UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

MARIANA DE OLIVEIRA BERRETTA

ESTUDO DA LIBERAÇÃO *IN VITRO* DA PROGESTERONA A PARTIR DE CÁPSULAS DE GELATINA MOLE: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO

GOIÂNIA
2010

MARIANA DE OLIVEIRA BERRETTA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ESTUDO DA LIBERAÇÃO *IN VITRO* DA PROGESTERONA A PARTIR DE CÁPSULAS DE GELATINA MOLE: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.
Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Eliana Martins Lima

GOIÂNIA
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

Berretta, Mariana de Oliveira.
B533e Estudo da liberação *in vitro* da progesterona a partir de cáspsulas de gelatina mole: desenvolvimento e validação de método de dissolução [manuscrito] / Mariana de Oliveira Berretta. - 2010.
124 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Profª. Drª. Eliana Martins Lima.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, 2010.
Bibliografia.
Inclui lista de tabelas, figuras, abreviaturas e siglas.
Apêndices.

1. Progesterona 2. Dissolução 3. Validação 4. Controle de Qualidade I. Título.

CDU: 577.175.6

Folha de Aprovação

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, em 16 de junho de 2010, pela mestranda Mariana de Oliveira Berreta.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Eliana Martins Lima (FF/UFG)
Presidente

Profa. Dra. Nádia Maria Volpato (UFRGS)

Dr. Leonardo de Souza Teixeira (ICF)

Dedico este trabalho à minha família,
a qual devo tudo o que sou e acredito.

AGRADECIMENTOS

À Deus que sempre me manteve com saúde, me deu forças para enfrentar todos os obstáculos encontrados durante este período e por sempre me guiar por seus caminhos.

À minha família pelo apoio, incentivo, torcida, por sempre acreditar na minha capacidade e por ser meu alicerce, me proporcionando forças para enfrentar os desafios da vida.

À Professora Eliana pela oportunidade, por acreditar na minha vontade de aprender e pela orientação.

À Professora Danielle pela atenção, dedicação e disposição em sempre ajudar.

À Fernanda Bellato pela atenção, carinho e torcida.

À Stela Ramirez por mostrar-se sempre disponível em ajudar, pelo companheirismo, pelo incentivo, troca de conhecimentos e pelos momentos de descontração.

Ao Marco Júnio pelo companheirismo, pelo incentivo, pela ajuda e troca de conhecimentos.

À Erika Crispim pelo auxílio técnico e pelas dúvidas sanadas ao longo dos experimentos.

À Ana Lúcia Zampieri pelos ensinamentos, ajuda e incentivo.

À Marilisa Gaeti pela ajuda com os gráficos durante a realização dos testes.

À Flávia Neri e Emanuelle pela ajuda com os dados estatísticos.

À Stephania Fleury pela ajuda e pelas dúvidas sanadas.

Aos colegas do FarmaTec pela troca de conhecimentos.

À Luna pelos momentos de descontração.

Por fim, agradeço do fundo do meu coração a todos que, mesmo sem perceber, colaboraram para o meu crescimento e contribuíram para tornar real este trabalho.

"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende."
Leonardo da Vinci

RESUMO

Progesterona é um hormônio esteroide muito utilizado em disfunções uterinas tais como: hemorragia e amenorréia secundária, contracepção, terapia de reposição hormonal em mulheres na pós-menopausa, bem como nos casos de suporte da fase lútea em técnicas de reprodução assistida. No entanto, apresenta baixa biodisponibilidade oral por causa de sua fraca solubilidade em água e intenso metabolismo hepático. Assim, sua administração é feita, principalmente, por formulações contendo o fármaco micronizado disperso em óleos e tensoativos veiculado em cápsulas de gelatina mole, na tentativa de melhorar a biodisponibilidade oral. Entretanto, não há relatos em compêndios oficiais de métodos de dissolução empregados para avaliar a liberação da progesterona a partir dessa forma farmacêutica. Sendo assim, o presente estudo propõe o desenvolvimento e validação de método de dissolução para cápsulas de gelatina mole contendo progesterona, com o objetivo de avaliar o perfil de dissolução *in vitro* de duas especialidades farmacêuticas (denominadas A e B) disponíveis comercialmente. Para o método de dissolução, foram avaliadas diferentes condições como: meio de dissolução (variações de pH e tensoativos), velocidade de rotação/agitação e tipo de dispositivo (cesta, pá). Neste estudo, o produto de referência A foi utilizado como modelo, e os testes ANOVA/Tukey para a realização de análise estatística, com intervalo de confiança de 95%. O método de dissolução foi validado quanto aos parâmetros de especificidade, linearidade, exatidão (recuperação) e precisão. Os dois produtos foram comparados através do perfil de dissolução, cinética de liberação e eficiência de dissolução. A quantificação das amostras foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), validada através dos parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação. Através da análise das condições utilizadas, testes estatísticos e, levando-se em consideração características biorrelevantes, foi verificado que o método de dissolução mais apropriado foi o que utilizou o dispositivo pá, meio de dissolução contendo tampão acetato de sódio pH 4,5 com 3,0% de lauril sulfato de sódio, volume de 1000 mL, velocidade de rotação/agitação de 150 rpm e temperatura de 37° C ± 0,5° C. Esse método demonstrou ser específico, linear, preciso e exato. Após a análise dos dois produtos, foi possível verificar que o produto B apresentou melhor desempenho *in vitro* nas primeiras quatro horas de ensaio, melhor eficiência de dissolução, e que ambos apresentaram cinética de primeira ordem. O método de quantificação por CLAE foi adequado para análise, pois mostrou ser seletivo, linear, preciso e exato com limite de detecção de 44,6 µg/mL e limite de quantificação de 148,6 µg/mL. Portanto, pode-se concluir que o método de dissolução desenvolvido e validado mostrou-se adequado para análise desejada, permitindo visualizar diferenças entre unidades de um mesmo lote e entre diferentes especialidades farmacêuticas.

Palavras-chave: Progesterona, Dissolução, Validação, Controle de Qualidade.

