controle de qualidade destas suspensões injetáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU, H.M. Dissolution. In: MISCHER, A. **Remington: The Science and Practice of Pharmacy**. 19 ed. v.1, Easton: Mack Publishing Company, 1995.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, L.V. **Formas farmacêuticas: considerações biofarmacêuticas**. In:___ Farmacotécnica formas farmacêuticas e sistema de liberação de fármacos. 6. ed. Editorial Premier, 2000.

AULTON. M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. In:___ Dissolução e solubilidade. 2.ed. Artmed Editora S.A., 2005.

BALLARD, B. E.; NELSON, E. Physicochemical properties of drugs that control absorption rate after subcutaneous implantation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, p. 120-135, 1962.

BECLONATO®, medicamento similar. Bula: Roberta Costa e Sousa, Laboratório Ducto Indústria Farmacêutica LTDA, Anápolis/GO, 2011.

BISRAT, M.; NYSTRÖM, C. Physicochemical aspects of drug release. VIII. The relation between particle size and surface specific dissolution rate in agitated suspensions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 47, n. 1-3, p. 223-231, nov. 1988.

BRASIL, **Resolução nº 482**, de 19 de março de 2002. Guia para estudos de correlação *in vivo -in vitro*. Diário Oficial da União, Brasília, 20 de março de 2002.

BRASIL. **Resolução nº 899**, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 02 de junho de 2003.

BRASIL. **Resolução nº 31**, de 11 de agosto de 2010. Guia para realização do estudos de equivalência farmacêutica e de perfil de dissolução comparativo. Diário Oficial da União, Brasília, 12 de agosto de 2010.

BROWN, C. K.. Dissolution Method Development: An Industry Perspective. In: DRESSMAN, J.; KRÄMER, J. **Pharmaceutical Dissolution Testing**. Boca Raton: Taylor e Francis, Florida, 2005.

BURGESS, D. J. **Injectable Dispersed Systems: Formulation, Processing, and Performance**. Boca Raton: Taylor e Francis, 2005.

BUCKWALTER, F. H.; DICKINSON, H. L, 1958 *appud* BURGESS, D. J. **Injectable Dispersed Systems: Formulation, Processing, and Performance**. Boca Raton: Taylor e Francis, 2005.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Editora Artmed: Porto Alegre, 2004.

CHO, S. B.; NAKANISHI, K.; KOKUBO, T.; SOGA, N.; OHTSUKI, C.; NAKAMURA, T. Apatite formation on silica gel in simulated body fluid: its depended on structures of silica gels prepared in different media. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 33, p. 145-151, 1996.

CLARK, B. C.; DICKINSON, P. A.; PYRAH, I. T. In Vitro=In Vivo Release from Injectable Dispersed Systems. In: BURGESS, D. J. **Injectable Dispersed Systems: Formulation, Processing, and Performance**. Boca Raton: Taylor e Francis, 2005.

COLZONE, S. D.; BROWN, R. F.; DAY, D. E.; EHRHARDT, G. J. In vitro and in vivo dissolution behavior of a dysprosium lithium borate glass designed for the radiation synovectomy treatment of rheumatoid arthritis. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 60, n. 2, p. 260-268, mai., 2002.

CRAIG, C.R.; STITZEL, R. E. **Modern Pharmacology with Clinical Applications**, 4. ed. Rio de Janeiro, 1996.

CRIST, G. B. Trends in Small-Volume Dissolution Apparatus for Low-Dose Compounds. **Dissolution Technologies**, Fev., 2009.

DIPROSPAN ®, medicamento referência. Bula: Lucia Lago Hammes, Mantecorp Indústria Química e Farmacêutica LTDA, Rio de Janeiro, 2011.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5ed. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, 2010.

FERRANTE, M. G.; RUDY, B. C. Betamethasone Dipropionate In: FLOREY, K. **Analytical Profiles of Drugs Substances**. Academic Press, New York, v. 6, p. 43-60; 1977.

FONSECA, L. B.; LABASTIE, M.; SOUSA, V. P.; VOLPATO, N. M. Development and validation of a discriminative dissolution test for nimesulide suspension. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 4, dez. 2009.

