

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL / MG

CRISTINA MARTINIANO MONTANARI

**ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* E ESTABILIDADE DE FASES SÓLIDAS DE
ESPIRONOLACTONA NA FORMA FARMACÊUTICA CÁPSULAS**

ALFENAS – MG
2016

CRISTINA MARTINIANO MONTANARI

**ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* E ESTABILIDADE DE FASES SÓLIDAS DE
ESPIRONOLACTONA NA FORMA FARMACÊUTICA CÁPSULAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas. Orientadora: Prof^a Titular Magali Benjamim de Araújo.

ALFENAS – MG
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Montanari, Cristina Martiniano.

Estudo de liberação in vitro e estabilidade de fases sólidas de
espironolactona na forma farmacêutica cápsulas. / Cristina Martiniano
Montanari. – Alfenas - MG, 2016.

72 f.

Orientadora: Magali Benjamim de Araújo.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade
Federal de Alfenas, 2016.

Bibliografia.

1. Cristalização. 2. Espironolactona. 3. Controle de qualidade -
Dissolução. I. Araújo, Magali Benjamim de. II. Título.

CDD-615

CRISTINA MARTINIANO MONTANARI

**ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* E ESTABILIDADE DE FASES SÓLIDAS
DE ESPIRONOLACTONA NA FORMA FARMACÊUTICA CÁPSULAS**

A Banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas. Orientadora: Prof^ª Titular Magali Benjamim de Araújo.

Aprovada em: 26/02/2016

Prof^ª Titular Magali Benjamim de Araújo
Instituição: UNIFAL - MG
Assinatura:

Prof^º Dr Marcello Garcia Trevisan
Instituição: UNIFAL - MG

Assinatura:

Prof^ª Titular Hérica Regina Nunes Salgado
Instituição: UNESP - SP
Assinatura:

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade, sabedoria, saúde e pelos momentos difíceis que nos fazem crescer.

Aos meus pais, meu irmão, Gabriel, Tayra e toda família pelo incentivo, esforço para me proporcionar uma boa educação e por sempre acreditar e torcer por mim.

À Prof^ª. Titular Magali Benjamim de Araújo, minha orientadora, a quem devo a oportunidade de conclusão do meu Mestrado, por ter aceitado me orientar. Agradeço também pelo carinho e atenção nesta jornada.

À Prof^ª. Dr^ª. Lucélia Magalhães da Silva, a quem dedico essa dissertação. Agradeço por ser um exemplo de pessoa, gentil e comprometida em ajudar o próximo. Não tenho palavras para expressar minha gratidão.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Doriguetto e ao Prof. Dr. Marcello Garcia Trevisan, pelo apoio e contribuição em minha formação científica.

Aos colegas do laboratório Núcleo Controle de Qualidade da Universidade Federal de Alfenas pelo apoio e pelas discussões científicas.

Aos professores, funcionários e alunos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, pelo apoio constante.

À Farmacêutica Patrícia França Pires Barcelos, por toda contribuição na realização deste trabalho.

À Capes, pelo suporte financeiro.

“Entre o desejo e o alcance, apenas dois moradores: o esforço e a determinação”.

(Lavínia Lins)

RESUMO

A espironolactona é um esteroide sintético, diurético, usado no tratamento de várias doenças, tais como cirrose, hipocalemia, aldosteronismo e hipertensão. A literatura reporta para espironolactona as formas polimórficas I e II e também cinco solvatos (metanol, etanol, acetonitrila, acetato de etila e benzeno). Este fármaco pode apresentar diferentes formas sólidas, as quais podem gerar diferentes propriedades físico-químicas, sendo necessário acompanhamento adequado, tanto qualitativo como quantitativo, a fim de garantir produtos de alta qualidade. A forma solvatada deste trabalho foi obtida a partir da dissolução de espironolactona forma II em acetato de etila para se obter uma solução saturada, a solução foi filtrada e mantida em repouso a temperatura ambiente para evaporação lenta e obtenção de cristais. As amostras foram peneiradas através de tamisação e as técnicas de difração de Raios X por pó (DRX-pó), de análise térmica, como a Termogravimetria (TG) e Calorimetria exploratória diferencial (DSC), e Espectrofotometria na região do infravermelho (IV-RTA) foram aplicadas para caracterizar as formas sólidas. A solubilidade da espironolactona foi avaliada pelo método *shake-flask*. Cápsulas contendo forma II e forma solvatada foram preparadas e submetidas a estudos de estabilidade (50 ± 1 ° C) e de dissolução. As amostras foram analisadas utilizando um método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que foi validado. Os resultados das análises de DRX-pó, TG e DSC mostraram que a forma solvatada foi obtida com sucesso nesse trabalho. A análise de DSC mostrou os eventos endotérmicos correspondentes aos pontos de fusão para ambas as formas estudadas, e o evento relacionado à perda de solvente da forma solvatada. A análise TG mostrou perda de peso da forma solvatada. Valores de solubilidade da forma II foram estatisticamente maiores em todos os solventes estudados. O melhor perfil de dissolução *in vitro* foi realizado utilizando tampão acetato de sódio pH 4,5 como meio de dissolução, com aparato cesta, a 100 rpm. A determinação quantitativa foi realizada por CLAE a 230 nm. Todos os parâmetros de validação foram satisfatórios. A aplicação do método mostrou o poder discriminatório do método de dissolução. Os resultados também mostraram a influência sobre as propriedades de dissolução e na estabilidade das diferentes formas sólidas em cápsulas.

Palavras-chave: Diferentes formas no estado sólido. Espironolactona. Perfil de dissolução.

ABSTRACT

Spironolactone, a steroidal diuretic, is widely used for the treatment of refractory edema associated with congestive heart failure, hepatic ascites, primary aldosteronism and essential hypertension. Spironolactone presents two polymorphic forms identified as form I and II and five solvates reported in the literature (methanol, ethanol, acetonitrile, ethyl acetate and benzene). It is known that different solid-state forms can cause significant differences in the physicochemical properties of a compound, thus, proper monitoring of solid-state forms, both qualitative and quantitative, is crucial in order to ensure high-quality products. The solvated form was obtained by dissolution of form II in ethyl acetate to obtain saturated solution at room temperature, and the solvent was allowed to spontaneously evaporation. The samples were sieved through stainless steel mesh. The techniques of X-ray diffraction (PXRD), infrared spectroscopy (IR), differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TGA) were applied to characterize the forms. The solubility of spironolactone forms was determined by the equilibrium method. Capsules containing forms II and solvated form were prepared and subjected to dissolution and stability studies ($50 \pm 1^\circ\text{C}$). The samples were analyzed using a validated high performance liquid chromatography (HPLC) method. The results of PXRD, DSC and TG analyses showed that the solvated form was successfully obtained in this work. DSC analysis showed endothermic event corresponding to the melting points to both forms and the event related to loss of solvent to the solvated form. TGA analysis showed extensive weight loss to solvated form. Solubility values of form II were statistically higher in all solvents studied. The best *in vitro* dissolution profile was achieved using pH 4.5 acetate buffer as the dissolution medium with a basket stirrer at 100 rpm. The quantitative determination was performed by HPLC at 230 nm. All validation parameters were satisfactory. The application of the method showed the discriminatory power of the dissolution method. The results also showed the influence on the dissolution and stability properties of the different forms in capsules.

Key words: Different solid-state forms. Spironolactone. Dissolution rate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquematisação dos vários tipos de formas sólidas.....	15
Figura 2 -	Fórmula estrutural da espironolactona.....	21
Figura 3 -	Curvas de calorimetria exploratória diferencial obtidas das matérias-primas forma II e forma solvatada.....	36
Figura 4 -	Curva de termogravimetria da forma II da espironolactona.....	37
Figura 5 -	Curva de termogravimetria da forma solvatada da espironolactona.....	37
Figura 6 -	Curva de calorimetria exploratória diferencial obtida da matéria-prima forma solvatada mantida em estufa à 100°C.....	38
Figura 7 -	Difração de Raio X por pó de espironolactona formas I e II segundo os padrões simulados no CSD.....	39
Figura 8 -	Difratogramas de Raios X por pó, obtidos para espironolactona padrão simulado forma II, padrão de trabalho e matéria-prima de espironolactona.....	40
Figura 9 -	Difratogramas de Raios X por pó, obtidos para espironolactona forma solvatada recristalizada e espironolactona padrões simulados formas I e II.....	41
Figura 10 -	Difratograma de Raios X por pó, obtido para espironolactona forma solvatada recristalizada mantida em estufa à 100°C.....	42
Figura 11 -	Espectros de infravermelho do padrão de trabalho e da forma II de espironolactona matéria-prima de trabalho.....	43
Figura 12 -	Espectros de infravermelho do Padrão forma II e da forma solvatada de espironolactona.....	43
Figura 13 -	Gráfico comparativo da solubilidade das matérias-primas nos meios aquosos testados.....	45
Figura 14 -	Cromatogramas obtidos por CLAE para o padrão de espironolactona (A) e para as formulações contendo forma II (B) e forma solvatada (C).....	49
Figura 15 -	Perfis de dissolução de cápsulas de 100 mg de espironolactona utilizando diferentes meios de dissolução.....	53
Figura 16 -	Otimização da velocidade de rotação do aparato cesta.....	54
Figura 17 -	Avaliação do aparato pá com diferentes velocidades de rotação.....	55
Figura 18 -	Comparação das melhores condições obtidas para o ensaio de dissolução.....	56
Figura 19 -	Cromatogramas de padrão de espironolactona (12,5 µg/mL), diluente, cápsula vazia, placebo e meio de dissolução para avaliação da seletividade do método.....	57
Figura 20 -	Curva analítica de padrão espironolactona obtida pelo método cromatográfico.....	58

Figura 21 -	Perfis de dissolução de espironolactona forma II e forma solvatada.....	62
Figura 22 -	Perfis de dissolução de espironolactona forma II para o estudo de estabilidades no tempo 0, mês 1, mês 2 e mês 3.....	64
Figura 23 -	Perfis de dissolução de espironolactona forma solvatada para o estudo de estabilidades no tempo 0, mês 1, mês 2 e mês 3.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Dados do padrão e matéria-prima utilizados no estudo.....	24
Tabela 2 -	Excipientes utilizados no preparo das cápsulas de espironolactona.....	27
Tabela 3 -	Faixas de frequências de grupos funcionais correspondentes às bandas observadas nos espectros de infravermelho de espironolactona.....	44
Tabela 4 -	Valores de peso médio das cápsulas forma II e forma solvatada.....	47
Tabela 5 -	Valores de teor de espironolactona das amostras de cápsulas.....	49
Tabela 6 -	Valores do teste de uniformidade para espironolactona nas amostras de cápsulas.....	50
Tabela 7 -	Valores obtidos no teste de recuperação para espironolactona no ensaio de dissolução.....	59
Tabela 8 -	Valores obtidos no teste de precisão de ensaio de dissolução de cápsulas de espironolactona.....	59
Tabela 9 -	Parâmetros da avaliação da robustez do método analítico de dissolução para análise de espironolactona por CLAE.....	61
Tabela 10 -	Fatores de diferença e semelhança calculados para os perfis de dissolução das cápsulas de espironolactona.....	63
Tabela 11 -	Fatores de diferença e semelhança calculados para os perfis de dissolução das cápsulas de espironolactona estudadas no ensaio de estabilidade.....	65
Tabela 12 -	Valores de teor para espironolactona cápsulas contendo a forma II e solvatada durante os estudos de estabilidade.....	65

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS.....	13
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
3.1	FASES SÓLIDAS E SÓLIDOS FARMACÊUTICOS.....	14
3.2	MÉTODO ANALÍTICO.....	17
3.3	TESTES DE CONTROLE DE QUALIDADE.....	18
3.3.1	Difração de Raios X por pó (DRXP).....	19
3.3.2	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	19
3.3.3	Análises térmicas.....	19
3.3.4	Ensaio de Dissolução.....	20
3.4	ESPIRONOLACTONA.....	20
4	PARTE EXPERIMENTAL.....	22
4.1	EQUIPAMENTOS E REAGENTES.....	22
4.1.1	Equipamentos.....	22
4.1.2	Reagentes e Amostras.....	23
4.2	AMOSTRAGEM.....	24
4.3	RECRISTALIZAÇÃO DAS FORMAS SÓLIDAS.....	24
4.4	ANÁLISES TÉRMICAS.....	25
4.5	ANÁLISES DE MATÉRIAS-PRIMAS POR DRXP.....	25
4.6	ANÁLISES DE MATÉRIAS-PRIMAS POR IV-RTA.....	26
4.7	ESTUDOS DE SOLUBILIDADE.....	26
4.8	PREPARO DE CÁPSULAS.....	26
4.9	CONTROLE DE QUALIDADE DAS CÁPSULAS.....	27
4.10	DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO DE DISSOLUÇÃO.....	28
4.10.1	Meios de dissolução utilizados.....	28
4.10.2	Preparo da solução padrão.....	29
4.10.3	Preparo das soluções amostras.....	29
4.10.4	Desenvolvimento do ensaio.....	29
4.11	VALIDAÇÃO DO ENSAIO DE DISSOLUÇÃO.....	31
4.12	PERFIS DE DISSOLUÇÃO DAS FORMAS SÓLIDAS EM CÁPSULAS.....	33
4.13	ESTUDO DE ESTABILIDADE.....	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1	RECRISTALIZAÇÃO DAS FORMAS SÓLIDAS.....	35
5.2	ANÁLISES TÉRMICAS.....	35
5.3	ANÁLISES POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X POR PÓ (DRXP).....	39
5.4	ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO...	42
5.5	ESTUDOS DE SOLUBILIDADE.....	44
5.6	PREPARO DAS CÁPSULAS.....	46
5.7	CONTROLE DE QUALIDADE DAS CÁPSULAS.....	46
5.7.1	Aspecto.....	47
5.7.2	Peso médio.....	47
5.7.3	Desintegração.....	48

5.7.4	Identificação.....	48
5.7.5	Teor do fármaco.....	49
5.7.6	Uniformidade de doses unitárias.....	50
5.8	DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO DE DISSOLUÇÃO.....	50
5.8.1	Condições sink.....	51
5.8.2	Otimização das condições para quantificação por CLAE.....	51
5.8.3	Ensaio de dissolução.....	52
5.9	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DO ENSAIO DE DISSOLUÇÃO.....	57
5.9.1	Seletividade.....	57
5.9.2	Linearidade.....	58
5.9.3	Exatidão e precisão.....	59
5.9.4	Limites de detecção e de quantificação.....	60
5.9.5	Robustez.....	60
5.9.6	Estabilidade.....	61
5.10	PERFIS DE DISSOLUÇÃO.....	62
5.11	ESTUDO DE ESTABILIDADE.....	63
6	CONCLUSÃO.....	66
	REFERÊNCIAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

A praticidade da via de administração oral permite que as formas farmacêuticas sólidas sejam comumente utilizadas na tecnologia da fabricação dos medicamentos que são formulados agregando excipientes e os ingredientes farmacêuticos ativos (IFAs). Em geral, o seu desenvolvimento, processo de fabricação, embalagem, transporte, armazenamento e dispensação são mais simples, práticos e economicamente viáveis, além de apresentarem maior estabilidade quando comparados às formulações líquidas, nas quais o processo de degradação ocorre mais facilmente (BABU; NANGIA, 2011).

O polimorfismo se define como a habilidade de um composto existir em duas ou mais estruturas no estado sólido (ARAUJO et al., 2012; FDA, 2007). Em outras palavras polimorfos são fases sólidas de uma mesma substância caracterizadas por diferentes estruturas cristalinas. Com relação aos IFAs, este fenômeno vem recebendo destaque devido ao seu impacto na produção e no desempenho do medicamento (LEE; ERDEMIR; MYERSON, 2011). Juntamente com esse fenômeno está o solvatomorfismo, também conhecido antigamente como pseudopolimorfismo, que é utilizado para descrever outras variações do cristal, em que a estrutura do cristal de uma substância difere da composição elementar através da inclusão de uma ou mais moléculas de solvente, que ocupam posições definidas na estrutura, não ligado à rede cristalina, mas ocupando espaços de cavidades e/ou falhas, no interior do cristal (BRITTAIN, 2012; FDA, 2007).

Considerando que o polimorfismo/solvatomorfismo pode resultar em diferentes propriedades físicas e químicas, é muito provável que as formas sólidas de IFAs exibam também diferenças em suas propriedades farmacotécnicas e farmacológicas, podendo fabricar um produto sem eficácia clínica ou, até mesmo, tóxico devido às interferências na liberação do IFA da forma farmacêutica e, conseqüentemente, na sua biodisponibilidade. Assim, a escolha incorreta da forma utilizada ou transição de fase pode afetar a eficácia, estabilidade, biodisponibilidade e a segurança do medicamento, principalmente naqueles em que a dissolução é o fator limitante da absorção (LEE; ERDEMIR; MYERSON, 2011).

A espironolactona é um IFA de baixa solubilidade e alta permeabilidade, pertencente à classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (AMIDON et al., 1995, TSRL, 2012). O fármaco é amplamente utilizado como diurético, particularmente em casos de hipertensão, e como antiandrogênico e, frequentemente, manipulado em farmácias. Embora

relatos na literatura apontem a ocorrência de diferentes formas polimórficas para o IFA selecionado, diferentes solvatos e co-cristais (AGAFONOV et al., 1991; AGAFONOV; LEGENDRE; RODIER, 1989; BECKSTEAD; NEVILLE; SHURVELL, 1993; BERBENNI et al., 1999; DIDEBERG; DUPONT, 1972; ESPEAU et al., 2007; LIEBENBERG et al., 2003; NEVILLE; BECKSTEAD; COONEY, 1994; NICOLAI et al., 2007; PISEGNA; GILSON; BUTLER, 2014; TAKATA et al., 2010; ZHANG et al., 2014) não há registros em compêndios oficiais de estudos de liberação *in vitro* e estabilidade para avaliar a influência das formas sólidas relatadas na qualidade dos medicamentos da forma farmacêutica cápsula.

2 OBJETIVOS

Segue abaixo os objetivos do trabalho.

