



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO DE
SUSPENSÕES DE BENZOILMETRONIDAZOL E PERFIL DE DISSOLUÇÃO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aline Santos da Silva

Uruguaiana, RS, Brasil.

2014

ALINE SANTOS DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO DE
SUSPENSÕES DE BENZOILMETRONIDAZOL E PERFIL DE DISSOLUÇÃO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Fabiana Ernestina Barcellos da Silva

Uruguiana

2014

Aline Santos da Silva

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO DE
SUSPENSÕES DE BENZOILMETRONIDAZOL E PERFIL DE DISSOLUÇÃO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Área de Concentração:
Desenvolvimento e controle de
qualidade de fármacos, medicamentos e
cosméticos.**

Dissertação defendida e aprovada em 11 de julho de 2014.

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Fabiana Ernestina Barcellos da Silva
Orientadora

Prof. Dr. Marcelo Donadel Malesuik
UNIPAMPA

Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Gomes
UNIFRA

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo a Deus, pela vida e oportunidades que me foram concedidas.

Ao meu grande amor e incentivador Fávero, pelo carinho, apoio e paciência em todos os momentos.

Ao meu filho Gabriel pelo amor e por me dar forças mesmo sem saber.

Aos meus pais, Mario e Jeani, pelo carinho, apoio e incentivo aos estudos.

Aos meus irmãos, Ana e Anderson, pela amizade e torcida.

À professora Fabiana pela oportunidade, orientação, incentivo e amizade.

Ao Carlos Eduardo pela dedicação e colaboração na realização da parte experimental deste trabalho.

Agradeço à UNIPAMPA pela oportunidade de estudo e crescimento profissional.

Aos professores e colegas do LDCQ pelo apoio e amizade.

A todos os professores do Curso de Farmácia pelo incentivo e em especial aos professores do PPG Ciências Farmacêuticas pelos ensinamentos transmitidos.

Às colegas de pós-graduação, Camila Guez, Camila Krüger, Cristina, Fernanda, Marí, Roselaine e Patrícia pela amizade e convívio.

Ao prof. Dr. Érico Flores da UFSM pela disponibilização dos equipamentos e realização das análises de Infravermelho e LC/MS-MS.

À Simone Machado Vieira do Grupo de pesquisa em Nanobiotecnologia e Nanotoxicofarmacologia agradeço pela realização das análises de tamanho de partícula.

Ao Felipe Ferrarini pelo auxílio na realização das análises de avaliação reológica.

À Prati-Donaduzzi pela doação da matéria-prima de Benzoilmetronidazol.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta dissertação.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO DE SUSPENSÕES DE BENZOILMETRONIDAZOL E PERFIL DE DISSOLUÇÃO.

O benzoilmetronidazol é um éster insolúvel do metronidazol e é indicado para o tratamento de infecções causadas por bactérias anaeróbias e por protozoários. Este fármaco apresenta como potenciais produtos de degradação o metronidazol e o ácido benzóico e encontra-se disponível na forma farmacêutica suspensão oral. Esse tipo de medicamento pode apresentar problemas para sua dissolução que podem influenciar a biodisponibilidade oral do fármaco. Até o momento, não há método de dissolução para o benzoilmetronidazol suspensão oral descrito em compêndios oficiais. Neste trabalho, um método de dissolução para o benzoilmetronidazol em suspensão oral foi desenvolvido e validado. No desenvolvimento do método, perfis de dissolução em diferentes meios e velocidade de agitação foram avaliados. As condições do teste de dissolução selecionadas foram o aparato pá, velocidade de 50 rpm e meio fluido gástrico (sem pepsina), o que possibilitou diferenciar formulações de suspensões orais distintas. O método de dissolução mostrou ser específico, linear, preciso, exato e robusto para a condição avaliada. Um método indicativo de estabilidade para o benzoilmetronidazol em suspensão oral por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi desenvolvido e validado e foi utilizado para a quantificação das amostras provenientes do teste de dissolução. As condições otimizadas para o método foram a coluna C18 (150 mm x 4,0 mm, 5 µm), fase móvel composta de ácido o-fosfórico 0,1 % pH 3,0 e metanol na proporção 50:50 (v/v), fluxo de 1,0 ml/min, em sistema isocrático. Este método possibilitou a determinação do fármaco na presença dos produtos de degradação. Os perfis de dissolução comparativo das suspensões orais de benzoilmetronidazol foram analisados pela determinação do fator de semelhança, f_2 . O modelo de Weibull é o que melhor descreve a cinética de dissolução das suspensões orais. O método de dissolução proposto é adequado para o controle de qualidade de rotina de benzoilmetronidazol em suspensão oral e para a comparação dos perfis de dissolução de diferentes formulações comerciais.

Palavras-chave: Benzoilmetronidazol, suspensão oral, teste de dissolução, validação.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF BENZOYLMETRONIDAZOLE SUSPENSIONS DISSOLUTION METHOD AND DISSOLUTION PROFILE.

The benzoylmetronidazole is an insoluble ester of metronidazole, and it is indicated for the treatment of infectious disease caused by anaerobic bacteria and protozoa. This drug shows two potential degradation products, such as metronidazole and benzoic acid. Nowadays, there is no official monograph described for benzoylmetronidazole oral suspension, and this drug can show problems for its dissolution that may to influence the drug oral bioavailability. In this study, a dissolution method for benzoylmetronidazole oral suspension was developed and validated. To develop the method, the dissolution profiles in different medium and stirring speed were evaluated. The best dissolution conditions were paddle at 50 rpm stirring speed, gastric fluid medium (without pepsin), which allowed differentiate the diverse suspensions. The method was validated and shown to be specific, linear, precise, accurate and robust for the condition evaluated. A stability indicating method for the benzoylmetronidazole oral suspension by high performance liquid chromatography (HPLC) was developed and validated, and used for quantification of samples taken from the dissolution test. The conditions for the method were C18 (150 mm x 4,0 mm, 5 μ m) column, mobile phase consisting of o-phosphoric acid 0,1% pH 3,0 and methanol (50:50 v/v) at a flow rate of 1,0 ml/min, using a isocratic elution. Benzoylmetronidazole was determined in the presence of degradation products using these analyses. The comparative dissolution profiles of benzoylmetronidazole oral suspensions were analyzed using the similarity factor, f_2 . The Weibull model describes the dissolution kinetics the suspensions in study. The dissolution method is suitable for routine quality control of benzoylmetronidazole oral suspensions and comparison of dissolution profiles of different commercial formulations.

Keywords: Benzoylmetronidazole, oral suspension, dissolution test, validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química dos compostos: (A) BMZ (B) 2-metil-5-nitroimidazol, (C) ácido benzóico e (D) metronidazol.....	23
Figura 2.	Representação da dupla camada elétrica.....	28
Figura 3.	Espectro na região do UV da matéria-prima BMZ na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ em ácido clorídrico 1M.....	70
Figura 4.	Espectro de absorção no IV do BMZ.....	71
Figura 5.	Cromatograma do BMZ obtido por LC-MS/MS para a caracterização da matéria-prima.....	72
Figura 6.	Espectro de massas de BMZ obtido por LC-MS/MS no modo de ionização positiva por eletronebulização para a caracterização da matéria-prima.....	73
Figura 7.	Cromatogramas representativos da condição 7; (1) Solução de BMZ SQR na presença de seus produtos de degradação, MTZ e AB, (2-A) Solução de BMZ SQR e (2-B) solução amostra de BMZ suspensão oral.....	75
Figura 8.	Cromatogramas representativos das soluções (A) amostra simulada de excipientes, (B) amostra de BMZ suspensão oral e (C) BMZ SQR.....	76
Figura 9.	Curva da pureza do pico da amostra de BMZ suspensão oral.....	77
Figura 10.	Cromatogramas da degradação forçada do BMZ SQR após ser submetido à hidrólise ácida em HCl 0,1M em refluxo a 80°C (A) Tempo zero (B) após 4 horas.....	78
Figura 11.	Cromatogramas da degradação forçada do BMZ SQR após ser submetido à hidrólise básica com NaOH 1M em refluxo a 80°C (A) Tempo zero (B) após 4 horas.....	78
Figura 12.	Cromatogramas da degradação forçada do BMZ SQR após ser submetido à oxidação com H_2O_2 10% (A) Tempo zero (B) após 24 horas.....	79
Figura 13.	Cromatogramas da degradação forçada do BMZ SQR após ser submetido à degradação térmica em estufa a 55°C (A) Tempo zero (B) após 24 horas.....	80
Figura 14.	Cromatogramas da degradação forçada do BMZ SQR após ser submetido à exposição à radiação UV a 254 nm (A) Tempo zero (B) após 4 horas.....	80

Figura 15.	Representação gráfica da curva de calibração média de BMZ por CLAE.....	81
Figura 16.	Reograma dos produtos A, B, C, D, E e F.....	88
Figura 17.	Perfil de dissolução do MR de BMZ suspensão oral na velocidade de agitação de 50 rpm, no meio de dissolução HCl 0,01M + 1% de LSS...	91
Figura 18.	Perfil de dissolução do MR de BMZ suspensão oral na velocidade de agitação de 50 rpm, nos meios de dissolução HCL 0,1M; HCl 0,1M + 0,1% LSS; HCl 0,1M + 0,5% LSS; HCl 0,1M + 1% LSS.....	92
Figura 19.	Perfil de dissolução do MR de BMZ suspensão oral na velocidade de agitação de 50 rpm e meios de dissolução HCL 0,1M; HCl 0,1M + 0,1% POL80; HCl 0,1M + 0,5% POL80; HCl 0,1M + 1% POL80.....	93
Figura 20.	Perfil de dissolução do MR de BMZ suspensão oral na velocidade de agitação de 50 rpm e meios de dissolução FG (sem pepsina) e FG (com pepsina).....	94
Figura 21.	Perfil de dissolução do MR de BMZ suspensão oral, na velocidade de agitação de 50 rpm e meio de dissolução Tampão acetato pH 4,5 + 1% LSS.....	95
Figura 22.	Perfil de dissolução dos produtos MR e MT na velocidade de agitação de 50 rpm e meio de dissolução HCl 0,1M.....	96
Figura 23.	Perfil de dissolução dos produtos MR e MT na velocidade de agitação de 50 rpm e meio de dissolução FG (sem pepsina).....	96
Figura 24.	Perfil de dissolução dos produtos MR e MT na velocidade de agitação de 25 rpm e meios de dissolução HCl 0,1M e FG (sem pepsina).....	97
Figura 25.	Perfil de dissolução do MR nas velocidades de agitação de 25 e 50 rpm e meios de dissolução HCl 0,1M e FG (sem pepsina).....	98
Figura 26.	Cromatogramas (A) meio de dissolução FG (sem pepsina); (B) amostra simulada de excipientes; (C) amostra de BMZ suspensão oral e (C) solução de BMZ SQR.....	101
Figura 27.	Curva de calibração média de BMZ representativa da linearidade do método de dissolução.....	102
Figura 28.	Perfil de dissolução dos produtos A, B, C, D, E e F.....	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Principais condições analíticas descritas na literatura para a quantificação de BMZ por CLAE.....	24
Tabela 2.	Características relevantes de alguns modelos matemáticos dependentes.....	38
Tabela 3.	Condições cromatográficas testadas durante o desenvolvimento de método por CLAE para a quantificação de BMZ em suspensão oral....	50
Tabela 4.	Fatores e níveis estabelecidos para o planejamento fatorial 2^3 para avaliação da robustez do método analítico.....	56
Tabela 5.	Delineamento experimental por planejamento fatorial 2^3 para avaliação da robustez do método analítico.....	56
Tabela 6.	Composição dos meios de dissolução.....	60
Tabela 7.	Valores obtidos para a faixa de fusão da matéria-prima BMZ.....	68
Tabela 8.	Percentual de perda de massa por dessecação da matéria-prima BMZ.	68
Tabela 9.	Análise quantitativa de BMZ matéria-prima.....	69
Tabela 10.	Principais frequências obtidas do espectro na região do IV do BMZ...	71
Tabela 11.	Coefficiente de partição do BMZ determinado experimentalmente e por estimativa matemática teórica.....	73
Tabela 12.	Valores experimentais dos parâmetros cromatográficos obtidos com a condição analítica selecionada.....	74
Tabela 13.	Condições estabelecidas para o método de doseamento de BMZ em suspensão oral por CLAE.....	75
Tabela 14.	Análise de variância (ANOVA) para a avaliação da linearidade do método de quantificação de BMZ.....	82
Tabela 15.	Resultados obtidos na quantificação de BMZ na suspensão oral para a avaliação da repetibilidade e precisão intermediária.....	83
Tabela 16.	Resultados da percentagem de recuperação para determinação da exatidão.....	83
Tabela 17.	Parâmetros cromatográficos e teor de BMZ obtidos para avaliação da robustez do método.....	84

Tabela 18.	Resultados do doseamento de BMZ em suspensões orais.....	85
Tabela 19.	Resultados do pH das amostras.....	85
Tabela 20.	Distribuição granulométrica, span e tamanho médio das partículas das suspensões orais de BMZ.....	86
Tabela 21.	Parâmetros reológicos obtidos pelo modelo Herschel-Bulkley dos diferentes produtos de suspensão oral de BMZ.....	89
Tabela 22.	Solubilidade de BMZ nos meios de dissolução avaliados.....	90
Tabela 23.	Resultados do percentual dissolvido de BMZ suspensão oral após a inserção da amostra no meio, com seringa e com o copo de suspensão	99
Tabela 24.	Valores experimentais obtidos na determinação da estabilidade da amostra de BMZ suspensão oral nas condições do teste de dissolução	100
Tabela 25.	Análise de variância (ANOVA) para a avaliação da linearidade do método de dissolução.....	103
Tabela 26.	Resultados da análise da precisão do método de dissolução.....	103
Tabela 27.	Valores experimentais da percentagem de recuperação obtidos na determinação da exatidão do método de dissolução.....	104
Tabela 28.	Resultado do ensaio de dissolução utilizando meio desaerado e sem desaeração, para avaliação da robustez.....	105
Tabela 29.	Percentual de recuperação de BMZ após filtração em papel filtro de faixa preta e filtro de membrana de <i>nylon</i> de 0,45 μm	106
Tabela 30.	Análise comparativa dos perfis de dissolução pelo modelo independente, f_2	107
Tabela 31.	Coefficiente de determinação (R^2) obtidos para o produto A.....	108
Tabela 32.	Coefficiente de determinação (R^2) e parâmetros de Weibull obtidos para as suspensões orais de BMZ.....	109

LISTA DE ABREVIATURAS

- AB** - Ácido benzóico
- ACN** - Acetonitrila
- ANOVA** - Análise de variância
- ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- BMZ** - Benzoilmetronidazol
- CLAE** - Cromatografia líquida de alta eficiência
- CIVIV** - Correlação *in vitro-in vivo*
- DAD** - Detector de arranjo de diodos
- DNA** - Ácido desoxirribonucleico
- DPR** - Desvio padrão relativo
- FDA** - Food and Drug Administration
- FM** - Fase móvel
- HCl** - Ácido clorídrico
- ICH** - International Conference on Harmonisation
- IV** – Infravermelho
- LSS** - Lauril sulfato de sódio
- MeOH** – Metanol
- MTZ** – Metronidazol
- NaOH** - Hidróxido de sódio
- POL80** - Polissorbato 80
- SCB** - Sistema de classificação biofarmacêutica
- SQR** – Substância química de referência
- TFPM** – Tampão fosfato de potássio monobásico
- UV** – Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 <i>Objetivo geral.....</i>	20
2.2 <i>Objetivos específicos.....</i>	20
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
3.1 <i>Benzoilmetronidazol.....</i>	22
3.1.1 <i>Propriedades físico-químicas.....</i>	22
3.1.2 Métodos de análise para a determinação quantitativa de BMZ em formas farmacêuticas por CLAE.....	24
3.2 <i>Suspensões farmacêuticas.....</i>	25
3.2.1 Considerações sobre formulação de suspensões.....	26
3.2.1.1 Sedimentação.....	26
3.2.1.2 Propriedades elétricas.....	26
3.2.1.3 Tamanho de partícula.....	28
3.2.1.4 Viscosidade.....	28
3.2.1.4.1 Comportamento reológico de suspensões.....	29
3.3 <i>Considerações biofarmacêuticas.....</i>	30
3.4 <i>Dissolução.....</i>	33
3.4.1 Teoria da dissolução.....	33
3.4.2 Ensaio de dissolução.....	35
3.4.3 Desenvolvimento de método de dissolução.....	38
3.4.4 Dissolução de suspensões orais.....	40
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 <i>Material.....</i>	43
4.1.1 Equipamentos e acessórios.....	43
4.1.2 Reagentes.....	44
4.1.3 Matéria-prima e produtos farmacêuticos.....	45
4.2 <i>Métodos.....</i>	46
4.2.1 Caracterização da matéria-prima.....	46
4.2.1.1 Determinação da faixa de fusão.....	46

4.2.1.2 Perda por dessecação.....	46
4.2.1.3 Análise quantitativa.....	47
4.2.1.4 <i>Identificação da matéria-prima</i>	47
4.2.1.4.1 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta (UV).....	47
4.2.1.4.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho médio (IV).....	47
4.2.1.4.3 Espectrometria de massas (MS).....	47
4.2.2 Determinação do coeficiente de partição (<i>P</i>).....	48
4.2.3 Desenvolvimento de método para a quantificação de BMZ em suspensão oral por CLAE.....	49
4.2.4 <i>Validação do método de quantificação de BMZ em suspensão oral por CLAE..</i>	50
4.2.4.1 <i>Especificidade</i>	51
4.2.4.1.1 Avaliação da interferência dos excipientes da formulação.....	51
4.2.4.1.2 Avaliação da interferência de potenciais produtos de degradação.....	52
4.2.4.2 Linearidade.....	54
4.2.4.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	55
4.2.4.4 Precisão.....	55
4.2.4.5 Exatidão.....	55
4.2.4.6 Robustez.....	55
4.2.5 <i>Caracterização geral das amostras comerciais</i>	56
4.2.5.1 Doseamento de BMZ em amostras comerciais.....	57
4.2.5.2 Determinação de pH e densidade relativa.....	57
4.2.5.3 Tamanho de partícula.....	57
4.2.5.4 Avaliação reológica.....	58
4.2.6 <i>Dissolução das suspensões orais de BMZ</i>	58
4.2.6.1 Teste de solubilidade de BMZ em diferentes meios de dissolução.....	58
4.2.6.2 Desenvolvimento do método de dissolução.....	61
4.2.6.2.1 Avaliação do método de inserção da amostra no meio de dissolução.....	62
4.2.6.2.2 Estabilidade do fármaco nas condições do teste de dissolução.....	63
4.2.6.3 <i>Validação do método de dissolução</i>	63
4.2.6.3.1 Especificidade.....	63
4.2.6.3.2 Linearidade.....	64
4.2.6.3.3 Precisão.....	64
4.2.6.3.4 Exatidão.....	64

4.2.6.3.5 Robustez.....	65
4.2.6.3.6 Adsorção nos filtros.....	65
4.2.6.4 Perfil de dissolução de produtos de BMZ suspensão oral.....	66
4.2.6.5 Cinética de dissolução.....	66
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
<i>5.1 Caracterização da matéria-prima.....</i>	<i>68</i>
5.1.1 Determinação da faixa de fusão.....	68
5.1.2 Perda por dessecação.....	68
5.1.3 Análise quantitativa.....	69
<i>5.1.4 Identificação da matéria-prima.....</i>	<i>69</i>
5.1.4.1 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta (UV).....	70
5.1.4.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV) médio.....	70
5.1.4.3 Espectrometria de massas (MS).....	72
5.2 Determinação do coeficiente de partição.....	73
5.3 Desenvolvimento do método para a quantificação de BMZ em suspensão oral por CLAE.....	74
<i>5.4 Validação do método de quantificação de BMZ em suspensão oral por CLAE.....</i>	<i>75</i>
<i>5.4.1 Especificidade.....</i>	<i>75</i>
5.4.1.1 Interferência dos excipientes da formulação.....	76
5.4.1.2 Interferência de potenciais produtos de degradação.....	77
5.4.2 Linearidade.....	81
5.4.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	82
5.4.4 Precisão.....	82
5.4.5 Exatidão.....	83
5.4.6 Robustez.....	84
<i>5.5 Caracterização geral das amostras comerciais.....</i>	<i>85</i>
5.5.1 Doseamento de BMZ em amostras comerciais.....	85
5.5.2 Determinação de pH.....	85
5.5.3 Tamanho de partícula.....	86
5.5.4 Avaliação reológica.....	87
<i>5.6 Dissolução das suspensões orais de BMZ.....</i>	<i>89</i>
5.6.1 Teste de solubilidade de BMZ em diferentes meios de dissolução.....	89
5.6.2 Desenvolvimento do método de dissolução.....	90

5.6.2.1 Avaliação do método de inserção da amostra no meio de dissolução.....	99
5.6.2.2 Estabilidade do fármaco nas condições do teste de dissolução.....	100
5.6.3 <i>Validação do método de dissolução</i>	101
5.6.3.1 Especificidade.....	101
5.6.3.2 Linearidade.....	102
5.6.3.3 Precisão.....	103
5.6.3.4 Exatidão.....	104
5.6.3.5 Robustez.....	104
5.6.3.6 Adsorção nos filtros.....	105
5.6.4 Perfil de dissolução de produtos de BMZ suspensão oral.....	106
5.6.5 Cinética de dissolução.....	108
6 CONCLUSÕES	111
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os imidazóis são uma classe de fármacos amplamente utilizados na terapêutica humana no tratamento de infecções bacterianas e fúngicas. O metronidazol, principal representante desta classe, pertence ao subgrupo dos 5-nitroimidazóis e foi, originalmente, introduzido na terapêutica para o tratamento de *Trichomonas vaginalis*, sendo também usado para o tratamento de infecções causadas por bactérias anaeróbias e por protozoários (TURGUT & ÖZYAZICI, 2004).

O metronidazol está disponível comercialmente nas formas farmacêuticas, comprimido, injetável, creme e gel. O fármaco tem seu uso restrito na pediatria devido ao sabor amargo que impossibilita a formulação de produtos líquidos. A suspensão oral é produzida a partir do seu sal insolúvel, o benzoilmetronidazol (BMZ). Esse sal é um éster do metronidazol que apresenta um sabor agradável em comparação ao gosto amargo do metronidazol base. Dessa forma, consegue-se produzir uma dispersão líquida palatável para os pacientes, permitindo flexibilidade na administração, sendo particularmente vantajoso para crianças e idosos (ZIETSMAN, 2005).

Para formas farmacêuticas sólidas de uso oral, um dos principais parâmetros de qualidade a ser avaliado é a velocidade com que o fármaco entra em solução, ou seja, a dissolução *in vitro*. Essa determinação é relevante, considerando que a velocidade de dissolução pode ser o passo limitante da absorção e, conseqüentemente, da extensão da disponibilidade do fármaco *in vivo*. Em suspensões farmacêuticas, embora o fármaco esteja disperso no veículo e, portanto, desintegrado, a absorção pode estar condicionada à velocidade de dissolução (STORPIRTIS et al., 2009).

Os ensaios de dissolução *in vitro* podem ser classificados em três categorias: teste de dissolução de um único ponto, de dois pontos e perfil de dissolução comparativo. Os testes de dissolução em único ponto são utilizados no controle de qualidade de rotina de produtos farmacêuticos e para fármacos pouco solúveis, um segundo ponto pode ser incluído (SERRA & STORPIRTIS, 2007). O perfil de dissolução comparativo tem como objetivo relacionar a porcentagem do fármaco dissolvido em função do tempo, comparando formulações através de parâmetros pré-determinados em legislação. Além disso, pode ser aplicado na avaliação de uma nova formulação; na etapa de desenvolvimento farmacotécnico, como importante meio para a caracterização da qualidade biofarmacêutica de uma forma farmacêutica; para o estabelecimento de correlações *in vitro-in vivo* e em estudos de equivalência farmacêutica (MANADAS et al., 2002; BRASIL, 2010).

O método de dissolução aplicado para a realização dos ensaios de dissolução *in vitro* deve ser discriminativo para detectar mudanças no processo de fabricação que sejam capazes de afetar a biodisponibilidade de fármacos. Além disso, recomenda-se o desenvolvimento de métodos que utilizem meios de dissolução biorrelevantes, capazes de prever o comportamento *in vivo* (MARQUES et al., 2011).

No Brasil, a exigência da realização do teste de dissolução para a forma farmacêutica suspensão oral foi estabelecida em 2004, pela Resolução nº 310, de 1º de setembro de 2004 (BRASIL, 2004) e embora existam monografias para fármacos em suspensão incluídos na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010), nenhuma contém método de dissolução. Até 2011, a Farmacopeia Americana contava com apenas nove monografias de suspensões orais com método descrito para o teste de dissolução.

Considerando a relevância dos ensaios de dissolução e a inexistência de método de dissolução para o BMZ suspensão oral em monografias oficiais, assim como os poucos estudos sobre a dissolução de suspensões orais em geral, este trabalho tem por objetivo realizar o desenvolvimento e a validação de um método de dissolução discriminativo para a análise do BMZ na forma farmacêutica suspensão oral por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Desenvolver e validar método de dissolução para a suspensão oral de BMZ.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar e identificar a matéria-prima do BMZ através dos seguintes métodos: ponto de fusão, perda por dessecação, análise quantitativa por volumetria em meio não aquoso, espectroscopia na região do ultravioleta, espectroscopia na região do infravermelho e espectrometria de massas;
- Desenvolver e validar método indicativo de estabilidade para o doseamento do BMZ em suspensão oral por CLAE;
- Caracterizar as suspensões orais utilizadas no trabalho através da determinação do pH, teor, perfil reológico e tamanho de partícula;
- Comparar o perfil de dissolução das suspensões orais aplicando o método modelo independente, f_2 ;
- Determinar a cinética de dissolução a partir da aplicação dos modelos dependentes zero ordem, primeira ordem, Higuchi, Hixson-Crowell e Weibull.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Benzoilmetronidazol

O BMZ é um fármaco que pertencente à classe dos 5-nitroimidazóis, com atividade antiparasitária e antibacteriana frente a cocos anaeróbios, bacilos anaeróbios Gram-negativos e Gram-positivos e contra bactérias microaerófilas, incluindo *Helicobacter e Campylobacter* (BRUNTON et al., 2010). O fármaco é prescrito para o tratamento de tricomoníase, amebíase, giardíase e infecções causadas por bactérias anaeróbias, como *Bacteroides e Clostridium*. Além disso, é um dos antibacterianos mais utilizados para certos tipos de doenças periodontais, rosácea e o tratamento da doença de Crohn's perianal (PÄHKLA et al., 2005; MARTINDALE, 2009). O BMZ é hidrolisado a metronidazol por esterases não específicas presentes no trato gastrointestinal (ZIETSMAN, 2005). O composto é um pró-fármaco ativado por um processo de redução do seu grupo nitro por microrganismos suscetíveis. A transferência de elétrons dá origem a um nitro-radical aniônico altamente reativo com ação sobre o DNA, causando a inibição da síntese de ácido nucleico e consequente, morte da célula microbiana (BRUNTON et al., 2010). Apresenta biodisponibilidade em torno de 80% (HOUGHTON, 1982), meia-vida plasmática de 8-10 horas, ligação às proteínas plasmática menor que 20% e excreção principalmente urinária (SILVA, 2008).

3.1.1 Propriedades físico-químicas

O BMZ (Figura 1-A) é um derivado éster do metronidazol de nome químico 1-benzoato de 2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-etanol, com peso molecular de 275,26 g e faixa de fusão de 99 °C a 102 °C (MERCK INDEX, 2006; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). É um pó cristalino branco a levemente amarelo, praticamente insolúvel em água (0,1 mg mL⁻¹), pouco solúvel em etanol (MARTINDALE, 2009; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010) e solúvel em diclorometano (VU et al., 2008; MARTINDALE, 2009). É uma base fraca com valor de pKa de 2,5 (SA'SA' et al., 1988).

O coeficiente de partição, *P*, é uma medida da lipofilicidade do fármaco e fornece informações sobre sua capacidade em atravessar as membranas biológicas. O coeficiente de partição do BMZ obtido experimentalmente e sua estimativa teórica, obtida por modelagem molecular, expressos na forma logarítmica de log *P* de 1,83 e 2,19, respectivamente, confirmam a lipofilicidade do fármaco, pois fármacos com características lipossolúveis

apresentam valores de $\log P > 0$ (AULTON, 2005). Ainda é desconhecida a classificação do fármaco com base no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB). Desta forma, como o BMZ é um fármaco lipofílico e com biodisponibilidade descrita em torno de 80% (HOUGHTON, 1982), sugere-se a classificação Classe IV (Baixa solubilidade e baixa permeabilidade) para este fármaco. Fármacos desta classe apresentam problemas para a absorção e a dissolução é um dos fatores determinantes para que esse processo ocorra.

