

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Lilian Klein Teleginski

Estudo de compatibilidade e avaliação da dissolução *in vitro* de formulações comerciais
contendo fluconazol segundo os critérios da bioisenção

GUARAPUAVA

2015

Lilian Klein Teleginski

Estudo de compatibilidade e avaliação da dissolução *in vitro* de formulações comerciais contendo fluconazol segundo os critérios da bioisenção

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia da Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação ampla com a Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Renato de Oliveira
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Larissa Sakis Bernardi

GUARAPUAVA
2015

Catálogo na Publicação
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

T267e Teleginski, Lilian Klein
Estudo de compatibilidade de avaliação da dissolução *in vitro* de formulações comerciais contendo fluconazol segundo os critérios da bioisenção / Lilian Klein Teleginski. -- Guarapuava, 2015
xiv, 74 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Bociências aplicadas à Farmácia, 2015

Orientador: Paulo Renato de Oliveira
Co-orientadora: Larissa Sakis Bernardi
Banca examinadora: Paulo Renato de Oliveira, Rubiana Mara Mainardes, Taiana Gabriela Moretti Bonadio

Bibliografia

1. Ciências Farmacêuticas. 2. Bioisenção. 3. Fluconazol. 4. Compatibilidade. 5. Dissolução. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

CDD 615

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo fim de mais essa etapa e pelos sonhos que se concretizam.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UNICENTRO, pela oportunidade oferecida e a CAPES pela bolsa concedida.

Ao Prof. Dr. Paulo Renato de Oliveira pela amizade, paciência e dedicação na orientação deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Larissa Sakis Bernardi, pela co-orientação, amizade e apoio.

Ao Prof. Dr. Marcos Antônio Segatto Silva pela disponibilização do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos (UFSC) e equipamentos.

À doutoranda Cassiana Mendes, pelo grande apoio durante a realização das pesquisas na UFSC.

Aos colegas de laboratório Pedro Nicolau Severino Júnior, Carolina Martins Abreu, Lays Ramos, Laiane Oliveira, Ana Deisi Antunes dos Santos, Jaine Paula e, especialmente, à Aline Biggi Maciel pela amizade, ajuda e companheirismo.

À minha família por todo amor, carinho e incentivo.

Ao meu marido, e grande amor, Fábio Teleginski, agradeço pela paciência, amor, compreensão e apoio sempre.

À todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A bioisenção de estudos de bioequivalência para fármacos pertencentes à classe I do sistema de classificação biofarmacêutico (SCB) tem como principal objetivo a redução dos custos e da exposição de voluntários sadios a novas fórmulas farmacêuticas. O fluconazol é um agente antifúngico importante mas, na literatura, não está claro se ele pertence à classe I ou III do SCB. O objetivo do presente estudo foi determinar qualitativamente a composição de formulações de fluconazol disponíveis comercialmente sob a forma de cápsulas, realizar estudos de compatibilidade fármaco/excipientes, desenvolver e validar metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e comparar os perfis de dissolução *in vitro* de formulações referência, genéricas e similares para verificar o cumprimento dos critérios estabelecidos para a bioisenção. Na determinação qualitativa da composição das cápsulas, em relação à presença de excipientes críticos, uma fórmula não continha lauril sulfato de sódio mas continha manitol, em contraste com a fórmula de referência, o que pode dificultar a aceitação da bioisenção. Na análise por Calorimetria Exploratória Diferencial foi observada interação entre o fluconazol e a celulose microcristalina e entre o fluconazol e o fosfato de cálcio dibásico diidratado. No entanto, nenhuma indicação de incompatibilidade foi encontrada na análise das fórmulas farmacêuticas comerciais. Essas interações também foram avaliadas por técnicas de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, onde pequenas alterações nas bandas foram observadas e por difração de raios X de pó e microscopia eletrônica de varredura, que não evidenciaram nenhuma modificação nas características do estado sólido. O método validado por CLAE mostrou-se linear, específico, preciso, exato, com robustez e limites de detecção e quantificação satisfatórios, garantindo assim a confiabilidade dos resultados. Segundo a RDC 37/2011, para ser candidato à bioisenção, um medicamento deve ser considerado de rápida dissolução, isto é, não menos de 85% da quantidade total do fármaco contido no medicamento deve se dissolver dentro de 30 minutos. Todas as formulações testadas em meio de fluido gástrico simulado (pH 1,2) cumpriram a especificação. Em tampão acetato (pH 4,5) apenas as formulações genéricas e uma similar cumpriram com o preconizado, e em meio de fluido intestinal simulado (pH 6,8), duas genéricas e uma similar apresentaram porcentagem de dissolução acima de 85%. Desta forma, demonstra-se que nem todas as formulações comerciais disponíveis cumpririam com o estabelecido pela RDC 37/2011, mas isto não deve ser uma preocupação para o paciente, uma vez que elas foram submetidas a análises *in vivo* para aprovação pela ANVISA.

Palavras-chave: bioisenção, fluconazol, compatibilidade, dissolução.

ABSTRACT

The biowaiver of bioequivalence studies on class I drugs of the biopharmaceutics classification system (BCS) is aimed mainly at reducing the costs and the exposure of health volunteers to a new pharmaceutical formulation. Fluconazole is an important antifungal agent but in the literature it is not clear whether it belongs to BCS class I or III. The aim of this study was to qualitatively determine the composition of commercially available fluconazole formulations in the form of capsules, to carry out compatibility studies drug/excipient, to develop and validate methodology by high performance liquid chromatography (HPLC) to quantify the drug and compare the *in vitro* dissolution profiles of reference, generic and similar formulations, verifying the compliance with the criteria established for biowaiver. One formulation did not contain sodium lauryl sulfate and contained mannitol, in contrast to the reference formulation, which could hinder the acceptance of the biowaiver. The interaction of fluconazole with microcrystalline cellulose and calcium hydrogen phosphate dihydrate was observed by Differential scanning calorimetry (DSC); however, no indication of incompatibility was found in the DSC analysis of the commercial pharmaceutical formulations. These interactions were also studied by Fourier transform infrared spectroscopy, where small changes in the bands were observed, and by X-ray Powder diffraction and scanning electron microscopy, that did not evidenced any modification in the solid state characteristics. The method developed and validated by HPLC to quantify the fluconazole showed linearity, specificity, precision, accuracy, satisfactory robustness and limits of quantification and detection, thus ensuring the reliability of the results. According to RDC 37/2011 to be a biowaiver candidate the formulation should be considered as rapid dissolution, i.e., not less than 85% of the total amount of drug contained in the formulation dissolves within 30 minutes. All tested formulations in simulated gastric fluid (pH1.2) met the specification. With acetate buffer (pH 4.5), all generic and one similar formulations complied the recommendations, and with simulated intestinal fluid (pH 6.8) only two generic and one similar showed a percentage of dissolution above 85%. Thus, it was shown that not all available commercial formulations met with the criteria established by RDC 37/2011. However, it should not be a concern for the patient, since they were subjected to *in vivo* analysis before approval by ANVISA.

Keywords: biowaiver, fluconazole, compatibility, dissolution.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1 | Estrutura química do fluconazol..... | 7 |
| Figura 2 | Curvas DSC e TG/DTG do fluconazol puro obtidos em atmosfera de nitrogênio (50 mL min ⁻¹) a uma taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ | 28 |
| Figura 3 | Espectro de absorção no infravermelho do fluconazol puro..... | 29 |
| Figura 4 | Perfil de difração de raios X de pó para o fluconazol puro..... | 30 |
| Figura 5 | Micrografias de MEV: fluconazol (500x) (A), fluconazol (1000x) (B)..... | 31 |
| Figura 6 | Fluxograma do estudo de compatibilidade fármaco-excipiente..... | 35 |
| Figura 7 | Curvas de DSC das misturas do fluconazol e seus excipientes (1: 1; m/m). A: fluconazol puro, B: croscarmelose de sódio, C: lactose monoidratada, D: lactose anidra, E: estearato de magnésio, F: amido, G: polivinilpirrolidona, H: dióxido de silício, I: lauril sulfato de sódio, J: manitol..... | 36 |
| Figura 8 | Curvas de DSC para o fluconazol /fosfato de cálcio dibásico diidratado e fluconazol /celulose microcristalina. A: fluconazol puro, B: celulose microcristalina pura, C: fluconazol /celulose microcristalina, D: fosfato de cálcio dibásico diidratado, E: fluconazol /fosfato de cálcio dibásico diidratado..... | 39 |
| Figura 9 | Curvas de DSC para o fluconazol e diferentes formulações comerciais. A: fluconazol puro, B: referência, C: genérico 1, D: genérico 2, E: genérico 3, F: similar 1, G: similar 2, H: similar 3..... | 41 |
| Figura 10 | Espectros FTIR do fluconazol (A), celulose microcristalina (B), fluconazol /celulose microcristalina (C), fosfato de cálcio dibásico diidratado (D), fluconazol /fosfato de cálcio dibásico diidratado (E)... | 42 |
| Figura 11 | Padrões de DRXP para o fluconazol (A), fluconazol /celulose microcristalina (B), celulose microcristalina (C), fluconazol /fosfato de cálcio dibásico diidratado (D), fosfato de cálcio dibásico diidratado (E)..... | 44 |
| Figura 12 | Micrografias de MEV: fluconazol (500x) (A), fluconazol (1000x) (B), celulose microcristalina (1000x) (C), fluconazol/celulose microcristalina (1000x) (D), fosfato de cálcio dibásico diidratado (1000x) (E), fluconazol /fosfato de cálcio dibásico diidratado (1000x) (F)..... | 45 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 13 | Representação gráfica da curva de calibração média do fluconazol em fluido gástrico simulado (pH 1,2) obtida por CLAE..... | 47 |
| Figura 14 | Representação gráfica da curva de calibração média do fluconazol em tampão pH 4,5 obtida por CLAE..... | 48 |
| Figura 15 | Representação gráfica da curva de calibração média do fluconazol em fluido intestinal simulado (pH 6,8) obtida por CLAE..... | 48 |
| Figura 16 | Avaliação da especificidade do método analítico nos diferentes meios de dissolução contendo os excipientes. A: FGS pH 1,2, B: FGS pH 1,2 contendo fluconazol, C: Tampão acetato pH 4,5, D: Tampão acetato pH 4,5 contendo fluconazol, E: FIS pH 6,8, F: FIS pH 6,8 contendo fluconazol..... | 49 |
| Figura 17 | Perfil de dissolução do fluconazol de diferentes fabricantes em fluido gástrico simulado (pH 1,2)..... | 55 |
| Figura 18 | Perfil de dissolução do fluconazol de diferentes fabricantes em tampão acetato (pH 4,5)..... | 56 |
| Figura 19 | Perfil de dissolução do fluconazol de diferentes fabricantes em fluido intestinal simulado (pH 6,8)..... | 57 |
| Figura 20 | Curvas de DSC dos excipientes. A: croscarmelose de sódio B: lactose monoidratada, C: lactose anidra, D: estearato de magnésio, E: amido, F: polivinilpirrolidona, G: dióxido de silício, H: lauril sulfato de sódio e I: manitol..... | 74 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Tabela 1 | Sistema de Classificação Biofarmacêutico..... | 1 |
| Tabela 2 | Solubilidade do fluconazol em diferentes meios a 37 °C..... | 26 |
| Tabela 3 | Excipientes utilizados em diferentes formulações comerciais de fluconazol..... | 32 |
| Tabela 4 | Temperatura inicial (T_{onset}), pico endotérmico (T_{peak}) e variação de entalpia (ΔH) da fusão do fluconazol, fluconazol puro e em misturas de fluconazol e excipientes (1:1; m/m)..... | 40 |
| Tabela 5 | Percentual dos excipientes utilizados no teste de especificidade..... | 50 |
| Tabela 6 | Dados do ensaio de repetibilidade do método analítico para quantificação do fluconazol..... | 51 |
| Tabela 7 | Dados da precisão intermediária do método analítico para quantificação do fluconazol..... | 52 |
| Tabela 8 | Resultado do ensaio de exatidão para o método de quantificação do fluconazol..... | 52 |
| Tabela 9 | Limites de detecção e quantificação para o método de quantificação do fluconazol..... | 53 |
| Tabela 10 | Parâmetros da avaliação da robustez do método analítico para análise do fluconazol por CLAE..... | 54 |
| Tabela 11 | Porcentagem de fluconazol dissolvido em relação a quantidade de 150mg declarada pelos fabricantes..... | 58 |
| Tabela 12 | Análise do fator de diferença (f_1) em diferentes pHs, comparando com o medicamento Referência..... | 60 |
| Tabela 13 | Análise do fator de semelhança (f_2) em diferentes pHs, comparando com o medicamento Referência..... | 60 |

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|---------------------|--|
| °C | Grau Celsius |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| CLAE | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| CV% | Coefficiente de variação |
| DRXP | Difração de raios X de pó |
| DSC | Calorimetria Exploratória Diferencial |
| EMA | <i>European Medicines Agency</i> |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FGS | Fluido Gástrico Simulado |
| FIP | <i>International Pharmaceutical Federation</i> |
| FIS | Fluido Intestinal Simulado |
| FTIR | Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier |
| g mol ⁻¹ | grama/mol |
| h | Hora |
| ICH | <i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i> |
| m/m | Massa/massa |
| mAU | <i>Mili Absorbance Units</i> (Unidades de absorbância) |
| MEV | Microscopia eletrônica de varredura |
| mg | Miligrama |
| min | Minuto |
| mL | Mililitro |
| mm | Milimetro |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |

| | |
|---------------|--|
| RDC | Resolução da Diretoria Colegiada |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| SCB | Sistema de Classificação Biofarmacêutico |
| TG | Termogravimetria |
| ΔH | Varição de entalpia |
| μg | Micrograma |

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|---|----|
| 1. | INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 | Sistema de Classificação Biofarmacêutico..... | 1 |
| 1.2 | Bioisenção..... | 4 |
| 1.3 | Fluconazol..... | 7 |
| 1.4 | Caracterização e compatibilidade..... | 9 |
| 1.5 | Dissolução..... | 12 |
| 2. | OBJETIVOS..... | 14 |
| 2.1 | Objetivo geral..... | 14 |
| 2.2 | Objetivos específicos..... | 14 |
| 3. | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 15 |
| 3.1 | MATERIAIS..... | 15 |
| 3.1.1 | Amostras..... | 16 |
| 3.2 | MÉTODOS..... | 17 |
| 3.2.1 | Caracterização da matéria-prima do fluconazol..... | 17 |
| 3.2.1.1 | Solubilidade..... | 17 |
| 3.2.1.2 | Doseamento volumétrico do fluconazol..... | 17 |
| 3.2.1.3 | Caracterização do estado sólido..... | 18 |
| 3.2.1.3.1 | Calorimetria exploratória diferencial (DSC)..... | 18 |
| 3.2.1.3.2 | Análise termogravimétrica (TG)..... | 18 |
| 3.2.1.3.3 | Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).. | 18 |
| 3.2.1.3.4 | Difração de raios X do pó (DRXP)..... | 18 |
| 3.2.1.3.5 | Microscopia eletrônica de varredura (MEV)..... | 19 |
| 3.2.2 | Avaliação da composição de formulações de fluconazol..... | 19 |
| 3.2.3 | Estudos de compatibilidade..... | 19 |
| 3.2.4 | Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de fluconazol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)..... | 19 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 3.2.4.1 | Condições cromatográficas..... | 20 |
| 3.2.4.2 | Validação do método de quantificação por CLAE..... | 20 |
| 3.2.4.2.1 | Linearidade..... | 20 |
| 3.2.4.2.2 | Especificidade..... | 21 |
| 3.2.4.2.3 | Precisão..... | 21 |
| 3.2.4.2.4 | Exatidão..... | 22 |
| 3.2.4.2.5 | Limites de detecção e quantificação..... | 22 |
| 3.2.4.2.6 | Robustez | 22 |
| 3.2.4.3 | Estudo do perfil de dissolução..... | 23 |
| 3.2.4.3.1 | Preparo dos meios..... | 24 |
| 3.2.4.3.2 | Análise estatística | 25 |
| 4. | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 26 |
| 4.1.1 | Caracterização da matéria-prima do fluconazol..... | 26 |
| 4.1.1.1 | Solubilidade..... | 26 |
| 4.1.1.2 | Doseamento volumétrico do fluconazol..... | 27 |
| 4.1.1.3 | Caracterização do estado sólido da matéria-prima | 27 |
| 4.1.1.3.1 | Calorimetria exploratória diferencial (DSC)..... | 27 |
| 4.1.1.3.2 | Análise termogravimétrica (TG)..... | 28 |
| 4.1.1.3.3 | Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).. | 29 |
| 4.1.1.3.4 | Difração de raios X do pó (DRXP)..... | 30 |
| 4.1.1.3.5 | Microscopia eletrônica de varredura (MEV)..... | 31 |
| 4.2 | Avaliação da composição de formulações de fluconazol..... | 31 |
| 4.3 | Estudos de compatibilidade..... | 35 |
| 4.3.1 | Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e Análise termogravimétrica (TG)..... | 35 |
| 4.3.2 | Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).. | 42 |
| 4.3.3 | Difração de raios X do pó (DRXP)..... | 44 |

| | | |
|---------|---|----|
| 4.3.4 | Microscopia eletrônica de varredura (MEV)..... | 45 |
| 4.4 | Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de fluconazol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)..... | 46 |
| 4.4.1 | Desenvolvimento e validação do método de quantificação por CLAE..... | 46 |
| 4.4.1.1 | Linearidade..... | 47 |
| 4.4.1.2 | Especificidade..... | 49 |
| 4.4.1.3 | Precisão..... | 51 |
| 4.4.1.4 | Exatidão..... | 52 |
| 4.4.1.5 | Limites de detecção e quantificação..... | 53 |
| 4.4.1.6 | Robustez..... | 54 |
| 4.5 | Estudo do perfil de dissolução do fluconazol..... | 55 |
| 4.5.1 | Análise Estatística..... | 59 |
| 5. | CONCLUSÕES..... | 62 |
| 6. | REFERÊNCIAS..... | 63 |
| 7. | ANEXOS | 73 |
| 7.1 | Anexo A..... | 73 |
| 7.2 | Anexo B..... | 74 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sistema de Classificação Biofarmacêutico

A via de administração de medicamentos mais comum é a oral devido à conveniência e facilidade de ingestão. Porém, para inúmeros fármacos há limitações na absorção e, conseqüentemente, na biodisponibilidade (DHIRENDRA et al., 2009). A biodisponibilidade de um produto farmacêutico é definida como a velocidade e extensão à qual o princípio ativo é absorvido e fica disponível no sítio da ação do fármaco (CHOW; LIU, 2008). Somente um fármaco dissolvido está disponível para absorção, desta forma, a dissolução do fármaco e o transporte através da membrana intestinal determinam a velocidade de absorção e, portanto, o início e extensão do efeito clínico (DROOGE, 2006).

Levando em consideração estes aspectos foi criado em 1995 por AMIDON e colaboradores o Sistema de Classificação Biofarmacêutico (SCB). Este sistema visa fornecer uma abordagem científica para a classificação dos fármacos baseado na sua solubilidade e permeabilidade intestinal em combinação com as propriedades de dissolução de medicamentos orais de liberação imediata (AMIDON et al., 1995; YU et al., 2002).

O SCB categoriza os fármacos em quatro classes, conforme demonstrado na tabela 1:

Tabela 1: Sistema de Classificação Biofarmacêutico.

| Classe | Solubilidade | Permeabilidade |
|--------|--------------|----------------|
| I | Alta | Alta |
| II | Baixa | Alta |
| III | Alta | Baixa |
| IV | Baixa | Baixa |

Fonte: (AMIDON et al., 1995)

A classe I contém fármacos que apresentam alta solubilidade e alta permeabilidade. Considera-se que o fármaco é bem absorvido e que o fator limitante para a absorção é a dissolução ou o esvaziamento gástrico. Para formas farmacêuticas de liberação imediata que se dissolvem rapidamente, a absorção será controlada pela velocidade de esvaziamento gástrico e nenhuma correlação com a taxa de dissolução é esperada. Sugere-se então, uma especificação de dissolução para formas farmacêuticas de liberação imediata que, se 85 %

do fármaco se dissolver em menos de 30 minutos, pode-se assegurar a bioequivalência (AMIDON, 1995).

Na classe II estão contidos os fármacos de baixa solubilidade e alta permeabilidade. A dissolução *in vivo* é o fator limitante da absorção, a qual normalmente é inferior à obtida com o fármaco de classe I. Devido às alterações no conteúdo e na membrana intestinal ao longo do intestino, o perfil de dissolução do fármaco é que determinará sua concentração pelo intestino e assim, a absorção ocorrerá por um período maior de tempo. Os fármacos que pertencem a esta classe devem apresentar absorção variável, em função da formulação e de parâmetros *in vivo* que podem afetar a dissolução e, por isso, necessitam que os perfis de dissolução sejam mais definidos e reproduzíveis (AMIDON, 1995).

A classe III contém fármacos de alta solubilidade e baixa permeabilidade. Nesta classe a permeabilidade é o fator que controla a absorção. Como o perfil de dissolução pode ser bem definido, assim como na classe I, uma simplificação na especificação da dissolução é aplicável para as formas farmacêuticas de liberação imediata, já que a entrada do fármaco no intestino depende da velocidade de esvaziamento gástrico. Para esta classe de fármacos, tanto a velocidade como a quantidade de fármaco absorvida podem ser altamente variáveis, mas se a dissolução for rápida (85% em 15 minutos), por exemplo, essas variações serão devido ao trânsito intestinal, permeabilidade da membrana e conteúdo luminal, e não aos fatores relacionados à formulação (AMIDON, 1995).

Na classe IV estão contidos os fármacos de baixa solubilidade e baixa permeabilidade. Os fármacos presentes nesta classe apresentam problemas significativos de biodisponibilidade quando administrados por via oral. Dificilmente é possível obter uma correlação *in vitro/in vivo* (AMIDON, 1995).

A classificação de solubilidade leva em consideração a maior dosagem de uma forma farmacêutica de liberação imediata, sendo um fármaco considerado altamente solúvel quando for solúvel em 250 mL ou menos de meios aquosos na faixa de pH de 1-7,5. A estimativa de volume de 250 mL é derivada de estudos de bioequivalência que prescrevem a administração da forma farmacêutica com um copo de água a voluntários humanos em jejum (AMIDON et al., 1995, FDA, 2000).

A classificação da permeabilidade está baseada, indiretamente, na extensão da absorção intestinal do fármaco em humanos, ou diretamente, pela medida da sua velocidade de transferência através da membrana intestinal humana. Como alternativa, podem ser usados modelos animais ou *in vitro* para predizer a extensão da absorção como, por

exemplo, métodos de cultura *in vitro* de células epiteliais. Um fármaco é considerado como altamente permeável quando a extensão da absorção intestinal de uma dose administrada em seres humanos for igual ou maior que 90% (AMIDON et al., 1995, FDA, 2000).

Um medicamento de liberação imediata é considerado de rápida dissolução, quando não menos do que 85% da quantidade de fármaco se dissolve dentro de 30 minutos, usando o aparato I a 100 rpm (ou aparato II a 50 rpm) num volume de 900 mL ou menos em cada um dos seguintes meios: 0,1 N HCl ou fluido gástrico simulado sem enzimas, tampão pH 4,5 e tampão pH 6,8 ou fluido intestinal simulado sem enzimas (FDA, 2000).