ABSTRACT

Progesterone is a steroid hormone used to treat uterin disfunction, such as hemorrhage and secondary amenorrhea, contraception, hormone replacement therapy in postmenopausal women, as well as in luteal phase support cases in assisted reproduction techniques. However, it presents low oral bioavailability because of its weak water solubility and intense hepatic metabolism. So, progesterone administration is carried out, mainly, through micronized drug dispersed in oils and surfactant formulations, in soft gelatin capsules, trying to improve oral bioavailability. However, there are no official compendia notifications about dissolution methods used to evaluate progesterone release from these dosage forms. Thus, this study proposes progesterone containing soft gelatin capsules dissolution method development and validation aiming to analyze two pharmaceutical specialties (called A and B) in vitro dissolution profile commercially available. Many conditions were evaluated in the study, such as dissolution medium different compositions (pH and surfactant variations), speed of agitation and apparatus (basket, paddle). In this study, reference product A was used as model and ANOVA/Tukey tests were carried out for statistic analysis, with 95% confidence interval. Dissolution method was validated according to selectivity, linearity, accuracy (recovery) and precision parameters. Both products were compared through dissolution profile, release kinetics and dissolution efficiency. Samples quantification was accomplished through high performance liquid chromatography (HPLC), validated through selectivity, linearity, precision, accuracy, detection and quantification limits parameters. Analyzing used conditions, statistic tests, and considering biorelevant characteristics, it was found that dissolution method more appropriate was the one that used paddle, sodium acetate buffer pH 4.5 with 3,0% of sodium lauryl sulfate dissolution medium, volume of 1000 mL, speed of agitation of 150 rpm and temperature of 37° C ± 0,5° C. This method showed to be specific, linear, precise and accurate. After products' analysis, it was possible to notice that product B presented the best in vitro performance in the first four hours of test, best dissolution efficiency and that both showed first order kinetics. Quantification method by HPLC was appropriate for analysis, because it showed to be selective, linear, precise and accurate, with detection limit of 44,6 µg/mL and quantification limit of 148,6 µg/mL. Therefore, it is possible to conclude that dissolution method developed and validated showed to be appropriate for analysis, allowing to visualize differences between same batch units and among different pharmaceutical specialties.

Keywords: Progesterone, Dissolution, Validation, Quality Control.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições cromatográficas avaliadas para a quantificação da progesterona. 49

Tabela 2 - Meios avaliados no estudo da solubilidade da progesterona. 52

Tabela 3 - Condições avaliadas no delineamento do método de dissolução. 54

Tabela 4 - Condições avaliadas para o estabelecimento da condição final do método de dissolução 54

Tabela 5 - Condições utilizadas no ensaio de dissolução realizado com seis unidades de cada produto. 60

Tabela 6 - Valores de DPR obtidos na construção das curvas padrão feitas com metanol. 67

Tabela 7 - Valores de DPR obtidos na construção das curvas padrão feitas com TAS pH 4.5 + 3,0% LSS e metanol, na proporção de 1:1. 68

Tabela 8 - Resultados obtidos no teste de precisão intra-corrida (n = 3) e inter-corridas (n = 6). 70

Tabela 9 - Resultados obtidos no teste de exatidão intra-corrida (n = 3) e inter-corridas (n = 6). 71

Tabela 10 - Equações da reta e coeficientes de correlação gerados a partir da construção de três curvas padrão preparadas com concentrações próximas ao suposto limite de quantificação. 72

Tabela 11 - Limite de detecção e quantificação da progesterona (n = 3) 72

Tabela 12 - Quantidade de progesterona dissolvida (µg/mL e %) em diferentes meios (n = 2). 73

Tabela 13 - Tipos de tensoativos utilizados no meio de dissolução. 75

Tabela 14 - Médias e Desvios Padrão das porcentagens de fármaco dissolvido em função do tempo comparando o tipo de tensoativo utilizado no meio de dissolução (n = 3). 76

Tabela 15 - Concentrações de Lauril Sulfato de Sódio utilizadas no meio de dissolução. 77

Tabela 16 - Médias e Desvios Padrão das porcentagens de fármaco dissolvido em função do tempo comparando a concentração do tensoativo utilizado no meio de dissolução (n = 3). 78

Tabela 17 - Variações da velocidade de rotação utilizadas no meio de dissolução..80

Tabela 18 - Médias e Desvios Padrão das porcentagens de fármaco dissolvido em função do tempo comparando as velocidades de rotação/agitação utilizadas no ensaio de dissolução (n = 3) 81

Tabela 19 - Variações de pH utilizadas no meio de dissolução. 83

Tabela 20 - Médias e Desvios Padrão das porcentagens de fármaco dissolvido em função do tempo comparando o pH do meio de dissolução utilizado (n = 3). 84

Tabela 21 - Tipos de dispositivos utilizados no meio de dissolução 86

Tabela 22 - Médias e Desvios Padrão das porcentagens de fármaco dissolvido em função do tempo comparando o tipo de aparato utilizado (n = 3). 87

Tabela 23 - Valores de DPR obtidos na construção das curvas padrão feitas com TAS pH 4.5 + 3,0% LSS.....90

Tabela 24 - Resultados da exatidão intra-corrida (n=3) e inter-corridas (n = 18) do método de dissolução para o produto A. 91

Tabela 25 - Resultados da exatidão intra-corrida (n=3) e inter-corridas (n = 18) do método de dissolução para o produto B. 91

Tabela 26 - Resultados da precisão intra-corrida (n = 3) e inter-corridas (n = 18) do método de dissolução para o produto A. 92

Tabela 27 - Resultados da precisão intra-corrida (n = 3) e inter-corridas (n = 18) do método de dissolução para o produto B. 92

Tabela 28 - Estudo de estabilidade da progesterona recém diluída (n = 3).....93

Tabela 29 - Estudo de estabilidade da progesterona no dia seguinte à diluição (n = 3).....93

Tabela 30 - Estudo comparativo da estabilidade da progesterona recém diluída e no dia seguinte à diluição (n = 3) 93

Tabela 31 - Análise da média dos tempos (n = 5) das amostras recém preparadas e das amostras no dia seguinte.....94

Tabela 32 - Peso médio das cápsulas (n = 20) do produto A (lote 1172). 95

Tabela 33 - Peso médio das cápsulas (n = 20) do produto B (lote 83506). 96

Tabela 34 - Teor dos produtos A e B (n = 3).....97

Tabela 35 - Uniformidade de conteúdo dos produtos A e B (n = 10) 98

Tabela 36 - Perfil de dissolução (n = 6) dos produtos A (lote 1172) e B (lote 83506). 99

Tabela 37 - Perfil de dissolução (n = 6) dos produtos A (lote 1207) e B (lote 83614). 100

Tabela 38 - Perfil de dissolução (n = 6) dos produtos A (lote 1218) e B (lote 84115). 101

Tabela 39 - Eficiência de Dissolução (n = 6) dos produtos A (lote 1172) e B (83506) 103

Tabela 40 - Eficiência de Dissolução (n = 6) dos produtos A (lote 1207) e B (lote 83614) 104

Tabela 41 - Eficiência de Dissolução (n = 6) dos produtos A (lote 1218) e B (lote 84115) 104