GENNARO, A. R. **Remington: A ciência e a prática da farmácia**. 20 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

GIKA, H. G.; Papadoyannis, I. N. **Enciclopedia of Chromatography**, Third Edition. Outubro, 2009.

GIL, E. S. **Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos**. 2 ed. Pharmabooks: São Paulo, 2007.

GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro, 2005.

GRAY, V. A. Compendial Testing Equipment: Calibration, Qualification, and Sources of Error. In: DRESSMAN, J.; KRÄMER, J. **Pharmaceutical Dissolution Testing**. Boca Raton: Taylor e Francis, Florida, 2005.

GROTH, L.; JORGENSEN, A. In vitro microdialysis of hydrophilic and lipophilic compounds. **Analytica Chimica Acta** 355, p. 75-83, 1997.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Saunders Elsevier, 11 ed., 384 – 384t, 2006.

HANSON, R.; GRAY, V. **Handbook of Dissolution Testing**. 3 ed. Dissolution Technologies Incorporated, USA, 199 p., 2004.

ICH - International Conference on Harmonization; *Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology*, 1996.

JIAO, J.; BURGESS, D. J. Characterization and Analysis of Dispersed Systems. In: BURGESS, D. J. **Injectable Dispersed Systems: Formulation, Processing, and Performance**. Boca Raton: Taylor e Francis, 2005.

KRÄMER, J.; GRADY, L. T.; GAJENDRAN, J. Historical Development of Dissolution Testing. . In: DRESSMAN, J.; KRÄMER, J. **Pharmaceutical Dissolution Testing**. Boca Raton: Taylor e Francis, Florida, 2005.

KEDOR-HACKMANN, E. R.; GIANOTTO, E. A.; SANTORO, M. I. Determination of betamethasone dipropionate and salicylic acid in pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n.6, p. 553-5, jun.,1998.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H.. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

LINDENBERG, M.; WIEGAND, C.; DRESSMAN, J. B. Comparison of the adsorption of several drugs to typical filter materials. **Dissolution Technologies**, p. 22-25, fev., 2005.

LIU, J.; MA, M.; CHOW, S. Statistical Evaluation of Similarity Factor f_2 as a Criterion for Assessment of Similarity between Dissolution Profiles. **Drug Information Journal**, 31:1255-1271, 1997.

LÖBENBERG, R.; KRÄMER, J.; SHAH, V. P. et al. Dissolution Testing as a Prognostic Tool for Oral Drug Absorption: Dissolution Behavior of Glibenclamide. **Pharmaceutical Research**, 17(4):439-444, 2000.

LU, J.; WEI, Y.; RUSTUM, A. M. A stability-indicating reversed-phase high performance liquid chromatography method for simultaneous assay of two corticosteroids and estimation of their related compounds in a pharmaceutical injectable formulation. **Journal of Chromatography A**, 1217(44), p. 6932-41, out., 2010.

MARQUES, M. R. C.; BROWN, W. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. **Revista Analytica**, n. 1, p. 48-51, 2002.

MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B. **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons**. 3 ed., vol. 2, 2004.

MOSHARRAF, M.; NYSTRÖM, C. The effect of particle size and shape on the surface specific dissolution rate of micro-sized practically insoluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 122, p. 35-47, jan. 1995.

NAIL, S. T.; STICKELMEYER, M. P. Coarse Suspensions: Design and Manufacturing. In: BURGESS, D. J. **Injectable Dispersed Systems: Formulation, Processing, and Performance**. Boca Raton: Taylor e Francis, 2005.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.; **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**, 2ª ed., Unicamp: São Paulo, 2003.

OUSSOREN, C.; TALSMA, H.; ZUIDEMA, J.; KADIR, F. Biopharmaceutical Principles of Injectable Dispersed Systems. In: BURGESS, D. J. **Injectable Dispersed Systems: Formulation, Processing, and Performance**. Boca Raton: Taylor e Francis, 2005.

PARFITT, K. **MARTINDALE**: The complete drug reference. 32 ed. 1999.

PATEL, R. M. Parenteral suspension: an overview. **International Journal of Current Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 3, 2010.

PILLAY, V.; FASSIHI, R. Unconventional Dissolution Methodologies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 88(9):843-851, 1999.