Através do emprego do SCB pode-se conhecer o fator limitante do processo de absorção implicando-se assim, em prever possíveis interações com alimentos, escolha de formulação, além de possibilitar a correlação *in vitro/ in vivo* nos testes de dissolução de formulações sólidas (FLEISHER, 1999; POLLI et al., 2004). Sendo assim, os conceitos do SCB e outros relacionados são atualmente amplamente utilizados na descoberta e desenvolvimento de medicamentos (BUTLER; DRESSMAN, 2010; COOK; ADDICKS; WU, 2008; WU; BENET, 2005; YAMASHITA; TACHIKI, 2008).

O SCB ganhou atenção uma vez que a sua aplicação pode reduzir a necessidade de estudos clínicos e, conseqüentemente, de custos e tempo necessários para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos, servindo como uma ferramenta para identificar compostos elegíveis para bioisenção de testes de bioequivalência *in vivo* (LENNERNÄS; ABRAHAMSSON, 2005).

Recentemente foi proposta a subclassificação dos fármacos pertencentes as classes II e IV do SCB de acordo com a constante de ionização (pka) em: (a) ácidos, (b) básicos e (c) neutros. A constante de ionização do fármaco (pka) é uma propriedade física com impacto significativo na solubilidade aquosa do fármaco (TSUME et al., 2014). Esta subclassificação é particularmente importante para o desenvolvimento de metodologia de dissolução *in vitro* preditiva do comportamento *in vivo* devido ao complexo e variável ambiente no trato gastrointestinal, com alterações de pH, da capacidade tamponante, do volume lumenal, das condições surfactantes lumenais, do perfil de permeabilidade ao longo do trato gastrointestinal em estado de jejum ou alimentados.

1.2 Bioisenção

O termo bioisenção é utilizado para descrever a substituição de estudos *in vivo* pela avaliação *in vitro*. Com base na avaliação *in vitro*, um novo medicamento pode ser considerado bioequivalente ao seu produto de referência, sem a necessidade de executar estudos farmacocinéticos realizados em voluntários humanos (BARENDS; SHAH; DRESSMAN, 2012).

Os principais critérios que devem ser avaliados para determinar a elegibilidade de um medicamento oral de liberação imediata à bioisenção dizem respeito a sua classificação SCB, ou seja, a solubilidade do fármaco em diferentes valores de pH e a sua permeabilidade intestinal. Outra condição está relacionada com a taxa de dissolução. Além disso, devem ser considerados os efeitos dos excipientes sobre a fisiologia gastrointestinal e as substâncias ativas. Não são elegíveis substâncias medicamentosas que têm janela terapêutica estreita e indicação terapêutica crítica e/ou se houver relatos na literatura de não aprovação em estudos de biodisponibilidade/ bioequivalência, bem como, medicamentos absorvidos na cavidade oral (BARENDS; SHAH; DRESSMAN, 2012; FDA, 2000; LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004).

Certas agências reguladoras, por exemplo, a *Food and Drug Administration* (FDA), Agência Europeia de Medicamentos (EMA) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), aceitam a substituição dos estudos de bioequivalência por ensaios *in vitro*, devido à redução, não somente da exposição de voluntários sadios a fármacos candidatos em testes de bioequivalência, mas também pelos custos e o tempo necessário para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos (BERGSTRÖM et al. 2014).

Os regulamentos sobre bioisenções baseadas no SCB diferem entre a FDA, a EMA e OMS. As diferenças entre os vários requisitos regulamentares são evidentes e frequentemente criticadas por indústrias farmacêuticas (BARENDS; SHAH; DRESSMAN, 2012).

Para a FDA somente a classe I do SCB é elegível para a bioisenção. A OMS além da classe I inclui a III e alguns fármacos da classe II. A EMA inclui a classe I e III (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2010; FDA, 2000; WHO, 2006). A FDA foi o primeiro órgão que implementou os requisitos regulamentares para a bioisenção baseada no SCB, em 2000. Para a FDA o fármaco é considerado altamente solúvel quando a quantidade presente na forma farmacêutica de maior concentração dissolver-se em 250 mL ou menos,

em um intervalo de pH fisiológico entre pH 1-7,5 a 37 ± 1 ° C. Já para a OMS e EMA a faixa de pH no qual o experimento deve ser realizado é de 1-6 (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2010; FDA, 2000; WHO, 2006).

A permeabilidade é considerada alta para a FDA se extensão da absorção do fármaco atinge pelo menos 90% de uma dose administrada por via oral. Para a OMS e EMA a fração da dose absorvida deve atingir pelo menos 85% (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2010; FDA, 2000; WHO, 2006).

Os estudos de dissolução comparativos *in vitro* para fármacos candidatos a bioisenção da classe I do SCB devem garantir não menos do que 85% de fármaco dissolvido dentro de 30 min em cada um dos meios de dissolução: fluido gástrico simulado pH 1,2 - (FGS), tampão pH 4,5 e fluido intestinal simulado pH 6,8 - (FIS). Perfis resultantes devem ser comparados utilizando o fator de similaridade (f_2), a menos que 85% ou mais da quantidade rotulada dissolva dentro de 15 minutos a partir de ambos os produtos (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2010; FDA, 2000; WHO, 2006). No caso de fármacos pertencentes a classe III do SCB a dissolução deve ocorrer dentro de 15 minutos (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2010; FDA, 2000; WHO, 2006). Para a FDA os excipientes devem ser empregados em quantidades usuais e consistentes com a função pretendida, a fim de excluir a interferência na velocidade e extensão da absorção (FDA, 2000). A OMS e EMA recomendam que a formulação teste empregue os mesmos excipientes presentes na formulação do medicamento referência. Para a EMA em caso de medicamentos contendo fármacos pertencentes à Classe III do SCB, a diretriz requer excipientes qualitativamente os mesmos e quantitativamente muito semelhantes. Segundo a EMA, se os medicamentos teste utilizarem excipientes que comprovadamente afetem a biodisponibilidade dos fármacos (como o sorbitol, manitol, lauril sulfato de sódio, dentre outros) o medicamento teste deverá conter qualitativamente e quantitativamente os mesmos do medicamento referência (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2010).

Atestando a importância que o tema assumiu atualmente, a *International Pharmaceutical Federation* (FIP) criou em 2004 um programa para elaboração de monografias de bioisenção com base no SCB. A seleção de candidatos a fármacos para futuras monografias de bioisenção baseia-se principalmente na "Lista de Medicamentos Essenciais" da OMS. As monografias são revisões da literatura nas quais as informações são coletadas, criticamente revistas e publicadas no *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Este projeto é apoiado pela OMS e leva em consideração as orientações da OMS, FDA e EMA,

bem como, os avanços científicos publicados nesta área. Atualmente são 43 monografias publicadas (INTERNATIONAL PHARMACEUTICAL FEDERATION, 2014).

No Brasil, em 2011, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a RDC 37 que dispõe sobre o “Guia para isenção e substituição dos estudos de biodisponibilidade relativa/ bioequivalência”. Assim como nas diretrizes da EMA e WHO para a ANVISA o fármaco será considerado de alta permeabilidade quando a fração da dose absorvida atingir pelo menos 85% e será considerado de alta solubilidade quando sua maior dosagem solubiliza-se completamente em até 250 mL de cada uma das soluções tampão dentro da faixa de pH fisiológico (FGS, tampão pH 4,5 e FIS), a 37 ± 1 °C. O fármaco deverá apresentar dissolução rápida, isto é, não menos do que 85% de fármaco deverá ser dissolvido dentro de 30 minutos em cada um dos meios de dissolução (FGS, tampão pH 4,5 e FIS). Para a ANVISA somente a classe I do SCB é elegível para a bioisenção.

A ANVISA recomenda que o candidato à bioisenção empregue os mesmos excipientes presentes na formulação do medicamento referência. Caso sejam utilizados excipientes críticos (como o sorbitol, manitol, lauril sulfato de sódio, polissorbato 80 dentre outros) o medicamento teste deverá conter qualitativamente os mesmos do medicamento referência e em quantidade compatível com a função pretendida na forma farmacêutica (BRASIL, 2011b).

A partir destas diretrizes a ANVISA publicou a INSTRUÇÃO NORMATIVA – IN nº 4 em 3 de agosto de 2011, que foi revogada pela INSTRUÇÃO NORMATIVA – IN nº 2 em 14 de março de 2013. A lista atual está contida na INSTRUÇÃO NORMATIVA – IN nº 7 em 21 de agosto de 2014, a qual aprova uma lista de 20 fármacos candidatos à bioisenção: ácido acetilsalicílico, capecitabina, cloridrato de doxiciclina, cloridrato de memantina, cloridrato de propranolol, cloridrato de venlafaxina, dicloridrato de pramipexol, dipirona, estavudina, fluconazol, fumarato de bisoprolol, hemitartrato de rivastigmina, isoniazida, levofloxacino, metoprolol, metronidazol, paracetamol, pregabalina, sotalol e temozolomida (BRASIL, 2014a).

Portanto, listas de candidatos a bioisenção foram publicados apenas pela ANVISA (BRASIL, 2014a), a OMS (WHO, 2006) e Federação Internacional Farmacêutica (FIP) (INTERNATIONAL PHARMACEUTICAL FEDERATION, 2014).

Embora seja difícil de calcular os benefícios econômicos da bioisenção, o impacto econômico é maior na Europa do que nos EUA, devido que a EMA inclui a classe III do SCB aos compostos bioisentos. Considerando-se ambas as classes I e III do SCB, estima-se

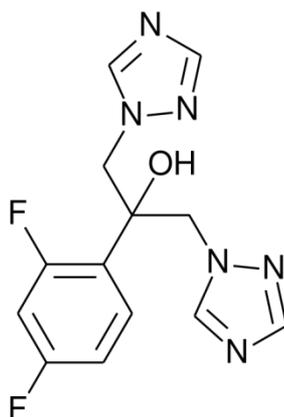
128-147.000.000 dólares poderiam ser salvos por ano em redução de custos clínicos. Estes são números baixos, dado que aproximadamente dois terços de compostos comercializados pertence as classes I e III do SCB (COOK; DAVIT; POLLI, 2010; TAKAGI et al., 2006). Assim, é evidente que a indústria farmacêutica não tira o máximo proveito da bioinsensão (COOK; DAVIT; POLLI, 2010).

1.3 Fluconazol

O fluconazol (Figura 1) é quimicamente descrito como α -(2,4-Difluorfenil)- α -(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)-1H-1,2,4-triazol-1-etanol, com fórmula empírica $C_{13}H_{12}F_2N_6O$ e massa molar de $306,3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. É um pó branco ou quase branco, pouco solúvel em água, facilmente solúvel em metanol, solúvel em etanol e acetona, pouco solúvel em tolueno e solúvel em soluções diluídas de ácidos minerais e hidróxidos alcalinos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010a; FDA, 2014; USP, 2011).

É um antifúngico menos lipofílico e mais hidrofílico quando comparado a outros antifúngicos azólicos como, por exemplo, o clotrimazol, miconazol (não absorvidos por via oral), e o cetoconazol (absorvido por via oral) (GRUDZIEŃA et al., 2009). Foi descoberto por RICHARDSON e seus colaboradores (1990) nos laboratórios Pfizer em 1981. Devido a grande necessidade de antifúngicos de uso oral este fármaco foi rapidamente aprovado pela FDA em 1990.

Figura 1: Estrutura química do fluconazol



O fluconazol é um inibidor altamente seletivo da enzima lanosterol 14- α -desmetilase no citocromo P450 dos fungos. Esta enzima atua na conversão do lanosterol para ergosterol. A conseqüente perda de esteróis normais correlaciona-se com a acumulação de esteróis 14-

α -metila nos fungos e perda da integridade da membrana fúngica que pode ser responsável pela atividade fungistática do fluconazol.

O seu espectro de atividade abrange um grande número de espécies de *Candida*, mas *Candida glabrata* e *Candida krusei* apresentam uma sensibilidade dependente da dose (*C. glabrata*) ou resistência completa (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2011; CASTAGNOLA et al., 2012; FDA, 2014; SPAMPINATO; LEONARDI, 2013). O fluconazol é recomendado para o tratamento de candidíase vaginal, candidíase orofaríngea e esofágica, infecções do trato urinário por *Candida* sp., peritonite e infecções sistêmicas por *Candida* sp., incluindo candidemia, candidíase disseminada e pneumonia. O fluconazol também é utilizado para o tratamento de meningite criptocócica. É recomendado para a diminuição da incidência de candidíase em pacientes submetidos ao transplante de medula óssea que receberam quimioterapia citotóxica e/ou terapia de radiação. Ele é quase completamente absorvido a partir do trato gastrointestinal, independentemente de alimentos ou da acidez gástrica. Apenas 10% do fármaco em circulação está ligado as proteínas. A excreção renal é responsável por mais de 90% da eliminação, com meia-vida de cerca de 25 horas (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2011; FDA, 2014).

Em relação ao polimorfismo do fluconazol, são conhecidas três formas polimórficas de fluconazol anidro, designadas por formas I, II e III. A Pfizer comercializa o medicamento com o fármaco na forma polimórfica III (DASH; ELMQUIST, 2001). Estudos demonstraram a identificação das formas polimórficas por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e difração de raios X. Medicamentos são comercializados em diferentes formas polimórficas (ALKHAMIS et al., 2002; DESAI et al., 2003; ZIÉMONS et al., 2011; BOURICHI et al., 2012).

Nos Estados Unidos, o fluconazol encontra-se disponível na forma de comprimidos para administração oral, na forma de pó para suspensão oral, e como solução estéril para administração intravenosa (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2011; FDA, 2014). No Brasil o fluconazol está disponível como solução estéril para administração intravenosa e em cápsulas para administração oral (50, 100, 150 e 200 mg). A dosagem de cápsula usualmente indicada é de 150 mg. Trinta e três laboratórios produzem cápsulas de 150 mg atualmente. Dentre as formulações fabricadas por estes laboratórios está o medicamento referência, 11 medicamentos genéricos e 26 similares (BRASIL, 2014b). O fluconazol pertence à relação nacional de medicamentos essenciais, a RENAME (BRASIL, 2012), sendo considerado um medicamento básico da assistência farmacêutica.

Relatos na literatura quanto à classificação do fluconazol pelo SCB estão confusas (BERGSTRÖM et al. 2014), uma vez que ele é atribuído a ambas as classes III (BERGSTRÖM et al., 2014; RAMIREZ et al., 2010) ou classe I (BERGSTRÖM et al., 2014; LINDENBER; KOPP; DRESSMAN, 2004). A discrepância entre publicações pode ser um resultado das diferentes orientações fornecidas pela EMA e FDA (diferentes intervalos de pH para avaliação da solubilidade, diferentes limites de absorção para permeabilidade e diferentes doses máximas quando indicado para o tratamento de diferentes doenças) e diferentes métodos utilizados na investigação das solubilidades e permeabilidades (BERGSTRÖM et al., 2014).

A ANVISA foi o primeiro órgão a incluir o fluconazol em sua lista de fármacos candidatos à bioisenção, na Instrução Normativa (IN) nº 4 da ANVISA (BRASIL, 2011a). Atualmente (setembro/2014) o fluconazol foi também incluído na lista da FIP (CHAROO et al., 2014).

1.4 Caracterização e compatibilidade

A caracterização completa e a compreensão das interações físico-químicas de um fármaco é uma parte integrante de estudos de pré-formulação, durante o desenvolvimento de uma nova formulação farmacêutica. Embora excipientes sejam geralmente considerados farmacologicamente inertes, eles podem interagir com o fármaco e afetar vários aspectos do produto, tais como as propriedades organolépticas, de dissolução ou degradação (BERNARDI et al., 2009; CHADHA; BHANDARI, 2014; CHAKRABORTY et al., 2013; McDAID et al., 2003), comprometendo a sua estabilidade e/ou biodisponibilidade. A avaliação das interações fármaco-excipiente pode ser considerada ainda mais crítica para medicamentos que são candidatos à bioisenção de testes de bioequivalência, uma vez que não serão submetidos a estudos *in vivo*.

Diretrizes regulatórias europeias e norte-americanas sobre bioisenções de formulações de liberação imediata exigem uma compreensão aprofundada dos efeitos biofarmacêuticos dos excipientes, a fim de estabelecer a bioequivalência entre dois produtos diferentes que transportam o mesmo princípio ativo com base somente em testes de dissolução (EMA, 2010; FDA, 2000). Os documentos de orientação mencionam alguns excipientes críticos, tais como adoçantes e surfactantes. No entanto, muitos excipientes não

são mencionados e novos mecanismos de potenciais interações ainda estão sendo descobertos (TAKIZAWA et al., 2013).

Nos estudos de pré-formulação tem-se explorado diversas técnicas termoanalíticas para a previsão inicial de excipientes apropriados para as formulações objetivando-se minimizar os efeitos indesejáveis que surgem de incompatibilidades fármaco-excipiente (CHADHA; BHANDARI, 2014).

A DSC é uma das principais técnicas de análise térmica e tem sido cada vez mais utilizada para a triagem rápida de incompatibilidades entre ingredientes farmacêuticos (ROUMELI et al., 2013).

O fármaco e os sistemas binários (fármaco-excipiente) são aquecidos e os seus eventos térmicos são monitorados em função do tempo e da temperatura, fornecendo informações sobre possíveis interações entre os componentes da formulação de acordo com a aparência, mudança ou desaparecimento de picos endotérmicos ou exotérmicos e/ou variações nos valores de entalpia nas curvas. Conseqüentemente a temperatura e a energia associada com eventos como a fusão, oxidação, reações de redução, transição vítrea, ebulição, sublimação, decomposição e cristalização podem ser avaliados (GIRON, 1990; OLIVEIRA, et al., 2010; TITA, 2011).

A DSC tem várias vantagens, por exemplo, é um método rápido, uma pequena quantidade de amostra é necessária e interações físicas são facilmente detectadas. No entanto, é um método destrutivo, eventos térmicos sobrepostos dificilmente são resolvidos e não é possível detectar as incompatibilidades que ocorrem após o armazenamento em longo prazo (CHADA; BHANDARI, 2014).

Quando interações fármaco-excipiente são detectadas por DSC, a incompatibilidade deve ser confirmada através de outros métodos, como a análise termogravimétrica (TG), microscopia em fase aquecida, difração raios X de pó (XRPD), Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), ressonância magnética nuclear (RMN) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (CHADHA; BHANDARI, 2014).

A termogravimetria (TG) é uma técnica na qual se avalia a variação de massa na amostra em função da temperatura ou tempo, em uma atmosfera controlada (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010a). O uso da termogravimetria é descrito na caracterização, determinação de pureza e de umidade, identificação de pseudopolimorfismo, na avaliação de estabilidade de fármacos e medicamentos e em estudos de cinética de

degradação (OLIVEIRA, M.A et al. 2011). O resultado TG pode ser alterado para registrar uma curva derivada (DTG). As vantagens da termogravimetria derivada são: melhor distinção da sobreposição de etapas; determinação da temperatura na qual a alteração de massa é máxima; a área sobre a curva DTG é proporcional a mudança de massa (BROWN, 1988).

Análises térmicas como DSC e TG podem ser utilizadas tanto no controle da matéria-prima, quanto do produto acabado, possuindo potencial emprego no desenvolvimento e na caracterização de novos produtos, avaliação dos processos produtivos além de outras aplicações (SILVA et al, 2007). A comparação dos registros dos resultados da TG e do DSC, obtidas em condições idênticas, pode ajudar na interpretação dos processos térmicos (BROWN, 1988).

A espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é utilizada para pesquisa na área farmacêutica para a identificação de fármacos, análise de pureza de amostras, investigação estrutural, cristalinidade, polimorfismos, qualidade da matéria-prima, interações entre fármacos e excipientes, entre outras aplicações (KALINKOVA, 1999; WARGO; DRENNER, 1996). O espectro de infravermelho é característico da molécula como um todo, no entanto, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência, o que possibilita ao profissional elucidar a estrutura da molécula (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

O método de difração de raios X de pó (DRXP) consiste em um método simples e direto que permite a identificação do fármaco, sem tratamento prévio, além de fornecer informações de polimorfos, estado de solvatação e grau de cristalinidade (PHADNIS, 1997). As vantagens da difratometria de raios X na caracterização de sólidos policristalinos são a capacidade de caracterização de substâncias e indicar o estado de combinação química dos elementos presentes no material, aliado a propriedades não destrutivas, rápida e de baixo custo (ARMELIN et al., 1992; CASTRO, 2007).

Para a identificação das fases cristalinas o padrão de difração de raios X da amostra é comparado com um padrão de difração de determinado polimorfo, o que permite a melhor identificação da composição e estrutura cristalina apresentadas por este material (CASTRO, 2007).

A combinação da espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) e a difração de raios X são utilizadas com grande êxito para comprovar as interações entre fármacos, excipientes e sistemas binários fármaco-excipientes (ALKHAMIS; OBAIDAT;

NUSEIRAT, 2002; LIMA et al., 2014; OLIVEIRA, et al., 2010; VERONEZ et al., 2014). Normalmente a espectroscopia na região do infravermelho antecede a técnica de difração de raios X. As alterações observadas nos espectros de infravermelho como o surgimento de novas bandas, ampliação ou alterações na intensidade ou posição das bandas, observadas em relação ao espectro original devem ser associadas com as alterações nos difratogramas obtidos em condições semelhantes (KALINKOVA, 1999).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica muito útil para a caracterização dos diferentes hábitos cristalinos e efeitos superficiais dos polimorfos. Ela se baseia na irradiação de um feixe fino de elétrons sobre a amostra (CUFFINI; JÚNIOR; TOMBARI, 2009). A variação da morfologia e tamanho das partículas de um fármaco pode ser relacionada com problemas no processo de desenvolvimento farmacotécnico, pois possíveis modificações da estrutura das partículas podem indicar alterações na velocidade de dissolução *in vitro* e absorção *in vivo*, além de modificações polimórficas, caso o fármaco apresente polimorfismo (ANSEL, POPOVICH; ALLEN, 2013).

1.5 Dissolução

A dissolução pode ser definida de forma simplificada como o processo pelo qual o fármaco é liberado de sua forma farmacêutica e se torna disponível para ser absorvido pelo organismo. A dissolução é um pré-requisito para a absorção do fármaco. Ela influencia a velocidade e extensão na qual a dose administrada de um fármaco atinge a circulação sistêmica (JAMBHEKAR; BREEN, 2013). Sendo assim, o objetivo do teste de dissolução *in vitro* é fornecer, tão próximo quanto possível, a previsão da biodisponibilidade do medicamento (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013).

O ensaio de dissolução nada mais é que um teste físico no qual o fármaco passa para a forma solúvel a partir da forma farmacêutica intacta ou de seus fragmentos e partículas formadas durante o teste, no caso de cápsulas e comprimidos (CHOWDARY; RAJYALAKSHIMI, 1987). O teste de dissolução *in vitro* de formas farmacêuticas sólidas é importante por várias razões: orienta a formulação e o desenvolvimento do produto em direção a sua otimização; a fabricação pode ser monitorada pelo teste de dissolução, que atua como um componente do programa de garantia de qualidade; assegura a bioequivalência a cada lote; é uma exigência para aprovação de comercialização de produtos aprovados pelas agências regulatórias (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013).