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Analisar a forma polimórfica no IFA espironolactona e realizar sua recristalização, visando avaliar a influência na qualidade da forma farmacêutica cápsula.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar as diferentes formas sólidas de espironolactona (matéria-prima e amostra recristalizada) por técnicas de difração de Raios X por pó, de análise térmica, como a termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC), e por espectrofotometria na região do infravermelho (IV-RTA);
- b) Avaliar o efeito das formas sólidas de espironolactona na sua qualidade físicoquímica, através de ensaios de solubilidade pelo método shake-flask;
- c) Manipular cápsulas em farmácia de manipulação local com as diferentes formas sólidas;
- d) Desenvolver e validar o ensaio de dissolução para as cápsulas manipuladas;
- e) Realizar estudo de dissolução para as cápsulas manipuladas;
- f) Realizar estudo de estabilidade para as cápsulas manipuladas, avaliando o seu perfil de dissolução nos diferentes tempos do estudo.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

Para melhor compreensão do trabalho segue o referencial teórico.

3.1 FASES SÓLIDAS E SÓLIDOS FARMACÊUTICOS

A matéria no estado sólido, com exceção do estado amorfo, tem como característica básica o fato de apresentar um arranjo tridimensional aproximadamente fixo das partículas que a constitui - átomos e moléculas. O arranjo espacial característico dos átomos e moléculas que formam um determinado sólido é denominado fase cristalina, onde os elementos em um sólido possuem uma disposição ordenada e repetitiva (sólido cristalino), sendo a distribuição mais provável, uma vez que é a situação de menor energia quando comparado a uma distribuição aleatória de átomos e moléculas interagindo fortemente. Contudo, apesar de ser a forma farmacêutica preferida, os medicamentos sólidos apresentam, como um de seus desafios, o fenômeno do polimorfismo/solvatomorfismo (ARAÚJO et al., 2012).

Quando a molécula de solvente que ocupa uma posição definida no interior do cristal da estrutura do fármaco for água, o solvatomorfismo é conhecido como hidrato. Quando o solvente incorporado não é a água, o solvatomorfismo passa a ser chamado de solvato (OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011). A formação de solvatos, de um modo geral, é indesejável, pois a presença de vapores orgânicos pode ser vista como impureza, e caso esses vapores sejam tóxicos, a substância não será apropriada para uso farmacêutico, além de poder afetar as propriedades químicas da mesma (PRADO; ROCHA, 2015).

Os solvatos cristalinos exibem um largo intervalo de comportamento, dependendo das interações entre o solvente e da estrutura cristalina. Em alguns solvatos, o solvente é responsável pela coesão da estrutura; por exemplo, através de pontes de hidrogênio. Estes solvatos são extremamente estáveis e difíceis de dessolvatar. Quando estes cristais perdem seu solvente, eles colapsam e se recristalizam em uma nova forma cristalina. Podemos considerá-los solvatos polimórficos. Em outros solvatos, o solvente não está ligado, mas ocupa espaços vazios no interior do cristal. Estes solvatos perdem o solvente mais facilmente e não ocorre a destruição

do retículo cristalino. Este tipo de solvato é conhecido como solvato pseudopolimórfico (FLORENCE, 2011).

Compostos amorfos são formas sólidas que não possuem cadeia molecular ordenada longa, sendo sólidos com arranjos desordenados de moléculas sem distinção da rede cristalina, consequentemente possuem cristalinidade zero (PRADO; ROCHA, 2015).

Nesse contexto, a ocorrência de polimorfismo e/ou pseudopolimorfismo é frequente nos fármacos que são, em sua maioria, moléculas orgânicas pequenas de baixo peso molecular (abaixo de 600 g/mol), capazes de cristalizarem-se como polimorfos verdadeiros, solvatos, sais, cocrystalis e sólidos amorfos, como ilustrado na Figura 1.

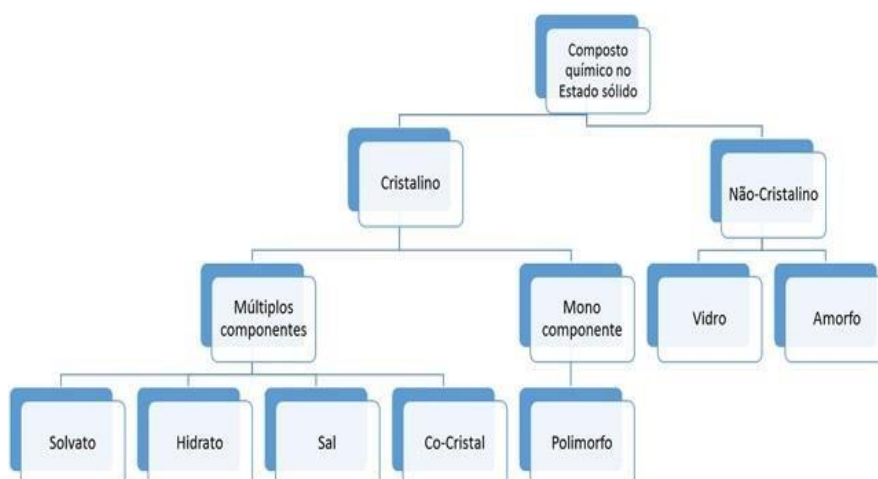


Figura 1 - Esquemática dos vários tipos de formas sólidas.

Fonte: adaptado pela autora a partir de ARAÚJO et al., 2012.

A possibilidade de ocorrer estas modificações no cristal do IFA deve ser levada em consideração na fabricação de medicamentos, pois podem ocorrer alterações no estado sólido das substâncias ativas, dependendo das suas características, dos adjuvantes e método de fabricação empregado (ARAÚJO et al, 2012). Alguns exemplos de etapas da produção de formas farmacêuticas sólidas que podem induzir a transições de fases sólidas incluem: redução do tamanho de partícula, granulação, secagem, compressão, revestimento, entre outras (ARAÚJO et al, 2012).

Considerando que o polimorfismo pode resultar em diferentes propriedades físicas e químicas, é muito provável que as formas sólidas de IFAs exibam diferenças, dentre as quais podemos citar: compressibilidade, dureza, fluxo de pó, condutividade, densidade, higroscopicidade, índice de refração, cor, morfologia das partículas, entalpia e entropia, capacidade calorífica, temperaturas de fusão e ebulição, pressão de vapor, estabilidade, solubilidade e taxa de dissolução (SANTOS, 2013). Seus diferentes efeitos nos fármacos sólidos são explicados pelas diferentes ligações intermoleculares existentes. Essas ligações de natureza não covalente, tais como ligações de hidrogênio, van der Waals, ligações π - π e interações eletrostáticas, determinam o arranjo das moléculas em um cristal (SOWA; S'LEPOKURA; MATCZAK-JON, 2013). As moléculas de fármacos são geradas por átomos conectados por ligações covalentes, já os cristais desses fármacos são formados por moléculas conectadas através de interações intermoleculares. Assim, a escolha incorreta da forma utilizada ou a transição de fase pode afetar a eficácia, estabilidade, biodisponibilidade e a segurança dos medicamentos (SILVA et al., 2015).

Sabe-se que, entre as propriedades físico-químicas afetadas pelo polimorfismo ou diferentes compostos sólidos, a solubilidade se destaca e, por sua vez, é uma característica que afeta criticamente a absorção do fármaco de preparações farmacêuticas sólidas. Isto é especialmente verdadeiro nos IFAs de baixa solubilidade e alta permeabilidade, da classe II conforme a Classificação Biofarmacêutica (AMIDON et al 1995, TSRL, 2012).

Por outro lado, temos que diferentes fases sólidas podem alterar as propriedades farmacotécnicas e farmacológicas do medicamento, e caso a forma empregada não seja identificada, pode-se fabricar um produto sem eficácia clínica ou até mesmo tóxico devido à alteração na liberação do IFA da forma farmacêutica e na sua biodisponibilidade.

Reconhecendo que os processos de manipulação e produção industrial de medicamentos podem induzir transformações de fases sólidas, o controle de qualidade deve ser aplicado nos IFAs e também nos produtos farmacêuticos acabados. Na obtenção de um IFA, a forma sólida preferida é a mais estável, embora nem sempre seja a forma farmacológica ideal (THAKUR et al., 2012). Assim, a agência de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA, 2007) sugere uma sequência de procedimentos para monitorar e controlar o problema do polimorfismo e/ou diferentes compostos sólidos e seu impacto na qualidade de medicamentos para quem pretende fabricar e comercializar produtos farmacêuticos.

Até o momento não existe um sistema de convenção internacional para a nomenclatura de polimorfos. Os numerais romanos (I, II, III, etc.) são os mais frequentemente utilizados, precedidos da palavra forma ou polimorfo (ex: forma I ou polimorfo I) para designar as diferentes formas cristalinas. Também pode ser encontrada na literatura a utilização do alfabeto latino (formas A, B, C, etc.) ou o alfabeto grego (α, β , etc.) (ARAUJO et al., 2012).

3.2 MÉTODO ANALÍTICO

A forma farmacêutica cápsula surgiu em uma vertente para facilitar o acesso da população ao medicamento manipulado e possui vantagens considerando fatores econômicos e operacionais em relação ao uso da forma farmacêutica comprimido. Como alternativa aos medicamentos industrializados os produtos manipulados vêm crescendo cada vez mais no Brasil uma vez que este medicamento é individualizado e de custo reduzido (OLIVEIRA et al., 2014).

A implantação de sistemas da qualidade no segmento magistral tem sido apontada como fator de sobrevivência da empresa decorrente do aumento da demanda por medicamentos manipulados, da necessidade de atender consumidores cada vez mais exigentes, do crescimento da competição comercial e da necessidade de adequação à legislação, tornando possível a detecção de possíveis não conformidades e implantação de medidas corretivas (OLIVEIRA et al., 2014).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a RDC 67/07, uma revisão da RDC 33/00, estabelecendo critérios mais rígidos para a manipulação de medicamentos. A partir de 21 de novembro de 2008, a RDC 67/07 foi modificada parcialmente pela RDC 87/08 (BRASIL, 2007; BRASIL, 2008) e para garantir a eficácia, segurança e a credibilidade aos medicamentos dispensados, o controle de qualidade realizado em farmácias magistrais de medicamentos alopáticos e homeopáticos é de suma importância e deve atender à legislação vigente.

Em compêndios oficiais, estão registradas apenas as monografias para espirolactona como IFA e forma farmacêutica comprimido (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2011; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008; F. BRAS., 2010; UNITED, 2015). Assim, o

desenvolvimento e validação de teste de dissolução e estudo de estabilidade para espirolactona na forma farmacêutica cápsula, se constitui de fundamental importância, visando à aplicação na rotina de laboratórios de controle de qualidade.

Os desvios da qualidade de medicamentos estão relacionados principalmente com: (1) o teor de ativo que, em excesso, pode levar a óbito e, em quantidade insuficiente, à ineficácia terapêutica, (2) a qualidade da matéria-prima, que depende de suas características físicas e físico-químicas especificadas, (3) a heterogeneidade de conteúdo, dependendo da formulação e processo de fabricação do medicamento (FERNANDES, 2015).

No desenvolvimento de um novo método analítico deve ser considerados diversos fatores, tais como: detecção e separação de todos os compostos de interesse, tempo de análise, necessidade de pré-tratamento da amostra e custo. Além disso, o método deve ser confiável, apresentando resultados exatos e reprodutíveis, o que é verificado através da validação (VALENTINI; SOMMER; MATIOLI, 2007).

A resolução (RE nº 899, de 29/05/2003) determina que a validação deva garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade (seletividade), linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e detecção e exatidão adequados à análise (BRASIL, 2003). Esses parâmetros são também descritos em outros guias como FDA (FDA, 1997), ICH (ICH, 2005) e USP (UNITED, 2015).

Os testes rotineiros de controle de qualidade que podem distinguir diferentes compostos sólidos são espectroscopia no infravermelho, espectroscopia Raman, análises térmicas (Calorimetria exploratória diferencial e Termogravimetria), difratometria de Raios X por pó e estudos de dissolução (SILVA; IHA, 2010). Neste contexto, pesquisadores da área de ciências farmacêuticas devem se atentar para novos desafios relacionados ao estudo de fases sólidas em fármacos.

3.3 TESTES DE CONTROLE DE QUALIDADE

Segue abaixo os testes de controle de qualidade realizados no trabalho.

3.3.1 Difração de Raios X por pó (DRXP)

A análise de matérias-primas por este método é o mais amplamente usado para exame preliminar de materiais policristalinos, permitindo a identificação, através da busca nos bancos de dados, da presença de até sete fases diferentes na amostra. Por essa razão, este é o primeiro exame a ser realizado para a identificação de polimorfos (SILVA; IHA, 2010).

3.3.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

A espectroscopia de estado sólido na região do infravermelho tornou-se parte integral das técnicas físicas de caracterização de sólidos farmacêuticos. A aplicação desta técnica permite a obtenção de espectros, os quais têm sua estrutura fundamentada nos modos vibracionais das moléculas. Estes espectros são impressões digitais das formas sólidas, oferecendo informações sobre a estrutura e conformação molecular do sólido (SILVA; IHA, 2010).

3.3.3 Análises térmicas

As técnicas de análise térmica, como a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e a Análise Termogravimétrica (TG), distinguem estruturas sólidas, baseando-se nas suas transições de fase durante o aquecimento, podendo ser usadas para obtenção de informações adicionais como ponto de fusão, dessolvatação, cristalização e transição vítrea (SILVA; IHA, 2010).

3.3.4 Ensaios de dissolução

Ensaios de dissolução *in vitro* são importantes ferramentas para avaliação da qualidade de medicamentos uma vez que orientam o desenvolvimento de novas formulações, monitoram variações lote a lote, asseguram a manutenção da qualidade e desempenho de um produto após certas mudanças, suportam a biodisponibilidade de um novo produto e a bioequivalência de um candidato a genérico ou similar. Qualquer falha no processo produtivo de medicamentos pode traduzir em risco para o paciente, podendo evoluir desde a ineficácia, à toxicidade ou, eventualmente, à morte (ARAÚJO et al., 2012).

3.4 ESPIRONOLACTONA

A espironolactona (7α -acetiltio-3-oxo-pregn-17 α -4-eno-21,17-carbolactona), apresentada na Figura 2, é um esteróide sintético, diurético, usado no tratamento de várias doenças, tais como cirrose, aldosteronismo e hipertensão (DONG et al., 2009; ZHANG et al., 2014). O IFA é comercializado por laboratórios farmacêuticos em diversas dosagens (25 mg, 50 mg e 100 mg) e apresentações e, frequentemente, manipulado por farmácias na forma farmacêutica cápsula.

A literatura reporta para espironolactona as formas cristalinas I e II (AGAFONOV; LEGENDRE; RODIER, 1989; DIDEBERG, DUPONT, 1972) e dessas, a forma II é a mais estável e a comercializada (NICOLAI et al; 2007; ZHANG et al., 2014). Há relatos, também, da existência de cinco solvatos (metanol, etanol, acetonitrila, acetato de etila e benzeno) de espironolactona para estudos de recristalização (NEVILLE; BECKSTEAD; COONEY, 1994; ZHANG et al., 2014).

A espironolactona é um IFA de baixa solubilidade e alta permeabilidade, pertencente à classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (AMIDON et al., 1995; TSRL, 2012). De acordo com a Farmacopeia Brasileira, o ativo é praticamente insolúvel em água,

pouco solúvel em metanol, solúvel em acetato de etila e etanol absoluto e facilmente solúvel em benzeno e clorofórmio (F. BRAS., 2010).

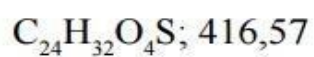
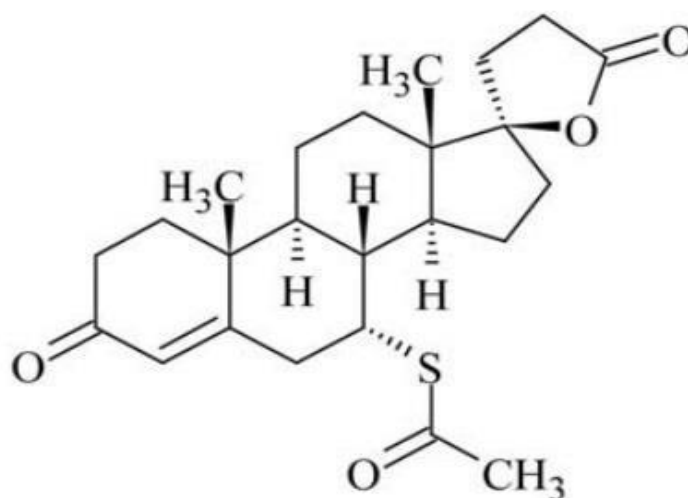


Figura 2 – Fórmula estrutural da espironolactona.
Fonte: F. BRAS., 2010.

A literatura cita estas diferentes formas sólidas para espironolactona, no entanto não foram encontrados estudos de liberação e estabilidade a fim de demonstrar o comportamento na forma farmacêutica cápsulas.

4 PARTE EXPERIMENTAL

Abaixo se encontra listada a metodologia utilizada neste trabalho.

4.1 EQUIPAMENTOS E REAGENTES

Segue abaixo os equipamentos e reagentes utilizados no trabalho.