Tabela 42 - Coeficientes de correlação gerados a partir da avaliação da cinética de dissolução apresentadas para os produtos A e B. 105

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da dissolução da partícula de um fármaco nos fluidos gastrointestinais 21

Figura 2 - Etapas envolvidas na liberação do fármaco da forma farmacêutica 23

Figura 3 - Representação esquemática do sistema de classificação biofarmacêutica 30

Figura 4 - Digestão lipídica e solubilização do fármaco no intestino delgado 38

Figura 5 - Biossíntese da progesterona 41

Figura 6 - Estrutura química da progesterona 42

Figura 7 - Varredura da amostra de progesterona preparada em metanol (10µg/mL) 63

Figura 8 - Cromatograma (progesterona 200µg/mL) obtido na utilização dos seguintes parâmetros: coluna C_{18} (250mm x 4,6mm, 5µm), fase móvel contendo metanol-água (90:10, v/v), fluxo de 1,0mL/minuto, forno para coluna com a temperatura de 30°C e volume de injeção de 20µL 65

Figura 9 - Leitura do branco (A) e da amostra contendo progesterona na mistura de metanol e TAS pH 4,5 + 3,0%LSS na concentração de 50µg/mL (B), utilizando os parâmetros cromatográficos: coluna C_{18} (250mmx4,6mm, 5µm), fase móvel contendo metanol-água (90:10, v/v), fluxo de 1,0mL/minuto, forno para coluna com a temperatura de 30°C e volume de injeção de 20µL 66

Figura 10 - Curva padrão média, equação da reta e coeficiente de correlação obtidos com amostras de progesterona preparadas em metanol (n = 3), utilizando coluna C_{18} (250mm x 4,6mm, 5µm), fase móvel contendo metanol-água (90:10, v/v), fluxo de 1,0mL/minuto, forno para coluna com a temperatura de 30°C e volume de injeção de 20µL 68

Figura 11 - Curva padrão média, equação da reta e coeficiente de correlação obtidos com amostras de progesterona preparadas em metanol e TAS pH 4.5 com 3,0% de LSS na proporção de 1:1 (n = 3), utilizando coluna C_{18} (250mm x 4,6mm, 5µm), fase móvel contendo metanol-água (90:10, v/v), fluxo de 1,0mL/minuto, forno para coluna com a temperatura de 30°C e volume de injeção de 20µL 69

Figura 12 - Perfil de dissolução das cápsulas de gelatina mole (Produto A) utilizando tipos diferentes de tensoativos no meio de dissolução (n = 3) 76

Figura 13 - Análise estatística dos dados encontrados no ensaio realizado para avaliar a influência do tipo de tensoativo utilizado no meio de dissolução (n = 3), utilizando ANOVA e Tukey com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) 77

Figura 14 - Perfil de dissolução das cápsulas de gelatina mole (Produto A) utilizando concentrações diferentes de tensoativo no meio de dissolução (n = 3) 79

Figura 15 - Análise estatística dos dados encontrados no ensaio realizado para avaliar a influência da concentração do tensoativo utilizado no meio de dissolução (n = 3), utilizando ANOVA e Tukey com intervalo de confiança de 95% (p < 0,05)..... 79

Figura 16 - Perfil de dissolução das cápsulas de gelatina mole (Produto A) utilizando diferentes velocidades de rotação no desenvolvimento do ensaio de dissolução (n = 3) 82

Figura 17: Análise estatística dos dados encontrados no ensaio para avaliar a influência da velocidade de rotação (n = 3), utilizando ANOVA e Tukey com intervalo de confiança de 95% (p < 0,05) 82

Figura 18 - Perfil de dissolução das cápsulas de gelatina mole (Produto A) utilizando pHs diferentes no meio de dissolução (n = 3) 84

Figura 19 - Análise estatística dos dados encontrados no ensaio realizado para avaliar a influência da pH na dissolução do fármaco (n = 3), utilizando ANOVA e Tukey com intervalo de confiança de 95% (p < 0,05)..... 85

Figura 20 - Perfil de dissolução das cápsulas de gelatina mole (Produto A) utilizando aparatos diferentes no desenvolvimento do ensaio de dissolução (n = 3) 87

Figura 21 - Análise estatística dos dados encontrados no ensaio para avaliar a influência do aparato na dissolução do fármaco (n = 3), utilizando ANOVA e Tukey com intervalo de confiança de 95% (p < 0,05) 88

Figura 22 - Análise do placebo contido no produto A utilizando as seguintes condições cromatográficas: coluna C_{18} (250mm x 4,6mm, 5µm), fase móvel contendo metanol-água (90:10, v/v), fluxo de 1,0mL/min, forno para coluna com a temperatura de 30°C e volume de injeção de 20µL 89

Figura 23 - Análise do placebo contido no produto B utilizando as seguintes condições cromatográficas: coluna (C_{18} - 250mm x 4,6mm, 5µm), fase móvel contendo metanol-água (90:10, v/v), fluxo de 1,0mL/min, forno para coluna com a temperatura de 30°C e volume de injeção de 20µL 89

Figura 24 - Curva padrão média, equação da reta e coeficiente de correlação obtidos com amostras de progesterona preparadas em TAS pH 4.5 com 3,0% de LSS (n = 3), utilizando os seguintes parâmetros cromatográficos: coluna C_{18} (250mm x 4,6mm, 5µm), fase móvel contendo metanol-água (90:10, v/v), fluxo de 1,0mL/minuto, forno para coluna com a temperatura de 30°C e volume de injeção de 20µL 90

Figura 25 - Comparativo entre amostras nos tempos 0, 1, 4, 8 e 24 horas logo após a diluição e 24 horas após a diluição (n = 3) 94

Figura 26 – Perfil de dissolução comparativo entre o produto A (lote 1172) e o produto B (lote 83506) (n = 6) 100

Figura 27 - Perfil de dissolução comparativo entre o produto A (lote 1207) e o produto B (lote 83614) (n = 6) 101

Figura 28 - Perfil de dissolução comparativo entre o produto A (lote 1218) e o produto B (lote 84115) (n = 6) 102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Abs — Absorbância
- ANOVA — Análise de Variância
- ASC — Área Sob a Curva
- BP — British Pharmacopeia
- CDER — Center for Drug Evaluation and Research
- $C_{máx}$ — Concentração Plasmática Máxima
- DP — Desvio Padrão
- DPR — Desvio Padrão Relativo
- Farm Bras — Farmacopéia Brasileira
- FDA — Food and Drug Administration
- FIP — International Pharmaceutical Federation
- JP — Japanese Pharmacopeia
- LSS — Lauril Sulfato de Sódio
- Poli 40 — Polissorbato 40
- Poli 80 — Polissorbato 80
- r — Coeficiente de Correlação
- r^2 — Coeficiente de Determinação
- rpm — Rotações por Minuto
- SCB — Sistema de Classificação Biofarmacêutica
- SEDDS — Self-Emulsifying Drug Delivery Systems
- SMEDDS — Self-Microemulsifying Drug Delivery System
- TAS — Tampão Acetato de Sódio
- $T_{máx}$ — Tempo para alcançar a concentração plasmática máxima
- USP — United States Pharmacopeia
- UV — Ultravioleta
- VIS — Visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 19