Segundo Marcolongo (2003), inúmeras variáveis podem modificar os resultados de um ensaio de dissolução. Todas devem ser consideradas e algumas monitoradas a fim de obter resultados confiáveis. Dentre essas variáveis se encontram: a solubilidade, o tamanho de partícula e a natureza química do fármaco; a forma farmacêutica, os excipientes e a tecnologia de fabricação empregada; o aparato utilizado, a vibração do sistema, a velocidade de agitação, a posição e o método de amostragem, o emprego de dispositivos para formas farmacêuticas que flutuam; o volume de meio empregado, a presença de gases no meio, o pH, a evaporação, a presença de tensoativos, a temperatura e a viscosidade do meio; o método de filtração e o método analítico; as condições de estocagem do produto.

Nos últimos anos, Agências Regulatórias têm utilizado o SCB para permitir que os testes de dissolução *in vitro* sejam usados para estabelecer bioequivalência no caso de fármacos altamente solúveis e altamente permeáveis (COOK; ADDICKS; WU, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi realizar estudos de compatibilidade fármaco/excipiente e comparar os perfis de dissolução *in vitro* de formulações referência, genéricas e similares contendo fluconazol para verificar o cumprimento dos critérios estabelecidos para a bioisenção.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar qualitativamente a formulação de diferentes fabricantes;
- Caracterizar as propriedades do estado sólido da matéria-prima do fluconazol;
- Realizar estudos de compatibilidade fármaco-excipiente;
- Desenvolver e validar metodologia por CLAE para quantificar o fármaco;
- Realizar os perfis de dissolução em diferentes meios;
- Comparar os perfis de dissolução.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Materiais, Substâncias e Reagentes

- acetato de sódio trihidratado (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).
- acetonitrila grau cromatográfico (Tedia, Fairfield, OH, EUA).
- ácido acético glacial (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil).
- ácido clorídrico (Synth, Diadema SP, Brasil).
- ácido perclórico (Carlo Erba, Milão, Itália).
- água ultrapura foi obtida pelo sistema de purificação Milli-Q (Merck Millipore, Darmstadt, HE, Alemanha).
- anidrido acético (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil).
- amido (Biotec, Pinhais, PR, Brasil).
- biftalato de potássio (Biotec, Pinhais, PR, Brasil).
- celulose microcristalina PH 101 (Sintética, Capivari, SP, Brasil).
- cloreto de sódio (Biotec, Pinhais, PR, Brasil).
- cloreto de metilrosanilínio - “Cristal Violeta” (Biotec, Pinhais, PR, Brasil).
- croscarmelose de sódio (Adrivan, Diadema, SP, Brasil).
- dióxido de silício (Gemini, Anápolis GO, Brasil).
- estearato de magnésio (Henrifarma, São Paulo, SP, Brasil).
- fosfato de cálcio dibásico di-hidratado (Henrifarma, Cambuci, SP, Brasil).
- fosfato de potássio monobásico (Dinâmica, Diadema SP, Brasil).
- fluconazol matéria-prima. Lote: M519841-1 Validade 01/11/2015. (EMS, Hortolândia, SP, Brasil).
- hidróxido de sódio (Biotec, Pinhais, PR, Brasil).
- lactose anidra (Sigma-Aldrich St . Louis, MO, EUA).
- lactose monoidratada (Pharma Nostra Anápolis, GO, Brasil).
- lauril sulfato de sódio (Viafarma, São Paulo, SP, Brasil).
- membrana acetato de celulose de poro 0,45 µm (Millipore, São Paulo, SP, Brasil).

- manitol (Gemini, Anápolis GO, Brasil).
- metanol grau cromatográfico (Tedia, Fairfield, OH, EUA).
- papel filtro quantitativo 28 μ m (J Prolab, São José dos Pinhais, PR, Brasil).
- polivinilpirrolidona K30 (Biotec, Pinhais, PR, Brasil).

Equipamentos

- Balança analítica Gehaka AG200 (São Paulo, SP, Brasil).
- Calorímetro Shimadzu DSC-60 (Kyoto, Japão).
- Cromatógrafo Shimadzu LC 10AVP (Kyoto, Japão).
- Difrátômetro de raios X de pó D2 Phaser (Bruker, Massachusetts, EUA).
- Dissolutor Vankel VK7000 (Vanker, Carolina do Norte, EUA).
- Espectrofotômetro FTIR Frontier (Perkin Elmer, Massachusetts, EUA).
- Microscópio Eletrônico de Varredura TM3000 (Hitachi, Tóquio, Japão).
- pHmetro Phtek PHS- 3B (Colombo, PR, Brasil)
- Termobalança Shimadzu TGA-50 (Kyoto, Japão).
- Sistema de purificação Milli-Q Merck Millipore (Darmstadt, HE, Alemanha).
- Estufa de secagem Biopar (Porto Alegre, RS, Brasil).
- Incubadora com agitação orbital (Quimis, Diadema, SP, Brasil)
- Espectrofotômetro Jasco V-630 Bio (Kyoto, Japão).

3.1.1 Amostras

As formulações comerciais de cápsulas contendo 150 mg de fluconazol (referência, genérico e similar) foram adquiridas de laboratórios distintos dentro do seu prazo de validade e foram designadas como R, para o fluconazol referência, G1, G2, G3, para as fórmulações genéricas e S1, S2 e S3 para formulações similares.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Caracterização da matéria-prima do fluconazol

3.2.1.1 Solubilidade

O teste de solubilidade do fluconazol foi realizado por meio do método de equilíbrio, empregando a técnica do shake-flask, na qual excesso de amostra fica em contato com o solvente em incubadora com temperatura controlada sob agitação orbital constante. O estudo foi realizado em frascos de vidro (erlenmeyer) com capacidade de 250 mL, cada um contendo 100 mL de um dos meios de dissolução, FGS, solução tampão acetato pH 4,5 e FIS, em triplicata. Foram adicionadas quantidades de fluconazol em concentração superior ao ponto de saturação de cada meio de dissolução. Os experimentos foram realizados a 37 °C, sob agitação constante a 150 rpm por 72 h. Para avaliar a saturação do meio, periodicamente, as amostras eram verificadas visualmente quanto à presença de fármaco não dissolvido. Em caso de solubilização total do fluconazol, adicionava-se mais fármaco ao meio em análise. Após este período, as amostras foram submetidas à filtração em papel filtro quantitativo. No final do experimento verificou-se os pHs das soluções. A determinação da concentração de fluconazol no filtrado foi feita por método espectrofotométrico, no comprimento de onda de 260 nm (BRASIL, 2011b; EMEA, 2008; FDA, 2000; PARAÍSO, 2012; WHO, 2006).

3.2.1.2 Doseamento volumétrico do fluconazol

Foram pesadas cerca de 0,1 g de fluconazol, em triplicata, e dissolvidas em 50 mL de ácido acético glacial (titulação em meio não-aquoso). As amostras foram tituladas com solução volumétrica de ácido perclórico 0,1 M. Para determinar o ponto final foi utilizada a solução indicadora de cloreto de metilrosanilínio. Foi realizado ensaio em branco. Cada mL de ácido perclórico 0,1 M equivale a 15,314 mg de $C_{13}H_{12}F_2N_6O$ (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010d).

3.2.1.3 Caracterização do estado sólido

3.2.1.3.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas utilizando cadinhos de alumínio com cerca de 2 mg de amostra. A faixa de temperatura foi de 25-300 °C com razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹ em atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL min⁻¹). O equipamento de DSC foi calibrado com padrão de referência de índio (pf 156,6 °C; $\Delta H_{\text{fus}} = -28,54 \text{ g}^{-1} \text{ J}$) e zinco (pf 419,5 °C).

3.2.1.3.2 Análise termogravimétrica (TG)

Os experimentos de TG foram realizados em faixa de temperatura de 30 a 600 °C, utilizando cadinhos de platina, com cerca de 4 mg de amostra, sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL min⁻¹) e razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹.

3.2.1.3.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR para o fluconazol, celulose microcristalina, fosfato de cálcio dibásico dihidratado e suas misturas binárias, foram obtidos em espectrofotômetro FTIR, dentro de um intervalo de varredura de 4000-600 cm⁻¹, com uma média de mais de 32 varreduras e resolução espectral de 4 cm⁻¹. Um espectro de fundo (branco) foi obtido para cada condição experimental.

3.2.1.3.4 Difração de raios X de pó (DRXP)

Padrões de difração de raios X de pó foram obtidos em difratômetro com tubo de CuK α , na faixa de 5-40° (2 θ) com tempo de passo de 1s e incremento de 0,05°. As amostras do fluconazol, celulose microcristalina, fosfato de cálcio dibásico diidratado e suas misturas binárias foram colocadas delicadamente sobre o porta amostras para evitar problemas de orientação preferencial. O suporte da amostra foi mantida a 5 rpm durante a análise.

3.2.1.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para aquisição de micrografias foi utilizado microscópio eletrônico de varredura com detector de elétrons retroespalhados acoplado a espectrômetro de energia dispersiva (EDS) (SwiftED3000) com detector de silício (SDD de 30 mm² e resolução de 161 eV, Cu-Ka), e analisador multicanal (2048 canais, 10 eV/canal). As amostras foram montadas em suporte de alumínio e fixadas em fita adesiva de dupla face de carbono.

3.2.2 Avaliação da composição de formulações de fluconazol

Baseado nas bulas das formulações comerciais de fluconazol utilizadas neste trabalho, compilou-se uma lista dos excipientes utilizados na produção das formulações e esta foi então considerada para estudos de compatibilidade.

3.2.3 Estudos de compatibilidade

Os estudos de compatibilidade foram realizados com misturas binárias (1:1; m/m) de fluconazol e cada excipiente presente nas cápsulas comerciais. As misturas físicas foram preparadas através de agitação em vórtex por 2 minutos e imediatamente submetidas à análise. As formulações referência, genéricas e similares também foram analisadas. As análises foram realizadas por DSC (item 3.2.1.3.1), TG (item 3.2.1.3.2), FTIR (item 3.2.1.3.3), DRXP (item 3.2.1.3.4) e MEV (item 3.2.1.3.5) conforme descritas anteriormente.

3.2.4 Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de fluconazol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O desenvolvimento da metodologia analítica por CLAE foi realizado com o objetivo de padronizar o método de quantificação do fluconazol após a dissolução das formulações descritas no item 3.1.1 nos diferentes meios de dissolução. Foram feitas adaptações a partir dos artigos da literatura com métodos simples e rápidos (CORRÊA, 2011; PORTA; CHANG; STORPIRTIS, 2005) e do método de doseamento da Farmacopéia Brasileira (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010c).

3.2.4.1 Condições cromatográficas

- Coluna cromatográfica de fase reversa Phenomenex Synergy Fusion C₁₈ (150 mm x 4,60 mm),
- Eluição isocrática,
- Vazão da fase móvel: 1 mL min⁻¹,
- Composição da fase móvel: acetonitrila: água (25:75),
- Temperatura 30 °C,
- Comprimento de onda: 260 nm,
- Volume de injeção: 20 µL,
- Tempo de corrida: 6 minutos,
- Detector espectrofotométrico UV-VIS,

A fase móvel e os meios de dissolução foram previamente filtrados à vácuo e degaseificados por membrana acetato de celulose de poro 0,45 µm.

3.2.4.2 Validação do método de quantificação por CLAE

O desenvolvimento e validação do método analítico foram realizados de acordo com o preconizado na RE nº 899 (BRASIL, 2003), e ICH Q2(R1) (ICH, 2005) nos seguintes parâmetros: linearidade, especificidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação e robustez.

3.2.4.2.1 Linearidade

As soluções trabalho para avaliação da linearidade foram obtidas através de diferentes diluições a partir de solução contendo 2 mg/mL de fluconazol em metanol. A linearidade foi avaliada utilizando-se oito diferentes concentrações de fluconazol (1, 5, 20, 50, 100, 150, 200 e 250 µg/mL) em cada um dos três meios de dissolução (FGS pH 1,2, tampão pH 4,5 e FIS pH 6,8). Os coeficientes de correlação e as inclinações foram obtidos plotando-se as áreas do cromatogramas obtidos *versus* concentração teórica do fármaco, e cada curva de linearidade foi submetida à análise de regressão. As curvas foram realizadas em triplicata.

3.2.4.2.2 Especificidade

Para verificar uma possível influência dos excipientes na área do pico do fluconazol foi preparada uma mistura com todos os excipientes, na faixa de proporção em que geralmente são utilizados nos medicamentos (FERREIRA, 2002; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Os cálculos foram realizados levando-se em consideração o conteúdo de uma cápsula de fluconazol que é de aproximadamente 0,4 g (CORRÊA, 2011; PORTA, 1999). Os excipientes foram misturados em agitador tipo vórtex por 2 minutos e diretamente colocados nas cubas de dissolução contendo os diferentes meios. A mistura de excipientes foi agitada no dissolutor nas mesmas condições utilizadas no processo de dissolução das cápsulas. Ao final de 30 min de agitação foram coletados 5 mL desta solução, filtrados e analisados por CLAE.

Também averiguou-se uma possível interferência dos meios de dissolução no tempo de retenção do fluconazol injetando-se 20 µL de cada um dos destes meios no CLAE.

3.2.4.2.3 Precisão

A precisão foi determinada através do ensaio de repetibilidade (precisão intra-corrída) e precisão intermediária (precisão inter-corrídas). A repetibilidade foi obtida analisando-se o coeficiente de variação das determinações de seis amostras na concentração de 100 µg mL⁻¹, no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais. A precisão intermediária do método foi avaliada pela determinação das amostras por 3 analistas diferentes (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

3.2.4.2.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada através da adição de solução de fluconazol (2 mg/mL) em metanol em solução placebo (mistura de todos excipientes) previamente dissolvidos em cada um dos meios de dissolução. Volumes variáveis de solução padrão foram adicionados a estes meios para obter valores de 80%, 100% e 120% da concentração de trabalho do fluconazol, correspondente a 133 µg/mL, 167 µg/mL e 200 µg/mL, respectivamente. Cada solução foi preparada em triplicata. A exatidão foi expressa em termos de porcentagem de recuperação, segundo a Equação 1 (BRASIL, 2003; ICH, 2005):

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

3.2.4.2.5 Limites de detecção e quantificação

Com a linearidade estabelecida, os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do fluconazol foram calculados conforme as Equações 2 e 3, respectivamente (BRASIL, 2003; ICH, 2005):

$$\text{LD} = \frac{\text{DP} \times 3}{\text{IC}} \quad (\text{Equação 2}) \quad \text{LQ} = \frac{\text{DP} \times 10}{\text{IC}} \quad (\text{Equação 3})$$

Em que:

DP = é o desvio padrão médio do intercepto,
IC = é a inclinação da curva de calibração.

3.2.4.2.6 Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada por meio da variação nas seguintes condições cromatográficas: fluxo da fase móvel (0,9; 1,0 e 1,1 mL min⁻¹), composição da fase móvel (acetonitrila: água - 23:77; 25:75 e 27:73), temperatura do forno (28, 30 e 32 °C) e comprimento de onda (258, 260 e 262 nm).

3.2.4.3 Estudo do perfil de dissolução

O estudo do perfil de dissolução do fluconazol foi realizado conforme preconizado na RDC N° 37/2011 e RDC N° 31/ 2010.

Condições experimentais:

- Aparatos e velocidade de agitação: Aparato I (cesta) a 100 rpm;
- Meios de dissolução: fluido gástrico simulado sem enzimas (pH 1,2), tampão pH 4,5 e fluido intestinal simulado sem enzimas (pH 6,8);
- Temperatura: $37 \pm 1^\circ \text{C}$;
- Registro do pH no início e no final do experimento;
- Volume do meio: 900 mL;
- $\lambda = 260 \text{ nm}$.

Foram realizadas dissoluções de seis cápsulas de cada uma das formulações citadas no item 3.1.1. As alíquotas foram coletadas das cubas nos seguintes tempos: 1 min, 1min e 30 s, 2 min, 2 min e 30 s, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20 e 30 min. Nos pH's 4,5 e 6,8 não foi coletada a alíquota de 1 min e 30 segundos. Estas amostras foram imediatamente filtradas em papel filtro quantitativo. Após a realização do perfil de dissolução as amostras foram quantificadas pelo método cromatográfico descrito anteriormente item 3.2.4.1.

3.2.4.3.1 Preparo dos meios

Fluido gástrico simulado sem enzimas (pH 1,2):

Dissolveram-se 2,0 g de cloreto de sódio em 7,0 mL de ácido clorídrico (37%) e completou-se o volume com água destilada o suficiente para fazer 1000 mL de solução. Ajustou-se o pH para 1,2 (USP, 2011).

Solução tampão pH 4,5:

Dissolveram-se 2,99 g de acetato de sódio tri-hidratado em 500 mL de água destilada, misturou-se e adicionou-se 14 mL da solução de ácido acético a 2N. Completou-se o volume com água destilada o suficiente para fazer 1000 mL de solução. Ajustou-se o pH para 4,5 (USP, 2011).

Fluido intestinal simulado sem enzimas (pH 6,8):

Dissolveram-se 6,8 g de fosfato de potássio monobásico em 250 mL de água destilada, misturou-se e adicionou-se 77 mL de hidróxido de sódio 0,2 M. Completou-se o volume com água destilada o suficiente para fazer 1000 mL de solução. Ajustou-se o pH para 6,8.

Os ajustes de pH foram realizados com soluções de hidróxido de sódio 0,2 M ou ácido clorídrico 0,2 M. Todos os meios foram filtrados a vácuo em membrana de acetato de celulose para desaeração e retirada de qualquer impureza insolúvel (USP, 2011).

3.2.4.3.2 Análise estatística

A avaliação dos perfis de dissolução obtidos foi realizada pela análise dos dados por comparação estatística, através da aplicação dos fatores $f1$ (fator de diferença) e $f2$ (fator de semelhança), conforme as Equações 4 e 5, respectivamente (BRASIL, 2010; MOORE et al., 1996; OLIVEIRA et al., 2011):

$$f1 = \left\{ \sum_{t=1}^n |Rt - Tt| / \sum_{t=1}^n Rt \right\} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

$$f2 = 50 \log \left\{ \left[1 + 1/n \sum_{t=1}^n (Rt - Tt)^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right\} \quad (\text{Equação 5})$$

Em que:

n = é o número de tempos considerados,

Rt e Tt = representam os valores médios das porcentagens dissolvidas no tempo t para as formulações referência e teste, respectivamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.1 Caracterização da matéria-prima do fluconazol

Os principais resultados dos estudos de caracterização do fluconazol e compatibilidade fármaco-excipientes encontram-se publicados na forma de artigo científico (Anexo A).

4.1.1.1 Solubilidade

O fluconazol é uma base fraca e possui três diferentes valores de pKa calculados, $11,01 \pm 0,29$, $2,94 \pm 0,10$ e $2,56 \pm 0,12$, correspondendo ao grupo álcool (doador de prótons) e dois azotos (aceptores de prótons), respectivamente. Desta forma a solubilidade aquosa do fluconazol é maior em soluções com valores de pH acima de 11,01 e abaixo 2,94, situações em que o fármaco seria totalmente ionizado (CORRÊA; VIANNA-SOARES; SALGADO, 2012). A literatura também cita o pKa do fármaco como sendo 2,0 (MERCK & COMPANY INCORPORATED, 2010).

O teste de solubilidade foi realizado pelo método shake-flask, conforme preconizado na RDC 37/2011 (BRASIL, 2011b; EMEA, 2008; FDA, 2000; e PARAÍSO, 2012; WHO, 2006). Os valores das solubilidades do fluconazol nos diferentes meios são apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Solubilidade do fluconazol em diferentes meios a 37 °C.

| Meios | Solubilidade (mg mL ⁻¹) (±DP) | pH inicial | pH final |
|----------------|--|------------|----------|
| FGS pH 1,2 | 54,72±0,77 | 1,2 | 1,7 |
| Tampão pH 4,5 | 8,85±0,03 | 4,52 | 4,54 |
| FIS pH 6,8 | 7,99±0,20 | 6,8 | 6,81 |
| Água destilada | 8,68±0,02 | 5,88 | 6,8 |

Conforme demonstrado na tabela acima a solubilidade do fluconazol em água a 37 °C foi 8,68 mg mL⁻¹. Valores próximos foram encontrados 8 mg mL⁻¹ (DASH; ELMQUIST, 2001), 8,8 mg mL⁻¹ (PARAÍSO, 2012).

O meio que apresentou maior solubilidade foi o fluido gástrico simulado, com solubilidade média de $54,72 \text{ mg mL}^{-1}$. Isto pode ser devido ao pH 1,2 do meio ser menor que o pka (2,56) do fármaco. Sendo o fluconazol uma base fraca, a solubilidade aumenta em um fator de 10 para cada unidade de pH abaixo do seu pka (MARTINEZ; AMIDON, 2002). Dash e Elmquist (2001) citam uma solubilidade em torno de 60 mg mL^{-1} para o fluconazol a 37°C . Porém Paraíso (2012) encontrou uma solubilidade de apenas $14,40 \text{ mg mL}^{-1}$.

Os demais meios avaliados tem valores de pH maiores que o menor pKa do fármaco, assim, as moléculas estão menos ionizadas e apresentam menor solubilidade.

Paraíso (2012) encontrou o valor de solubilidade de $9,16 \text{ mg mL}^{-1}$ para o fluconazol em meio de dissolução tampão pH 4,5, e de $8,34 \text{ mg mL}^{-1}$ para o meio de dissolução pH 6,8. O valor da solubilidade encontrada em água destilada foi de $8,80 \text{ mg mL}^{-1}$ (pH 5,5). Estes valores são próximos aos demonstrados na tabela 2.

A RDC nº 37/2011 (BRASIL, 2011b) cita que o fármaco será considerado altamente solúvel se sua maior dose administrada oralmente solubiliza-se completamente em até 250 mL de cada uma das soluções tampão utilizadas dentro do pH fisiológico (1,2 a 6,8) a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Observando os resultados mostrados na tabela 2 e levando-se em consideração a dose usual de fluconazol de 150 mg, este fármaco é considerado altamente solúvel, já que em todos os meios sua concentração foi bem superior a $0,6 \text{ mg mL}^{-1}$ ($150 \text{ mg} \div 250 \text{ mL}$).

4.1.1.2 Doseamento volumétrico do fluconazol

A volumetria em meio não aquoso realizada para o doseamento do fluconazol matéria-prima resultou em teor de $101,35 \pm 1,06\%$. O valor está em conformidade com a monografia da Farmacopia Brasileira 5ª edição que traz a faixa de 98 a 102 % como limites de teor para o fluconazol (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010c).

