

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL/MG

RENATA CUNHA DE RESENDE OLIVEIRA

**OCORRÊNCIA DE POLIMORFISMO EM MATÉRIAS-PRIMAS DE
ESPIRONOLACTONA E AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA NA QUALIDADE
FÍSICO-QUÍMICA DE COMPRIMIDOS**

Alfenas – MG

2016

RENATA CUNHA DE RESENDE OLIVEIRA

**OCORRÊNCIA DE POLIMORFISMO EM MATÉRIAS-PRIMAS DE
ESPIRONOLACTONA E AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA NA QUALIDADE
FÍSICO-QUÍMICA DE COMPRIMIDOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Alfenas-MG.

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

Oliveira, Renata Cunha de Resende.

Ocorrência de polimorfismo em matérias-primas de espirolactona e
avaliação da influência na qualidade físico-química de comprimidos /
Renata Cunha de Resende Oliveira. – Alfenas - MG, 2016.
65 f.

Orientadora: Magali Benjamim de Araújo.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade
Federal de Alfenas, 2016.
Bibliografia.

1. Espirolactona. 2. Polimorfismo (Cristalografia). 3. Solubilidade.
4. Dissolução. I. Araújo, Magali Benjamim de. II. Título.

CDD-615.1

RENATA CUNHA DE RESENDE OLIVEIRA

**OCORRÊNCIA DE POLIMORFISMO EM
MATÉRIAS-PRIMAS DE ESPIRONOLACTONA E
AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA NA
QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE COMPRIMIDOS**

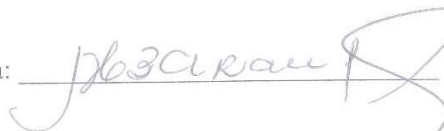
A Banca examinadora abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas-MG.

Aprovada em: 24/02/2016

Profa. Magali Benjamin de Araújo

Instituição: UNIFAL-MG

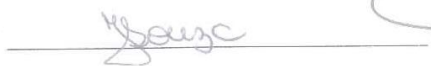
Assinatura: _____



Profa. Jacqueline de Souza

Instituição: UFOP

Assinatura: _____



Prof. Antônio Carlos Doriguetto

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: _____



Aos meus pais, Almírio e Mariângela,
Que dentre muitas lições, me ensinaram a importância
da educação de qualidade me motivando
na obtenção deste título.
Obrigada pelo amor incondicional.

Ao meu marido, Antônio Felipe,
Amado, amigo e fiel companheiro desde o início
da minha trajetória como farmacêutica.
Obrigada pelo apoio, paciência e por suas palavras
de incentivo. Seu amor, carinho e confiança foram
fundamentais em todas as etapas desta conquista.

E esta conquista, é nossa!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sua presença constante em minha vida, guiando meus passos e iluminando meu caminho quando as adversidades se fazem presente.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNIFAL-MG, por minha formação como farmacêutica durante a graduação, residência e mestrado. Sinto imenso orgulho e carinho de ter sido aluna desta universidade.

À Professora Dra. Magali Benjamin de Araújo, pela confiança depositada, orientação e amizade durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Antônio Carlos Doriguetto, por transmitir seus conhecimentos em difração de raio X e por disponibilizar o Laboratório de Cristalografia. Obrigada ao colega Deiverson pela realização das análises.

À Professora Dra. Gislaine Ribeiro Pereira, por possibilitar que as formulações fossem preparadas no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e pelas importantes considerações durante o exame de qualificação.

Ao Professor Dr. Marcelo Garcia Trevisan, por compartilhar seus conhecimentos em análises térmicas e incentivar o manuseio dos equipamentos. Obrigada à equipe do Laboratório de Análises e Caracterização de fármacos pelo auxílio nas análises.

À farmacêutica, doutoranda e comadre Olímpia Maria Martins Santos Viana, por sua amizade, carinho e disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos desde o delineamento do projeto até as últimas análises.

À doutoranda Jennifer Tavares Jacon Freitas, por sua ajuda e disponibilidade em várias etapas deste trabalho.

Ao pós-doutorando André Luís Moraes Ruela, amigo de longa data, por me ajudar com o artigo e a dissertação. Obrigada por todas as suas considerações.

A todos os colaboradores do Núcleo de Controle de Qualidade que me acolheram durante os dois anos de mestrado. Em especial à Ana, Sirléia, Bia, Aline e Gilmara, pela ajuda, palavra amiga e torcida durante a obtenção de cada resultado.

A todos os colegas de mestrado e doutorado, que contribuíram e compartilharam experiências, dificuldades e motivação durante a nossa caminhada.

À secretária do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fabiana da Silva, por ser sempre solícita.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

Às minhas irmãs Marina e Melissa, a minha avó Terezinha, aos sogros Dimas e Rita, aos cunhados Júlio e Olívia, à Lúcia, às minhas amigas APKS, às minhas amigas da faculdade e aos familiares, obrigada pelo apoio, ajuda e incentivo em diversas situações.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada!

RESUMO

A espironolactona (SPR) é um ingrediente farmacêutico ativo (IFA), com estrutura química esteroideal, que possui atividade diurética sendo utilizada no controle da hipertensão arterial e, também, como agente antiandrogênico. Possui incompleta absorção oral devido à sua baixa solubilidade que pode dificultar a sua liberação. O uso de solventes e diferentes processos de cristalização para a síntese de um IFA são fatores que conduzem à formação de polimorfos. No Brasil, os IFAs em sua maioria são provenientes de diversos países, portanto apresentam diferentes fabricantes e rotas sintéticas distintas e, por isso, a caracterização físico-química e a identificação da estrutura cristalina são procedimentos importantes para garantir a qualidade e eficácia do medicamento, pois distintos polimorfos podem levar a concentrações plasmáticas ineficazes ou tóxicas. O trabalho teve por objetivo caracterizar polimorfos de SPR em IFAs provenientes de diferentes fabricantes através das técnicas de difração de raios X, análises térmicas, infravermelho e ensaios de solubilidade em equilíbrio. Os IFAs caracterizados foram usados para fabricar comprimidos, avaliando a influência do polimorfismo no perfil de dissolução do medicamento. Os IFAs foram identificados como SPR-L1, L2, L3, L4 e L5, o padrão secundário como SPR-pd 2° NCQ, o comprimido de referência como SPR-R, e os lotes de comprimidos produzidos como Lote A (SPR-L1) e Lote B (SPR-L2). Os resultados mostraram que os IFAs SPR-L2, L3, L4, L5 e padrão SPR-pd 2° NCQ foram caracterizados como forma II enquanto o IFA SPR-L1 contém polimorfos I e II. O ensaio de solubilidade em equilíbrio demonstrou que SPR-L1 apresenta solubilidade significativamente maior que SPR-L2 em todos os meios avaliados ($p < 0,01$), a partir do teste *t-Student*. Ao comparar os perfis de dissolução dos lotes A e B, o valor calculado para F2 foi de 19,00, demonstrando que à dissolução dos lotes de comprimidos fabricados não foram equivalentes. Portanto, a presença de pequena quantidade do polimorfo I, mais solúvel, influenciou com aumento significativo na velocidade de dissolução do fármaco. Ao avaliar o mecanismo de ação do fármaco, o aumento na velocidade de dissolução poderia estar relacionado à maiores concentrações plasmáticas de SPR e potencializar o efeito terapêutico, podendo causar hiperpotassemia e efeitos adversos indesejáveis. Comprimidos comercializados no Brasil também foram avaliados e a formulação demonstrou papel importante na velocidade de dissolução do fármaco, pois estes medicamentos não apresentaram equivalência farmacêutica entre si.

Palavras-chave: Espironolactona. Polimorfismo. Solubilidade. Perfil de dissolução.

ABSTRACT

Spirolactone (SPR) is an active pharmaceutical ingredient (API), with steroidal chemical structure and diuretic activity, administered for arterial hypertension treatment, and also as antiandrogen agent. The drug shows incomplete gastrointestinal absorption due to its poor aqueous solubility that can difficult the drug release. The use of different solvents and crystallization processes for the synthesis of an API are factors that lead to formation of polymorphs. In Brazil, APIs have been purchased from different manufacturers, including different synthetic routes. Therefore, the physicochemical characterization and identification of the crystal structure of an API are important points to ensure its quality. Different crystal structures of a drug can lead to ineffective or toxic plasma concentrations, if different aqueous solubility were determined. In this study, SPR polymorphs in five batches of APIs from different manufacturers were characterized using powder X-ray diffraction, infrared spectroscopy, thermal analysis, and equilibrium solubility measurements. Tablets were manufactured using different APIs to assess the effect of drug polymorphism on their dissolution profiles. The APIs were identified as SPR-L1, L2, L3, L4 and L5; the standard as SPR-pd 2 ° NCQ, the reference drug product as SPR-R, and the batches of the manufactured tablets are denominated as batch A (SPR-L1) and batch B (SPR-L2). The results indicated that the APIs SPR-L2, L3, L4, L5 and standard SPR-pd 2 ° NCQ were characterized as pure form II although SPR-L1 contains both forms I and II. The equilibrium solubility measurements demonstrated that SPR-L1 solubility is higher than the SPR- L2 solubility in all aqueous media ($p < 0.01$ using Student test). When the dissolution profiles of batches A and B were compared, the calculated value for F2 was 19.00, demonstrating that the dissolution of the manufactured tablets are not equivalent. Therefore, the presence of low amounts of polymorph I, a more soluble form, increases the dissolution rate of the drug. The increase in the dissolution rate could enhance the therapeutic effects of SPR due to changes in drug plasma concentrations, and cause hyperkalemia, leading to the appearance of undesirable side effects. Marketed SPR tablets in Brazil were also evaluated and formulation showed an important role in dissolution rate of the drug, leading to lack of pharmaceutical equivalence in these drug products.

Keywords: Spirolactone. Polymorphism. Solubility. Dissolution profile.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Estrutura química da espironolactona ($C_{24}H_{32}O_4S$)	22
Figura 2	–	Estruturas moleculares da espironolactona, forma I e II	24
Figura 3	–	Empacotamento molecular de dois polimorfos de SPR: forma I e forma II ..	24
Figura 4	–	Difratogramas de IFAs (SPR-L1 à L5) e SQR (SPR-pd2° NCQ) de SPR em comparação com difratogramas da forma I e forma II simulados de SPR	37
Figura 5	–	Difratogramas de SPR-L2, SPR-L3, SPR-L4, SPR-L5 e SPR-pd2° NCQ em comparação com o padrão de difração simulado da forma II de SPR	38
Figura 6	–	Difratograma de SPR-L1 em comparação com o padrão de difração simulado das formas I e II de SPR	39
Figura 7	–	Curva termoanalítica por CED e TG da SQR (SPR-pd2° NCQ) de SPR. Razão de aquecimento: 10 °C.min ⁻¹ (40 a 300 °C)	40
Figura 8	–	Curva termoanalítica por CED dos IFAs SPR-L1 e SPR-L2 de SPR. Razão de aquecimento: 10 °C.min ⁻¹ (100 a 230 °C)	41
Figura 9	–	Curvas termoanalíticas por CED do SPR-L1 a partir de diferentes razões de aquecimento (5, 10, 15 e 20 °C.min ⁻¹)	42
Figura 10	–	Curvas termoanalíticas por TG de SPR-L1 e SPR-L2 obtidas a partir de razão de aquecimento de 10 °C.min ⁻¹	43
Figura 11	–	Espectros de absorção na região do IV-RTA para SPR em SQR e IFAs	44
Figura 12	–	Gráfico comparativo da solubilidade dos IFAs de SPR nos meios aquosos testados	46
Figura 13	–	Perfis de dissolução dos comprimidos produzidos – Lote A e Lote B	50
Figura 14	–	Perfil de dissolução dos comprimidos comercializados: referência, genéricos e similar – SPR-R, SPR-G1, SPR-G2, SPR-G3 e SPR-S	53
Figura 15	–	Eficiência de dissolução (%) de comprimidos comercializados de espironolactona 50 mg (n=6)	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Parâmetros de rede da célula unitária de espironolactona, forma I e II	25
Tabela 2 –	Informações sobre IFAs de espironolactona utilizados no estudo	27
Tabela 3 –	Informações sobre comprimidos comercializados utilizados no estudo	28
Tabela 4 –	Valores percentuais de excipientes utilizados no preparo dos comprimidos de 50 mg dos IFAs de SPR, por compressão direta	33
Tabela 5 –	Valores médios de percentagem de teor dos IFAs, calculados a partir do teor da solução referência de padrão secundário ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	45
Tabela 6 –	Valores de solubilidade ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e desvio padrão (DP) dos IFAs nos meios aquosos testados	46
Tabela 7 –	Valores de peso médio, faixa permitida pela especificação e DPR das formulações de comprimidos estudadas	48
Tabela 8 –	Valores de dureza (em Kgf) das formulações de comprimidos estudadas, expresso em média e DPR	49
Tabela 9 –	Valores médios obtidos na determinação da uniformidade de doses unitárias de comprimidos de SPR	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CED	-	Calorimetria exploratória diferencial
CLAE	-	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência
CSD	-	Banco de Dados de Estruturas Cristalinas de Cambridge (<i>Cambridge Structural Database</i>)
DP	-	Desvio padrão
DPR	-	Desvio padrão relativo
DRXP	-	Difração de Raio X por pó
HCl	-	Ácido clorídrico
IFA	-	Ingrediente farmacêutico ativo
IV	-	Infravermelho
IV-RTA	-	Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier acoplada ao dispositivo de reflectância total atenuada
LSS	-	Lauril sulfato de sódio
NCQ	-	Núcleo de Controle de Qualidade da UNIFAL-MG
SCB	-	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
SPR	-	Espironolactona
TA	-	Tampão acetato
TC	-	Tampão citrato
TF	-	Tampão fosfato
TG	-	Termogravimetria
UNITED	-	Farmacopeia dos Estados Unidos (<i>United States Pharmacopeia</i>)
UV	-	Espectrofotometria no ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	POLIMORFISMO – CONCEITOS E FUNDAMENTOS	17
2.2	EFEITO DO POLIMORFISMO EM SÓLIDOS FARMACÊUTICOS	19
2.3	CARACTERIZAÇÃO DE POLIMORFOS	21
2.4	AVALIAÇÃO DE POLIMORFOS	22
2.5	ESPIRONOLACTONA	24
3	OBJETIVOS	28
3.1	OBJETIVOS GERAIS	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	AMOSTRAS E REAGENTES	29
4.2	EQUIPAMENTOS	30
4.3	CARACTERIZAÇÃO DOS IFAS	31
4.3.1	Análises por difração de raio X por pó (DRXP)	31
4.3.2	Análises Térmicas	32
4.3.3	Análises por Espectroscopia de Absorção na região do infravermelho acoplada ao dispositivo de reflectância total atenuada (IV-RTA)	32
4.4	AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS IFAS E COMPRIMIDOS	32
4.4.1	Avaliação dos IFAs	33
4.4.1.1	Teor	33
4.4.1.2	Estudos de solubilidade	33
4.4.2	Avaliação dos comprimidos produzidos	34
4.4.2.1	Preparo da forma farmacêutica comprimido	34
4.4.2.2	Determinação de peso médio	35
4.4.2.3	Determinação da dureza	36
4.4.2.4	Determinação da uniformidade de doses unitárias	36
4.4.2.5	Ensaio de perfil de dissolução	37
4.4.3	Avaliação dos comprimidos comercializados	38
4.4.3.1	Ensaio de perfil de dissolução	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS IFAS	39

5.1.1	Análises por difração de raio X por pó (DRXP)	39
5.1.2	Análises térmicas	42
5.1.3	Análises por espectroscopia de absorção na região do infravermelho por reflectância total atenuada (IV-RTA)	45
5.2	AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS IFAS E COMPRIMIDOS	44
5.2.1	Avaliação dos IFAs	46
5.2.1.1	Teor.....	46
5.2.1.2	Estudos de solubilidade	47
5.2.2	Avaliação dos comprimidos produzidos	49
5.2.2.1	Preparo da forma farmacêutica comprimido	49
5.2.2.2	Determinação do Peso Médio.....	50
5.2.2.3	Determinação da dureza	50
5.2.2.4	Determinação da uniformidade de doses unitárias	51
5.2.2.5	Ensaio de perfil de dissolução	52
5.2.3	Avaliação da qualidade dos comprimidos comercializados	54
5.2.3.1	Ensaio de perfil de dissolução	54
6	CONCLUSÕES	58
	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

A preocupação relativa à qualidade, quando associada à atividade produtiva, foi sempre aspecto inerente ao ser humano, que busca inovar, aperfeiçoar e superar limites independentemente da atividade que exerça, a fim de atender aos anseios da sociedade consumidora. A indústria farmacêutica, por meio da tecnologia e fundamentada nas legislações, busca constantemente a qualidade nos serviços prestados e nos produtos disponibilizados aos usuários de medicamentos (AULTON, 2005).