2. REVISÃO DA LITERATURA 21
2.1 TEORIA DA DISSOLUÇÃO 21
2.2 DISSOLUÇÃO DE FORMAS FARMACÊUTICAS SÓLIDAS 23
2.2.1 Fatores que influenciam no processo de dissolução e absorção de fármacos 24
2.3 SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA 29
2.4 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE DISSOLUÇÃO 32
2.4.1 Escolha das condições do método de dissolução 33
2.4.2 Forma Farmacêutica 36
2.5 FORMULAÇÕES BASEADAS EM LIPÍDEOS 37
2.6 PROGESTERONA 40
2.6.1 Propriedades físico-químicas 41
2.6.2 Propriedades farmacodinâmicas 42
2.6.3 Propriedades farmacocinéticas 43
2.6.4 Vias de administração 44

3. OBJETIVOS 46
3.1 OBJETIVO GERAL 46
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 46

4. MATERIAL E MÉTODOS 47
4.1 MATERIAL 47
4.1.1 Equipamentos e Acessórios 47
4.1.2 Reagentes e Produtos 47
4.2 MÉTODOS 49
4.2.1 Padronização da metodologia analítica para quantificação da progesterona por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) 49
4.2.2 Validação da metodologia analítica para a quantificação da progesterona por CLAE 50
4.2.3 Estudos da solubilidade da progesterona em função da condição *sink* 52

4.2.4 Desenvolvimento do método de dissolução 53
4.2.5 Validação do método de dissolução 55
4.2.6 Ensaios Físicos 58
4.2.7 Cinética de dissolução e estudo dos perfis obtidos 61

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 63
5.1 Padronização da metodologia analítica para quantificação da progesterona por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) 63
5.1.1 Determinação do comprimento de onda de absorção máxima da progesterona no UV/VIS 63
5.1.2 Condições cromatográficas 63
5.1.3 Validação da metodologia analítica para a quantificação da progesterona por CLAE 65
5.2 Estudos da solubilidade da progesterona em função da condição *sink* 72
5.3 Desenvolvimento do método de dissolução 73
5.3.1 Definição do tensoativo 74
5.3.2 Definição da concentração do tensoativo 77
5.3.3 Definição da velocidade de rotação 80
5.3.4 Definição do pH do meio de dissolução 83
5.3.5 Definição do dispositivo/método 86
5.4 Validação do método de dissolução 88
5.4.1 Seletividade/Interferência do placebo 88
5.4.2 Linearidade 90
5.4.3 Exatidão (Recuperação) 91
5.4.4 Precisão 92
5.4.5 Estudo de estabilidade da progesterona 93
5.5 Ensaios físicos comparativos dos Produtos A e B 94
5.5.1 Peso médio 94
5.5.2 Teor 97
5.5.3 Uniformidade de conteúdo 97
5.5.4 Perfil de dissolução 98
5.6 Cinética de dissolução e estudo dos perfis obtidos (Produtos A e B) 103
5.6.1 Modelo método independente 103
5.6.2 Modelos método dependente 105

6. CONCLUSÕES 107

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 108

Apêndice A 120
Apêndice B 122
Apêndice C 124

1 INTRODUÇÃO

Dissolução pode ser caracterizada, no sentido literal, como sendo o processo de transferência de moléculas e íons de um estado sólido para a solução (AULTON, 2005). Entretanto, no sentido mais amplo da palavra, dissolução pode ser mais corretamente descrita como um ensaio físico para prever a liberação para uma determinada área numa determinada quantidade e no tempo correto, sendo mais do que uma simples medida da taxa de solubilidade (MANADAS *et al*., 2002). Estando na forma dissolvida, o fármaco se torna disponível para ser absorvido pelo organismo, atingir seu sítio de ação e, finalmente, promover sua ação.

O ensaio de dissolução representa um dos instrumentos essenciais na avaliação das propriedades biofarmacêuticas das formulações, promove informações úteis tanto para a pesquisa e desenvolvimento como para a produção e controle de qualidade, permitindo detectar desvios de fabricação, de uniformidade do produto e de reprodutibilidade lote a lote. Além disso, favorece a avaliação de novas formulações durante o desenvolvimento farmacotécnico, a verificação da estabilidade e a possibilidade de estudos de correlação *in vitro/in vivo* (EL-MASSIK *et al*., 1996; MARQUES, 2009; SHAH, 2005; SKOUG *et al*., 1997).

Os compêndios oficiais descrevem os ensaios de dissolução para alguns fármacos. Porém, aqueles que não são descritos devem ter seus métodos de dissolução desenvolvidos e validados (BRASIL, 2004). É o caso da progesterona, um hormônio esteroide muito utilizado em ginecologia e obstetrícia, que não apresenta método de dissolução descrito para nenhuma forma farmacêutica (FARM. BRAS, 1988; BP, 2000; JP, 2006; USP, 2008).

A progesterona está disponível comercialmente sob a forma de apresentação cápsula de gelatina mole com veículo oleoso, podendo ser administrada por via oral e vaginal (DEF, 2010). Tal forma de apresentação é interessante visto que oferece diversas vantagens como: adesão do paciente ao tratamento por ser de fácil deglutição, estabilidade do produto por proteger contra degradação oxidativa, uniformidade de dose com fármacos muito ativos por proporcionar um fluxo mais preciso e, principalmente, o aumento da absorção oral por facilitar a solubilização de fármacos fracamente solúveis em água (HUTCHISON e FERDINANDO, 2005).

Durante a realização de ensaios de dissolução *in vitro*, alguns fatores devem ser levados em consideração tais como: solubilidade, estabilidade em solução em

função do pH, influência de tensoativos, tamanho da partícula, excipientes que afetam a dissolução como a presença de agentes solubilizantes (ABDOU, 2004). Tais fatores podem afetar a velocidade de dissolução, comprometendo a biodisponibilidade do fármaco.

Para garantir que um novo método analítico (quantificação e dissolução) gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser submetido ao processo de validação, pois dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis (RIBANI *et al*., 2004), além de sérias consequências relacionadas aos desvios da qualidade dos produtos farmacêuticos.