4.1.1.3 Caracterização do estado sólido da matéria-prima

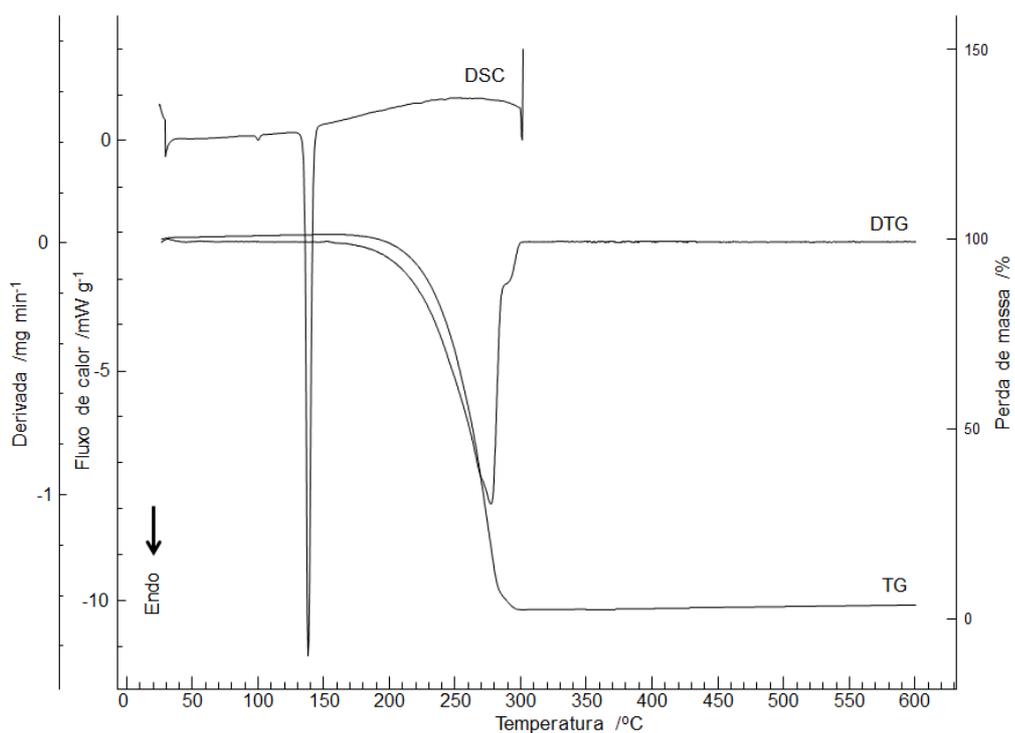
4.1.1.3.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A caracterização termoanalítica do fluconazol é apresentada na Figura 2. A curva DSC mostra um evento endotérmico ($T_{\text{peak}} = 138,16^\circ\text{C}$; $T_{\text{onset}} = 135,70^\circ\text{C}$; $\Delta H_{\text{fusion}} = -114,91 \text{ J g}^{-1}$) que corresponde ao ponto de fusão.

4.1.1.3.2 Análise termogravimétrica (TG)

As curvas de TG/DTG revelam a decomposição do fluconazol em dois eventos sobrepostos entre 256-295 °C ($\Delta m = 99,1\%$) (Figura 2). Não foram observados eventos acima de 300 °C.

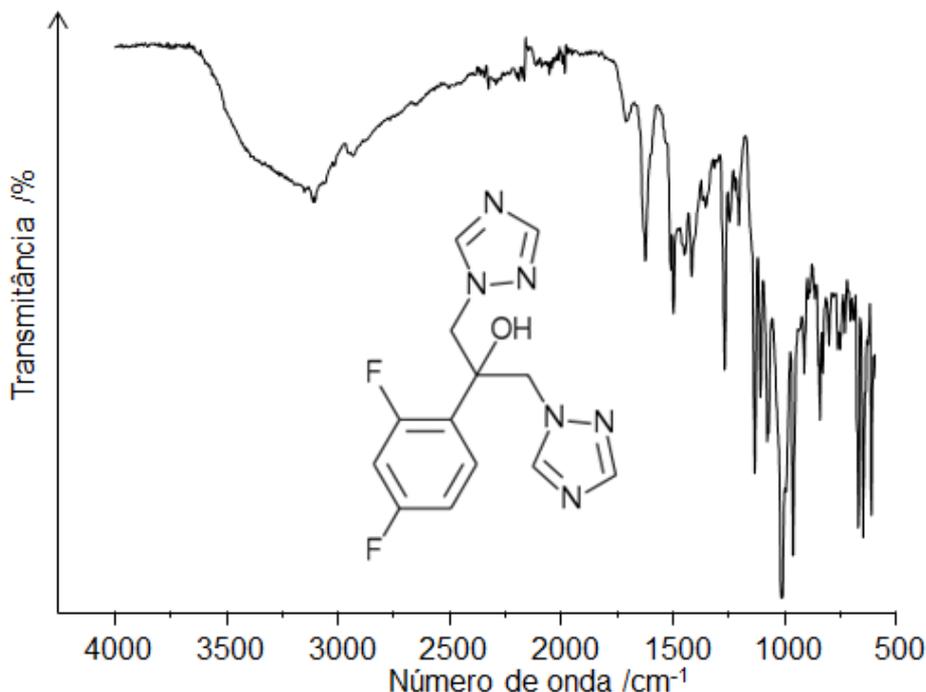
Figura 2: Curvas DSC e TG/DTG do fluconazol puro obtidos em atmosfera de nitrogênio (50 mL min^{-1}) e razão de aquecimento de 10 °C min^{-1} .



4.1.1.3.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de absorção no infravermelho do fluconazol foi registrado no intervalo de 4000 a 500 cm^{-1} (Figura 3).

Figura 3: Espectro de absorção no infravermelho do fluconazol puro.

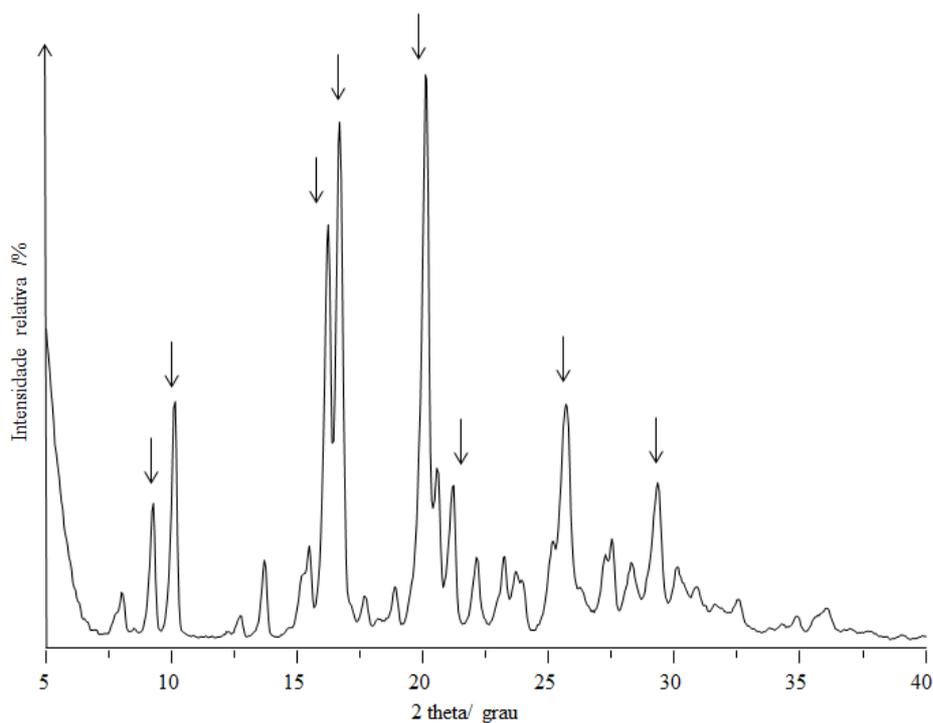


O espectro de absorção do fluconazol matéria-prima apresenta uma banda larga na faixa de 3600-2500 cm^{-1} devido às vibrações de estiramento O-H. As bandas 1619 e 1514 cm^{-1} são atribuídas às vibrações de estiramento das ligações C=C do anel aromático. As bandas 1502 e 1420 cm^{-1} estão relacionadas às vibrações de estiramento do anel triazólico, enquanto que a banda 1273 cm^{-1} refere-se ao estiramento C-F. A banda em 1138 cm^{-1} está relacionada com a respiração (breathing) do anel triazólico. As bandas 1020 cm^{-1} correspondem às ligações C-H do anel aromático e as bandas 967 e 846 cm^{-1} às ligações C-H do anel triazólico. Dados semelhantes foram encontrados por DASH e ELMQUIST (2001) e CYR et al. (1996).

4.1.1.3.4 Difração de raios X de pó (DRXP)

O padrão de difração de raios X de pó do fluconazol na faixa de 5-40° (2θ) está representado na Figura 4.

Figura 4: Perfil de difração de raios X de pó para o fluconazol puro.



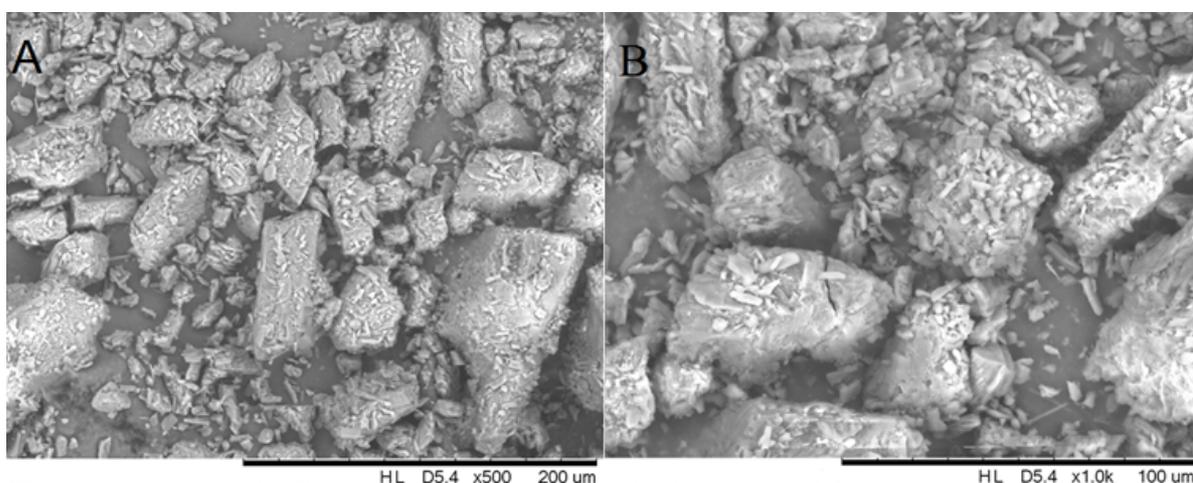
A presença de picos bem definidos indica que o fluconazol matéria-prima apresenta estrutura cristalina. Os principais ângulos dos picos de difração do fluconazol foram 9,27°, 10,13°, 16,23°, 16,68°, 20,09°, 21,20°, 25,67° e 29,33° (2θ).

4.1.1.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Fotomicrografias da matéria-prima de fluconazol foram realizadas em dois aumentos, conforme Figura 5.

Verifica-se que o fluconazol material-prima apresenta-se com tamanho de partícula variável e morfologia indicativa de estrutura cristalina, comprovada pelas análises obtidas por DRXP.

Figura 5: Micrografias de MEV: fluconazol (500x) (A), fluconazol (1000x) (B).



4.2 Avaliação da composição de formulações de fluconazol

Com objetivo de minimizar um possível impacto dos excipientes sobre a biodisponibilidade do fármaco, os medicamentos que contenham princípio ativo da classe I do SCB candidatos à bioisenção devem conter quantidades semelhantes dos mesmos excipientes nas composições dos produtos de teste e de referência. Se uma bioisenção é aplicada a um fármaco de classe III do SCB, os excipientes têm de ser qualitativamente os mesmos e quantitativamente muito semelhantes, de modo a excluir diferentes efeitos sobre os transportadores de membrana. A limitação principal relaciona-se com a utilização dos chamados "excipientes críticos". Estes excipientes (por exemplo, sorbitol, manitol, lauril sulfato de sódio ou outros surfactantes) podem afetar a biodisponibilidade e devem ser identificados, juntamente com o seu possível impacto sobre a motilidade gastrointestinal, a suscetibilidade de interações com o fármaco, a permeabilidade de fármacos e interação com transportadores de membrana. Além disso, os excipientes críticos devem ser

qualitativamente e quantitativamente os mesmos no produto de teste e o produto de referência tanto para os fármacos de classe I e classe III do SCB (BARENDS; SHAH; DRESSMAN, 2012; EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2010; FDA, 2000).

A avaliação qualitativa dos componentes das formulações está descrita na tabela 3. Considerando-se a presença de excipientes críticos, apenas a formulação G3 não contém lauril sulfato de sódio e contém manitol. A formulação G3 também contém álcool etílico, sugerindo que foi a única formulação na qual foi utilizada granulação úmida no processo de fabricação. Uma vez que é uma formulação genérica, foram realizados estudos de bioequivalência e o produto foi aprovado. No entanto, sendo uma formulação distinta, provavelmente não satisfaça os critérios da bioisenção.

Tabela 3: Excipientes utilizados em diferentes formulações comerciais de cápsulas de 150 mg de fluconazol.

| Excipiente | Formulações* | | | | | | |
|---------------------------------------|--------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | R | G ₁ | G ₂ | G ₃ | S ₁ | S ₂ | S ₃ |
| Álcool etílico | | | | X | | | |
| Amido | X | | X | | X | | |
| Celulose microcristalina | | | | X | | X | |
| Croscarmelose de sódio | | X | | | | X | |
| Dióxido de silício | X | X | X | | X | X | X |
| Estearato de magnésio | X | X | X | X | X | X | X |
| Fosfato de cálcio dibásico diidratado | | | | | | X | |
| Lactose anidra | | | | | | | X |
| Lactose monoidratada | X | X | X | | X | | |
| Lauril sulfato de sódio | X | X | X | | X | X | X |
| Manitol | | | | X | | | |
| Polivinilpirrolidona | | | | X | | X | X |

* R: referência, G: genérico, S: similar.

O amido é um excipiente versátil utilizado como aglutinante, diluente, desintegrante e agente espessante. Foi utilizado pelos medicamentos referência, G2 e S1. A celulose microcristalina é amplamente utilizada em produtos farmacêuticos, principalmente como um

ligante/diluyente em formulações de comprimidos e de cápsulas orais, nas quais é utilizada em ambos os processos de granulação por via úmida e de compressão direta. Em adição a sua utilização como um ligante/diluyente, a celulose microcristalina também tem propriedades lubrificantes e desintegrantes que a tornam útil para a produção de comprimidos (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). A celulose microcristalina foi utilizada em G3 e S2.

A croscarmelose sódica atua como desintegrante e foi utilizada somente por G1 e S2. O dióxido de silício está presente em todas as formulações, exceto na G3. Ele é comumente utilizado para melhorar as propriedades de escoamento dos pós-secos em numerosos processos, tais como no processo de compressão e enchimento de cápsulas, devido ao seu tamanho de partícula pequeno e grande área superficial.

O estearato de magnésio, que atua principalmente como lubrificante, foi utilizado por todos os fabricantes. Em S2 pode-se verificar a presença de fosfato de cálcio dibásico diidratado, que é utilizado como um diluyente em comprimidos e cápsulas. É também usado em produtos farmacêuticos devido às suas propriedades de compactação e as boas propriedades de fluxo.

Quanto à lactose ou lactose monoidratada, somente G3 e S2 não utilizaram este excipiente, que tem como principal função diluir e preencher as cápsulas. Nas formulações em que foi identificada a lactose monoidratada, esta foi avaliada. No entanto, quando a bula mencionava apenas lactose, foi utilizada lactose anidra. A polivinilpirrolidona está presente em G3, S2 e S4. Atua como aglutinante (geralmente em processos de granulação por via úmida) e melhora da dissolução de fármacos pouco solúveis. Porém nas formulações que não consta água e/ou álcool supõe-se que não foi utilizada a granulação via úmida na fabricação.

O lauril sulfato de sódio é um surfactante aniônico utilizado numa grande variedade de formulações farmacêuticas não-parenterais. É um surfactante e agente molhante o qual tem a finalidade de diminuir a repulsão da água e facilitar o contato do princípio ativo com os líquidos gastrintestinais, favorecendo a dissolução e melhorando a absorção. É eficaz tanto em condições alcalinas quanto ácidas. Também é utilizado como agente emulsionante e lubrificante em comprimidos e cápsulas. Uma vez que a utilização de lauril sulfato de sódio aumenta a taxa de dissolução do fármaco, e assim, pode afetar a biodisponibilidade e a absorção de fármacos, ele também é considerado um excipiente crítico para análise de

bioisentos (BRASIL, 2011). O laurilsulfato de sódio está presente na composição do medicamento Referência e na maior parte dos medicamentos avaliados, com exceção de G3.

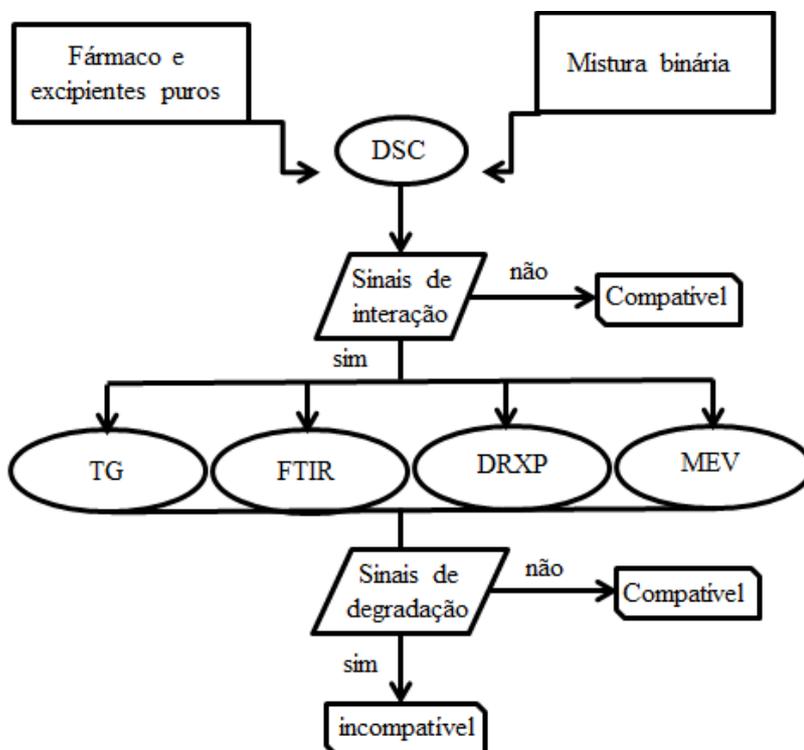
O manitol faz parte apenas do G3, e não faz parte do medicamento de referência. Nas preparações farmacêuticas o manitol é utilizado principalmente como diluente (10-90% m/m). Em formulações de comprimidos pode ser usado com substâncias ativas sensíveis à umidade uma vez que não é higroscópico. Administrado por via oral, o manitol não é absorvido em quantidades significativas a partir do trato gastrointestinal e quando administrado em doses elevadas, pode causar diarreia osmótica (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Verificou-se que a utilização de manitol levou a uma biodisponibilidade oral menor de cimetidina em comparação com a sacarose (ADKIN et al., 1995) . O manitol diminui a biodisponibilidade, pois reduz o tempo de trânsito gastrointestinal e desta forma acelera a passagem do medicamento limitando sua absorção. Devido a este problema gastrointestinal, considera-se o manitol um excipiente crítico (BARENDS; SHAH; DRESSMAN, 2012; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009; BRASIL, 2011b).

Os medicamentos G2 e S1 são as formulações que mais se assemelham ao medicamento de referência. G3 foi a que mais diferiu da fórmula de referência, tendo apenas o estearato de magnésio como excipiente em comum.

4.3 Estudos de compatibilidade

O fluxograma (Figura 6) mostra o protocolo utilizado para o estudo de compatibilidade fármaco-excipiente. Primeiramente realizou-se a caracterização do fluconazol puro, bem como de todos os excipientes puros e posteriormente foram analisadas suas misturas binárias. As misturas binárias que apresentaram algum sinal de interação por DSC foram analisadas por técnicas adicionais (TG, FTIR, DRXP, MEV) para ajudar na interpretação dos resultados.

Figura 6: Fluxograma do estudo de compatibilidade fármaco-excipiente.



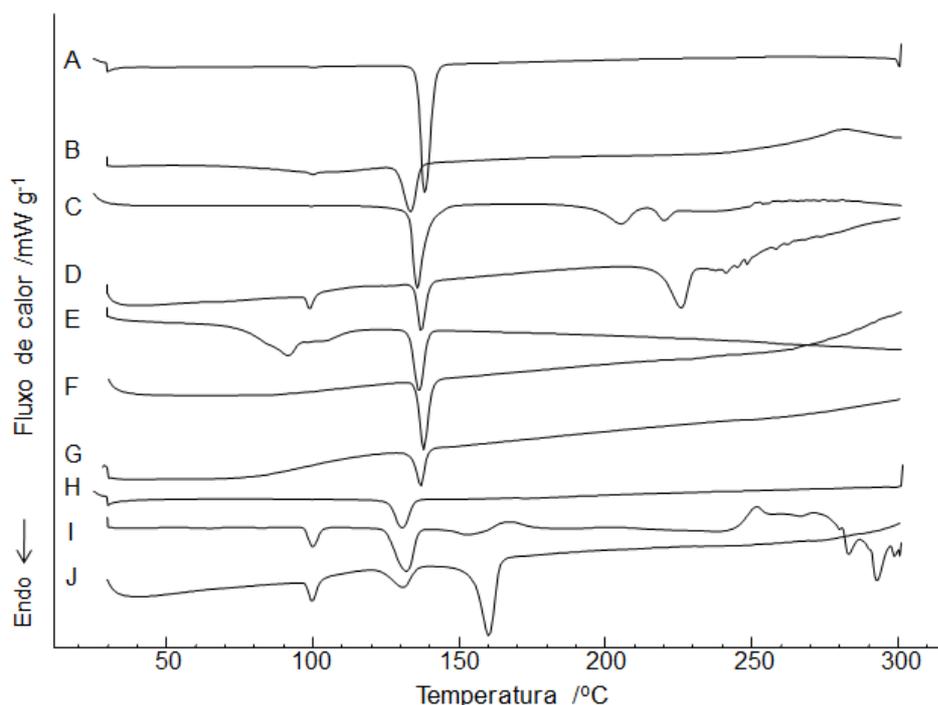
4.3.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e Análise termogravimétrica (TG)

No estudo de compatibilidade as curvas DSC dos componentes puros são comparadas com as curvas obtidas a partir de misturas físicas 1:1. Supõe-se que as propriedades térmicas (ponto de fusão, de mudança de entalpia, etc) das misturas são a soma dos componentes individuais, se os componentes são compatíveis uns com os outros. A ausência de um pico, mudança significativa no pico de fusão dos componentes, ou o aparecimento de um novo pico exo/endotérmico na mistura física indica incompatibilidade.

No entanto, pequenas mudanças na forma de pico, altura e largura são esperados devido a possíveis diferenças na geometria mistura (CHADHA et al., 2013). Em geral, quando a interação é observada por DSC, é necessário investigar e empregar outros métodos de analíticos.