Os medicamentos são formulados por incorporação de excipientes aos ingredientes farmacêuticos ativos (IFAs) através de processos de fabricação, sendo que a forma farmacêutica sólida, a qual envolve várias etapas de processo e tecnologias diversas, é preferida em relações às formulações líquidas (NUNN, 2005). Os IFAs, quando apresentados em formas farmacêuticas sólidas, como exemplo os comprimidos, geralmente são mais estáveis quimicamente quando comparados com as demais formas farmacêuticas cujo processo de degradação ocorre mais fácil e rapidamente (BERNSTEIN, 2002; BYRN, 1999; LEE; ERDEMIR; MYERSON, 2011; SHAN, 2008;). Além disso, a praticidade da via oral como forma de administração do medicamento é outro fator responsável pela prevalência da forma farmacêutica no estado sólido (DATTA, 2004) chegando a somar mais de 80% dos medicamentos disponíveis para comercialização (BABU; NANGIA, 2011). Entretanto, apesar de ser a forma mais utilizada, os medicamentos sólidos apresentam como um dos seus desafios o fenômeno do polimorfismo (LEE; ERDEMIR; MYERSON, 2011), que pode levar à perdas incalculáveis para a indústria farmacêutica (BAUER et al., 2001; PRADO; ROCHA, 2015).

O polimorfismo pode ser definido como a capacidade de um composto sólido apresentar-se em duas ou mais formas cristalinas, sendo compostos pela mesma composição química, porém com moléculas arranjadas em pelo menos dois diferentes modos no estado cristalino (BILTON et al., 1999; VIPPAGUNTA; BRITAIN; GRANT, 2001; KARPINSKI, 2006; DESIRAJU, 2008; PUROHIT; VENUGOPALAN, 2009; ARAÚJO et al., 2012; SANTOS et al., 2014; PRADO; ROCHA, 2015).

Em Ciências Farmacêuticas, o polimorfismo pode impactar sobre as propriedades farmacotécnicas e farmacocinéticas. O emprego de um polimorfo inadequado no estágio de

formulação ou qualquer conversão entre fases durante o processamento ou estocagem é indesejável e pode resultar em concentrações plasmáticas ineficazes ou tóxicas devido às diferenças nas taxas de absorção de diferentes polimorfos (BRITTAIN, 2009; SANTOS et al., 2014). Isto destaca que a identificação e a caracterização de diferentes formas cristalinas de um fármaco é de extrema importância para assegurar a sua estabilidade termodinâmica e condições cinéticas da dissolução/solubilidade, as quais são essenciais para garantir um comportamento reprodutível e a segurança do medicamento (ZHANG et al., 2004; VIPPAGUNTA; BRITTAIN; GRANT, 2001; LLINÀS; GOODMAN, 2008).

A espironolactona é fármaco de baixa solubilidade e alta permeabilidade, (TAKAHASHI et al., 2012; BCS DATABASE, 2015), pertencente à classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (AMIDON et al., 1995). É utilizada como diurético no tratamento da hipertensão arterial e, também, como agente antiandrogênico, sendo comercializado por diversos laboratórios farmacêuticos somente na forma farmacêutica comprimido. Registros na literatura (DIDEBERG; DUPONT, 1972; SALOLE; AL-SARRAJ, 1985; AGAFONOV; LEGENDRE; RODIER, 1989; AGAFONOV et al., 1991; NEVILLE; BECKSTEAD; COONEY, 1994; BERBENNI et al., 1999; NICOLAI et al., 2007) apontam diferentes fases cristalinas para esse fármaco o que desperta interesse em avaliar a ocorrência de polimorfos em IFAs e analisar o comportamento de liberação do fármaco na forma farmacêutica comprimidos. Apesar de todo conhecimento científico a respeito dos efeitos de transição de fase em fármacos no estado sólido, a maioria das monografias de compêndios oficiais ainda não constam ensaios específicos para caracterização de estruturas cristalinas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Embora o fenômeno do polimorfismo em fármacos seja conhecido desde a década de 60, foi a partir do caso com o Norvir[®] (ritonavir), utilizado para o tratamento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (HIV/AIDS), que a indústria farmacêutica passou a dar importância ao fenômeno (AALTONEN et al., 2009; SANTOS et al., 2014). Durante seu desenvolvimento apenas uma forma cristalina foi identificada. Entretanto em 1998, vários lotes de cápsulas não passaram no teste de dissolução devido ao aparecimento de um novo polimorfo mais estável e menos solúvel o qual se formou durante a fabricação (CHEMBURKAR, 2000; BAUER et al., 2001; LLINÀS; GOODMAN, 2008; SANTOS et al., 2014). Foi necessário retirar o medicamento Norvir[®] do mercado devido à incapacidade de produzir a forma eficaz, o que levou à perdas de milhões de dólares nas vendas apenas no ano de 1998, além de gastos incalculáveis para resolver esse problema (LEE; ERDEMIR; MYERSON, 2011; SANTOS et al., 2014).

Este fato deu visibilidade ao tema polimorfismo e despertou interesse das indústrias farmacêuticas e agências reguladoras em todo o mundo. Diante disso, torna-se necessário a identificação e caracterização de IFAs pela indústria farmacêutica, avaliação esta que envolve um conjunto de técnicas de caracterização capazes de produzir dados suficientes para confirmar a presença de diferentes formas cristalinas.

Sabe-se que a reprodutibilidade dos processos farmacêuticos não compreende uma tarefa fácil e que qualquer falha no processo produtivo pode traduzir em risco para a saúde do paciente, levando desde a ineficácia terapêutica à toxicidade. Por isso, a importância das análises de controle de qualidade em garantir a comercialização de medicamentos seguros para a população deve ser sempre destacada.

2.1 POLIMORFISMO – CONCEITOS E FUNDAMENTOS

O polimorfismo se constitui na habilidade de uma substância existir no estado sólido com, no mínimo, duas estruturas cristalinas diferentes, incluindo solvatos, hidratos, sais e co-cristais (AALTONEN et al., 2009; ARAÚJO et al., 2012; ATICI; KARLIGA, 2015; PRADO;

ROCHA, 2015). Stahly (2007) estimou que 80-90% dos compostos orgânicos podem exibir polimorfismo, e mais de metade dos IFAs demonstram diferentes formas sólidas. Associa-se que essa variedade de estruturas cristalinas seja proporcional ao tempo e ao dinheiro gasto no estudo (MCCAULEY; VARSOLONA; LEVORSE, 1993).

A estrutura cristalina caracteriza-se pelo agrupamento de aproximadamente 1020 moléculas em um arranjo regular com repetição tridimensional e ordem à longo alcance (BERNSTEIN et al., 1999; ARAÚJO et al., 2012). Quando a distribuição das moléculas se dá de forma aleatória, o termo utilizado é “amorfo” (ARAÚJO et al., 2012).

Os compostos podem cristalizar-se com moléculas de solventes, sendo as quantidades estequiométricas ou não-estequiométricas (ATICI; KARLIGA, 2015). Ao incorporar o solvente ao retículo cristalino, ocorre a formação dos solvatos, cujo termo que designa tal fenômeno é solvatomorfismo (anteriormente denominado pseudopolimorfismo). Se o solvente de cristalização incorporado é a água, este é denominado hidrato (FDA, 2007; EUROPEAN PHARMAPOEIA 6th Edition, 2008).

Alguns IFAs são eletrólitos fracos e formam sais. Cada sal apresenta propriedades físico-químicas únicas, geralmente abrangendo uma série maior de formas sólidas. A denominação “sal” é atribuída quando ocorre a existência de cargas entre as unidades formadoras do cristal (CHILDS; STAHL; PARK, 2007; MARTINS, 2010). Já os “co-cristais” são modificações cristalinas em que fármacos cristalizam junto com outras espécies moleculares que não estejam dissociadas (MARTINS, 2010; PRADO; ROCHA, 2015).

O termo amorfo designa um sólido que não tem estrutura cristalina definida (BRITTAIN, 2009), ou seja, átomos ou moléculas estão distribuídos sem apresentar ordem e periodicidade (ARAÚJO et al., 2012; ATICI; KARLIGA, 2015; PRADO; ROCHA, 2015). Dois amorfos podem assumir propriedades distintas, devido à sistemas com constantes energéticas diferentes oriundas das diversas configurações que as moléculas ou átomos podem adotar (PRADO; ROCHA, 2015). A forma amorfa é a mais solúvel e apresenta menor estabilidade (HANCOCK; PARKS, 2000; YU, 2001; CHIENG et al., 2009).

A diversidade de formas cristalinas é ocasionada pelos diferentes processos de cristalização e eventos que ocorrem durante a produção de um medicamento (YU; REUTZEL; STEPHENSON, 1998; LYN et al., 2011).

O polimorfismo e seus diferentes efeitos nos sólidos são explicados pela existência de diferentes ligações intermoleculares. Moléculas de fármacos são geradas por átomos conectados por ligações covalentes, enquanto que os cristais desses fármacos são formados por moléculas conectadas através de interações intermoleculares. Essas ligações de natureza

não covalente, tais como ligações de hidrogênio, ligações de van der Waals, ligações π - π e interações eletrostáticas, determinam o arranjo das moléculas em um cristal (ETTER; MACDONALD; BERNSTEIN, 1990; DESIRAJU, 1995; PUROHIT; VENUGOPALAN, 2009).

O polimorfismo pode ainda ser classificado em polimorfismo conformacional ou “por empacotamento”. No primeiro, as moléculas flexíveis apresentam diferentes conformações e, assim, empacotam-se em diferentes arranjos. No segundo, as moléculas são normalmente rígidas e empacotadas de forma diferente dentro da célula unitária de cada polimorfo (SARMA et al., 2011; PRADO; ROCHA, 2015). Entretanto, muitos casos de polimorfismo de IFAs têm origem a partir dos dois mecanismos, exibindo os polimorfos, diferenças na conformação e no empacotamento das moléculas (VIPAGUNTA; BRITAIN; GRANT, 2001; ARAÚJO et al., 2012; PRADO; ROCHA, 2015).

2.2 EFEITO DO POLIMORFISMO EM SÓLIDOS FARMACÊUTICOS

A importância do polimorfismo na área de ciências farmacêuticas se deve ao fato da existência de matérias-primas, utilizadas na fabricação de medicamentos, que podem se apresentar em várias formas cristalinas. As diferentes interações intra e intermoleculares que ocorrem com polimorfos de um mesmo IFA podem afetar muitas propriedades físico-químicas importantes (ALLESØ et al., 2008). As interações estabilizam conformações moleculares e afetam propriedades como: morfologia da partícula, densidade, higroscopicidade, compressibilidade, dureza, fluxo do pó, granulometria, ângulo de repouso, entalpia e entropia, capacidade calorífica, temperatura de fusão e ebulição, estabilidade, solubilidade e velocidade de dissolução, entre outras. Estas diferenças influenciam desde o processamento dos insumos farmacêuticos até a biodisponibilidade do fármaco (PAYGHAN et al., 2010; LEE; ERDEMIR; MYERSON, 2011; ATICI; KARLIGA, 2015).

A possível alteração na biodisponibilidade de um medicamento é considerada a consequência do polimorfismo mais preocupante para a indústria farmacêutica e órgãos regulatórios. Essa propriedade está diretamente relacionada com a absorção do fármaco, e é importante para determinar se uma concentração terapêuticamente eficaz do princípio ativo alcançará o seu sítio de ação e desencadeará a atividade farmacológica esperada (AULTON, 2005; PRADO; ROCHA, 2015).

A diferença de solubilidade dos ativos farmacêuticos é a principal causa de alteração na biodisponibilidade de um produto farmacêutico (PISEGNA; GILSON; BUTLER, 2014). Para os ativos que apresentam alta solubilidade, as preocupações são mínimas (YU et al., 2003), porém para os ativos com baixa solubilidade, em que a velocidade de dissolução é o fator limitante para a absorção do fármaco (LLINÀS; GOODMAN, 2008), a biodisponibilidade pode ser afetada (LÁNG et al., 2013). Os produtos de baixa solubilidade são classificados como classe II e IV no sistema de classificação biofarmacêutica (SCB). Neste sistema, os fármacos são subdivididos em quatro categorias: classe I – fármacos de alta solubilidade e alta permeabilidade; classe II – baixa solubilidade e alta permeabilidade; classe III – alta solubilidade e baixa permeabilidade; classe IV – baixa solubilidade e baixa permeabilidade.

Conseqüentemente, com a biodisponibilidade afetada, dificuldades na obtenção de bioequivalência entre formulações contendo diferentes polimorfos podem ser encontradas, levando a produtos ineficazes ou com maior atividade farmacológica, podendo levar à reações adversas intensas ou até mesmo à toxicidade. Além disso, o polimorfismo pode influenciar na estabilidade física e química de medicamentos, devido às diferenças termodinâmicas dos polimorfos (SAIFEE et al., 2009).

Deve-se também ampliar os estudos em relação à estabilidade e à conversão entre fases polimórficas durante a estocagem dos medicamentos em drogarias e farmácias, para que não ocorram alterações das propriedades de estado sólido, e, portanto, a eficácia dos medicamentos seja garantida (MARTINS, 2010). Como exemplo de transição, pode-se citar um sólido amorfo, que por apresentar menor estabilidade termodinâmica, dependendo das condições de armazenamento e umidade, pode cristalizar-se e gerar uma forma menos solúvel, o que conseqüentemente prejudicaria a biodisponibilidade do fármaco (PRADO; ROCHA, 2015).

A dificuldade ao se tratar do fenômeno do polimorfismo é que é impossível estabelecer uma regra universal sobre a tendência de comportamento, pois diferentes interações intermoleculares estão envolvidas em cada forma cristalina, e os efeitos são únicos para cada substância (PRADO; ROCHA, 2015).

Diante disso, um rigoroso controle de qualidade, envolvendo a caracterização e estudo da fase sólida presente no medicamento deve ser realizado para que seja garantido o efeito terapêutico e sejam cumpridas as exigências dos órgãos regulatórios quanto à qualidade do produto farmacêutico (BONFILIO et al., 2012). No entanto, para a grande maioria dos ativos farmacêuticos, a identificação de polimorfos não é um teste obrigatório solicitado por

compêndios oficiais. Por outro lado, em algumas monografias (UNITED 38, 2015), por exemplo orbifloxacino, carbamazepina e ritonavir, entre outras, o polimorfismo de fármacos já é descrito como teste de identificação usando difração de raios X por pó (DRXP), destacando-se a importância das pesquisas na área e um maior comprometimento das autoridades regulatórias.

2.3 CARACTERIZAÇÃO DE POLIMORFOS

A possibilidade de um fármaco cristalizar-se em diferentes estruturas leva à necessidade de uma criteriosa avaliação dos IFAs e produtos acabados pela indústria farmacêutica, avaliação esta que envolve um conjunto de técnicas de caracterização que geram dados capazes de confirmar a presença de diferentes formas cristalinas (PRADO; ROCHA, 2015).

Existem diversos métodos avançados para identificação e caracterização de polimorfos, sendo esses os cristalográficos, espectroscópicos, térmicos e microscópicos. Atualmente têm-se empregado técnicas combinadas que permitem uma abordagem multidisciplinar em uma única análise, economizando tempo, amostra e custos operacionais.

A DRXP é muito utilizada na identificação qualitativa de fases ou de misturas de fases e é uma das técnicas mais importantes para caracterização de polimorfos (ZACCARO et al., 2001; PRADO; ROCHA, 2015).

O método consiste na difração de raios X de um único comprimento de onda pelos planos cristalinos do material. A difração do material está diretamente relacionada à distância que separa os planos em um cristal, obedecendo à lei de Bragg. Quando um feixe de raios X incide sobre um cristal constituído de planos atômicos sucessivos este é difratado, gerando um ângulo característico. Os planos de difração e suas respectivas distâncias interplanares, são características específicas e únicas de cada cristal, da mesma forma que o padrão de difração por ele gerado (PRADO; ROCHA, 2015).

As análises térmicas são técnicas em que determinadas propriedades físico-químicas de uma substância são monitoradas em função da temperatura, sendo a amostra submetida a uma programação controlada de temperatura sob atmosfera específica. As mais utilizadas para investigação de polimorfismo são calorimetria exploratória diferencial (CED) e a termogravimetria (TG) (PRADO; ROCHA, 2015).

A calorimetria exploratória diferencial é responsável por medir a diferença de fluxo de calor fornecido entre a amostra e um material de referência em função de um programa de aquecimento ou resfriamento (OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011; PRADO; ROCHA, 2015). A técnica é capaz de fornecer dados sobre as temperaturas de fusão e entalpia de cada forma cristalina em materiais puros ou misturas e informações sobre a cinética de transformações no estado sólido. Importante, também, na identificação de formas estáveis e metaestáveis (PRADO; ROCHA, 2015).

A termogravimetria é utilizada para medir a variação da massa da amostra em função da temperatura em uma atmosfera controlada sob um programa de aquecimento/ou tempo (OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011). As análises são restritas às transições que envolvam perda ou ganho de massa e sua aplicação é comum em estudos de processos de dessolvatação e decomposição (BRITTAIN, 2009; PRADO; ROCHA, 2015). Importante, também, para determinar quantitativamente compostos voláteis e diferenciar solvatos e anidros de determinada substância (PRADO; ROCHA, 2015).