Segundo a Resolução RE n° 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003) e a USP 31ª ed. (2008b), a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve atender alguns parâmetros adequados a cada tipo de análise tais como: seletividade, linearidade, precisão e exatidão.

Diante do exposto, o presente trabalho propõe o desenvolvimento e validação de método de dissolução para cápsulas de gelatina mole contendo progesterona, com a finalidade de avaliar o desempenho *in vitro* de duas especialidades farmacêuticas disponíveis no mercado.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TEORIA DA DISSOLUÇÃO

Dissolução é um processo heterogêneo clássico, pois ocorre nos limites da interface sólido-líquido (PILLAY e FASSIHI, 1999). Dois estágios consecutivos compõem a dissolução de um sólido em um líquido. O primeiro é uma reação interfacial que resulta na liberação de moléculas de soluto da fase sólida através da redução de forças intermoleculares; estas envolvem uma mudança de fase, de modo que as moléculas de sólido tornam-se moléculas de soluto no solvente no qual está se dissolvendo. O segundo envolve migração das moléculas de soluto pelas camadas limítrofes que circundam a partícula em direção ao seio da solução, através do aumento de interações soluto-solvente; estas promovem o transporte dessas moléculas para longe da interface sólido-líquido, ao seio da fase líquida, sob influência da difusão ou convecção (AULTON, 2005, KRAMER *et al*., 2005, PORTER *et al.*, 2007), como demonstrado na Figura 1.

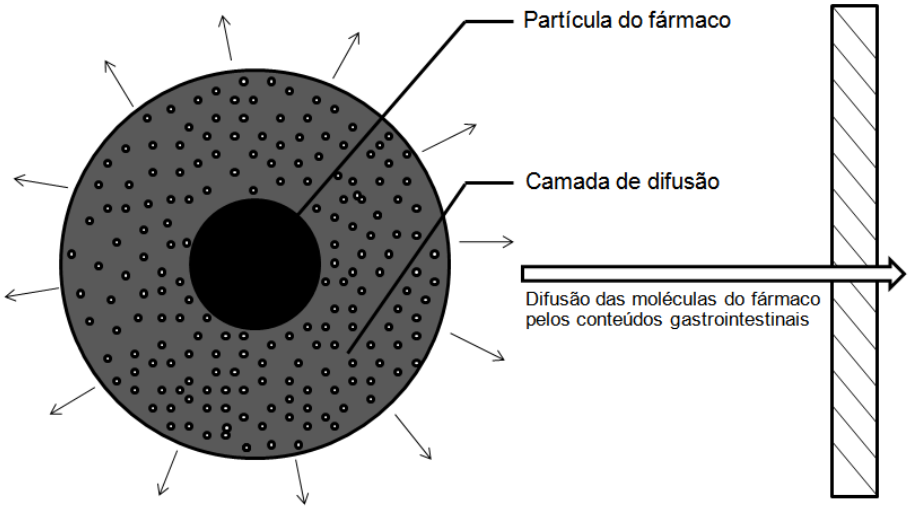


Figura 1: Representação esquemática da dissolução da partícula de um fármaco nos fluidos gastrointestinais (adaptado de ASHFORD, 2005, p. 247)

A velocidade de variação da concentração de material dissolvido com o tempo é diretamente proporcional à diferença de concentração entre os dois lados da camada de difusão, ou seja, a velocidade de difusão obedece à lei de difusão de Fick (AULTON, 2005), descrita na Equação 1.

$$\frac{dC}{dt} = K\Delta C \qquad \text{Equação 1}$$

Onde:

$\frac{dC}{dt}$ = Taxa de dissolução

K = Constante de velocidade (s^{-1})

ΔC = Diferença de concentração da solução entre a superfície sólida e o seio da solução.

Parâmetros físicos tais como a área de superfície, a forma da partícula e a solubilidade da substância no solvente governam a taxa de dissolução (MARCOLONGO, 2003). Dessa forma, a dissolução pode ser descrita matematicamente (Equação 2) pela equação de Noyes-Whitney modificada por Nerst e Brunner, baseada na lei de difusão de Fick (DOKOUMETZIDIS e MACHERAS, 2006).

$$\frac{dC}{dt} = \frac{DS}{Vh}(Cs - Ct) \qquad \text{Equação 2}$$

Onde:

$\frac{dC}{dt}$ = Taxa de dissolução do fármaco

Cs = Solubilidade da substância no solvente (ou concentração de saturação)

Ct = Concentração do soluto no tempo t

$Cs - Ct$ = gradiente de concentração

S = Área superficial da partícula

D = Coeficiente de difusão

h = Espessura da camada de difusão

V = Volume do meio de dissolução

Uma das suposições-chave em todos os estudos é que a concentração do soluto na superfície de dissolução é igual ao limite da solubilidade, independentemente das circunstâncias hidrodinâmicas aplicadas. Além disso, o fluxo

ou taxa de dissolução são considerados sempre diretamente proporcionais à solubilidade da substância sob condicões *sink* (DOKOUMETZIDIS *et al*., 2008).

Condição *sink* pode ser definida como um volume de, no mínimo, três vezes o volume de solvente necessário para se obter uma solução saturada de fármaco (BROWN, 2005; USP 31ª ed., 2008b; MARQUES, 2009). Tal condição é importante para garantir que a dissolução não seja limitada pela saturação do meio utilizado durante a realização do ensaio e, também, para proporcionar condições semelhantes ao fisiológico, visto que, no trato gastrintestinal, o fármaco é absorvido no momento em que ele se dissolve, não existindo, portanto, um aumento de concentração e um efeito retardador do gradiente de concentração sobre a taxa de dissolução (ABDOU, 2004).

2.2 DISSOLUÇÃO DE FORMAS FARMACÊUTICAS SÓLIDAS

A dissolução de medicamentos em sistemas biológicos pode ser definida como o processo em que um fármaco no estado sólido é liberado de sua forma farmacêutica de administração, dissolvido ou solubilizado, tornando-se disponível para ser absorvido (Figura 2). Portanto, a dissolução é uma importante condição para absorção sistêmica de fármacos, podendo afetar a biodisponibilidade dos mesmos (ABDOU, 2004; YUKSEL *et al*., 2000).