O BMZ (Figura 1-A) contém como impureza o 2-metil-5-nitroimidazol (Figura 1-B) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010) e como potenciais produtos de degradação o ácido benzóico (Figura 1-C) e o metronidazol (Figura 1-D) (BEMPONG et al., 2005; VU et al., 2008). Apresenta estabilidade à temperatura ambiente, mas oxida quando exposto de forma prolongada à luz. Ambientes mais alcalinos favorecem sua degradação, principalmente quando o pH apresenta valores superiores a 8 (BEDIN, 2011). Apresenta hidrólise instantânea em pH 11 a 25 °C (SA'SA' et al., 1988). Em relação à forma cristalina, pode existir nas formas anidra e monohidratada com diferentes propriedades de solubilidade. A forma anidra pode apresentar polimorfos e não foram encontrados relatos da presença da forma amorfa do BMZ (ZIETSMAN, 2005).

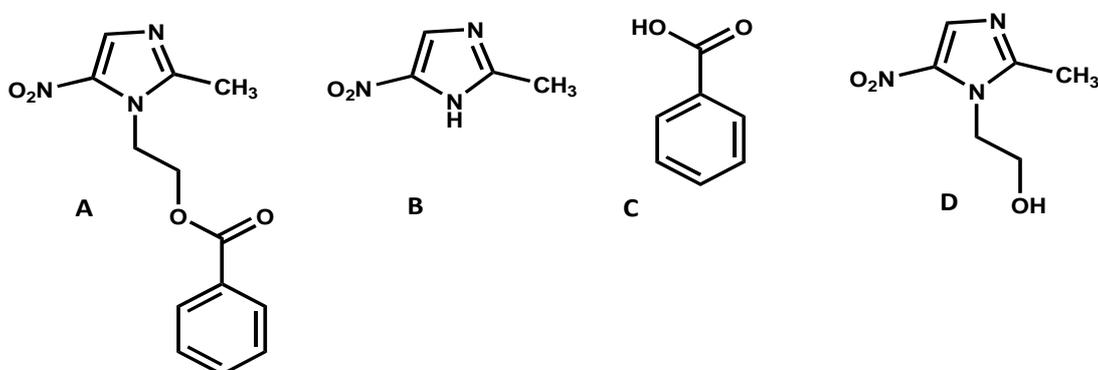


Figura 1. Estrutura química dos compostos: (A) BMZ, (B) 2-metil-5-nitroimidazol, (C) ácido benzóico e (D) metronidazol. Adaptado de MERCK INDEX, 2006.

3.1.2 Métodos de análise para a determinação quantitativa de BMZ em formas farmacêuticas por CLAE

A Tabela 1 apresenta os principais métodos descritos na literatura para a determinação de BMZ por CLAE. Não estão descritos os métodos em que o BMZ está presente em associações farmacêuticas.

Tabela 1. Principais condições analíticas descritas na literatura para a quantificação de BMZ por CLAE.

Amostra	Sistema cromatográfico	Referência
Suspensão oral	Coluna: C18, 150 x 3,9 mm, 5 µm; FM: MeOH:água (50:50, v/v); Fluxo: 1,0 mL/min; Detecção: UV a 254 nm;	FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010
Suspensão oral	Coluna: Phenomenex C18, 150 x 4,6mm; 5 µm; FM: água:ACN:ácido acético glacial (50:50:0.05, v/v); Fluxo: 1,0 mL/min; Detecção: UV a 314 nm	VU et al., 2008
Suspensão oral	Coluna: Perkin-Elmer C18, 250 x 4mm, 10 µm, pré-coluna de 50 mm x 2 mm; FM: 4mM de dodecil hidrogenosulfato em ACN:água (35:65; v/v); Detecção: UV a 254 nm;	PASHANKOV & KOSTOVA, 1987
Nanoemulsão	Coluna: Kromasil C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm; FM: MeOH:água (50:50;v/v); Fluxo: 1,0 mL/min; Detecção: UV a 310 nm;	BEDIN, 2011
Pastilha e emulsão	Coluna: Phenomenex IB-SIL C8, 250 x 4,6 mm, 5 µm; FM: tampão fosfato pH 7,0: ACN (55:45;v/v); Fluxo: 1,0 mL/min; Detecção: UV a 230nm;	FAN et al., 2001
Matéria-prima	Coluna: Waters C8, 250 x 4,6 mm, 5 µm; FM: ACN: 0,1% de ácido acético glacial em fosfato de potássio monobásico (0,01M) (40:60; v/v); Fluxo: 2,0 mL; Detecção: UV a 271 nm;	BEMPONG et al., 2005
Matéria-prima	Coluna: MicroPak MCH-10 µm 300 x 4 mm; FM: 0,02 M acetato de amônio em acetonitrila: água (47:53; v/v) pH 4,5; Fluxo: 2,0 mL/min; Detecção: UV 270 e 320 nm;	SA'SA' et al., 1988

3.2 Suspensões farmacêuticas

Suspensões são sistemas dispersos formados por duas fases, a dispersa ou interna e a contínua ou externa. A fase dispersa é formada por partículas insolúveis de um sólido que estão uniformemente distribuídos em um meio que pode ser líquido ou semissólido, e representa a fase contínua ou externa. Podem ser classificadas em coloidais quando forem formadas por partículas de até 1 μm , e quando o tamanho de partícula for superior ao coloidal é chamado de dispersão grosseira (AULTON, 2005).

A forma farmacêutica suspensão é comumente utilizada para administração oral, parenteral e tópica, entretanto existem preparações que utilizam suspensões de fármacos para uso oftálmico, nasal e pulmonar. As suspensões injetáveis são formuladas para serem administradas por via intramuscular, subcutânea, intra-articular ou por via intradérmica, mas nunca devem ser administradas por via intravenosa ou intra-arterial, devido ao tamanho de suas partículas.

Existem várias razões para a formulação de suspensões farmacêuticas como:

- Permitir a formulação de substâncias ativas de baixa solubilidade ou insolubilidade no veículo;
- Mascarar o sabor amargo de certos fármacos;
- Aumentar a estabilidade de fármacos instáveis em solução aquosa;
- Promover a liberação controlada/sustentada de fármacos.

Uma suspensão farmacêutica é considerada estável e ideal quando as partículas da fase interna não se agregam, permanecem uniformemente distribuídas e apresentam fácil redispersibilidade mediante agitação moderada (AULTON, 2005). Entretanto, como possuem grande área superficial e alta energia livre de superfície, são considerados sistemas termodinamicamente instáveis, o que dificulta o processo de manipulação e manutenção das características acima mencionadas.

3.2.1 Considerações sobre formulação de suspensões

3.2.1.1 Sedimentação

A velocidade de sedimentação e de agregação em sistemas dispersos são propriedades dependentes do tamanho de partículas, das interações entre as partículas, de suas densidades e também da viscosidade da fase contínua (LACHMAN et al., 2001). A velocidade de sedimentação de partículas incorporadas em dispersões grosseiras pode ser expressa pela Lei de Stokes, representada na equação 1 (NETZ & ORTEGA, 2002; SINKO, 2008).

$$v = \frac{2r^2(\rho_{sol} - \rho_{liq})g}{9\eta} \quad \text{Equação (1)}$$

Onde:

v = velocidade de sedimentação em cm. sec⁻¹;

r = raio das partículas;

η = viscosidade do meio;

ρ_{sol} = densidade do sólido;

ρ_{liq} = densidade da fase dispersante;

g = constante da aceleração da gravidade.

A partir da Lei de Stokes é possível prever o comportamento das suspensões farmacêuticas de maneira geral. A situação ideal é a que apresente a menor velocidade de sedimentação, para evitar o aparecimento de sedimento irredispersível (*caking*) no fundo do frasco e que proporcione uniformidade de dose (AULTON, 2005; SINKO, 2008).

3.2.1.2 Propriedades elétricas

No estudo de suspensões farmacêuticas é importante entender as interações que ocorrem entre as partículas. O tamanho e as forças de atração na superfície das partículas e no meio de dispersão são os responsáveis pelo comportamento geral da suspensão.

Partículas de um sólido disperso em um meio aquoso tornam-se carregadas, principalmente pela adsorção de íons presentes em solução.

De acordo com a teoria da dupla camada elétrica, a carga da partícula influencia a distribuição de íons no meio aquoso. Caso a partícula for negativa, ao redor dela coexistirão íons de carga oposta, no caso, cátions. Com isso ocorre a formação de uma região que origina um potencial eletrodinâmico ou de *Nernst*. Esses íons formam uma rígida camada ao redor da partícula, conhecida como camada de *Stern* (Figura 2). Contraíons são atraídos para a camada de *Stern*, gerando um equilíbrio dinâmico e dando origem a uma segunda camada chamada de difusa e que vai ficando mais dispersa à medida que se distancia da camada de *Stern* (AULTON, 2005; NETZ & ORTEGA, 2002; SINKO, 2008). O potencial situado no plano de cisalhamento é conhecido como potencial eletrocinético ou potencial zeta (ζ) e é definido como a diferença de potencial entre a superfície fortemente ligada e a região neutra da solução (SINKO, 2008).

O potencial zeta é importante fator para a estabilidade de sistemas dispersos porque rege o grau de repulsão entre as partículas dispersas. Quando o potencial zeta é alto há o predomínio das forças de repulsão entre duas partículas e temos um sistema defloculado, sem agregação de partículas e sedimentação individual. Como a velocidade de sedimentação depende do tamanho de partícula, a sedimentação é bastante lenta com padrão de sedimentação de baixo para cima e turbidez na fase líquida (NETZ & ORTEGA, 2002). Em repouso, o sedimento formado sofre compactação progressiva, que leva a formação de agregados fortemente coesos e compactos de difícil redispersão, denominados *caking*. A formação de *caking* é considerado o problema mais sério de estabilidade física em suspensões (AULTON, 2005).

A redução do potencial zeta produz o predomínio das forças de atração e nestas condições, ocorre a formação de agregados, sendo este sistema chamado de floculado. O sistema floculado apresenta rápida velocidade de sedimentação devido as partículas estarem agrupadas em flóculos. O sedimento é formado de cima para baixo, é poroso e de fácil redispersão, com volume final de sedimentação alto, sem formação de *caking*. Entretanto, a rápida sedimentação de sistemas floculados pode levar a imprecisão de doses (AULTON, 2005; ANSEL et al., 2007).

Para a formulação de suspensões estáveis utiliza-se o controle da floculação. Esse processo é realizado através da adição de eletrólitos, os quais agem reduzindo o potencial zeta. Além disso, controla-se o tamanho de partícula e a viscosidade do meio (SINKO, 2008).

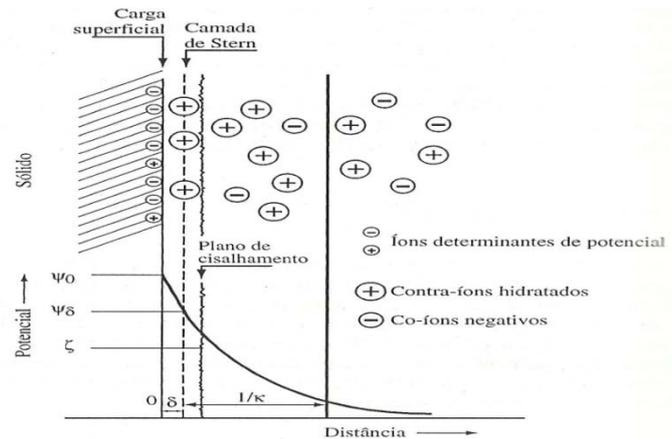


Figura 2. Representação da dupla camada elétrica (FLORENCE & ATTWOOD, 2003).

3.2.1.3 Tamanho de partícula

O tamanho de partícula do fármaco é um importante fator a ser considerado na produção de medicamentos. No caso de suspensões farmacêuticas pode influenciar tanto nas características físicas, na estabilidade do sistema, quanto na ação farmacológica do fármaco (SINKO, 2008).

Suspensões farmacêuticas de uso oral podem apresentar partículas da fase dispersa de tamanho variado e geralmente apresentam partículas grandes e visíveis a olho nu, com diâmetro médio de 1 a 50 μm de diâmetro, que são conhecidas como dispersões grosseiras (AULTON, 2005; ANSEL et al., 2007).

A partir da equação de Stokes verifica-se que o tamanho de partícula exerce influência sobre a velocidade de sedimentação das suspensões, ou seja, quanto maior for o tamanho de suas partículas, maior será sua velocidade de sedimentação.

Hoelgaard e Moller (1983), em um estudo sobre suspensões comerciais de BMZ, verificaram a ocorrência de instabilidade física causada pelo aumento no tamanho das partículas em suspensão devido a ocorrência de transição de fase do estado anidro para o estado hidratado em solução das partículas do BMZ.

3.2.1.4 Viscosidade

A reologia é o estudo das propriedades de fluxo e deformação da matéria. A viscosidade é definida como a resistência ao fluxo sofrida por um fluido e quanto maior a viscosidade, maior será essa resistência (AULTON, 2005). Análises reológicas são

importantes para o desenvolvimento de formulações e para a caracterização de produtos farmacêuticos, como por exemplo, emulsões, suspensões, pastas, géis e supositórios (SINKO, 2008).

A viscosidade (η) é definida como a relação entre a tensão e a taxa de cisalhamento, conforme descrito na equação 2, e a representação gráfica desta relação é chamada de reograma. A taxa ou velocidade de cisalhamento indica a velocidade com que o líquido escoar quando uma determinada força ou pressão é aplicada. Essa pressão é denominada de tensão de cisalhamento (NETZ & ORTEGA, 2002; GENNARO, 2004).

$$\eta = \frac{\text{Tensão de Cisalhamento (dina/s)}}{\text{Taxa de Cisalhamento (cm}^2\text{)}} \quad \text{Equação (2)}$$

O primeiro a perceber que a velocidade de fluxo é diretamente proporcional à tensão aplicada foi Newton, portanto fluidos que obedecem a essa relação são chamados de fluidos newtonianos (AULTON, 2005). Muitos dos medicamentos não são líquidos simples e não obedecem à lei de Newton e são chamados de fluidos não newtonianos (SINKO, 2008), os quais não apresentam uma relação linear entre a tensão e a taxa de cisalhamento. A viscosidade em sistemas não newtonianos não é constante e depende, além da temperatura e da taxa de deformação, de fatores como forma de preparação, manuseio e tempo de repouso, entre outros. Sistemas não newtonianos são classificados em três tipos: plástico, pseudoplástico e dilatante (SINKO, 2008; NETZ & ORTEGA, 2002). Além disto, o fenômeno de tixotropia acontece frequentemente em sistemas dispersos (AULTON, 2005; SINKO, 2008).

3.2.1.4.1 Comportamento reológico de suspensões

A viscosidade das suspensões também tem relação com a velocidade de sedimentação de partículas dispersas, segundo a Lei de Stokes, e quanto maior a viscosidade do meio, menor é a velocidade de sedimentação das partículas. A característica reológica de um produto pode influenciar a aceitação por parte do paciente, sua estabilidade física e, em alguns casos, até sua biodisponibilidade (SINKO, 2008).

Suspensões são sistemas não newtonianos, onde as propriedades reológicas são afetadas pelo grau de floculação. Em sistemas floculados a fase contínua diminui à medida que se torna presa aos flocos dispersos, provocando o aumento da viscosidade aparente. Desta

forma, suspensões floculadas apresentam viscosidade maior quando comparado a uma suspensão similar em todos os aspectos, porém defloculada (AULTON, 2005).

Suspensões floculadas podem apresentar comportamento plástico ou pseudoplástico e se a ruptura e a formação de ligações entre os flocos forem dependentes do tempo, será observado também um comportamento tixotrópico. O fluxo plástico está associado à presença de partículas floculadas em suspensão concentrada, que resulta na formação de uma estrutura contínua que permeia o sistema. O valor de cedência ocorre devido a interações entre as partículas, que precisam ser rompidas para que o fluxo possa acontecer. O valor de cedência é uma indicação do grau de floclulação de uma suspensão (AULTON, 2005; SINKO, 2008).

A formação de estruturas não acontece em suspensão defloculada e a avaliação reológica será determinada pelo comportamento da fase contínua (FONSECA, 2007).

Além do controle da floclulação, modificações reológicas são utilizados para a produção de suspensões adequadas ao uso pretendido e, também, para garantir a estabilidade física do sistema. Uma boa suspensão deve apresentar preferencialmente um comportamento pseudoplástico com um certo grau de tixotropia. Essas propriedades garantem que a suspensão apresente uma elevada consistência dentro do frasco, mas torna-se fluida, mediante agitação, para facilitar a remoção do produto (MOGHIMIPOUR et al., 2013). Além disso, a tixotropia em suspensões evita a rápida sedimentação das partículas dispersas dentro do frasco e garante a homogeneidade de doses. Por isso que, em muitas suspensões, verifica-se a presença de agentes suspensionantes como a goma adragante, alginato de sódio e carboximetilcelulose, que são substâncias pseudoplástica que proporcionam as qualidades desejadas ao sistema (SINKO, 2008; MOGHIMIPOUR et al., 2013).

Em sistemas dispersos a avaliação reológica é realizada em viscosímetros rotatórios, que se baseiam na resistência ao fluxo observado, quando um corpo rotatório gira imerso no líquido ou semi-sólido (AULTON, 2005).

3.3 Considerações biofarmacêuticas

A via de administração oral é a via preferencial para a administração de medicamentos, devido à sua conveniência, baixo custo e maior aderência ao tratamento pelo paciente. Uma das desvantagem desta via é a variação da absorção de fármacos, que pode ser causada pelas características físico-químicas do composto, formulação, forma farmacêutica e fatores fisiológicos individuais (AULTON, 2005; ANSEL et al., 2007).

A biodisponibilidade de um medicamento é definida como a quantidade e a velocidade com que um fármaco é absorvido a partir de sua forma farmacêutica e está disponível para exercer o efeito biológico (STORPIRTIS et al., 2009). Primeiramente, para que um fármaco seja absorvido é necessário sua solubilização nos fluidos biológicos do trato gastrointestinal. Neste sentido, a dissolução controla a velocidade de absorção, principalmente em relação a fármacos de baixa solubilidade aquosa (SOUZA et al., 2007). Além disso, a extensão e a velocidade de absorção de fármacos administrados por via oral depende, também, da sua capacidade de atravessar as membranas biológicas (MANADAS et al., 2002; MARCOLONGO, 2003).

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) proposto por Amidon e colaboradores em 1995, correlaciona à dissolução, solubilidade e a permeabilidade gastrointestinal como fatores que afetam a velocidade e a extensão da absorção de fármacos em formas farmacêuticas sólidas. O objetivo do SCB é prever a biodisponibilidade de fármacos, baseado em parâmetros fisiológicos e propriedades físico-químicas. Este sistema organiza os fármacos em quatro classes (AMIDON et al., 1995):

- Classe I - Alta solubilidade e alta permeabilidade;
- Classe II - Baixa solubilidade e alta permeabilidade;
- Classe III - Alta solubilidade e baixa permeabilidade;
- Classe IV - Baixa solubilidade e baixa permeabilidade.

São considerados fármacos de alta solubilidade quando a sua maior dose administrada oralmente, de uma formulação de liberação imediata é completamente solúvel, em até 250 mL de meio aquoso, no intervalo de pH fisiológico estabelecido entre 1,2 a 6,8 (BRASIL, 2010) e 1,0 a 7,5 (FDA, 2000). O método indicado para a avaliação da solubilidade é o shake flask (BRASIL, 2013).

A classificação da permeabilidade pode ser determinada diretamente, com base na extensão da absorção intestinal de um fármaco *in vivo* ou, indiretamente, através das medidas da velocidade de transferência de massa através da membrana intestinal humana. Sistemas *in vitro* capazes de prever a permeabilidade também podem ser utilizados como, por exemplo, o método de cultura de células epiteliais (YU et al., 2002). Uma substância é considerada de alta permeabilidade quando a fração da dose absorvida é igual ou maior do que 90% (AMIDON et al., 1995; BRASIL, 2010; FDA, 1997).

Fármacos classificados como Classe I apresentam alta solubilidade e permeabilidade e quando apresentam velocidade de dissolução rápida, a absorção é controlada pelo esvaziamento gástrico. Um produto é considerado de dissolução rápida quando apresenta dissolução média de no mínimo 85% da quantidade declarada, em até 30 minutos (FDA, 2000; BRASIL, 2010). Os fármacos de Classe II apresentam baixa solubilidade aquosa e o fator limitante para a absorção é a velocidade de dissolução e uma correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV) pode ser esperada. Neste sentido, qualquer fator que afete a dissolução, irá afetar a biodisponibilidade e, por essa razão, o fármaco terá uma absorção variável. Quando fármacos são classificados como Classe III apresentam como passo limitante para a absorção a permeabilidade, sendo a absorção menos dependente da formulação. Fármacos Classe IV apresentam baixa solubilidade e baixa permeabilidade, ambos indesejáveis para uma boa absorção. Para fármacos dessa classe dificilmente consegue-se estabelecer uma CIVIV (AMIDON et al., 1995; YU et al., 2002).

O FDA, em 2000, estabeleceu o SCB com a finalidade de dispensar o estudo de biodisponibilidade e bioequivalência para fármacos de formas farmacêuticas sólidas orais classificados como Classe I, desde que apresentem dissolução rápida (FDA, 2000). No Brasil, a ANVISA instituiu a RDC nº 37, de 3 de agosto de 2011, que dispõe sobre o Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. Este guia regulamenta as bioisenções baseadas no SCB e, assim como o FDA, somente permite a bioisenção para fármacos de alta solubilidade e permeabilidade (Classe I). O SCB gerou um impacto significativo sobre o processo de regulamentação de medicamentos, com benefício para a indústria farmacêutica.

As suspensões orais, por serem preparações líquidas que contém partículas de fármacos dispersos em um veículo, geralmente aquosos, apresentam a vantagem em relação à forma farmacêutica sólida por serem disponibilizadas ao organismo como finas partículas prontas para a dissolução. Além disso, a grande área superficial do fármaco disperso assegura a alta disponibilidade para dissolução e, portanto, para a absorção (SINKO, 2008). Por conseguinte, a velocidade de absorção do fármaco é mais rápida a partir de uma suspensão do que se o fármaco estivesse em uma forma farmacêutica sólida (AULTON, 2005). Entretanto, qualquer fator que altere a dissolução desta forma farmacêutica pode influenciar a biodisponibilidade do fármaco (SIMON et al., 2013).

3.4 Dissolução

3.4.1 Teoria da dissolução

O processo pelo qual o fármaco entra em solução a partir da forma farmacêutica é denominado de dissolução (MANADAS et al., 2002). A velocidade de dissolução de um fármaco no estado sólido é definida como a quantidade de fármaco que entra em solução por unidade de tempo (MARCOLONGO, 2003; SINKO, 2008; STORPIRTIS et al., 2009). A teoria da velocidade de dissolução mais aceita é descrita pela equação de Noyes e Whitney, com base na segunda lei de Fick, conforme descrita na equação 3 (SINKO, 2008; MANADAS et al., 2002):

$$\frac{dC}{dT} = K \cdot (C_s - C_t) \quad \text{Equação (3)}$$

Onde:

$\frac{dC}{dT}$ = gradiente de dissolução do fármaco em função do tempo;

K = constante de dissolução;

C_s = concentração de saturação do fármaco na solução;

C_t = concentração do fármaco em solução no tempo t .

A equação de Noyes - Whitney foi modificada por Nernst e Brunner com a inclusão de parâmetros que influenciam o processo de dissolução como o coeficiente de difusão, a área de superfície, a espessura da camada de difusão (h) formada ao redor da partícula sólida e o volume do meio de dissolução, dando origem à equação 4 descrita abaixo (SINKO, 2008; MANADAS et al., 2002):

$$\frac{dC}{dT} = K \cdot \frac{D \times S}{V \times h} (C_s - C_t) \quad \text{Equação (4)}$$

Onde:

D = coeficiente de difusão do soluto na solução;

S = área de superfície da partícula;

V = volume do meio de dissolução;

h = espessura da camada de difusão.

Para que tais conceitos sejam aplicados é necessário que a concentração do soluto no meio de dissolução não aumente significativamente, pois a velocidade de dissolução do medicamento a dissolver é influenciada por este aumento. Esta condição de inalteração da concentração do soluto no meio de dissolução é conhecida como condição “*sink*” (DRESSA, & KRÄMER, 2005).

Vários fatores podem influenciar a dissolução de sólidos em um meio líquido, como por exemplo: tamanho de partícula, o estado físico do fármaco, o pH, os excipientes que compõem a formulação e a forma farmacêutica (MARCOLONGO, 2003; DRESSA, & KRÄMER, 2005).

O tamanho de partículas do fármaco está diretamente relacionado com a velocidade de dissolução, como pode ser verificado na equação de Noyes-Whitney modificada. Quanto menor o tamanho de partícula, maior a superfície de contato entre o sólido e o líquido e maior a velocidade de dissolução e, em muitos casos, maior será a biodisponibilidade (SINKO, 2008).

A redução do tamanho de partículas de fármacos pouco solúveis é uma estratégia utilizada para aumentar a velocidade de dissolução e a biodisponibilidade oral deste tipo de fármaco. Entretanto, o tamanho da partícula não pode ser alterado indefinidamente, pois pode influenciar fortemente a biodisponibilidade do sólido disperso e também levar a problemas de intoxicação (STORPIRTIS et al., 2009).

O estado físico do fármaco tem influência sobre sua solubilidade e biodisponibilidade. As várias formas do cristal, ou seja, a presença de polimorfos produz características diferenciadas ao fármaco em relação as suas características de solubilidade. E no caso de fármacos de baixa solubilidade isso pode afetar a velocidade de dissolução e a biodisponibilidade (SINKO, 2008). Além disso, alguns sólidos de importância farmacêutica podem ocorrer em formas não cristalinas ou amorfas. Geralmente, a forma amorfa de um sólido é mais solúvel que a forma cristalina e apresenta velocidade de dissolução maior em comparação se o sólido estivesse na sua forma cristalina (AULTON, 2005).

O pH do meio exerce influencia sobre a solubilidade e velocidade de dissolução de fármacos ácidos e bases fracas, devido ao grau de ionização da molécula ser dependente do pH. Em geral, os fármacos na forma ionizada tendem a exibir maior solubilidade aquosa do que sua forma não ionizada (SINKO, 2008). Em relação ao excipiente, Marcolongo (2003) relata que os vários tipos utilizados em uma determinada formulação apresentam alguma influência na dissolução. Por exemplo, lubrificantes insolúveis retardam a dissolução e

diluentes como o amido e tensoativos, como o polissorbato 80, tendem a facilitar este processo.

Fatores relacionados ao equipamento de dissolução podem alterar o desempenho do teste de dissolução *in vitro*. Entre esses fatores estão a geometria do sistema, a posição da haste, a posição e método de amostragem, a presença de gases no meio de dissolução e a velocidade de agitação (DRESSA & KRÄMER, 2005). Os fatores relacionados ao meio de dissolução, como volume, temperatura e composição, também exercem influência direta sobre a dissolução e todos devem ser avaliados durante o desenvolvimento do teste de dissolução.

3.4.2 Ensaio de dissolução

Os ensaios que avaliam a dissolução de fármacos sólidos orais de liberação imediata são chamados de teste de dissolução. O teste de dissolução visa determinar a quantidade de substância ativa dissolvida no meio de dissolução quando submetido à ação de aparelhagem e condições experimentais específicas (BRASIL, 2010). O primeiro teste de dissolução foi publicado em 1970, na Farmacopeia Americana (USP XVIII) juntamente com as especificações do aparato (1) cesto rotatório. Em 1975, a USP XIX oficializou, também, o aparato (2) pá (MARCOLONGO, 2003). Os aparatos cesto e pá foram e são, até o presente momento, os equipamentos de escolha para testes de dissolução de formas farmacêuticas sólidas, principalmente os de liberação imediata. A partir de 1990, com o crescente estudo sobre dissolução e desenvolvimento de novas formas farmacêuticas, outros equipamentos foram desenvolvidos. Atualmente, na Farmacopeia Americana (USP 36, 2013) são descritos sete equipamentos de dissolução oficiais. A Farmacopeia Brasileira considera como oficial os aparatos (1) cestas, (2) pás e (3) cilindros alternantes (BRASIL, 2010).

As autoridades regulatórias recomendam que o teste de dissolução seja aplicado para as seguintes formas farmacêuticas: comprimidos de liberação imediata e modificada, cápsulas, pós e granulados para suspensão, suspensões administradas por qualquer via de administração, adesivos transdérmicos, pomadas, géis, cremes, implantes, microparticulados injetáveis e goma de mascar (BRASIL, 2010; SIEWERT et al., 2003; STORPIRTIS et al., 2009).

Como mencionado anteriormente, existem três categorias de testes de dissolução: teste de um único ponto, teste de dissolução de dois pontos e perfis de dissolução. O teste de dissolução de um ponto é utilizado na análise de rotina de um laboratório de controle de qualidade, para a avaliação da qualidade de formas farmacêuticas de liberação imediata e,

também, para verificar a estabilidade durante o prazo de validade (SERRA & STORPIRTIS, 2007). As metodologias descritas nos compêndios oficiais indicam especificações para o teste de dissolução em um único ponto de coleta, a partir de um tempo estabelecido na monografia. Especificações de dois pontos podem ser requeridas para fármacos pouco solúveis em água e formas farmacêuticas de dissolução lenta (SERRA & STORPIRTIS, 2007; MARCOLONGO, 2003).