As técnicas espectroscópicas são sensíveis às estruturas, às conformações e ao ambiente de um composto e, estudam as vibrações moleculares fundamentais (ZACCARO et al., 2001; PRADO; ROCHA, 2015). O espectro de um IFA se dá a partir dos grupamentos químicos da molécula, o qual produz bandas em regiões características. A posição e a intensidade de uma banda vibracional são características do movimento molecular, podendo os polimorfos apresentar deslocamentos de bandas devido às diferentes interações intermoleculares (DETOISIEN et al., 2011; PRADO; ROCHA, 2015). Consequentemente, estes espectros são impressões digitais das formas sólidas, oferecendo informações sobre a estrutura e conformação molecular do sólido (BRITTAIN, 2009).

O desenvolvimento da espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (IV) fez com que esta análise fosse usada na rotina e recomendada pelas farmacopeias para identificação química de IFAs (SONG; SOHN, 2011; OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011; PRADO; ROCHA, 2015). Quando esta técnica é acoplada ao dispositivo de reflectância total atenuada (RTA), agrega-se como vantagem a isenção de preparo inicial da amostra com pastilhas convencionais e, portanto, a identificação passar a ser direta, além de não exercer pressão sobre o IFA, prevenindo a transição de fases.

2.4 AVALIAÇÃO DE POLIMORFOS

O polimorfismo em sólidos farmacêuticos pode alterar as propriedades físico-químicas de um ativo. Quando as diferenças de solubilidade entre polimorfos são significantes, a biodisponibilidade de um produto farmacêutico pode ser modificada, principalmente para fármacos de baixa solubilidade - classes II e IV do SCB – em que a velocidade de dissolução é o fator limitante para a absorção (AMIDON et al., 1995; LLINÀS; GOODMAN, 2008). Conseqüentemente, isto pode dificultar a obtenção de bioequivalência entre formulações contendo diferentes polimorfos de um mesmo fármaco.

Esse é um dado preocupante, pois ao considerar que diferentes formas cristalinas expressam velocidades de dissolução e solubilidades diferentes e, normalmente a absorção de um fármaco é dependente desses dois parâmetros (AMIDON et al., 1995; FDA, 2007), em casos extremos o polimorfismo pode ocasionar toxicidade ou ineficácia terapêutica.

Os principais ensaios realizados para se prever estes efeitos são a solubilidade em equilíbrio dos IFAs e a dissolução em formas farmacêuticas sólidas.

O termo dissolução compreende o processo pelo qual uma forma sólida se dissolve em um solvente, em uma dada temperatura. Já solubilidade é a condição de equilíbrio do processo de dissolução, caracterizado pela máxima concentração do fármaco no meio de dissolução em uma dada temperatura (AULTON, 2005).

O ensaio de solubilidade em equilíbrio permite identificar qual forma cristalina é mais solúvel e conseqüentemente menos estável, e também avaliar o possível efeito do polimorfismo nos perfis de dissolução de medicamentos. Fármacos que apresentam diferentes solubilidades em equilíbrio podem apresentar distintas eficácias farmacológicas (MARTINS, 2010).

Os testes de dissolução são comumente empregados na rotina de controle de qualidade para orientar o desenvolvimento de novas formulações, monitorar variações lote a lote, assegurar a manutenção da qualidade e desempenho de um produto após certas mudanças, suportar a biodisponibilidade de um novo produto e a bioequivalência de um candidato a genérico ou similar (SERRA; STORPIRTIS, 2007; PASA et al., 2008). Como o polimorfismo pode influenciar na biodisponibilidade do fármaco, este ensaio também deve ser considerado na avaliação da qualidade dos medicamentos (BONFILIO et al., 2012; 2014).

A dissolução *in vitro* determina a porcentagem da quantidade de ativo liberado no meio de dissolução dentro do período de tempo especificado nas monografias oficiais do fármaco, utilizando-se de aparelhagem específica (BRASIL, 2010a). Entretanto, quando se deseja conhecer o comportamento de dois medicamentos na avaliação de efeitos de mudanças

em formulações, em estudos de estabilidade em estudos de equivalência farmacêutica, são utilizados os perfis de dissolução (SERRA; STORPIRTIS, 2007). O perfil de dissolução é obtido por meio da quantificação de fármaco dissolvido em várias alíquotas, as quais são coletadas em intervalos de tempo predefinidos (ALVES et al., 2012). A avaliação do perfil de dissolução permite uma melhor visualização das diferenças entre as formulações e, portanto, também são adequados para estudos de influência de polimorfismo em comprimidos.

2.5 ESPIRONOLACTONA

A espironolactona (SPR) é designada quimicamente como 7α -tioacetil-3-oxo- 17α -pregn-4-eno-21, γ -carbolactona (Figura 1). Apresenta como fórmula molecular $C_{24}H_{32}O_4S$, seu peso molecular é 416,58 mg/mol, $\log p = 2,78$ e $pka = - 4,9$ e $18,01$. O pó cristalino é de coloração creme a castanho claro, praticamente insolúvel em água, solúvel em álcool e acetato de etila, muito solúvel em clorofórmio e benzeno, e ligeiramente solúvel em metanol (BRANDÃO et al., 2008; ZHANG et al., 2014).

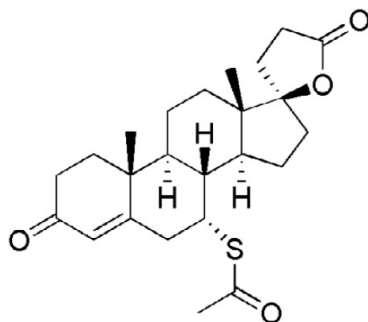


Figura 1 - Estrutura química da espironolactona ($C_{24}H_{32}O_4S$).

Fonte: Da autora.

O ativo foi introduzido clinicamente em 1959, é um esteróide sintético e atua como diurético poupador de potássio sendo utilizado para tratar condições em que há um excesso de aldosterona no organismo. A aldosterona, hormônio produzido pelas glândulas supra-renais, é responsável pelo equilíbrio hidroeletrólítico dos indivíduos (GIRON, 1995; SOLIMAN et al., 1997; ISMAIL et al., 2014; RAHUL et al., 2014). A SPR é um antagonista competitivo da

aldosterona, portanto age excretando sódio e água, enquanto o potássio é retido. Atua nos receptores mineralocorticoides de aldosterona nos rins, mais precisamente no túbulo distal (RAM et al., 2012; ISMAIL et al., 2014; ZHANG et al., 2014;).

É conhecida como o principal diurético e anti-hipertensivo utilizado no tratamento de edema refratário associado com insuficiência cardíaca congestiva, ascite hepática e hipertensão essencial (GIRON, 1995; SOLIMAN et al., 1997; ISMAIL et al., 2014; RAHUL et al., 2014; PISEGNA; GILSON; BUTLER, 2014; ZHANG et al., 2014). É também utilizada para tratar ou prevenir hipocalcemia (RAHUL et al., 2014), além de exercer atividade anti-androgênica através da competição aos receptores, impedindo-os de interagir com a di-hidrotestosterona (RAM et al., 2012).

A SPR tem início de ação lento, bem como a cessação do efeito e excreção prolongada (RAM et al., 2012). Apresenta alto metabolismo de primeira passagem, efeito máximo no terceiro dia e excreção entre dois a três dias. É conhecida por apresentar polimorfismo no estado sólido e incompleta absorção via oral devido à sua baixa solubilidade em água, o que pode influenciar a sua velocidade de liberação (AGAFONOV et al., 1991; LIEBENBERG, 2005), sendo classificada como classe II no SCB (TAKAHASHI et al., 2012; BCS DATABASE, 2015). Diferentes propriedades físico-químicas da SPR estão relacionadas a sua habilidade em arranjar-se em diferentes formas cristalinas devido à sua flexibilidade molecular (SALOLE; AL-SARRAJ, 1985a; BERBENNI et al., 1999; LIEBENBERG, 2005).

O comportamento polimórfico da SPR foi descoberto ao estudar polimorfos obtidos por diferentes solventes de recristalização a partir dos ensaios de fusão, infravermelho (IV), DRXP, CED por El-Dash e colaboradores em 1983 (PISEGNA; GILSON; BUTLER, 2014). Após dois anos, Salole & Al-Sarraaj (1985a, 1985b) avaliaram três polimorfos e cinco solvatos pelos ensaios de IV, TG, CED e DRXP (NEVILLE; BECKSTEAD; COONEY, 1994). Entretanto não foram indexados os padrões de raio X por pó e acredita-se que as amostras se tratavam de misturas de fases e não polimorfos puros (AGAFONOV et al., 1991).

Antes disso, em 1972 na Bélgica, Dideberg e Dupont reportaram a determinação da primeira estrutura cristalina de SPR intitulada como forma I (Figura 2). Já em 1989, os franceses Agafonov, Legendre e Rodier, determinaram outra estrutura cristalina identificada como forma II (Figura 2). Ainda há relatos na literatura da existência de cinco solvatos (metanol, etanol, acetonitrilo, acetato de etilo e benzeno) de SPR (AGAFONOV et al., 1991; NEVILLE; BECKSTEAD; COONEY, 1994; ZHANG et al., 2014).

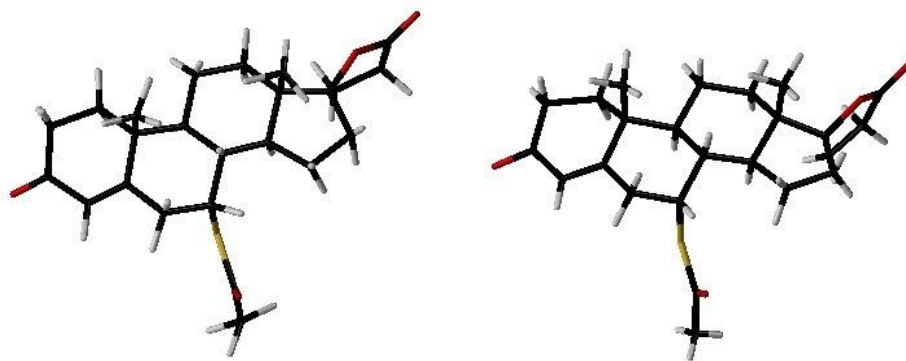


Figura 2 - Estruturas moleculares da espironolactona, forma I e II.
Fonte: Da autora.

Nos dois polimorfos (forma I e II), o núcleo esteróide (anéis A, B, C e D) é aproximadamente planar e perpendicular ao anel E e ao grupo lateral 7α -tioacetil. Uma sutil diferença é percebida na conformação dos anéis A, D e E, o que produz empacotamento molecular e hábitos distintos (Figura 3) (AGAFONOV; LEGENDRE; RODIER, 1989; PISEGNA; GILSON; BUTLER, 2014). As distâncias intermoleculares são constituídas principalmente por ligações de Van der Waals (AGAFONOV; LEGENDRE; RODIER, 1989; AGAFONOV et al., 1991).

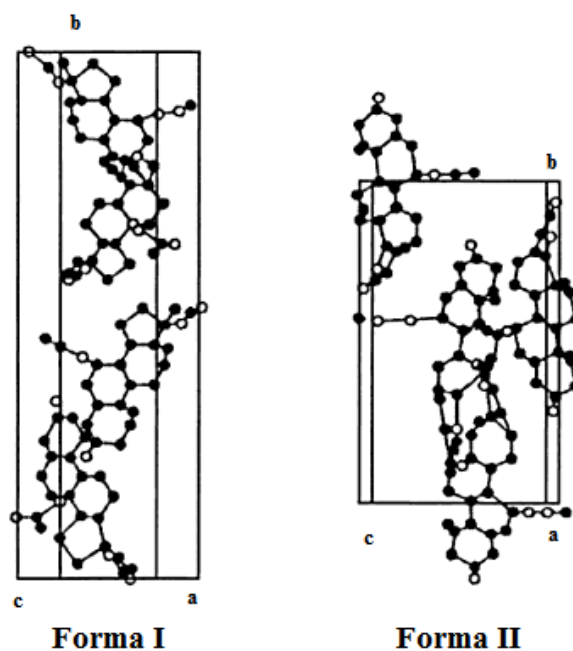


Figura 3 - Empacotamento molecular de dois polimorfos de SPR: forma I e forma II.
Fonte: AGAFONOV et al. (1991).

Enquanto a estrutura macroscópica, também denominada como hábito, da forma I aponta o formato de agulhas longas, a forma II evidencia cristais prismáticos (AGAFONOV; LEGENDRE; RODIER, 1989). A Tabela 1 descreve as diferenças nas dimensões da célula unitária das formas I e II que se cristalizam em uma fase ortorrômbica (DIDEBERG; DUPONT, 1972; AGAFONOV; LEGENDRE; RODIER, 1989; NEVILLE; BECKSTEAD; COONEY, 1994; NICOLAI et al., 2007).

Tabela 1 - Parâmetros de rede da célula unitária de espironolactona, forma I e forma II.

	Forma I (Dideberg; Dupont, 1972)	Forma II (Agafonov; Legendre; Rodier, 1989)
Grupo de espaço	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
a/Å	9,979	10,584
b/Å	35,573	18,996
c/Å	6,225	11,005
Volume célula unitária/ Å ³	2209,8	2212,6

Fonte: Da autora.

Entre estas formas cristalinas, a forma II é termodinamicamente mais estável do que os solvatos e a forma I e, também, é a forma amplamente comercializada de SPR (NICOLAI et al., 2007; ZHANG et al., 2014). O volume da célula unitária da forma I é ligeiramente menor que a da Forma II e ao imprimir alta pressão a partir da análise de espectroscopia de Raman, Pisegna, Gilson e Butler (2014), verificaram que ambas sofrem transição estrutural. Na ausência de espectroscopia de Raman de alta pressão acoplada a um difratômetro de raio X por pó, não foi possível concluir em qual forma cristalina ambos os polimorfos se transformaram (PISEGNA; GILSON; BUTLER, 2014).

Embora haja relatos na literatura de ocorrência de diferentes formas cristalinas para a SPR e apesar de ser um fármaco relativamente antigo no mercado, não há estudos sobre a influência na qualidade físico-química de formas farmacêuticas para comercialização com presença de polimorfos.

3 OBJETIVOS

Os objetivos do trabalho estão apresentados abaixo.

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a ocorrência de polimorfismo em matérias-primas e verificar a qualidade físico-química de comprimidos produzidos contendo formas cristalinas de espironolactona.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O objetivo geral do trabalho foi subdividido em etapas:

- a) Investigar e caracterizar polimorfos em diferentes lotes de matérias-primas (IFAs) de espironolactona pela técnica de difração de raio X por pó;
- b) Selecionar matérias-primas que apresentam diferentes formas cristalinas e caracterizá-las pelas técnicas de espectroscopia infravermelho por reflectância total atenuada e análises térmicas utilizando calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria;
- c) Avaliar a influência da presença de diferentes formas cristalinas na qualidade físico-química dos IFAs, através de ensaios de solubilidade em equilíbrio pelo método *shake-flask*;
- d) Produzir a forma farmacêutica comprimido com IFAs que contêm polimorfos utilizando a técnica de compressão direta;
- e) Avaliar o impacto dos polimorfos na forma farmacêutica de comprimidos fabricada através de estudos de perfis de dissolução;
- f) Realizar estudos de perfil de dissolução com medicamentos comercializados no mercado brasileiro por diferentes laboratórios, na forma farmacêutica comprimido incluindo referência, genérico e similar.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais e métodos utilizados estão descritos nos itens 4.1, 4.2 e 4.3.

4.1 AMOSTRAS E REAGENTES

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico cromatográfico e espectrofotométrico, disponibilizados pelo Núcleo de Controle de Qualidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas-MG (NCQ/FCF-UNIFAL-MG).

A substância química de referência (SQR) utilizada foi padrão secundário validado (SPR-pd 2° NCQ) com teor de 102,4% (Galena[®]/ data de validade: 10/2018) e o medicamento referência Aldactone[®] 50 mg (PfizerTM/data de validade: 08/2017), identificado por SPR-R (SPR referente à espironolactona, e R referente à medicamento referência).

Foram selecionados cinco lotes de IFAs de SPR provenientes de diferentes origens a partir de dois critérios de seleção: 1) data de validade e 2) quantidade disponibilizada. Os IFAs foram identificados como SPR-L1 à L5, sendo que as informações sobre os lotes estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Informações sobre IFAs de espironolactona utilizados no estudo.

IFA	Código do Fornecedor / País de Origem	Validade (MM/AAAA)	Teor (%)
SPR-L1	F1 / China	11/2016	99,9
SPR-L2	F2 / China	11/2017	99,3
SPR-L3	F3 / Índia	10/2018	99,2
SPR-L4	F3 / Índia	05/2017	98,9
SPR-L5	F4 / China	06/2014	100,0

Fonte: Da autora.

Nota: F: Fornecedor; L: Lote; MM/AAAA: Mês/Ano; SPR: Espironolactona.