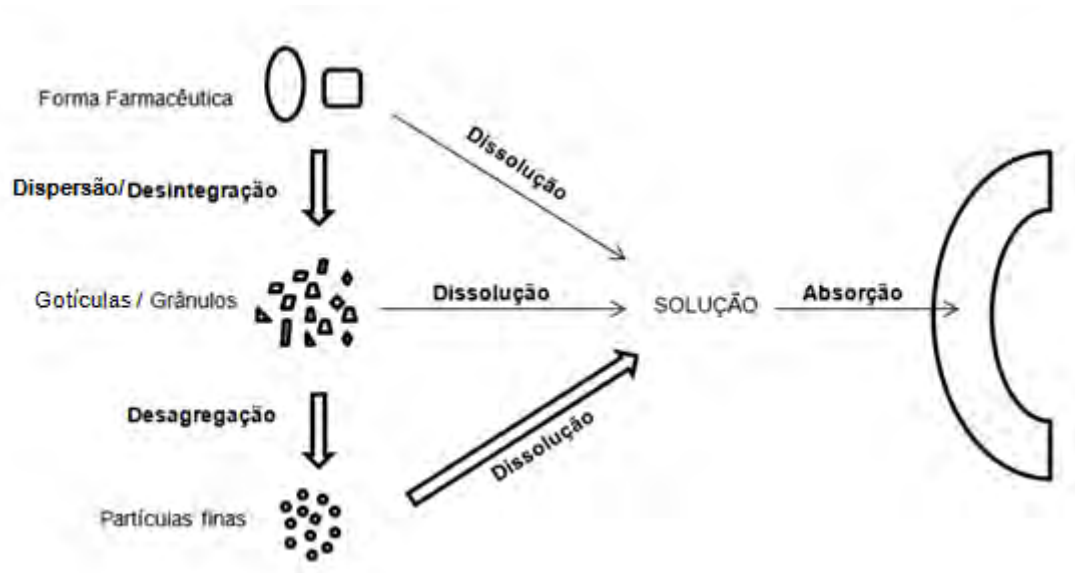


Figura 2: Etapas envolvidas na liberação do fármaco da forma farmacêutica (adaptado de TOZER e ROWLAND, 2009, p. 137)

Levando-se em consideração o esquema ilustrado na Figura 2, pode-se verificar que, quando a taxa de desintegração é maior do que a taxa de dissolução, a dissolução é controlada pela dissolução intrínseca do ativo, sendo suas propriedades físico-químicas consideradas importantes. No entanto, quando a taxa de desintegração é menor do que a taxa de dissolução, a dissolução é controlada pela desintegração, sendo esta influenciada pelas propriedades da formulação (BROWN *et al*., 2004; KRAMER *et al*., 2005).

As propriedades da formulação desempenham papel-chave no primeiro passo da dissolução. Para formas farmacêuticas sólidas, essas propriedades incluem a desintegração e erosão; já no caso de formulações semi-sólidas ou líquidas, a dispersão de lipídeos ou a divisão do fármaco na fase lipídica se torna relevante (BROWN *et al*., 2004).

Portanto, a observação de tais parâmetros durante o processo de desenvolvimento é de fundamental importância, pois está diretamente relacionada com o processo de absorção. Caso a velocidade de dissolução de uma partícula de fármaco seja rápida, a absorção torna-se, primeiramente, dependente de sua capacidade de atravessar a membrana gastrintestinal (permeabilidade) e do esvaziamento gástrico. Entretanto, caso a velocidade de dissolução seja lenta devido às suas características físico-químicas ou da forma farmacêutica, o processo de dissolução torna-se uma etapa limitante da velocidade de absorção (SIRISUTH e EDDINGTON, 2004; AULTON, 2005; ANSEL *et al*., 2007).

2.2.1 Fatores que influenciam no processo de dissolução e absorção de fármacos

Considerando que o processo de dissolução é bastante complexo, inúmeras variáveis capazes de modificar os ensaios devem ser analisadas, sendo que algumas devem ser rigorosamente monitoradas com o intuito de gerar resultados confiáveis (MARCOLONGO, 2003).

2.2.1.1 Fatores relacionados ao fármaco

2.2.1.1.1 Solubilidade

Solubilidade é definida pela extensão na qual uma molécula de um sólido é removida a partir de sua superfície por um solvente (BUENO e RECH, 2009), sendo considerada um parâmetro termodinâmico que representa a concentração da solução de um fármaco em equilíbrio com o soluto não dissolvido (AULTON, 2005). É também considerada o fator que mais afeta a velocidade de dissolução (ABDOU, 2004).

2.2.1.1.2 Tamanho da partícula

O tamanho da partícula de fármacos fracamente solúveis apresenta, geralmente, grande importância para a sua dissolução e absorção (DIEBOLD, 2005). Relaciona a área de superfície do fármaco com sua taxa de dissolução, ou seja, com a diminuição do tamanho da partícula há o aumento da área superficial e, consequentemente, maiores taxas de dissolução podem ser atingidas, como demonstrada pela equação de Noyes-Whitney modificada por Nerst e Brunner (Equação 2). Por essa razão, muitos fármacos encontram-se micronizados, de forma a facilitar a sua dissolução e sua absorção (MELIA e DAVIS, 1989; ABDOU, 2004). No entanto, deve-se considerar que existem alguns casos, como de fármacos que se degradam nos líquidos gástricos, em que a redução da partícula não representa um processo vantajoso para a absorção por favorecer a degradação química (ASHFORD, 2005; MARCOLONGO, 2003).

2.2.1.1.3 Natureza química

É sabido que a natureza química do fármaco (amorfismo, cristalinidade, hidratação e polimorfismo) influencia de forma significativa o ritmo de dissolução por apresentar diferentes propriedades físicas (ABDOU, 2004). Geralmente, substâncias anidras são mais solúveis que as hidratadas, assim como substâncias amorfas são mais solúveis que as cristalinas (AULTON, 2005; ANSEL *et al.*, 2007).

2.2.1.2 Fatores relacionados com a forma farmacêutica e com o processo de fabricação

2.2.1.2.1 Tipo de forma farmacêutica

O tipo de forma farmacêutica administrada por via oral influi no número de possíveis etapas até o processo de absorção. Portanto, quanto maior o número de etapas que intervêm no processo da absorção, maior será o número de potenciais obstáculos e a probabilidade de reduzir a biodisponilidade apresentada pelo fármaco. Logo, a biodisponibilidade de um determinado fármaco tende a diminuir de uma solução para uma suspensão e de uma suspensão para cápsulas ou comprimidos (ASHFORD, 2005).

2.2.1.2.2 Excipientes

Embora os excipientes sejam considerados inertes, já que não exercem uma ação biológica, podem influenciar de forma positiva ou negativa na velocidade e/ou extensão da absorção do fármaco conforme suas próprias características físico-químicas. Como exemplo, tem-se lubrificantes insolúveis que podem retardar o processo de dissolução por diminuir a molhabilidade do fármaco, e tensoativos que podem favorecer o processo de dissolução por aumentar a solubilização de fármacos fracamente solúveis em água (ASHFORD, 2005).