Os perfis de dissolução, os quais são obtidos a partir da porcentagem dissolvida de fármaco em diferentes tempos de amostragem, são úteis durante o processo de pesquisa e desenvolvimento farmacotécnico, para avaliar o efeito de determinadas alterações em produtos já em comercialização e para estabelecer a semelhança entre formulações. O perfil de dissolução comparativo, também é aplicado no estudo de equivalência farmacêutica de medicamentos (MARCOLONGO, 2003; BRASIL, 2010). O ensaio de perfil de dissolução permite a obtenção de parâmetros cinéticos importantes para determinar as características biofarmacotécnicas de determinada formulação e prever a disponibilidade do fármaco *in vivo*, ao estabelecer uma CIVIV. Desta forma, é possível eliminar estudos de bioequivalência para dosagens menores de um mesmo produto (STORPIRTIS et al., 2009).

O perfil de dissolução é representado graficamente por meio da curva das quantidades do fármaco dissolvido em função do tempo e vários parâmetros cinéticos podem ser descritos, tais como: constante de velocidade de dissolução (K), meia vida de dissolução ($t_{50\%}$) e quantidade dissolvida em determinado tempo (Q) (SERRA & STORPIRTIS, 2007). A partir dos dados do perfil de dissolução determina-se o tempo máximo dentro do qual deve ser dissolvida a quantidade mínima, em porcentagem da substância ativa. Frequentemente, as farmacopeias determinam que não menos que 80% da quantidade rotulada (Q) deve estar dissolvida após o tempo determinado. Para forma farmacêutica de liberação imediata, esse tempo geralmente é entre 30 e 60 minutos (USP 36, 2013).

O guia que regulamenta a avaliação comparativa dos perfis de dissolução no país determina o emprego do Método Modelo Independente Simples, através do cálculo do fator de semelhança (f_2), conforme a equação 5 (BRASIL, 2010). Para a comparação de perfis de dissolução, os perfis devem ser realizados com doze unidades.

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \times \sum_{i=1}^n (R_f - T_t)^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right\}$$

Equação (5)

Onde:

n = número de tempos de coleta considerados para fins de cálculo de f_2 ;

Rt = valor da porcentagem dissolvida no tempo t, obtido com o medicamento referência;

Tt = valor da porcentagem dissolvida do medicamento teste, no tempo t.

O cálculo do f_2 permite avaliar a similaridade de cada par de valores, em cada ponto da curva, obtidos com o medicamento teste e referência. Para realizar o cálculo do f_2 , o número de pontos de coleta deve ser representativo do processo de dissolução, até que se obtenha um platô na curva. Sendo obrigatória a quantificação de amostras de, no mínimo, cinco tempos, em que devem ser utilizados, no mínimo, os três primeiros pontos, excluindo o tempo zero. Além disto, só pode ser incluído um ponto da curva após os medicamentos atingirem a média de 85% de dissolução. Os tempos devem ser os mesmos para as duas formulações avaliadas. O cálculo do f_2 não é aplicado para formulações de liberação imediata que apresentam dissolução muito rápida, ou seja, mais de 85% em 15 minutos, por perder o seu poder discriminativo. Dois perfis são considerados semelhantes quando o valor de f_2 estiver entre 50-100 (BRASIL, 2010).

Os Modelos matemáticos dependentes, baseados em funções matemáticas distintas, também podem ser aplicados na avaliação da cinética de dissolução de fármacos. Existem vários modelos, como por exemplo, o de zero ordem, primeira ordem, Higuchi, Hixson-Crowell e Weibull, conforme descrito na Tabela 2. Os modelos são empregados para descrever os mecanismos de liberação do fármaco a partir da sua forma farmacêutica, assim como para representar os perfis de dissolução dos mesmos.

Os perfis de dissolução dos produtos, também, podem ser comparados pela determinação da eficiência de dissolução (ED%), que pode ser definida como a área sob a curva de dissolução em um determinado intervalo de tempo (SERRA & STORPIRTIS, 2007).

Tabela 2. Características relevantes de alguns modelos matemáticos dependentes.

Ordem/Modelo	Equação	Características relevantes dos modelos
Zero ordem	$Q_t = Q_0 - K_0 t$	As formas farmacêuticas que seguem este perfil liberam a mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo (COSTA & LOBO, 2001).
Primeira ordem	$\ln Q_t = \ln Q_0 - K_1 t$	A quantidade de fármaco liberado no meio de dissolução é proporcional à quantidade que resta no seu interior, por unidade de tempo. (COSTA, 2002).
Higuchi	$Q_t = K_H t^{1/2}$	A liberação do fármaco é baseada na lei de Fick (difusão) e é dependente da raiz quadrada do tempo (PAUL, 2011).
Hixson-Crowell	$W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = K_c t$	Considera que a área de uma partícula é proporcional à raiz cúbica do seu volume. O perfil de liberação provém da diminuição da superfície das partículas de fármaco à medida que a dissolução ocorre (SINKO, 2008).
Weibull	$\log[-\ln(1-m)] = \beta \log(t - T_i) - \log \alpha$	Demonstra a fração cumulativa do fármaco na solução em determinado tempo (MANADAS et al., 2002).

Q_t - quantidade de fármaco liberado no tempo t ; Q_0 - quantidade inicial de fármaco em solução; f_t - quantidade de fármaco liberado no tempo t por unidade de superfície; K_0 , K_1 , K_H - constantes de liberação de: zero ordem, primeira ordem, Higuchi respectivamente; K_s - constante de integração da relação superfície volume; W_0 - quantidade inicial de fármaco na forma farmacêutica; W_t - quantidade remanescente de fármaco na forma farmacêutica no tempo t ; m - massa do fármaco; β - parâmetro de forma da curva; α -parâmetro de escala (COSTA & LOBO, 2001; MANADAS et al., 2002; ROSSI et al., 2011).

3.4.3 Desenvolvimento de método de dissolução

Para o desenvolvimento de um método de dissolução é essencial o conhecimento das características físico-químicas do fármaco, como a solubilidade em função do pH do meio. A forma farmacêutica, a via de administração e o tipo de mecanismo de liberação do fármaco, também, devem ser considerados (VAGHELA et al., 2011). A etapa do desenvolvimento do método deve ser estudada e avaliada, antes da definição do método final, para fornecer uma visão ampla dos fatores que potencialmente possam afetar a dissolução do fármaco em estudo.

As condições desenvolvidas para o teste devem ser próximas à fisiológica, de modo que os dados obtidos com o teste possam prever o desempenho *in vivo* do medicamento. Para isso, o meio de dissolução utilizado deve estar na faixa de pH de 1,2 a 6,8. No entanto, outras faixas de pH podem ser requeridas e, quando utilizadas, devem ser justificadas (BRASIL, 2010; USP 36, 2013). O uso de tensoativo ao meio é permitido para aumentar a dissolução de fármacos pouco solúveis em meios aquosos. Diferentes concentrações devem ser testadas para identificar a concentração mínima necessária de tensoativo para obter a condição *sink* (USP 36, 2013). Atualmente, novas formulações de meios de dissolução que mimetizam as propriedades do trato gastrointestinal têm sido desenvolvidas e estudadas. Esses meios apresentam componentes, como por exemplo, o ácido taurocólico (sal biliar) e lecitina (fosfolípido endógeno) em níveis correspondentes àquelas encontradas no trato gastrointestinal, tanto no estado de jejum como no alimentado (MARQUES et al., 2011). Esses tipos de meios vêm sendo utilizados pelo fato de que meios aquosos nem sempre fornecem um indicativo da solubilidade do fármaco no trato gastrointestinal e podem, portanto, levar a uma subestimativa de sua biodisponibilidade oral (DRESSMAN et al., 2007).

Recomenda-se que o teste de dissolução seja conduzido em condição *sink*. A condição *sink* é definida como no mínimo três vezes o volume de meio de dissolução necessário para obter uma solução saturada do fármaco. Essa condição é recomendada com o objetivo de evitar que a velocidade de dissolução seja influenciada pela aproximação da concentração de saturação durante o teste (BROWN et al., 2004). A quantidade de meio de dissolução recomendada pode variar de 500 mL a 1000 mL, sendo 900 mL o volume mais utilizado. A temperatura do meio deve ser mantida constante a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante todo o teste.

O equipamento de dissolução utilizado deve estar verificado e qualificado de acordo com as especificações farmacopeicas estabelecidas nos capítulos gerais para o teste de dissolução (BRASIL, 2010; USP 36, 2013). Os filtros empregados nos procedimentos de coleta de amostras, também, devem ser avaliados na etapa de desenvolvimento, com o objetivo de verificar se são adequados à substância ativa e à forma farmacêutica em estudo (STORPIRTIS et al., 2009; USP 36, 2013).

Outro fator importante é o desenvolvimento de métodos de dissolução discriminativos, capazes de distinguir mudanças nas formulações ou nos processos de fabricação que podem afetar a qualidade do produto e até o desempenho *in vivo*. Existem diferentes formas de desafiar o poder discriminatório do método, uma delas é comparar perfis de dissolução de

formulações que são intencionalmente formuladas com variações significativas nas etapas críticas de fabricação (BROWN et al., 2004).

O método de dissolução é considerado um teste de desempenho (categoria III) e para métodos classificados nesta categoria os parâmetros de validação preconizados são linearidade, especificidade, precisão e exatidão (BRASIL, 2003; ICH 2005; USP 36, 2013). A validação do método de dissolução deste trabalho foi conduzida de acordo com as normas ICH Q2(R1) 2005 e o capítulo geral da Farmacopeia Americana <1092> The dissolution procedure: development and validation (USP 36, 2013).

3.4.4 Dissolução de suspensões orais

O ensaio de dissolução para sólidos orais de liberação imediata como comprimido e cápsula é bem estabelecido. No entanto, as diferentes características das diversas formas farmacêuticas requerem muitas vezes procedimentos, aparatos e técnicas especiais para avaliar a dissolução do fármaco de uma forma farmacêutica (SIEWERT et al., 2003). Desta forma, nos últimos anos o ensaio de dissolução foi expandido para outras formas farmacêuticas, como as suspensões.

Vários fatores podem interferir com a dissolução do fármaco a partir de suspensões. Entre esses fatores estão a forma do cristal, a formação de complexos entre o fármaco e o agente suspensor, o tamanho de partícula do sólido, a viscosidade do produto e os excipientes (AULTON, 2005, FONSECA, 2007). Nas suspensões o tamanho reduzido das partículas produz uma grande área superficial do fármaco disperso. Consequentemente, fármacos nessa forma farmacêutica apresentam velocidade de dissolução mais rápida, se comparado às formas farmacêuticas sólidas. Já o aumento da viscosidade do sistema pode adiar a dissolução, devido ao coeficiente de difusão do fármaco diminuir em função do aumento da viscosidade (SINKO, 2008). Os excipientes da formulação, também, podem alterar a velocidade de dissolução de suspensões, como por exemplo, os tensoativos que são utilizados como agentes molhantes ou estabilizantes de suspensões e tendem, portanto, a favorecer a dissolução (MARCOLONGO, 2003).

Com relação ao teste de dissolução, o aparato de dissolução recomendado para suspensões é a pá, usando um meio de dissolução aquoso. A velocidade de agitação e a introdução da amostra devem ser selecionadas com base na viscosidade das suspensões (VAGHELA et al., 2011). Velocidades de agitação mais altas podem ser necessárias para suspensões mais viscosas, para impedir a sedimentação e o acúmulo do fármaco na parte

inferior da cuba, bem como para facilitar a discriminação de diferentes lotes ou formulações. Estudos indicam a velocidade de agitação de 50 e 100 rpm para esta forma farmacêutica (BROWN et al, 2011). A USP 36 (2013) recomenda a velocidade de agitação de 25 e 50 rpm para suspensões. A velocidade de 25 rpm geralmente é indicada para suspensões com baixa viscosidade (SIEWERT et al., 2003).

A forma de introdução da amostra no meio de dissolução influencia no perfil de dissolução e varia de acordo com o tipo de produto e, por isso, deve ser avaliada (STORPIRTIS et al., 2009). Para amostras pouco viscosas a introdução na cuba pode ser com o auxílio de uma pipeta volumétrica. As amostras podem ser adicionadas com o auxílio de uma seringa quando as suspensões forem viscosas, desta forma a quantidade adicionada é determinada por diferença de peso (SIEWERT et al., 2003). Um acessório, não oficial, para a introdução de suspensões é disponibilizado comercialmente, pela Agilent Technologies, e é denominado de *suspension cup* (copo de suspensão). Este acessório permite que a amostra seja pesada diretamente no copo de inserção e, desta forma, permaneça retida neste acessório ao ser introduzido na cuba, o que proporciona uma área de superfície controlada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.2 Material

4.1.1 Equipamentos e acessórios

- Analisador de tamanho de partícula Mastersizer 2000 – Malvern[®], unidade de medida Hydro SM;
- Balança analítica Shimadzu[®], modelo AY220;
- Banho Metabólico tipo Dubnoff com Agitação Orbital SOLAB[®];
- Coluna Cromatográfica Nucleodur[®] 100-5 C18 4,0 x 150 mm;
- Coluna Cromatográfica Shim-pack[®] CLC-C8 (M), 4,6 mm x 250 mm, partículas de 5 µm;
- Coluna Acquity UPLC[®] BEH C18, 2,1 mm × 50 mm, partículas de 1,7 µm;
- Cromatógrafo líquido Prominence Shimadzu[®], equipado com bomba LC-20AT, auto-injetor SIL-20A, detector PDA SPD-20AT, forno de coluna CTO-20A e *software* LC Solution V. 1.24 SP1;
- Cromatógrafo líquido *ultrafast* e espectrômetro de massa XEVO G2 (ionizador electrospray e analisador de massas Quadrupolo-Time-of-fly (QTOF), Waters[®]);
- Dissolutor Varian[®] Modelo VK 7000 composto de 8 cubas, bomba peristáltica bidirecional VK 750D, banho e circulador /aquecedor VK, com coletor manual;
- Espectrômetro infravermelho Perkin Elmer[®] com transformada de Fourier (FT-IR/FT-NIR spectrometer), modelo Spectrum 400 com acessório de refletância total atenuada (Universal ATR Sampling Accessory, Perkin Elmer[®]);
- Espectrofotômetro UV-Vis Perkin Elmer[®], modelo Lambda 35;
- Estufa de ar circulante Nova ética[®];
- Lavadora Ultra-Sônica Unique[®], modelo USC 2850;
- Potenciômetro HANNA[®], modelo 2220;
- Ponto de Fusão Buchi[®], modelo B-540;
- Sistema Milli-Q Millipore[®] de purificação de água;
- Viscosímetro BROOKFIELD[®], modelo DV-II.

4.1.2 Reagentes

Os reagentes utilizados foram:

- Água ultrapura;
- Água destilada;
- Acetonitrila grau HPLC - Merck;
- Acetona p.a - Synth;
- Acetato de sódio triidratado p.a - Synth;
- Ácido acético glacial p.a - Vetec;
- Ácido clorídrico p.a - Vetec;
- Ácido fórmico - Merck;
- Ácido ortofosfórico 85% - Merck;
- Ácido benzóico p.a - Synth;
- Ácido perclórico p.a - Vetec;
- Álcool etílico p.a - Qhemis;
- Álcool metílico p.a - Química Moderna;
- Álcool metílico grau HPLC - Merck;
- Álcool octílico (N) p.a - Synth;
- Anidrido acético - Spectrum;
- Cloreto de sódio p.a - Vetec;
- Clorofórmio p.a - Labimpex;
- Cristal violeta - Synth;
- Fosfato de sódio monobásico anidro p.a - Synth;
- Fosfato de potássio monobásico anidro p.a - Nuclear;
- Hidróxido de sódio p. a - Vetec;
- Lauril Sulfato de Sódio - Nuclear;
- Pepsina ultra pura - Vetec;
- Peróxido de Hidrogênio - Fmaia;
- Polissorbato 80 - Synth;
- Trietilamina - Vetec.

4.1.3 Matéria-prima e produtos farmacêuticos

A matéria-prima Benzoilmetronidazol com teor declarado de 99,60%, de fabricação 07/04/2010 e validade 06/04/2015 foi fornecida pela empresa farmacêutica Prati-donaduzzi Ltda. A matéria-prima Metronidazol foi adquirida da empresa Henrifarma. Os medicamentos utilizados no estudo foram adquiridos no comércio local, na forma farmacêutica suspensão oral e estão descritos a seguir:

- Medicamento referência: Flagyl[®] 4% pediátrico suspensão oral, fabricado pela Sanofi-Aventis Farmacêutica. Fabricação: 11/2012; Validade: 10/2015.
Excipientes: fosfato de sódio monobásico anidro, metilparabeno, propilparabeno, silicato de alumínio e magnésio, álcool etílico 96 °C, sacarina sódica di-hidratada, essência de limão, essência de laranja, sacarose líquida e água purificada.
- Benzoilmetronidazol 40mg/mL Genérico EMS. Fabricação: 10/2012; Validade: 10/2014.
Excipientes: silicato de alumínio e magnésio, sorbato de potássio, sacarina sódica, essência de damasco, óleo de rícino hidrogenado e etoxilado, corante amarelo tartrazina 5, carmelose sódica, ciclamato de sódio, benzoato de sódio, álcool etílico, ácido cítrico, água purificada.
- Benzoilmetronidazol 40mg/mL Genérico TEUTO. Fabricação: 12/2012; Validade 12/2014.
Excipientes: água de osmose reversa, álcool etílico, aroma de pêssego, carmelose sódica, ciclamato de sódio, corante amarelo crepúsculo, metilparabeno, polissorbato 80, propilparabeno, sacarina sódica, dióxido de silício e sorbitol.
- Benzoilmetronidazol 40mg/mL Genérico Neo Química. Fabricação: 07/2012; Validade: 07 /2014.
Excipientes: metilparabeno, propilparabeno, sacarina sódica, álcool etílico 96°GL, dióxido de silício, ciclamato de sódio, carboximetilcelulose, sorbitol, essência de limão, polissorbato 80, silicone, antiespumante, glicerina bi-destilada líquida e água purificada.

- Benzoilmetronidazol 40mg/mL Genérico Prati-Donaduzzi. Fabricação: 06/2013; Validade: 06/2015.
Excipientes: carmelose sódica, metilparabeno, propilparabeno, sorbitol 70%, corante vermelho de eritrosina, aroma de morango solido, polissorbato 80, sacarose refinada e água purificada.
- Flagimax[®] Suspensão, fabricado pela BELFAR indústria farmacêutica. Fabricação: 08/2012; Validade: 08 /2014.
Excipientes: celulose coloidal, glicerol, metilparabeno, propilparabeno, sacarina sódica, aroma de limão, polissobarto 80, álcool etílico, água purificada.

4.2 Métodos

4.2.1 Caracterização da matéria-prima

Com o objetivo de utilizar a matéria-prima de BMZ como Substância Química de Referência (SQR) foram realizadas análises para sua caracterização. As análises de determinação quantitativa, faixa de fusão, perda por dessecação e espectroscopia de absorção no ultravioleta foram realizadas conforme o preconizado na monografia de BMZ matéria-prima da Farmacopeia Brasileira (2010).

4.2.1.1 Determinação da faixa de fusão

Uma pequena quantidade de pó da matéria-prima foi introduzida em três tubos capilares, que foram colocados na célula de aquecimento do equipamento. Procedeu-se a observação do pó até sua fusão. As temperaturas correspondentes ao início e ao final da fusão foram registradas.

4.2.1.2 Perda por dessecação

Este ensaio foi realizado pelo método gravimétrico. Pesou-se aproximadamente 1 g da matéria-prima BMZ, que foi seca em estufa a 80 °C, por 3 horas. As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.1.3 Análise quantitativa

A determinação do teor de BMZ matéria-prima foi realizada por volumetria em meio não aquoso. Pesou-se 250 mg de BMZ matéria-prima e transferiu-se para erlenmeyer de 250 mL. Adicionou-se 50 mL de anidrido acético e três gotas de cristal violeta SI. Titulou-se com ácido perclórico 0,1M SV até mudança de cor para verde-azulado. Cada mL de ácido perclórico 0,1M SV equivale a 27,526 mg de BMZ. A análise foi realizada em triplicata, por dois dias consecutivos (n=6).

4.2.1.4 Identificação da matéria-prima

4.2.1.4.1 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta (UV)

O espectro de absorção de uma solução de BMZ em ácido clorídrico 1M, na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi obtido em espectrofotômetro UV/Vis. A faixa de comprimento de onda utilizada foi de 200 nm a 400 nm, utilizando-se cubetas de quartzo com 1 cm de percurso óptico. As bandas de absorção máxima foram registradas.

4.2.1.4.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho médio (IV)

O espectro de absorção no IV foi obtido em espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier composto com acessório de refletância total atenuada (FT-IR/FT-NIR). A amostra, sem prévio tratamento, foi colocada sobre o acessório e o espectro foi coletado com resolução de 4 cm^{-1} e 16 números de leituras realizadas (scan). A análise foi realizada no Laboratório de Química Industrial e Ambiental (LAQIA) da Universidade Federal de Santa Maria em colaboração com o Professor Doutor Érico Marlon de Moraes Flores.

4.2.1.4.3 Espectrometria de massas (MS)

A determinação do espectro de massas do BMZ foi realizada em LC-MS/MS composto por cromatógrafo líquido *ultrafast* e espectrômetro de massa XEVO G2. As análises foram realizadas com o emprego de uma coluna Acquity UPLC BEH C18 (2,1 mm \times 50 mm, 1,7 μm) a 30 °C, utilizando fase móvel composta por metanol: água (80:20; v/v)

adicionados de ácido fórmico (0,1%), fluxo de 0,3 mL min⁻¹. O volume de injeção foi de 1,0 µL e a detecção foi realizada no modo positivo (ESI⁺), seguindo as seguintes condições de aquisição:

- Tempo de análise: 5 min;
- Vazão do gás do cone (N₂): 100 L/h;
- Vazão do gás de dessolvatação (N₂): 500 L/h;
- Potencial do capilar: 2500 V;
- Potencial do cone de amostragem: 15 V;
- Potencial do cone de extração: 3,3 V;
- Temperatura da fonte: 150 °C;
- Temperatura de dessolvatação: 300 °C.

A aquisição de massas foi monitorada de 50 a 1000 Da e o controle das análises e aquisição dos dados foi realizada com o *software* MassLynx V 4.1. A análise foi realizada no Laboratório de Química Industrial e Ambiental (LAQIA) da Universidade Federal de Santa Maria em colaboração com o Professor Doutor Érico Marlon de Moraes Flores.

4.2.2 Determinação do coeficiente de partição (*P*)

O coeficiente de partição octanol/água do BMZ foi determinado experimentalmente por solubilização de aproximadamente 200 mg da SQR de BMZ em 50 mL de octanol com posterior adição de 50 mL de água destilada. Em seguida o conteúdo foi transferido para um funil de separação, com homogeneização das fases. Após 24 horas de estabilização, as fases foram coletadas e diluídas em seus respectivos solventes até a concentração de 20 µg mL⁻¹. A quantificação da concentração de BMZ foi determinada por espectroscopia no UV, no comprimento de onda de 280 nm, com amostras preparadas em triplicata. O coeficiente de partição foi representado pelo logaritmo de base 10 da relação entre a concentração de fármaco nas fases octanólica e aquosa, Log*P* [octanol/água]. Em conjunto com a determinação experimental, o log *P* teórico para o fármaco foi determinado por modelagem molecular, com utilização do *software* Chem3D Ultra 8.0 (Cambridge Soft, UK).

4.2.3 Desenvolvimento de método para a quantificação de BMZ em suspensão oral por CLAE

Na etapa do desenvolvimento do método por CLAE para a quantificação de BMZ em suspensão oral foram testadas as condições cromatográficas descritas na Tabela 3. Essas condições foram baseadas na monografia do fármaco presente na Farmacopeia Brasileira (2010) e no método desenvolvido por Bempong et al. (2005), com modificações. Objetivou-se desenvolver nesta etapa um método indicativo de estabilidade, considerando que o BMZ apresenta como possíveis produtos de degradação o ácido benzóico (AB) e o metronidazol (MTZ) (BEMPONG et al., 2005; VU et al., 2008). Neste sentido, foram injetadas soluções de BMZ SQR, amostra de BMZ suspensão oral e soluções das matérias-primas AB e MTZ, com a finalidade de demonstrar que o método pode identificar e quantificar o BMZ na presença de seus produtos de degradação. As soluções foram preparadas em metanol e água (50:50; v/v), na concentração final de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Para a análise utilizou-se CLAE equipado com detector por arranjos de diodos (DAD) contendo degaseificador e injetor automático. A aquisição dos dados foi realizada através do *software* LC Solution. As fases móveis foram filtradas, sob vácuo, em membrana de *nylon* de diâmetro do poro de $0,45 \mu\text{m}$ e degaseificadas em banho de ultrassom por 30 minutos. As análises foram realizadas em temperatura ambiente. Para reprodução dos métodos descritos na literatura, o comprimento de onda utilizado foi conforme o especificado nos métodos. Entretanto, para as outras condições testadas o comprimento de onda mais adequado foi determinado a partir da realização de varredura nos comprimentos de ondas de 200 a 400 nm. Os parâmetros cromatográficos para o BMZ como tempo de retenção, fator de cauda, pratos teóricos, resolução e fator de capacidade foram avaliados e levados em consideração para a escolha do método analítico mais adequado.

Tabela 3. Condições cromatográficas testadas durante o desenvolvimento de método por CLAE para a quantificação de BMZ em suspensão oral.

Condição	Fase móvel	Coluna	Fluxo (mL/min)	Volume de injeção (µL)	λ (nm)
1 ^a	MeOH:H ₂ O (50:50)	Nucleodur [®] C18, 5 µm 4,0 x 150 mm	0,8	20	254
2	MeOH:H ₂ O (60:40)	Nucleodur [®] C18, 5 µm 4,0 x 150 mm	0,6	20	254
3	ACN:H ₂ O (50:50)	Nucleodur [®] C18, 5 µm 4,0 x 150 mm	0,8	20	254
4	ACN:H ₂ O (40:60)	Nucleodur [®] C18, 5 µm 4,0 x 150 mm	1,0	20	254
5 ^b	ACN:0,1% Ác. Acético em TFPM 0,01M (40:60)	Shim-pack [®] CLC-C8 5 µm, 4,6 x 250 mm	1,0	20	271
6	ACN:0,1% Ác. Acético em TFPM 0,01M (40:60)	Nucleodur [®] C18,5 µm 4,0 x 150 mm	1,0	20	271
7	Ác. fosfórico 0,1% pH 3,0: MeOH (50:50)	Nucleodur [®] C18, 5 µm 4,0 x 150 mm	1,0	10	235
8	Ác. fosfórico 0,1% pH 3,0: MeOH (40:60)	Nucleodur [®] C18, 5 µm 4,0 x 150 mm	1,0	10	235
9	Ác. fosfórico 0,1% pH 5,0: MeOH (50:50)	Nucleodur [®] C18, 5 µm 4,0 x 150 mm	1,0	10	235

^aFARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; ^bBEMPONG et al., 2005.

4.2.4 Validação do método de quantificação de BMZ em suspensão oral por CLAE

A validação do método para a quantificação de BMZ em suspensão oral por CLAE foi realizada segundo as diretrizes da Resolução n^o 899, de 29 de maio de 2003, da ANVISA, o Guia do International Conference on Harmonisation, ICH-Q2(R1) (2005) e o Capítulo Geral da Farmacopeia Americana <1225> Validation of Compendial Procedures (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 36, 2013). Os parâmetros avaliados foram: Especificidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez do método.

4.2.4.1 Especificidade

A capacidade de um método em detectar um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz, é definida como especificidade (BRASIL, 2003).

A especificidade foi determinada através da avaliação da possível interferência dos excipientes e de potenciais produtos de degradação na detecção e quantificação do BMZ (SHAH et al., 2008). Com o intuito de demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente, determinou-se a pureza de pico para o fármaco utilizando DAD.

4.2.4.1.1 Avaliação da interferência dos excipientes da formulação

A possível interferência dos excipientes na quantificação de BMZ por CLAE foi determinada pela avaliação dos perfis cromatográficos de BMZ SQR, amostra de BMZ suspensão oral e da amostra simulada de excipientes.

- **Preparo da amostra simulada de excipientes**

Para o seu preparo, foram utilizados os excipientes descritos na bula do medicamento referência. As concentrações utilizadas foram com base na especificação máxima de cada excipiente, obtida na literatura (KIBBE, 2000) e calculadas para o volume de 100 mL de formulação. Os excipientes utilizados foram fosfato de sódio monobásico anidro, metilparabeno, propilparabeno, silicato de alumínio e magnésio, álcool etílico 96 °C, sacarina sódica di-hidratada, essência de limão, essência de laranja, sacarose líquida e água purificada.

- **Preparo da solução contendo amostra simulada de excipiente**

Procedeu-se a determinação da densidade da amostra simulada de excipiente em picnômetro, e pesou-se o equivalente a 2,0 mL em balão volumétrico de 50 mL. Adicionou-se 30 mL do diluente metanol: água (50:50; v/v) e levou-se ao banho de ultrassom por 20 minutos e completou-se o volume com o diluente. Pipetou-se 2,0 mL para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com metanol:água (50:50; v/v). Filtrou-se a solução em filtro de membrana de *nylon* de 0,45 µm antes das injeções.