4.1.1 Equipamentos

- a) Aparelho de ultrassom Unique, modelo USC 2800 A (Indaiatuba, SP, Brasil);
- b) Balança analítica Marte®, modelo AY 220 (São Paulo, SP, Brasil);
- c) Bomba de vácuo Nova técnica, modelo NT 613 (Diadema, SP, Brasil);
- d) Calorímetro SII Nano Technology ®, modelo DSC EXSTAR X-7020 (Tóquio, Japão) / Termobalança SII Nano Technology ® modelo TG/DTA EXSTAR -7300 (Tóquio, Japão);
- e) Coluna cromatográfica: C18 (150 mm x 3,9 mm, tamanho de partícula de 5 µm) Agilent Technologies (Holanda);
- f) Cromatógrafo a líquido Shimadzu®, série LC-10A (Quioto, Japão), com injetor manual 7725i e alça de amostragem de 20 µL (Rheodyne®, Rohnert Park, Califórnia, EUA), detector SPD-10AVP (Quioto, Japão), válvula FCV10ALVP (Quioto, Japão), forno de coluna CTO-10AVP (Quioto, Japão) e controlador SCL-10Avp (Quioto, Japão);

- g) Desintegrador Nova Ética, modelo 3013 (Vargem Grande Paulista, SP, Brasil);
- h) Difratorômetro de Raios X de pó Rigaku® modelo Ultima IV (tipo II) (Rigaku Co.Ltd., Tóquio, Japão);
- i) Dissolutor Electrolab ® modelo TDT-08 L (n=8) (Mumbai, Maharashtra, Índia), com *sinkers*;
- j) Espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier Shimadzu ®, modelo Affinity-1 (Shimadzu ®, Tóquio, Japão) acoplado a acessório de amostragem por refletância total atenuada Pike Miracle ® com cristais de ZnSe Pike Technologies ® (Madison, Wisconsin, USA);
- k) Estufa Quimis, modelo Q317M-42 (Diadema, SP, Brasil);
- l) Mesa agitadora Solab ® modelo SL 180 DT (Piracicaba, SP, Brasil);
- m) Peagômetro digital Del lab, modelo DLA-PH (Araraquara, SP, Brasil);
- n) Sistema de purificação de água Millipore®, modelo Direct-Q® 5 (São Paulo, Brasil).

4.1.2 Reagentes e Amostras

- a) Água ultra-pura, sistema Millipore Milli-Q;
- b) Ácido acético glacial, Synth (Diadema, SP, Brasil);
- c) Acetonitrila grau cromatográfico, Panreac (Barcelona, Espanha);
- d) Acetato de sódio; Ácido clorídrico grau P.A, Exôdo Científica (Hortolândia, SP, Brasil);
- e) Fosfato de potássio monobásico, Cinética (Jandira, SP, Brasil);
- f) Hidróxido de sódio grau P.A, Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil);
- g) Lauril sulfato de sódio, Proquímios (Bangu, RJ, Brasil);

- h) Cápsulas de espironolactona 100 mg, forma II e forma recristalizada, manipuladas em farmácia local.

4.2 AMOSTRAGEM

Para amostragem inicial foram pré-selecionados os IFAs padrão secundário e matériaprima, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados do padrão e matéria-prima utilizados no estudo

Amostra	Fornecedor/Fabricante	Validade	Lote/Teor (%)
Espironolactona Padrão Secundário	GALENA	10/2018	102,4
Espironolactona Matéria-prima	GALENA	09/2019	SP140901/99,16

Fonte: do autor.

4.3 RECRISTALIZAÇÃO DAS FORMAS SÓLIDAS

No processo de recristalização selecionado para o estudo, dissolveram-se cerca de 800 mg de espironolactona em 7 mL de acetato de etila, formando uma solução saturada. A solução foi filtrada e mantida em repouso à temperatura ambiente (25°C) para evaporação lenta e obtenção de cristais (BERBENNI et al., 1999).

Para que o tamanho das partículas da matéria-prima se tornassem uniformes, os cristais obtidos foram tamisados e coletados na faixa de 150 e 200 mesh.

Com o objetivo de verificar a perda do solvente da amostra, a amostra final permaneceu por um período de 24 horas em estufa à 100°C, temperatura superior ao ponto de ebulição do acetato de etila.

4.4 ANÁLISES TÉRMICAS

Para execução destas análises, pequenas quantidades (5 a 10 mg) das matérias-primas pré-selecionadas foram utilizadas nos experimentos, em cadinhos de alumínio herméticos para o DSC e em cadinho de alumínio aberto para o TG, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min⁻¹) com um fluxo de calor de 10°C min⁻¹ a uma faixa de variação de temperatura de aproximadamente 20 a 300°C e de 30 a 400°C para o DSC e TG respectivamente. O instrumento foi calibrado com um padrão de índio (In) para a temperatura e um peso de calibração de alumina para a massa. As análises foram realizadas em parceria com o Instituto de Química da UNIFAL-MG.

4.5 ANÁLISES DE MATÉRIAS-PRIMAS POR DRXP

Para as análises de difração de Raios X por pó, as matérias-primas foram pulverizadas e montadas sobre um suporte de amostra a ser exposta ao feixe de Raios X e, após, comparadas com o padrão simulado para forma II de espirolactona.

As análises foram realizadas nas seguintes condições: radiação monocromática em tubo selado de grafite por filtro de Cu ($K\alpha$ Cu, $\lambda = 1,54187 \text{ \AA}$), varreduras no intervalo de 3 a 35° 2 θ , a temperatura ambiente, com passo óptico de 0,05 em 2 θ , corrente de 30 mA, tensão de 40 kV, velocidade de varredura de 0,2° 2 θ /min para Padrão Secundário e Matéria-prima estudada e posterior recristalizada. As análises foram realizadas em parceria com o Laboratório de Cristalografia da UNIFAL-MG.

4.6 ANÁLISES DE MATÉRIAS-PRIMAS POR IV-RTA

As análises foram realizadas utilizando um espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier, acoplado a um acessório de refletância total atenuada. Os dados foram coletados a temperatura ambiente, na região do infravermelho entre 3500-400 cm^{-1} , sendo que as amostras não necessitam de preparo inicial. As especificações das medidas são: modo transmitância, 32 varreduras por análise e resolução de 4,0 cm^{-1} .

4.7 ESTUDOS DE SOLUBILIDADE

Os testes de solubilidade das formas sólidas foram realizados pelo método de equilíbrio, empregando a técnica *shake-flask*. Para a realização deste ensaio, observando a saturação em todas amostras, um excesso dos sólidos foi adicionado em tubos tipo eppendorf, a 1 mL dos solventes água ultrapura, HCl 0,1 M, tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,5, tampão fosfato de potássio 0,07 M pH 6,8 e tampão acetato 0,05 M pH 4,5 adicionado de diferentes concentrações de lauril sulfato de sódio (LSS). Posteriormente, as soluções foram agitadas, à temperatura ambiente, por 48 horas e quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (F. BRAS., 2010). Os resultados foram comparados estatisticamente, utilizando o teste t-Student ao nível de significância de 5%.

4.8 PREPARO DE CÁPSULAS

Foram preparadas formulações na forma farmacêutica cápsula, nas mesmas dosagens dos produtos comercializados no mercado (100 mg). Dois lotes foram preparados: Lote 1

(contendo forma II, matéria-prima inicial) e Lote 2 (contendo a forma solvatada, produzida pelo processo de recristalização encontrado no item 4.3), manipulados em farmácia magistral local. Na Tabela 2 são identificados os adjuvantes utilizados na preparação do placebo das cápsulas manipuladas com os diferentes compostos sólidos.

Tabela 2 - Adjuvantes utilizados no preparo das cápsulas de espironolactona (100 mg), cápsulas com peso médio de aproximadamente 210 mg

Excipientes	Teor (%)
LSS	1,5
Talco	3
Lactose	Qsp

Fonte: do autor.

4.9 CONTROLE DE QUALIDADE DAS CÁPSULAS

O controle de qualidade das cápsulas manipuladas, contendo os dois compostos estudados, abrangeu a análise do aspecto (cor, superfície e integridade), peso médio, desintegração, identificação, teor, uniformidade de doses unitárias e dissolução.

Para o teste de peso médio, obedeceu-se aos critérios estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira (F. BRAS., 2010), realizando-se a pesagem individual do conteúdo de 20 unidades de cápsulas dos produtos avaliados. O limite de variação aceito é de 10 % para formas farmacêuticas com peso menor que 300 mg.

O teste de desintegração obedeceu aos critérios estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira (F. BRAS., 2010). Foram utilizadas seis unidades de cápsulas de cada lote nas seguintes condições: meio aquoso, temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e tempo de 45 minutos.

A identificação do princípio ativo espironolactona foi realizada pela comparação do tempo de retenção do pico principal obtido com o padrão com o tempo de retenção obtido com a amostra, no ensaio de doseamento.

Para o teor do fármaco, a partir do conteúdo removido das cápsulas das formulações na determinação do peso médio, foi realizada uma pesagem com a massa de interesse referente a 100 mg de espironolactona de cada formulação. As massas foram transferidas para balões volumétricos de 50 mL e diluídas para balão de 25 mL com diluente acetonitrila:água (50:50, v/v), obtendo-se a concentração final de 12,5 µg/mL. O limite de aceitação adotado de 90,0% a 105,0% do valor rotulado foi baseado na especificação adotada para a forma farmacêutica comprimido (UNITED, 2015).

A uniformidade de doses unitárias foi realizada pelo método de variação de peso, pois as cápsulas gelatinosas continham mais de 25 mg de fármaco e este representava mais que 25% do peso total da cápsula (F. BRAS., 2010).

O perfil de dissolução das cápsulas foi realizado de acordo com método desenvolvido e validado, demonstrado nos itens 4.10 e 4.11.

4.10 DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO DE DISSOLUÇÃO

Segue abaixo o desenvolvimento do método para ensaio de dissolução.

4.10.1 Meios de dissolução utilizados

Os meios de dissolução utilizados neste estudo foram água, ácido clorídrico 0,1 M, tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,5, tampão fosfato de potássio 0,07 M pH 6,8, tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,5, acrescido de diferentes concentrações de LSS 0,1%, 0,25 %

e 0,5% (m/v). Estes foram aquecidos a 41°C e levados ao banho de ultrassom, por 20 minutos, para degaseificação.

4.10.2 Preparo da solução padrão

Para o preparo da solução estoque padrão de trabalho pesou-se 25,0 mg de espironolactona e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL, acrescentou-se cerca de 5 mL de diluente água:acetonitrila (50:50, v/v) para dissolução do fármaco e levou-se ao banho de ultrassom por 5 minutos. Após, completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo-se a concentração de 500 µg/mL, a qual foi filtrada. Em seguida, transferiu-se alíquota de 0,625 mL para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo-se uma solução padrão na concentração de 12,5 µg/mL, utilizada nas análises por cromatografia líquida de alta eficiência.

4.10.3 Preparo das soluções amostras

As soluções amostras foram preparadas colocando-se uma cápsula contendo 100 mg de espironolactona em cada cuba (n = 6) contendo meio de dissolução (1000 mL) a 37 °C. As amostras foram coletadas ao fim do tempo especificado e filtradas. Em seguida, transferiu-se alíquota de 1,25 mL para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com o diluente água:acetonitrila (50:50, v/v), obtendo uma concentração final de 12,5 µg/mL.

4.10.4 Desenvolvimento do ensaio

No desenvolvimento do ensaio de dissolução foram avaliadas as condições de pH do meio de dissolução, observando a capacidade de manter as condições *sink*, tipos de aparatos para agitação do meio e velocidade de agitação, conforme recomendado na legislação (UNITED, 2015). Assim, foram definidas as condições a serem empregadas no estudo de dissolução das cápsulas.

A quantificação foi realizada por CLAE com as seguintes condições: temperatura ambiente; coluna C18 (150 mm x 3,9 mm, 5 μ m); fase móvel constituída por acetonitrila:água (60:40, v/v), filtrada em membrana filtrante de 0,45 μ m (Millipore) e degaseificada em banho de ultrassom, por vinte minutos; vazão de 0,8 mL/min; volume de injeção de 20 μ L e comprimento de onda de 230 nm.

A condição *sink* foi assegurada a partir do conhecimento dos resultados do estudo de solubilidade, sendo definido que, para seu atendimento, há a necessidade de utilização de volume do meio de dissolução de, pelo menos, três vezes o volume necessário para formar uma solução saturada do fármaco.

Após definição do pH do meio de dissolução a ser utilizado (4,5) para cápsulas contendo a forma II comercializada, acrescentou-se diferentes concentrações de LSS (0,1%, 0,25% e 0,5%) (m/v) ao meio, com intuito de se obter o mínimo preconizado de dissolução das cápsulas. Inicialmente, para definição da melhor concentração de LSS a ser utilizada, fixou-se as outras condições: aparato cesta e velocidade de agitação de 100 rpm. Depois, utilizando tampão acetato de sódio pH 4,5 0,05 M acrescido de 0,5% (m/v) de LSS como meio de dissolução, foi verificada a influência da velocidade de rotação da cesta (50, 75 e 100 rpm) sobre a liberação de espirolactona da cápsula. Por fim, comparou-se o desempenho dos aparatos, testando pá (50, 75 e 100 rpm) sobre a liberação de espirolactona no meio escolhido. Quando o aparato pá foi testado, uma hélice de arame (*sinker*) foi usada em volta das cápsulas, para evitar flutuação das mesmas, conforme recomendado pela USP (UNITED, 2015).

Um volume de 1000 mL de meio foi usado nas cubas e a temperatura de estabilização do ensaio foi de $37,0 \pm 0,5^\circ$ C. Amostras de 5 mL foram retiradas do meio de dissolução nos tempos de 3, 6, 10, 15, 30 e 60 minutos, seguido por reposição imediata de meio, na mesma temperatura. As amostras foram analisadas por CLAE e os resultados analíticos foram utilizados para a aquisição dos perfis de dissolução. Seis cápsulas foram analisadas em cada ensaio.

4.11 VALIDAÇÃO DO ENSAIO DE DISSOLUÇÃO

O ensaio de dissolução e o método de quantificação foram validados pela avaliação dos parâmetros seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação, robustez e estabilidade segundo critérios da USP (UNITED, 2015), ICH (ICH, 2005) e ANVISA (BRASIL, 2003).

Para a determinação da seletividade, amostras de placebo e cápsula vazia foram submetidas às condições do ensaio de dissolução. Ao final do tempo do ensaio, frações foram recolhidas, filtradas, diluídas seguindo o mesmo procedimento utilizado para as cápsulas. Avaliou-se a ausência de interferência dessas amostras na quantificação da espironolactona, bem como do diluente e meio de dissolução.

A linearidade foi avaliada por análise de regressão de soluções padrão de espironolactona, preparadas em sete concentrações variando entre 5-120% da concentração de trabalho do método (0,625; 1,25; 2,5; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 µg/mL), preparadas em diluente acetonitrila:água (50:50, v/v) e em triplicata. A equação de calibração e o coeficiente de correlação linear foram obtidos e calculados. Os critérios de admissão foram o coeficiente de correlação de 0,99 ou superior e um desvio-padrão relativo (D.P.R) de cada ponto ($n = 3$) menor do que 2% (BRASIL, 2003, UNITED, 2015).

A precisão foi avaliada através do ensaio de repetibilidade efetuando-se seis determinações de solução na concentração de trabalho do método (100%). Preparou-se uma solução-estoque de espironolactona na concentração de 25000 µg/mL em acetonitrila:água (50:50, v/v). Transferiu-se 4 mL desta solução e quantidade de placebo equivalente a uma cápsula (107,5 mg), obtendo-se concentração de 100 µg/mL na cuba. Frações foram recolhidas, filtradas, diluídas até concentração de 12,5 µg/mL (100%) e avaliadas por CLAE. A precisão interdia também foi avaliada, realizando o mesmo procedimento em dia e por analistas diferentes. O critério de aceitação foi D.P.R. inferior a 5,0 % (BRASIL, 2003, UNITED, 2015). Adicionalmente, aplicou-se o teste t-Student para comprovação da diferença não significativa entre os ensaios ($p = 0,05$).

A exatidão foi avaliada através de um ensaio de recuperação utilizando quantidades conhecidas de substância referência espironolactona adicionadas ao placebo. Uma solução

estoque, contendo 10000 µg/mL de espironolactona padrão, foi preparada em diluente contendo acetonitrila:água (50:50, v/v). Alíquotas de 2,0 mL, 10 mL e 12 mL desta solução foram adicionadas às cubas contendo 1000 mL do meio de dissolução. Amostras de placebo proporcionais a cada concentração, 21,5 mg (20%), 107,5 mg (100%) e 129,0 mg (120%), foram também adicionadas às cubas. As amostras foram submetidas às condições do ensaio. Após, alíquotas foram recolhidas, filtradas e diluídas até concentrações finais de 2,5, 12,5 e 15 µg/mL, correspondendo a 20, 100 e 120% da concentração de trabalho do método, respectivamente, e analisadas por CLAE. Estes estudos foram realizados em triplicata. As recuperações percentuais foram calculadas de acordo com a Eq. (1):

$$R \% = (C \text{ média experimental}) / (C \text{ teórica}) \times 100 \quad (1)$$

em que C média experimental é a concentração da amostra obtida, a partir do método proposto, em cada nível de concentração e C teórica é a concentração teórica em cada nível de concentração. O critério de aceitação de recuperação utilizado foi de 95,0 a 105,0% (BRASIL, 2003; UNITED, 2015).

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram obtidos a partir das seguintes equações Eq. (2) e a Eq. (3):

$$LD = (DP \times 3) / IC \quad (2)$$

$$LQ = (DP \times 10) / IC \quad (3)$$

em que DP é o desvio padrão do intercepto e IC é a inclinação média, das três curvas analíticas no estudo da linearidade (ICH, 2005).

A robustez foi avaliada através da variação de seis parâmetros do método de dissolução. A concentração de espironolactona na amostra foi calculada para cada caso, comparando com as áreas dos picos obtidos a partir da solução padrão, no mesmo nível de concentração. Os fatores variados foram: velocidade de agitação, degaseificação do meio de

dissolução, filtração da amostra, tempo de teste de dissolução, composição e vazão da fase móvel. As análises foram realizadas em triplicata e o teste t-Student foi utilizado para determinar se as variações produziram alterações significativas nos resultados ($p = 0,05$). Salienta-se que este parâmetro não é preconizado pelas agências regulatórias para validação de ensaios de dissolução, entretanto, optou-se por realizá-lo para conhecimento dos fatores cruciais do método.

Avaliou-se, também, a estabilidade das soluções submetidas ao ensaio de dissolução. Soluções padrão de espironolactona, na concentração de $12,5 \mu\text{g/mL}$, foram preparadas em triplicata, filtradas e imediatamente injetadas no sistema de CLAE (tempo zero). As mesmas soluções foram mantidas a temperatura ambiente durante 24 horas e avaliadas novamente. Para avaliar a estabilidade das amostras de espironolactona em cápsulas, três amostras foram submetidas às condições do método. Após, frações foram recolhidas, filtradas e diluídas para concentração $12,5 \mu\text{g/mL}$ e imediatamente analisadas por CLAE (tempo zero). As soluções foram mantidas por 2 horas a temperatura ambiente e novamente analisadas. O critério de aceitação adotado foi uma resposta analítica, após 24 horas (padrão) e 2 horas (amostra), entre 98% e 102% do valor obtido no tempo zero.