2.2.1.2.3 Tecnologia de fabricação

Alguns fatores tais como: o método de granulação, a força de compressão e a composição da formulação podem contribuir para as características da taxa de dissolução do produto final, pois podem promover alterações na densidade aparente, na dureza, no tamanho médio das partículas, na viscosidade, entre outros (ABDOU, 2004).

2.2.1.3 Fatores relacionados ao meio de dissolução

Segundo El-Massik e colaboradores (1996), dificuldades são usualmente encontradas em selecionar um meio de dissolução com volume e composição aceitáveis para fármacos insolúveis em água, bem como definir um método de dissolução com bom poder discriminativo.

2.2.1.3.1 Volume

O volume apropriado do meio de dissolução empregado depende principalmente da solubilidade do fármaco, devendo ser capaz de manter a condição *sink*. Isso se faz necessário, porque um excesso de meio permite que o fármaco se dissolva continuamente (MARCOLONGO, 2003; ROSA, 2005). No entanto, a condição *sink* não é uma condição obrigatória, desde que seja justificada (FIP, 1996)

Segundo Diebold (2005), o volume usado nos testes de dissolução não pode ser ignorado e tem influência não somente nos termos da força motriz da concentração para a dissolução, mas também do ponto de vista da hidrodinâmica.

2.2.1.3.2 Presença de ar/gases/bolhas

A presença de ar/gases dissolvidos no meio de dissolução pode gerar vários problemas; eles atuam como uma barreira diminuindo ou aumentando a razão de dissolução. As bolhas facilitam a aderência de partículas tanto na cuba como no mecanismo de agitação (USP 31ª ed., 2008b), podem aumentar a flutuabilidade da forma farmacêutica e conduzir a um aumento na taxa da dissolução ou diminuir a taxa de dissolução por diminuir a área superficial disponível (BROWN, 2005).

2.2.1.3.3 Valor do pH

Sabendo que fármacos administrados oralmente passam pelo trato gastrointestinal e que sofrem variações de pH entre cerca de 1 e 8 (GARAY, 2004), deve-se levar em consideração a relação entre o pH e a solubilidade de solutos ionizáveis, sendo extremamente importante no que diz respeito à ionização de fármacos do tipo ácidos fracos ou bases fracas (ROHRS, 2001; AULTON, 2005).

2.2.1.3.4 Temperatura

A temperatura é um parâmetro que pode influenciar na solubilidade do fármaco. Por isso, seu controle deve ser cuidadoso durante todo o processo de dissolução, não permitindo variações acima de 0,5°C (ABDOU, 2004). A maior parte dos testes de dissolução é conduzida à 37ºC ± 0,5ºC, exceto para produtos transdérmicos, nos quais a temperatura é tipicamente 32ºC ± 0,5ºC para refletir a temperatura da pele (SIEWERT *et al*., 2003).

2.2.1.3.5 Tensoativos

Os tensoativos são moléculas anfifílicas frequentemente utilizadas com o objetivo de alterar o meio reacional e permitir a solubilização de espécies de baixa solubilidade (MANIASSO, 2001; RANGEL-YAGUI *et al*., 2005). Os mecanismos mais prováveis de atuação dos tensoativos são a molhabilidade e a solubilização micelar (SCHOTT *et al*., 1982).

No processo de molhabilidade, ocorre o deslocamento de uma microfase de ar da superfície do sólido e há a substituição por uma microfase de líquido, diminuindo o ângulo de contato sólido-líquido e as tensões superficial e interfacial do meio aquoso. Por conseguinte, aumenta o processo de penetração do meio dissolvente na matriz sólida (SILVA e VOLPATO, 2002). Já na solubilização micelar, ocorre a formação de micelas. Estas são entidades lábeis formadas por agregação não-covalente de monômeros individuais de tensoativos e promovem interação reversível com o fármaco para formar uma solução isotrópica termodinamicamente estável reduzindo a atividade termodinâmica do produto solubilizado (RANGEL-YAGUI *et al*., 2005).

2.2.1.4 Fatores fisiológicos

2.2.1.4.1 Esvaziamento gástrico e trânsito intestinal

Segundo Diebold (2005), a hidrodinâmica do trato gastrointestinal é caracterizada pela cinética do esvaziamento gástrico, pelo trânsito intestinal e pela razão de fluxo do fluido intestinal. Por isso, mudanças no tempo de esvaziamento

gástrico e/ou na motilidade intestinal podem afetar o tempo de trânsito e, consequentemente, alterar os processos de dissolução e absorção (ANSEL *et al*., 2007). O tempo de esvaziamento gástrico é mais lento na presença de alimentos, e o trânsito intestinal menos afetado pelas condições alimentares (SOUZA *et al*., 2007).

Apesar de existir uma considerável variabilidade interindividual, o esvaziamento gástrico tanto de sólidos pequenos quanto de grandes é, em média, rápido durante o jejum, com tempo médio de cerca de 1 hora. O estômago demonstra, nesse estado, um padrão temporal complexo de atividade motora com alternância de períodos de imotilidade e moderada contração de frequência variável, o movimento peristáltico basal que move o material para o intestino delgado. Já no estado alimentado, a situação se difere um pouco, visto que o tempo de trânsito gástrico de sólidos é aumentado, variando de intensidade de acordo com o tipo de refeição e tamanho das partículas, sendo maior para refeições abundantes e partículas grandes (TOZER e ROWLAND, 2009).

O tempo de contato com o epitélio absortivo no intestino delgado é limitado, sendo tipicamente de 3,5 a 4,5 horas em indivíduos saudáveis (WILSON e KELLY, 2005). Portanto, esse fator deve ser levado em consideração durante o processo de desenvolvimento da formulação, uma vez que fármacos pouco solúveis ou produtos farmacêuticos mal formulados podem não ser completamente absorvidos e sair inalterados do trato gastrointestinal (ANSEL *et al.*, 2007).

2.3 SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA

O sistema de classificação biofarmacêutica (SCB) é uma ferramenta científica utilizada para classificar os fármacos quanto à solubilidade em água e à permeabilidade intestinal, visto que, combinados com a dissolução, governam a razão e a extensão da absorção (CDER/FDA, 2000; KRAMER *et al*, 2005).

A solubilidade do fármaco é determinada através da dissolução da maior dosagem do fármaco em 250 mL de uma solução tampão com pH entre 1,0 e 7,5 (CDER/FDA, 2000). O fármaco é considerado altamente solúvel quando o volume de dissolução for menor ou igual a 250 mL (CDER/FDA, 1997). O volume de 250 mL é utilizado, considerando-se o volume de um copo de água preconizado em protocolos de bioequivalência, na administração de medicamentos (CDER/FDA, 2000). A

solubilidade é considerada uma limitação físico-química do fármaco com potencial de causar liberação incompleta a partir da forma farmacêutica (FLACH e DALLA COSTA, 1999).