- **Preparo da solução contendo padrão de BMZ**

Pesou-se cerca de 40 mg de BMZ SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se cerca de 15 mL de metanol: água (50:50; v/v) e levou-se ao banho de ultrassom por 20 minutos ou até a completa solubilização. Completou-se o volume com o diluente e pipetou-se 2,0 mL para balão volumétrico de 50 mL. Completou-se o volume com metanol: água (50:50; v/v), obtendo-se uma solução de $64 \mu\text{g mL}^{-1}$ de BMZ. Filtrou-se a solução em filtro de membrana de *nylon* de 0,45 μm antes das injeções.

- **Preparo da solução contendo BMZ suspensão oral**

Procedeu-se a determinação da densidade da amostra em picnômetro e pesou-se o equivalente a 2,0 mL da amostra (equivalente a 80 mg de BMZ) em balão volumétrico de 50 mL. Adicionou-se 30 mL de metanol: água (50:50; v/v) e levou-se ao banho de ultrassom por 20 minutos e completou-se o volume com o diluente. Pipetou-se 2,0 mL para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com metanol: água (50:50; v/v), obtendo-se uma solução de $64 \mu\text{g mL}^{-1}$ de BMZ. A solução foi filtrada antes das injeções.

4.2.4.1.2 Avaliação da interferência de potenciais produtos de degradação

Soluções de BMZ SQR foram submetidas a condições de hidrólise ácida e básica, oxidação, degradação térmica e fotólise, com o intuito de formar produtos de degradação e avaliar prováveis interferências na determinação e quantificação de BMZ por CLAE. O preparo das soluções está descrito a seguir:

- **Solução estoque de BMZ**

Foram pesados 320 mg de BMZ SQR em balão volumétrico de 50 mL e adicionados 30 mL de metanol. Esta solução foi levada ao banho de ultrassom por 20 minutos ou até a completa solubilização e o volume foi completado com metanol ($6,4 \text{ mg mL}^{-1}$).

- **Hidrólise ácida**

Pipetou-se 1,0 mL da solução estoque de BMZ para balão volumétrico de 10,0 mL e completou-se o volume com HCl 0,1M. Esta solução foi levada ao refluxo a 80 °C, por 4 horas ($640 \mu\text{g mL}^{-1}$). Após este período, pipetou-se 1,0 mL para balão volumétrico de 10,0 mL e neutralizou-se a solução com 1,0 mL de NaOH 0,1M, completando-se o volume com metanol:água (50:50; v/v), obtendo-se uma solução de concentração de $64 \mu\text{g mL}^{-1}$. Filtrou-se a solução em filtro de membrana de *nylon* de 0,45 μm antes das injeções. Preparou-se uma solução controle para a análise do tempo zero. As soluções foram preparadas em duplicata.

- **Hidrólise básica**

Pipetou-se 1,0 mL da solução estoque de BMZ para balão volumétrico de 10,0 mL e completou-se o volume com NaOH 1M. Esta solução foi levada ao refluxo a 80°C, por 4 horas. Após este período, pipetou-se 1,0 mL para balão de 10 mL, neutralizou-se com 1,0 mL de HCl 1M e completou-se o volume com metanol:água (50:50; v/v), obtendo-se uma solução de concentração de $64 \mu\text{g mL}^{-1}$ de BMZ. Filtrou-se a solução em filtro de membrana de *nylon* de 0,45 μm antes das injeções. Preparou-se uma solução controle para a análise do tempo zero. As soluções foram preparadas em duplicata.

- **Oxidação com peróxido de hidrogênio**

Pipetou-se 1,0 mL da solução estoque de BMZ em balão volumétrico de 10,0 mL e completou-se o volume com peróxido de hidrogênio 10%. Esta solução foi deixada em repouso por 24 horas ao abrigo da luz. Após este período, pipetou-se 1,0 mL em balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com metanol:água (50:50; v/v) obtendo-se uma solução de concentração de $64 \mu\text{g mL}^{-1}$ de BMZ. Filtrou-se a solução em filtro de membrana de *nylon* de 0,45 μm antes das injeções. Preparou-se uma solução controle para a análise do tempo zero. As soluções foram preparadas em duplicata.

- **Degradação térmica**

Pipetou-se 1,0 mL da solução estoque de BMZ em balão volumétrico de 10,0 mL e completou-se o volume com metanol:água (50:50; v/v). Esta solução foi mantida em repouso por 24 horas, em estufa pré-aquecida a 55 °C. Após este período, pipetou-se 1,0 mL em balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com metanol:água (50:50; v/v), obtendo-se uma solução de 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de BMZ. Filtrou-se a solução em filtro de membrana de *nylon* de 0,45 μm antes das injeções. Preparou-se uma solução controle para a análise do tempo zero.

- **Fotólise**

Pipetou-se 1,0 mL da solução estoque de BMZ para balão volumétrico de 10,0 mL e completou-se o volume com acetonitrila. A solução foi transferida para cubeta de quartzo e mantida em câmara horizontal de vidro espelhada internamente (80 x 25 x 35cm) com lâmpada TUV 30W/G30 T8, 254 nm, Starlux®, por 4 horas. Após este período, alíquota de 1,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com metanol:água (50:50; v/v), obtendo-se uma solução de 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de BMZ. Filtrou-se a solução em filtro de membrana de *nylon* de 0,45 μm antes das injeções. Preparou-se uma solução controle para a análise do tempo zero, sob as mesmas condições e protegidas da luz. As soluções foram preparadas em duplicata.

4.2.4.2 Linearidade

A linearidade do método foi verificada através do preparo de curva de calibração com cinco níveis de concentração, em triplicata. Para o preparo da curva, pesou-se o equivalente a 40,0 mg de BMZ SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL. Adicionou-se 70 mL de metanol:água (50:50; v/v) e levou-se ao banho de ultrassom por 20 minutos ou até a completa solubilização. Completou-se o volume com o diluente, obtendo-se solução de concentração de 400,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Com o auxílio de uma bureta, transferiu-se para balão de 25 mL alíquotas de 1,5; 3,0; 4,0; 5,5 e 7,0 mL. Os volumes foram completados com metanol:água (50:50; v/v), obtendo-se soluções com concentrações de 24,0; 48,0; 64,0; 88,0 e 112,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. As soluções foram filtradas em filtro de membrana de *nylon* de 0,45 μm antes das injeções.

A curva de calibração padrão foi obtida relacionando-se os valores da área do pico em função da concentração de BMZ nas soluções correspondentes. Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente, através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e análise de variância (ANOVA) com confiabilidade de 95% ($p < 0,05$) com auxílio do *software* Microsoft[®] Excel 2010.

4.2.4.6 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados com base no desvio padrão da resposta e da inclinação da curva de calibração, conforme as fórmulas $3,3\sigma/s$ e $10\sigma/s$, respectivamente. Onde σ é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y e s é a inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

4.2.4.7 Precisão

Avaliou-se a repetibilidade e a precisão intermediária do método através do preparo de seis soluções da amostra do medicamento referência de BMZ suspensão oral na concentração de $64 \mu\text{g mL}^{-1}$, em três dias consecutivos. O desvio padrão relativo (DPR) dos resultados foi calculado e o método foi considerado preciso para valores dos DPR inferiores a 2,0% (USP 36, 2013).

4.2.4.8 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através do teste de recuperação, o qual relaciona a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (BRASIL, 2003). O teste foi determinado pela adição de solução de BMZ SQR à solução amostra simulada de excipientes, nas concentrações de 80, 100 e 120% da concentração teórica. Cada concentração foi preparada em triplicata.

4.2.4.6 Robustez

A robustez foi avaliada através da resposta do método a pequenas modificações produzidas nas condições cromatográficas. Para tanto, realizou-se delineamento do experimento, através de planejamento fatorial do tipo 2^3 . Neste tipo de planejamento, os

fatores fluxo da fase móvel, temperatura da coluna e proporção dos constituintes da fase móvel foram modificados em dois níveis (um nível alto, codificado pelo sinal positivo e um nível baixo, codificado pelo sinal negativo). A Tabela 4 apresenta os fatores e níveis estabelecidos para o delineamento do experimento descrito na Tabela 5. O teor do fármaco e os parâmetros cromatográficos, tempo de retenção e fator de cauda do BMZ, foram determinados para a avaliação da robustez do método.

Tabela 4. Fatores e níveis estabelecidos para o planejamento fatorial 2^3 para avaliação da robustez do método analítico.

Fatores	Níveis		
	Baixo (-)	Central	Alto (+)
1-Fluxo da FM (mL)	0,9	1,0	1,1
2-Temperatura da coluna (°C)	20	25	30
3-Proporção dos constituintes da FM	47,50:52,50 MeOH: Ác.fosfórico 0,1% pH 3,0	50:50 MeOH: Ác.fosfórico 0,1% pH 3,0	52,50:47,50 MeOH: Ác.fosfórico 0,1% pH 3,0

Tabela 5. Delineamento experimental por planejamento fatorial 2^3 para avaliação da robustez do método analítico.

Experimentos	Fator 1	Fator 2	Fator 3
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

4.2.5 Caracterização geral das amostras comerciais

Realizou-se a caracterização dos seis produtos farmacêuticos utilizados no trabalho. As suspensões orais foram caracterizadas através da determinação do teor, pH, densidade, tamanho de partícula e avaliação reológica. As amostras incluem o medicamento referência,

quatro medicamentos genéricos e um medicamento similar, que foram representados por letras de A a F.

4.2.5.1 Doseamento de BMZ em amostras comerciais

As amostras foram preparadas de acordo com o descrito em preparo de solução de BMZ suspensão oral (item 4.2.4.1.1), em triplicata, e foram analisadas conforme método validado descrito no item 5.4.

Uma curva de calibração em três níveis foi preparada para a determinação do teor. Os resultados foram expressos em porcentagem de princípio ativo em relação ao valor declarado.

4.2.5.2 Determinação de pH e densidade relativa

O pH das suspensões foram avaliados em triplicata, em potenciômetro previamente calibrado, com soluções tampão pH 7,0 e pH 4,0, à temperatura ambiente.

A densidade relativa foi determinada pelo método do picnômetro, à temperatura de 20 °C (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

4.2.5.3 Tamanho de partícula

A avaliação do tamanho de partículas e distribuição granulométrica das amostras foi realizada utilizando a técnica de difração a laser. O ângulo de difração do laser é inversamente proporcional ao tamanho da partícula por ele incidida. O tamanho em diâmetro é obtido quando a luz do laser passa pelas partículas e é difratada a um determinado ângulo.

O equipamento empregado (*Mastersizer 2000* - Malvern®) apresenta velocidade de aquisição de dados de 1 kHz e faixa de leitura do tamanho das partículas de 0,02-2000 µm. Foi utilizada a unidade de dispersão para amostras líquidas, *Hydro SM* – Malvern®, que permite analisar partículas em suspensão, utiliza pequeno volume de amostra e provoca uma recirculação da mesma em frente ao feixe do laser. O meio dispersante utilizado foi água destilada com agitação de 1500 rpm. As seis amostras de suspensão oral de BMZ foram analisadas e os resultados foram processados pelo *software Mastersizer 2000* versão 5.6. Os dados de distribuição do tamanho de partícula foram apresentados na forma de $d_{10\%}$, $d_{50\%}$ e $d_{90\%}$ e referem-se à média dos diâmetros de partículas nos intervalos abaixo de 10, 50 e 90% na curva de distribuição de tamanho.

4.2.5.4 Avaliação reológica

O comportamento reológico das diferentes suspensões de BMZ foram realizados em viscosímetro rotacional Brookfield, modelo DV-II+ PRO, utilizando o *software* Rheocalc 3.2 (Brookfield Engineering Labs) e a agulha (spindle) SC4-21. Foram feitas dez leituras nas velocidades 15, 30, 60, 90, 100, 115, 130, 145, 160 e 175 rpm, com intervalo de 15 segundos entre as mesmas e nos sentidos crescente e decrescente das velocidades. O reograma de cada produto foi obtido utilizando os dados de tensão e taxa de cisalhamento e utilizados para caracterizar as suspensões quanto ao comportamento reológico. Os produtos foram avaliados usando os modelos: Lei das Potências, Bingham, Casson e Herschel-Bulkley, de acordo com as equações descritas a seguir (ALVES et al., 2005):

- Lei das Potências: $\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n$
- Bingham: $\tau = \tau_0 + \eta\dot{\gamma}$
- Casson: $\tau^{0,5} = \tau_0^{0,5} + \eta^{0,5} \cdot \dot{\gamma}^{0,5}$
- Herschel-Bulkley: $\tau = \tau_0 + K\dot{\gamma}^n$

Onde:

τ_0 =Tensão de cisalhamento inicial;

τ =Tensão de cisalhamento;

η =Viscosidade;

n =Índice de fluxo;

K =Índice de consistência;

$\dot{\gamma}$ =Taxa de Cisalhamento.

4.2.6 Dissolução das suspensões orais de BMZ

4.2.6.1 Teste de solubilidade de BMZ em diferentes meios de dissolução

A avaliação da solubilidade de BMZ SQR em diferentes meios de dissolução foi testada com o objetivo de encontrar um meio que garanta a condição *sink* durante o teste de dissolução. Os meios avaliados foram:

- HCl 0,01M;
- HCl 0,01M com 1,0% LSS;
- HCl 0,1M;
- HCl 0,1M com 0,1% LSS;
- HCl 0,1M com 0,5% LSS;
- HCl 0,1M com 1,0 % LSS;
- HCl 0,1M com 0,1% POL80;
- HCl 0,1M com 0,5% POL80;
- HCl 0,1M com 1,0 % POL80;
- Fluido gástrico (FG) (sem pepsina);
- FG (com pepsina);
- Tampão acetato pH 4,5;
- Tampão acetato pH 4,5 com 1,0% LSS;
- Tampão fosfato pH 5,8;
- Tampão fosfato pH 5,8 com 1,0% LSS;
- Tampão fosfato pH 6,8;
- Tampão fosfato pH 6,8 com 1,0% LSS;
- Fluido intestinal pH 7,5 (sem pancreatina);
- Fluido intestinal pH 7,5 (sem pancreatina) com 1,0% LSS.

Os meios foram preparados conforme a Farmacopeia Americana (USP 36, 2013), com exceção do Fluido intestinal simulado pH 7,5 (sem pancreatina) que foi preparado de acordo com a Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). A composição dos meios está descrita na Tabela 6. O preparo de tampão fosfato pH 5,8 com 1,0 % de LSS e tampão fosfato pH 6,8 com 1,0 % de LSS foi modificado pela substituição de fosfato de potássio por fosfato de sódio, devido à incompatibilidade do LSS com o íon potássio. A concentração máxima de tensoativo usada foi de 1,0%. Os tensoativos foram adicionados à solução antes de completar o volume final e, após, o ajuste de pH, quando o mesmo se fez necessário. O pH dos meios foram avaliados em potenciômetro previamente calibrado.

Tabela 6. Composição dos meios de dissolução.

Meios de dissolução	Composição química
HCl 0,01 M	0,85 mL de HCl para 1000 mL de água destilada.
HCl 0,1M	8,5 mL de HCl para 1000 mL de água destilada.
FG (sem pepsina)	2 g de cloreto de sódio e 7 mL de HCl. Completar o volume para 1000 mL com água destilada. pH de 1,2.
FG (com pepsina)	2 g de cloreto de sódio e 3,2 g de pepsina purificada (com 800 UNI/mg de proteína) e 7 mL de HCl. Completar o volume para 1000 mL com água destilada. pH de 1,2.
Tampão acetato pH 4,5	2,99 g de acetato de sódio triidratado, 14 mL de solução de ácido acético 2N. Completar o volume para 1000 mL com água destilada.
Tampão fosfato pH 5,8	50 mL de solução de fosfato de potássio monobásico e 3,6 mL de NaOH 0,2N. Completar o volume para 200 mL com água destilada.
Tampão fosfato pH 6,8	50 mL de solução de fosfato de potássio monobásico e 22,4 mL de NaOH 0,2N. Completar o volume para 200 mL com água destilada.
Fluido intestinal simulado pH 7,5 sem pancreatina	6,8 g de fosfato de potássio monobásico e 77 mL de NaOH 0,2N. Completar o volume para 1000 mL com água destilada.

A solubilidade foi determinada pelo método *shake flask* (BRASIL, 2013). Em um erlemeyer de 250 mL, pesou-se aproximadamente 33,33 mg de BMZ SQR e adicionou-se 50 mL de cada meio de dissolução avaliado. Essa quantidade é equivalente a três vezes a dose do fármaco (200 mg/5 mL) presente na formulação em 900 mL de meio. As soluções foram mantidas por 24 horas, em incubadora com plataforma de agitação orbital, com velocidade de agitação controlada de 100 RPM e temperatura de 37 °C ± 1°C. Após as soluções foram filtradas em papel filtro de faixa preta e do filtrado pipetou-se 1,0 mL para balão volumétrico

de 50 mL, completando o volume com metanol:água (50:50; v/v). As soluções foram filtradas em filtro de membrana de *nylon* de 0,45 μm e, posteriormente, foram quantificadas por CLAE, conforme método descrito no item 5.4. Para a determinação da quantidade de fármaco solubilizado em cada meio avaliado, preparou-se uma curva de calibração com quatro concentrações de BMZ SQR (2,67, 6,67, 13,33 e 16,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O teste foi realizado em triplicata para cada meio avaliado. Foram considerados adequados os meios em que o BMZ apresentou alta solubilidade.

4.2.6.2 Desenvolvimento do método de dissolução

Os testes de dissolução foram realizados em Dissolutor Varian[®] Modelo VK 7000. A escolha dos meios de dissolução a serem testados foi realizada com base nos resultados da solubilidade do BMZ nos meios avaliados. Os meios de dissolução utilizados nos testes foram:

- HCl 0,01M com 1,0% LSS;
- HCl 0,1M;
- HCl 0,1M com 0,1% LSS;
- HCl 0,1M com 0,5% LSS;
- HCl 0,1M com 1,0 % LSS;
- HCl 0,1M com 0,1% POL80;
- HCl 0,1M com 0,5% POL80;
- HCl 0,1M com 1,0 % POL80;
- FG (com pepsina) e FG (sem pepsina);
- Tampão acetato pH 4,5 com 1,0% de LSS.

O volume de meio de dissolução utilizado para cada meio testado foi 900 mL. Os meios sem tensoativo foram desaerados, através do emprego de banho de ultrassom por 20 minutos. Os meios contendo tensoativo não foram desaerados.

Segundo a USP (2013), as condições recomendadas para o estudo de dissolução de suspensões são o aparato 2 (pá) e velocidade de agitação de 25 ou 50 rpm. Para o desenvolvimento do método proposto, foi utilizado o aparato pá em todas as condições testadas. A velocidade de 50 rpm foi inicialmente testada para todos os meios utilizando como

amostra o medicamento referência (MR) nomeado de produto A. Para os meios HCl 0,1M e FG (sem pepsina) especificamente, foram testadas as velocidades de agitação de 25 e 50 rpm com o MR e o medicamento teste (MT). O meio de dissolução foi adicionado às cubas com auxílio de uma proveta de 1000 mL. O teste foi iniciado após a estabilização da temperatura dos meios nas cubas em $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. A quantidade de suspensão de BMZ adicionada na cuba foi o equivalente a uma dose (200 mg/5 mL). As suspensões foram previamente agitadas, e foram adicionadas na cuba com o auxílio de uma seringa que foram pesadas antes e depois da adição da amostra. A diferença de peso foi calculada e relacionada com a densidade, para cálculo da dose adicionada em cada cuba.

Alíquotas de 10,0 mL foram coletadas manualmente nos tempos de 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 90 minutos, com reposição de igual volume de meio. Nesta etapa do desenvolvimento do método, cada perfil de dissolução foi realizado com três cubas.

- **Preparo de amostra:** Após a coleta, amostras foram filtradas em papel filtro de faixa preta. Do filtrado foram pipetados 4,0 mL para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com o diluente metanol:água (50:50; v/v), obtendo-se uma solução de $35,56\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ de BMZ. As soluções foram filtradas em filtro de membrana de *nylon* de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ antes das injeções.

A quantidade de fármaco dissolvido no meio de dissolução foi determinada por CLAE utilizando metodologia desenvolvida e validada neste trabalho para o doseamento de BMZ em suspensão oral.

4.2.6.2.1 Avaliação do método de inserção da amostra no meio de dissolução

O método de inserção da suspensão de BMZ no meio de dissolução foi avaliado através da comparação do teste de dissolução realizado nas condições previamente selecionadas para o teste. Neste caso, foi comparado o método de introdução da amostra com auxílio de uma seringa e o método utilizando o copo de suspensão, da marca Agilent Technologies[®]. Esse copo é composto de duas peças de PTFE. A primeira peça denominada copo de inserção, apresenta as especificações de $17,5 \times 8,2\text{ mm}$, com $2,40\text{ cm}^2$ de área de superfície exposta e capacidade de volume de $1,9\text{ cm}^3$. A amostra é pesada nesta peça e depois acoplada à segunda, denominada de *weighted holder*, a qual apresenta formato hemisférico, $5,72\text{ cm}$ de diâmetro externo, $2,52\text{ cm}$ de diâmetro interno e tem por objetivo manter a

suspensão no fundo da cuba. Os testes de dissolução foram realizados com seis cubas. A porcentagem dissolvida de BMZ no meio de dissolução foi determinada por CLAE para cada teste. A análise estatística comparativa dos dois métodos de inserção da amostra no meio de dissolução foi realizada através do Teste *t*-Student, com nível de significância de $p < 0,05$.

4.2.6.2.2 Estabilidade do fármaco nas condições do teste de dissolução

A estabilidade de BMZ suspensão oral nas condições selecionadas para o teste de dissolução foi verificada. Aliquotas da amostra foram coletadas após o teste de dissolução e foram imediatamente analisadas (tempo zero) e após 24 horas. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente e ao abrigo da luz ($n=3$).

4.2.6.3 Validação do método de dissolução

O método de dissolução para o BMZ em suspensão oral foi validado para os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, de acordo com as normas da ANVISA, ICH e o Capítulo Geral da Farmacopeia Americana <1092> The Dissolution Procedure: Development and Validation (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 36, 2013). A adsorção de BMZ nos filtros também foi avaliada. O método de quantificação utilizado foi a CLAE e os parâmetros cromatográficos empregados encontram-se descritos no item 5.4. Utilizou-se a amostra do MR de BMZ suspensão oral para realizar a validação do método de dissolução.

4.2.6.3.1 Especificidade

A especificidade do método foi determinada através da realização do teste de dissolução da amostra simulada de excipientes e da amostra de BMZ suspensão oral, preparadas conforme item 4.2.4.1.1. Foram adicionados nas cubas 900 mL do meio selecionado, e o teste foi iniciado após a estabilização da temperatura em $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Adicionou-se em cada cuba com o auxílio de uma seringa aproximadamente 5 mL da amostra simulada de excipientes e da amostra da suspensão (equivalente a 200 mg de BMZ). Após 60 minutos de teste, as amostras foram coletadas e preparadas conforme descrito em Preparo de amostra do item 4.2.6.2.

4.2.6.3.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada pela construção da curva de calibração do BMZ nas concentrações de 3,56; 8,89; 17,78; 26,67; 35,56 e 44,45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ que correspondem as concentrações de 10, 25, 50, 75, 100 e 125%, respectivamente. As soluções foram diluídas no meio de dissolução e filtradas em filtro de membrana de *nylon* de 0,45 μm , antes das injeções. Cada concentração foi analisada em triplicata. A equação da reta foi determinada pela análise de regressão linear e os resultados avaliados estatisticamente, através da análise de variância (ANOVA) com confiabilidade de 95% ($p < 0,05$) com auxílio do *software* Microsoft® Excel 2010.

4.2.6.3.3 Precisão

Para a avaliação da precisão do método amostras foram submetidas ao teste de dissolução nas condições padronizadas para o ensaio. Após os 60 minutos do teste, alíquotas da amostra foram coletadas e preparadas como descrito no item 4.2.6.2. Para cada dia de análise, preparou-se uma curva de calibração na faixa de 3,56-44,45 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A repetibilidade e a precisão intermediária foram avaliadas com base no DPR obtido a partir dos resultados da porcentagem de fármaco dissolvido no meio, em dias diferentes e com diferentes analistas.

4.2.6.3.4 Exatidão

O estudo da exatidão do método de dissolução foi realizado através da determinação da porcentagem de recuperação de uma quantidade conhecida de BMZ SQR adicionada à amostra simulada de excipientes. Alíquotas da solução de BMZ SQR e da amostra simulada de excipientes do MR foram adicionadas às cubas contendo meio de dissolução. Após 60 minutos de teste, as amostras foram coletadas, diluídas em solução de metanol:água (50:50; v/v) e analisadas por CLAE. As concentrações teóricas finais foram 3,56, 17,78 e 42,67 $\mu\text{g mL}^{-1}$, equivalentes a 10,0%, 50,0% e 120,0%, respectivamente. A porcentagem de recuperação foi determinada através da relação entre a concentração encontrada experimentalmente e a concentração teórica adicionada.

4.2.6.3.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada com o objetivo de verificar a influência de uma mudança deliberada nas condições do teste de dissolução. O parâmetro escolhido foi a desaeração do meio de dissolução. Desta forma, avaliou-se o perfil de dissolução realizado nas condições estabelecidas, utilizando meio de dissolução previamente desaerado, por 20 minutos, em banho de ultrassom, comparado com o perfil realizado com o meio sem desaeração. A análise estatística comparativa dos dois modos foi realizada através do Teste *t*-Student, com nível de significância de $p < 0,05$.

4.2.6.3.6 Adsorção nos filtros

A adsorção do fármaco na superfície dos filtros foi avaliada através do preparo de solução na concentração de 3,56 e 35,56 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de BMZ, o qual representa a concentração teórica de 10% e 100%. As soluções foram submetidas ao mesmo processo de filtração empregado no teste de dissolução, sendo primeiro submetido ao papel filtro de faixa preta seguida da filtração em filtro de membrana de *nylon* de 0,45 μm .

Foram pesados cerca de 11,11 mg de BMZ SQR e transferidos para balão volumétrico de 50 mL, acrescentando-se 1,0 mL de metanol para a solubilização e completando-se o volume com o meio de dissolução. Esta solução foi filtrada em papel filtro de faixa preta e posteriormente foram pipetados 4,0 mL para balão volumétrico de 25 mL. Completou-se o volume com o diluente metanol:água (50:50; v/v) ($35,6 \mu\text{g mL}^{-1}$). As soluções foram filtradas em filtro de membrana de *nylon* de 0,45 μm , para posterior quantificação. Para o preparo da solução de concentração $3,56 \mu\text{g mL}^{-1}$, procedeu-se mais uma diluição a partir da solução de concentração de $35,6 \mu\text{g mL}^{-1}$, para posterior filtração em filtro de membrana de *nylon* de 0,45 μm . Soluções de BMZ nas mesmas concentrações foram preparadas pelo mesmo procedimento, excluindo-se ambos os processos de filtração. As amostras foram quantificadas por CLAE, em triplicata cada concentração.

Os valores da adsorção foram descritos como percentual de recuperação (%R) de acordo com a equação $\% R = \text{Valor da solução filtrada} / \text{Valor da solução não filtrada} \times 100$. O critério de aceitação para a %R é de $> 95,0\%$, ou seja, a perda de fármaco por adsorção nos filtros deve ser de no máximo 5,0% (LINDENBERG et al., 2005).

4.2.6.4 Perfil de dissolução de produtos de BMZ suspensão oral

Perfil de dissolução dos seis produtos em estudo foi realizado em 12 cubas utilizando o método de dissolução previamente validado. A comparação dos perfis foi realizada pelo emprego do método modelo independente, através do cálculo do fator de semelhança, f_2 , utilizando a equação 5. Foram considerados semelhantes os perfis que apresentaram valor de f_2 entre 50 e 100.

4.2.6.5 Cinética de dissolução

Para avaliar a cinética de dissolução das suspensões foram aplicados os modelos matemáticos de ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Hixson-Crowell e Weibull, calculados utilizando as equações descritas na Tabela 2. Curvas foram construídas empregando os modelos matemáticos citados, com seleção do melhor modelo baseado nos valores obtidos para o coeficiente de determinação (R^2).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da matéria-prima

5.1.1 Determinação da faixa de fusão

Os valores obtidos nas três determinações da faixa de fusão de BMZ estão apresentados na Tabela 7. A faixa de fusão obtida para a matéria-prima BMZ nas três determinações, encontra-se dentro da faixa de fusão de 99 °C a 102 °C, conforme especificado para o BMZ matéria-prima (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Os resultados são um indicativo da pureza da matéria-prima BMZ.

Tabela 7. Valores obtidos para a faixa de fusão da matéria-prima BMZ.

Determinações	1	2	3
Faixa de Fusão (°C)	99,1-102,2	99,4-102,1	99,5-102,4

5.1.2 Perda por dessecação

Este ensaio destina-se a determinar a quantidade de substância volátil eliminada, após a matéria-prima ser submetida às condições do teste.