Os perfis térmicos das misturas fluconazol/croscarmelose de sódio, fluconazol/lactose monoidratada, fluconazol/estearato de magnésio, fluconazol/polivinilpirrolidona, fluconazol/dióxido de silício, fluconazol/lauril sulfato de sódio, e fluconazol/amido podem ser considerados como uma sobreposição das curvas do fluconazol e dos excipientes (Figura 7, Tabela 3), demonstrando a ausência de interação. As curvas DSC dos excipientes puros acima citados estão demonstrados no Anexo B.

Figura 7: Curvas de DSC das misturas do fluconazol e seus excipientes (1:1; m/m). A: fluconazol puro, B: croscarmelose de sódio, C: lactose monoidratada, D: lactose anidra, E: estearato de magnésio, F: amido, G: polivinilpirrolidona, H: dióxido de silício, I: lauril sulfato de sódio, J: manitol.



A curva DSC do fluconazol/croscarmelose de sódio (Figura 7B) demonstra um evento endotérmico característico do ponto de fusão do fluconazol a 133,7 °C e um amplo evento endotérmico na faixa de 75 °C - 125 °C, correspondente a perda de água adsorvida. Foi demonstrado por DSC que a croscarmelose de sódio é compatível com ceftodoxima proxetil (BADALKUMAR et al., 2012) e metformina (SANTOS et al., 2008). Interações no

estado sólido foram observadas com o citrato de sildenafil (JÚLIO et al., 2013) e maleato de enalapril (REZENDE; SANTORO; MATOS, 2008).

A curva do fluconazol/lactose monoidratada (Figura 7C) mostrou pico endotérmico característico do ponto de fusão do fluconazol a 135,8 °C, seguido pela fusão da lactose monoidratada em 205,4 °C (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). A desidratação da lactose monoidratada foi observada como um evento endotérmico a 141,8 °C quando o excipiente foi analisado puro (Anexo B). Este evento foi provavelmente sobreposto pelo ponto de fusão do fluconazol na mistura de 1:1, como também pode ser visto no maior valor de $\Delta H_{\text{fusão}}$ (-115,71 J/g), em comparação com as outras misturas binárias (Tabela 4).

A curva do fluconazol/lactose anidra (Figura 7D) demonstrou o ponto de fusão do fluconazol em 136,7 °C. Em contraste, Desai et al. (2003) observaram também picos a 86,1 e 136,4 °C em adição ao pico correspondente à fusão do fluconazol puro a 140,2 °C, indicando interação parcial do fármaco com a lactose. No entanto, os autores não mencionam o tipo de lactose presente. Em outro estudo a lactose foi considerada compatível com cloridrato de sibutramina monoidratada (OLIVEIRA, P.R., et al., 2010) e norfloxacino (OLIVEIRA et al., 2009) e incompatível com cloridrato de prometazina (THUMMA; REPKA, 2009) e o aciclovir (MONAJJEMZADEH et al., 2009). Normalmente, as incompatibilidades relativas à lactose são devidas à reação de Maillard. Esta reação é suscetível de ocorrer entre lactose (um dissacarídeo redutor) e compostos com um grupo amina primária e/ou secundária, geralmente resultando em produtos de cor castanha ou castanho-amarelada (MONAJJEMZADEH et al., 2009; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

Na mistura fluconazol/estearato de magnésio (Figura 7E), foram observados dois eventos endotérmicos sobrepostos. O primeiro, no intervalo de 75-101 °C, foi atribuído à desidratação do estearato de magnésio e o segundo na faixa de 96-126 °C, foi atribuído à fusão do excipiente, que está dentro da faixa de fusão de 117-150 °C relatada (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Um terceiro evento foi observado em 136,43 °C correspondente à fusão de fluconazol. Estearato de magnésio foi considerado incompatível com nebicaopona (SILVA; LOBO, 2010), aceclofenaco (AIGNER et al., 2011) e ácido acetilsalicílico (TITA et al., 2013).

A curva do fluconazol/amido (Figura 7F) mostra o pico endotérmico do ponto de fusão do fluconazol de 137,8 °C. O amido foi considerado incompatível com o antidepressivo maleato seproxetina (SCHILDCROUT; RISLEY; KLEEMANN, 1993) e

com o broncodilatador clenbuterol (SIGNORETTI et al., 1986). E ele foi compatível com anti-histamínico desloratadina (VERONEZ et al., 2014) e com o antipsicótico atípico risperidona (DANIEL et al., 2013).

Em comprimidos, soluções de povidona são usadas como aglutinante nos processos de granulação via úmida. De modo semelhante ao caso da mistura de amido, a curva fluconazol/polivinilpirrolidona (Figura 7G) mostra a sobreposição das curvas de DSC individuais (Anexo B), com o ponto de fusão do fluconazol a 137,1 °C. A polivinilpirrolidona foi incompatível com o anti-inflamatório cetoprofeno (TITA et al., 2012), com o anti-hipertensivo atenolol (MARINI et al., 2003), e com o antipsicótico haloperidol (BRUNI et al., 2010), mas compatível com a desloratadina (VERONEZ et al., 2014) e citrato de dietilcarbamazina (CHAVES et al., 2013).

A curva fluconazol/dióxido de silício (Figura 7H) mostrou o pico endotérmico do ponto de fusão do fluconazol a 130,9 °C. Esta redução de cerca de 8 °C na fusão não foi considerado como indicativo de incompatibilidade uma vez que a curva de DSC pode ser considerada como a soma das curvas individuais, sem a presença de novos eventos ou a ausência de eventos anteriormente presentes. Além disso, o dióxido de silício é comumente utilizado em pequenas quantidades, em uma formulação farmacêutica e, provavelmente, não compromete a estabilidade do produto. O dióxido de silício foi considerado compatível com a primaquina (BERTOL et al., 2010), o norfloxacino (OLIVEIRA et al., 2009) e o cetoprofeno (TITA et al., 2011), mas incompatível com maleato de enalapril (REZENDE et al., 2008).

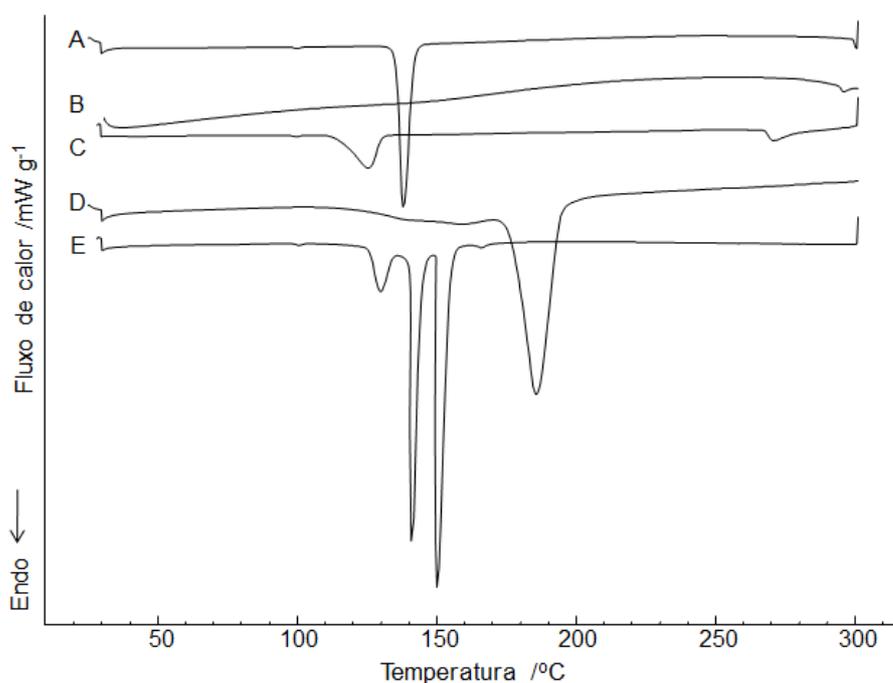
Para a mistura do fluconazol/lauril sulfato de sódio (Figura 7I) o evento de fusão de fluconazol foi observado em T_{peak} 132 °C. Os dois eventos endotérmicos T_{peak} 100 °C e T_{peak} 153 °C, juntamente com o evento exotérmico a T_{peak} 167 °C, também foram observados no lauril sulfato de sódio sozinho. Ele mostrou interação com trioxsaleno (LIMA et al., 2014), penta cloropropamida (FREIRE et al., 2009) e levotiroxina sódica (COLLIER et al., 2010), mas foi compatível com a risperidona (DANIEL et al., 2013).

Para a mistura fluconazol/manitol (Figura 7J), a curva de DSC foi considerada a sobreposição das curvas individuais, sem indicação de incompatibilidade. O ponto de fusão do fluconazol foi observado no T_{peak} 130,8 °C. O manitol foi compatível com a desloratadina (VERONEZ et al., 2014) e trioxsaleno (LIMA et al., 2014) e incompatível com primaquina (BERTOL et al., 2010) e omeprazol (AGATONOVIC-KUSTRIN et al., 2008).

Foram observadas diferenças nas curvas de DSC para o fluconazol/fosfato de cálcio

dibásico diidratado e fluconazol / celulose microcristalina (Figura 8).

Figura 8: Curvas de DSC para o fluconazol/fosfato de cálcio dibásico diidratado e fluconazol/celulose microcristalina. A: fluconazol puro, B: celulose microcristalina pura, C: fluconazol/celulose microcristalina, D: fosfato de cálcio dibásico diidratado, E: fluconazol/fosfato de cálcio dibásico diidratado.



A curva DSC do fluconazol/celulose microcristalina (Figura 8C) mostrou o deslocamento do ponto de fusão do fluconazol de T_{peak} 138,2 °C para T_{peak} 125,6 °C. Este decréscimo de cerca de 13 °C indica uma possível interação no estado sólido, mas isso não corresponde necessariamente à incompatibilidade. A celulose microcristalina apresentou interação com a desloratadina (VERONEZ et al., 2014), maleato de enalapril (REZENDE et al., 2008), a risperidona (DANIEL et al., 2013), mas foi compatível com cloridrato de venlafaxina (BERNARDI et al., 2009), cloridrato monoidratado de sibutramina (OLIVEIRA et al., 2010), norfloxacino (OLIVEIRA et al., 2009) e cetoprofeno (TITA et al., 2011).

Para o fosfato de cálcio dibásico di-hidratado puro (Figura 8D), a curva DSC mostrou dois eventos endotérmicos sobrepostos. O primeiro foi um pico largo na faixa de 109-169 °C e o segundo foi um pico agudo na faixa de 170 – 206 °C (T_{peak} 185,4 °C). Estes eventos podem ser atribuídos ao processo de desidratação (água ligada).

A curva de DSC para fluconazol/fosfato de cálcio dibásico diidratado (Figura 8E) mostra três picos endotérmicos agudos e bem definidos: o primeiro evento (T_{peak} 129,7 °C),

o segundo evento (T_{peak} 140,7 °C) e o terceiro evento (T_{peak} 150 °C). Na análise DSC da mistura, não foi possível identificar corretamente os eventos térmicos de cada composto individual, indicando uma possível interação fármaco-excipiente, alterando os seus perfis termoanalíticos. Por esta razão, o T_{onset} , T_{peak} e valores de entalpia (ΔH) não foram atribuídos para esta mistura (Tabela 4). O fosfato de cálcio dibásico diidratado foi compatível com cloridrato de ciprofloxacino (FATHY; HASSAN; MOHAMED, 2002) e mesilato de pefloxacino (MISRA; MISRA; PANPALIA, 2007).

Se o fármaco é compatível com o excipiente a altas temperaturas então é também compatível sob temperatura ambiente. No entanto, se houver incompatibilidade/interação a temperaturas elevadas, esta pode ou não ser comprovada em temperatura ambiente. Em tais casos, estudos adicionais devem ser realizados para investigar a possibilidade de incompatibilidade utilizando DSC-fotovisual, TG, DRXP, FTIR, MEV, estudos de compatibilidade de curta e longa duração, CLAE, espectrometria de massas, entre outros.

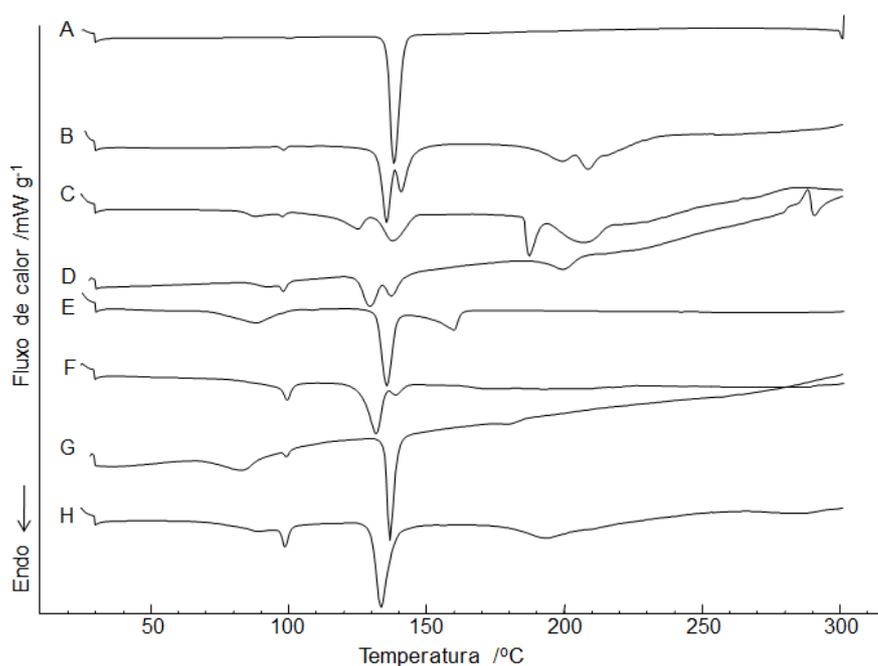
Tabela 4: Temperatura inicial (T_{onset}), pico endotérmico (T_{peak}) e variação de entalpia (ΔH) da fusão do fluconazol puro e em misturas de fluconazol e excipientes (1:1; m/m).

| | $T_{\text{onset}}/^{\circ}\text{C}$ | $T_{\text{peak}}/^{\circ}\text{C}$ | ΔH de fusão/ J.g^{-1} |
|--|-------------------------------------|------------------------------------|--|
| Fluconazol | 135,70 | 138,16 | -114,91 |
| Fluconazol + amido | 134,88 | 137,84 | -66,08 |
| Fluconazol + celulose microcristalina | 115,35 | 125,55 | -57,22 |
| Fluconazol + croscarmelose de sódio | 129,04 | 133,70 | -55,58 |
| Fluconazol + dióxido de silício | 126,10 | 130,93 | -34,39 |
| Fluconazol + estearato de magnésio | 133,08 | 136,43 | -59,78 |
| Fluconazol + fosfato de cálcio dibásico diidratado | - | - | - |
| Fluconazol + lactose anidra | 134,13 | 136,75 | -45,00 |
| Fluconazol + lactose monoidratada | 133,01 | 135,81 | -115,71 |
| Fluconazol + lauril sulfato de sódio | 124,85 | 132,04 | -65,84 |
| Fluconazol + manitol | 123,55 | 130,78 | -41,81 |
| Fluconazol + polivinilpirrolidona | 93,01 | 137,12 | -40,85 |

As curvas DSC do fluconazol e das diferentes formulações comerciais são mostradas na Figura 9. Os perfis das formulações diferem, conforme já esperado, uma vez que as

composições (excipientes) são diferentes, mas isto não afeta o ponto de fusão do fluconazol. Mesmo a formulação G3, que aparenta ser fabricada utilizando granulação via úmida, apresentou curva DSC semelhante às outras formulações. De fato, o comportamento térmico do fluconazol foi mantido em todas as análises das formulações farmacêuticas comerciais com celulose microcristalina (G3 e S2) e fosfato de cálcio dibásico diidratado (S2).

Figura 9: Curvas de DSC para o fluconazol e diferentes formulações comerciais. A: fluconazol puro, B: referência, C: genérico 1, D: genérico 2, E: genérico 3, F: similar 1, G: similar 2, H: similar 3.

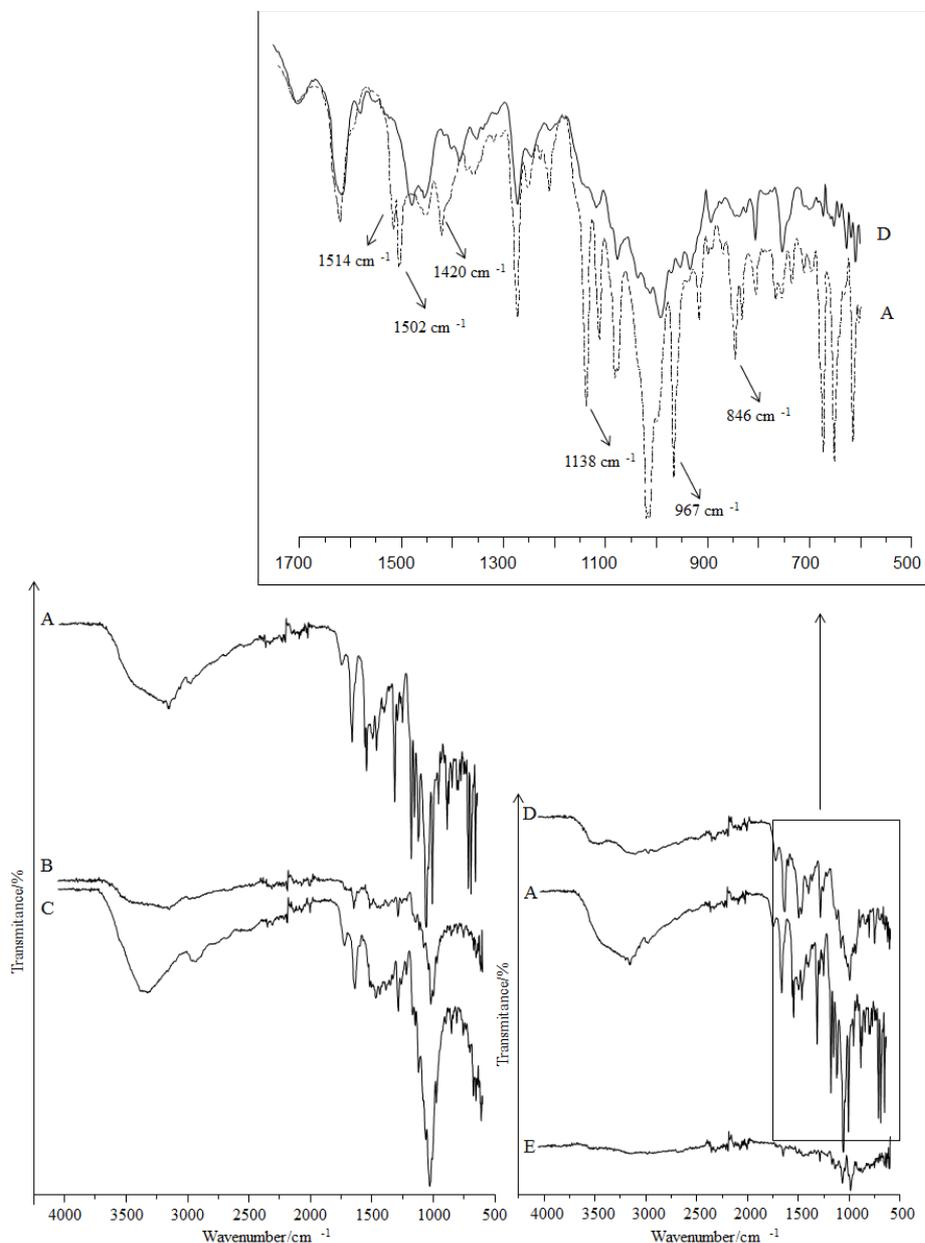


Em todas as formulações, eventos térmicos foram observados até 100 °C e foram considerados como perda de água superficial (umidade). Eles também podem ser atribuídos ao estearato de magnésio e/ou lauril sulfato de sódio; no entanto estes excipientes estão geralmente presentes em baixas concentrações nas formulações (cerca de 0,5 - 2%), dificultando a sua identificação. Os perfis de R, G1, G2, e S1 (Fig. 9B, 9C, 9D, e 9F, respectivamente), mostraram dois picos sobrepostos no intervalo de 125-145 °C, que podem ser explicados pela fusão do fluconazol seguida pela desidratação da lactose monoidratada. Os eventos observados em R, G1, G2, S2 e S3 (9B, 9C, 9D, 9G e 9H, respectivamente) dentro do intervalo de 185-230 °C podem ter ocorrido devido à fusão da lactose. O evento endotérmico observado a 160 °C em G3 é explicado pela presença de manitol (Figura 9E).

4.3.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A interação do fluconazol com a celulose microcristalina e o fosfato de cálcio dibásico diidratado foi observada em misturas binárias por DSC. Deste modo, os espectros de FTIR destas misturas foram obtidos a fim de identificar uma possível interação química (Figura 10).

Figura 10: Espectro de absorção no infravermelho fluconazol (A), celulose microcristalina (B), fluconazol/ celulose microcristalina (C), fluconazol/fosfato de calco dibásico diidratado (D), fosfato de calcio dibásico diidratado (E).



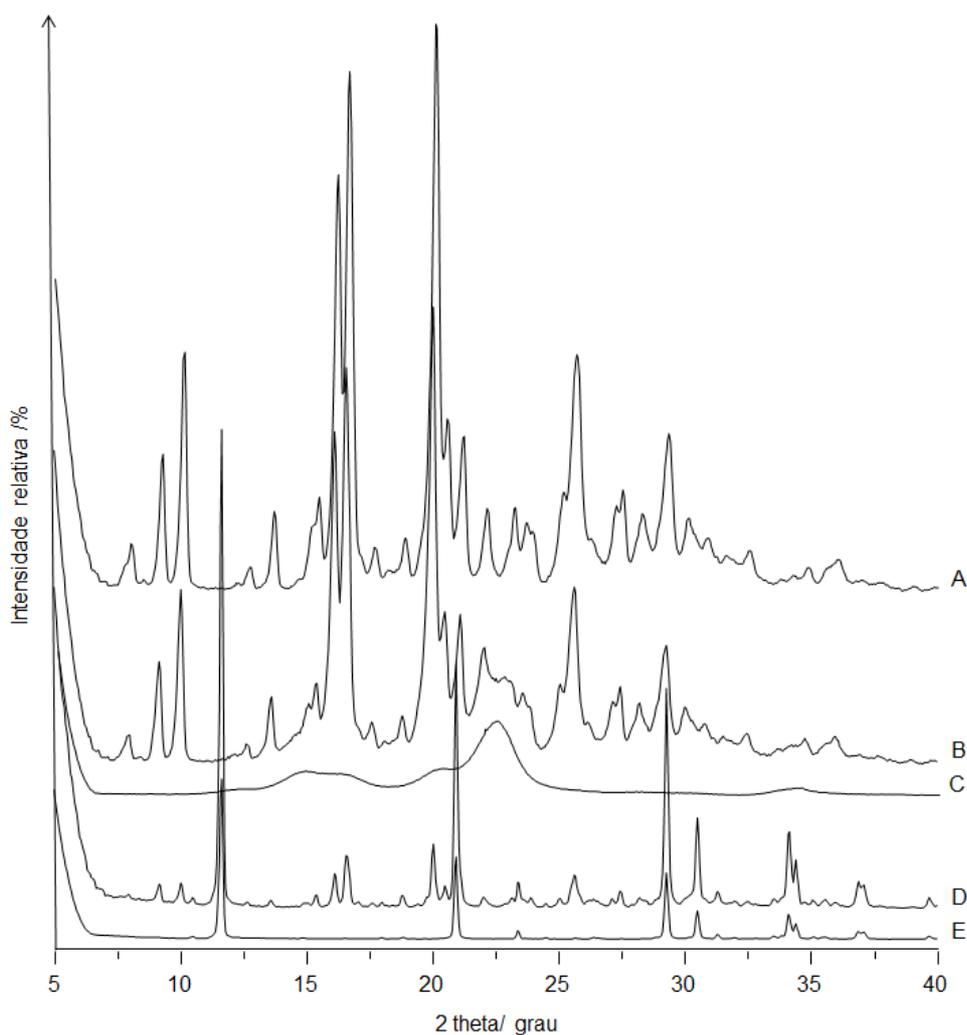
Na mistura de fluconazol/celulose microcristalina, houve uma mudança de pico da banda de 3600-2500 para 3116-3286 cm^{-1} , em comparação com o espectro de fluconazol puro. Isto ocorreu possivelmente devido à maior força de interação de ligações de hidrogênio. As outras bandas de absorção podem ser consideradas como a sobreposição das individuais, sem falta, deslocamento ou alargamento das bandas de vibração fluconazol.