4.12 PERFIS DE DISSOLUÇÃO DAS FORMAS SÓLIDAS EM CÁPSULAS

As cápsulas contendo 100 mg das formas II e solvatada de espironolactona foram colocadas em seis cubas contendo 1000 mL de tampão acetato 0,05 M pH= 4,5, acrescido de 0,5% (m/v) de LSS. A sétima cuba foi preenchida com o meio de dissolução para reposição dos volumes. Em cada tempo de amostragem, alíquotas de 5 mL foram retiradas de cada cuba, filtradas e diluídas em acetonitrila:água (50:50, v/v), obtendo-se a mesma concentração do padrão de trabalho ($12,5 \mu\text{g/mL}$). Após cada coleta, igual volume de meio de dissolução foi imediatamente repostado, evitando, assim, oscilações de volume na cuba. Essas reposições foram descontadas nos cálculos finais de porcentagem de liberação.

A semelhança dos perfis de dissolução foi então determinada pelo fator de diferença (F1) e fator de semelhança (F2), calculados a partir da Eq. 4 e da eq. 5, como segue:

$$F1 = \{[\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|]\} / \{[\sum_{t=1}^n R_t]\} \times 100 \quad (4)$$

$$F2 = 50 \times \log \{[(1 + 1/n) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2]^{-0.5} \times 100\} \quad (5)$$

em que: R_t é a percentagem do fármaco referência dissolvido em cada ponto, T_t é a percentagem de produto teste dissolvido em cada ponto e n é o número de pontos de amostragem (SILVA et al., 2015).

Para as curvas serem consideradas semelhantes, valores de F1 devem ser perto de 0, e os valores de F2 devem ser perto de 100. Geralmente, os valores de F1 até 15 (0-15) e os valores de F2 superior a 50 (50-100) asseguram equivalência das duas curvas (FDA, 1997).

4.13 ESTUDO DE ESTABILIDADE

Os estudos de estabilidade foram realizados para verificar diferenças entre os compostos estudados, sob condições definidas de temperatura.

As amostras das cápsulas, contendo as formas II e solvatada da espirolactona, foram acondicionadas em estufa microprocessadora de secagem, sem umidade, a temperatura de $50^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, por 3 meses. As cápsulas de cada composto sólido foram analisadas quanto ao teor e perfil de dissolução, nos tempos 0, 1, 2 e 3 meses.

A semelhança dos perfis de dissolução foi então determinada pelo fator de diferença (F1) e fator de semelhança (F2), calculados a partir da Eq. 4 e da eq. 5 descritas na seção anterior.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Abaixo se encontra os resultados e a discussão deste trabalho.

5.1 RECRISTALIZAÇÃO DAS FORMAS SÓLIDAS

Vários métodos de recristalização são descritos para diferenciar a forma em que a concentração do soluto é aumentada: evaporação do solvente, resfriamento, convecção, sublimação, adição de anti-solvente, entre outros.

Diversas tentativas de recristalização da espirolactona foram executadas com base nos relatos da literatura, na tentativa de obtenção da forma I e/ou na obtenção de possíveis formas solvatadas (AGAFONOV et al., 1991; BECKSTEAD; NEVILLE; SHURVELL, 1993; BERBENNI et al., 1999; DIDEBERG; DUPONT, 1972; NEVILLE; BECKSTEAD; COONEY, 1994; PISEGNA; GILSON; BUTLER, 2014).

A metodologia selecionada está descrita no item 4.3.

5.2 ANÁLISES TÉRMICAS

A Figura 3 demonstra a curva de calorimetria exploratória diferencial da matériaprima forma II e forma solvatada.

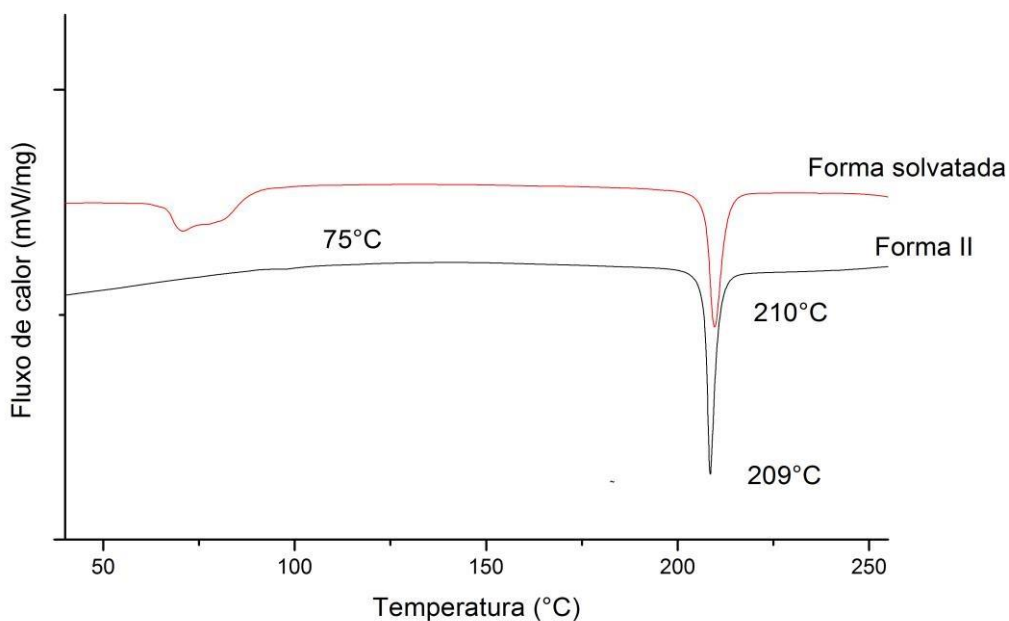


Figura 3 - Curvas de calorimetria exploratória diferencial obtidas das matérias-primas forma II e forma solvatada.

Fonte: do autor.

Na curva se observa o evento de fusão em 209°C para forma II. É possível confirmar, também, que o processo de recristalização com acetato de etila, descrito na seção 4.3, permitiu a obtenção da forma solvatada da espirolactona, pois somente formas solvatadas apresentam o evento em torno de 75°C, a qual é atribuído à perda de solvente da amostra.

Dados na literatura confirmam a perda, seguida pelo evento de fusão visualizado em torno de 210°C (AGAFONOV et al., 1991; NEVILLE, BECKSTEAD, COONEY, 1994).

A análise termogravimétrica das formas II e solvatada são demonstradas nas Figuras 4 e 5, respectivamente.

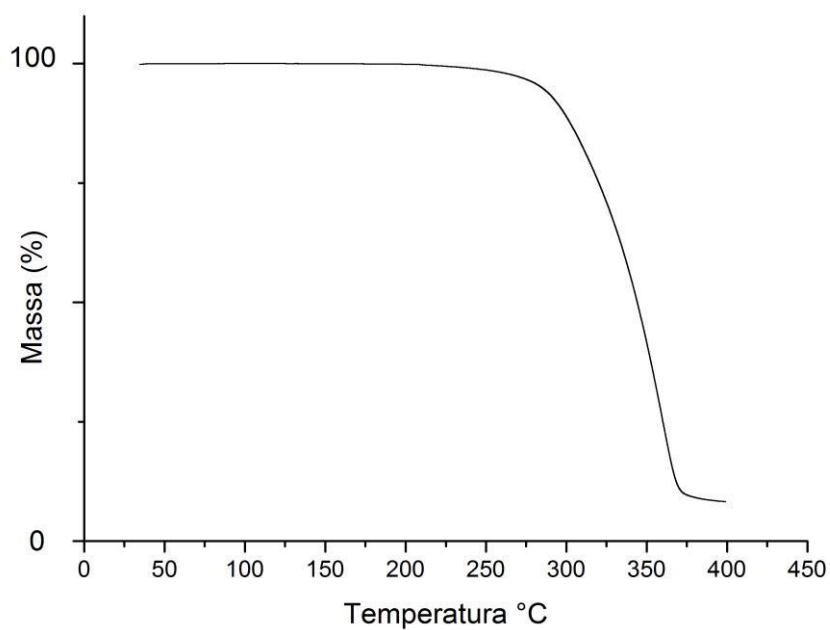


Figura 4 - Curva de termogravimetria da forma II da espironolactona, obtida a 10°C/min em N₂ navazão de 50 mL/min.

Fonte: do autor.

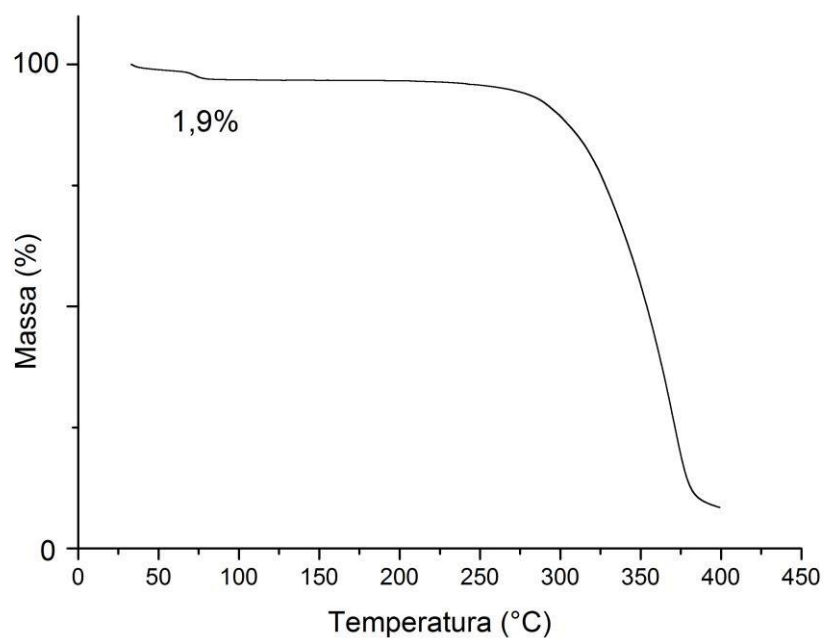


Figura 5 - Curva de termogravimetria da forma solvatada da espironolactona, obtida a 10°C/min em N₂ na vazão de 50 mL/min.

Fonte: do autor.

Através das curvas foram evidenciadas perda de massa na região de temperatura onde se observam os eventos endotérmicos na análise de calorimetria exploratória diferencial para a forma solvatada, confirmando a presença de solvente no cristal. As decomposições ocorreram nas temperaturas aproximadas de 272 e 273°C, para as formas solvatada e II, respectivamente, concordando com dados descritos na literatura (NEVILLE, BECKSTEAD, COONEY, 1994).

A perda de massa do solvente acetato de etila (1,9 %) no termograma da espironolactona forma solvatada sugere possível proporção de 1 molécula de acetato de etila para cada 11 moléculas de espironolactona. A adição do solvente na amostra de espironolactona foi realizada de forma não estequiométrica.

Com o objetivo de verificar a perda do solvente, a amostra solvatada foi dessecada à temperatura superior ao ponto de ebulição do acetato de etila, como apresentado na Figura 6. Demonstrando perfil semelhante à matéria-prima forma II, com evento de fusão em 209°C.

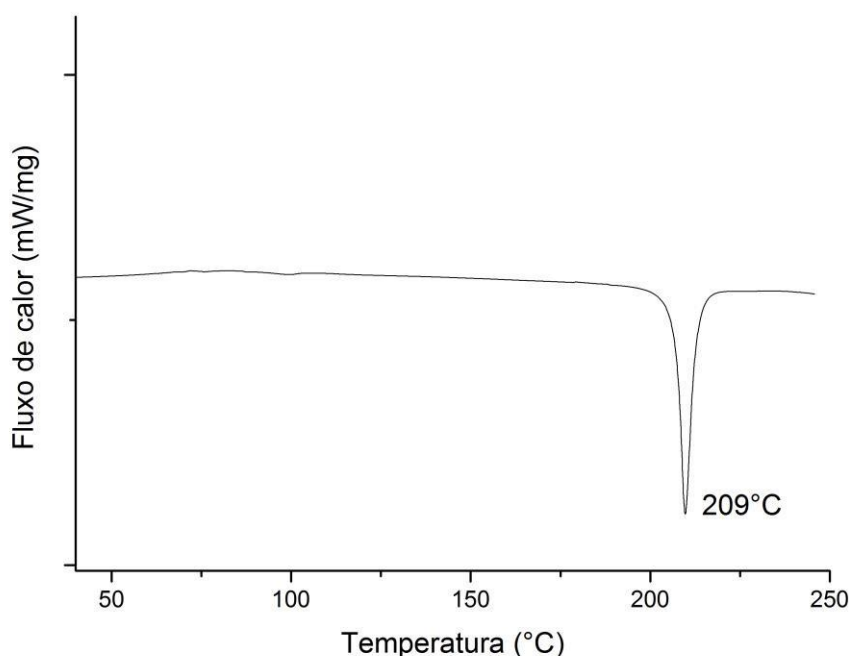


Figura 6 - Curva de calorimetria exploratória diferencial obtida da matéria-prima forma solvatada mantida em estufa à 100°C por um período de 24 horas.

Fonte: do autor.

5.3 ANÁLISES POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X POR PÓ (DRXP)

A forma II da espirolactona é a forma comercializada no mercado. As formas polimórficas I e II de espirolactona apresentam os padrões de difração de Raios X de pó demonstrados na Figura 7, de acordo com dados depositados na base de dados de estruturas cristalinas da Cambridge, o CSD (Cambridge Structural Database). Nos artigos desta base são descritos os métodos de produção das formas I e II, formas hidratadas, solvatadas (acetonitrila, tolueno e hexano), e outros compostos (AGAFONOV; LEGENDRE; RODIER, 1989; DIDEBERG; DUPONT, 1972; BIAN et al., 2013; SONI et al., 2011; AGAFONOV; LEGENDRE; RODIER, 1989; MALLAMO et al., 1992; TAKATA et al., 2010).

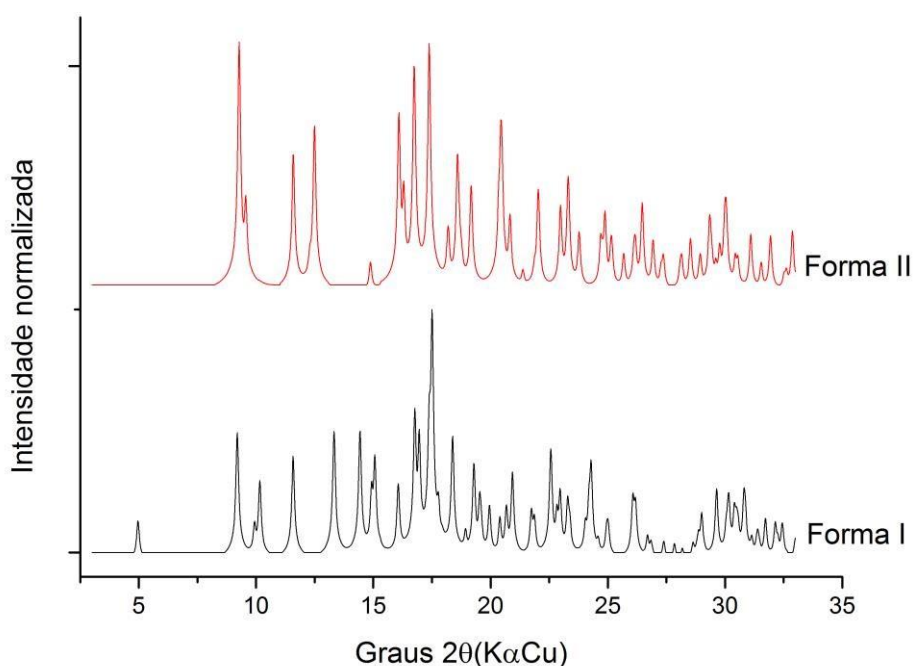


Figura 7 - Difração de Raios X por pó de espirolactona formas I e II segundo os padrões simulados no CSD (códigos: ATPRCL10 e AATPRCL01)
Fonte: (DIDEBERG; DUPONT, 1972; AGAFONOV; LEGENDRE; RODIER, 1989).

Os difratogramas experimentais do padrão de trabalho e da matéria-prima de espirolactona utilizados nas análises foram comparados com os padrões de difração das formas I e II de espirolactona, conforme apresentado na Figura 8.

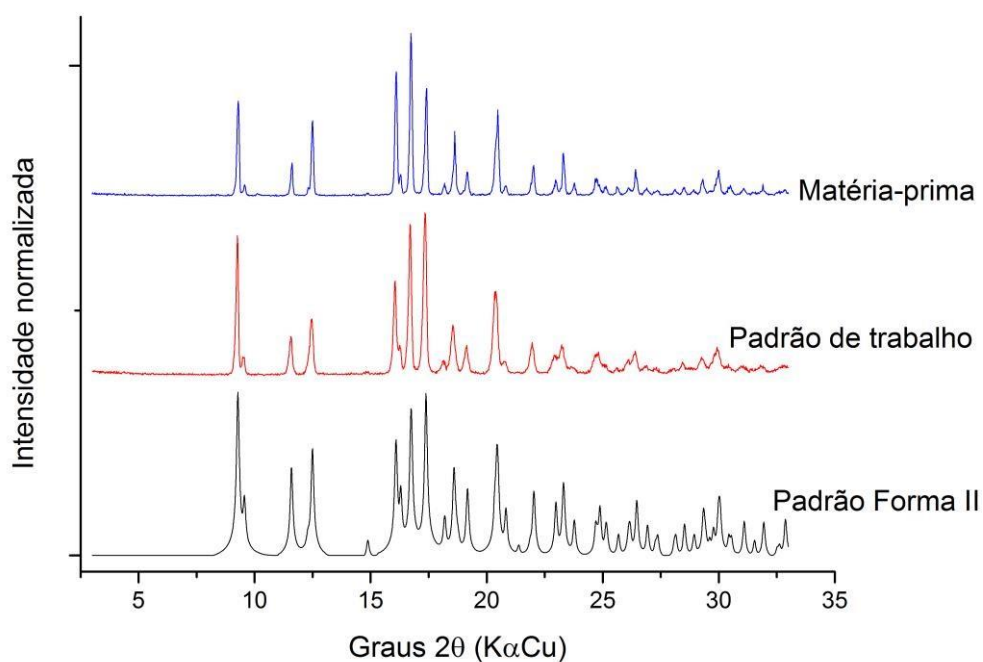


Figura 8 - Difratogramas de Raios X por pó, obtidos para espirolactona padrão simulado forma II, padrão de trabalho e matéria-prima de espirolactona utilizados nas análises.