A porcentagem da perda de massa da matéria-prima BMZ após a dessecação está apresentada na Tabela 8.

Tabela 8. Percentual de perda de massa por dessecação da matéria-prima BMZ.

Amostra	Perda de massa por dessecação (%)
1	0,27
2	0,28
3	0,28
Média	0,28
DPR	2,09

A perda de massa por dessecação média obtida foi de 0,28%, estando dentro do valor especificado de, no máximo, 0,50% (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

5.1.3 Análise quantitativa

Os resultados da quantificação de BMZ matéria-prima por volumetria em meio não aquoso estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Análise quantitativa de BMZ matéria-prima.

Dia	Teor (%)
	98,93
1	99,54
	100,10
	99,58
2	98,64
	98,91
Média	99,28
DPR (%)	0,55

A Farmacopeia Brasileira (2010) especifica que a matéria-prima de BMZ deve conter no mínimo, 98,5% e no máximo, 101,0% de BMZ em relação à substância dessecada. O teor médio encontrado a partir das seis determinações foi de 99,28%, dentro da faixa preconizada.

Os resultados das análises efetuadas para a caracterização da matéria-prima de BMZ foram adequados para confirmar a identidade do fármaco, o que permitiu sua utilização neste trabalho como SQR.

5.1.4 Identificação da matéria-prima

As análises de espectroscopia no UV, espectroscopia no IV e espectrometria de massas foram realizadas para identificar a matéria-prima de BMZ e caracterizá-la como SQR.

5.1.4.1 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta (UV)

O espectro de absorção no UV na faixa de 200 nm a 400 nm de uma solução de BMZ ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) em ácido clorídrico 1 M, estão apresentados na Figura 3. Observam-se máximos de absorção em 232 nm e 275 nm, conforme especificado na Farmacopeia Brasileira (2010).

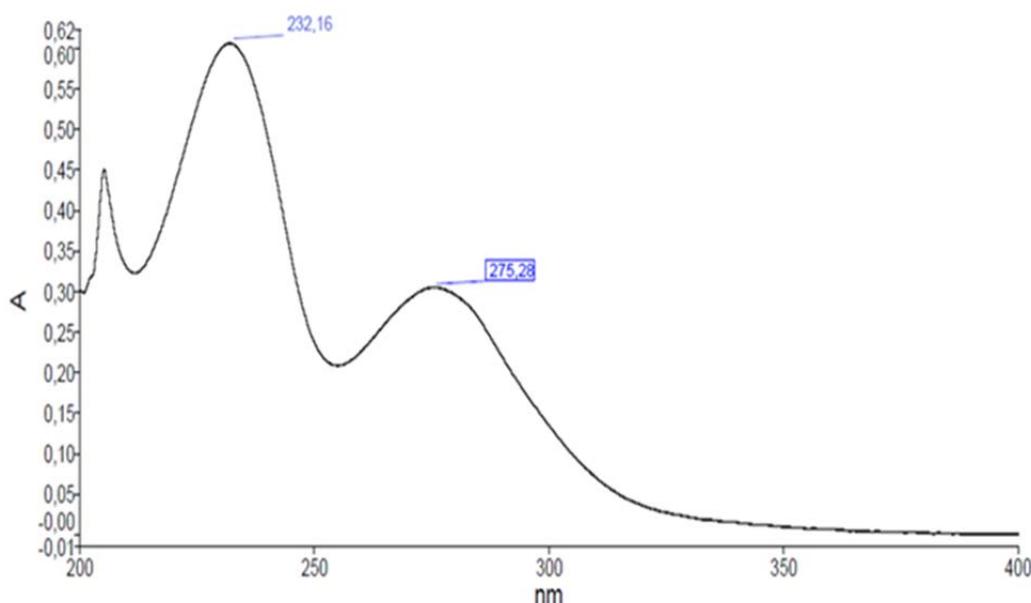


Figura 3. Espectro na região do UV da matéria-prima BMZ na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ em ácido clorídrico 1M.

5.1.4.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV) médio

A espectroscopia no IV baseia-se nas vibrações dos átomos da molécula. A presença de bandas características de grupos de átomos permite, através da análise do espectro, a identificação da estrutura química. Entretanto, o espectro de IV deve ser utilizado em conjunto com outros dados espectrais, para determinar a estrutura da molécula (SILVERSTEIN et al., 2007).

O espectro de absorção do BMZ matéria-prima na região do IV, na faixa de $600\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$ está apresentado na Figura 4.

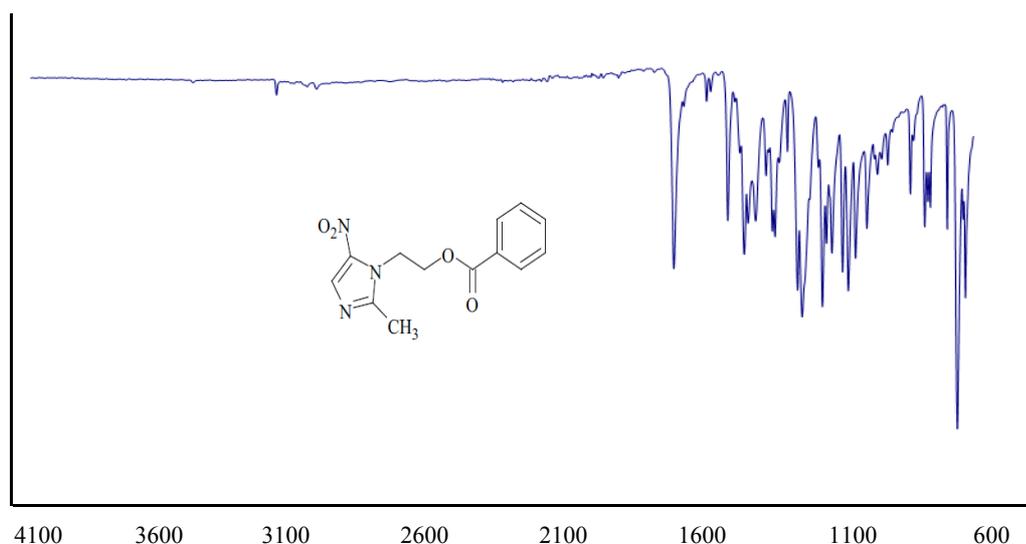


Figura 4. Espectro de absorção na região do IV do BMZ.

As atribuições das principais frequências das bandas de absorção, características à estrutura química do BMZ, estão apresentadas na Tabela 10 e foram determinadas com base na literatura (SILVERSTEIN et al., 2007).

Tabela 10. Principais frequências obtidas do espectro na região do IV do BMZ.

Frequência (cm ⁻¹)	Atribuição
3100	Deformação axial de C-H de aromático
1715-1730	Deformação axial de C=O de benzoatos
1550-1530	Deformação axial assimétrica de NO ₂
1490	Deformação axial CH ₃
1360-1290	Deformação axial simétrica de NO ₂
1200	Deformação axial de C-O de éster
1000	Deformação angular no plano C-H do anel
870	Deformação axial de C-N
675-900	Deformação angular fora do plano C-H do anel

O espectro de IV obtido para o BMZ apresentou bandas características para os grupos químicos presentes na estrutura da molécula. Além disto, apresentou o mesmo perfil do espectro do BMZ publicado na Farmacopeia Britânica (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2014).

5.1.4.3 Espectrometria de massas (MS)

O LC/MS-MS é um equipamento analítico de grande versatilidade que apresenta as vantagens da cromatografia, uma vez que produz a separação de substâncias químicas com alta seletividade em conjunto com a determinação da massa molecular de uma molécula (ARDREY, 2003). Desta forma, esta técnica permite a identificação de uma substância isolada através da geração de fragmentos com valores de relação massa/carga (m/z) altamente específicos para cada molécula estudada e importante para a confirmação da estrutura química analisada.

Pelo cromatograma apresentado na Figura 5 observa-se a presença do pico referente ao BMZ isolado. A massa molecular descrita para a molécula de BMZ é 275,26 (MERCK INDEX, 2006) e o principal pico obtido foi $m/z = 276,0914$ (Figura 6). Este último é característico da formação da espécie $[M+H]^+$ a partir do íon molecular e são obtidos a partir do uso do espectrometro de massas, ionização positiva por eletronebulização (ES+). Os resultados obtidos confirmam a identidade do fármaco analisado.



Figura 5. Cromatograma do BMZ obtido por LC-MS/MS para a caracterização da matéria-prima. Condições cromatográficas: Coluna: Acquity UPLC BEH C18 (2,1 mm × 50 mm, 1,7 μ m), mantida em 30 °C; Fase móvel: metanol: água (80:20; v/v), adicionados de ácido fórmico (0,1%); Fluxo: 0,3 mL min⁻¹; Volume de injeção: 1,0 μ L.

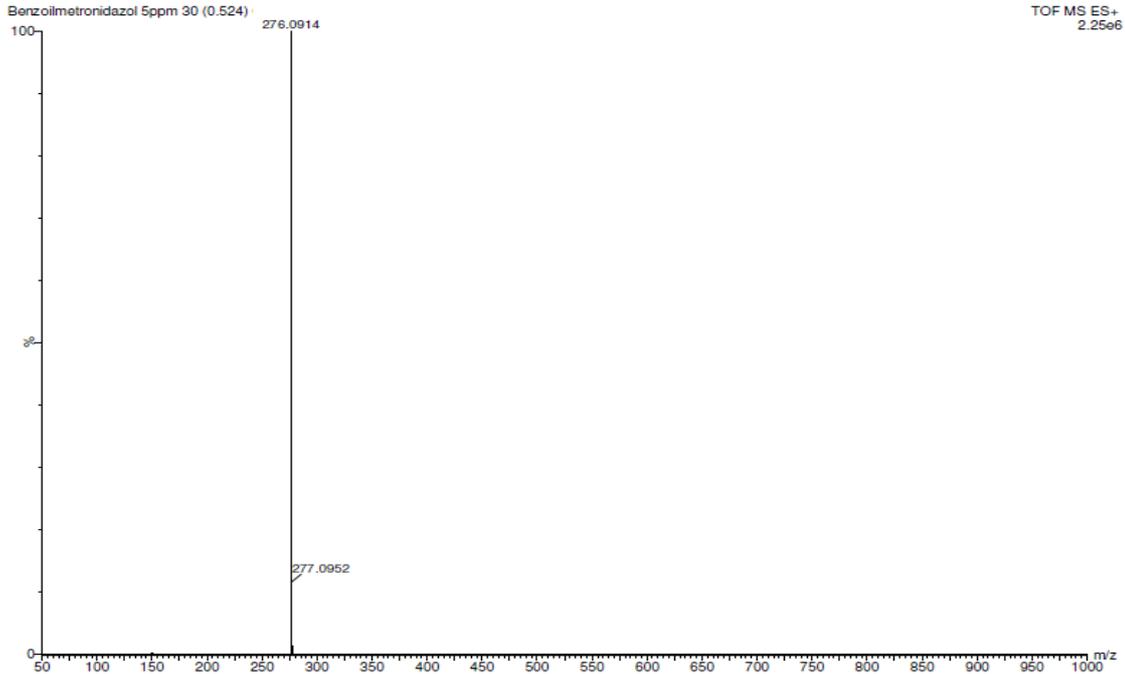


Figura 6. Espectro de massas do BMZ obtido por LC-MS/MS no modo de ionização positiva por eletronebulização para a caracterização da matéria-prima.

5.2 Determinação do coeficiente de partição

O coeficiente de partição (P) pode ser definido pela razão entre a concentração do BMZ em uma fase orgânica e sua concentração na fase aquosa em um sistema de dois compartimentos. O valor de seu logaritmo, $\log P$, é um valor quantitativo que descreve a lipofilicidade de um composto.

O valor de $\log P$, determinado experimentalmente e a sua estimativa teórica determinada por modelagem molecular encontram-se descritos na Tabela 11.

Tabela 11. Coeficiente de partição do BMZ determinado experimentalmente e por estimativa matemática teórica.

	Coeficiente de Partição	
	$\log P$	
Experimental	1,83 (0,97%)*	
Estimativa Teórica	2,19	

*DPR .

O valor de $\log P$ obtido experimentalmente foi de 1,83 e o valor teórico predito matematicamente foi de 2,19. Embora os valores obtidos sejam diferentes, ambos apresentam valores acima de 1,0, o que demonstra a lipofilicidade do fármaco.

5.3 Desenvolvimento do método para a quantificação de BMZ em suspensão oral por CLAE

Com a finalidade de desenvolver um método analítico adequado para a quantificação de BMZ em suspensão oral, frente a seus produtos de degradação, foram testadas as condições descritas no item 4.2.3. A melhor condição foi selecionada de acordo com o desempenho do método, através dos valores obtidos para os parâmetros do pico cromatográfico para o fármaco, como tempo de retenção, fator de cauda, pratos teóricos, fator de capacidade e resolução.

A partir das condições cromatográficas testadas, a melhor condição de eluição foi obtida com a condição 7 (Tabela 3) que utiliza fase móvel composta de ácido fosfórico 0,1% pH 3,0: metanol (50:50, v/v). Os resultados obtidos para os parâmetros cromatográficos com a condição selecionada estão apresentados na Tabela 12. Os valores para o fator de cauda, fator de capacidade, pratos teóricos e resolução, encontram-se dentro do recomendado por SHABIR (2003), com precisão de injeção adequada (USP 36, 2013). O método permitiu a identificação do BMZ em aproximadamente 8,6 minutos, com resolução frente aos seus principais produtos de degradação.

Tabela 12. Valores experimentais dos parâmetros cromatográficos obtidos com a condição analítica selecionada.

Parâmetro	Valor observado	Valor recomendado
Fator de cauda	1,20	$\leq 2^a$
Fator de capacidade	4,42	$> 2^a$
Pratos teóricos	6963	$> 2000^a$
Resolução _{AB-BMZ}	16,73	$> 2^a$
Precisão de injeção (DPR%)	0,92	DPR (%) $< 2^b$

^aSHABIR, 2003; ^bUSP 36, 2013.

Os cromatogramas da solução de BMZ SQR na presença de seus produtos de degradação e frente à solução amostra de BMZ suspensão oral, obtidos com a condição 7, encontram-se na Figura 7.

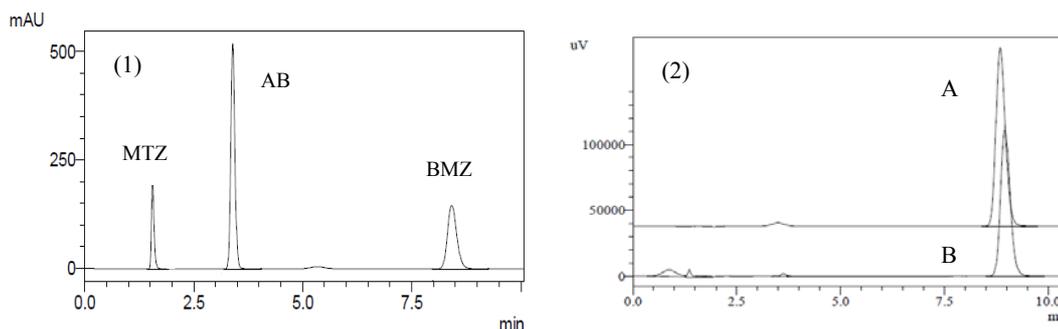


Figura 7. Cromatogramas representativos da condição 7; (1) Solução de BMZ SQR na presença de seus produtos de degradação, MTZ e AB, (2-A) Solução de BMZ SQR e (2-B) Solução amostra de BMZ suspensão oral. Condições cromatográficas: fase móvel: ácido fosfórico 0,1% pH 3,0:metanol (50:50; v/v); coluna C18 (4,0 x 150 mm, 5 μ m); fluxo 1,0 mL/min; detecção: 235 nm; volume de injeção: 10 μ L; temperatura: 25 °C.

5.4 Validação do método de quantificação de BMZ em suspensão oral por CLAE

A validação de método analítico tem a finalidade de assegurar a confiabilidade dos resultados gerados a partir do método, fornecendo evidências que este é adequado à finalidade pretendida (BRASIL, 2003; USP 36, 2013). Com o objetivo de garantir a confiabilidade do método analítico desenvolvido neste trabalho (Tabela 13), para a quantificação de BMZ em suspensão oral por CLAE foram avaliados os parâmetros de validação: Especificidade, linearidade, precisão, limite de quantificação e de detecção, exatidão e robustez.

Tabela 13. Condições estabelecidas para o método de doseamento de BMZ em suspensão oral por CLAE.

Fase móvel	MeOH:Ác.fosfórico 0,1% pH 3,0 ajustado com trietilamina (50:50; v/v)
Coluna	C18 (4,0 x 150 mm, 5 μ m) a 25 °C
Fluxo	1,0 mL/min
Detecção	UV λ = 235 nm
Volume de injeção	10 μ L
Diluyente	Metanol:água (50:50; v/v)

5.4.1 Especificidade

A especificidade do método para a quantificação de BMZ em suspensão oral por CLAE foi avaliada frente aos excipientes presentes na formulação e aos potenciais produtos de degradação do fármaco.

5.4.1.1 Interferência dos excipientes da formulação

A interferência dos excipientes da formulação na quantificação de BMZ foi avaliada através da análise da solução de BMZ SQR, amostra simulada de excipientes e amostra comercial de BMZ suspensão oral. Os cromatogramas das respectivas soluções estão apresentados na Figura 8.

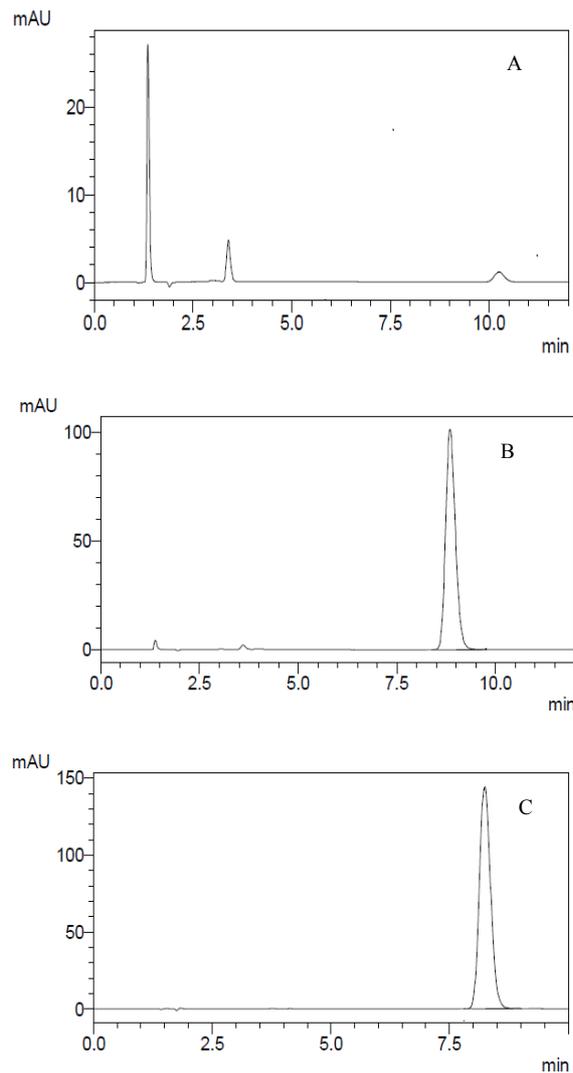


Figura 8. Cromatogramas representativos das soluções (A) amostra simulada de excipientes, (B) amostra de BMZ suspensão oral e (C) BMZ SQR. Condições cromatográficas: fase móvel: ácido fosfórico 0,1% pH 3,0:metanol (50:50; v/v); coluna C18 (4,0 x 150 mm, 5 μ m); fluxo 1,0 mL/min; detecção: 235 nm; volume de injeção: 10 μ L; temperatura: 25 °C.

De acordo com o observado nos cromatogramas verifica-se a ausência de picos interferentes referentes aos excipientes, no mesmo tempo de retenção do BMZ.

Na Figura 9 está apresentada a curva de pureza do pico para a amostra de BMZ suspensão oral. A pureza do pico de 1,0000 sugere a ausência de impurezas eluídas no mesmo tempo de retenção do BMZ, indicando que o método é específico para a quantificação do fármaco.

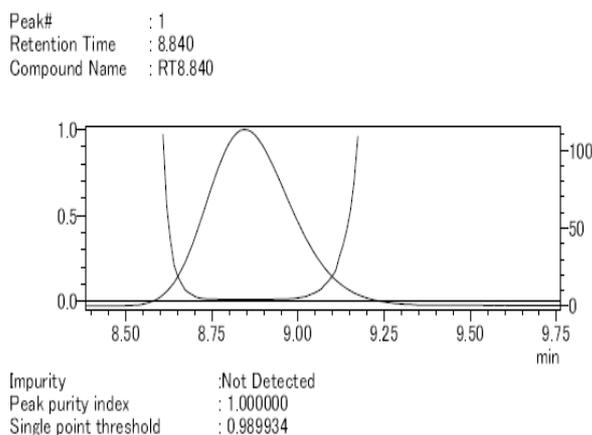


Figura 9. Curva da pureza do pico da amostra de BMZ suspensão oral. Condições cromatográficas: fase móvel: ácido fosfórico 0,1% pH 3,0:metanol (50:50; v/v); coluna C18 (4,0 x 150 mm, 5 μ m); fluxo 1,0 mL/min; detecção: 235 nm; volume de injeção: 10 μ L; temperatura: 25 °C.

5.4.1.2 Interferência de potenciais produtos de degradação

A especificidade do método por CLAE para a quantificação do BMZ, também, foi avaliada pelo estudo de degradação forçada da SQR. O fármaco foi submetido às seguintes condições de estresse: hidrólise ácida e básica, oxidação, degradação térmica e fotólise. A degradação teve como finalidade induzir a formação de possíveis produtos de degradação e avaliar a interferência desses sobre a quantificação do BMZ. Os cromatogramas obtidos para cada condição avaliada estão expostos a seguir.

- **Hidrólise ácida**

A Figura 10 mostra o cromatograma obtido para o BMZ SQR no tempo zero e após ser submetido à hidrólise ácida (HCl 0,1M) em refluxo a 80 °C, durante 4 horas. Verificou-se o aparecimento de dois potenciais produtos de degradação e uma degradação do fármaco de

26,86%. Os picos formados não interferiram na quantificação do BMZ e a pureza do pico foi de 1,0000.

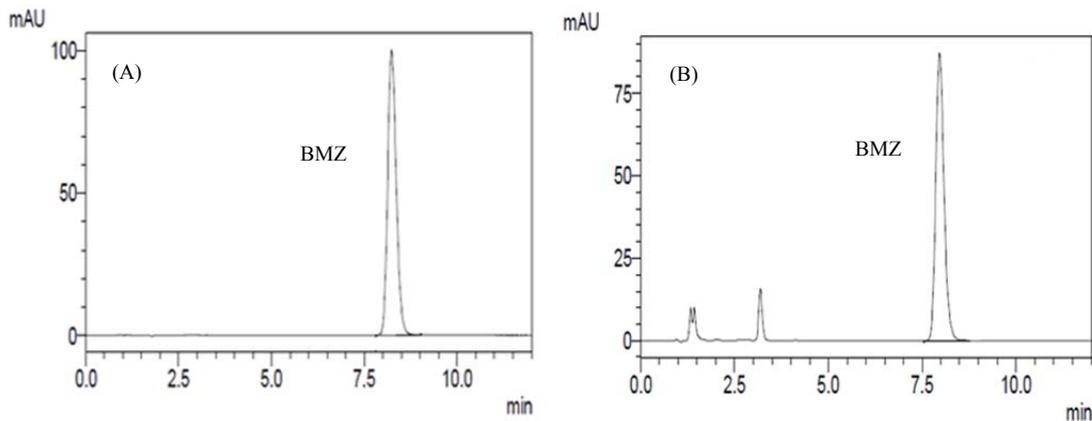


Figura 10. Cromatogramas da degradação forçada do BMZ SQR após ser submetido à hidrólise ácida em HCl 0,1M em refluxo a 80 °C; (A) Tempo zero e (B) após 4 horas. Condições cromatográficas: fase móvel: ácido fosfórico 0,1% pH 3,0:metanol (50:50; v/v); coluna C18 (4,0 x 150 mm, 5µm); fluxo 1,0 mL/min; detecção: 235 nm; volume de injeção: 10µL; temperatura: 25 °C.

- **Hidrólise básica**

Os cromatogramas do BMZ SQR no tempo zero e após ser submetido por 4 horas à hidrólise básica em NaOH 1M sob refluxo a 80 °C, estão apresentados na Figura 11. Os resultados demonstram a formação de produtos de degradação e a diminuição do teor do fármaco em 31,28%. Os picos formados não interferiram na quantificação do BMZ e a pureza do pico obtida foi de 1,0000.

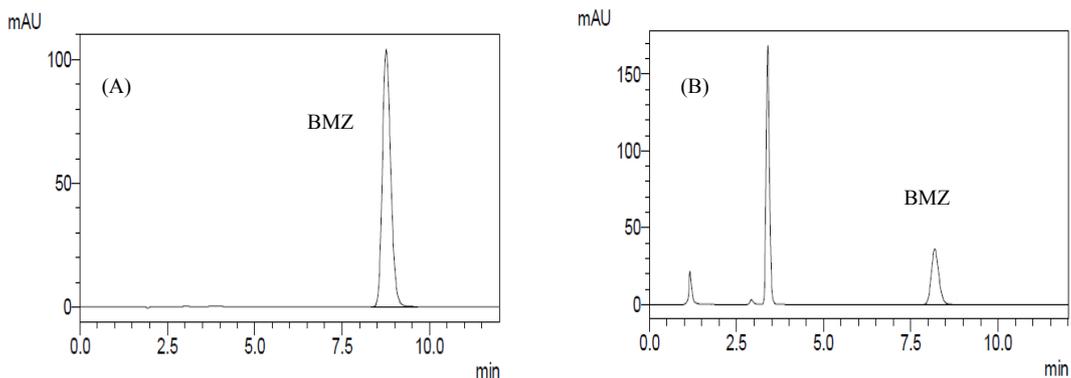


Figura 11. Cromatogramas da degradação forçada do BMZ SQR após ser submetido à hidrólise básica com NaOH 1M em refluxo a 80 °C; (A) Tempo zero e (B) após 4 horas. Condições cromatográficas: fase móvel: ácido fosfórico 0,1% pH 3,0:metanol (50:50; v/v); coluna C18 (4,0 x 150 mm, 5µm); fluxo 1,0 mL/min; detecção: 235 nm; volume de injeção: 10µL; temperatura: 25 °C.

- **Oxidação com peróxido de hidrogênio**

A Figura 12 apresenta os cromatogramas obtidos para o BMZ SQR no tempo zero e após ser submetido à oxidação com H₂O₂ 10%, por 24 horas. Observou-se um pico, em aproximadamente 1,0 minuto, presente nos cromatogramas da solução no tempo zero e após 24 horas de degradação, referente ao estabilizante do H₂O₂. Não foi observado após as 24 horas de degradação, o aparecimento de picos adicionais. Entretanto, o fármaco demonstrou percentual de degradação de 59,72%. A pureza do pico obtida para o BMZ em meio oxidante foi de 0,9999.

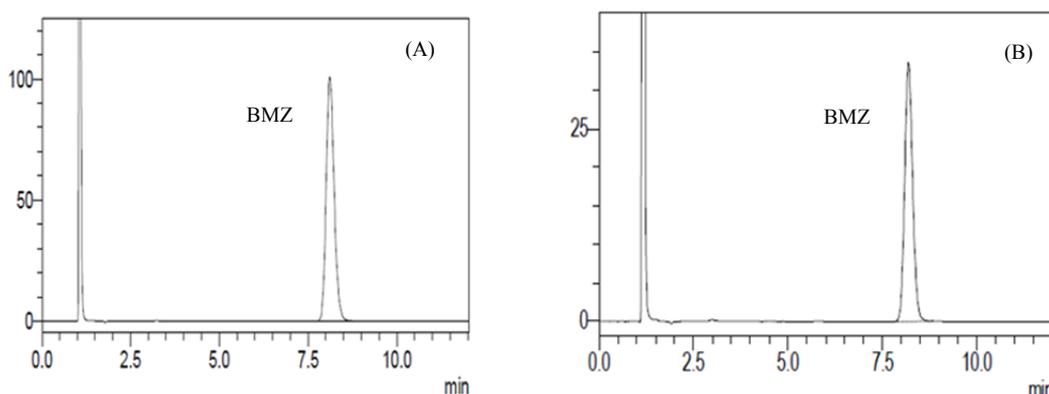


Figura 12. Cromatogramas da degradação forçada do BMZ SQR após ser submetido à oxidação com H₂O₂ 10%; (A) Tempo zero e (B) após 24 horas. Condições cromatográficas: fase móvel: ácido fosfórico 0,1% pH 3,0 :metanol (50:50; v/v); coluna C18 (4,0 x 150 mm, 5µm); fluxo 1,0 mL/min; detecção: 235 nm; volume de injeção: 10µL; temperatura: 25 °C.

- **Degradação térmica**

A degradação térmica do BMZ SQR a 55 °C, por 24 horas, produziu o aparecimento de um pequeno pico em torno de 2,0 minutos, como pode ser observado na Figura 13 (B). O percentual de degradação do fármaco foi de 9,80% e a pureza de pico foi de 1,0000.