Comprimidos de espironolactona comercializados no mercado brasileiro, oriundos de diferentes laboratórios, foram avaliados. Dos comprimidos classificados como genérico avaliaram-se três lotes, identificados como SPR-G1, SPR-G2 e SPR-G3 e um lote de

comprimido classificado como similar, identificado como SPR-S. As informações sobre os comprimidos avaliados estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Informações sobre comprimidos comercializados utilizados no estudo.

Comprimido	Código do Fabricante / Estado de Origem	Validade (MM.AAAA)	Dosagem declarada (mg)
SPR-G1	IF1 / SP	05/2017	50
SPR-G2	IF2 / SP	09/2016	50
SPR-G3	IF3 / SP	02/2017	50
SPR-S	IF2 / SP	07/2017	50
SPR-R	IF4 / SP	08/2017	50

Fonte: Da autora.

Nota: G: Medicamento genérico; IF: Indústria Farmacêutica; MM/AAAA: Mês/Ano;

R: Medicamento Referência; SP: São Paulo; S: Medicamento Similar; SPR: Espironolactona.

4.2 EQUIPAMENTOS

- Aparelho de ultrassom – Unique[®], modelo USC 2800A (São Paulo, Brasil).
- Balança analítica – Marte[®], modelo AY 220 (São Paulo, Brasil).
- Balança analítica – Acculab[®], modelo ALC 210.4 (São Paulo, Brasil).
- Balança de topo – Acculab[®], modelo VIC 303 (São Paulo, Brasil).
- Calorímetro – SII Nano Technology[®], modelo EXSTAR DSC 7020 (Tóquio, Japão).
- Coluna C18 – Agilent Technology[®], 150 mm x 4,6 mm x 5 µm (Santa Clara, Estados Unidos da América).
- Compressora rotativa – Lemaq[®], modelo LM08B (São Paulo, Brasil).
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência – Shimadzu[®], série LC-10A (Quioto, Japão); acoplado ao detector ultravioleta – Shimadzu[®], SPD-10AVP (Quioto, Japão).
- Difrátômetro de raio X por pó – Rigaku[®], modelo Ultima IV (Tóquio, Japão).
- Dissolutor – Electrolab[®], modelo TDL-08 L (n=8) (Maharashtra, Índia).
- Durômetro automático de bancada autônomo – Nova Ética[®], modelo 298 ATTS (São Paulo, Brasil).
- Espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier – Shimadzu[®], modelo

Affinity-1 (Tóquio, Japão); acoplado ao acessório de amostragem por reflectância total atenuada – Pike Miracle[®] (Wisconsin, Estados Unidos da América).

- Espectrofotômetro UV/Vis – Shimadzu[®], modelo UV-1800 PC (Quioto, Japão).
- Filtros de PTFE hidrofílicos – Advantec[®], 13 mm x 0,50 µm (Califórnia, Estados Unidos da América).
- Mesa agitadora – Solab[®], modelo SL 180 DT (São Paulo, Brasil).
- pHmetro – Marconi[®], modelo PA 200 (São Paulo, Brasil).
- Sistema de purificação de água – Millipore[®], modelo Direct-Q 5 (São Paulo, Brasil); acoplado a sistema purificador de água – Gehaka[®], modelo osmose reversa 10 LTH (São Paulo, Brasil).
- Termobalança – SII Nano Technology[®], modelo EXSTAR TG/DTA-7300 (Tóquio, Japão).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS IFAS

Para caracterização dos IFAs foram utilizadas as técnicas de difração de raio X por pó, análises térmicas (calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria) e espectroscopia na região do infravermelho acoplada ao dispositivo de reflectância total atenuada.

4.3.1 Análises por difração de raio X por pó (DRXP)

As amostras de IFAs foram colocadas individualmente sobre lâmina de vidro e inserida no suporte de amostra do difratômetro de raio X por pó (*Rigaku*[®]), modelo *Ultima IV*. As análises foram realizadas nas seguintes condições: radiação monocromática por filtro de Cu ($K\alpha$ Cu, $\lambda = 1,54187 \text{ \AA}$); varreduras no intervalo de 5 a 40° 2 θ , à temperatura ambiente, com passo ótico de 0,02° em 2 θ , corrente de 30 mA, tensão de 40 kV, velocidade de varredura de 1° 2 θ .min⁻¹. As análises foram realizadas visando obter dados para identificação e triagem dos ativos farmacêuticos quanto a presença de polimorfos entre as amostras.

4.3.2 Análises Térmicas

As curvas termoanalíticas de CED foram obtidas pesando-se cerca de 5,0 – 7,0 mg dos IFAs de SPR em cadinhos de alumínio e colocado sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min⁻¹) com razões de aquecimento de 5, 10, 15 e 20 °C.min⁻¹ a uma faixa de variação de temperatura de 30 a 240 °C. O instrumento foi calibrado com um padrão de índium.

As medidas de TG foram realizadas pesando-se cerca de 5,0 – 7,0 mg de amostra em cadinho de alumínio aberto, colocada sob atmosfera de nitrogênio (50 mL.min⁻¹) com fluxo de calor de 10 °C.min⁻¹ na faixa de aquecimento de 40 a 400 °C. O equipamento foi calibrado com um padrão de índium para a temperatura e um peso de calibração de alumina para a massa.

As amostras foram analisadas em Calorímetro (*SII Nano Technology*[®]), modelo *EXSTAR X-DSC7020* e Termobalança (*SII Nano Technology*[®]) modelo *EXSTAR TG/DTA-7300*.

4.3.3 Análises por Espectroscopia de Absorção na região do infravermelho acoplada ao dispositivo de reflectância total atenuada (IV-RTA)

As amostras na forma de pó, foram analisadas em infravermelho (*Shimadzu*[®]) modelo *Affinity-1*, e os dados foram coletados a temperatura ambiente, na região entre 4000 - 600 cm⁻¹. As especificações das medidas são: modo transmitância, número de scans de 32 e resolução de 4,0 cm⁻¹.

4.4 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS IFAS E COMPRIMIDOS

Os ensaios realizados seguiram as especificações descritas nas monografias de espirolactona, matéria-prima e comprimidos, da Farmacopeia Americana 38^a edição (UNITED 38, 2015). De acordo com as monografias do fármaco, a maioria dos ensaios é

quantificada por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE), enquanto que apenas o ensaio de dissolução por espectrofotômetro no ultravioleta (UV).

Os parâmetros cromatográficos recomendados pela Farmacopeia Americana 38ª edição (UNITED 38, 2015) para análise de teor dos IFAs e uniformidade dos comprimidos de espironolactona foram: coluna C18 (150 x 4,6 mm x 5 µm), temperatura do forno: 25 °C, fase móvel composta por metanol:água ultrapura (6:4, v/v), fluxo da fase móvel: 1 mL.min⁻¹, volume de injeção: 20 µL, detectores: UV e DAD = 230 nm.

A quantificação da espironolactona nas amostras do ensaio de perfil de dissolução foi realizada por espectrofotometria no ultravioleta à $\lambda=242$ nm (UNITED 38, 2015).

4.4.1 Avaliação dos IFAs

Os ensaios considerados importantes para avaliar a influência do polimorfismo em IFAs foram a determinação do teor e a solubilidade em equilíbrio.

4.4.1.1 Teor

As amostras de cada lote dos IFAs para o ensaio de teor foram preparadas em solução de acetonitrila:água ultrapura (1:1, v/v) na concentração de 40 µg.mL⁻¹. O teor de cada IFA foi obtido por CLAE a partir da comparação das áreas das amostras (n=5), com as áreas obtidas pela injeção de solução de padrão secundário de espironolactona na mesma concentração (n=3).

4.4.1.2 Estudos de solubilidade

Os testes de solubilidade foram realizados pelo método do equilíbrio, empregando-se a técnica de agitação em frasco (*shake-flask*) em mesa agitadora.

Adicionou-se cada IFA em recipientes com 5 mL dos meios aquosos selecionados (n=3) até observar a saturação da solução com formação de corpo de fundo. Após, as réplicas de cada meio foram agitadas a 150 rpm sob temperatura ambiente por 48 horas. A suspensão obtida foi filtrada com o auxílio de filtros de PTFE hidrofílicos. As amostras foram diluídas 1:1 em fase móvel e injetadas em CLAE para quantificação.

Os meios selecionados foram água ultrapura; ácido clorídrico (HCl) 0,01M; ácido clorídrico 0,1M; ácido clorídrico 0,1M com 0,1% lauril sulfato de sódio (LSS); tampão citrato de sódio (TC) 0,1M pH=3,0; tampão acetato de sódio (TA) 0,1M pH=4,5; tampão fosfato de potássio (TF) 0,1M pH=6,2; tampão fosfato de potássio 0,1M pH=7,2. Todos esses meios foram preparados de acordo com a Farmacopeia Americana 38ª Edição (UNITED 38, 2015) e os valores de pH atenderam a faixa de pH fisiológica. O meio composto por HCl 0,1M com 0,1% LSS foi adicionado ao estudo pois este é o meio descrito na Farmacopeia Americana 38ª Edição (UNITED 38, 2015) como meio de dissolução de comprimidos.

As solubilidades dos IFAs, em cada meio, foram estatisticamente comparadas utilizando o teste *t-Student*. Valores de $p < 0,01$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.4.2 Avaliação dos comprimidos produzidos

Os ensaios considerados importantes para avaliar a qualidade dos comprimidos produzidos e a influência de polimorfos presentes nos comprimidos foram: determinação do peso médio, dureza, uniformidade do conteúdo e perfil de dissolução.

4.4.2.1 Preparo da forma farmacêutica comprimido

Foram preparados dois lotes de comprimidos (A e B). O lote A foi preparado a partir do IFA (SPR-L1) que foi identificado contendo contaminação da forma I (minoritário) na forma II (majoritário) de SPR. O lote B foi preparado com IFA (SPR-L2) identificado apenas como a forma II de SPR.

Os lotes foram fabricados utilizando a técnica por compressão direta, na mesma dosagem e dureza aproximada dos comprimidos do medicamento de referência Aldactone® 50

mg. A produção foi embasada na composição qualitativa dos excipientes descritos na bula do medicamento referência. A quantidade utilizada de cada excipiente foi calculada baseando-se em um valor médio do intervalo estipulado de acordo com a literatura (AULTON, 2005). Os excipientes utilizados na preparação da forma farmacêutica comprimido estão representados na Tabela 4.

Tabela 4 – Valores percentuais de excipientes utilizados no preparo dos comprimidos de 50 mg dos IFAs de SPR, por compressão direta.

Excipientes	Teor
Amido	6,5%
Celulose microcristalina	77,0%
Dióxido de silício (Aerosil)	0,5%
Estearato de magnésio	1,0%
Lactose monohidratada	15%

Fonte: Da autora.

No preparo da formulação, quantidades de SPR-L1 e SPR-L2 proporcionais a trinta comprimidos de cada IFA foram adicionados a quantidades exatas do mesmo placebo, misturados e separados em porções referentes ao peso de um único comprimido (409 mg) para compressão individual na máquina rotativa de punção de 10 mm. A pressão da máquina compressora foi ajustada para dureza mais próxima possível do comprimido referência Aldactone[®] 50mg.

Alguns comprimidos contendo somente o placebo foram também preparados para posterior comparação e eliminação de possíveis interferências no teste de dissolução.

4.4.2.2 Determinação de peso médio

Pesou-se, individualmente, em balança analítica (Marte[®]) modelo AY 220, vinte comprimidos e calculados o peso médio. De acordo com a especificação, para comprimidos não revestido com peso superior a 250 mg, não mais que duas unidades poderiam estar fora do limite de 5% em relação ao peso médio, e nenhuma poderá estar acima ou abaixo de 10% (BRASIL, 2010a).

4.4.2.3 Determinação da dureza

O teste de dureza é considerado oficial e determina a resistência do comprimido ao esmagamento ou à ruptura sob pressão radial. A dureza de um comprimido é proporcional à força de compressão e inversamente proporcional à sua porosidade (BRASIL, 2010a).

Para verificação da dureza, utilizou-se o durômetro de bancada autônomo (Nova Ética[®]), modelo 298 ATTS. A determinação foi realizada com 5 comprimidos dos lotes produzidos (A e B) e 10 comprimidos do medicamento referência, e o resultado expresso em média (kgf) dos valores obtidos nas determinações. De acordo com a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010a) este resultado é apenas informativo.

4.4.2.4 Determinação da uniformidade de doses unitárias

Foi realizada a quantificação de 5 comprimidos individuais dos lotes A e B com a finalidade de avaliar a homogeneidade de ativo entre as unidades fabricadas. O preparo da amostra foi realizado de acordo com o descrito na monografia de comprimidos de espironolactona da Farmacopeia Americana (UNITED 38, 2015). O ensaio consiste nas seguintes etapas:

- a) Acondicionar cada comprimido em balão volumétrico adequado (100 mL) e adicionar quantidade suficiente de diluente (solução de acetonitrila: água ultrapura 1:1, v/v).
- b) Agitar e levar para banho de Ultrassom por 30 minutos.
- c) Completar o volume com diluente e homogeneizar.
- d) Filtrar a solução ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) com filtro adequado, retirar alíquota e quantificar por CLAE.

Para cálculo do teor de SPR nos comprimidos produzidos, solução referência de padrão secundário ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi preparada seguindo as mesmas condições. Os resultados foram expressos em % teor e DPR.

4.4.2.5 Ensaio de perfil de dissolução

Os dois lotes de comprimidos (lote A e lote B) preparados de acordo com o item 4.4.2.1 foram submetidos ao perfil de dissolução partindo das condições preconizadas pela monografia de comprimidos de espirolactona da Farmacopéia Americana (UNITED 38, 2015). As condições utilizadas foram: meio de dissolução: 1000 mL HCl 0,1M com 0,1% lauril sulfato de sódio; aparato de agitação: pá; velocidade de agitação: 75 rpm. Aliquotou-se 10 mL do meio de dissolução (temperatura controlada: $37 \pm 0,5$ °C) após 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 90 min, seguido de substituição imediata do volume retirado. Estes intervalos de tempos foram utilizados, pois a partir deles foi possível obter a curva de dissolução. As alíquotas foram filtradas em papel de filtro quantitativo, diluídas 1:1 em meio de dissolução e analisadas pelo método espectrofotométrico no UV ($\lambda=242$ nm).

Para cada lote produzido, seis amostras foram ensaiadas. A quantificação foi possível a partir da determinação da absorvância média obtida pela solução padrão de SPR na concentração de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($n=5$) diluída no meio de dissolução. Segundo a monografia do fármaco, em 60 minutos não menos que 75% do fármaco deveriam estar dissolvidos no meio (UNITED 38, 2015).

Os resultados dos perfis foram avaliados pelo Método Modelo Independente Simples, calculando-se o fator de semelhança (F2) entre as curvas dos perfis através da equação seguinte:

$$f2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n (Rt - Tt)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\}$$

sendo que, n = número de tempos de coleta considerados para fins de cálculo;

Rt = valor de porcentagem dissolvida em cada ponto de tempo t , obtido com o lote de referência;

Tt = valor de porcentagem dissolvida do lote teste em cada ponto de tempo t .

A semelhança ou equivalência de dois perfis é observada quando os valores de F2 se apresentarem entre 50 e 100 (BRASIL, 2010a; FDA, 2014).

4.4.3 Avaliação dos comprimidos comercializados

Comprimidos comercializados no mercado brasileiro foram avaliados em relação ao perfil de dissolução para verificar a equivalência terapêutica entre eles.

4.4.3.1 Ensaio de perfil de dissolução

Obteve-se os perfis de dissolução, conforme procedimento descrito no item 4.4.2.5, de um lote de cada laboratório farmacêutico que produz comprimidos de SPR 50 mg disponíveis no mercado farmacêutico brasileiro. Dos comprimidos classificados como genérico avaliaram-se três lotes (SPR-G1, SPR-G2 e SPR-G3) e um lote de comprimido classificado como similar (SPR-S1), além do comprimido referência Aldactone[®] (SPR-R).

Para cada lote avaliado, seis amostras foram ensaiadas. A quantificação foi possível a partir da determinação da absorvância média obtida pela solução padrão de SPR na concentração de $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (n=5) diluída no meio de dissolução. Segundo a monografia do fármaco, em 60 minutos não menos que 75% do fármaco deveriam estar dissolvidos no meio (UNITED 38, 2015).

A eficiência de dissolução ($ED_{0-90\%}$) foi calculada a partir do perfil de dissolução de cada medicamento comercial avaliado, conforme descrito por Anderson et al. (1998). Para isso, a porcentagem de área sob a curva do tempo zero até 90 minutos foi calculada a partir de cada perfil de dissolução.