Fonte: do autor.

A partir da análise, conforme esperado, foi possível identificar a presença do polimorfo II em ambas as amostras.

Após procedimento de recristalização da matéria-prima, não foi possível correlacionar o difratograma obtido com nenhuma das estruturas depositadas para a espirolactona, polimorfos I e II e seus solvatos, depositados no CSD, conforme apresentado na Figura 9.

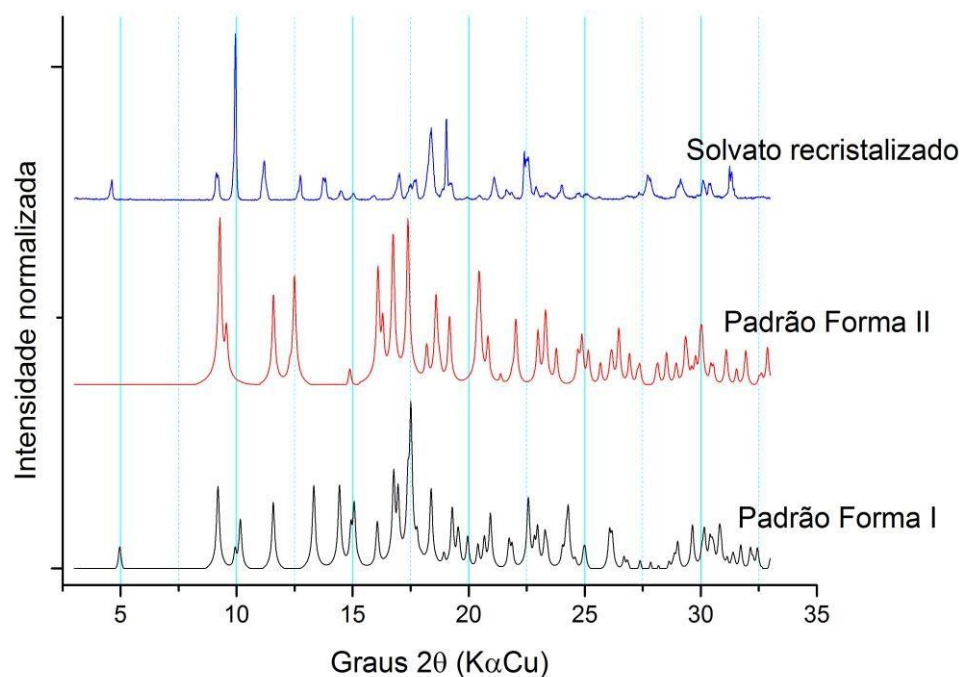


Figura 9 - Difrátogramas de Raios X por pó, obtidos para espirolactona forma solvatada recristalizada e espirolactona padrões simulados formas I e II.
Fonte: do autor.

Os difratogramas dos solvatos depositados não foram demonstrados, pois nenhum é composto pelo solvente acetato de etila, utilizado neste trabalho. Este solvato não possui estrutura cristalina elucidada, entretanto, através dos dados de análise térmica publicados na literatura, foi possível identificar a amostra recristalizada como um possível solvato de espirolactona com acetato de etila.

De acordo com o capítulo geral da USP sobre identificação de formas cristalinas por difração de Raios X por pó, as diferenças entre os ângulos de difração de uma mesma forma cristalina devem ser menores do que $0,2^\circ$ (UNITED, 2015). Na estrutura do solvato recristalizado, observou-se os picos de difração individuais, confirmando, portanto, que a forma obtida é um outro composto sólido ainda não elucidado e não uma contaminação cristalina de duas amostras.

Com o objetivo de verificar a perda de solvente, a amostra solvatada foi dessecada à temperatura superior ao ponto de ebulição do acetato de etila, como apresentado na Figura 10.

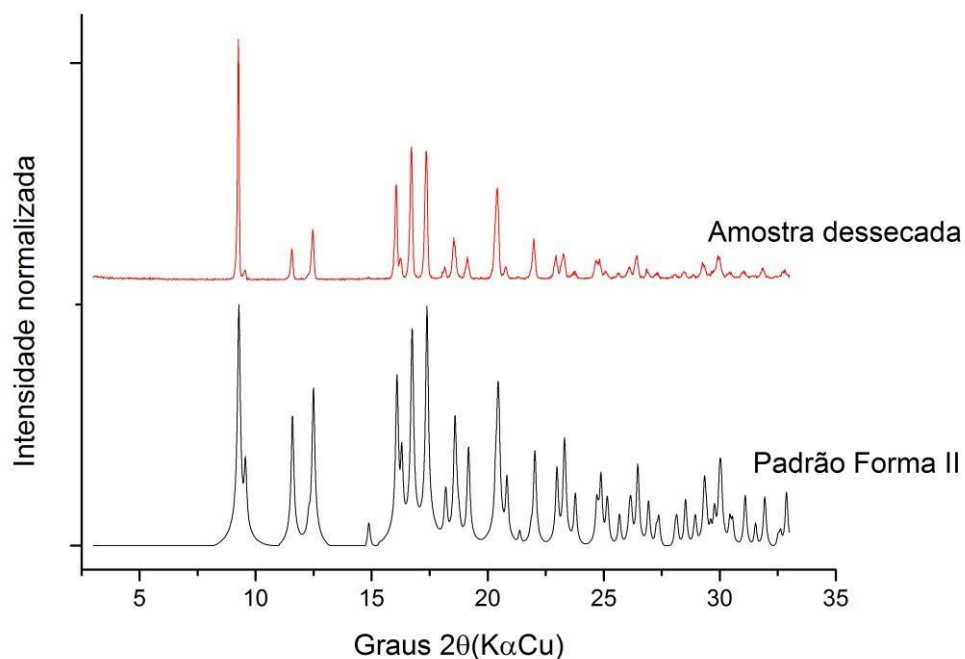


Figura 10 - Difratoograma de Raios X por pó, obtido para espironolactona forma solvatada recristalizada mantida em estufa à 100°C por um período de 24 horas.

Fonte: do autor.

O solvato de espironolactona converte-se em polimorfo de forma II sob aquecimento, indicando que o solvente não está ligado ao retículo cristalino, concordando com a literatura (FLORENCE, 2011).

5.4 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (IV-RTA)

Os resultados de espectrofotometria na região do infravermelho do padrão e das amostras forma II e solvatada foram analisados e estão descritos nas Figuras 11 e 12.

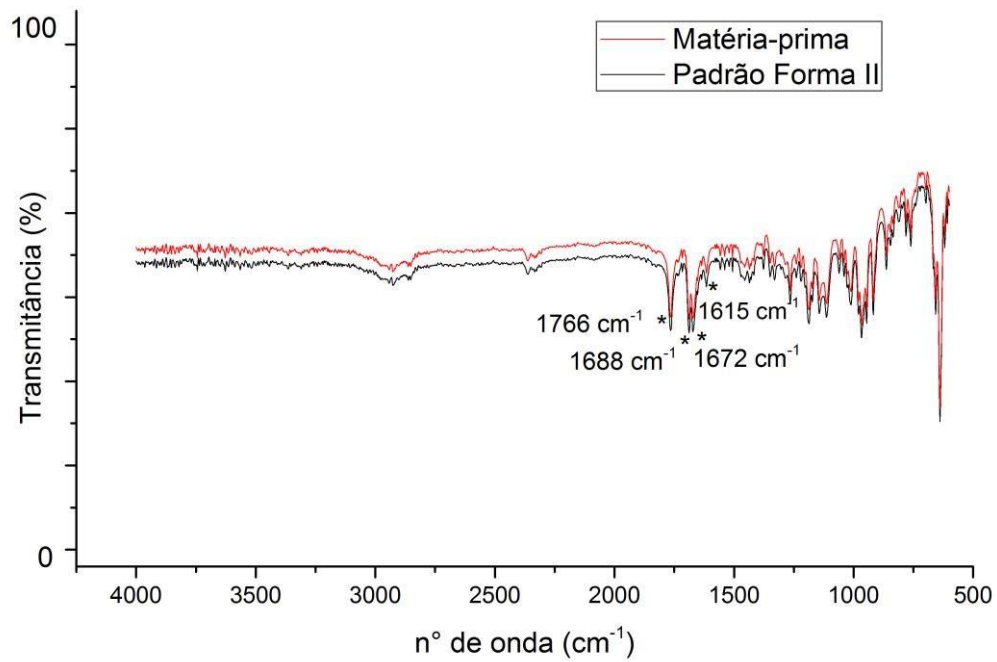


Figura 11 - Espectros de infravermelho do padrão de trabalho e da forma II de espirolactona matéria-prima de trabalho.

Fonte: do autor.

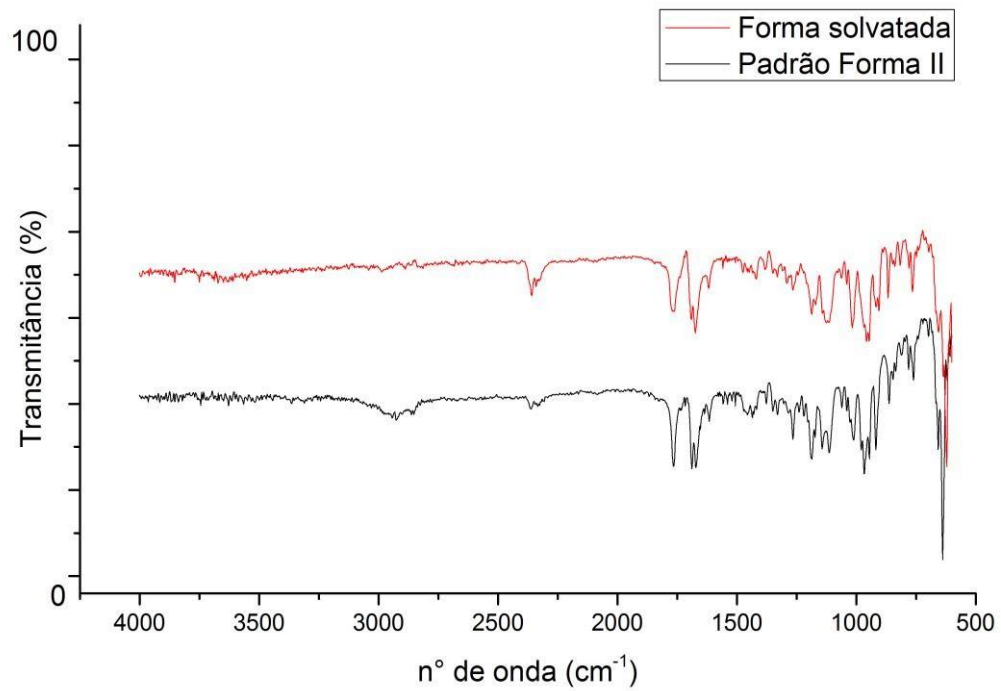


Figura 12 - Espectros de infravermelho do padrão forma II e da forma solvatada de espirolactona.

Fonte: do autor.

Os espectros mostraram que o padrão da forma II e a forma solvatada da espirolactona não apresentaram diferenças significativas, uma vez que o acréscimo da molécula do solvente acetato de etila não apresenta grupos funcionais que representariam picos adicionais.

Outros autores também não conseguiram diferenciar os compostos estudados nesse trabalho por esta técnica (BERBENNI et al., 1999; EL-DALSH et al., 1983). Assim, entendese que técnicas complementares são necessárias para que se obtenha melhores informações para o reconhecimento de grupos funcionais do fármaco.

Os espectros obtidos foram analisados de acordo com dados apresentados na literatura (DONALD et al., 2010). As faixas de frequências dos grupos funcionais correspondentes às principais bandas observadas nos espectros estão representadas na Tabela 3, fornecendo informações de grupos presentes na estrutura da espirolactona.

Tabela 3 - Faixas de frequências de grupos funcionais correspondentes às bandas observadas nos espectros de infravermelho de espirolactona

Faixa de frequências (cm⁻¹)	Grupamentos responsáveis
1766*	γ -lactona
1672*	Estiramento de C=O
1615*	Estiramento de C=C
1688*	Tio-acetil

Fonte: do autor.

5.5 ESTUDOS DE SOLUBILIDADE

Foi construída curva analítica para determinação das concentrações dissolvidas de espirolactona no estudo de solubilidade. Foram preparadas cinco concentrações de padrão de espirolactona (1, 5, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$), em triplicata, utilizando o diluente acetonitrila/água (50:50). A partir das médias de absorção em cada concentração, obteve-se a equação da reta $y = 21915x + 7568,9$, com $R^2 = 0,9999$. A equação da reta foi utilizada

para calcular a solubilidade das formas sólidas de espironolactona nos sete meios aquosos testados, conforme demonstrado na Figura 13.

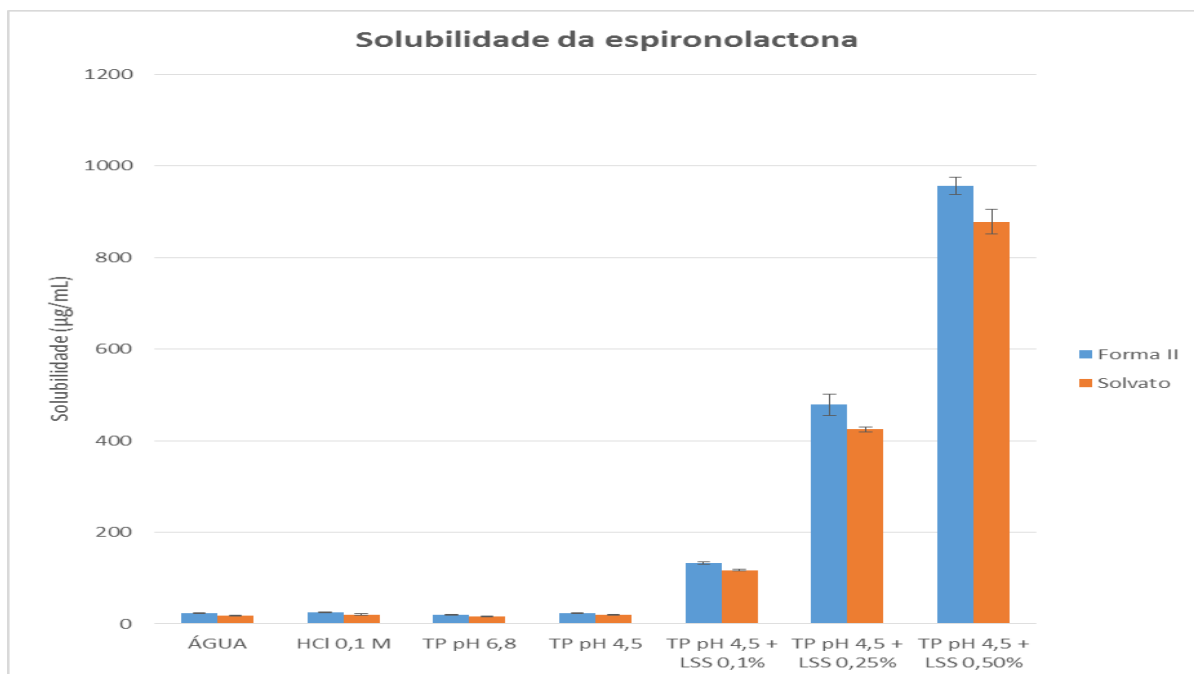


Figura 13 - Gráfico comparativo da solubilidade das matérias-primas nos meios aquosos testados.
Fonte: do autor.

Na análise do gráfico, é possível verificar a baixa solubilidade da espironolactona na maioria dos meios testados. O tampão acetato de sódio 0,05 M pH= 4,5, acrescido de 0,5% (m/v) de lauril sulfato de sódio apresentou a maior solubilidade do fármaco entre os meios testados. Nos meios avaliados, a solubilidade do solvato recristalizado foi consideravelmente menor do que a matéria-prima da espironolactona comercializada (forma II), consequentemente a dissolução dessa matéria-prima solvatada pode ser menor.

A forma solvatada apresentou menor solubilidade em todos os meios avaliados, com diferença significativa em relação à forma II ($p < 0,05$), verificada através do teste t-Student, sendo em água ($p = 0,00442$), HCl 0,1 M ($p = 0,04771$), tampão 0,07 M pH 6,8 ($p = 0,00123$), tampão 0,05 M pH 4,5 ($p = 0,00399$), tampão 0,05 M pH 4,5, acrescido de 0,1% (m/v) LSS ($p = 0,00122$), tampão 0,05 M pH 4,5, acrescido de 0,25% (m/v) LSS ($p = 0,01927$) e tampão 0,05 M pH 4,5, acrescido de 0,5% (m/v) LSS ($p = 0,01433$). Este fenômeno é esperado, pois a maioria dos solvatos são menos solúveis do que o sólido original (AULTON, 2005). Uma provável causa para esta baixa solubilidade está nas pequenas diferenças existentes entre as

energias livres de cada fase, em função dos diferentes empacotamentos ou conformações dos compostos que formam os cristais moleculares (SARMA, 2011). Quando o solvato, na forma sólida, é dissolvido em meio aquoso, a interação que ocorre entre o solvente e a fase cristalina reduz a quantidade de energia liberada. Como consequência, cristais solvatados podem apresentar solubilidade menor que suas formas sólidas não solvatadas, podendo levar a uma precipitação do fármaco em solução (AULTON, 2005).

De acordo com Barros de Araujo et al (2012), parâmetros como velocidade de absorção e biodisponibilidade são diretamente influenciados pelo grau de solubilidade de um fármaco, interferindo nos perfis farmacocinéticos e, conseqüentemente, na eficácia do medicamento.