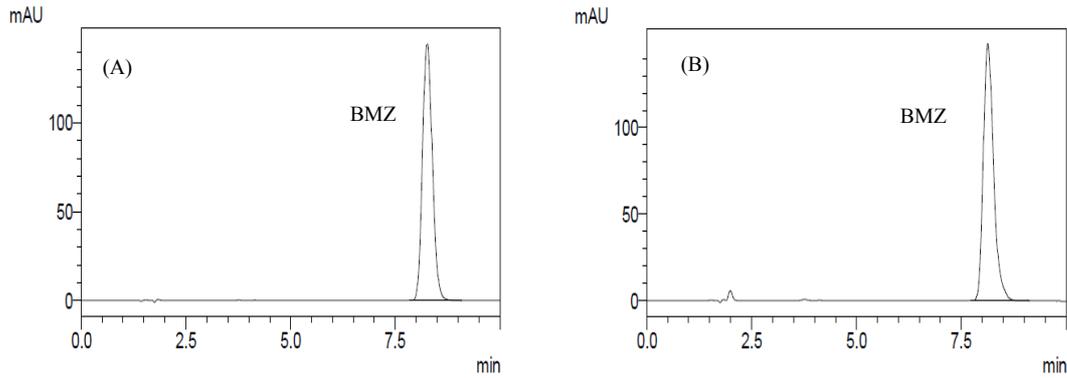


Figura 13. Cromatogramas da degradação forçada do BMZ SQR após ser submetido à degradação térmica em estufa a 55 °C; (A) Tempo zero e (B) após 24 horas. Condições cromatográficas: fase móvel: ácido fosfórico 0,1% pH 3,0:metanol (50:50; v/v); coluna C18 (4,0 x 150 mm, 5 μ m); fluxo 1,0 mL/min; detecção: 235 nm; volume de injeção: 10 μ L; temperatura: 25 °C.

- **Fotólise**

A Figura 14 apresenta os cromatogramas obtidos para o BMZ no tempo zero e após ser submetido à radiação UVC-254 nm, por 4 horas. A incidência de radiação produziu o aparecimento de vários picos adicionais e diminuição de teor do fármaco em 33,21%. A pureza do pico obtida foi de 0,9999.

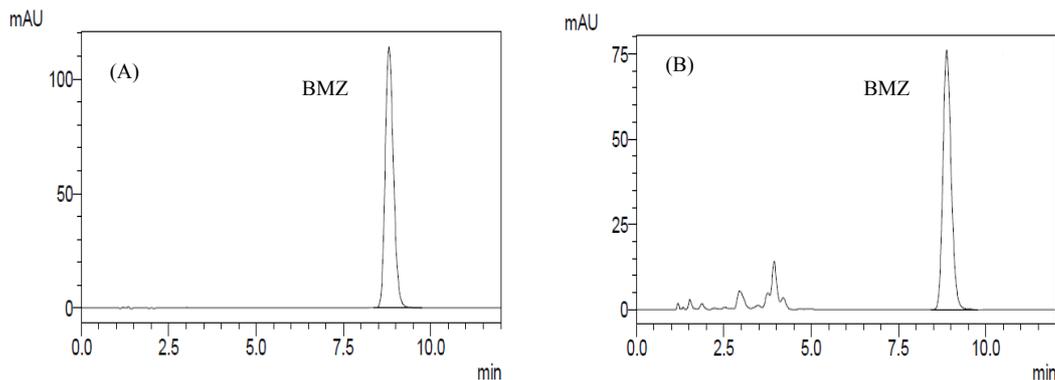


Figura 14. Cromatogramas da degradação forçada do BMZ SQR após ser submetido à exposição à radiação UV a 254 nm; (A) Tempo zero e (B) após 4 horas de exposição. Condições cromatográficas: fase móvel: ácido fosfórico 0,1% pH 3,0:metanol (50:50; v/v); coluna C18 (4,0 x 150 mm, 5 μ m); fluxo 1,0 mL/min; detecção: 235 nm; volume de injeção: 10 μ L; temperatura: 25 °C.

5.4.2 Linearidade

A linearidade do método foi verificada através da construção de curva de calibração padrão de BMZ. O método mostrou-se linear na faixa de concentração de 24,0-112,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A curva média, a equação da reta e o coeficiente de correlação estão representados na Figura 15. O coeficiente de correlação linear (r) obtido de 0,9999 demonstra alta correlação e indica que os resultados obtidos estão diretamente proporcionais à concentração do fármaco. Para comprovar a linearidade do método, foi realizada análise estatística da regressão linear através da ANOVA, conforme exposto na Tabela 14. Os resultados obtidos apresentam valor para F calculado superior ao valor do F tabelado para a regressão linear. Para o desvio da linearidade o valor de F calculado foi menor que o valor tabelado, o que comprova com 95% de confiança que houve regressão linear sem haver desvio da linearidade.

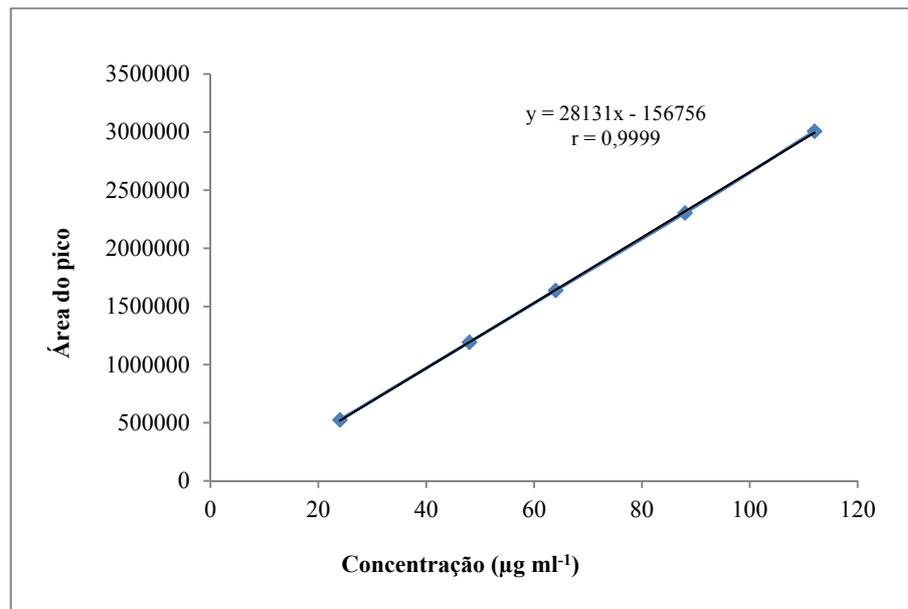


Figura 15. Representação gráfica da curva de calibração média de BMZ por CLAE.

Tabela 14. Análise de variância (ANOVA) para a avaliação da linearidade do método de quantificação de BMZ.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	4	11123751576523	2780937894131	10719,77*	3,48
Regressão Linear	1	11122325215041	11122325215041	42874*	4,96
Desvio da Linearidade	3	1426361482	475453827	1,8	3,71
Resíduo	10	2594214291	259421429		
Total	14	11126345790814			

*Significativo para $p < 0,05$.

5.4.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O LD e LQ foram determinados a partir da curva de calibração e foram estimados em $0,66 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

5.4.4 Precisão

A repetibilidade e a precisão intermediária foram determinadas pela análise de seis soluções da amostra de BMZ suspensão oral no mesmo dia e em dias diferentes, respectivamente. Os resultados encontram-se na Tabela 15 e demonstram que o método foi preciso, com valores de DPR máximo de 1,63%.

Tabela 15. Resultados obtidos na quantificação de BMZ na suspensão oral para a avaliação da repetibilidade e precisão intermediária.

Amostras	Repetibilidade			Precisão Intermediária
	Teor (%)			
	Dia 1	Dia 2	Dia 3*	
1	99,68	100,25	98,05	
2	100,67	101,41	98,71	
3	98,13	98,27	101,69	
4	100,71	98,81	99,54	
5	102,15	100,28	98,90	
6	101,96	98,31	101,94	
Média (%)	100,55	99,56	99,81	99,95
DP	1,50	1,28	1,63	0,52
DPR (%)	1,49	1,29	1,63	0,52

* Diferente analista.

5.4.5 Exatidão

A exatidão do método analítico foi comprovada através da determinação da porcentagem de recuperação avaliada através da adição de quantidades conhecidas da solução de BMZ SQR, na solução amostra simulada de excipientes. Os resultados podem ser observados na Tabela 16, com porcentagem de recuperação média das quantidades adicionadas, entre 99,13% e 100,89%, demonstrando a exatidão do método.

Tabela 16. Resultados da porcentagem de recuperação para determinação da exatidão.

	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Recuperação (%)	Média (%)	DPR (%)
	Teórica	Experimental			
80%	51,20	50,50	98,63	99,38	1,17
		51,57	100,72		
		50,58	98,79		
100%	64,00	62,83	98,17	99,13	0,93
		64,01	100,02		
		63,48	99,19		
120%	76,80	78,02	101,59	100,89	0,68
		76,97	100,22		
		77,46	100,86		

5.4.6 Robustez

A robustez do método foi avaliada através de modificações nas condições cromatográficas, conforme Tabela 4 (item 4.2.4.6), utilizando planejamento fatorial 2^3 . Os resultados estão apresentados na Tabela 17. Os valores obtidos para o teor em relação à condição validada apresentaram DPR menores do que 2,0% e valores adequados para o fator de cauda. Em relação ao tempo de retenção, houve alteração no tempo, mas condizentes com as alterações do fluxo e proporção de metanol da FM.

Os resultados demonstram que as variações produzidas nas condições cromatográficas efetuadas não influenciaram na determinação quantitativa de BMZ suspensão oral, indicando a robustez do método analítico.

Tabela 17. Parâmetros cromatográficos e teor de BMZ obtidos para avaliação da robustez do método.

Experimentos	Parâmetros		
	Tempo de retenção (min)	Fator de cauda	Teor (%)*
1	13,14	1,24	99,41
2	11,38	1,24	99,30
3	13,03	1,22	99,19
4	10,79	1,22	99,43
5	8,22	1,20	99,61
6	6,71	1,20	99,46
7	7,21	1,21	99,52
8	5,97	1,20	99,55
Condição Validada	8,64	1,20	99,68

*Média de 3 determinações.

5.5 Caracterização geral das amostras comerciais

5.5.1 Doseamento de BMZ em amostras comerciais

Procedeu-se o doseamento das suspensões orais para a determinação do teor médio de BMZ presente em seis produtos disponíveis comercialmente. Cada produto foi analisado em triplicata. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 18, verifica-se que a amostra B apresenta valor de 92,32%, abaixo do limite aceitável de, no mínimo, 95,0% da quantidade de BMZ declarada no rótulo. Os outros produtos apresentam valores dentro da faixa aceitável de no mínimo 95,0% e no máximo 105,0%, para o teor de BMZ em suspensão oral (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Tabela 18. Resultados do doseamento de BMZ em suspensões orais.

Produtos	Teor médio (%)	DPR (%)
A	99,25	1,04
B	92,32	1,07
C	96,74	1,22
D	103,01	0,78
E	103,72	0,47
F	104,37	0,68

5.5.2 Determinação de pH

Os valores de pH obtidos para as amostras das suspensões em estudo estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19. Resultados do pH das amostras.

Amostras	pH
A	6,07
B	5,28
C	6,17
D	6,15
E	6,03
F	6,00

A faixa aceitável de pH especificada na monografia de BMZ suspensão oral na Farmacopeia Brasileira (2010) é de 5,5 a 6,5, sendo que valores fora desta faixa podem indicar instabilidade do produto. Pelos resultados obtidos, observou-se que a amostra B apresentou valor de pH de 5,28, fora da faixa aceitável. As demais amostras apresentaram valores dentro da faixa de pH especificada.

5.5.3 Tamanho de partícula

O tamanho de partícula das suspensões orais de BMZ foi determinado conforme procedimento descrito no item 4.2.5.3.

As suspensões avaliadas apresentaram tamanho de partícula com diâmetro médio entre 32,85 e 112,05 μm , o que as caracteriza como suspensões grosseiras, conforme resultados demonstrados na Tabela 20. Juntamente com o tamanho de partícula foi verificado o span, o qual avalia a polidispersão do tamanho de partícula do produto e leva em consideração o $d_{10\%}$, $d_{50\%}$ e $d_{90\%}$, (diâmetro de partícula correspondente a 10%, 50% e 90% da distribuição acumulada, respectivamente). O span foi calculado pela fórmula: $\text{Span} = d_{90\%} - d_{10\%} / d_{50\%}$ (SANTOS et al., 2012) e quanto menor o seu valor, menor o intervalo de distribuição granulométrica.

Tabela 20. Distribuição granulométrica, span e tamanho médio das partículas das suspensões orais de BMZ.

Produto	$d_{10\%}$	$d_{50\%}$	$d_{90\%}$	Média (μm)	Span
A	11,84	57,97	202,46	86,24	3,29
B	6,41	22,58	46,37	32,85	1,77
C	10,76	94,74	202,46	112,05	2,51
D	14,68	87,93	230,23	105,96	2,45
E	13,89	32,31	60,49	34,87	1,44
F	6,70	36,85	95,67	54,81	2,41

O produto A apresentou o maior valor de span, o que demonstra a polidispersão das suas partículas. O produto E apresentou o menor valor, o que demonstra uma distribuição granulométrica homogênea. Os produtos C e D apresentaram valores semelhantes para o diâmetro médio de partícula e para o span, assim como os produtos B e E.

5.5.4 Avaliação reológica

Os reogramas obtidos para as diferentes suspensões orais de BMZ em estudo estão apresentados na Figura 16. Pela análise dos reogramas verificou-se que todos os produtos avaliados neste trabalho apresentam fluxo não-newtoniano com característica pseudoplástica.

Com o objetivo de comparar cada um dos produtos avaliados, além da análise global dos gráficos de tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação, modelos reológicos foram testados. Dos quatro modelos avaliados, o modelo que apresentou o melhor valor de confiabilidade (R^2) para todos os produtos em estudo foi o de Herschel-Bulkley. Os valores obtidos para o índice de fluxo (n), índice de consistência (K) e a confiabilidade (R^2) para cada produto, obtidos pelo modelo de Herschel-Bulkley estão apresentados na Tabela 21. O modelo de Herschel-Bulkley é um modelo reológico clássico de três parâmetros derivado do modelo de Bingham. Os fluidos de Herschel-Bulkley são fluidos que possuem uma tensão de cedência e que, após serem submetidos a uma tensão de corte superior a sua tensão de cedência, escoam com um comportamento pseudoplástico ou dilatante, dependendo do seu valor de n (HUILGOL & YOU, 2005). Valores de $n < 1$ indicam a pseudoplastia do material. E quanto mais próximo o valor de n for de 1, menor é a pseudoplastia do material (ALVES et al., 2005). Valores de $n=1$ são classificados como fluidos newtonianos (SINKO, 2008).

De acordo com os resultados obtidos experimentalmente para n e descritos na Tabela 21, verifica-se que todos os produtos apresentaram comportamento pseudoplástico com valores de $n < 1$. Esses materiais têm a viscosidade aparente diminuída à medida que a tensão de cisalhamento aumenta e, portanto, sua viscosidade não pode ser expressa por um único valor (CORRÊA et al., 2005). Esse comportamento foi observado em todos os produtos, o que também confirma a pseudoplastia das suspensões em estudo.

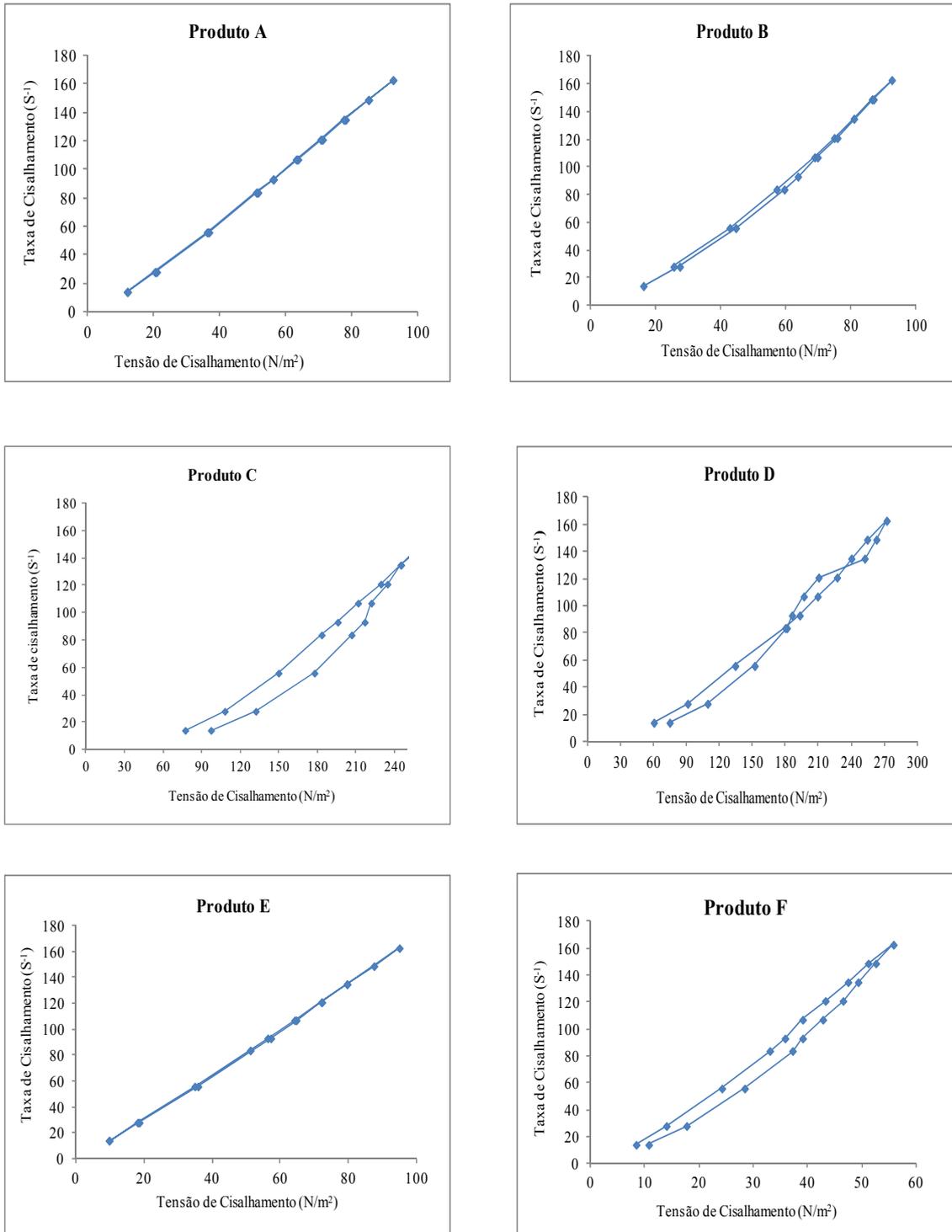


Figura 16. Reograma dos produtos A, B, C, D, E e F.

Tabela 21. Parâmetros reológicos obtidos pelo modelo Herschel-Bulkley dos diferentes produtos de suspensão oral de BMZ.

Produto	Modelo	Tipo de Fluido	K (mPas)	N	R²
A	Hershel-Bulkley	Pseudoplástico sem tixotropia	84	0,92	100,0
B	Hershel-Bulkley	Pseudoplástico sem tixotropia	320	0,67	99,9
C	Hershel-Bulkley	Pseudoplástico com tixotropia	1334	0,57	97,5
D	Hershel-Bulkley	Pseudoplástico com tixotropia	586	0,73	98,6
E	Hershel-Bulkley	Pseudoplástico sem tixotropia	92	0,91	100,0
F	Hershel-Bulkley	Pseudoplástico com tixotropia	177	0,68	98,8

O índice de consistência, K, está relacionado com a viscosidade do produto e, pelos resultados apresentados, observou-se que o produto A apresenta o menor valor de K (84 mPas), sendo considerado o produto menos viscoso. O produto C apresentou-se como o produto mais viscoso, quando comparado com os outros produtos, com valor de K de 1334 mPas.

Pelos reogramas observou-se que os produtos C, D e F são sistemas tixotrópicos. Para estes produtos as curvas de ida e volta não estão sobrepostas, e a curva de volta ocorre em um plano superior à de ida, desenhando uma curva denominada de curva de histerese. A tixotropia pode ser definida como um fenômeno no qual se observa a recuperação isotérmica e relativamente lenta da consistência, perdida pelo cisalhamento de um material deixado em repouso (SINKO, 2008). O efeito de histerese não foi observado para os produtos A, B e E, sendo praticamente inexistente a área entre a curva ascendente e a descendente.

5.6 Dissolução das suspensões orais de BMZ

5.6.1 Teste de solubilidade de BMZ em diferentes meios de dissolução

A solubilidade do BMZ SQR em diferentes meios foi avaliada conforme o item 4.2.6.1. Trabalhou-se com um excesso de fármaco a fim de observar se a condição *sink* seria satisfeita. Os dados foram utilizados como base para a seleção dos meios a serem testados

durante o processo de desenvolvimento do método de dissolução. Os resultados da solubilidade em diferentes meios estão apresentados na Tabela 22. Observa-se que o BMZ apresenta solubilidade dependente do pH, ou seja, a medida que o pH do meio de dissolução aumenta, diminui a taxa de solubilidade do fármaco, mesmo na presença de tensoativo. O BMZ é um fármaco com propriedades alcalinas, cuja solubilidade aumenta à medida que o pH do meio de dissolução diminui, devido a formação de seu sal ionizado (AULTON, 2005).

Tabela 22. Solubilidade de BMZ nos meios de dissolução avaliados.

Meios de dissolução	Concentração de BMZ*	
	$\mu\text{g mL}^{-1}$	%
HCl 0,01M	8,55	64,14
HCl 0,01M + 1,0% LSS	13,48	101,13
HCl 0,1M	13,35	100,15
HCl 0,1M + 0,1% LSS	13,37	100,30
HCl 0,1M + 0,5% LSS	13,29	99,70
HCl 0,1M + 1,0% LSS	13,41	100,60
HCl 0,1M + 0,1% POL80	12,96	97,22
HCl 0,1M + 0,5% POL80	12,87	96,55
HCl 0,1M + 1,0% POL80	13,08	98,12
FG (sem pepsina)	13,24	99,32
FG (com pepsina)	12,72	95,14
Tampão acetato pH 4,5	3,50	26,26
Tampão acetato pH 4,5 + 1,0% LSS	13,31	99,85
Tampão fosfato pH 5,8	3,88	29,10
Tampão fosfato pH 5,8 + 1,0% LSS	12,08	90,62
Tampão fosfato pH 6,8	3,98	29,86
Tampão fosfato pH 6,8 + 1,0% LSS	11,07	83,05
Fluido intestinal pH 7,5 (sem pancreatina)	4,97	37,28
Fluido intestinal pH 7,5 (sem pancreatina) + 1,0%LSS	9,16	68,72

*n=3.

5.6.2 Desenvolvimento do método de dissolução

A avaliação do perfil de dissolução de fármacos em diferentes condições de teste é recomendada durante a etapa de desenvolvimento de um método de dissolução. O desenvolvimento deve apresentar como um dos objetivos a seleção de condições do teste que apresentem poder discriminativo, ou seja, que resulte na capacidade de refletir mudanças nas

formulações. Além disso, busca-se trabalhar em condições *sink* e com meios que apresentem biorrelevância.

Para os testes foram selecionados os meios de dissolução nos quais o BMZ apresentou alta solubilidade, com concentração de saturação acima de $12,67 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 23). Amostras de suspensão oral de BMZ, equivalentes a uma dose (200 mg/5 mL) foram submetidas ao ensaio de dissolução. O aparato utilizado foi à pá rotatória. Primeiramente, os meios selecionados a partir do teste de solubilidade foram testados na velocidade de 50 rpm, que é a velocidade recomendada para suspensões farmacêuticas. Com o objetivo de gerar curvas de perfil de dissolução, as amostras foram coletadas nos tempos de 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 90 minutos. Esses tempos foram escolhidos levando em consideração que suspensões orais, geralmente, apresentam uma velocidade de dissolução rápida, pois as partículas estão desintegradas.

Devido a adequada solubilidade, primeiramente foi avaliado o perfil de dissolução para o meio de dissolução HCl 0,01M + 1% de LSS, conforme Figura 17. Este meio apresentou um perfil que teve inicialmente uma velocidade de dissolução rápida do fármaco, aproximadamente 62% em 5 minutos. Após este tempo o platô da curva foi alcançado, com dissolução máxima de 80%, em 90 minutos de teste. Devido à dissolução rápida e incompleta, este meio foi descartado para estudos posteriores.

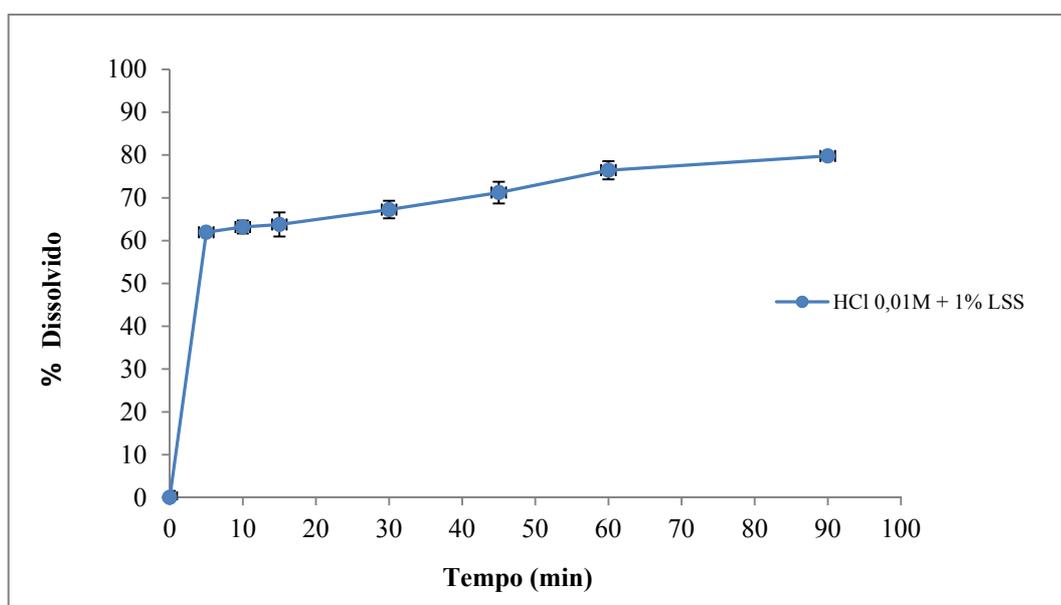


Figura 17. Perfil de dissolução do MR de BMZ suspensão oral na velocidade de agitação de 50 rpm, no meio de dissolução HCl 0,01M + 1% de LSS.

O BMZ apresentou boa solubilidade no meio HCl 0,1M, sem a adição de tensoativo. Entretanto, foram realizados perfis de dissolução nos meios HCl 0,1M com adição dos tensoativos LSS e POL nas concentrações de 0,1%, 0,5% e 1,0%, respectivamente. Esses testes foram realizados com o intuito de verificar a influência dos tensoativos e da sua concentração na dissolução do BMZ, quando adicionados ao meio HCl 0,1M. O uso de tensoativo é indicado para fármacos de baixa solubilidade, pois estas substâncias alteram a velocidade de dissolução por aumentar a hidrossolubilidade de fármacos (SILVA & VOLPATO, 2002). Entretanto, a concentração de tensoativo utilizada deve ser a menor possível, para que o método não perca a capacidade de discriminar as variáveis de fabricação (SIEWERT et al., 2003). Os perfis com HCl 0,1M sem adição de tensoativo e com adição de LSS nas concentrações 0,1%, 0,5% e 1,0% e com adição de POL80 nas concentrações 0,1%, 0,5% e 1,0%, estão demonstrados nas Figuras 18 e 19, respectivamente.