Os resultados de $ED_{0-90\%}$ foram avaliados estatisticamente usando análise de variância seguida de teste *Tukey* para comparação de médias. O nível de significância utilizado foi de $\alpha=1\%$. Valores de $p < 0,01$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS IFAS

5.1.1 Análises por difração de raio X por pó (DRXP)

A partir da técnica de DRXP é possível identificar formas cristalinas presentes nos IFAs, pois diferentes empacotamentos do cristal resultam em modificações no arranjo e repetição deste. Consequentemente, diferentes formas sólidas em IFAs resultam em padrões de difração distintos (AGATONOVIC-KUSTRIN et al., 2001; BONFILIO et al., 2014).

Para identificação de formas cristalinas presentes em IFAs de SPR, os difratogramas experimentais das matérias-primas (IFA-L1 a L5) e SQR (SPR-pd2° NCQ) foram comparadas com os dados de difração das estruturas depositadas no Banco de Dados de Estruturas Cristalinas de Cambridge (*Cambridge Structural Database – CSD*) para forma I (DIDEBERG; DUPONT, 1972) e forma II (AGAFONOV; LEGENDRE; RODIER, 1989) de SPR, conforme apresentado na Figura 4.

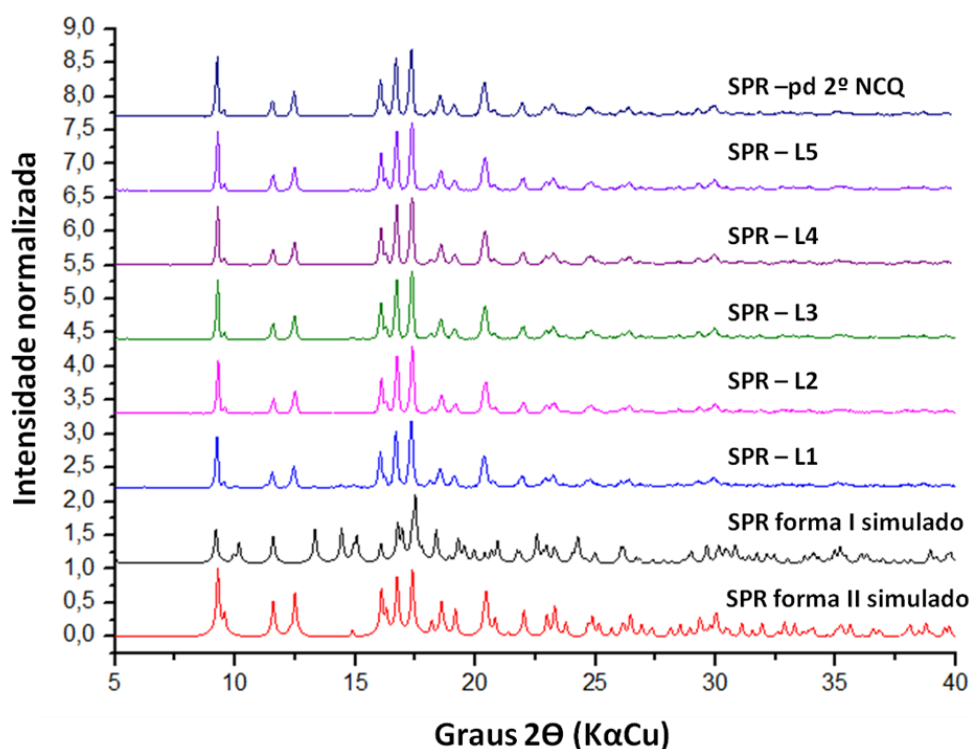


Figura 4 - Difratogramas de IFAs (SPR-L1 à L5) e SQR (SPR-pd2° NCQ) de SPR em comparação com difratogramas da forma I e forma II simulados de SPR.
Fonte: Da autora.

Ao estudar os difratogramas das amostras, o polimorfo identificado na SPR- pd2° NCQ e nos IFAs SPR-L2, SPR-L3, SPR-L4 e SPR-L5 foi a forma II conforme demonstrado na Figura 5. Esse resultado era esperado, pois esta forma é a mais estável e amplamente utilizada pelas indústrias farmacêuticas (NICOLAI et al., 2007; ZHANG et al., 2014).

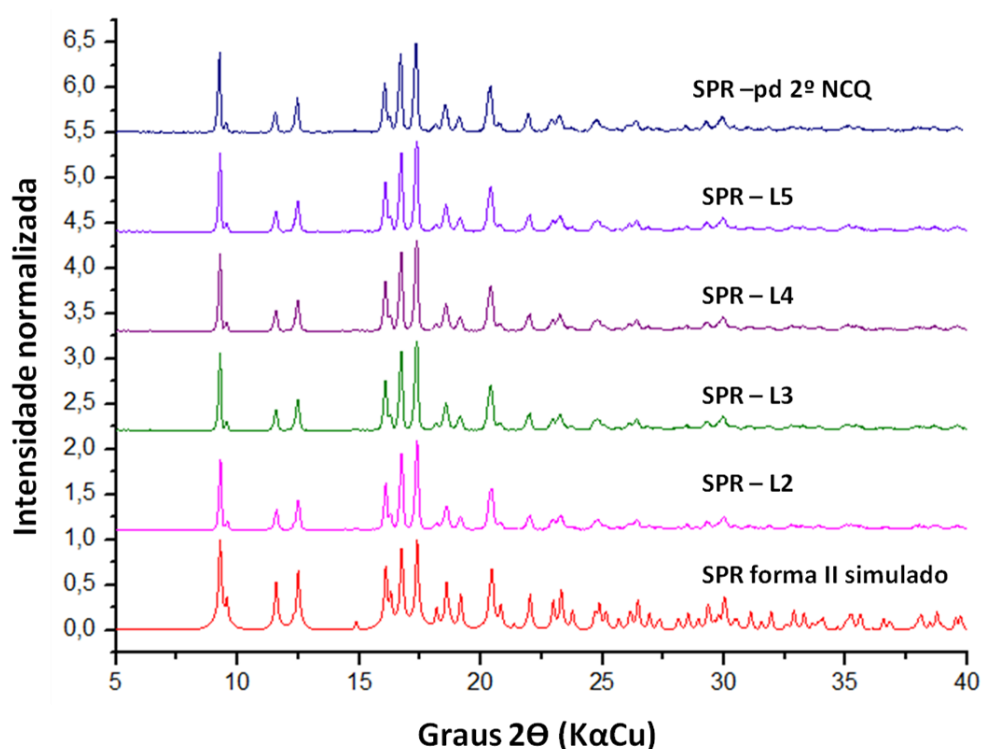


Figura 5 - Difratogramas de SPR-L2, SPR-L3, SPR-L4, SPR-L5 e SPR-pd2° NCQ em comparação com o padrão de difração simulado da forma II de SPR.

Fonte: Da autora.

Ao analisar criteriosamente o difratograma do IFA SPR-L1 pode-se observar na Figura 6, picos correspondentes à forma II e alguns picos (destacados pelas setas) característicos da forma I.

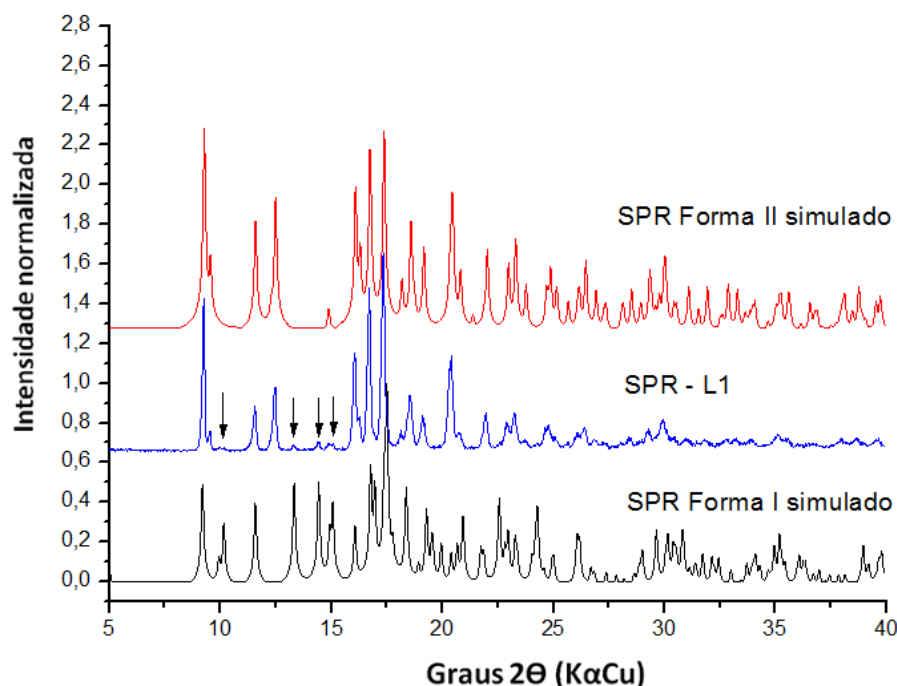


Figura 6 - Difratograma de SPR-L1 em comparação com o padrão de difração simulado das formas I e II de SPR.

Fonte: Da autora.

Os picos destacados são correspondentes à forma I como 10,1; 13,2; 14,6 e 15,2 °2θ; o que caracteriza esse lote como mistura de fases sólidas ou mais precisamente como contaminação da forma I (minoritário) na forma II (maioritário) de SPR (Figura 6). Liebenberg e colaboradores (2003) estudaram cinco amostras de matérias-primas de SPR através da técnica de DRXP com variação de temperatura. Os autores também caracterizaram um dos lotes como mistura das formas I e II e utilizaram os mesmos picos de Bragg para justificar a presença da forma I.

Esses resultados evidenciam que matérias-primas de espirolactona provenientes de diferentes fabricantes podem conter composições polimórficas distintas. Esse fenômeno pode ter impacto direto na eficácia dos produtos formulados. Por isso foram selecionados os IFAs SPR-L1 (contaminação da forma I na forma II) e SPR-L2 (apenas forma II) para dar continuidade aos testes, com o objetivo de avaliar o impacto da contaminação da forma II pela forma I, comparando os perfis de dissolução de comprimidos produzidos com os IFAs selecionados. Os dois lotes de IFAs foram tamisados cuidadosamente, selecionou-se a porção de maior rendimento (partículas maiores que 60 mesh – 250 μm – e menores que 48 mesh – 300 μm) para dar continuidade aos testes, após verificação que as formas I e II mantiveram no IFA SPR-L1.

5.1.2 Análises térmicas

Os experimentos de TG e CED foram realizados a fim de caracterizar, identificar mistura de formas cristalinas na mesma amostra e verificar a estabilidade térmica e decomposição das amostras.

Na caracterização por análise térmica da SPR-pd 2° NCQ (Figura 7) a fusão ocorreu em 209,1 °C ($T_{onset} = 203,0$ °C), temperatura próxima das descritas por Espeau e colaboradores (ESPEAU et al., 2007) e Agafonov e colaboradores (AGAFONOV et al., 1991), com fusão em 209 °C e 210 °C respectivamente, confirmando esta SQR como forma II.

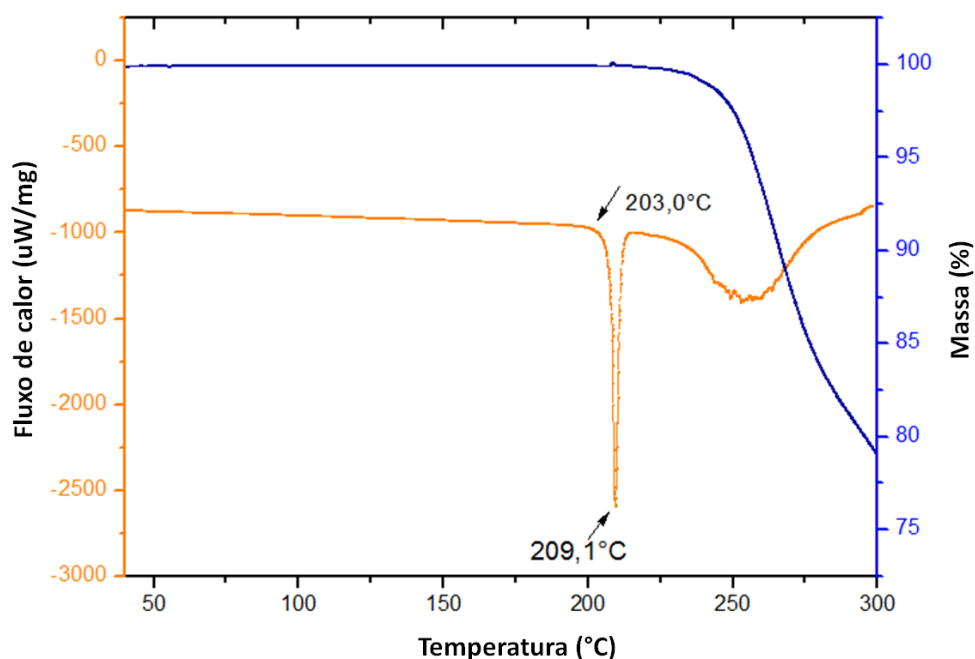


Figura 7 - Curva termoanalítica por CED e TG da SQR (SPR-pd2° NCQ) de SPR. Razão de aquecimento: 10 °C.min⁻¹ (40 a 300 °C).

Fonte: Da autora.

Comparando as curvas termoanalíticas dos IFAs, uma pequena diferença na temperatura de fusão das amostras foi verificada (Figura 8). As análises de calorimetria exploratória diferencial foram realizadas em triplicata e o desvio padrão relativo (DPR) foi calculado. O SPR-L2 composto por apenas uma forma cristalina teve seu ponto médio de fusão em 209,2 °C ($m = 5,63$ mg / DPR: 0,09% / $T_{onset}: 202,7$ °C / $\Delta H_{fusão} = 45,2$ mJ.mg⁻¹), enquanto que a temperatura média de fusão do SPR-L1 foi de 207,0 °C ($m = 5,62$ mg / DPR:

0,05% / T_{onset} : 197,3 °C / $\Delta H_{fusão} = 43,6 \text{ mJ.mg}^{-1}$). Pequenas diferenças de temperatura de fusão entre matérias-primas de SPR também foram encontradas por Liebenberg e colaboradores (LIEBENBERG et al., 2003). Neste estudo, foram caracterizados dois lotes de matérias-primas contendo mistura das formas I e II com fusão em 204 °C e matérias-primas contendo apenas forma II com fusão entre 205 – 206 °C.

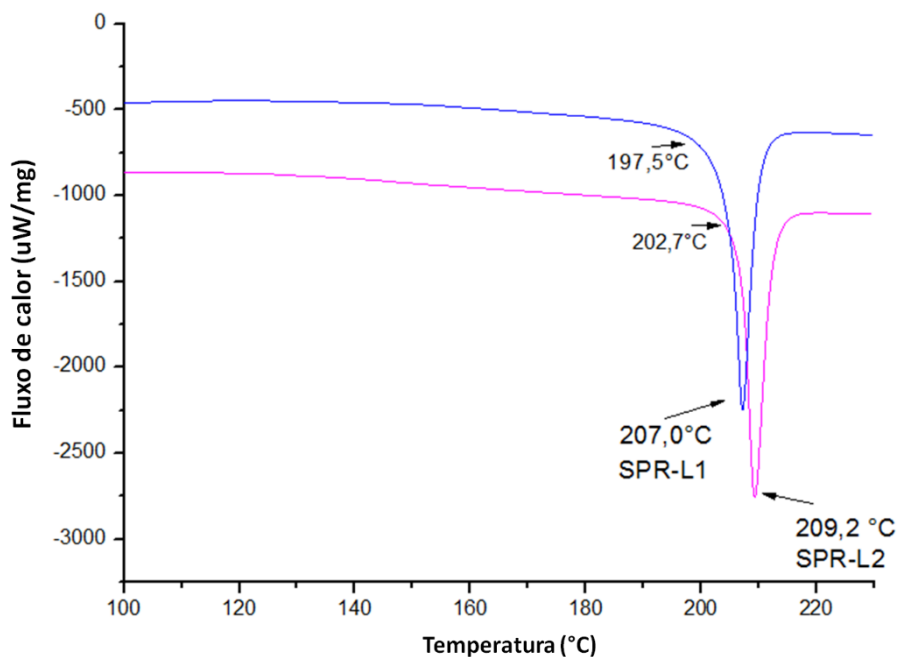


Figura 8 - Curva termoanalítica por CED dos IFAs SPR-L1 e SPR-L2 de SPR.
Razão de aquecimento: 10 °C.min^{-1} (100 a 230 °C).
Fonte: Da autora.

A justificativa do IFA SPR-L1 apresentar menor temperatura de fusão e menor $\Delta H_{fusão}$, é pelo fato deste IFA ser composto por pequena quantidade da forma I que é termodinamicamente menos estável (AGAFONOV et al., 1991; LIEBENBERG et al., 2003, ESPEAU et al., 2007).

De acordo com Agafonov e colaboradores (AGAFONOV et al., 1991) a forma I de SPR funde em 205 °C e a forma II em 210 °C, sendo a última termodinamicamente mais estável (AGAFONOV et al., 1991; LIEBENBERG et al., 2003, ESPEAU et al., 2007). A partir dessas informações, foram realizadas análises por calorimetria exploratória diferencial do SPR-L1 modificando as razões de aquecimento ($n=3$), a fim de observar eventos de fusão correspondentes à cada forma cristalina (Figura 9).