5.6 PREPARO DAS CÁPSULAS

As matérias-primas forma II e solvatada reproduzidas no trabalho foram tamisadas na faixa de 150 e 200 mesh e utilizadas para o preparo das cápsulas.

A forma farmacêutica cápsula foi preparada na mesma dosagem de produtos comercializados em farmácias de manipulação. Cápsulas contendo 100 mg de espironolactona foram utilizadas para o desenvolvimento do método de dissolução e comparação dos diferentes compostos (forma II e solvato).

5.7 CONTROLE DE QUALIDADE DAS CÁPSULAS

Os resultados do controle de qualidade das cápsulas seguem abaixo.

5.7.1 Aspecto

As cápsulas gelatinosas para as duas formas estudadas se apresentaram duras, bicolores, com superfície lisa e contendo pó homogêneo e branco.

5.7.2 Peso médio

Os dados do peso médio estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 2 - Valores de peso médio das cápsulas forma II e forma solvatada

Cápsulas	Forma II (mg)	Forma solvatada (mg)
Média	207,5	218,2
Limites	186,8 – 228,2	196,4 – 240,0
Resultados	186,7 – 236,8	207,2 – 227,7

Fonte: do autor.

A Farmacopeia Brasileira (F. BRAS., 2010) especifica que na determinação de peso é tolerado não mais que duas cápsulas fora do limite de variação ($\pm 10\%$) em relação ao peso médio, porém, nenhuma poderá estar acima ou abaixo do dobro das porcentagens indicadas. Analisando os dados, pode-se observar que ambas as cápsulas contendo as formas sólidas foram aprovadas no teste, demonstrando homogeneidade de peso. Apenas duas cápsulas contendo a forma II ficaram fora dos limites especificados.

5.7.3 Desintegração

Todas as amostras atenderam às especificações estabelecidas pela Farmacopeia Brasileira (F. BRAS., 2010), onde as cápsulas devem estar completamente desintegradas ao final de 45 minutos. A desintegração das cápsulas contendo os compostos sólidos estudados ocorreram em 2 minutos.

5.7.4 Identificação

A identificação da espironolactona foi confirmada pela comparação dos tempos de retenção do pico principal do cromatograma da solução padrão com os obtidos nos cromatogramas de cada formulação (forma II e solvatada), conforme mostra a Figura 14.

Os tempos de retenção (R_t) para o padrão, forma II e forma solvatada foram em 3,3 minutos.

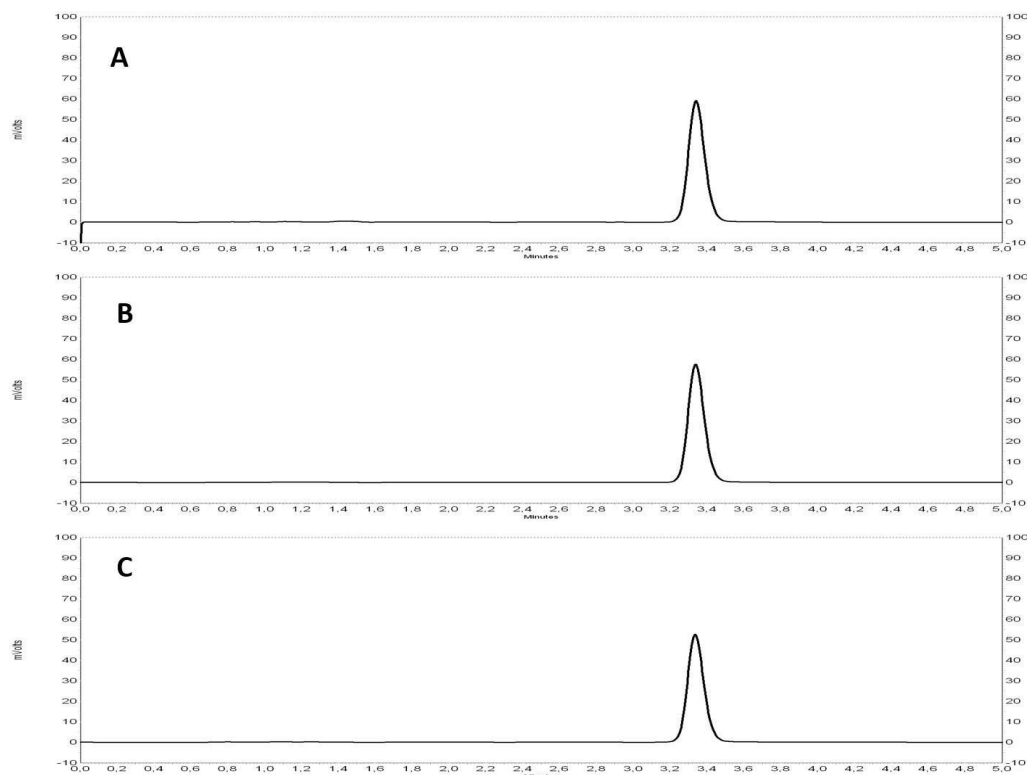


Figura 14 - Cromatogramas obtidos por CLAE para o padrão de espironolactona (A) e para as formulações contendo forma II (B) e forma solvatada (C) na concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$.

Fonte: do autor.

5.7.5 Teor do fármaco

Considerando a especificação para doseamento de espironolactona em comprimidos de 90,0 a 105,0 % do valor rotulado (UNITED, 2015), todas as amostras cumpriram o teste, como observado na Tabela 5.

Tabela 3 - Valores de teor de espironolactona das amostras de cápsulas (n=3)

Amostras	Teor (%)	D.P.R (%)*
Formulação Forma II	100,2	0,43
Formulação Solvato	100,9	0,48

Fonte: do autor

5.7.6 Uniformidade de doses unitárias

O teste de uniformidade por variação de peso foi realizado para as formulações contendo forma II e forma solvatada, conforme descrito na Tabela 6. As formulações cumpriram o teste de uniformidade de doses unitárias.

Tabela 4 - Valores do teste de uniformidade para espironolactona nas amostras de cápsulas

Cápsulas	Forma II (%)	Forma solvatada (%)
1	98,6	98,1
2	99,4	100,7
3	103,6	98,0
4	96,7	102,5
5	99,6	102,7
6	97,8	100,8
7	98,2	100,6
8	100,9	105,3
9	106,4	95,8
10	107,7	104,3
Média	100,9	100,9
D.P.R (%)	3,8	3,0
Valor de aceitação*	9,1	9,1

* Limite máximo permitido para o valor de aceitação = 15.

Fonte: do autor.

5.8 DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO DE DISSOLUÇÃO

Segue abaixo as condições encontradas no desenvolvimento do ensaio de dissolução.

5.8.1 Condições *sink*

Os testes de solubilidade mostraram condições *sink* para os meios tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,5 acrescidos de 0,1%, 0,25% e 0,5% (m/v) de LSS, para os dois compostos estudados (forma II e forma solvatada) de espironolactona. No entanto, de acordo com o Food and Drug Administration, as condições *sink* são desejáveis, mas não obrigatórias (FDA, 1997). Mesmo para os meios que não garantiram condições *sink*, foram realizados testes de otimizações de ensaio de dissolução, a fim de verificar se os medicamentos comerciais apresentariam boa liberação *in vitro*, devido à ação de excipientes.

5.8.2 Otimização das condições para quantificação por CLAE

As condições cromatográficas foram previamente otimizadas para produzir um desempenho analítico adequado em um curto espaço de tempo. Após testes preliminares, os seguintes parâmetros foram considerados adequados: fase móvel acetonitrila:água (60:40, v/v), vazão de 0,8 mL/min, temperatura ambiente, coluna C18 (150 x 3,9 mm, 5 µm), comprimento de onda de detecção de 230 nm e volume de injeção de 20 µL.

Para confirmar os parâmetros cromatográficos, um ensaio de adequabilidade do sistema foi realizado através da injeção de uma solução padrão de trabalho contendo 12,5 µg/mL de espironolactona em diluente água:acetonitrila (50:50, v/v). Os seguintes resultados foram encontrados: tempo de retenção de 3,32 min, números de pratos teóricos de, aproximadamente, 6812, fator de retenção de 3,32 e assimetria do pico de 1,20. O

desviopadrão relativo da área do pico foi de 0,33% (n=3). Todos os parâmetros foram, portanto, consistentes com as recomendações da USP (UNITED, 2015).

5.8.3 Ensaio de dissolução

Em geral, condições moderadas devem ser mantidas durante os ensaios de dissolução no sentido de obter o máximo poder discriminatório e resultar na capacidade de detecção de eventuais desvios dos padrões de qualidade propostos. Neste estudo, o teste de dissolução foi desenvolvido avaliando meio de dissolução, velocidade de rotação, aparato cesta (tipo I) / pá (Tipo II) para se obter uma dissolução lenta dos produtos nos primeiros pontos de amostragem. Além disso, buscou-se um teste de dissolução que estivesse de acordo com as especificações do FDA (FDA,1997) e da RE nº 310, de 1º de setembro de 2004 (BRASIL, 2004), que afirmam que apenas uma medida deve ser considerada depois de 85% de dissolução para a comparação de perfis de dissolução através do método modelo independente simples. Neste contexto, o último ponto de amostragem pode ser utilizado em testes de rotina realizados em laboratórios de controle de qualidade.

A escolha do meio de dissolução foi comparada através dos perfis de dissolução demonstrados na Figura 15.

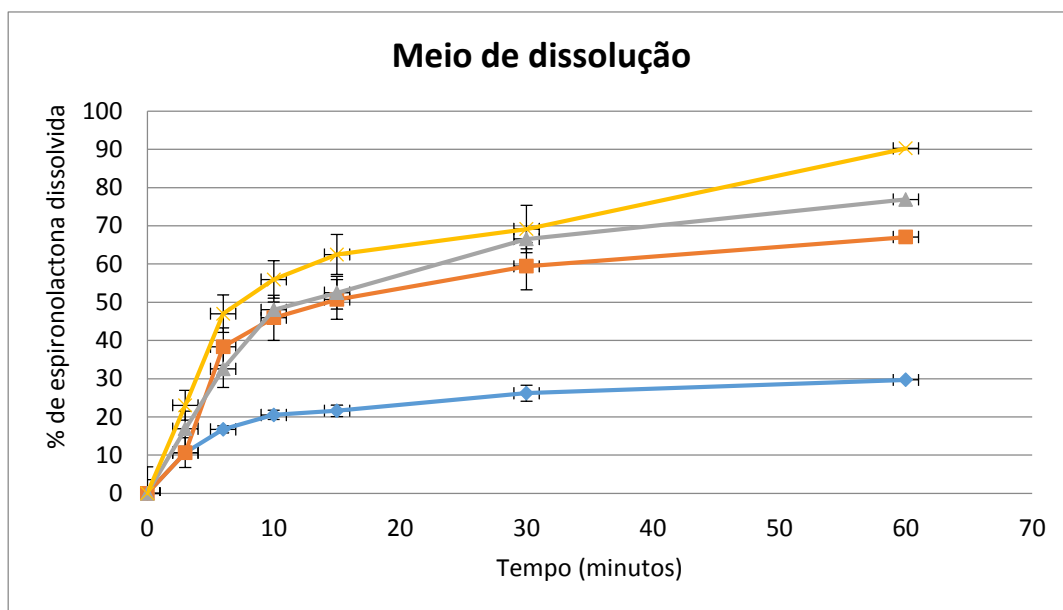


Figura 15 - Perfis de dissolução de cápsulas de 100 mg de espironolactona utilizando tampão acetato 0,05 M pH 4,5 (♦), tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,5, acrescido de 0,1% (m/v) (■), 0,25% (m/v) (▲) e 0,5% (m/v) (x) de LSS como o meio de dissolução; aparato cesta e velocidade de agitação de 100 rpm.

Nota: As amostras foram analisadas por CLAE.

Fonte: do autor.

Na composição do meio de dissolução (utilizando a cesta como aparato e velocidade de agitação de 100 rpm), tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,5 isolado (29,7% de liberação) e acrescido de 0,1% (m/v) (67,0% de liberação) e 0,25% (m/v) (76,9% de liberação) de LSS não foram considerados meios de dissolução "ideais", pois não proporcionaram nível de dissolução aceitável das cápsulas de espironolactona, no tempo de 60 minutos. Por outro lado, o tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,5, acrescido de 0,5% (m/v) de LSS permitiu uma liberação adequada de espironolactona a partir das cápsulas (90,3% de liberação). Além disso, com este meio foi possível obtenção de um perfil de dissolução com apenas um ponto acima de 85% de dissolução, permitindo comparação de perfis de dissolução pelo método modelo independente simples.

Com a utilização de tampão acetato de sódio pH 4,5 0,05 M acrescido de 0,5% (m/v) LSS como meio de dissolução, foi então verificada a influência da velocidade de rotação da cesta (50, 75 e 100 rpm) sobre a liberação das cápsulas de espironolactona, como demonstrado na Figura 16.

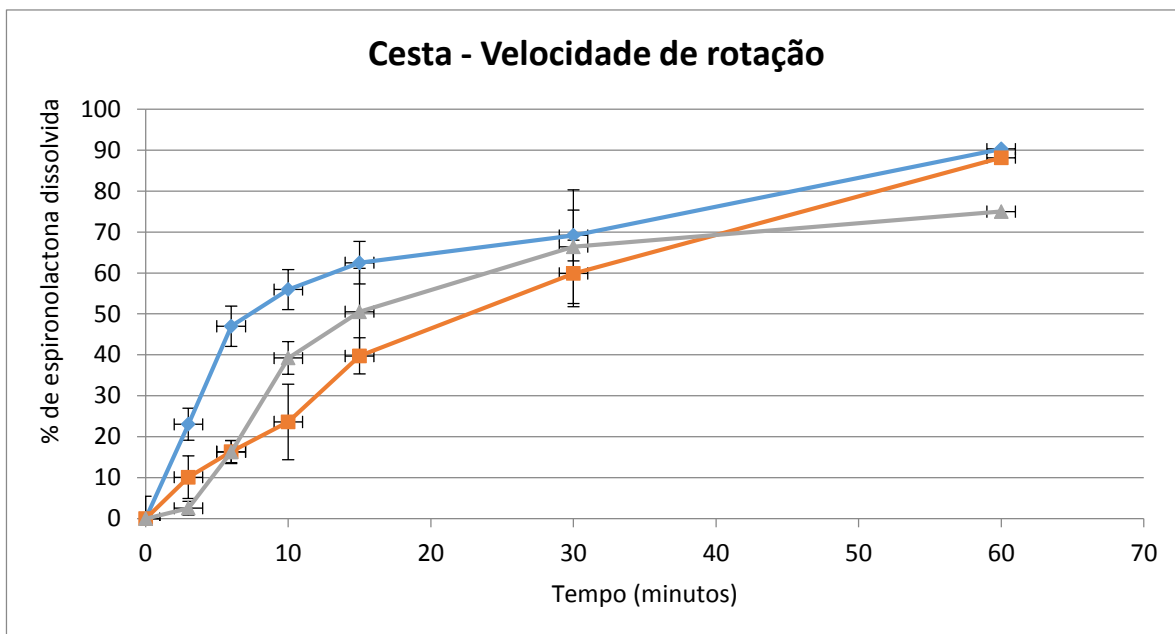


Figura 16 - Otimização da velocidade de rotação do aparato cesta. As velocidades utilizadas foram 100 rpm (♦), 75 rpm (▲) e 50 rpm (■).

Nota: O tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,5 acrescido de 0,5 % (m/v) de LSS foi utilizado como o meio de dissolução. As amostras foram analisadas por CLAE.

Fonte: do autor.

Os resultados experimentais mostraram melhor taxa de dissolução para os últimos pontos de amostragem utilizando a velocidade de rotação de 100 rpm (90,3% de liberação). A taxa de dissolução para a velocidade de rotação de 50 rpm (88,1% de liberação) atendeu a condição de apenas um ponto acima de 85% de dissolução. Para a velocidade de 75 rpm (75,0% de liberação) o valor não alcançou a taxa de liberação mínima de 80%. Portanto, o meio tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,5 acrescido 0,5% (m/v) de LSS, juntamente com as velocidades de rotação de 50 rpm e 100 rpm, foram considerados favoráveis para comparação dos perfis de dissolução, através do método modelo independente simples.

Após obtenção de boa taxa de dissolução nos últimos pontos de amostragem com aparato cesta a 100 rpm, avaliou-se o desempenho do aparato pá com diferentes velocidades de agitação (50, 75 e 100 rpm) para a liberação da espirolactona, conforme demonstrado na Figura 17.

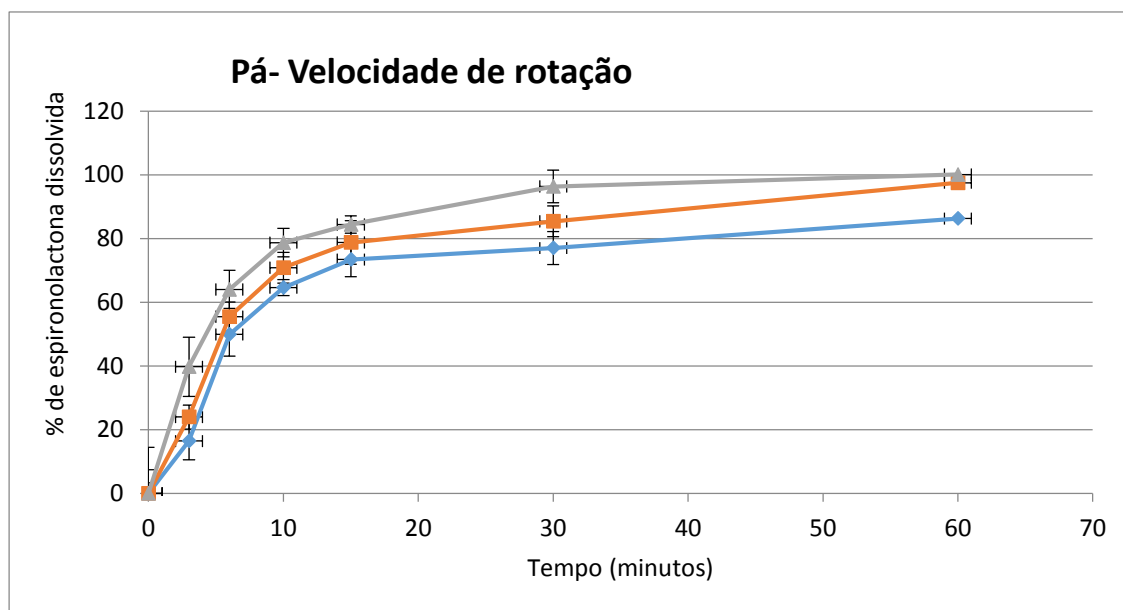


Figura 17 - Avaliação do aparato pá com diferentes velocidades de rotação. As velocidades utilizadas foram 100 rpm (▲), 75 rpm (■) e 50 rpm (◆). O meio de dissolução foi tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,5, acrescido de 0,5 % (m/v) de LSS.