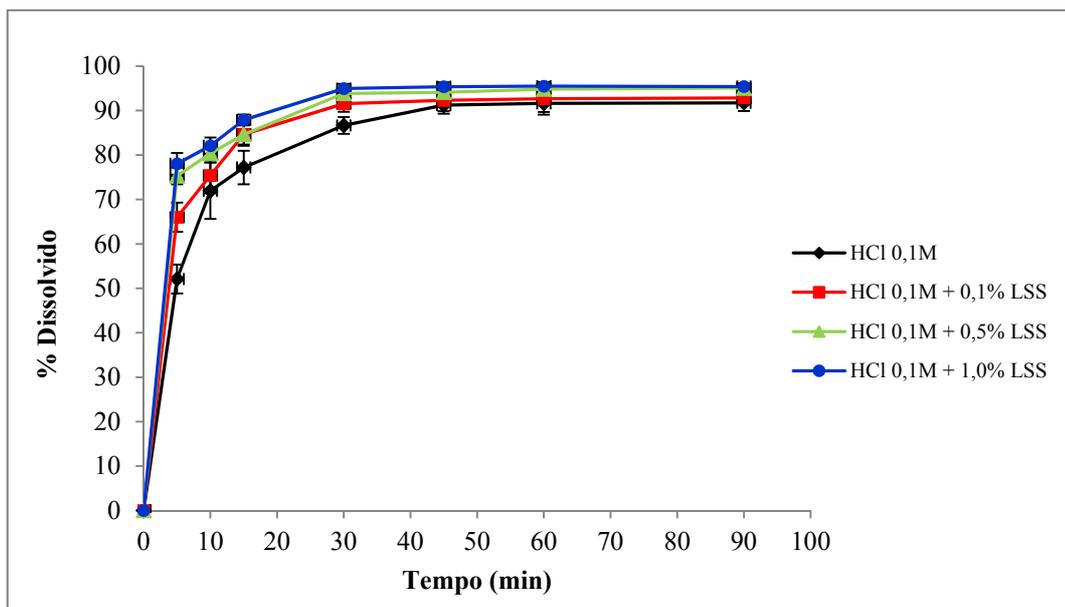


Figura 18. Perfil de dissolução do MR de BMZ suspensão oral na velocidade de agitação de 50 rpm, nos meios de dissolução HCl 0,1M; HCl 0,1M + 0,1% LSS; HCl 0,1M + 0,5% LSS; HCl 0,1M + 1% LSS.

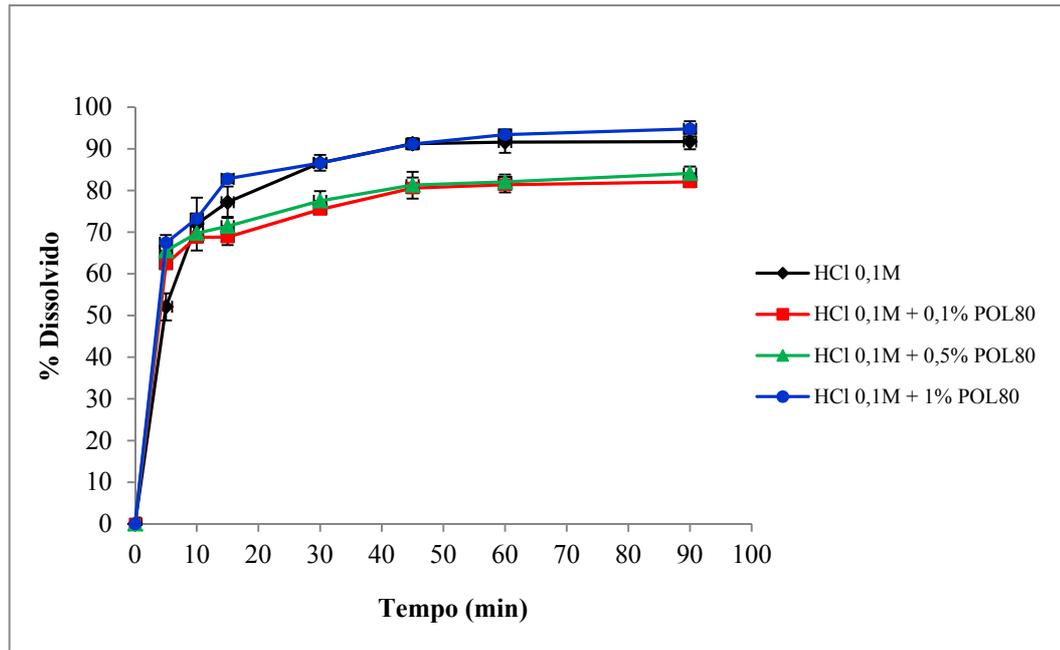


Figura 19. Perfil de dissolução do MR de BMZ suspensão oral na velocidade de agitação de 50 rpm e meios de dissolução HCL 0,1M; HCl 0,1M + 0,1% POL80; HCl 0,1M + 0,5% POL80; HCl 0,1M + 1% POL80.

O meio HCl 0,1M gerou um perfil que apresentou dissolução mais lenta do fármaco, comparativamente com os perfis obtidos na presença do tensoativo LSS ao meio, nas diferentes concentrações avaliadas (Figura 18). Entretanto, foi observado que, ao final de 90 minutos de teste, o percentual dissolvido com o meio contendo tensoativo, nas três concentrações avaliadas, foi semelhante ao observado com o meio HCl 0,1M sem o tensoativo.

Na Figura 19, observa-se que a adição do tensoativo POL80 ao HCl 0,1M nas concentrações de 0,1% e 0,5% produziu dissolução rápida, em 5 minutos, com uma dissolução incompleta ao final do teste. A presença de 1,0% de POL80 produziu dissolução rápida e completa do fármaco. Em relação aos perfis de dissolução obtidos com o meio HCl 0,1M sem tensoativo e na presença dos tensoativos LSS e POL80, verificou-se que a adição de tensoativo ao meio produziu pequenas alterações em comparação com o meio sem tensoativo. Desta forma, a adição de tensoativo ao meio HCl 0,1M demonstrou não ser necessária.

Os resultados obtidos com os meios FG (sem pepsina) e FG (com pepsina) estão apresentados na Figura 20.

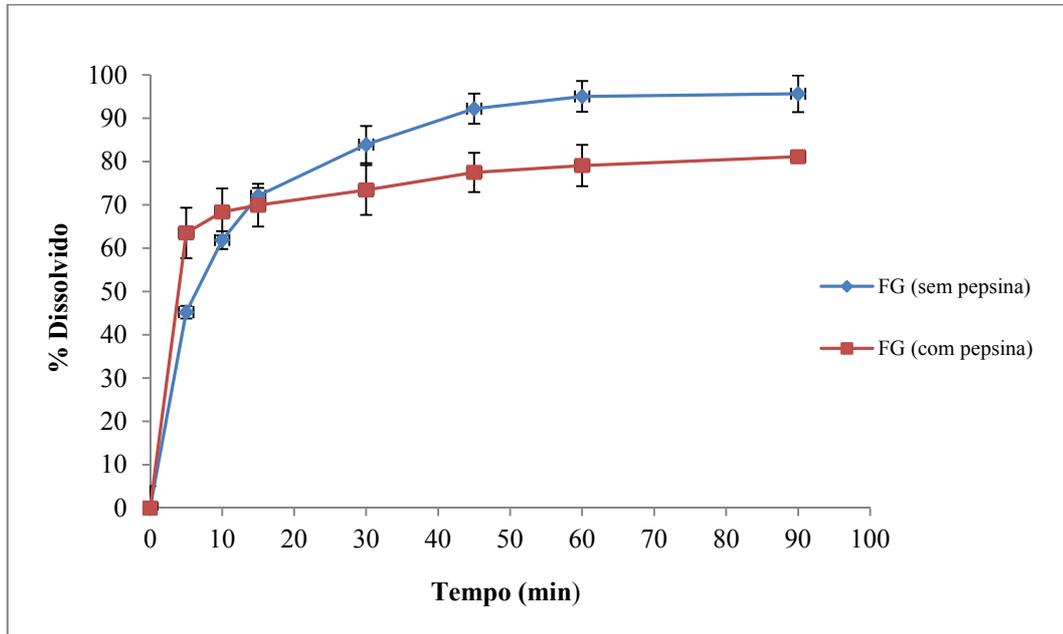


Figura 20. Perfil de dissolução do MR de BMZ suspensão oral na velocidade de agitação de 50 rpm e meios de dissolução FG (sem pepsina) e FG (com pepsina).

O meio FG (sem pepsina) produziu uma curva de dissolução do fármaco com percentual dissolvido de 45%, em 5 minutos e liberação gradual ao longo do tempo, com dissolução completa do fármaco ao final do teste. O meio FG (com pepsina), embora tenha apresentado bons resultados para o teste de solubilidade de BMZ, não produziu perfil adequado para a forma farmacêutica suspensão oral. Observa-se um perfil em que o fármaco apresentou inicialmente uma dissolução rápida, porém incompleta ao final do ensaio.

Na Figura 21, observa-se que o meio de dissolução Tampão acetato pH 4,5 + 1% LSS causou a estagnação do processo de dissolução do fármaco.

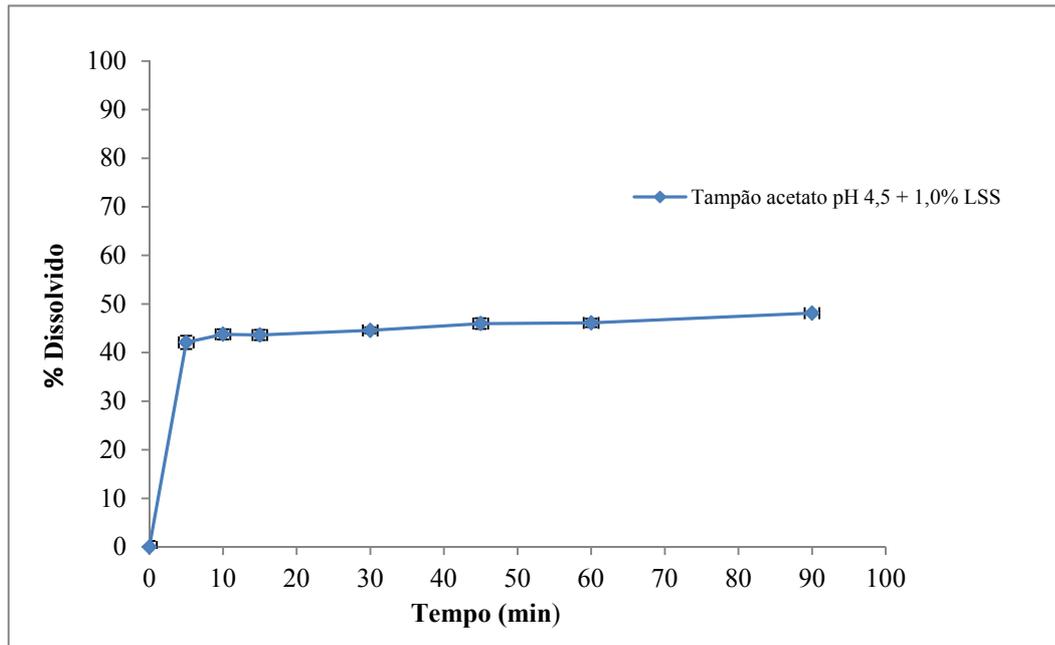


Figura 21. Perfil de dissolução do MR de BMZ suspensão oral, na velocidade de agitação de 50 rpm e meio de dissolução Tampão acetato pH 4,5 + 1% LSS.

Para os meios que apresentaram os perfis de dissolução mais adequados (HCl 0,1M e FG, sem pepsina) foram realizados perfis de dissolução com o MT para a observação do poder discriminativo do método. Foi escolhido como MT o produto C, que apresentou características de formulação como tamanho de partícula e viscosidade mais distintas em relação ao MR. Na Figura 22 estão representados os perfis obtidos para o MR e MT, com o meio HCl 0,1M. Observa-se o poder discriminativo do método, com dissolução incompleta e lenta do MT em relação ao perfil de dissolução obtido para o MR.

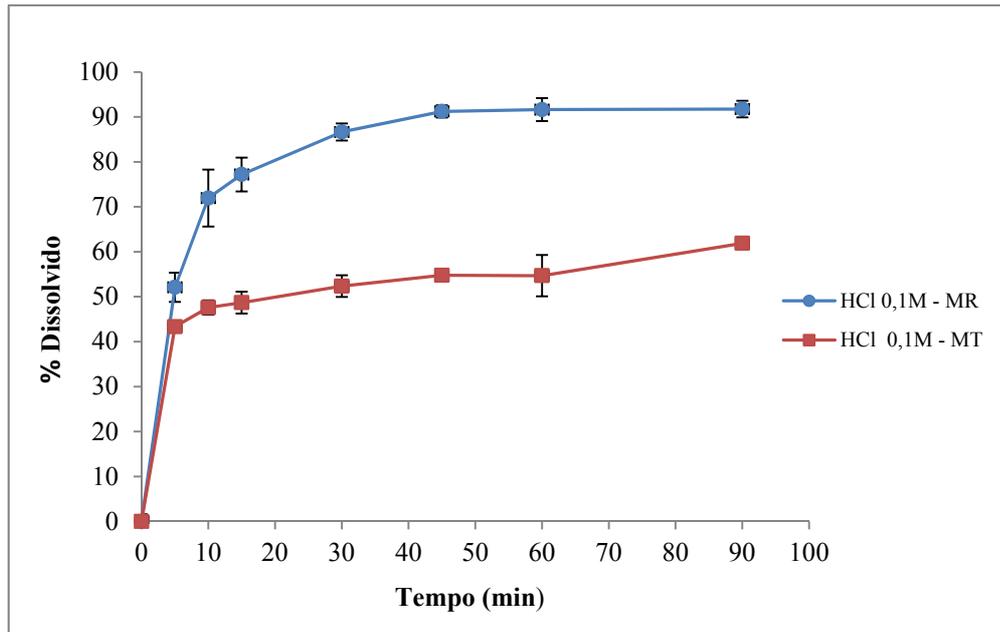


Figura 22. Perfil de dissolução dos produtos MR e MT na velocidade de agitação de 50 rpm e meio de dissolução HCl 0,1M.

O meio FG (sem pepsina) também apresentou poder discriminativo em avaliar as diferentes formulações. Na Figura 23, observa-se a liberação gradual e completa para o MR neste meio. Para o MT a dissolução foi lenta e incompleta, com percentual dissolvido em torno de 57%, após 90 minutos de teste.

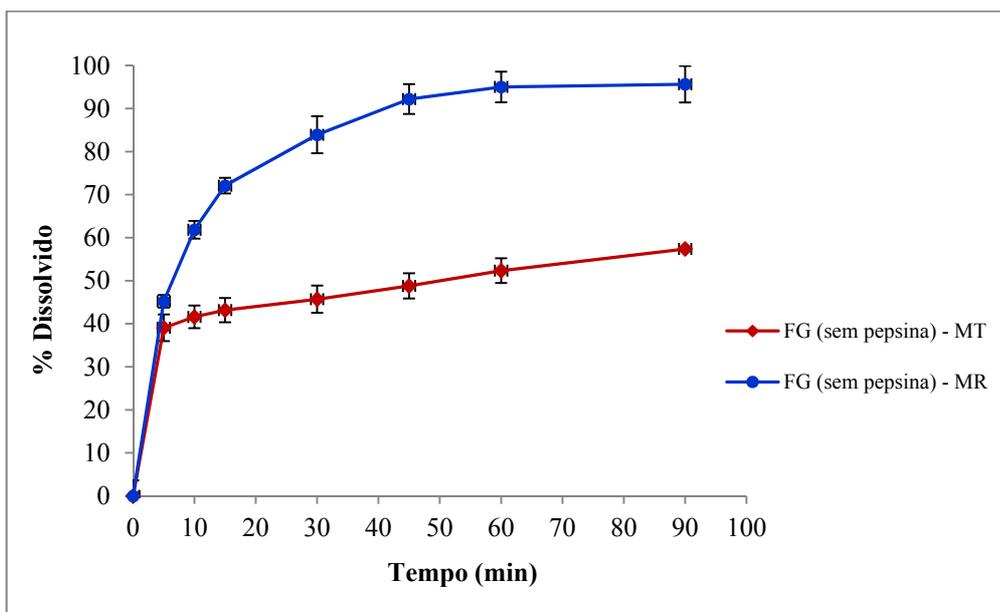


Figura 23. Perfil de dissolução dos produtos MR e MT na velocidade de agitação de 50 rpm e meio de dissolução FG (sem pepsina).

A velocidade de agitação de 25 rpm para os meios HCl 0,1M e FG (sem pepsina) foi testada em relação a sua capacidade discriminativa. A velocidade de 25 rpm é mais indicada para suspensões pouco viscosas e, com o intuito de verificar se essa velocidade apresenta a capacidade de discriminar diferenças entre formulações, os testes foram realizados com o MR e MT. Na Figura 24 está apresentado o resultado obtido com os meios HCl 0,1M e FG (sem pepsina). O perfil de dissolução obtido na velocidade de agitação de 25 rpm para o MR no meio FG (sem pepsina), apresentou uma dissolução gradual do fármaco ao longo do tempo, com percentual de dissolução de 28% em 5 minutos e de 93% ao final do teste. Com o meio HCl 0,1M foi observado uma liberação no primeiro ponto de 39% e de 89% ao final do teste para o MR. Os dois meios avaliados na velocidade de 25 rpm, também demonstraram serem discriminativos, para diferentes formulações, como verificado pelos perfis obtidos para o MT nos dois meios avaliados.

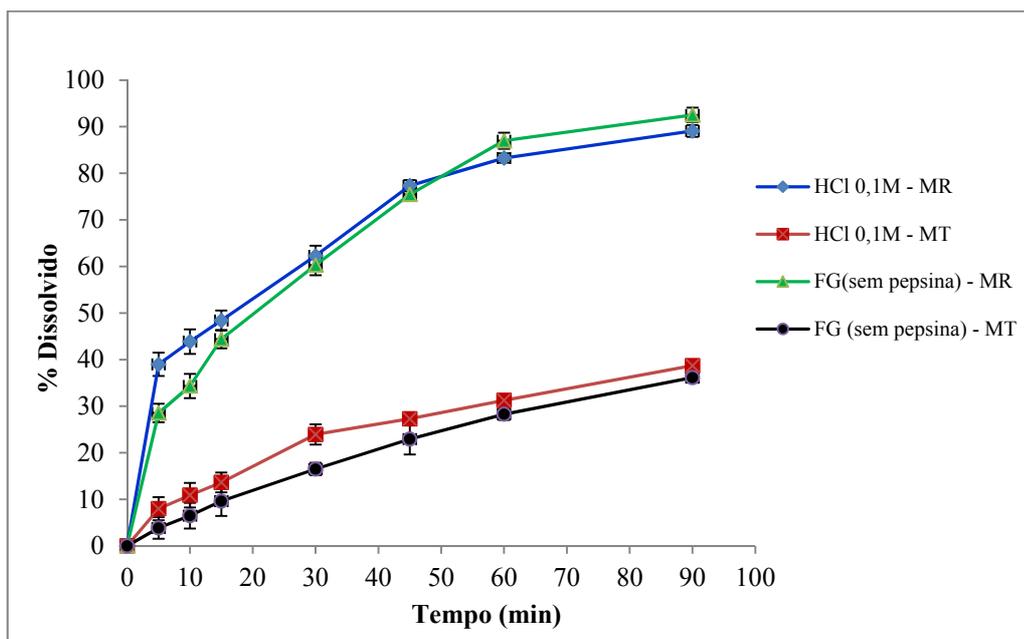


Figura 24. Perfil de dissolução dos produtos MR e MT na velocidade de agitação de 25 rpm e meios de dissolução HCl 0,1M e FG (sem pepsina).

Para auxiliar na escolha da melhor condição para o teste de dissolução de BMZ suspensão oral, foi construído um gráfico com as condições que proporcionaram os melhores perfis de dissolução obtidos com o MR. Essas condições foram os meios HCl 0,1M e FG (sem pepsina) nas velocidades de agitação de 25 e 50 rpm e estão demonstrados na Figura 25.

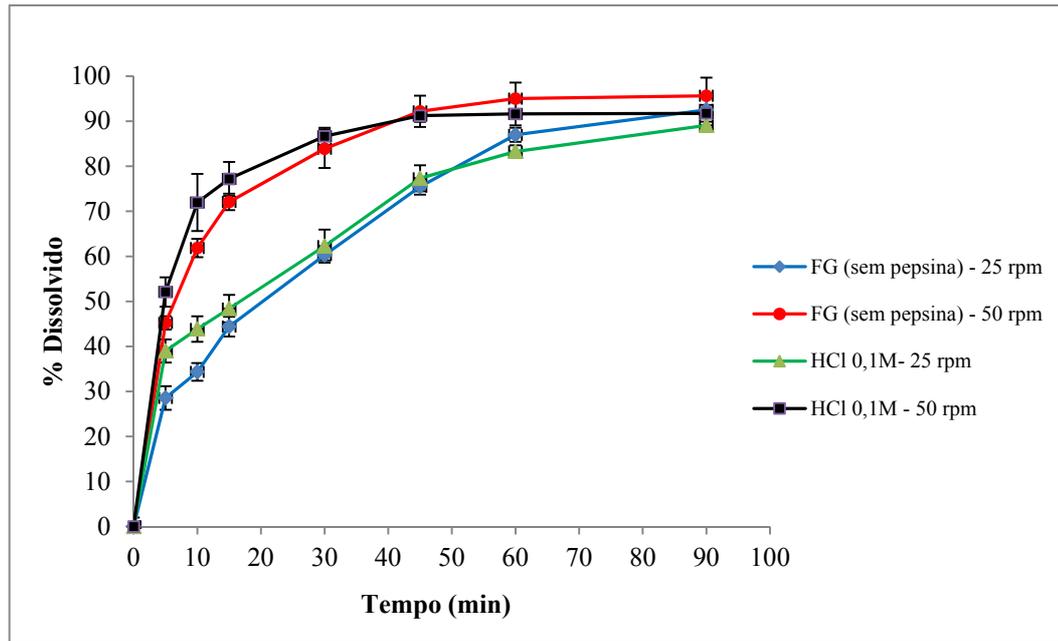


Figura 25. Perfil de dissolução do MR nas velocidades de agitação de 25 e 50 rpm e meios de dissolução HCl 0,1M e FG (sem pepsina).

A velocidade de agitação de 25 rpm produziu uma velocidade de dissolução lenta com percentuais dissolvidos de aproximadamente 60% em 30 minutos de teste, observados para ambos os meios. A análise comparativa dos perfis obtidos na velocidade de agitação de 25 rpm nos meios FG (sem pepsina) e HCl 0,1M demonstrou que os perfis obtidos nestas condições são semelhantes, com valor de f_2 maior do que 50 ($f_2=59,72$). A alteração da velocidade de agitação para 50 rpm provocou um aumento na velocidade de dissolução para os dois meios avaliados, com percentuais dissolvidos acima de 80% em 30 minutos de teste. Os perfis obtidos com o meio FG (sem pepsina) e HCl 0,1M na velocidade de 50 rpm também foram semelhantes com $f_2=61,25$. O meio FG (sem pepsina) e a velocidade de 50 rpm foram escolhidos como as condições mais adequadas para dar continuidade aos estudos. A escolha foi baseada nos resultados obtidos com esta condição, a qual gerou um perfil com menor percentual dissolvido nos primeiros 30 minutos, comparativamente ao perfil obtido com HCl 0,1M. Além disso, as condições determinadas para o ensaio de dissolução utilizam um meio biorrelevante, que garante a condição *sink* e proporcionam uma dissolução gradual e completa do BMZ a partir da suspensão oral.

O tempo do teste de dissolução é um dos parâmetros que devem ser avaliados e pode ser estabelecido a partir da análise do perfil de dissolução nas condições determinadas para o método. As especificações para o teste de dissolução envolvem uma quantidade mínima dissolvida do fármaco em determinado tempo (Q). Produtos de liberação imediata geralmente

apresentam uma dissolução que alcança 80-85% em 30-45 minutos (STORPIRTIS et al., 2009). A Farmacopeia Americana menciona que, para fármacos de liberação imediata, o tempo do teste de dissolução deve ser de 30-60 minutos. Valores de Q acima de 80% não são indicados, devido à faixa de uniformidade de conteúdo (USP 36, 2013). A escolha da especificação para o método desenvolvido foi estabelecida com base no perfil de dissolução obtido nas condições selecionadas, na qual se observa uma dissolução acima de 90% em 60 minutos. Nesse tempo, o platô da curva de dissolução foi alcançado (Figura 25). Diante do exposto, considerando que suspensões são formas farmacêuticas de liberação imediata, estabeleceu-se a especificação de que no mínimo 80% (Q) do fármaco devem dissolver em 60 minutos de teste.

5.6.2.1 Avaliação do método de inserção da amostra no meio de dissolução

O método de inserção da amostra no meio de dissolução foi avaliado conforme procedimento descrito no item 4.2.6.2.1. Os resultados obtidos com os dois modos de introdução da suspensão no meio estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23. Resultados do percentual dissolvido de BMZ suspensão oral após a inserção da amostra no meio, com seringa e com o copo de suspensão.

Tempo (minutos)	Média do percentual dissolvido de BMZ (%) ± DPR (%)*	
	Seringa	Copo de Suspensão
5	44,82 ± 7,20	33,91 ± 12,75
10	61,96 ± 7,83	38,28 ± 11,30
15	72,34 ± 8,64	41,23 ± 9,07
30	83,99 ± 2,82	45,18 ± 9,24
45	91,75 ± 3,33	48,98 ± 10,33
60	93,72 ± 3,37	51,73 ± 8,42
90	95,82 ± 3,57	53,95 ± 7,44

*n=6.

Os resultados apresentados demonstram que a inserção da amostra com seringa gerou uma dissolução completa do fármaco, com valores de DPR abaixo de 10% em todos os tempos avaliados. A inserção da amostra com o copo de suspensão impediu a dissolução completa do fármaco, com percentual dissolvido de aproximadamente 54% em 90 minutos. Com este tipo de introdução, verificou-se que as amostras ficaram retidas no copo de suspensão, no fundo da cuba, com pouca dispersão das suspensões no meio. Entretanto, apesar deste modo de inserção proporcionar uma área de superfície controlada, apresentou maiores valores de DPR, quando comparados com a inserção com seringa.

O teste *t*-Student foi utilizado para comparar os resultados do percentual dissolvido de BMZ obtidos com introdução da amostra com seringa e com o copo de suspensão, e verificar se os métodos são equivalentes. O valor obtido para *t* calculado ($t_{\text{calc}} = 7,23$) foi superior ao valor de *t* tabelado ($t_{\text{tab}} = 2,45$), para um nível de confiança de 95%, o que indica que esses dois métodos de inserção não são equivalentes. Este resultado demonstra que há diferença significativa entre os resultados obtidos com os dois modos de inserção avaliados. Devido aos melhores resultados apresentados com a inserção da amostra com seringa, este método apresentou-se adequado para ser aplicado durante os estudos de dissolução do BMZ.

5.6.2.2 Estabilidade do fármaco nas condições do teste de dissolução

A estabilidade do fármaco nas condições selecionadas para o teste de dissolução deve ser determinada ainda na etapa de desenvolvimento de um método de dissolução. Deste modo, amostras de BMZ suspensão oral foram analisadas após 60 minutos de teste (tempo zero) e, após 24 horas, mantidas em temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

De acordo com o resultado exposto na Tabela 24 verificou-se que o fármaco permaneceu estável no meio selecionado durante o período de 24 horas, com recuperação de 99,35%, dentro da faixa aceitável de 98% a 102% (USP 36, 2013).

Tabela 24. Valores experimentais obtidos na determinação da estabilidade da amostra de BMZ suspensão oral nas condições do teste de dissolução.

Tempo (h)	Área*	% Recuperada
0	1167292	99,35
24 horas	1159682	

*n=3.

5.6.3 Validação do método de dissolução

As condições do método de dissolução determinadas e que foram submetidas à validação estão descritas a seguir:

- **Aparato:** (2) pá
- **Volume de meio:** 900 mL
- **Meio de dissolução:** FG (sem pepsina) a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$
- **Velocidade de agitação:** 50 rpm
- **Tempo do teste:** 60 minutos

5.6.3.1 Especificidade

Os cromatogramas obtidos com o meio de dissolução FG (sem pepsina), amostra simulada de excipientes, amostra de BMZ suspensão oral e solução de BMZ SQR estão apresentados na Figura 26.

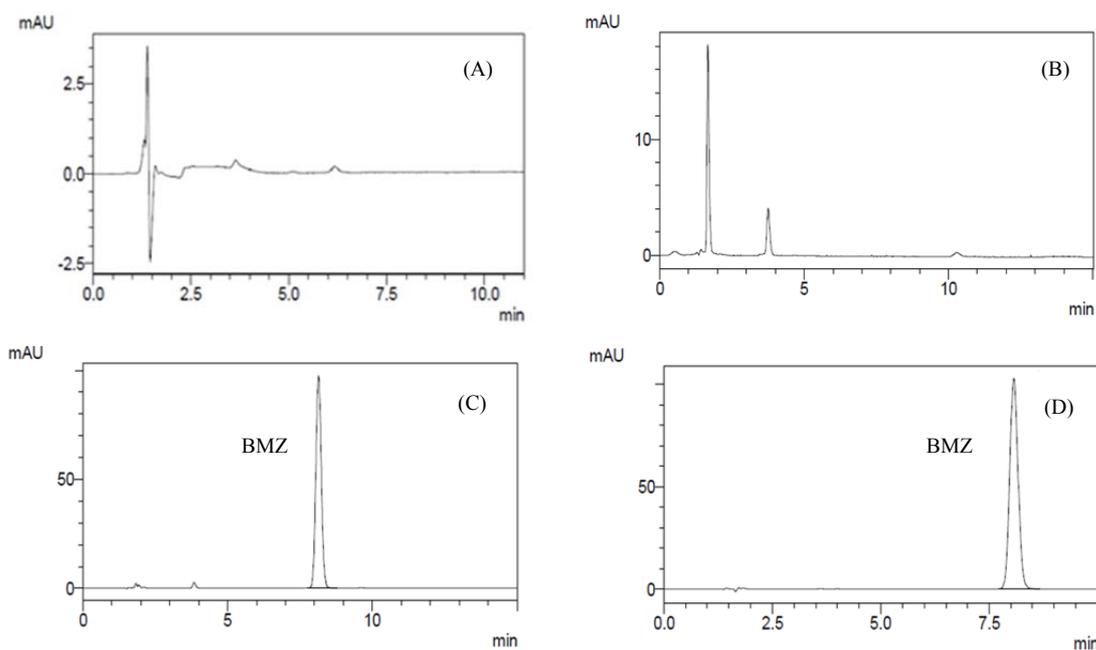


Figura 26. Cromatogramas (A) meio de dissolução FG (sem pepsina); (B) amostra simulada de excipientes; (C) amostra de BMZ suspensão oral e (D) solução de BMZ SQR. Condições cromatográficas: fase móvel: ácido fosfórico 0,1% pH 3,0:metanol (50:50, v/v); coluna C18 (4,0 x 150 mm, 5 μ m); fluxo 1,0 mL/min; detecção: 235 nm; volume de injeção: 10 μ L; temperatura: 25 $^{\circ}$ C.