Na mistura de fluconazol/fosfato de cálcio dibásico diidratado foram observadas algumas alterações: o desaparecimento de alguns picos a 1514, 1502, 1420, 1138, 967, e 846 cm^{-1} . A maior parte das bandas que desapareceram estão associados ao anel triazólico, que é responsável pela atividade antifúngica de fluconazol. Desta forma, uma interação ou incompatibilidade com este excipiente pode prejudicar a eficácia clínica do fármaco.

4.3.3 Difração de raios X de pó (DRXP)

Os estudos de difração de raios X de pó (DRXP) foram realizados para obtenção de informações adicionais sobre as características cristalinas das misturas binárias de fluconazol, celulose microcristalina e fosfato de cálcio dibásico diidratado. Os valores de 2θ dos picos de difração para o fluconazol foram: $9,27^\circ$, $10,13^\circ$, $16,23^\circ$, $16,68^\circ$, $20,09^\circ$, $21,20^\circ$, $25,67^\circ$ e $29,33^\circ$ (2θ) (Fig. 11). Para ambas as misturas binárias foram observadas apenas pequenas alterações nas intensidades de picos, o que não indica qualquer alteração na estrutura cristalina dos compostos.

Figura 11: Padrões de DRXP para o fluconazol (A), fluconazol/celulose microcristalina (B), celulose microcristalina (C), fluconazol/fosfato de cálcio dibásico diidratado (D), fosfato de cálcio dibásico diidratado (E).

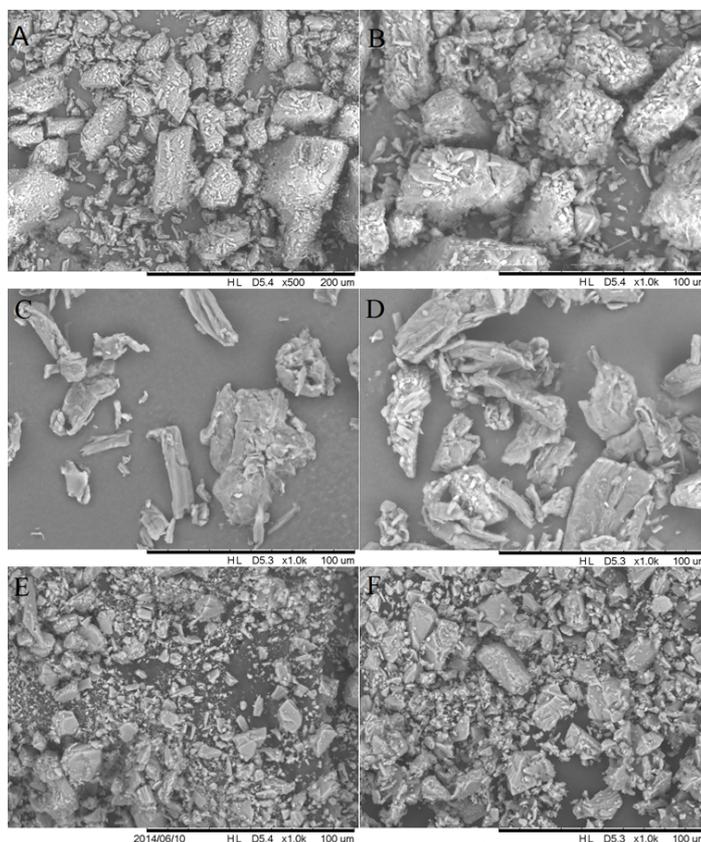


4.3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias obtidas por MEV não evidenciaram qualquer interação entre fluconazol e os excipientes (Figura 12). As imagens de MEV mostraram que ambas as partículas de fluconazol e dos excipientes mantiveram a sua morfologia e os cristais do fármaco apareceram dispersos sobre a superfície das partículas de excipientes. Os dados de MEV estão de acordo com o DRXP e não foram observadas alterações na estrutura e/ou incompatibilidade.

A capacidade de visualizar a morfologia de fármacos no estado sólido através de MEV ajuda a dar suporte para o desenvolvimento e a produção de medicamentos, constituindo uma ferramenta importante na detecção de mudanças cristalinas em decorrência de variações no processo de síntese ou mesmo do processamento farmacêutico, que podem vir a formar outras formas polimórficas do fármaco (RIBEIRO et al., 2008).

Figura 12: Micrografias de MEV: fluconazol (500x) (A), fluconazol (1000x) (B), celulose microcristalina (1000x) (C), fluconazol/celulose microcristalina (1000x) (D), fosfato de cálcio dibásico diidratado (1000x) (E), fluconazol/fosfato de cálcio dibásico diidratado (1000x) (F).



Técnicas termoanalíticas, principalmente calorimetria exploratória diferencial, têm sido cada vez mais utilizadas na caracterização de interações de estado sólido e detecção precoce de compatibilidade fármaco-excipiente. Estes estudos de pré-formulação são um passo importante para a obtenção de uma formulação farmacêutica confiável e eficaz. No entanto, para o desenvolvimento de formulações que são candidatas a bioisenção dos testes de bioequivalência eles são ainda mais críticos, pois estas formulações não serão avaliadas *in vivo*.

Foi observada interação do fluconazol em suas misturas binárias com a celulose microcristalina e o fosfato de cálcio dibásico diidratado, mas a interação não foi confirmada na análise das formulações comerciais e por FTIR, DRXP e MEV. O DSC mostrou ser uma técnica importante no primeiro passo de desenvolvimento do produto. Se forem detectadas interações, futuros problemas na dissolução e/ou estabilidade podem ser previstos.

4.4 Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de fluconazol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

4.4.1 Desenvolvimento e validação do método de quantificação por CLAE

Na etapa de desenvolvimento analítico utilizaram-se artigos da literatura com métodos simples e rápidos (CORRÊA, 2011; PORTA; CHANG; STORPIRTIS, 2005) e o método de doseamento da Farmacopéia Brasileira (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010c). A proporção dos constituintes da fase móvel foi otimizada para água e acetonitrila (75:25, v/v), resultando em tempo de retenção de aproximadamente 4,4 minutos para o fluconazol, sem interferência de outros componentes.

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão e robustez adequadas à análise (BRASIL, 2003).

4.4.1.1 Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003; ICH, 2005). O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser $\geq 0,99$ (BRASIL, 2003). Para definir a linearidade da resposta do detector do instrumento à concentração conhecida do fluconazol, foram preparadas 3 curvas de linearidade, uma para cada meio de dissolução, segundo os critérios da RDC 37/2011. No intervalo de concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ a 250 $\mu\text{g/mL}$ foram obtidas as equações de reta $y = 1.973,4 x - 1.379,3$ com $r^2 = 0,9999$ para o fluido gástrico simulado (pH 1,2), $y = 1993,6x - 16620$ com $r^2 = 0,9911$ para o tampão acetato (pH 4,5) e $1961,6x - 3998,8$ com $r^2 = 0,9999$, para o fluido intestinal (pH 6,8), conforme figuras 13, 14 e 15 respectivamente.

Figura 13: Representação gráfica da curva de calibração média do fluconazol em fluido gástrico simulado (pH 1,2) obtida por CLAE.

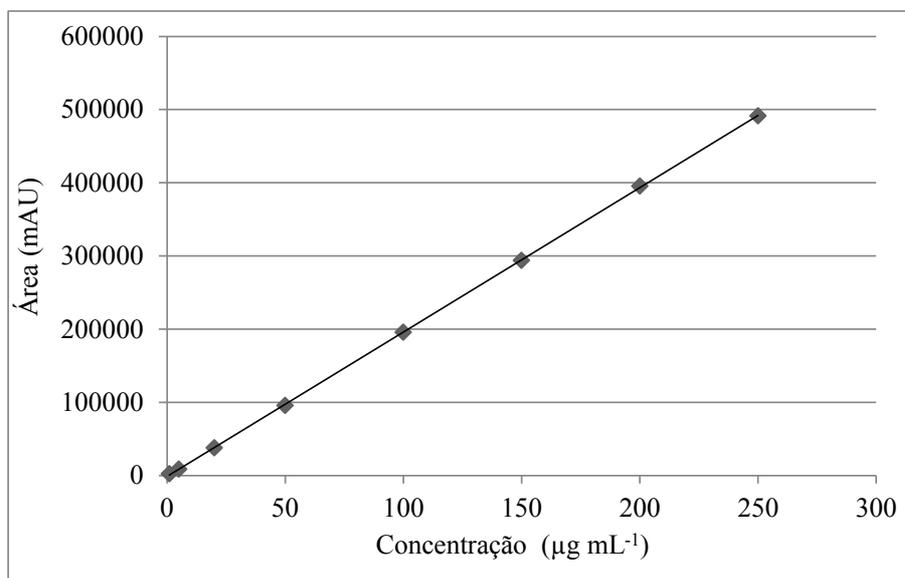


Figura 14: Representação gráfica da curva de calibração média do fluconazol em tampão acetato pH 4,5 obtida por CLAE.

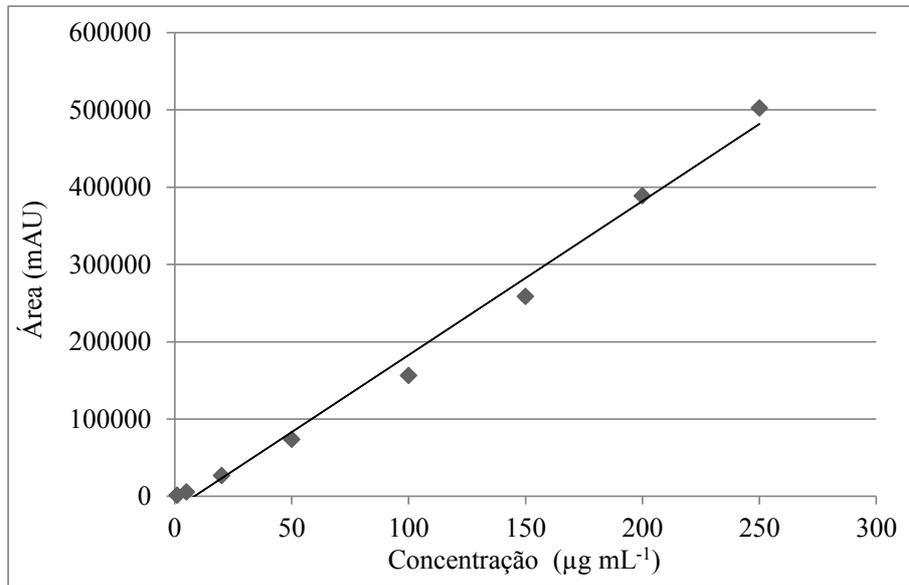
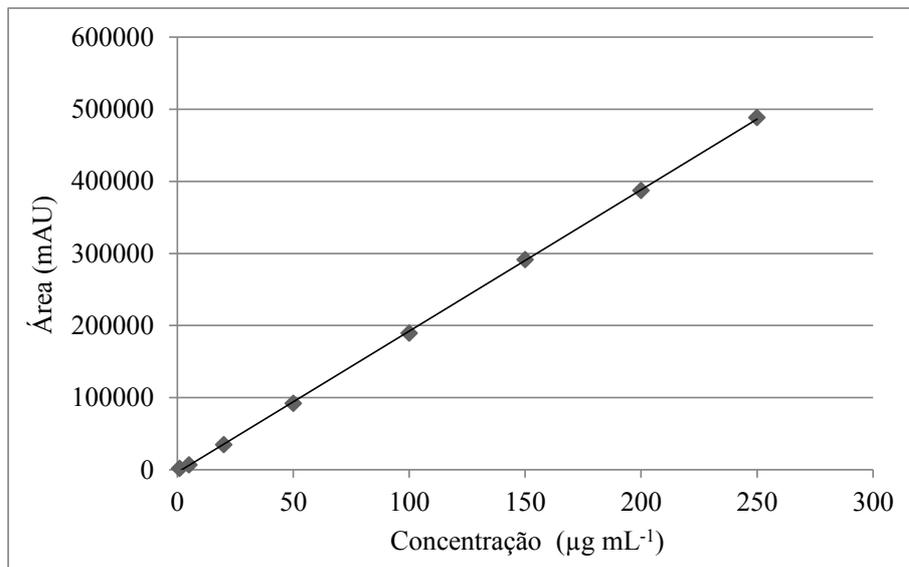


Figura 15: Representação gráfica da curva de calibração média do fluconazol em fluido intestinal simulado (pH 6,8) obtida por CLAE.

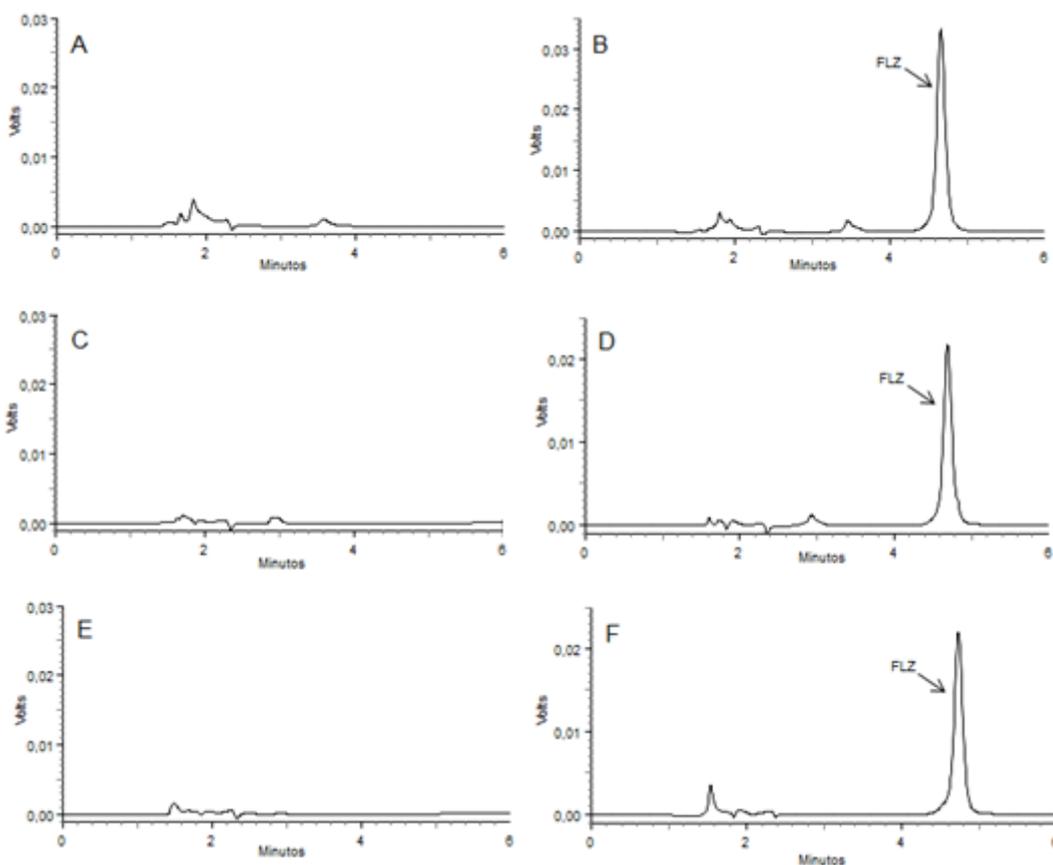


Diante destes critérios e de acordo com as figuras 13, 14 e 15, podemos concluir que o método utilizado para determinação do perfil de dissolução do fluconazol é linear, uma vez que o resultado das dissoluções nos três meios foram iguais a $r^2 > 0,99$.

4.4.1.2 Especificidade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003; ICH, 2005). A interferência dos excipientes foi avaliada pela injeção em CLAE da mistura de excipientes após agitação no dissolutor nas mesmas condições utilizadas no processo de dissolução das cápsulas (Figuras 16 A, C e E). Nas figuras 16 B, D e F foi acrescentado o fluconazol.

Figura 16: Avaliação da especificidade do método analítico nos diferentes meios de dissolução contendo os excipientes. A: FGS pH 1,2, B: FGS pH 1,2 contendo fluconazol, C: Tampão acetato pH 4,5, D: Tampão acetato pH 4,5 contendo fluconazol, E: FIS pH 6,8, F: FIS pH 6,8 contendo fluconazol.



A tabela 5 sumariza os dados dos excipientes utilizados.

Tabela 5: Percentual dos excipientes utilizados no teste de especificidade.

| Excipiente | Percentual utilizado | Faixa de proporção conforme literatura | Função |
|---------------------------------------|----------------------|--|---|
| Amido | 15% | 3-25% ^a | Aglutinante, diluente, desintegrante |
| Celulose microcristalina | 50% | 20-90% ^a | Aglutinante, diluente, lubrificante e desintegrante |
| Croscarmelose de sódio | 5% | 10-25% ^a | Desintegrante |
| Dióxido de silício | 2% | 0,1-1 % ^a | Deslizante |
| Estearato de magnésio | 2% | 0,25- 5% ^a | Lubrificante |
| Fosfato de cálcio dibásico diidratado | 25% | 50% ^b | Diluente |
| Lactose anidra | 20% | 65-85% ^c | Diluente |
| Lactose monoidratada | 20% | 65-85% ^c | Diluente |
| Lauril sulfato de sódio | 2% | 1-2% ^a | Surfactante aniônico, detergente, emulsionante, agente molhante, lubrificante |
| Manitol | 50% | 10-90% ^a | Diluente |
| Polivinilpirrolidona | 5% | 0,5-5% ^a | Aglutinante |

^a ROWE ; SHESKEY; QUINN, 2009; ^b ABDELKADER; ABDALLA; SALEM, 2008; ^c FERREIRA, 2002.

Também foi averiguada uma possível interferência dos meios de dissolução no tempo de retenção do fluconazol injetando-se 20 µL de cada um dos destes meios no CLAE. Tanto a mistura dos excipientes quanto os meios de dissolução não apresentaram pico na região de retenção do fluconazol.

A monografia do fluconazol da Farmacopeia Brasileira 5^a edição traz a espectrofotometria por UV como um dos métodos empregados para o doseamento de cápsulas. Contudo, alguns autores verificaram que há forte interferência dos excipientes na determinação por espectrofotômetro de UV (OLIVEIRA, D.M. et al., 2010; CORRÊA; VIANNA-SOARES; SALGADO, 2012). No doseamento por CLAE isto não ocorre porque há separação das substâncias presentes na amostra.

4.4.1.3 Precisão

A precisão representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

A precisão foi determinada através do ensaio de repetibilidade (precisão intra-corrída) e precisão intermediária (precisão inter-corrídas). A repetibilidade foi obtida analisando-se o coeficiente de variação das determinações de seis amostras na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais. Os resultados são sumarizados na tabela 6.

Tabela 6: Dados do ensaio de repetibilidade do método analítico para quantificação do fluconazol.

| Amostra | Teor (%) |
|---------|----------|
| 1 | 102,49 |
| 2 | 103,24 |
| 3 | 102,45 |
| 4 | 100,98 |
| 5 | 100,22 |
| 6 | 100,60 |
| Média | 101,66 |
| CV% | 0,36 |

A precisão intermediária do método foi avaliada pela determinação das amostras na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, no mesmo dia, por 3 analistas diferentes, e os resultados são demonstrados na tabela 7.

Tabela 7: Dados da precisão intermediária do método analítico para quantificação do fluconazol

| Analista | Teor (%) |
|----------|----------|
| 1 | 100,66 |
| 2 | 100,00 |
| 3 | 101,25 |
| Média | 100,63 |
| CV% | 0,51 |

Os resultados indicam que o método é preciso, pois os valores de CV% sumarizados nas tabelas 6 e 7 foram inferiores ao limite de 5% preconizados pela ANVISA (BRASIL, 2003).

4.4.1.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Volumes variáveis de solução padrão foram adicionados aos meios de dissolução com uma mistura de excipientes para obter valores de 80%, 100% e 120% da concentração de trabalho do fluconazol. Os resultados estão expressos na tabela 8.

Tabela 8: Resultado do ensaio de exatidão para o método de quantificação do fluconazol

| Concentração teórica | Recuperação média % (CV%) | | |
|----------------------|---------------------------|---------------|--------------|
| | FGS pH 1,2 | Tampão pH 4,5 | FIS pH 6,8 |
| 80% | 95,29 (0,49) | 95,38 (1,42) | 95,17 (0,46) |
| 100% | 97,96 (0,45) | 98,53 (0,79) | 99,14 (0,07) |
| 120% | 95,41 (0,51) | 100,63 (0,09) | 98,29 (0,30) |

Os valores foram considerados satisfatórios, pois encontram-se dentro da faixa de 95-105%.

4.4.1.5 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade de analito numa amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificada com um valor exato; já o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade de analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão adequadas.

Os LD e LQ foram calculados pela curva analítica levando-se em conta o desvio padrão do intercepto e a média da inclinação das 3 curvas obtidas para cada um dos meios de dissolução, conforme preconizado pela RE n° 899 (BRASIL, 2003), e ICH Q2(R1) (ICH, 2005). Os resultados são mostrados na tabela 9.

Tabela 9: Limites de detecção e quantificação para o método de quantificação do fluconazol.

| Meio de dissolução | Limite de detecção $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Limite de quantificação $\mu\text{g mL}^{-1}$ |
|--------------------|---|--|
| FGS pH 1,2 | 0,05 | 0,16 |
| Tampão pH 4,5 | 0,20 | 0,65 |
| FIS pH 6,8 | 0,20 | 0,66 |

4.4.1.6 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

A avaliação da robustez foi verificada por meio de pequenas alterações nos parâmetros do método, como fluxo da fase móvel, temperatura do forno, proporção da fase móvel, e comprimento de onda. Os resultados estão sumarizados na Tabela 10.