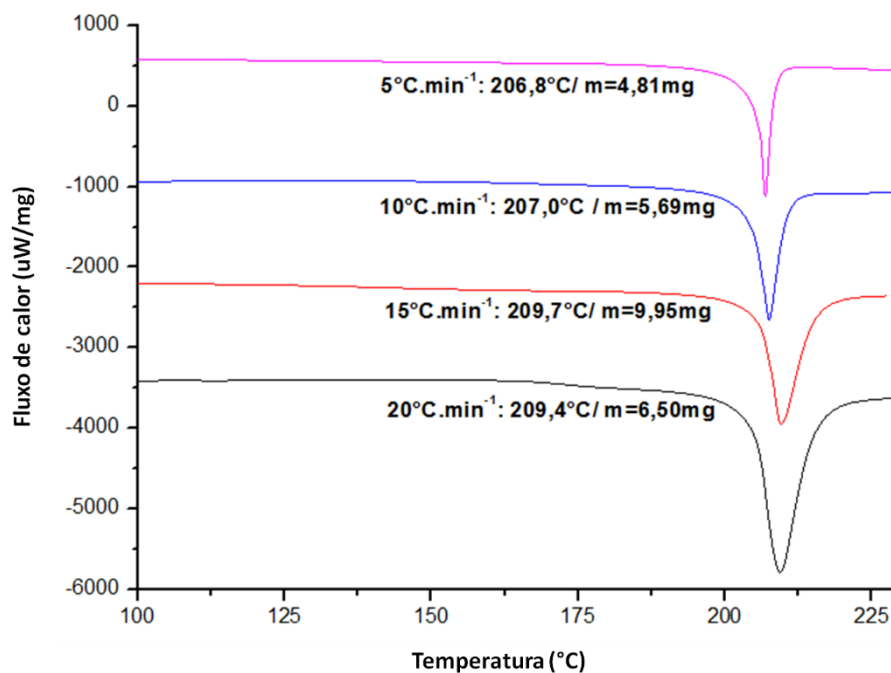


Figura 9 - Curvas termoanalíticas por CED do SPR-L1 a partir de diferentes razões de aquecimento (5, 10, 15 e 20 °C.min⁻¹).

Fonte: Da autora.

Como demonstrado na Figura 9, é possível concluir que eventos distintos de fusão para as formas I e II não foram observados nestas condições de estudo, corroborando com Liebenberg e colaboradores (LIEBENBERG et al., 2003) ao estudarem por calorimetria exploratória diferencial matérias-primas contendo mistura de polimorfos. Isso pode ser justificado devido à proximidade entre os pontos de fusão das formas cristalinas.

Ao avaliar as curvas termoanalíticas (Figura 10), verifica-se que os IFAs têm decomposição acentuada a partir de 250 °C, concordando com trabalho de Agafonov e colaboradores (AGAFONOV et al., 1991).

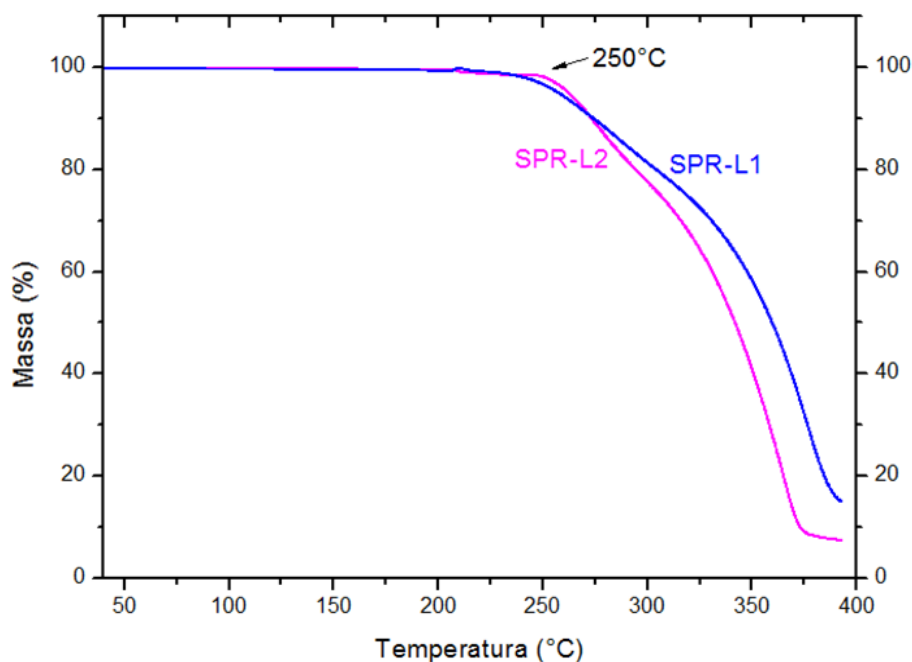


Figura 10 - Curvas termoanalíticas por TG de SPR-L1 e SPR-L2 obtidas a partir de razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

Fonte: Da autora.

5.1.3 Análises por espectroscopia de absorção na região do infravermelho por reflectância total atenuada (IV-RTA)

A técnica de infravermelho por reflectância total atenuada foi realizada com a finalidade de comparar os espectros dos IFAs e identificar distintos modos vibracionais da forma I e II no SPR-L1. Os espectros obtidos após análise em triplicata da SQR (SPR-pd2° NCQ) e dos IFAs (SPR-L1 e SPR-L2) estão exibidos na Figura 11. A sobreposição dos picos e a ocorrência dos estiramentos em 1689 cm^{-1} referente ao grupamento tio-acetil, 1766 cm^{-1} referente à γ -lactona, 1668 cm^{-1} referente à ligação C=O esteroidal e estiramentos em 1615 cm^{-1} corresponde à ligação C=C esteroidal, fornecem a identificação da forma II de SPR segundo trabalho publicado por Berbenni e colaboradores (BERBENNI et al., 1999).

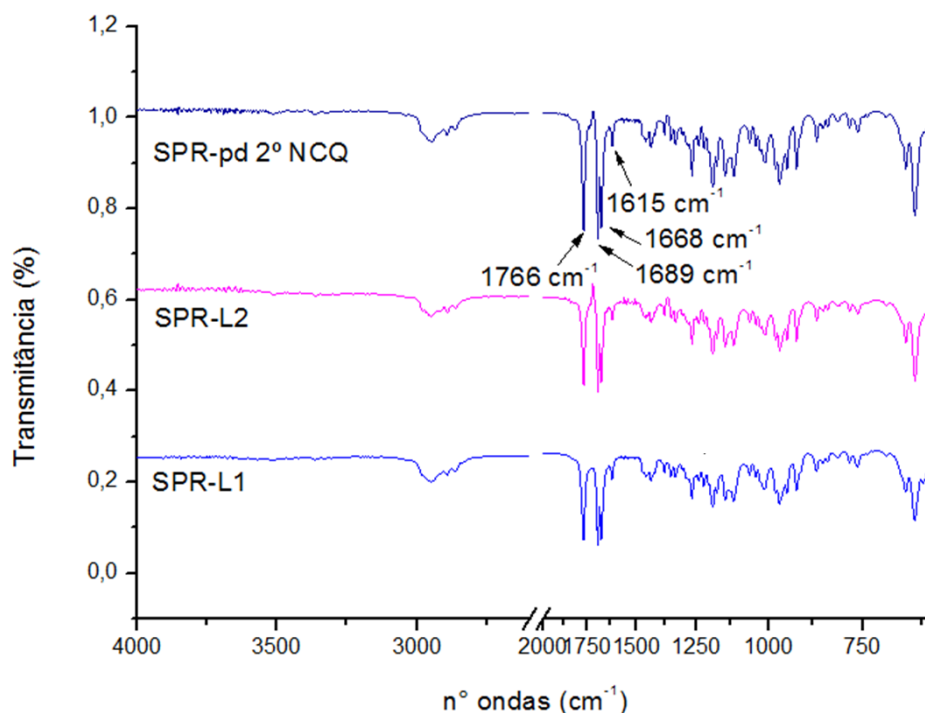


Figura 11 – Espectros de absorção na região do IV-RTA para SPR em SQR e IFAs.
Fonte: Da autora.

Ao comparar criteriosamente os estiramentos vibracionais das amostras, não foi possível discriminar diferenças entre elas. Isso pode ser relacionado ao fato das formas I e II apresentarem pequenas diferenças na conformação, as quais não poderiam ser evidenciadas por infravermelho. Berbenni e colaboradores (1999) estudaram quatro solvatos de SPR e verificaram apenas dois tipos distintos de comportamento vibracional alegando assim, a dificuldade desta técnica em diferenciar polimorfos de SPR. Em suma, ao estudar IFAs com mistura de polimorfos de SPR, a diferenciação por essa técnica torna-se improvável.

5.2 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS IFAS E COMPRIMIDOS

5.2.1 Avaliação dos IFAs

5.2.1.1 Teor

De acordo com a Farmacopeia Americana (UNITED 38, 2015) o intervalo especificado para o teor de SPR na monografia do ativo é de 97,0 – 103,0% para ser aprovado. A solução referência de SPR-pd2° NCQ (102,4% de teor) foi realizada em triplicata ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$), enquanto que os IFAs SPR-L1 e SPR-L2 em quintuplicata ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e injetados em cromatógrafo a líquido de alta pressão.

Os resultados estão expressos em média de teor (%) e DPR, conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores médios de percentagem de teor dos IFAs, calculados a partir do teor da solução referência de padrão secundário ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Amostras	Média teor (%)	DPR
SPR-L1 (n = 5)	99,90	0,43
SPR-L2 (n = 5)	99,26	0,89

Fonte: Da autora.

De acordo com a Tabela 5, os percentuais de teor dos IFAs selecionados para produção dos comprimidos apresentaram resultados dentro das especificações, indicando elevada pureza e aprovação no ensaio.

5.2.1.2 Estudos de solubilidade

Para determinar a solubilidade dos IFAs de SPR com base na concentração obtida em cada meio estudado, uma curva de calibração com seis pontos de concentração (10, 20, 40, 60, 80, $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi construída utilizando solução referência de SPR-pd2° NCQ em acetonitrila:água ultrapura (1:1, v/v). A partir das médias de área em cada concentração da curva, obteve-se a equação da reta: $y = 46719x + 9188,3$ ($R^2 = 0,9995$), a qual foi utilizada para quantificar a solubilidade do fármaco (Figura 12).

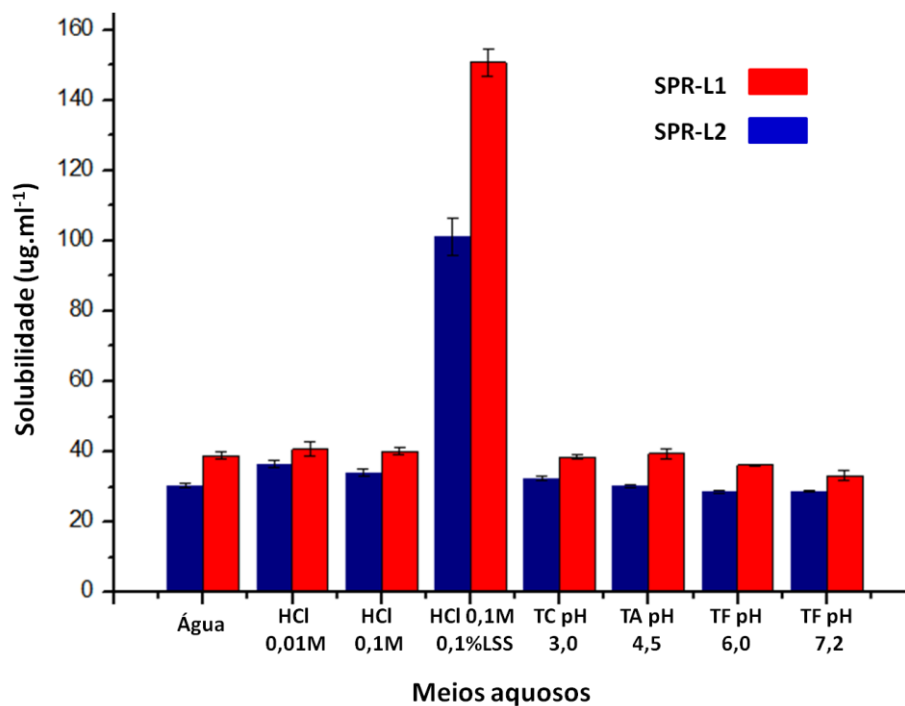


Figura 12 - Gráfico comparativo da solubilidade dos IFAs de SPR nos meios aquosos testados.

Fonte: Da autora.

Como demonstrado na Figura 12, a solubilidade do IFA SPR-L1 (contaminação de fases cristalinas) é maior em todos os meios estudados. Esta observação foi estatisticamente confirmada pelo teste *t-Student* ($p < 0,01$) em todos os meios. A Tabela 6 traz os valores de solubilidade ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e desvio padrão relativo dos IFAs SPR-L1 e SPR-L2 nos meios fisiológicos testados.

Tabela 6 - Valores de solubilidade ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e desvio padrão (DP) dos IFAs nos meios aquosos testados.

Meio	SPR - L1		SPR - L2	
	($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	DP	($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	DP
Água ultrapura	38,87	0,97	30,36	0,41
HCl 0,01M	40,66	2,02	36,47	7,92
HCl 0,1 M	40,05	0,96	33,99	1,12
HCl 0,1 M com 0,1% LSS	150,74	3,78	101,10	5,20
Tampão citrato de sódio pH = 3,0	38,51	0,43	32,32	0,64
Tampão acetato de sódio pH = 4,5	39,38	1,57	30,29	0,36
Tampão fosfato de potássio pH = 6,2	36,21	0,23	28,58	0,49
Tampão fosfato de potássio pH = 7,2	33,24	1,44	28,71	0,34

Fonte: Da autora.

Conforme dados descritos na Tabela 6 e na Figura 12, os IFAs foram cerca de 3 a 4 vezes mais solúveis no meio composto por HCl 0,1M com 0,1% de LSS do que os demais meios, sendo esse meio preconizado pela Farmacopeia Americana (UNITED 38, 2015) para o ensaio de dissolução de comprimidos. Esse aumento na solubilidade é devido à inclusão de LSS, o qual é um surfactante aniônico que melhora a solubilidade de ativos pouco solúveis em água devido à formação de uma solução micelar que solubiliza o fármaco (RUELA; ARAÚJO; PEREIRA, 2009).

Analisando as solubilidades no meio composto por HCl 0,1M com 0,1% de LSS a concentração de SPR foi de 150,74 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para SPR-L1 e 101,10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para SPR-L2. Neste meio a solubilidade foi 1,5 vezes maior para o IFA composto por contaminação da forma I e maior parte constituída pela forma II, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$), confirmando que a presença da forma I aumenta consideravelmente a solubilidade do fármaco. Consequentemente a velocidade de dissolução deste IFA pode ser maior em relação ao polimorfo II puro de SPR podendo influenciar na biodisponibilidade e consequentemente pode afetar a ação terapêutica do fármaco.

5.2.2 Avaliação dos comprimidos produzidos

5.2.2.1 Preparo da forma farmacêutica comprimido

Após a produção dos comprimidos foram realizados ensaios oficiais para verificar a qualidade dos lotes e avaliar se determinadas características estão em conformidade com especificações estabelecidas. Os ensaios considerados importantes para avaliar a reprodutibilidade dos lotes foram: peso médio, dureza e uniformidade de doses unitárias.

A biodisponibilidade de produtos farmacêuticos é dependente da dissolução do fármaco a partir da forma farmacêutica bem como da solubilidade do ingrediente farmacêutico ativo (BONFILIO et al., 2014). Por isso, para melhor estudar a influência do polimorfismo na liberação de SPR, no ensaio de perfil de dissolução, foram preparados dois lotes distintos de comprimidos: lote A (contendo contaminação da forma I – minoritário; e forma II – maioritário: SPR-L1) e lote B (contendo apenas a forma II: SPR-L2), os quais foram submetidos ao teste de perfil de dissolução.

5.2.2.2 Determinação do Peso Médio

Os resultados da determinação de peso médio dos comprimidos referência Aldactone[®] (SPR-R), lote A (SPR-L1) e lote B (SPR-L2) estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Valores de peso médio, faixa permitida pela especificação e DPR das formulações de comprimidos estudadas.

Amostras (n=20)	Peso médio (mg)	± 5%	Faixa permitida (mg)	Faixa encontrada (mg)	DPR
SPR-R	409,2	± 20,5	388,7 – 429,7	396,0 – 423,7	1,90
Lote A (SPR-L1)	413,2	± 20,7	392,5 – 433,9	411,2 – 414,8	0,23
Lote B (SPR-L2)	409,5	± 20,5	389,0 – 430,0	407,5 – 411,0	0,20

Fonte: Da autora.