Os cromatogramas demonstram não haver nenhuma interferência dos excipientes e do meio de dissolução no tempo de retenção do BMZ, comprovando assim, a especificidade do método.

5.6.3.2 Linearidade

A linearidade do método de dissolução foi avaliada através da análise de soluções de BMZ SQR com concentrações dentro da faixa de $\pm 20\%$ da menor concentração até $\pm 20\%$ da maior concentração esperada. Neste sentido, a curva de calibração média para o BMZ foi obtida na faixa de 3,56-44,45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e está demonstrada na Figura 27. De acordo com o observado, foi obtido um coeficiente de correlação linear (r) de 0,9999, estando de acordo com o preconizado pela ANVISA, que determina um valor de no mínimo $r=0,99$ (BRASIL, 2003). A validade da regressão linear foi avaliada pela análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 25. Os resultados demonstram regressão linear significativa sem desvio da linearidade, para um nível de significância de 95%, e confirmam a linearidade do método.

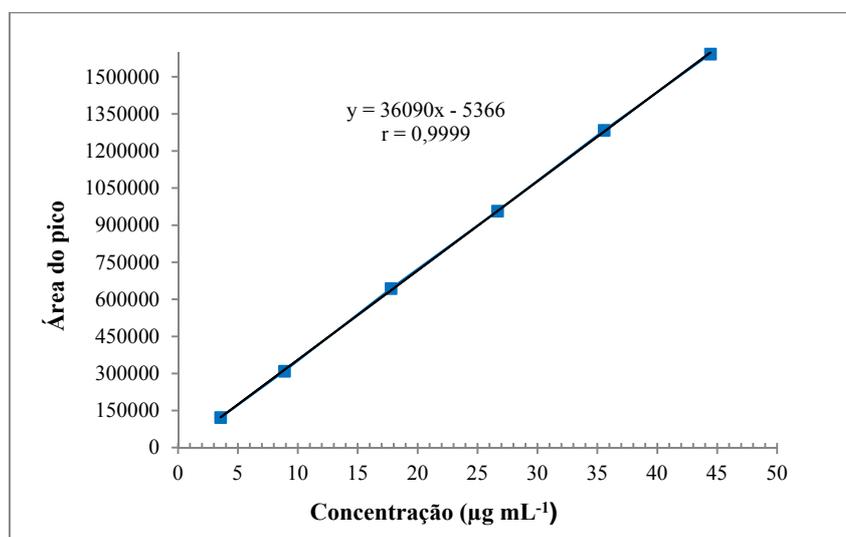


Figura 27. Curva de calibração média de BMZ representativa da linearidade do método de dissolução.

Tabela 25. Análise de variância (ANOVA) para a avaliação da linearidade do método de dissolução.

Fontes de Variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	5	117886711593	23577342319	535,54*	3,48
Regressão Linear	1	117360455785	117360455785	2666*	4,96
Desvio da Linearidade	4	526255808	131563952	3,0	3,71
Resíduo	12	528300235	44025020		
Total	17	-117358411358			

*Significativo para $p < 0,05$.

5.6.3.3 Precisão

A precisão foi avaliada pelos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária. Na Tabela 26 estão apresentados os valores do percentual dissolvido de BMZ. Os valores dos DPR obtidos em cada dia de análise (repetibilidade) e interdia (precisão intermediária) encontraram-se dentro do valor aceitável, de no máximo 5,0 % (USP 36, 2013), comprovando a precisão do método.

Tabela 26. Resultados da análise da precisão do método de dissolução.

Amostras	Repetibilidade		Precisão Intermediária
	% dissolvido de BMZ		
	Dia 1	Dia 2	
1	90,22	95,08	
2	93,48	92,84	
3	94,65	89,82	
4	90,85	93,71	
5	93,87	94,33	
6	95,74	91,96	
Média	93,14	92,96	93,05
DP	2,17	1,89	0,13
DPR (%)	2,33	2,03	0,14

5.6.3.4 Exatidão

A exatidão do método de dissolução foi demonstrada experimentalmente pela adição ao meio de dissolução de uma quantidade conhecida de BMZ SQR e amostra simulada de excipientes, conforme descrito no item 4.2.6.3.4. Os resultados determinados experimentalmente podem ser visualizados na Tabela 27 e demonstram a exatidão do método, com percentagens de recuperação média entre 99,34% e 99,65 %, dentro da faixa aceitável, de 95% a 105%, para métodos de dissolução (USP 36, 2013).

Tabela 27. Valores experimentais da porcentagem de recuperação obtidos na determinação da exatidão do método de dissolução.

	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Recuperação (%)	Média (%)	DPR (%)
	Adicionada	Recuperada			
10%	3,56	3,51	98,60	99,34	1,82
		3,49	98,03		
		3,60	101,40		
50%	17,78	17,93	100,84	99,53	1,16
		17,54	98,65		
		17,62	99,10		
120%	42,67	43,28	101,43	99,65	1,62
		41,93	98,27		
		42,35	99,25		

5.6.3.5 Robustez

Considerando que bolhas de ar podem atuar como uma barreira para o processo de dissolução e podem prejudicar a confiabilidade dos resultados (USP 36, 2013), a influência da desaeração do meio sobre o ensaio de dissolução foi verificada. Os valores experimentais obtidos estão apresentados na Tabela 28.

Tabela 28. Resultado do ensaio de dissolução utilizando meio desaerado e sem desaeração, para avaliação da robustez.

Tempo (minutos)	Média do % dissolvido de BMZ*	
	Meio desaerado	Meio sem desaeração
5	44,82	43,77
10	61,96	60,31
15	72,34	72,17
30	83,99	82,95
45	91,75	90,14
60	93,72	94,88
90	95,82	94,06

*n=6.

O teste de t de Student foi utilizado para comparar os resultados dos perfis obtidos com o meio de dissolução desaerado e sem desaeração. O valor para t calculado ($t_{\text{calc}} = 0,08$) não excedeu o valor de t tabelado ($t_{\text{tab}} = 2,18$), o que demonstra que não há diferença entre os valores do percentual dissolvido de BMZ obtidos com o meio desaerado e sem desaeração. Esses resultados evidenciam que a desaeração do meio não influenciou os resultados do perfil de dissolução. Desta forma, a utilização do meio de dissolução sem desaeração pode ser empregada, em caso de necessidade, comprovando a robustez do método para o critério avaliado.

5.6.3.6 Adsorção nos filtros

Nos testes de dissolução, filtros são utilizados com a finalidade de interromper a dissolução do fármaco e remover partículas em suspensão (STORPIRTIS et al., 2009). Os filtros devem ser inertes, não liberar partículas para a solução e não adsorver partículas do fármaco. A adsorção de fármacos na superfície dos filtros deve ser avaliada, pois a adsorção pode levar a resultados fora do especificado. Neste contexto, a adsorção do BMZ nos filtros utilizados no teste de dissolução foi avaliada. Os resultados estão expostos na Tabela 29 e apresentam valores de recuperação do fármaco de mais de 95% e estão de acordo com o critério de aceitação, para a adsorção nos filtros.

Tabela 29. Percentual de recuperação de BMZ após filtração em papel filtro de faixa preta e filtro de membrana de *nylon* de 0,45 μm .

	Concentração de BMZ	
	3,56 $\mu\text{g mL}^{-1}$	35,56 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Recuperação Média (%)	102,03	100,56
DPR (%)	1,07	0,49

De acordo com os resultados obtidos experimentalmente, conclui-se que os filtros utilizados não provocam perda de fármaco por adsorção na sua superfície e podem ser empregados com segurança nos testes de dissolução.

5.6.4 Perfil de dissolução de produtos de BMZ suspensão oral

Os perfis de dissolução dos seis produtos de BMZ suspensão oral estão apresentados na Figura 28. Os produtos foram submetidos às mesmas condições de ensaio. Para todos os produtos avaliados, o DPR obtido em até 10 minutos, não excedeu a 20% e para os demais tempos, os desvios foram menores do que 10%.

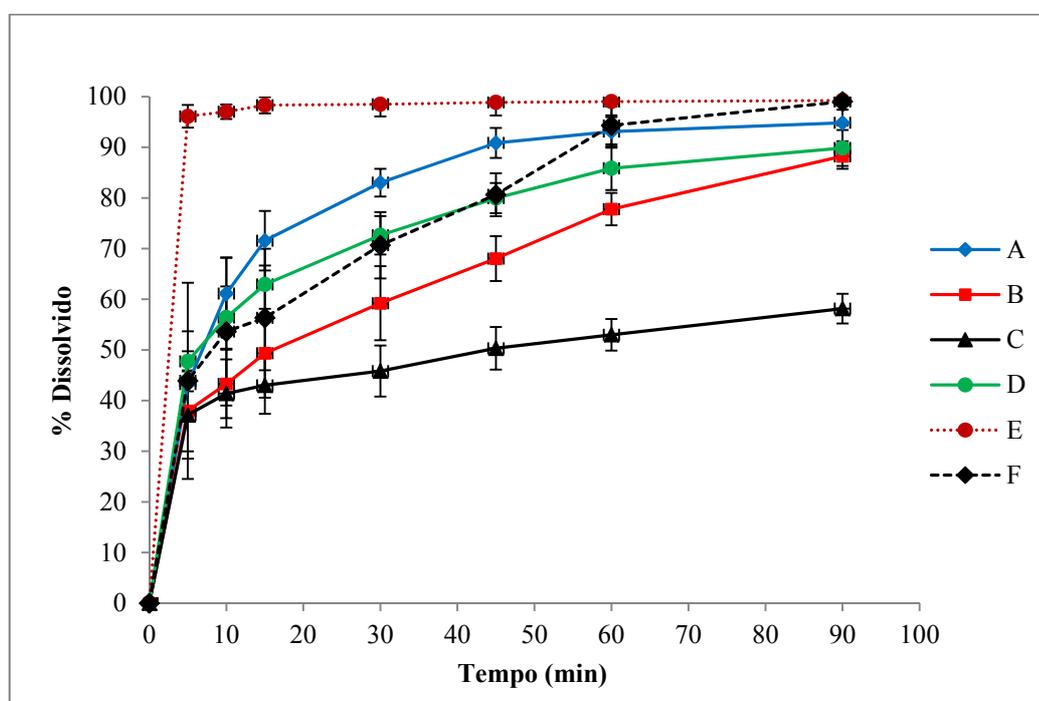


Figura 28. Perfil de dissolução dos produtos A, B, C, D, E e F. Condições do ensaio de dissolução: Meio de dissolução: FG (sem pepsina) a $37 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$, aparato (2) pá; velocidade de agitação 50 rpm (n=12).

Comparações entre os perfis de dissolução dos produtos foram realizadas e para avaliar a semelhança entre os perfis foi empregado como ferramenta, o fator de semelhança, f_2 .

O produto B apresentou um percentual dissolvido de 77,79% em 60 minutos de ensaio, estando o resultado fora da especificação determinada para o teste de dissolução, de $Q \geq 80\%$. Este valor pode estar relacionado com os desvios de qualidade encontrados durante a determinação de teor e pH. Esses fatos atestam a capacidade discriminativa do método, no entanto, não foi possível estabelecer o perfil de dissolução comparativo deste produto com os outros em estudo.

O cálculo do f_2 não foi aplicado para comparar o perfil de dissolução do produto E com os demais produtos, devido o produto apresentar dissolução muito rápida (mais de 85% em 15 minutos) e não correspondente aos perfis de dissolução obtidos com os demais produtos.

Os valores de f_2 encontrados estão apresentados na Tabela 30. Foram considerados semelhantes os perfis de dissolução que apresentaram valor de f_2 entre 50-100.

Tabela 30. Análise comparativa dos perfis de dissolução pelo modelo independente, f_2 .

Comparação	Parâmetro
	f_2
Produto A x C	26,16
Produto A x D	52,42
Produto A x F	47,59
Produto C x D	31,10
Produto C x F	30,45
Produto D x F	65,22

De acordo com o observado na Tabela 30, os produtos que mostraram perfis semelhantes foram os A e D e os produtos D e F, com valores de f_2 maiores que 50.

A velocidade de dissolução rápida do produto E, com dissolução completa do BMZ em 5 minutos de teste, pode ser atribuída aos valores encontrados para o tamanho de partícula e viscosidade do produto (Tabela 20 e Tabela 21). Conforme descrito pela equação de Noyes e Whitney, o aumento da área superficial das partículas de BMZ em contato com o meio de dissolução e o aumento do coeficiente de difusão do fármaco no líquido, promove uma dissolução rápida do fármaco (SIMON et al., 2013).

O produto C foi o produto que apresentou os maiores valores para o tamanho de partícula e viscosidade, comparativamente com os outros produtos avaliados, o que pode ter contribuído para a velocidade de dissolução lenta do fármaco (SINKO, 2008).

Segundo Marcolongo (2003) fatores como o tamanho de partícula do sólido, viscosidade do sistema e os excipientes que compõem a formulação são interdependentes e podem contribuir para a diferença obtida entre os perfis de dissolução dos produtos analisados.

5.6.5 Cinética de dissolução

A partir dos dados do perfil de dissolução obtidos para os produtos foram aplicados os modelos matemáticos de ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Hixson-Crowell e Weibull.

De acordo com os valores obtidos para o coeficiente de determinação (R^2) demonstrados na Tabela 31, a cinética de dissolução para o medicamento referência pode ser descrita pelo modelo de Weibull, o qual apresentou maior coeficiente de determinação.

Tabela 31. Coeficiente de determinação (R^2) obtidos para o produto A.

Modelo	Coeficiente de determinação (R^2)
Ordem Zero	0,8265
Primeira Ordem	0,7490
Higuchi	0,9193
Hixson-Crowell	0,7763
Weibull	0,9513

Para os produtos B, C, D, E e F a cinética de dissolução também foi descrita pelo modelo de Weibull, com os melhores valores obtidos para R^2 . A partir da equação de Weibull obtida para cada produto foram determinados os parâmetros α e β . Os resultados estão apresentados na Tabela 32.

Tabela 32. Coeficiente de determinação (R^2) e parâmetros de Weibull obtidos para as suspensões orais de BMZ.

Produtos	R^2	β	α
A	0,9513	0,2900	- 0,5159
B	0,9877	0,2972	- 0,6491
C	0,9755	0,1470	- 0,5371
D	0,9913	0,2280	- 0,4755
E	0,9081	0,0107	- 0,0230
F	0,9886	0,2935	- 0,5714

O modelo de Weibull é um modelo que se aplica a todos os tipos de curvas de dissolução. Para os produtos que seguem este modelo, o logaritmo da quantidade dissolvida do fármaco *versus* o logaritmo do tempo é linear e demonstra a fração cumulativa do fármaco, em determinado tempo (COSTA & LOBO, 2001; DOKOUMETZIDIS et al., 2006). O parâmetro α determina a escala temporal do processo (MANADAS et al., 2002). O parâmetro β caracteriza a forma da curva. Quando a curva apresenta valores para $\beta = 1$ a curva é exponencial, valores de $\beta > 1$ indica curvas de formato sigmoide e $\beta < 1$ caracteriza a curva como parabólica (MANADAS et al., 2002; ADAMS et al., 2002; KOESTER, et al., 2004). O parâmetro β calculado para todas as suspensões orais de BMZ em estudo foi menor do que 1, o que indica curvas parabólicas com inflexão inicial. As curvas parabólicas são comuns em suspensões que liberam rapidamente o fármaco nos primeiros tempos da dissolução e depois permanecem com dissolução constante (FONSECA, 2007).

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- As análises de espectroscopia na região do ultravioleta e região do infravermelho, espectrometria de massas, determinação de ponto de fusão, perda por dessecação e análise quantitativa permitiram a caracterização da matéria-prima utilizada como substância de referência no presente trabalho.
- O método de quantificação de BMZ desenvolvido por CLAE para a determinação de BMZ na forma farmacêutica suspensão oral apresentou especificidade frente aos excipientes e aos produtos de degradação. O BMZ mostrou-se sensível a todas as condições de estresse avaliadas. Além disto, o método mostrou-se linear, preciso, exato e robusto.
- As análises de pH, teor, perfil reológico e tamanho de partícula permitiram a caracterização das suspensões orais de BMZ. A análise do tamanho de partícula evidenciou que os produtos apresentam uma variabilidade nos tamanhos e na distribuição de tamanho de suas partículas. A análise reológica permitiu classificá-las como fluidos de Herschel-Bulkley com comportamento pseudoplástico.
- O método de dissolução desenvolvido, com 900 ml de FG (sem pepsina) à $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, aparato pá e velocidade de 50 rpm apresentou poder discriminativo entre produtos com diferentes características de formulação. A validação comprovou a especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez do método.
- No estudo comparativo dos perfis dos produtos, verificou-se que o medicamento referência (produto A) apresentou perfil semelhante somente com o produto D. Além disto, o produto D apresentou perfil semelhante ao produto F. O produto E apresentou dissolução muito rápida e o produto C apresentou velocidade de dissolução lenta, características que podem estar correlacionada com o tamanho de partícula e viscosidade.

- A cinética de dissolução das suspensões em estudo pode ser descrita pelo modelo de Weibull, que é uma ferramenta para caracterizar as curvas de dissolução deste tipo de forma farmacêutica.
- O método de dissolução proposto com quantificação por CLAE possibilita sua aplicação em ensaios de rotina em laboratórios de controle de qualidade e em estudos de estabilidade de suspensões orais de benzoilmetronidazol.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, E.; COOMANS, D.; SMEYERS-VERBEKE, J.; MASSART, D.L. Non-linear mixed effects models for the evaluation of dissolution profiles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 240, n. 1-2, p. 37-53, 2002.

ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. **Die Pharmazie**, v. 60, n. 12, p. 900-904, 2005.

AMIDON, G.L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v.12, n. 3, p. 413-420, 1995.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN JR., L.V. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

ARDREY, R.E. **Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction**. England: John Wiley & Sons Ltd, 2003.

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

BEDIN, A.C. **Nanoemulsões contendo Benzoilmetronidazol**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Farmacologia, UFSC. Florianópolis, 2011.

BEMPONG, D.K.; MANNING, R.G.; MIRZA, T.; BHATTACHARYYA, L. A stability-indicating HPLC assay for metronidazole benzoate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, n.4, p.776-780, 2005.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 310**, de 1º de setembro de 2004. Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução. Diário Oficial da União, Brasília, 03 de set. de 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 31**, de 11 de agosto de 2010. Realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo. Diário Oficial da União, Brasília, 12 de ago. de 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 37**, de 3 de agosto de 2011. Dispõe sobre o Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 05 de ago. de 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nota técnica nº 003/2013/CEFAR/GTFAR/GCMED/ANVISA**. Dispõe sobre a avaliação da solubilidade de fármacos e o desenvolvimento de métodos de dissolução para estudos de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução comparativo, e dá outras providências. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ddf957004f6206189687f79a71dcc661/nota+t%C3%A9cnica.pdf?MOD=AJPERES&attachment=true&id=1366839901426>. Acesso em: 16 de julho de 2013.

BRITISH PHARMACOPOEIA. London: Her Majesty's Stationery Office, 2014.

BROWN, C.K.; CHOKSHI, H.P.; NICKERSON, B.; REED, R.A.; ROHRS, B.R.; SHAH, P.A. Acceptable Analytical Practices for Dissolution Testing of Poorly Soluble Compounds. **Pharmaceutical Technology**, v. 28, n.1, p. 56-65, 2004.

BROWN, C.K.; FRIEDEL, H.D.; BARKER, A.R.; BUHSE, L.F.; KEITEL, S.; CECIL, T.L.; KRAEMER, J.; MORRIS, J.M.; REPPAS, C.; STICKELMEYER, M.P.; YOMOTA, C.; SHAH, V.P. FIP/AAPS Joint Workshop Report: Dissolution/In vitro Release Testing of Novel/Special Dosage Forms. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 2, p. 782-794, 2011.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman – As bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11. ed. New York: MacGraw-Hill, 2010.

CORRÊA, N.M.; JUNIOR, F.B.C.; IGNÁCIO, R.F.; LEONARDI, G.R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 73-78, 2005.

COSTA, P.J.C. Avaliação *in vitro* da bioequivalência de formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 2, p. 141-153, 2002.

COSTA, P.; LOBO, J.M.S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001.

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

DRESSMAN, J.B.; VERTZONI, M.; GOUMAS, K.; REPPAS, C. Estimating drug solubility in the gastrointestinal tract. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n.7, p. 591-602, 2007.

DRESSA, J.; KRÄMER, J. **Pharmaceutical Dissolution Testing**. 1. ed. New York: Informa Healthcare, 2005.

FAN, B.; STEWART, J. T.; WHITE, C.A. Stability and Dissolution of Lozenge and Emulsion Formulations of Metronidazole Benzoate. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, v. 5 n. 2, p. 153-156, 2001.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

FDA. Guidance for industry Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms, 1997. Disponível em:
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070237.pdf>. Acesso em: 05 de dezembro de 2013.

FDA. Guidance for industry Waiver of In Vivo Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System, 2000. Disponível em:
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070246.pdf>. Acesso em: 05 de dezembro de 2013.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**, 3. ed. São Paulo: EDUSP, 2003.

FONSECA, L.B. **Desenvolvimento e Validação de Método de Dissolução Aplicado a Suspensões Oraís de Nimesulida**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRJ. Rio de Janeiro, 2007.

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

HOELGAARD, A.; MOLLER, N. Hydrate formation of metronidazole benzoate in aqueous suspensions. **International Journal of Pharmaceutics**, v.15, n.2, p.213-221, 1983.

HOUGHTON, G.W. A comparison of the pharmacokinetics of Metronidazole in man after oral administration of single doses of Benzoylmetronidazole and Metronidazole. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.14, n.2, p. 201-206, 1982.

HUILGOL, R.R.; YOU, Z. Application of the augmented Lagrangian method to steady pipe flows of Bingham, Casson and Herschel-Bulkley fluids. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, v.128, n. 2-3, p. 126-143, 2005.

ICH – International Conference on Harmonization. Validation of analytical methods: text and methodology Q2 (R1). ICH Steering Committee, Switzerland, 2005.

KIBBE, A.H. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, 3.ed. Washington: American Pharmaceutical Association: Pharmaceutical Press, 2000.

KOESTER, L.; ORTEGA, G.G.; MAYORGA, P.; BASSANI, V.L. Mathematical evaluation of in vitro release profiles of hydroxypropylmethylcellulose matrix tablets containing carbamazepine associated to b-cyclodextrin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n.1, p. 177-179, 2004.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANING, J. L. **Teoria e Prática na indústria Farmacêutica**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

LINDENBERG, M.; WIEGAND, C.; DRESSMAN, J.B. Comparison of the Adsorption of Several Drugs to Typical Filter Materials. **Dissolution Technologies**, v.12, n.1, p. 22-25, 2005.

MANADAS, R; PINA, M. E; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.4, p.375-399, 2002.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de Medicamentos: Fundamentos, Aplicações, Aspectos Regulatórios e Perspectivas na Área Farmacêutica**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, USP. São Paulo, 2003.

MARQUES, M. R. C; LOENBERG, R.; ALMUKAINZI, M. Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing. **Dissolution Technologies**, v. 18, n. 3, p. 15-28, 2011.

MARTINDALE: **The Complet Drug Reference**. 36. ed. London: Pharmaceutical Press, 2009.

MERCK INDEX. 14. ed. New Jersey: Merck & Co, 2006.

MOGHIMIPOUR, E.; KOUCHAK, M.; SALIMI A.; BAHRAMPOUR, S.; HANDALI, S. The Effect of Polymer Content on the Non-Newtonian Behavior of Acetaminophen Suspension. **Journal of Drug Delivery**, v. 2013, n.1, p. 1-5, 2013.

NETZ, P. A.; ORTEGA, G. G. **Fundamentos de físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

PÄHKLA, E.R.; KOPPEL, T.; SAAG, M.; PÄHKLA, R. Metronidazole concentrations in plasma, saliva and periodontal pockets in patients with periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, n. 1, p. 163-166, 2005.

PASHANKOV, P. P.; KOSTOVA, L. L. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of metronidazole benzoate in suspension dosage form. **Journal of Chromatography**, v. 394, n. 2, p. 382-387, 1987.

PAUL, D.R. Elaborations on the Higuchi model for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 418, n. 1, p. 13-17, 2011.

ROSSI, R.C., DIAS, C.L.; BAJERSKI, L.; BERGOLD, A.M.; FRÖEHLICH, P.E. Development and validation of discriminating method of dissolution for fosamprenavir tablets based on in vivo data. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n.3, p. 439-444, 2011.

SA'SA', S.I.; KHALIL, H.S.; JALAL, I.M. A Kinetic Study of Metronidazole Benzoate Hydrolysis by Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography. **Microchemical Journal**, v. 37, p. 190-199, 1988.

SHAH, R.B.; BRYANT, A.; COLLIER, J.; HABIB, M.J.; KHAN, M.A. Stability indicating validated HPLC method for quantification of levothyroxine with eight degradation peaks in the presence of excipients. **International Journal of Pharmaceutics**, v.360, n. 1-2, p. 77-82, 2008.

SANTOS, G.S.; PEREIRA, G.G.; BENDER, E.A.; COLOMÉ, L.M.; GUTERRES, S.S.; CARVALHO, D.C.M.; WEISSMÜLLER, G. Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas destinadas à aplicação tópica de Dapsona. **Química Nova**, v.35, n.7, p. 1388-1394, 2012.

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.

SERRA, C.H.R.; STORPIRTIS, S. Comparação de perfis de dissolução da cefalexina através de estudos de cinética e eficiência de dissolução (ED%). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n.1, 2007.

SIEWERT, M.; DRESSMAN, J.; BROWN, C. SHAH, V.P. Guidelines to dissolution / in vitro release testing of novel / special dosage forms. **AAPS PharmSciTech**, v. 4, n.1, p. 43-52, 2003.

SILVA, R.L.; VOLPATO, N.M. Meios para dissolução de comprimidos de nimesulida: ação dos tensoativos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 38, n. 2, p. 163-172, 2002.

SILVA, A.T.A. **Desenvolvimento de Compostos Potencialmente ativos contra Helicobacter Pylori**. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Unesp. Araraquara, 2008.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SIMON, A.; BORGES, V.R.A.; CABRAL, L.M.; SOUSA, V.P. Development and Validation of a Discriminative Dissolution Test for Betamethasone Sodium Phosphate and Betamethasone Dipropionate Intramuscular Injectable Suspension. **AAPS PharmSciTech**. v.14, n.1, p. 425-434, 2013.

SINKO, P. J. **Martin: Físico-farmácia e ciências farmacêuticas**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

SOUZA, J. S.; FREITAS, Z.M.F.; STORPIRTIS, S. Modelos *in vitro* para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 515-527, 2007.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. **Biofarmacotécnica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

TURGUT, E.H.; ÖZYAZICI, M. Bioavailability File: Metronidazole. **FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, n. 1, p. 39-49, 2004.

USP - UNITED STATES PHARMACOPEIA. 36th ed. NF 31, Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2013.

VAGHELA, B.; KAYASTHA, R.; BHATT, N.; PATHAK, N.; RATHOD, D. Development and validation of dissolution procedures. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.1, n.3, p. 50-56, 2011.

VU, N.T.; ALOUMANIS, V.; BEN, M.J.; KUPIEC, T.C.; PATTERSON, E.K.; RADKE, J.; ERICKSON, M.A.; SCHNEIDER, G. Stability of Metronidazole Benzoate in SyrSpend SF One-Step Suspension System. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, v. 12, n. 6, p. 558-564, 2008.

YU, L.X.; AMIDON, G.L.; POLLI, J.E.; ZHAO, H.; MEHTA, M.U.; CONNER, D.P.; SHAH, V.P.; LESKO, L.J.; CHEN, ML.; LEE V.H.L.; HUSSAIN, A.S. Biopharmaceutics Classification System: The Scientific Basis for Biowaiver Extensions. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 7, p. 921- 925, 2002.

ZIETSMAN, S. L. **An Investigation into the development of a stable aqueous suspension of Metronidazole Benzoate for oral use.** Magister Scientiae. Nelson Mandela Metropolitan University. África do Sul, 2005.