Nota: As amostras foram analisadas por CLAE.

Fonte: do autor.

Os resultados experimentais mostraram que o aparato pá produz melhor porcentagem de dissolução das cápsulas na velocidade de 50 rpm (86,3% de liberação), atendendo a condição de apenas um ponto acima de 85% de dissolução. As outras velocidades apresentaram uma liberação muito rápida e não contínua, fornecendo mais de 70% de liberação em 10 minutos e mais de um ponto acima de 85% de dissolução, não sendo favorável ao método modelo independente simples.

As condições que podem ser utilizadas para comparação de perfis de dissolução de espironolactona pelo método modelo independente simples são: aparato pá a 50 rpm, aparato cesta a 50 rpm e a 100 rpm, todos utilizando tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,5, acrescido de 0,5% (m/v) LSS como meio de dissolução, conforme Figura 18.

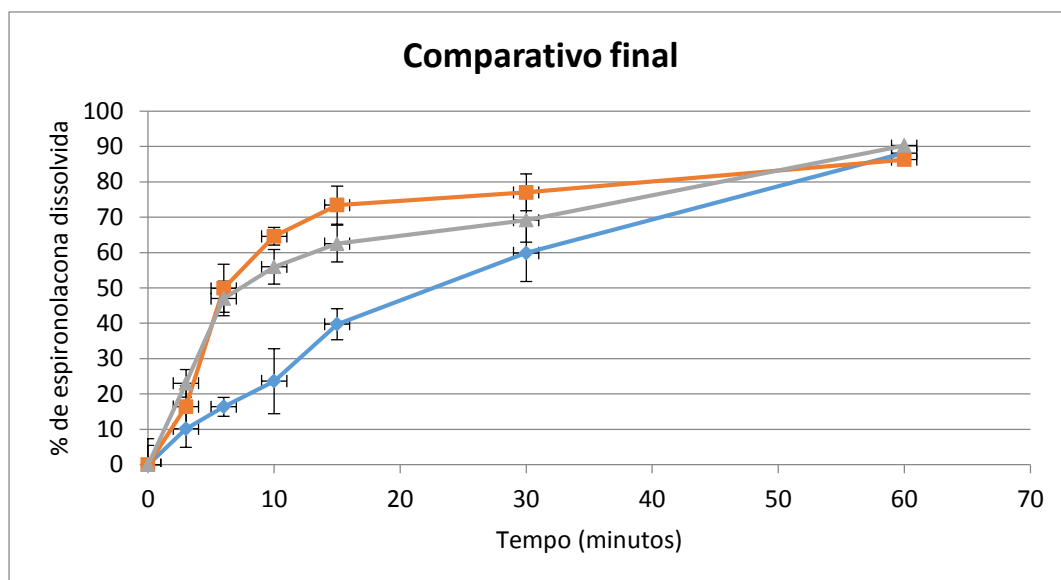


Figura 18 - Comparação das melhores condições obtidas. Velocidade de 50 rpm e cesta (◆), velocidade de 50 rpm e pá (■) e velocidade de 100 rpm e cesta (▲). O meio de dissolução foi tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,5, acrescido de 0,5% (m/v) de LSS.

Nota: As amostras foram analisadas por CLAE.

Fonte: do autor.

Considerando que o aparato cesta é normalmente recomendado pela Farmacopeia Americana para realização de testes de dissolução em cápsulas (UNITED, 2015), estabeleceu-se como aparato a cesta, velocidade de 100 rpm e meio de dissolução tampão acetato 0,05 M pH 4,5 contendo 0,5% (m/v) de LSS como condições ideais para realização de perfis e ensaios de dissolução de cápsulas de espironolactona. Estas condições permitiram a obtenção de um perfil de dissolução discriminatório, produzindo dissolução satisfatória no último ponto de amostragem, podendo, assim, ser empregado em estudos de equivalência farmacêutica e em testes de rotina de laboratórios de controle de qualidade.

De acordo com o FDA (FDA, 1997), para a dissolução de IFAs pouco solúveis (classe 2- SCB) é recomendada uma especificação de dissolução de 85 % em 30, 45, ou 60 minutos para caracterizar a qualidade destes produtos. Com base nestas especificações e nos resultados obtidos neste trabalho, foi estabelecido um critério de aceitação de 85% (Q = 80) de dissolução em 60 minutos.

As condições estabelecidas foram: meio tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,5, acrescido de 0,5% (m/v) de LSS previamente degaseificado; aparato de agitação cesta; velocidade de agitação 100 rpm e tempos de coleta: 3, 6, 10, 15, 30 e 60 minutos. O último

ponto de amostragem adotado foi 60 minutos, conforme recomendação da farmacopeia americana

(UNITED, 2015) com processo de duração de 30 a 60 minutos para as formas de dosagem de liberação imediata.

5.9 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DO ENSAIO DE DISSOLUÇÃO

Os resultados da validação do método desenvolvido seguem abaixo.

5.9.1 Seletividade

A avaliação da seletividade do método por CLAE é demonstrada na Figura 19.

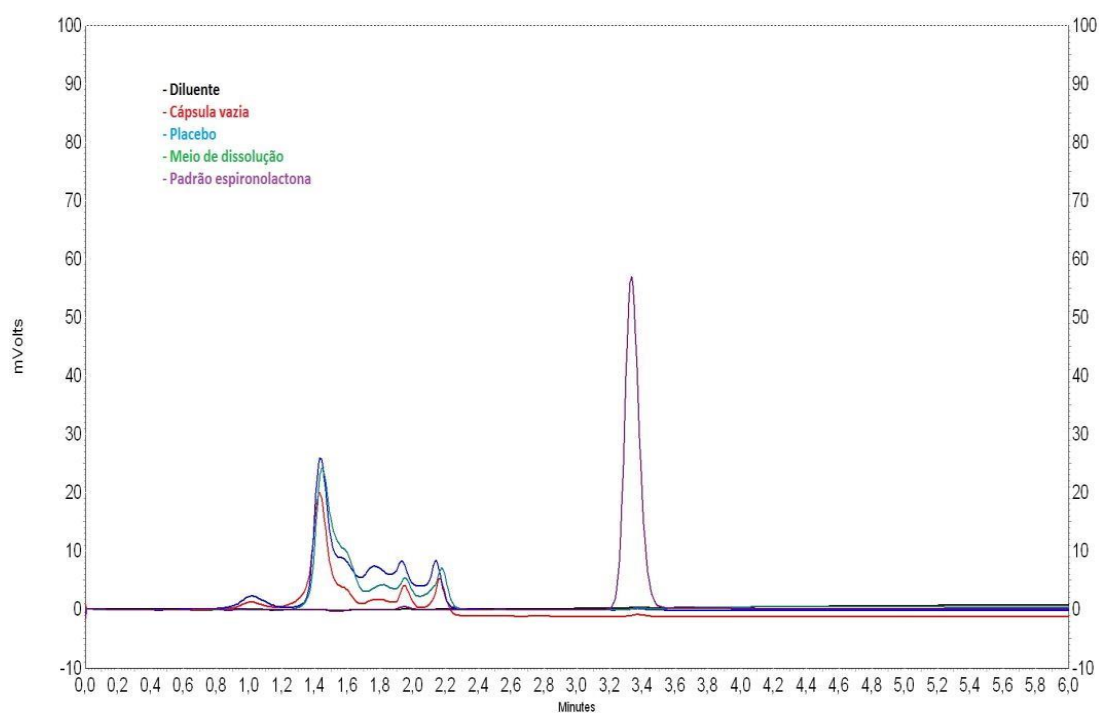


Figura 19 - Cromatogramas de padrão de espirolactona (12,5 µg/mL), diluente, cápsula vazia, placebo e meio de dissolução para avaliação da seletividade do método.

Fonte: do autor.

Foram realizadas análises do diluente, cápsula vazia, placebo e meio de dissolução, nas quais não foram observados picos cromatográficos adicionais no mesmo tempo de retenção da espironolactona, demonstrando, assim, a seletividade do método proposto.

5.9.2 Linearidade

A curva analítica está demonstrada na Figura 20.

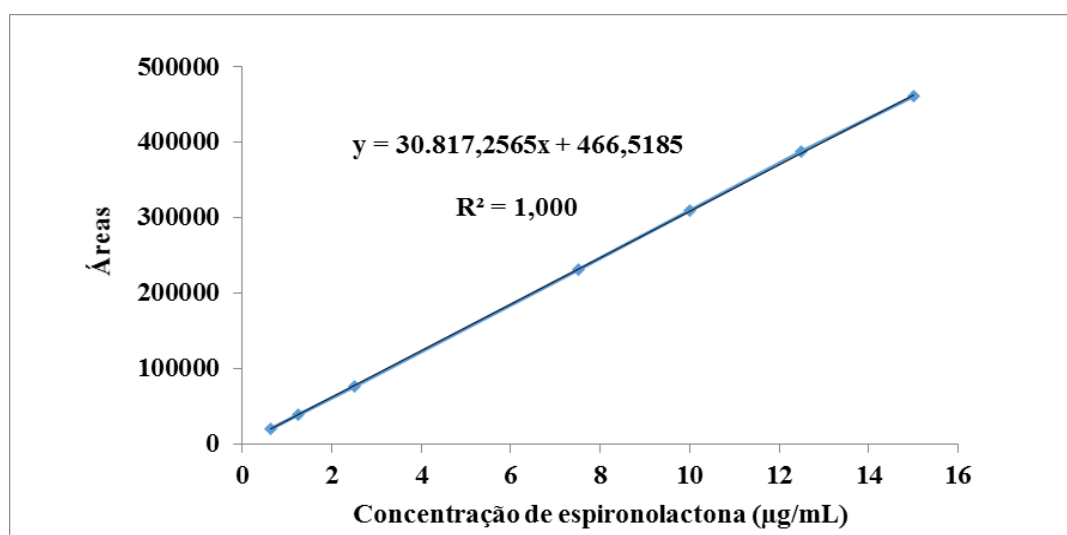


Figura 20 - Curva analítica de padrão espironolactona obtida pelo método cromatográfico.
Fonte: do autor.

A equação de calibração obtida foi $y = 30817x + 466,5185$. A regressão por mínimos quadrados mostrou coeficiente de correlação satisfatório ($R^2 = 1,0000$), confirmando a linearidade do método. O desvio padrão relativo de cada ponto ($n = 3$) foi inferior a 2%. Estes resultados satisfazem os critérios de aceitação (UNITED, 2015).

5.9.3 Exatidão e precisão

Os valores dos percentuais de recuperação para espironolactona estão demonstrados na Tabela 7 e apresentam-se entre 95,0-105,0%, confirmando a exatidão do ensaio e do método cromatográfico (UNITED, 2015).

Tabela 5 - Valores obtidos no teste de recuperação para espironolactona no ensaio de dissolução

	Concentração adicionada (µg/mL)	Concentração recuperada (µg/mL)*	Recuperação (%)
R1 (20%)	2,5	2,6	104,0
R2 (100%)	12,5	12,5	100,0
R3 (120%)	15,0	15,1	100,7

* Média de três determinações

Fonte: do autor.

Os resultados da precisão por repetibilidade (intraensaio) e intermediária (interensaio) do procedimento de dissolução foram aceitáveis, considerando os desvios padrão relativos menores que 5,0%, demonstrando boa precisão (UNITED, 2015, BRASIL, 2003), conforme Tabela 8.

Tabela 6 - Valores obtidos no teste de precisão de ensaio de dissolução de cápsulas de espironolactona
(continua)

Amostra	Analista 1 - Dia 1 (%)	Analista 2 - Dia 2 (%)
1	103,4	97,0
2	98,9	101,3
3	99,9	100,7
4	99,7	103,0
5	102,0	108,9
6	99,6	102,3

Tabela 7 - Valores obtidos no teste de precisão de ensaio de dissolução de cápsulas de espironolactona (conclusão)

Média	100,6	102,2
CV (%) n=6	1,72	3,81
CV (%) n=12	2,0	
Teste t-Student	$p = 0,3742^*$	

* Significativo para $p < 0,05$.

Fonte: do autor.

5.9.4 Limites de detecção e de quantificação

O limite de detecção do método encontrado foi de 0,014 $\mu\text{g/mL}$. O limite de quantificação encontrado foi de 0,047 $\mu\text{g/mL}$. Estes resultados demonstram que as análises foram realizadas em uma região acima destes valores (intervalo de trabalho do método: 0,625 – 15 $\mu\text{g/mL}$).

5.9.5 Robustez

A Tabela 9 descreve os resultados obtidos na avaliação da robustez do método proposto. O método foi, portanto, robusto para todos os fatores avaliados, não apresentando diferença significativa entre os resultados, de acordo com o teste t-Student ($p = 0,05$).

Tabela 9 - Parâmetros da avaliação da robustez do método analítico de dissolução para análise de espirolactona por CLAE

Parâmetros	Condições	Teores (%)			Test t-Student*
Velocidade de agitação	100 rpm	103,1	86,1	93,7	0,26
	95 rpm	103,0	110,4	95,1	
Degaseificação do meio de dissolução	Sim	103,1	86,1	93,7	0,22
	Não	80,5	80,9	93,4	
Filtração da amostra	Papel filtro quantitativo	98,8	99,2	102,2	0,80
	(PTFE) hidrofílicos	96,8	95,0	99,9	
Tempo do ensaio de dissolução (minutos)	60	103,1	86,1	93,7	0,80
	62	100,0	84,3	93,3	
Acetonitrila na fase móvel (%)	60	84,6	84,0	83,3	0,16
	62	83,3	83,4	83,2	
Vazão da fase móvel (mL/min)	0,8	84,6	84,0	83,3	0,27
	0,9	84,7	84,0	85,0	

*Significativo para $p < 0,05$

Fonte: do autor.

5.9.6 Estabilidade

As soluções padrão e amostra mantiveram-se estáveis à temperatura ambiente durante 24 e 2 horas, respectivamente. As soluções padrão e amostra tiveram resposta analítica de 100,4% e 99,3%, respectivamente, em relação ao tempo zero.

5.10 PERFIS DE DISSOLUÇÃO

A comparação dos perfis de dissolução é demonstrada na Figura 21.

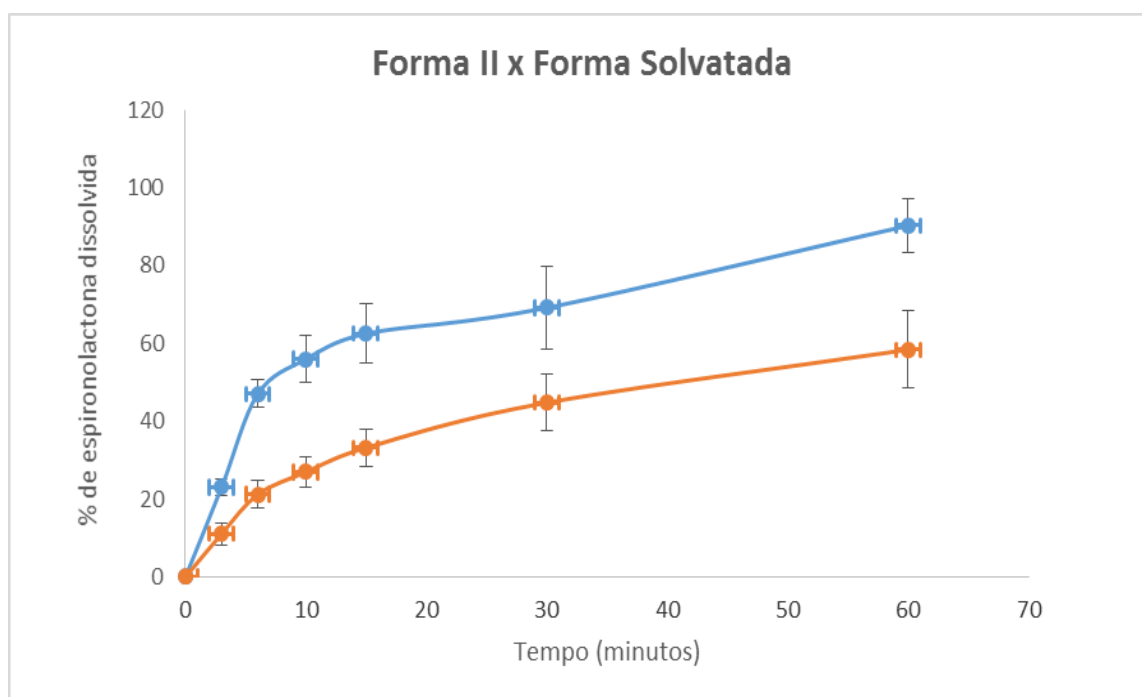


Figura 21 - Perfis de dissolução de espironolactona forma II (●) e forma solvatada (●).
Fonte: do autor

No tempo estabelecido de 60 minutos, as cápsulas contendo a forma II liberaram 90,2% do princípio ativo, enquanto que as cápsulas contendo a forma solvatada liberaram 58,4% do fármaco. Os fatores de diferença e semelhança calculados são demonstrados na Tabela 10.

Tabela 10 - Fatores de diferença e semelhança calculados para os perfis de dissolução das cápsulas de espironolactona estudadas

Amostras	F1	F2
Formulação Forma II x Formulação Solvato	43,78	29,07

Fonte: do autor.

Os dados da tabela 10 mostram que os perfis de dissolução das duas formas não foram equivalentes, ou seja, os perfis de dissolução de cápsulas contendo espironolactona são influenciados pela forma sólida presente. A presença da forma solvatada influenciou negativamente a dissolução do fármaco. A forma solvatada dissolve 1,5 vezes menos que a forma II.