Tabela 10: Parâmetros da avaliação da robustez do método analítico para análise do fluconazol por CLAE.

| Variável | Faixa investigada | Teor (%) | CV (%) |
|---|-------------------|----------|--------|
| Fluxo da fase móvel (mL min ⁻¹) | 0,9 | 103,30 | 0,20 |
| | 1,0 | 99,78 | 0,21 |
| | 1,1 | 104,51 | 1,81 |
| Temperatura do forno (°C) | 28 | 99,12 | 0,29 |
| | 30 | 99,78 | 0,21 |
| | 32 | 100,14 | 0,51 |
| Proporção da fase móvel (água: acetonitrila) | 73:27 | 99,85 | 0,70 |
| | 75:25 | 99,86 | 0,15 |
| | 77:23 | 100,50 | 0,03 |
| Comprimento de onda (nm) | 258 | 96,19 | 0,09 |
| | 260 | 99,78 | 0,21 |
| | 262 | 99,27 | 0,18 |

O método desenvolvido e validado por CLAE para a quantificação do fluconazol teve linearidade, especificidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e robustez satisfatórias, garantindo assim a confiabilidade dos resultados.

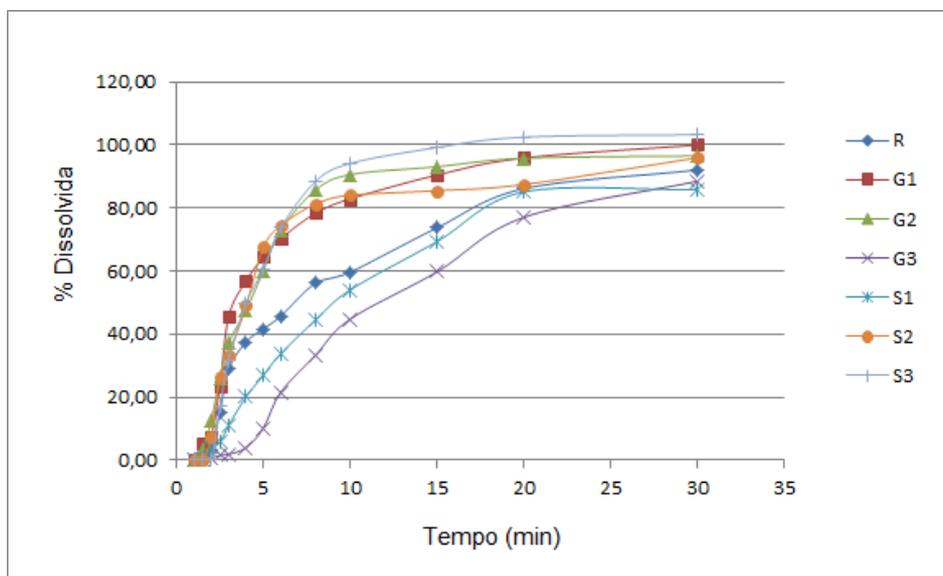
4.5 Estudo do perfil de dissolução do fluconazol

O objetivo do teste de dissolução *in vitro* é fornecer, tão próximo quanto possível, a previsão da biodisponibilidade do produto (AULTON, 2005). Para os fármacos da classe I do SCB que são absorvidos rapidamente, o fator limitante é a sua dissolução a partir da forma farmacêutica ou o esvaziamento gástrico. Sugere-se que uma especificação de dissolução de 85% em menos de 30 minutos possa assegurar a bioequivalência para as formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata (AMIDON, 1995).

Existem três categorias de ensaios de dissolução para medicamentos de liberação imediata: ensaio de dissolução de um único ponto; ensaio de dissolução de dois pontos e perfis de dissolução. Os perfis de dissolução, os quais são obtidos a partir da porcentagem dissolvida de fármaco em diferentes tempos de amostragem, permitem uma análise mais conclusiva (AULTON, 2005; STORPIRTIS; RODRIGUES, 1998; MARCOLONGO, 2003).

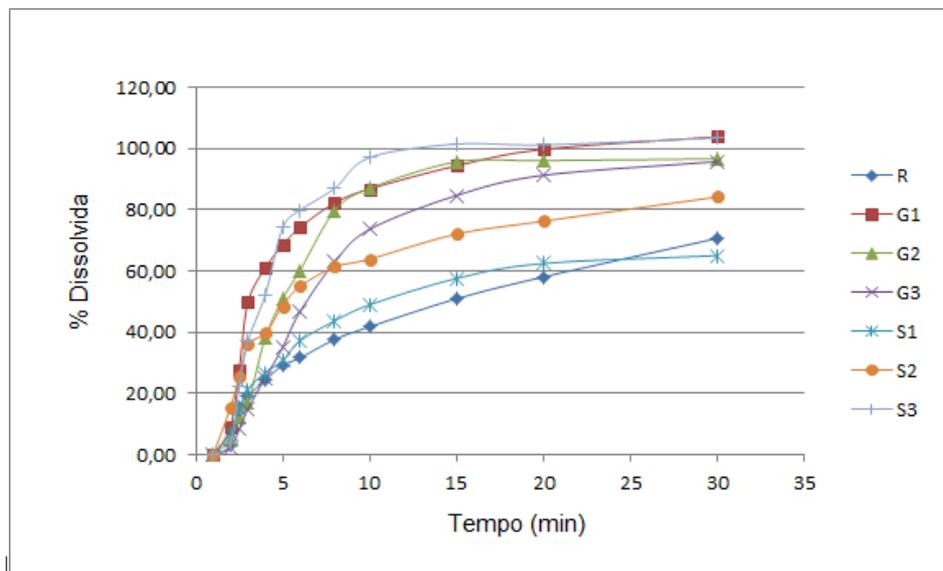
Nas dissoluções realizadas em fluido gástrico simulado pH 1,2 (Figura 17) observa-se que S3 apresentou o maior percentual de dissolução em menor intervalo de tempo, com 88,4% de fluconazol liberados em 8 min. Em contrapartida, G3 apresentou o menor percentual de dissolução comparado aos demais medicamentos, com pouco mais de 33% dissolvidos em 8 min. Nenhum medicamento apresentou quantidade dissolvida inferior a 85% em 30 min, que é a taxa de dissolução mínima estabelecida pelas agências regulatórias (BRASIL, 2011b; FDA, 2000).

Figura 17: Perfil de dissolução do fluconazol de diferentes fabricantes em fluido gástrico simulado, pH 1,2 (n = 6).



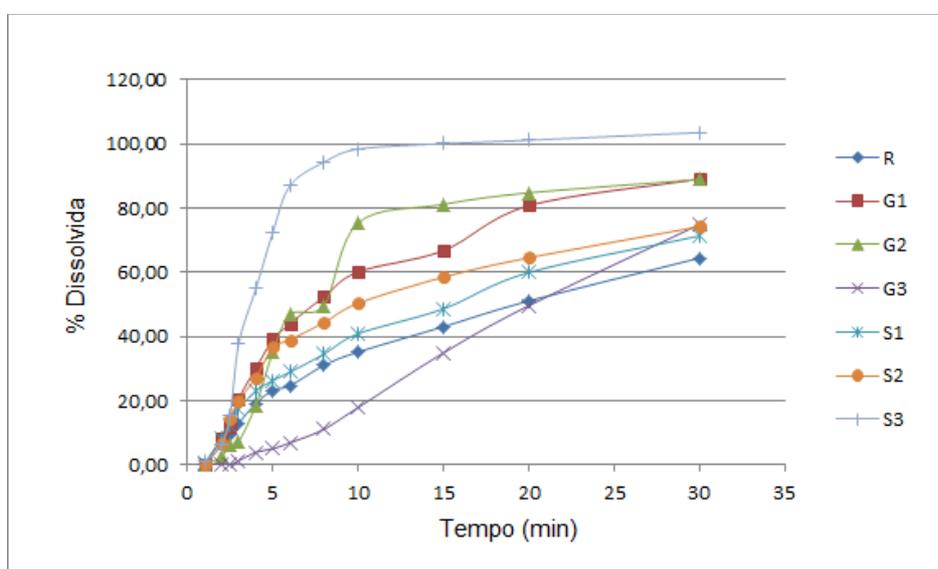
Em tampão acetato pH 4,5 (Figura 18) a formulação S3 apresentou o maior percentual de dissolução em menor intervalo de tempo, com aproximadamente 87% em 8 min. Já a formulação R, apresentou a menor porcentagem dissolvida no tempo de 8 min, bem como não atingiu dissolução igual ou superior a 85%, em 30 minutos, assim como as formulações S1 e S2.

Figura 18: Perfil de dissolução do fluconazol de diferentes fabricantes em tampão acetato pH 4,5, n = 6.



As formulações testadas em fluido intestinal simulado pH 6,8 (Figura 19) apresentaram os resultados mais discrepantes comparado aos demais pHs. Somente as formulações G1, G2 e S3 cumpriram com o preconizado pela legislação, apresentando resultados satisfatórios com porcentagem dissolvida acima de 85% em 30 min. A formulação G3 apresentou o menor percentual de dissolução com aproximadamente 11% da quantidade dissolvida em 8 min. Neste mesmo tempo a formulação S3 apresentou o maior percentual com 94% da quantidade declarada dissolvida.

Figura 19: Perfil de dissolução do fluconazol de diferentes fabricantes em fluido intestinal simulado, pH 6,8 (n = 6).



Sabendo-se que no mínimo 85% do fármaco deverão dissolver-se em até 30 minutos dentro das condições estabelecidas (BRASIL, 2011b; FDA, 2000), verificamos que todas as formulações testadas em fluido gástrico simulado (pH 1,2) cumpriram a especificação. Em tampão acetato (pH 4,5) apenas as formulações genéricas e S3 cumpriram com o preconizado, e em fluido intestinal simulado (pH 6,8) apenas G1, G2 e S3 apresentaram porcentagem de dissolução acima de 85% conforme demonstrado na tabela 11. A formulação G3 apresentou dissolução mais lenta em fluido gástrico e intestinal simulados. Esta formulação foi a que mais diferiu do medicamento referência, além disso, possivelmente foi utilizada granulação via úmida no processo de fabricação. Contudo, estas podem não ser as únicas explicações para este comportamento *in vitro*, uma vez que em tampão acetato, a formulação R apresentou perfil de dissolução mais lento.

Observou-se que R não cumpriu os critérios de dissolução nos meios tampão acetato e fluido intestinal simulado, o que pode ser considerado um problema para a subsequente análise estatística (f1 e f2), uma vez que as demais formulações são comparadas ao R.

Aparentemente, os comportamentos observados nos perfis de dissolução estão mais relacionados aos processos de produção industrial (cujos detalhes não são conhecidos) do que aos excipientes empregados, dado que G1, G2 e S3 apresentam composições distintas entre si e cumpriram com os critérios de dissolução contidos na RDC 37/2011.

Tabela 11: Porcentagem de fluconazol dissolvido em relação a quantidade de 150 mg declarada pelos fabricantes após 30 minutos de dissolução.

| Meio de dissolução | Fluconazol dissolvido (%) | | | | | | |
|--------------------|---------------------------|--------|-------|-------|-------|-------|--------|
| | R | G1 | G2 | G3 | S1 | S2 | S3 |
| FGS pH 1,2 | 92,07 | 100,02 | 96,58 | 88,52 | 85,84 | 95,95 | 103,31 |
| Tampão pH 4,5 | 70,66 | 103,80 | 96,60 | 95,71 | 65,05 | 84,15 | 103,42 |
| FIS pH 6,8 | 64,44 | 89,14 | 88,92 | 74,92 | 71,34 | 74,24 | 103,58 |

A diferença observada nos perfis de dissolução pode ser devido a diferente solubilidade do fluconazol em diferentes pHs. O fluconazol é uma base fraca com pKa de 2,0 (MERCK & COMPANY INCORPORATED, 2010). Como o único pH menor que o pKa do fármaco foi o do meio de dissolução do fluido gástrico simulado (pH 1,2), e que as moléculas ficam mais ionizadas em pH abaixo do pKa do fármaco, este foi o meio em que o fluconazol apresentou maior solubilidade.

Existem diversos fatores capazes de exercer influência sobre a velocidade de dissolução de fármacos em formas farmacêuticas sólidas, tais como: características físico-químicas do próprio fármaco; excipientes utilizados na formulação; processo de fabricação; embalagem e armazenamento; aparato de dissolução e parâmetros do ensaio de dissolução (ABDOU, 1989).

Apesar do ensaio de dissolução *in vitro* ser um ensaio importante na previsão da dissolução *in vivo*, deve-se também verificar se o fármaco que foi absorvido está chegando no seu alvo e se o efeito do fármaco está ocorrendo. Corrêa (2011) comparou o doseamento físico-químico do fluconazol com sua atividade como antifúngico. Tanto o produto fluconazol cápsulas quanto as amostras após estudos de estabilidade preliminar foram avaliadas quanto a sua atividade. Os resultados demonstraram diferença entre o teor físico-

químico e sua atividade como antifúngico. Como não observaram correlação entre a potência do fármaco e seu teor físico-químico, possivelmente a atividade do fármaco está ligada a sítios moleculares diferentes dos envolvidos na absorção de radiação UV. O que demonstra a necessidade de determinação de potência para os agentes antimicrobianos. A avaliação da atividade das amostras submetidas ao estudo de estabilidade preliminar (estufa: 60 °C , 60 dias; câmara climática: 40 °C, umidade relativa 75%, 90 dias e radiação: 254nm, 66 e 180 dias), mostraram que a atividade dessas amostras foi reduzida em mais de 50 % em relação à atividade inicial do produto. Desta forma, talvez o doseamento *in vivo* ou *in vitro* do fluconazol forneça informações diretas apenas a cerca concentração do fármaco, mas não a sua resposta terapêutica.

Os ensaios de dissolução *in vitro* constituem importante meio de caracterização da qualidade biofarmacêutica de uma forma farmacêutica sólida oral, possibilitando o controle da qualidade farmacêutica e o estabelecimento de correlações com os dados obtidos *in vivo*. O conhecimento e controle das variáveis que podem influenciar a liberação da substância ativa bem como a padronização e conseqüente calibração e validação de equipamentos e procedimentos fortalecem a importância destes ensaios, tornando-os mais confiáveis, robustos e exeqüíveis. A seleção criteriosa das condições do ensaio deve ser orientada no sentido de se obter o máximo poder discriminatório e resultar na capacidade de detecção de eventuais desvios aos padrões de qualidade inicialmente pretendidos (MANADAS; PINA, VEIGA, 2002).

4.5.1 Análise Estatística

Dentre os métodos propostos para a avaliação comparativa entre perfis de dissolução destacam-se os fatores de diferença (f1) e de semelhança (f2) que comparam diretamente a diferença entre a porcentagem de fármaco dissolvida em uma unidade de tempo para os produtos teste e referência (MOORE; FLANNER, 1996). Vários órgãos como a FDA, ANVISA (RDC 31/2010 e RDC 37/2011) e EMA, adotam estes fatores para realização da comparação entre os perfis de dissolução, especialmente o fator de semelhança (f2) (BRASIL, 2010; BRASIL, 2011; FDA, 2000; EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2010).

Para ser considerado semelhante, o fator de semelhança (f2) deve estar compreendido entre 50 e 100 e os valores de f1 compreendidos entre 0 e 15. A comparação sempre é feita em relação ao perfil de dissolução do medicamento Referência. De acordo

com a tabela 12, na qual se analisa o f1, nenhuma amostra apresentou resultado semelhante ao preconizado pela legislação em fluido gástrico simulado (pH 1,2), bem como em fluido intestinal simulado (pH 6,8). Em tampão acetato (pH 4,5) apenas uma amostra (S1) apresentou resultados entre 0 e 15.

Tabela 12: Análise do fator de diferença (f1) em diferentes pHs, comparando com o medicamento Referência.

| Meio de dissolução | Formulação | | | | | |
|-----------------------|------------|-------|-------|-------|-------|--------|
| | G1 | G2 | G3 | S1 | S2 | S3 |
| FGS pH 1,2 | 37,54 | 38,82 | 36,37 | 21,34 | 33,17 | 39,20 |
| Tampão pH 4,5 | 97,96 | 69,87 | 47,73 | 11,93 | 51,22 | 98,62 |
| FIS pH 6,8 | 56,82 | 63,24 | 42,49 | 15,87 | 35,91 | 140,85 |

Em relação ao f2 somente a amostra S1 apresentou resultado satisfatórios (entre 50 e 100) em dois pHs (4,5 e 6,8), como mostra a tabela 13.

Tabela 13: Análise do fator de semelhança (f2) em diferentes pHs, comparando com o medicamento Referência.

| Meios de dissolução | Formulação | | | | | |
|------------------------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | G1 | G2 | G3 | S1 | S2 | S3 |
| FGS pH 1,2 | 37,09 | 35,60 | 34,34 | 47,39 | 37,50 | 33,75 |
| Tampão pH 4,5 | 21,98 | 26,69 | 33,89 | 66,02 | 36,80 | 20,63 |
| FIS pH 6,8 | 36,11 | 31,82 | 43,31 | 64,62 | 46,96 | 16,72 |

Diante das seis amostras comparadas, apenas a formulação S1 apresentou alguns resultados condizentes com os parâmetros de f1 e f2. Os perfis das demais formulações podem ser considerados diferentes entre si. O medicamento S1 apresenta os mesmos excipientes de R e demonstrou, em geral, resultados aceitáveis de f1 e f2, contudo, ambos S1 e R não cumprem com os critérios de dissolução mínima de 85% em 30 min.

Conforme observado nos perfis de dissolução, isto pode ser explicado pela baixa dissolução do R, comprometendo a análise estatística de comparação com as demais formulações. As formulações G1, G2 e S3 que cumpriram o percentual mínimo de

dissolução nos três meios de dissolução, porém apresentaram resultados insatisfatórios de f1 e f2.

Coelho et al. (2004) realizou perfil de dissolução do fluconazol utilizando o aparato 2, com 900 mL de solução de tampão fosfato 0,2 M (pH 7,0) como meio de dissolução, mantido a 37,0 °C, velocidade de agitação igual a 100 rpm. Porta (1999) realizou perfil de dissolução em várias condições, variando o meio utilizado (900 mL de água ou ácido clorídrico 0,1 N), aparato 1 ou 2 e a velocidade de rotação (50, 75 ou 100 rpm). Ambos não encontraram perfis de dissolução homogêneos para todas as cápsulas analisadas.

A RDC 37/ 2011, recomenda que se deve demonstrar a semelhança entre os perfis de dissolução entre os fármacos teste e referência. Porém, o fármaco de referência do fluconazol não atendeu ao critério de rápida dissolução em todos os meios recomendados (mínimo de 85% do fármaco devem dissolver-se em até 30 minutos). Este critério foi somente atendido para o meio de fluido gástrico simulado (pH 1,2). Quando o medicamento referência não atende a todos os critérios estabelecidos pela legislação de bioequivalência, a ANVISA pode aceitar, sob justificativa, outro medicamento como parâmetro de comparação. Os medicamentos de referência são produtos inovadores, e tiveram sua eficácia, segurança e qualidade comprovadas cientificamente, contudo podem ter uma formulação que não atenda a todos os critérios da bioequivalência, mas ainda assim têm garantida sua eficácia por meios dos testes *in vivo*.

5. CONCLUSÕES

- As formulações Genéricas e Similares apresentam composição diferenciada, comparada ao medicamento Referência.
- Foi observada interação do fluconazol em suas misturas binárias com a celulose microcristalina e o fosfato de cálcio dibásico diidratado, mas a interação não foi confirmada na análise das formulações comerciais e por FTIR, DRXP e MEV.
- O método desenvolvido e validado por CLAE para a quantificação do fluconazol teve linearidade, especificidade, precisão, exatidão, robustez e limite de detecção e de quantificação satisfatórios, garantindo assim a confiabilidade dos resultados.
- A partir da realização dos perfis de dissolução, podemos observar que somente em fluido gástrico simulado (pH 1,2) os resultados foram satisfatórios para todas as formulações.
- Na análise estatística por f1 e f2 apenas a formulação S1 apresentou resultado parcialmente satisfatório, para f1 em tampão acetato (pH 4,5) e para f2 em tampão acetato (pH 4,5) e FIS, o que pode ser explicado pela baixa dissolução do medicamento Referência.
- Estudos *in vitro* mostram-se úteis na detecção de diferenças entre produtos similares, além de fornecerem indicações importantes sobre o provável comportamento *in vivo* desses produtos. No entanto, conclusões definitivas sobre biodisponibilidade e bioequivalência somente são possíveis após a realização de estudos *in vivo*.

6. REFERÊNCIAS

ABDELKADER, H., ABDALLA O.Y., SALEM, H. Formulation of Controlled-Release Baclofen Matrix Tablets II: Influence of Some Hydrophobic Excipients on the Release Rate and In Vitro Evaluation. **AAPS PharmSciTech**. v. 9, p. 675-683, 2008.

ABDOU, H. M. **Dissolution, bioavailability and bioequivalence**. Easton: Mack Printing, 1989.

ADKIN, D.A.; DAVIS, S.S.; SPARROW, R.A.; HUCKLE, P.D.; WILDING, I.R.. The effect of mannitol on the oral bioavailability of cimetidine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 84, n.12, p. 1405–1409, 1995.

AGATONOVIC-KUSTRIN, S.; MARKOVIC, N.; GINIC-MARKOVIC, M.; MANGAN, M.; GLASS, B.D.. Compatibility studies between mannitol and omeprazole sodium isomers. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 48, n. 2, p. 356–360, 2008.

AIGNER, Z.; HEINRICH, R.; SIPOS, E.; FARKAS, G.; CIURBA, A.; BERKESI, O; SZABÓ-RÉVÉSZ, P.. Compatibility studies of aceclofenac with retard tablet excipients by means of thermal and FT-IR spectroscopic methods. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 104, p. 265–271, 2011.

ALKHAMIS, K.A; OBAIDAT, A.A; NUSEIRAT, A.F.. **Solid-state characterization of fluconazole**. **Pharmaceutical Development and Technology**. v. 7, p.491–503, 2002.

ALLEN, L.V., POPOVICH, N. G., ANSEL, H. C.. **Formas farmacêuticas e sistema de liberação de fármacos**. 9 ed. São Paulo: Artmed, 2013.

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

ARMELIN, M. J. A.; V. A. MAIHARA, M. B. A.; VASCONCELLOS, D. I. T.; FAVARO, V. F.; NASCIMENTO FILHO. Application of neutron activation analysis to estimate the distribution of inorganic elements among five varieties of Brazilian corn. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**. v.164, p.265-274, 1992.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BADALKUMAR, R.P.; RAJESH, K.J., RAKESH, K.J.; RAJENDRA, V.S.. Formulation development and evaluation of cefpodoxime proxetil dispersible tablets. **International Journal of Drug Development and Research**, v. 4, p. 124–131, 2012.

BARENDT, D.; SHAH, V.; DRESSMAN, J.. Biowaiver Monographs: What have we learned? In: Dressman J, editor. Biowaiver Monographs 2004 – 2012 Compiled and reviewed on the occasion of the FIP Centennial. The Netherlands. 2012. pp. 8-33. Disponível em: https://fip.org/files/fip/publications/FIP_centennialbook_biowaiver_webversion.pdf. Acesso: 20 Fev. 2014.

BERGSTRÖM, C.A.S.; ANDERSSON, S.B.E., FAGERBERG, J.H.; RAGNARSSON, G.; LINDAHL, A.. Is the full potential of the biopharmaceutics classification system reached? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 57, p. 224-231, 2014.