Os comprimidos formulados e o medicamento referência apresentaram resultados de variação de peso dentro da faixa especificada, segundo a qual o limite de variação permitido é de 5%. Nenhuma unidade ficou fora da faixa e os pesos médios dos comprimidos tiveram valores próximos entre si, indicando reprodutibilidade na produção dos lotes.

5.2.2.3 Determinação da dureza

Durante a produção dos comprimidos, a pressão da compressora foi ajustada o mais próximo da média de dureza obtida pelos comprimidos referência Aldactone[®] (SPR-R). Foram selecionados 10 comprimidos do medicamento referência e 5 comprimidos dos lotes A e B, porque foram produzidos número restrito devido a pequena quantidade de matéria-prima disponível.

Os resultados da determinação da dureza dos comprimidos identificados como referência Aldactone[®] (SPR-R), lote A (SPR-L1) e lote B (SPR-L2) estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Valores de dureza (em Kgf) das formulações de comprimidos estudadas, expresso em média e DPR.

Amostras	Dureza média (Kgf)	DPR
SPR-R (n = 10)	12,3	14,7
Lote A (SPR-L1) (n = 5)	11,4	13,0
Lote B (SPR-L2) (n = 5)	11,8	10,5

Fonte: Da autora.

Esse teste é apenas informativo e caracteriza a forma farmacêutica, buscando a homogeneidade na resistência mecânica dos comprimidos entre lotes produzidos pela indústria farmacêutica. De acordo com os resultados obtidos, as médias da dureza dos comprimidos apresentaram valores próximos, sendo que o medicamento referência foi utilizado como parâmetro para o desenvolvimento das formulações de comprimidos produzidas a partir dos diferentes IFAs.

5.2.2.4 Determinação da uniformidade de doses unitárias

Para determinar a dose em cada unidade de comprimido avaliada, inicialmente foram obtidas soluções referência de SPR-pd² NCQ (50 µg.mL⁻¹) em quintuplicata, as quais foram preparadas seguindo as mesmas condições dos comprimidos. Após a obtenção dos resultados, foi calculado a média (considerada 100%). Assim, foi possível calcular o teor (%) em cada unidade de comprimidos e os resultados foram expressos em média de teor (%) e DPR, conforme apresentado na Tabela 9.

Tabela 9 - Valores médios obtidos na determinação da uniformidade de doses unitárias de comprimidos de SPR.

Amostras	Média teor (%)	DPR	Dose
SPR-R (n = 10)	100,97	3,83	50,00 mg
Lote A (SPR-L1) (n = 5)	99,68	2,12	49,36 mg
Lote B (SPR-L2) (n = 5)	99,39	0,83	49,22 mg

Fonte: Da autora.

Todos os comprimidos avaliados (formulados e medicamento referência) apresentaram valores de unidade de dose conforme as especificações. A homogeneidade do ativo que se

desejava avaliar foi comprovada a partir do resultado de DPR (menor que 2,2% para os lotes produzidos), indicando que possíveis diferenças nos perfis de dissolução não estão relacionadas à dosagem dos comprimidos, o que torna possível avaliar a influência de distintos polimorfos presentes nas matérias-primas utilizadas para a produção dos comprimidos.

5.2.2.5 Ensaio de perfil de dissolução

Para cada lote de comprimidos produzidos (Lote A e Lote B) analisaram-se seis comprimidos de SPR na dosagem de 50 mg. Os comprimidos foram colocados individualmente em seis cubas distintas, e na sétima cuba avaliou-se também a dissolução do comprimido de placebo.

As curvas dos perfis de dissolução dos comprimidos, Lote A (SPR-L1) e Lote B (SPR-L2), são mostradas na Figura 13. O cálculo da percentagem de fármaco liberado foi determinado a partir da absorvância média obtida pela solução padrão de SPR na concentração de $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (n=5) diluído no meio de dissolução (UNITED 38, 2015).

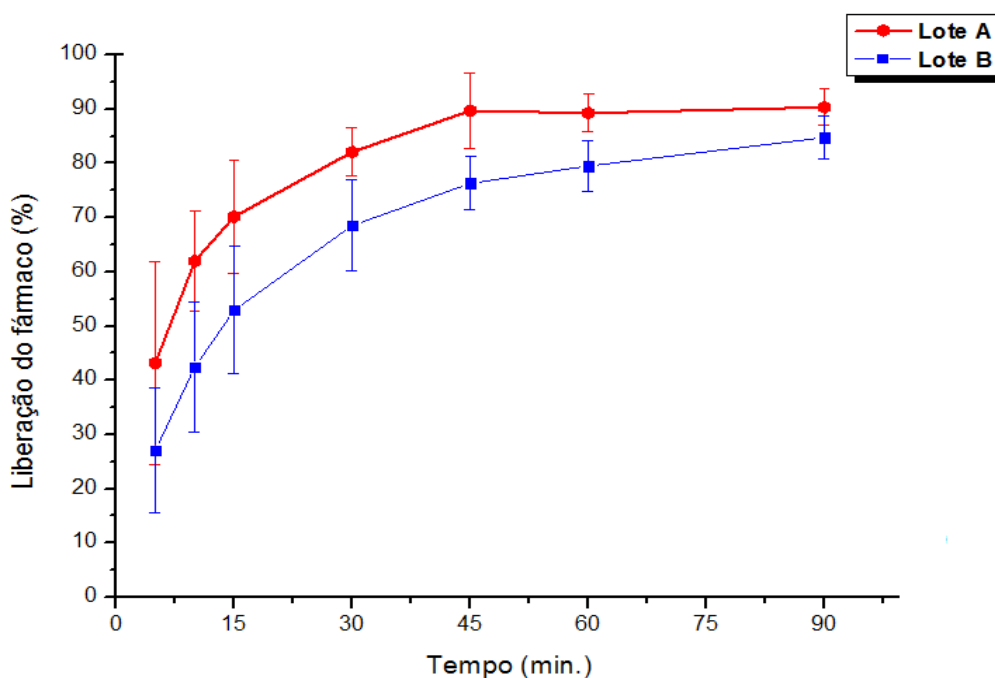


Figura 13 – Perfis de dissolução dos comprimidos produzidos – Lote A e Lote B.
Fonte: Da autora.

No tempo de 60 minutos, os comprimidos referentes ao Lote A e Lote B liberaram a média de 89,32% (DPR = 3,43 %) e 79,55% (DPR = 9,72 %) do ativo presente nas formulações, respectivamente. Segundo a monografia do fármaco, em 60 minutos não menos que 75% do fármaco deveriam estar dissolvidos no meio e, conforme os resultados acima descritos, os comprimidos produzidos estão de acordo com a especificação (UNITED 38, 2015).

Para avaliar a influência da contaminação do polimorfo I no Lote A (composto pelo IFA SPR-L1) foi calculado o fator de semelhança (F2) entre os lotes A e B, a partir da equação abaixo:

$$f2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n (Rt - Tt)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\}$$

Sendo que: n = número de tempos de coleta considerados para fins de cálculo;

Rt = valor de porcentagem dissolvida em cada ponto de tempo t , obtido com o lote de referência; e

Tt = valor de porcentagem dissolvida do lote teste em cada ponto de tempo t .

A semelhança ou equivalência de dois perfis é observada quando os valores de F2 se apresentarem entre 50 e 100 (BRASIL, 2010a; FDA 2014). Ao comparar os perfis de dissolução dos lotes de comprimidos A e B, o valor calculado para F2 foi de 19,00, demonstrando que os perfis não são semelhantes ou equivalentes. A presença de pequena quantidade da forma I, a qual é mais solúvel, influenciou com aumento significativo na velocidade de dissolução do fármaco. Este resultado corrobora com o resultado da solubilidade em equilíbrio (item 5.2.1.2), onde o IFA que apresentava contaminação com pequena quantidade da forma I de SPR demonstrou solubilidade significativamente maior do que o IFA que apresentava apenas a forma II de SPR.

Ao extrapolar este resultado para a rotina de uma indústria farmacêutica, caso haja produção de comprimidos de espironolactona com forma cristalina diferente da preconizada (forma II) ou até mesmo pequenas contaminações de outras formas como a forma I, o ensaio de dissolução *in vitro* estaria prejudicado, pois um aumento significativo na velocidade de dissolução poderia ser obtido, podendo modificar a curva farmacocinética do fármaco.

Ao avaliar o mecanismo de ação do fármaco, por exemplo, um aumento na dissolução poderia reforçar o efeito terapêutico da SPR e causar hiperpotassemia. Estudo realizado por

Lima e colaboradores (2008) demonstra que em pacientes com insuficiência cardíaca descompensada a incidência de hiperpotassemia foi duas vezes maior com a utilização de SPR. Este efeito pode manifestar-se desde a ausência de qualquer sintoma até parada cardíaca (VIEIRA NETO & MOYSÉS NETO, 2003).

5.2.3 Avaliação da qualidade dos comprimidos comercializados

5.2.3.1 Ensaio de perfil de dissolução

Avaliou-se um lote de cada laboratório que produz comprimidos de espironolactona 50 mg disponíveis no mercado farmacêutico brasileiro. Ao todo foram 5 lotes ensaiados, sendo três classificados como medicamentos genéricos (SPR-G1, SPR-G2 e SPR-G3), um similar (SPR-S) e um lote do comprimido referência Aldactone[®] (SPR-R).

As curvas dos perfis de dissolução dos comprimidos referência (SPR-R), genéricos (SPR-G1, SPR-G2 e SPR-G3) e similar (SPR-S) são mostradas na Figura 14. O cálculo da porcentagem de fármaco liberado foi determinado a partir da absorvância média obtida pela solução padrão de SPR na concentração de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (n=5) diluído no meio de dissolução (UNITED 38, 2015).

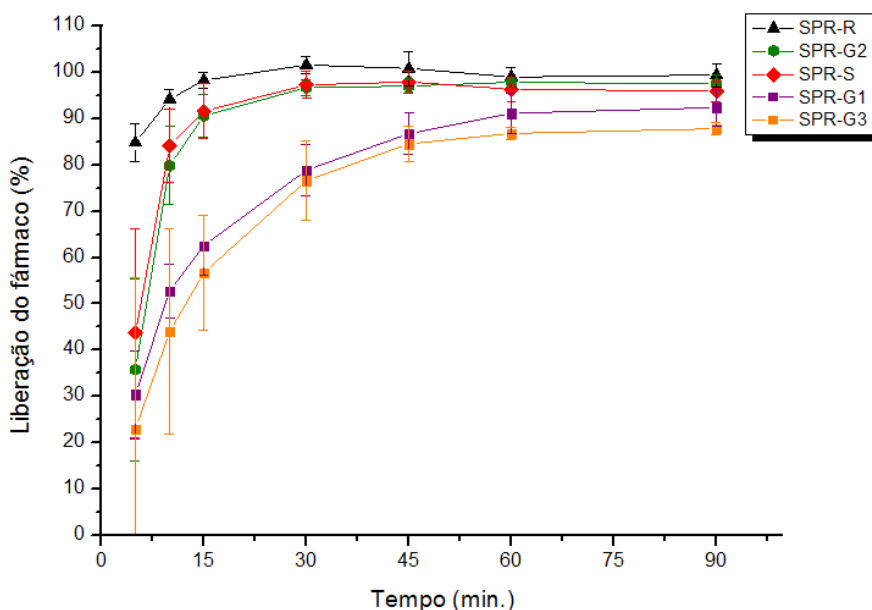


Figura 14 – Perfil de dissolução dos comprimidos comercializados: referência, genéricos e similar – SPR-R, SPR-G1, SPR-G2, SPR-G3 e SPR-S.
Fonte: Da autora.

Conforme a RDC 31 (BRASIL, 2010b), o comprimido referência, SPR-R, foi caracterizado como comprimido de dissolução muito rápida, em que $84,86 \pm 4,15\%$ do ativo foi liberado em 5 minutos. Os comprimidos SPR-G2 e SPR-S liberaram mais de 90% do fármaco em 15 minutos, e foram igualmente caracterizados como medicamentos de dissolução muito rápida. Já os comprimidos SPR-G1 e SPR-G3 mostraram uma velocidade de dissolução menor, apresentando liberação do fármaco maior do que 75% em 30 minutos. Estes resultados atenderam às exigências da monografia descritas pela UNITED 38-NF 33 (2015) para comprimidos de espirolactona (dissolução maior que 75% em 60 minutos). No entanto, estes resultados demonstraram claramente a falta de equivalência farmacêutica nas formulações SPR-G1 e SPR-G3 em comparação com o medicamento referência (SPR-R).

Não foi possível comparar os perfis de dissolução dos medicamentos comercializados utilizando o fator de semelhança (F2). A justificativa se dá pelo fato do fator F2 não ser aplicado para produtos de dissolução muito rápida - mais que 85% do fármaco dissolvido em até 15 minutos (BRASIL, 2010b; FDA, 2014). Isso ocorreu com os comprimidos SPR-R, que em 5 minutos liberaram aproximadamente 85% do fármaco. Neste caso, a eficiência de dissolução ($ED_{0-90\%}$) foi calculada para comparar os perfis de dissolução (Figura 15).

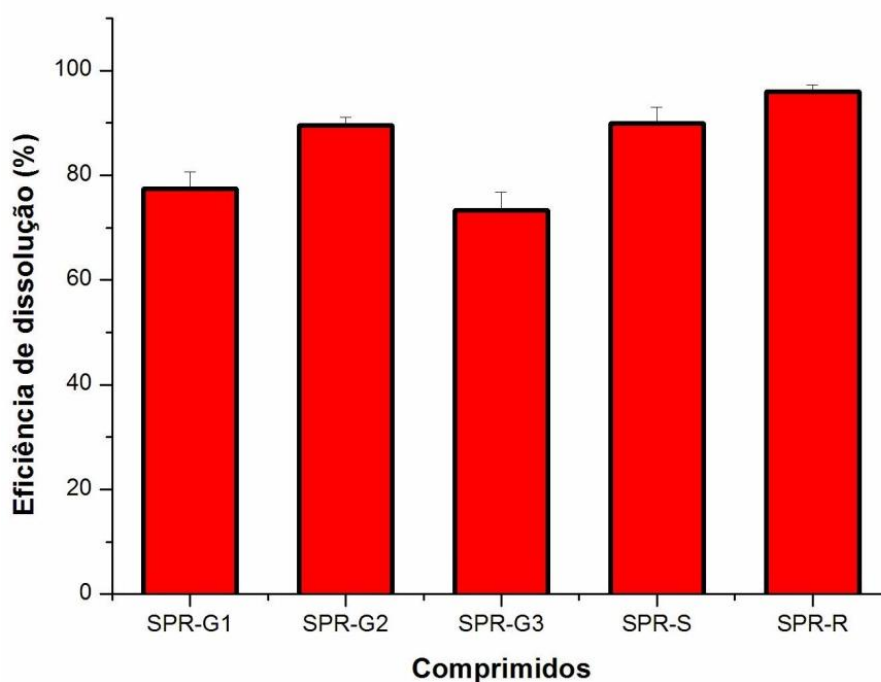


Figura 15 – Eficiência de dissolução (%) de comprimidos comercializados de espironolactona 50 mg (n=6).

Fonte: Da autora.

Houve diferença significativa entre os valores de $ED_{0.90\%}$ dos comprimidos comercializados de espironolactona após análise de variância seguida de teste Tukey ($p < 0,001$). A $ED_{0.90\%}$ do medicamento de referência (SPR-R) apresentou o maior valor ($95,95 \pm 1,32\%$), caracterizando como um medicamento de liberação muito rápida. Os outros medicamentos comercializados não alcançaram a $ED_{0.90\%}$ da SPR-R. Os comprimidos SPR-G1 e SPR-G3 apresentaram os menores valores de $ED_{0.90\%}$, respectivamente $77,38 \pm 3,24\%$ e $73,24 \pm 3,53\%$, e eles eram diferentes significativamente de SPR-G2 e SPR-S, respectivamente $89,52 \pm 1,55\%$ e $89,92 \pm 3,02\%$. Esses resultados indicam diferenças nas características de liberação entre as formulações avaliadas. Isto é esperado para fármacos pouco solúveis, em que variáveis na composição dos excipientes na formulação (sejam elas de natureza qualitativa e/ou quantitativas), bem como alterações no processo de fabricação podem levar à alterações na liberação do fármaco.

Apesar de todos os lotes avaliados cumprirem as especificações para o teste de dissolução (liberação maior que 75% em 60 minutos) (UNITED 38, 2015), os perfis de dissolução dos medicamentos avaliados apresentaram diferenças significativas. De acordo com os critérios da RDC 31 (BRASIL, 2010b), SPR-G2 e SPR-S apresentaram perfis de dissolução muito rápida da mesma forma que SPR-R, podendo ser considerados equivalentes

farmacêuticos. Porém, SPR-G1 e SPR-G3 apresentaram dissolução lenta e não foram considerados equivalentes farmacêuticos em comparação com SPR-R.