5.11 ESTUDO DE ESTABILIDADE

As amostras das cápsulas, contendo as formas II e solvatada da espironolactona foram analisadas quanto ao teor e perfil de dissolução, nos tempos 0, 1, 2 e 3 meses. A comparação dos perfis de dissolução estão demonstrados nas Figuras 22 e 23, para as cápsulas forma II e forma solvatada, respectivamente.

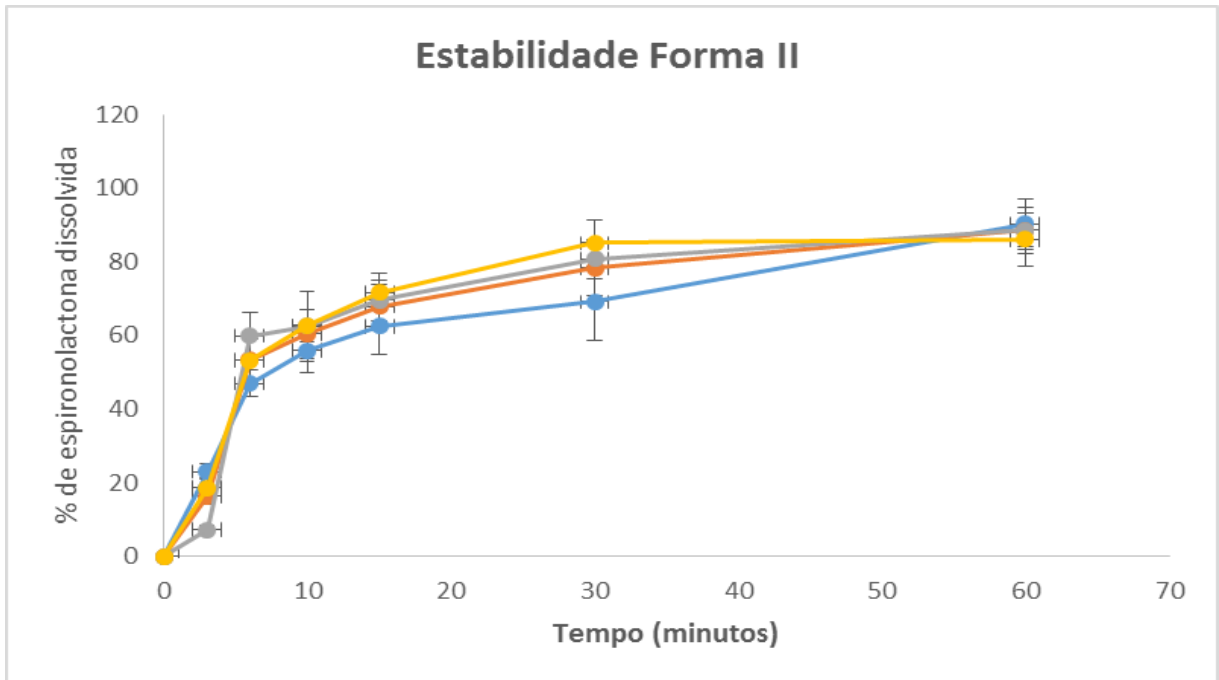


Figura 22 - Perfis de dissolução de espirolactona forma II para o estudo de estabilidades no tempo 0 (●), mês 1 (●), mês 2 (●) e mês 3 (●).

Fonte: do autor.

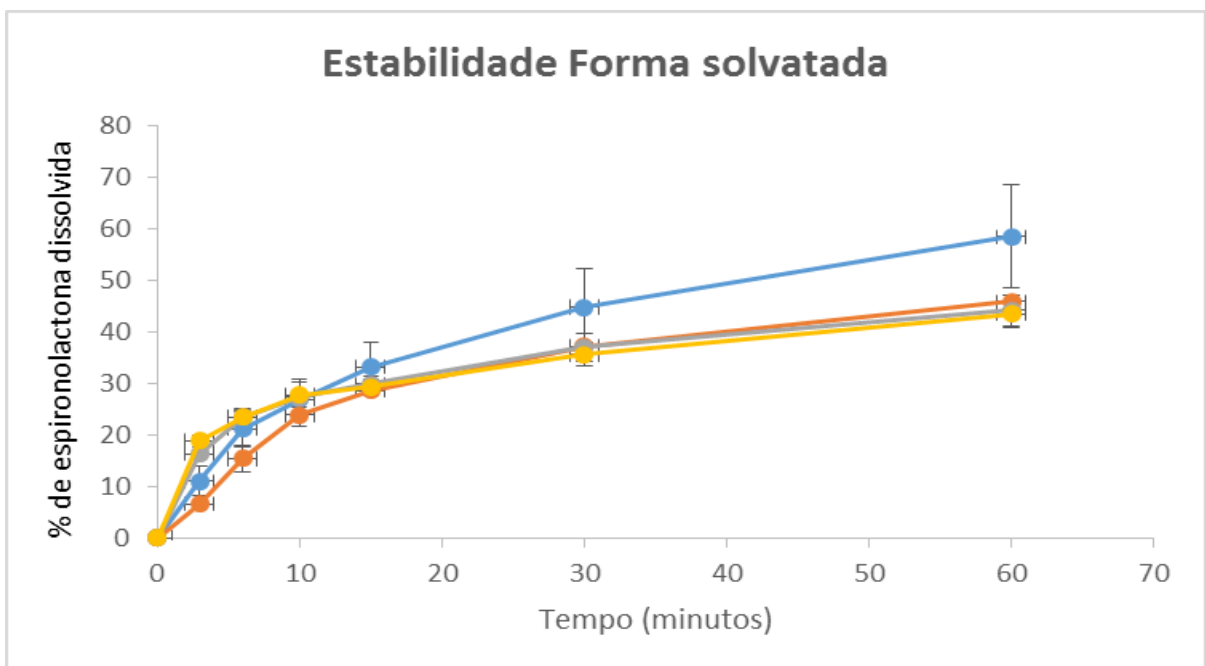


Figura 23 - Perfis de dissolução de espirolactona Forma solvatada para o estudo de estabilidades no tempo 0 (●), mês 1 (●), mês 2 (●) e mês 3 (●).

Fonte: do autor.

No tempo estabelecido de 60 minutos, as cápsulas contendo a forma II liberaram 90,25% do princípio ativo para o tempo 0; 88,6% para o mês 1; 89,6% para o mês 2 e 86,0% para o mês 3. As cápsulas contendo a forma solvatada liberaram 58,4% do princípio ativo para o tempo 0; 45,8% para o mês 1; 44,2% para o mês 2 e 43,4% para o mês 3. Os fatores de diferença e semelhança calculados estão demonstrados na Tabela 11.

Tabela 11 - Fatores de diferença e semelhança calculados para os perfis de dissolução das cápsulas de espirolactona estudadas no ensaio de estabilidade

Amostras	F1	F2
Tempo 0 x Mês 3 (Forma II)	8,48	52,71
Tempo 0 x Mês 3 (Forma solvatada)	8,70	54,58

Fonte: do autor.

Os dados da Tabela 11 mostram que os perfis de dissolução das cápsulas de espirolactona contendo a forma II e a forma solvatada foram estáveis e não influenciaram significativamente na dissolução dos compostos sólidos.

A Tabela 12 contém os teores calculados a partir das cápsulas utilizadas para o estudo de estabilidade durante os tempos de estudo.

Tabela 12 - Valores de teor para espirolactona cápsulas contendo a forma II e solvatada durante os estudos de estabilidade

Cápsulas	Tempo 0	Mês 1	Mês 2	Mês 3	DP*
Formulação Forma II	100,20%	101,64%	98,86%	101,63%	1,33
Formulação Solvato	100,93%	100,92%	99,22%	101,12%	0,89

*Desvio padrão

Fonte: do autor.

6 CONCLUSÃO

As conclusões encontradas foram:

- a) A matéria-prima estudada foi identificada como forma II, a qual é a forma comercializada e a mais estável. A partir desta, foi possível, pelo processo de recristalização com solvente acetato de etila, obter a forma solvatada. As técnicas como DRXP-pó, DSC e TG foram essenciais e complementares para o processo de identificação e caracterização dessas formas;
- b) As cápsulas manipuladas para desenvolvimento do método de dissolução obedeceram aos critérios estabelecidos para o controle de qualidade pela Farmacopeia Brasileira e Farmacopeia Americana;
- c) O ensaio de dissolução para espironolactona forma farmacêutica cápsulas, foi desenvolvido e validado. As condições estabelecidas para dissolução foram: meio de dissolução tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,5, acrescido de 0,5% (m/v) de LSS (1000 mL a $37 \pm 0,5$ °C), aparato cesta, velocidade de agitação de 100 rpm;
- d) Os resultados da validação demonstraram que todos os parâmetros cumpriram os critérios de aceitação. A avaliação dos produtos estudados mostrou que o critério de aceitação de 85% ($Q = 80$) em 60 min pode ser considerado como satisfatório para o controle de qualidade de rotina da espironolactona em cápsulas. Uma vez que não há monografia para espironolactona em cápsulas, este estudo ilustra a importância da disponibilidade de um método oficial para o ensaio de dissolução;
- e) Pode-se notar, também, através dos estudos de solubilidade e perfil de dissolução, que a forma solvatada afeta significativamente as propriedades físico-químicas da espironolactona;

- f) Os resultados encontrados mostram a importância da avaliação da qualidade do medicamento para saúde do paciente, pois a ocorrência de uma forma sólida com propriedades diferentes pode afetar a resposta farmacológica.

Estudos paralelos sobre polimorfismo e avaliação da qualidade de medicamentos, durante o período da pós-graduação, geraram resultados bastante positivos como:

- a) Artigo publicado — SILVA L. M., **MONTANARI C. M.**, SANTOS O. M. M., CAZEDEY E. C. L., ÂNGELO M. L., ARAÚJO M. B. Quality evaluation of the Finasteride polymorphic forms I and II in capsules. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 105, p. 24-31, 2015;
- b) Menção Honrosa do trabalho apresentado no 6th International Symposium of Graduate Studies and Research (VI SINPOSPq) intitulado — “Quality and Stability Evaluation of Finasteride Polymorphic Forms in Capsules” dos autores **MONTANARI C. M.**, SILVA L. M., ARAÚJO M. B, 2014;
- c) Apresentação de trabalho no Congress and General Assembly of The International Union of Crystallography. Montréal, Québec, Canada. Dos autores SILVA L. M., **MONTANARI C. M.**, CAZEDEY E. C. L., ÂNGELO M. L., BONFILIO R., ARAÚJO M. B, 2014;
- d) Apresentação do trabalho – “Quality and stability evaluation of spironolactone solid-state forms in capsules” no 10th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP), Ribeirão Preto, Brasil. Dos autores **MONTANARI C. M.**, SILVA L. M., ARAÚJO M. B, 2015.

REFERÊNCIAS

AGAFONOV, V. et al. Polymorphism of Spironolactone. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 80, n. 2, p. 181-185, 1991.

AGAFONOV, V.; LEGENDRE, B.; RODIER, N. A. New Crystalline Modification of Spironolactone. **Acta Crystallographica**, v. 25, p. 1661-1663, 1989.

AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.

ARAÚJO, B. L. G. et al. Polimorfismo na produção de medicamentos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 1, p. 27-36, 2012.

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

BABU, N. J.; NANGIA, A. Solubility advantage of amorphous drugs and pharmaceutical cocrystals. **Crystal Growth and Design**, v.11, p.2662-2679, 2011.

BARROS DE ARAÚJO, G.L. et al. Polimorfismo na produção de medicamentos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n.1, p. 27-36, 2012.

BECKSTEAD, H.D.; NEVILLE, G. A.; SHURVELL, H. F. Differentiation of solvated spironolactone samples by FT-Raman and FT-IR diffuse reflectance spectroscopy. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 345, n. 11, p. 727-732, 1993.

BERBENNI, V. et al. Physico-chemical characterisation of different solid forms of spironolactone. **Thermochimica Acta**, v. 340±341, p. 117-129, 1999.

BIAN, J. et al. Diastereoselective synthesis of β -heteroaryl syn- α -methyl- β -amino acid derivatives via a double chiral auxiliary approach. **Organic Letters**, v. 15, n. 3, p. 562-565, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003**. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun. 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 11 jul. 2015.

BRASIL. **Resolução n° 310, 2004.** Dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficinais para Uso Humano em farmácias. Diário Oficial da União, Brasília, 08 out. 2007. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 11 jul. 2015.

BRASIL. **Resolução n° 67, 2007.** Dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficinais para Uso Humano em farmácias. Diário Oficial da União, Brasília, 08 out. 2007. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 11 jul. 2015.

BRASIL. **Resolução n° 87, 2008.** Altera o Regulamento Técnico sobre Boas Práticas de Manipulação em Farmácias. Diário Oficial da União, Brasília, 21 nov. 2008. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 11 jul. 2015.

BRITAIN, H. G. Polymorphism and Solvatomorphism 2010. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 2, p. 464-484, 2012.

BRITISH PHARMACOPOEIA. **The Stationery Office**, London, v. 2, p. 2137- 2138; 3264-3266, 2011.

DIDEBERG, O.; DUPONT, L. La structure cristalline et Moléculaire de la Spironolactone. **Acta Crystallographica**, v.28, p.3014-3022, 1972.

DONALD. et al. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

DONG, Y. et al. Preparation and characterization of spironolactone nanoparticles by antisolvent. **International Journal of Pharmaceutics Sciences**, v. 375, p. 1-2, 2009.

EL-DALSH, S. S. et al. Studies on spironolactone polymorphic forms. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 9, n. 5, p. 877-894, 1983.

ESPEAU, P. et al. Thermal behavior of orthorhombic polymorphs I and II of spironolactone. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 90, n. 2, p. 341-342, 2007.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 6. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2008.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 5. ed. Brasília: v. 2, 2010.

FDA. **US Food and Drug Administration** Guidance for Industry, ANDAs: Pharmaceutical Solid Polymorphism. Chemistry, Manufacturing, and Controls Information. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Washington, DC, 2007. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm072866.pdf>>. Acesso em: 27 jul. 2015.

US Food and Drug Administration. FDA, 1997. Guidance for Industry, Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070237.pdf>>. Acesso em: 27 jul. 2015.

FERNANDES, F. O. et al. Avaliação da qualidade do medicamento de referência de prednisona. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 1, p. 55-56, 2015.

FLORENCE, A.T. **Princípios físico-químicos em farmácia**. 2. ed. São Paulo: EDUSP, 2011.

International Conference on Harmonization. ICH, of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use Topic Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Geneva, 2005.

LEE, A.Y.; ERDEMIR, D.; MYERSON, A.S. Crystal polymorphism in chemical process development. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v.2, p. 259-280, 2011.

LIEBENBERG, W. et al. Variable temperature X-Ray Powder Diffractometry of spironolactone polymorphs. **Pharmazie**, v.58, p.435-437, 2003.

MALLAMO, J. P. et al. Antiandrogenic steroidal sulfonyl heterocycles. Utility of electrostatic complementarity in defining bioisosteric sulfonyl heterocycles. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 10, p. 1663-1670, 1992.

NEVILLE, G. A.; BECKSTEAD, H. D.; COONEY, J.D. Thermal analyses (TGA and DSC) of some spironolactone solvates G.A. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 349, p. 746-750, 1994.

NICOLAI, B. et al. Polymorph formation from solvate desolvation: Spironolactone forms I and II from the spironolactone ethanol solvate. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 90, n.2, p.337-339, 2007.

OLIVEIRA, E. A. et al. Análise e validação do procedimento de manipulação de cápsulas por encapsulamento manual por nivelamento. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n.1, p.59-65, 2014.

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.

PISEGNA, L. G. et al. High-pressure infrared and Raman studies of polymorphism in pharmaceutical compounds: Spironolactone, Forms I and II. **Journal of Molecular Structure**, v. 1078, p. 146-150, 2014.

PRADO, L. D.; ROCHA, H. V. A. Estado Sólido na Indústria Farmacêutica: Uma Breve Revisão. **Revista virtual de Química**, v.7, n.6, p.2080-2112, 2015.

SANTOS, F. C. M. **Estudo de pré-formulação da ivermectina**: caracterização e estabilidade do fármaco. 2013. 102f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

SARMA, B. et al. Solid forms of pharmaceuticals: Polymorphs, salts and cocrystals. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 2, p. 315-322, 2011.

SILVA, G.; IHA, K. Polimorfismo: caracterização e estudo das propriedades de uma fase cristalina. **Journal of Aerospace Technology and Management**, v. 2, n. 3, p. 331-338, 2010.

SILVA, L. M et al. Quality evaluation of the finasteride polymorphic forms I and II in capsules. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 105, p. 24-31, 2015.

SONI, R. et al. An unexpected directing effect in the asymmetric transfer hydrogenation of α,α -disubstituted ketones. **Organic Letters**, v. 13, n. 16, p. 4304-4307, 2011.

SOWA, M; S'LEPOKURA, K; MATCZAK-JON, E. Cocrystals of fisetin, luteolin and genistein with pyridinecarboxamide cofomers: crystal structures, analysis of intermolecular interactions, spectral and thermal characterization. **CrystEngComm**, v. 15, p. 7696-7708, 2013.

TAKATA, N. et al. A Spironolactone – Saccharin 1:1 Cocrystal Hemihydrate. **Crystal Growth & Design**, v. 10, p. 2116-2122, 2010.

THAKUR, S.S. et al. Solid-state mechanical properties of crystalline drugs and excipients. **Journal Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 108, p. 283-287, 2012.

TSRL inc. Therapeutic System Research Laboratories. **BCS (Biopharmaceutics Classification System)**. Disponível em : <<http://69.20.123.154/services/bcs/search.cfm>>. Acesso em: 30 jan. 2016.

USP. **United States Pharmacopoeia**. 38. ed. Rockville: The United States Pharmacopoeial Convention, 2015.

VALENTINI, S. R; SOMMER, W. A; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. **Arquivos do Mudi**, v. 11, n. 2, p. 26-31, 2007.

ZHANG, J. et al. Determination and correlation of solubility of spironolactone form II in pure solvents and binary solvent mixtures. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 79, p. 61-68, 2014.