BERNARDI, L.S.; OLIVEIRA, P.R.; MURAKAMI, F.S.; SILVA, M.A.S.; BORGMANN, S.H.M.; CARDOSO, S.G.. Characterization of venlafaxine hydrochloride and compatibility studies with pharmaceutical excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 97, p. 729–733, 2009.

BERTOL, C.D.; CRUZ, A.P.; STULZER, H.K.; MURAKAMI, F.S.; SILVA, M.A.S.. Thermal decomposition kinetics and compatibility studies of primaquine under isothermal and non-isothermal conditions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 102, p. 187–192, 2010.

BOURICHI, H., BRIK, Y., HUBERT, P., CHERRAH, Y., BOUKLOUSE, A..Solid-state characterization and impurities determination of fluconazol generic products marketed in Marocco. **Journal of Pharmaceutic Analysis**. v.2, p.412-421, 2012.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Instrução normativa - IN nº 4, de 3 de agosto de 2011**. Dispõe sobre a lista de fármacos candidatos à bioisenção baseada no sistema de classificação biofarmacêutica (SCB) e dá outras providências. Brasília, DF, 2011a.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Instrução normativa - IN nº 7, de 21 de agosto de 2014**. Determina a publicação da “Lista de fármacos candidatos à bioisenção baseada no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB)” e dá outras providências Brasília, DF, 2014a.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Nota Técnica n.º 003/2013/CEFAR/ GTFAR/GGMED/ANVISA**. Dispõe sobre o 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. Brasília, DF, 2013.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução - RDC 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. Brasília, DF, 2011b.

BRASIL. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução (RE) Nº. 899, de 29 de maio de 2003**. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2003.

BRASIL. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Listas de Preços de Medicamentos**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/0764e30045e7354795dbb57ffa9843d8/LIST+A+CONFORMIDADE_2014-10-20.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 03 Nov. 2014b.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução - RDC Nº 31, de 11 de agosto de 2010. **Dispõe sobre a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo**. Brasília, DF, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 533, de 28 de março de 2012. **Estabelece o elenco de medicamentos e insumos da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS)**. Brasília, DF, 2012.

BROWN, M.E. **Introduction to thermal analysis**. London: Chapman and Hall, 1988. 211p.

BRUNI, G.; BERBENNI, V.; MILANESE, C.; GIRELLA, A.; MARINI, A.. Drug-excipient compatibility studies in binary and ternary mixtures by physico-chemical techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 102, p. 193-201, 2010.

BRUNTON, L.L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B.C. **Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12 ed. New York: McGraw-Hill; 2011.

BUTLER, J.M.; DRESSMAN, J.B.The developability classification system: application of biopharmaceutics concepts to formulation development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 99, p. 4940–4954, 2010.

CASTAGNOLA, E.; JACQZ-AIGRAIN, E.; KAGUELIDOU, F.; MARAGLIANO, R.; STRONATI, M.; RIZZOLLO, S.; FARINA, D.; MANZONI, P.. Fluconazole use and safety in the nursery. **Early Human Development**. v. 88, s.2, p. S11–S15, 2012.

CASTRO, A. C. **Determinação quantitativa de fases em ZrO₂ – MgO -Y₂O₃ utilizando o Método de Rietveld**.2007. 81f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia nuclear de materiais) – Setor de Ciências Energéticas e Nuclear, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

CHADHA, R.; ARORA, P.; BHANDARI, S.; GARG, M.; JAIN, D.V.S.. Thermoanalytical and spectroscopic studies on different crystal forms of Nevirapine. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 111, p. 2133-2142, 2013.

CHADHA, R.; BHANDARI, S.. Drug–excipient compatibility screening—Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 87, p. 82– 97, 2014.

CHAKRABORTY, P.; DEY, S.; PARCHA, V.; BHATTACHARYA, S.S.; GHOSH, A.. Design Expert Supported Mathematical Optimization and Predictability Study of Buccoadhesive Pharmaceutical Wafers of Loratadine. **BioMed Research International**. v. 2013, p.12, 2013.

CHAROO, N.; CRISTOFOLETTI, R.; GRAHAM, A.; LARTEY, P.; ABRAHAMSSON, B.; GROOT, D. W.; KOPP, S.; LANGGUTH, P.; POLLI, J.; SHAH, V. P.; DRESSMAN, J.. Biowaiver Monograph for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms: Fluconazole. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, p. 3843–3858, 2014.

CHAVES, L.L.; ROLIM, L.A.; GONÇALVES, M. L.C.M.; VIEIRA, A.C.C.; ALVES, L.D.S; SOARES, M.F.R.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; LIMA, M.C.A.; ROLIM-NETO, P.J.. Study of stability and drug-excipient compatibility of diethylcarbazine citrate. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 111, p. 2179–2186, 2013.

CHOW, S.-C., LIU, J.-P.. **Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies**. 3. ed. Boca Raton: Chapman and Hall/CRC, 2008.p. 760.

CHOWDARY K.P.R, RAJYALAKSHIMI, Y. Dissolution rate in modern pharmacy. **Eastern pharmacist**.v. 30, n. 350, p. 51-54. 1987.

COELHO, H.; MATINATTIL, A. N. F.; ARAÚJO, M. B.; BERGOLD, A. M.; BUENO, F. Análise químico-farmacêutica do fluconazol e especialidade farmacêutica cápsula. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 40, n. 2, p. 235–246, 2004

COLLIER, J.W., SHAH, R.B., GUPTA, A., SAYEED, V., HABIB, M.J., KHAN, M.A.. Influence of formulation and processing factors on stability of levothyroxine sodium pentahydrate. **AAPS PharmSciTech**. v. 11, n. 2, p. 18–25, 2010.

COOK, J.; ADDICKS, W.; WU, Y.H. Application of the biopharmaceutical classification system in clinical drug development—an industrial view. **AAPS Journal**. v.10, p. 306–310, 2008.

COOK, J.A.; DAVIT, B.M.; POLLI, J.E.. Impact of biopharmaceutics classification system-based biowaivers. **Molecular Pharmaceutics**. v.7, n. 5, p. 1539–1544, 2010.

CORRÊA, J. C. R. **Desenvolvimento de métodos analíticos para estudos de estabilidade para fluconazol cápsulas**. 2011. 136 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Araraquara, 2011.

CORRÊA, J. C. R.; VIANNA-SOARES, C. D.; SALGADO, H. R. N. Development and Validation of Dissolution Test for Fluconazole Capsules by HPLC and Derivative UV Spectrophotometry. **Chromatography Research International**. v. 2012, p. 1-8, 2012.

CORRÊA, J. C.R., SALGADO, H. R. N., Review of fluconazole properties and analytical methods for its determination. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**. v. 41, n. 2, pp. 124–132, 2011.

CUFFINI, S.; JÚNIOR, A.P.; TOMBARI, D. Polimorfismo em fármacos. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. (eds.) **Biofarmacotécnica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009, p. 21-31.

CYR, T.D.; DAWSON, B.A.; NEVILLE, G.A.; SHURVELL, H.F.. Spectral characterization of fluconazole. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 14, n. 3, p. 247-255, 1996.

DANIEL, J.S.P.; VERONEZ, I.P.; RODRIGUES, L.L.; TREVISAN, M.G.; GARCIA, J.S.. Risperidone – Solid-state characterization and pharmaceutical compatibility using thermal and non-thermal techniques. **Thermochimica Acta**. v. 568, p. 148– 155, 2013.

DASH, A.K.; ELMQUIST, W.F.. Fluconazole. In: Brittain, H.G.; Al-Badr, A.A.; Kumar, K.; Dash, A.K.; Mazzo, D. J.; Florey, K.; Shervington, L.; Indrayanto, G.; Wozniak, T.J., Ip, D.P., editors. **Analytical profiles of drug substances and excipients**. San Diego: Academic Press, 2001. p. 67-113.

DESAI, S.R.; SHAIKH, M.M.; DHARWADKAR, S.R.. Preformulation compatibility studies of etamsylate and fluconazole drugs with lactose by DSC. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 71, p. 651–658, 2003.

DHIRENDRA, K.; LEWIS, S.; UDUPA, N.; ATIN, K. Solid dispersions: A review. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 22, p.234-246, 2009.

DROOGE, D.J.V. Introduction: production, stability, and dissolution of solid dispersions to improve the bioavailability of class II lipophilic drugs. In: DROOGE, D.J.V. **Combining the incompatible: inulin glass dispersions for fast dissolution, stabilization and formulation of lipophilic drugs**. Tese, 178 p. University of Groningen, 2006. Disponível em: <http://dissertations.ub.rug.nl/FILES/faculties/science/2006/d.j.van.drooge/c1.pdf>. Acesso em: 20 Out. 2014.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Guideline on the investigation of bioequivalence**, 2010. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf. Acesso em: 20 Mar. 2014.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. **Análise térmica**. 5ª ed. Brasília, 2010a, v.1, p 146.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. **Determinação da perda por dessecação**. 5ª ed. Brasília, 2010b, v.1, p 91.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. **Fluconazol**. 5ª ed. Brasília, 2010c, v.2, p 966-967.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. **Titulações em meio não aquoso**. 5ª ed. Brasília, 2010d, v.1, p 184.

FATHY, M.; HASSAN, M.A.; MOHAMED, F.A.. Differential scanning calorimetry to investigate the compatibility of ciprofloxacin hydrochloride with excipients. **Pharmazie**. v. 57, n. 12, p. 825-828, 2002.

FERREIRA, A.O. **Guia Prático da Farmácia Magistral**. 2ª ed. Juiz de Fora: LMC, 2002.

FLEISHER, D.; LI, C.; ZHOU, Y.; PAO, L.H.; KARIM, A. Drug meal and formulation interactions influencing drug absorption after oral administration. Clinical implications. **Clinical pharmacokinetics**.v.36, p.233-254, 1999.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Diflucan: (Fluconazole Tablets),(Fluconazole Injection - for intravenous infusion only), (Fluconazole for Oral Suspension) package insert. Disponível em: http://www.access.data.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/019949s057,019950s061,020090s040lbl.pdf. Acesso em: 11 Mar. 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System**, 2000. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/developmentapprovalprocess/howdrugsaredevelopedandapproved/approvalapplications/abbreviatednewdrugapplicationandagenerics/ucm154838.pdf>. Acesso em: 20 Mar. 2014.

FREIRE, F.D.; ARAGÃO, C.F.S.; MOURA, F.A.L. ; RAFFIN, F.N.. Compatibility study between chlorpropamide and excipients in their physical mixtures. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 97, p. 355–357, 2009.

GARCÍA-ARIETA, A. Interactions between active pharmaceutical ingredients and excipients affecting bioavailability: Impact on bioequivalence. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 65, p. 89–97, 2014.

GIRON, D. Thermal analysis in pharmaceutical analysis. **Acta Pharmaceutica Jugoslava**. v.40, p.95-157, 1990.

GRUDZIEŃA, M.; KRÓLA, A.; PATEREKA, G.; STEPIEŃA, K.; PLUCIŃSKIB, F.; MAZUREKA, A.P.. The structure–bioavailability approach in antifungal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 44, p. 1978–1981, 2009

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. ICH: Guideline for industry: **Validation of Analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**, 2005.

INTERNATIONAL PHARMACEUTICAL FEDERATION (FIP). **Biowaiver Monographs**. Disponível em: <https://www.fip.org/bcs_monographs>. Acesso em: 05 Dez. 2014.

JAMBHEKAR, S. S.; BREEN, P.J.. Drug dissolution: significance of physicochemical properties and physiological conditions. **Drug Discovery Today**. v. 18, n. 23/24, 2013.

JÚLIO, T.A.; ZÂMARA, I.F.; GARCIA, J.S.; TREVISAN, M.G.. Compatibility of sildenafil citrate and pharmaceutical excipients by thermal analysis and LC–UV. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 111, p. 2037–2044, 2013.

KALINKOVA, G. N. Studies of beneficial interactions between active medicaments and excipients in pharmaceutical formulations. **International Journal of Pharmaceutics**. v.187, p.1-15, 1999.

LENNERNÄS, H.; ABRAHAMSSON, B. The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension. **Journal of pharmacy and pharmacology**. v. 57, n. 3, p. 273-285, 2005.

LIMA, N.G.P.B.; LIMA, I.P.B.; BARROS, D.M.C.; OLIVEIRA, T.S.; RAFFIN, F.N.; MOURA, T.F.A.L., MEDEIROS, A.C.D., GOMES, A.P.B., ARAGÃO, C.F.S.. Compatibility studies of trioxsalen with excipients by DSC, DTA, and FTIR. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 115, p. 2311-2318, 2014.

LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J.B.. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 58, p. 265–278, 2004.

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, 2002.

MARCOLONGO R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MARINI, A.; BERBENNI, V.; PEGORETTI, M.; BRUNI, G.; COFRANCESCO, P.; SINISTRI, C.; VILLA, M.. Drug excipient compatibility studies by physico chemical techniques. The case of atenolol. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 73, p. 547-561, 2003.

MARTINEZ, M.N.; AMIDON, G.L.. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. **Journal of clinical pharmacology**. v. 42, p. 620-643, 2002.

McDAID, F.M., BARKER, S.A.; FITZPATRICK, S.; PETTS, C.R., CRAIG, D.Q.M. Further investigations into the use of high sensitivity differential scanning calorimetry as a means of predicting drug–excipient interactions. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 252, p. 235–240, 2003.

MISRA, M.; MISRA, A.K.; PANPALIA, G.M.. Interaction study between pefloxacin mesilate and some diluents using DSC supported with isothermal method. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 89, p. 803–808, 2007.

MONAJJEMZADEH, F.; HASSANZADEH, D.; VALIZADEH, H.; SIAHI-SHADBAD, M.R.; MOJARRAD, J.S., ROBERTSON, T.A.; ROBERTS, M.S.. Compatibility studies of acyclovir and lactose in physical mixtures and commercial tablets. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 73, n. 3, p. 404-413, 2009.

MOORE, J.W., FLANNER, H.H. Mathematical comparison of dissolution profiles. **Pharmaceutical Technology**. v. 20, p. 64-74, 1996.

OLIVEIRA, D.M.; MARKMAN, B.E.O.; UESSUGUI, O.; WU, E.M.; MAGNELLI, R.F. Ensaio de dissolução de cápsulas de fluconazol: problemas encontrados na determinação por espectrofotometria na região do UV. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 2, pp. 211–213, 2010.

OLIVEIRA, M.A.; YOSHIDA, M.I.; GOMES, E.C.L..Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**. v. 34, n. 7, p. 1224-1230, 2011.

OLIVEIRA, P.R., BERNARDI, L.S., STRUSI, O.L., MERCURI, S., SILVA, M.A.S., COLOMBO, P., SONVICO, F. Assembled modules technology for site specific prolonged delivery of norfloxacin. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 405, p. 90-96, 2011.

OLIVEIRA, P.R.; BERNARDI, L.S.; MURAKAMI, F.S.; MENDES, C.; SILVA, M.A.S.. Thermal characterization and compatibility studies of norfloxacin for development of extended release tablets. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 97, p. 741–745, 2009.

OLIVEIRA, P.R.; STULZER, H.K.; BERNARDI, L.S.; BORGMANN, S.H.M.; CARDOSO, S.G.; SILVA, M.A.S.. Sibutramine hydrochloride monohydrate: Thermal behavior, decomposition kinetics and compatibility studies. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 100, p. 277–282, 2010.

PARAÍSO, R.L.M.. **Determinação da solubilidade e permeabilidade de fármacos conforme o Sistema de Classificação Biofarmacêutico (SBC)**. 2012. 138 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

PHADNIS, N.V.; CAVATUR, R.K.; SURYANARAYANAN, R. Identification of drugs in pharmaceutical dosage forms by X-ray powder diffractometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.15, p.929-943, 1997.

POLLI, J.E.; YU, L.X.; COOK, J.A.; AMIDON, G.L.; BORCHARDT, R.T.; BURNSIDE, B.A.; BURTON, P.S.; CHEN, M.L.; CONNER, D.P.; FAUSTINO, P.J.; HAWI, A.A.; HUSSAIN, A.S.; JOSHI, H.N.; KWEI, G.; LEE, V.H.; LESKO, L.J.; LIPPER, R.A.; LOPER, A.E.; NERURKAR, S.G.; POLLI, J.W.; SANVORDEKER, D.R.; TANEJA, R.; UPPOOR, R.S.; VATTIKONDA, C.S.; WILDING, I.; ZHANG, G.. Summary workshop report: Biopharmaceutics classification system - implementation challenges and extension opportunities. **Journal of pharmaceutical Sciences**. v. 93, n. 6, 2004.

PORTA, V. **Avaliação da bioequivalência de formulações do mercado nacional contendo fluconazol**. 1999. 129 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

PORTA, V.; CHANG, K.H.; STORPIRTIS, S.. Evaluation of the bioequivalence of capsules containing 150 mg of fluconazole. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 288, p. 81–86, 2005.

RAMIREZ, E.; LAOS, O.; GUERRA, P.; DUQUE, B.; MOSQUERA, B.; BOROBIA, A.M.; LEI, S.H.; CARCAS, A.J., FRIAS, J.. Acceptability and characteristics of 124 human bioequivalence studies with active substances classified according to the Biopharmaceutic Classification System. **British Journal of Clinical Pharmacology**. v. 70, n. 5, p. 694–702, 2010.

REZENDE, R.L.O.; SANTORO, M.I.R.M.; MATOS, J.R.. Stability and compatibility study of Enalapril maleate using thermoanalytical techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 93, p. 881-886, 2008.

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

RICHARDSON, K., COOPER, K., MARRIOTT, M.S., TARBIT, M.H., TROKE, F., WHITTLE, P.J. Discovery of fluconazole, a Novel Antifungal Agent. **Clinical Infectious Diseases**. v. 12, s. 3, p. s267-s271, 1990.

ROUMELI, E.; TSIAPRANTA, A.; PAVLIDOU, E.; VOURLIAS, G.; KACHRIMANIS, K.; BIKIARIS, D.; CHRISAFIS, K.. Compatibility study between trandolapril and natural excipients used in solid dosage forms. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 111, p. 2109-2115, 2013.

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; QUINN, M.E.. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 6 ed. London: PhP Pharmaceutical Press; 2009.

SANTOS, A.; BASÍLIO, I.; SOUZA, F.; MEDEIROS, A.; PINTO, M.; SANTANA, D.; MACÊDO, R.. Application of thermal analysis in study of binary mixtures with metformin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 93, p. 361- 364, 2008.

SCHILDCROUT, S.A.; RISLEY, D.S.; KLEEMANN, R.L.. Drug-excipient interactions of seproxetine maleate hemihydrate: Isothermal stress methods. **Drug development and industrial pharmacy**. v. 19, n. 10, p. 1113-1130, 1993.

SIGNORETTI, E.C.; DELL'UTRI, A.; SALVO, A.D.; DONINI, L.. Compatibility study between clenbuterol and tablet excipients using differential scanning calorimetry. **Drug development and industrial pharmacy**. v. 12, n.4, p. 603-620, 1986.

SILVA, E. C. PAOLA, M.V.R.V.; MATOS, J. R.. Análise térmica aplicada à cosmetologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 43, n. 3, 2007.

SILVA, J.P.S.; LOBO, J.M.S.. Compatibility studies between nebicapone, a novel COMT inhibitor, and excipients using stepwise isothermal high sensitivity DSC method. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 102, p. 317–321, 2010.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2006. 490p.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D.. *Candida* Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. **BioMed Research International**. v. 2013, p. 1-13, 2013.

STORPIRTIS S, RODRIGUES D. *In vitro* evaluation of dissolution properties and degradation products of omeprazole in enteric-coated pellets. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. v.24, n.11, p. 1101-1107, 1998.

TAKAGI, T.; RAMACHANDRAN, C., BERMEJO, M.; YAMASHITA, S.; YU, L.X.; AMIDON, G.L.. A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan. **Molecular Pharmaceutics**. v. 3, n. 6, p. 631–643, 2006.

THUMMA, S.; REPKA, M.A.. Compatibility studies of promethazine hydrochloride with tablet excipients by means of thermal and non-thermal methods. **Pharmazie**. v. 64, n. 3, p. 183–189, 2009.

TITA, B.; FULIAS, A.; BANDUR, G.; MARIAN, E.; TITA, D.. Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 56, n.2, p. 221–227, 2011.

TITA, D.; JURCA, T.; FULIAS, A.; TITA, E.M.B.. Compatibility study of the acetylsalicylic acid with different solid dosage forms excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 112, p. 407–419, 2013.

TSUME, Y; MUDIE, D.M.; LANGGUTH, P.; AMIDON, G.E.; AMIDON, G. L.. The Biopharmaceutics Classification System: Subclasses for in vivo predictive dissolution (IPD) methodology and IVIVC. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.57, p.152–163, 2014.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. 34 ed. Rockville : United States Pharmacopeial Convention, 2011.

VERONEZ, I.P.; DANIEL, J.S.P.; GARCIA, J.S.; TREVISAN, M.G.. Characterization and compatibility study of desloratadine. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 115, p. 2407–2414, 2014.

WARGO, D.J.; DRENNEN, J.K. Near-Infrared Spectroscopic characterization of pharmaceutical powder blends. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.14, p.1415-1423, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for WHO Model List of Essential Medicines immediate-release, solid oral**

dosage forms. vol. 937 of WHO Technical Report Series, 2006. Disponível em: <http://apps.who.int/prequal/info_general/documents/TRS937/WHO_TRS_937__annex8_eng.pdf>. Acesso em: 10 Mar. 2014.

WU, C.Y.; BENET, L.Z.. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. **Pharmaceutical Research.** v. 22, p. 11–23. 2005.

YAMASHITA, S.; TACHIKI, H.. Analysis of risk factors in human bioequivalence study that incur bioequivalence of oral drug products. **Molecular Pharmaceutics.** v. 6, p. 48–59, 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, M. L., LEE, V. H., HUSSAIN, A. S. Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. **Pharmaceutical Research.** v.19, n.7, p. 921–925, 2002.

ZIÉMONS, E., BOURICHI, H., MANTANUS, J., ROZET, E., LEBRUN, P., ESSASSI, E., CHERRAH, Y., BOUKLOUZE, A., HUBERT, P.. Determination of binary polymorphic mixtures of fluconazole using near infrared spectroscopy and X-ray powder diffraction: A comparative study based on the pre-validation stage results. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** v. 55, p. 1208–1212, 2011.

7. ANEXOS

7.1 Anexo A- Artigo disponível on-line

J Therm Anal Calorim
DOI 10.1007/s10973-014-4316-z

Fluconazole–excipient compatibility studies as the first step in the development of a formulation candidate for biowaiver

Lilian Klein Teleginski · Aline Biggi Maciel ·
Cassiana Mendes · Marcos Antônio Segatto Silva ·
Larissa Sakis Bernardi · Paulo Renato de Oliveira

Received: 13 August 2014 / Accepted: 19 November 2014
© Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary 2014

7.2 Anexo B

Figura 20: Curvas de DSC dos excipientes. A: croscarmelose de sódio B: lactose monoidratada, C: lactose anidra, D: estearato de magnésio, E: amido, F: polivinilpirrolidona, G: dióxido de silício, H: lauril sulfato de sódio e I: manitol.