6 CONCLUSÕES

A identificação de polimorfos e, até mesmo, a contaminação de uma forma cristalina com outra em matérias-primas de espirolactona deve ser cuidadosamente controlada, realizando o monitoramento destas matérias-primas na rotina de controle de qualidade. No caso da espirolactona, a contaminação de uma forma cristalina com outra foi claramente evidenciada pelas técnicas de difração de raio X por pó e calorimetria exploratória diferencial. Quatro matérias-primas de espirolactona foram identificadas como forma II, e um lote identificado como forma II contaminada com forma I, sendo a forma I menos estável e mais solúvel. A solubilidade no ativo espirolactona forma II e forma II contaminada foram significativamente diferentes. Os lotes de comprimidos produzidos usando estes IFAs apresentaram resultados satisfatórios nos ensaios de peso médio, dureza, teor e uniformidade. Ao analisar os perfis de dissolução, observaram-se diferenças entre os lotes produzidos decorrentes da presença da forma I. Os comprimidos comercializados no mercado brasileiro não mostraram equivalência terapêutica em relação ao medicamento referência, demonstrando que a formulação tem papel importante na velocidade de dissolução. Desta forma, é necessário realizar mais estudos para avaliar o impacto do polimorfismo na qualidade final de medicamentos, embora exista a escassez das análises de caracterização de polimorfos pela indústria farmacêutica, devido a ausência de regulamentação e fiscalização, mesmo compreendendo sua importância e influência, conforme os resultados obtidos neste estudo.

REFERÊNCIAS

AALTONEN, J. et al. Solid form screening – a review. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 71, p. 23-37, 2009.

AGAFONOV, V.; LEGENDRE, B.; RODIER, N. A new crystalline modification of spironolactone. **Acta Cryst.**, v. C45, p. 1661-1663, 1989.

AGAFONOV, V. et al. Polymorphism of spironolactone. **J. Pharm. Sci.**, v. 80, p. 181-185, 1991.

AGATONOVIC-KUSTRIN, S. et al. Determination of polymorphic forms of ranitidine–HCl by DRIFTS and XRPD. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 25, p. 741-750, 2001.

AGUIAR, J.A. et al. Effect of polymorphism on the absorption of chloramphenicol from chloramphenicol palmitate. **J. Pharm. Sci.**, v. 56, p. 847-853, 1967.

AITIPAMULA, S. et al. Polymorphs, Salts, and Cocrystals: What's in a Name? **Cryst. Growth Des.**, v. 12, p. 2147-2152, 2012.

ALLESØ, M. et al. Solvent diversity in polymorph screening. **J. Pharm. Sci.**, v. 97, p. 2145-2159, 2008.

ALVES, M. C. et al. Estudo comparativo de preparações orais sólidas contendo carbamazepina: teste e perfil de dissolução. **Rev. Bras. Farm.**, v. 93, p. 487-492, 2012.

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. **Pharm. Res.**, v. 12, p. 413-420, 1995.

ANDERSON, N. H. et al., An evaluation of fit factors and dissolution efficiency for the comparison of in vitro dissolution profiles. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 17, p. 811-822, 1998.

ARAÚJO, G. L. B. et al. Polimorfismo na produção de medicamentos. **Rev. Ciênc. Farm. Apl.**, v. 33, p. 27-36, 2012.

ATICI, E. B.; KARLIGA, B. Quantitative determination of two polymorphic forms of imatinib mesylate in a drug substance and tablet formulation by X-ray powder diffraction, differential scanning calorimetry and attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. **J. Pharm. Biomed. Anal.** v. 114, p. 330-340, 2015.

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

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

BAUER, J. et al. Ritonavir: An extraordinary example of conformational polymorphism. **Pharmaceut. Res.**, v. 18, n. 6, p. 859-866, 2001.

BERBENNI, V. et al. Physico-chemical characterisation of different solid forms of spironolactone. **Thermochim. Acta**, v. 14, p. 340-341, 1999.

BERNSTEIN, J. **Polymorphism in molecular crystals**. 3. ed. New York: Oxford University. p. 428, 2002.

BERNSTEIN, J., DAVEY, R. J., HENCK, J. O. Concomitant polymorphs. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 38, p. 3440-3461, 1999.

BILTON, C. et al. When is a polymorph not a polymorph? Helical trimeric O-H \cdots O synthons in trans-1,4-diethynylcyclohexane-1,4-diol. **Chem. Commun.**, v. 17, p. 1675-1676, 1999.

BOND, A. D. What is a co-crystal? **Cryst. Eng. Comm.**, v. 9, p. 833-834, 2007.

BONFILIO, R. et al. A discriminating dissolution method for glimepiride polymorphs. **J. Pharm. Sci.**, v. 101, p. 794-804, 2012.

BONFILIO, R. et al. Analysis of chlorthalidone polymorphs in raw materials and tablets and the effect of forms I and II on the dissolution properties of drug products. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 88, p. 562-570, 2014.

BRANDÃO, F. C. et al. Structure of chemical compounds, methods of analysis and process control: physical-chemical characterization and quality control of spironolactone raw material samples. **Pharm. Chem. J.**, v. 42, n. 6, p. 368-376, 2008.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. Brasília: ANVISA, 5. ed., v. 1 e 2, 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – **Resolução RDC Nº. 31, de 11 de agosto de 2010**, dispõe sobre a realização dos “Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo”. Diário Oficial da União, 2010b.

BRITISH Pharmacopoeia. 6^a ed. Londres: The Stationery Office. v. IV, p. A146, 2009.

BRITTAIN, H.G. **Polymorphism in pharmaceutical solids**. 2. ed. New York: Informa Healthcare, 2009.

BYRN, S. R.; PFEIFFER, R. R.; STOWELL, J. G. **Solid-State Chemistry of Drugs**. 2. ed. West Lafayette: Ssci Inc. 1999.

CHAWLA, G.; BANSAL, A. K. Challenges in polymorphism of pharmaceuticals. **CRIPS**, v. 5, p. 5-12, 2004.

CHEMBURKAR, S. R. et al. Dealing with the impact of ritonavir polymorphs on the late stages of bulk drug process development. **Org. Proc. Res. Dev.**, v. 4, p. 413-417, 2000.

CHIENG, N. et al. Physical characterization and stability of amorphous indomethacin and ranitidine hydrochloride binary systems prepared by mechanical activation. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 71, p. 47-54, 2009.

CHILDS, S. L.; STAHLY, G. P.; PARK, A. The salt-cocrystal continuum: the influence of crystal structure on ionization state. **Molec. Pharm.**, v. 4, p. 323-338, 2007.

DATTA, S.; GRANT, D. J. W. Crystal structures of drugs: advances in determination, prediction and engineering. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 3, p. 42-57, 2004.

DESIRAJU, G. R. Polymorphism: the same and not quite the same. **Cryst. Growth Des.**, v. 8, p. 3-5, 2008.

DESIRAJU, G. R. Supramolecular Synthons in Crystal Engineering – A New Organic Synthesis. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 34, p. 2311-2327, 1995.

DETOISIEN, C. et al. Thermal analysis: A further step in characterizing solid forms obtained by screening crystallization of an API. **Int. J. Pharm.**, v.403 p. 29-36, 2011.

DIDEBERG, O.; DUPONT, L. La structure cristalline et Moléculaire de la Spironolactone. **Acta Cryst.**, v. B28, p. 3014-3022, 1972.

EL-DALSH, S. S. et al. Studies on spironolactone polymorphic forms. **Drug Develop. Ind. Pharm.**, v. 9, p. 877-894, 1983.

ESPEAU, P. et al. Thermal Behavior of Orthorhombic polymorphs I and II of Spironolactone. **J. Therm. Anal. Calorim.**, v. 90, p. 341-342, 2007.

ETTER, M. C.; MACDONALD, J. C.; BERNSTEIN, J. Graph-set analysis of hydrogen-bond patterns in organic crystals. **Acta Cryst. B**, v. 46, p. 256-262, 1990.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 6. ed. Strasbourg: Council of Europe. v. 1, p. 649, 2008.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA. US Department of Health and Human Services. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). **Guidance for Industry, ANDAs: Pharmaceutical Solid Polymorphism: Chemistry, Manufacturing, and Controls Information**. 2007. Disponível em:
<<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm072866.pdf>>. Acesso em: 05 abr. 2015.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA. US Department of Health and Human Services. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). **Guidance for Industry, ANDAs: Bioavailability and Bioequivalence Studies Submitted in NDAs or INDs: General Considerations**, 2014.

GIRON, D. Thermal analysis and calorimetric methods in the characterisation of polymorphs and solvates. **Thermoquim. Acta**, v. 248, p. 1-59, 1995.

GRANT, D. J. W.; BYRN, S. R. A timely re-examination on drug polymorphism in pharmaceutical development and regulation. **Adv. Drug Deliver. Rev.**, v. 56, p.237-239, 2004.

HALEBLIAN, J.; McCRONE, W. Pharmaceutical applications of polymorphism. **J. Pharm. Sci.**, v. 58, p. 911-929, 1969.

HANCOCK, B. C.; PARKS, M. What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals? **Pharmacol. Res.**, v. 17, p. 397-404, 2000.

ISMAIL, Y.; CHANDRASEKHAR, K. B.; GUNASEKARAN, V. A new stability indicating UPLC method development and validation for the simultaneous estimation of metolazone and spironolactone in bulk and in its pharmaceutical formulations. **Int. J. Pharm. Pharma. Sci.**, v. 6, p. 448-452, 2014.

KARPINSKI, P. H. Polymorphism of active pharmaceutical ingredients. **Chem. Eng. Technol.**, v. 29, p. 233-237, 2006.

LÁNG, P. et al. Polymorph screening of an active material. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 84, p. 177-183, 2013.

LEE, A. Y.; ERDEMIR, D.; MYERSON, A. S. Crystal polymorphism in chemical process development. **Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.**, v. 2, p. 259-280, 2011.

LIEBENBERG, W. Crystal polymorphism and its occurrence among active pharmaceutical ingredients in South Africa. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 8, p. 1-246, 2005.

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

LIMA, M. V. et al. Hiperpotassemia na Vigência de Espironolactona em Pacientes com Insuficiência Cardíaca Descompensada. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 91, p. 194-199, 2008.

LLINÀS, A.; GOODMAN, J. M. Polymorph control: past, present and future. **Drug Discov. Today**, v. 13, p. 198-210, 2008.

LYN, L. Y. et al. Crystal modifications and dissolution rate of piroxicam. **Acta Pharm.**, v. 61, p. 391-402, 2011.

MARTINS, F. T. Aplicações Tecnológicas do Polimorfismo Farmacêutico. **Rev. Proc. Quím.**, v. 4, p. 9-23, 2010.

MCCAULEY, J. A.; VARSOLONA, R. J.; LEVORSE, D. A. The effect of polymorphism and metastability on the characterization and isolation of two pharmaceutical compounds. **J. Phys. D: Appl. Phys.**, v. 26, p. B85, 1993.

NEVILLE, G.; BECKSTEAD, H.; COONEY, J. D. Thermal analyses (TGA and DSC) of some spironolactone solvates. **Fresenius J. Anal. Chem.**, 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. **J. Thermal Anal. Calor.**, v. 90, p. 337-339, 2007.

NUNN, T.; WILLIAMS, J. Formulation of medicines for children. **Brit. J. Clin. Pharmacol.**, v. 59, p. 674-676, 2005.

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

PASA, C. R. et al. Análise de medicamentos antihipertensivos contendo captopril, propranolol e losartana manipulados por farmácias de Campo Grande-MS. **Rev. Bras. Farm.**, v. 89, p. 322-326, 2008.

PAYGHAN, S. A. et al. Pharmaceutical solid polymorphism: approach in regulatory consideration. **J. Global Pharma Technol.**, v. 2, p. 8-16, 2010.

PISEGNA, G. L.; GILSON, D. F. R.; BUTLER, I. S. High-pressure infrared and Raman studies of polymorphism in pharmaceutical compounds: Spironolactone, Forms I and II. **J. Mol. Struct.**, v. 1078, p. 146-150, 2014.

PRADO, L. D.; ROCHA, H. V. A. Estado Sólido na Indústria Farmacêutica: Uma Breve Revisão. **Rev. Virtual Quim.**, 2015. No prelo.

PUROHIT, R.; VENUGOPALAN, P. Polymorphism: An Overview. **Reson.**, v.14, p. 882-893, 2009.

RAHUL, C. R.; PATEL, J.; BAPNA, M. Development and validation of analytical method for estimation of Spironolactone in oral suspension. **J. Chem Biol. Phys Sci.** v. 4, p. 2196-2204, 2014.

RAM, V. R.; DAVE, P. N.; JOSHI, H. S. Development and Validation of a Stability-Indicating HPLC Assay Method for Simultaneous Determination of Spironolactone and Furosemide in Tablet Formulation. **J. Chromatogr. Sci.** v. 50, p. 721-726, 2012.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6. ed. London, UK: Pharmaceutical Press e Washington, DC: American Pharmacists Association, 2009.

RUELA, A. L. M.; ARAÚJO, M. B.; PEREIRA, G. R. Desenvolvimento de um teste de dissolução para comprimidos de nimesulida em meio que assegure condições sink. **Acta Farm. Bonaer.**, v.28, p.661-667, 2009.

SACHIN, L.; GRANT, J. W. D. Thermodynamics of Polymorphs. em: Hilfiker, R. **Polymorphism in the Pharmaceutical Industry**. Weinheim: Wiley-VCH; p.21-42, 2006.

SAIFEE, M.; INAMDAR, N.; DHAMECHA, D. L.; RATHI, A. A. **Drug Polymorphism: A Review. Int. J. Health Res.**, v. 2, p. 291-306, 2009.

SALOLE, E. J.; AL-SARRAJ, F. A. Effect of Solvent-Deposition on Spironolactone Crystal Form. **Drug Develop. Ind. Pharm.**, v. 11, p. 2061-2070, 1985.

SALOLE, E. G.; AL-SARRAJ, F. A. Spironolactone crystal forms. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 11, p. 855-864, 1985.

SANTOS O. M. M. et al. Polymorphism: an evaluation of the potential risk to the quality of drug products from the Farmácia Popular Rede Própria. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 50, p. 1-24, 2014.

SAURABH, G.; KAUSHAL, C. Pharmaceutical solid polymorphism in abbreviated new drug application (ANDA) – A regulatory perspective. **J. Chem. Pharm. Res.**, v. 3, p. 6-17, 2011.

SARMA, B.; CHEN, J.; HIS, H-Y.; MYERSON, A. S. Solid forms of pharmaceuticals: Polymorphs, salts and cocrystals. **Korean J. Chemical Eng.**, v. 28, p. 315-22, 2011.

SCHNITZLER, E. et al. Aplicação da calorimetria exploratória diferencial (DSC) na caracterização térmica do acetato de dexametazona, excipientes e do creme de dexametazona. **Eclét. Quím.**, v. 26, p. 71, 2001.

SERRA, C. H. R.; STORPIRTIS, S. Comparação de perfis de dissolução da cefalexina através de estudos de cinética e eficiência de dissolução (ED%). **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 43, p. 79-88, 2007.

SHAN, N.; ZAWOROTKO, M. J. The role of cocrystals in pharmaceutical science. **Drug Discov. Today**, v. 13, p. 440-446, 2008.

SOLIMAN, O. A. E. et al. Amorphous spironolactone-hydroxypropylated cyclodextrin complexes with superior dissolution and oral bioavailability. **Int. Journ. Pharm.**, v. 149, p. 73-83, 1997.

SONG, J. S.; SOHN, Y. T. Crystal forms of naproxen. **Arch. Pharmacol Res.**, v. 34, p. 87-90, 2011.

STAHLY, G. P. Diversity in single- and multiple-component crystals: the search for prevalence of polymorphs and cocrystals. **Cryst. Growth. Des.**, v. 7, p. 1007-1026, 2007.

TAKAHASHI, A. I. et al. Using fluid bed granulation to improve the dissolution of poorly water-soluble drugs. **Braz. arch. biol. technol.**, v. 55, p. 477-484, 2012.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. USP. National Formulary. 38^a ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention. v. 1, 2 e 3, 2015.

VIEIRA NETO, O. M.; MOYSÉS NETO, M. Distúrbios do equilíbrio hidroeletrólítico. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 36, p. 325-337, 2003.

VIPPAGUNTA, S. R.; BRITTAIN, H. G.; GRANT, D. J. W. Crystalline solids. **Adv. Drug Deliver. Rev.**, v. 48, p. 3-26, 2001.

YU, L. Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization. **Adv. Drug Deliver. Rev.**, v. 48, p. 27-42, 2001.

YU, L. X. et al. Scientific Considerations of Pharmaceutical Solid Polymorphism in Abbreviated New Drug Applications. **Pharm. Research**, v. 20, p. 531-536, 2003.

ZACCARO, J. et al. Nonphotochemical, laserinduced nucleation of supersaturated aqueous glycine produces unexpected gamma-polymorph. **Cryst. Growth Des.** v. 1, p. 1-8, 2001.

ZHANG, G. G. et al. Phase transformation considerations during process development and manufacture of solid oral dosage forms. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 56, p. 371-390, 2004.

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