POLLI, J. E.; REKHI, G. S.; SHA, V. P. Methods to compare dissolution profiles. **Drug Information Journal**, Philadelphia, v. 30, p. 1113-20, 1996.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGANO, R. M. R. **Tecnologia Farmacêutica**. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2000.

RAWLE, A. *Basic principles of particle size analysis*. Disponível em: <<http://www.malvern.co.uk>>. Acesso em: 17/05/2011.

SAMTANI, M. N.; SCHWAB, M.; NATHANIELSZ, P. W.; JUSKO, W. J. Stabilization and HPLC analysis of betamethasone sodium phosphate in plasma. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n.3, p. 726-732, mar., 2004.

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.

SCAFI, S. H. F.; PASQUINI, C. Avaliação do uso da espectroscopia no infravermelho próximo na identificação de medicamentos. Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas: 23^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Calda, MG, <http://www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/0453/index.html>, 2000.

SCHELLACK, G. **Farmacologia: Uma abordagem didática**. São Paulo, 2006.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57–66, 2003.

SHAH, V. P. The Role of Dissolution Testing in the Regulation of Pharmaceuticals: The FDA Perspective. In: DRESSMAN, J.; KRÄMER, J. **Pharmaceutical Dissolution Testing**. Boca Raton: Taylor e Francis, Florida, 2005.

SHOU, M.; GALINADA, W. A.; WEI, Y. C.; TANG, Q.; MARKOVICH, R. J.; RUSTUM A. M. Development and validation of a stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of salicylic acid, betamethasone dipropionate and their related compounds in Diprosalic Lotion. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, n. 3, p. 356-361, 2009.

SIEWERT, M.; DRESSMAN, J.; BROWN, C. K.; SHAH, V. P. **FIP/AAPS Guidelines to dissolution / in vitro release testing of novel / special dosage forms**. AAPS PharmSciTech, Jan. 2003.

SILVA, R. L.; VOLPATO, N. M. Meios para dissolução de comprimidos de nimesulida: ação dos tensoativos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 2, p. 163-172, 2002.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**, 5^a Ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1994.

SIMÕES, S.; SOUSA, A.; FIGUEIREDO, M. Dissolution rate studies of pharmaceutical multisized powders – a practical approach using the Coutler method. **International Journal of Pharmaceutics**, v 127, p. 283-291, 1996.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2 ed. Wiley - Interscience, 765 p., 1997.

SOUSA, J.; FREITAS, Z. M., STORPIRTS, S. Modelos in vitro para a determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, out./dez., 2007.

STORPIRTS, S.; CONSIGLIERI, V. O. Biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos: aspectos fundamentais para o planejamento e execução de estudos. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 31, n. 2, p. 63-70, 1995.

STORPIRTS, S.; OLIVEIRA, P. G.; RODRIGUES, D.; MARANHO, D. Considerações biofarmacotécnicas para a fabricação de medicamentos genéricos: fatores que afetam a dissolução e a absorção de fármacos. **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas**, v.35, p. 1-16, 1999.

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

U.S.FDA. Guidance for industry. Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms. Disponível em: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm064964.htm>. Acesso em: novembro de 2010. p. 14, 1997.

U.S.FDA. Dissolution Methods for Drug Products Database, 2011. U.S. Food and Drug Administration: Department of Health and Human Services. Disponível em: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_SearchResults_Dissolutions.cfm?PrintAll=1 Acesso em junho, 2011.

USP - UNITED STATES PHARMACOPEIA. 33th ed. NF-28, Supp. 1. Rockville: U.S.P. Convention, 2010.

USP - UNITED STATES PHARMACOPEIA. 34th ed. NF-29, Supp. 1. Rockville: U.S.P. Convention, 2011.

ZUDEIMA, J.; PIETERS, F. A. J. M.; DUCHATEAU, G. S. M. J. E. Release and absorption rate aspects of intramuscularly injected pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 47, n1-3, p. 1-12, nov., 1988.

YUKSEL, N.; KANIK, A. E.; BAYKARA, T. Comparasion of in Vitro Dissolution Profiles by ANOVA-based, Model-dependent and-independent Methods. **International Journal of Pharmaceutics**, 209:57-67, 2000.