A permeabilidade do fármaco é considerada alta quando a extensão da absorção de uma dose administrada é maior ou igual a 90%. A permeabilidade é baseada indiretamente na extensão da absorção (fração da dose absorvida) e não na biodisponibilidade sistêmica de um fármaco (CDER/FDA, 2000); a biodisponibilidade pode ser influenciada por efeitos de metabolismo de primeira passagem, degradação no intestino e absorção limitada pela fraca solubilidade do fármaco (LINDENBERG *et al*.,2004).

Os fármacos foram classificados em quatro classes (I, II, III e IV) por Amidon *et al*. (1995), de acordo com os critérios de solubilidade e permeabilidade, como ilustrado na Figura 3.

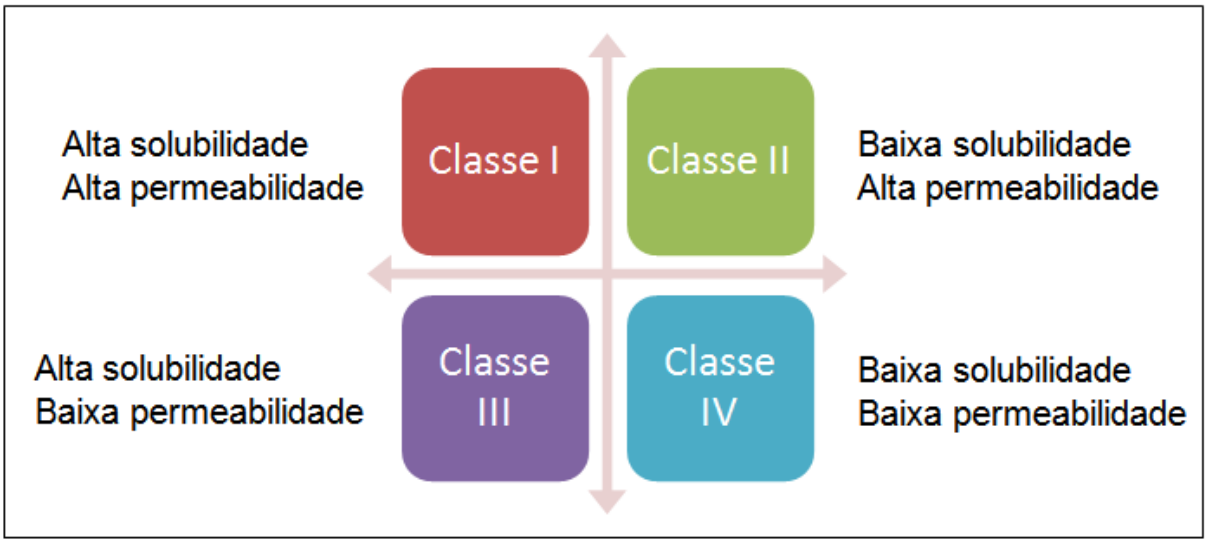


Figura 3: Representação esquemática do sistema de classificação biofarmacêutica (Adaptada de DRESSMAN *et al*., 1998)

Os fármacos pertencentes à classe I possuem alta solubilidade e alta permeabilidade. Portanto, a dissolução não é a razão limitante para a absorção oral e a correlação ponto a ponto entre a dissolução *in vitro* e a absorção não é esperada, a não ser que a velocidade de dissolução seja mais lenta do que a velocidade de esvaziamento gástrico (GALIA *et al*., 1998; YU *et al*., 2004).

Os fármacos pertencentes à classe II, em que se tem baixa solubilidade e alta permeabilidade, a dissolução torna-se a razão limitante para que ocorra a absorção,

e uma correlação *in vitro/in vivo* significativa é esperada. Por isso, meios de dissolução fisiologicamente compatíveis são preferencialmente utilizados, devendo-se levar em consideração uma variedade de fatores tais como: tensoativos, pH, capacidade tamponante, entre outros (GALIA *et al*., 1998; DRESSMAN e REPPAS, 2000). É a classe de fármacos em que o perfil de dissolução deve ser mais claramente definido e reproduzível (AMIDON et al., 1995). A variabilidade na absorção pode ocorrer devido a fatores como diferenças de formulação e variáveis fisiológicas (FLACH e DALLA COSTA, 1999).

No caso de fármacos pertencentes à classe III apresentando alta solubilidade e baixa permeabilidade, o perfil de dissolução pode até ser bem definido. No entanto, a absorção se torna dependente da permeabilidade das membranas. Sendo assim, espera-se limitada ou nenhuma correlação *in vitro/in vivo* (AMIDON *et al.*, 1995; YU *et al*., 2004). Fatores como diferenças no trânsito gastrointestinal, conteúdo luminal e permeabilidade da membrana podem influenciar na velocidade e extensão da absorção (FLACH e DALLA COSTA, 1999).

Os fármacos de classe IV, que apresentam baixa solubilidade e baixa permeabilidade, possuem limitada probabilidade de correlação *in vitro/in vivo* (AMIDON *et al.*, 1995; YU *et al*., 2004). Apresentam alta variabilidade na velocidade e extensão de absorção, sendo problemáticos para a utilização oral (CDER/FDA, 1997; FLACH e DALLA COSTA, 1999).

Dessa forma, o sistema de classificação biofarmacêutica pode ser utilizado para determinar algumas especificações do método de dissolução *in vitro* (BRASIL, 2002). A escolha do meio de dissolução para fármacos de classe I (alta solubilidade e alta permeabilidade) não é problemática, pois a alta solubilidade favorece a dissolução em qualquer meio aquoso, desde que não haja qualquer problema de desintegração. Já para fármacos de classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade), a escolha do meio deve ser mais cautelosa e alguns parâmetros devem ser levados em consideração, tal como o grau de ionização do fármaco e a inclusão de agentes tensoativos (AMIDON, 1995; OLIVEIRA, 2006). Portanto, a classificação em que o fármaco se enquadra deve ser levada em consideração durante o desenvolvimento do método de dissolução.

Alguns fármacos têm sua classificação biofarmacêutica bem estabelecida, enquanto que outros ainda não, como é o caso da progesterona. No entanto, apesar de a progesterona não possuir sua classificação claramente definida na literatura,

sabe-se que ela é praticamente insolúvel em meio aquoso (8,81 mg/L dissolvido em água) (CLARKE'S, 2004; Drugbank), sendo incapaz de dissolver 200 mg em 250 mL (quase 1mg/mL) e que mostrou ser 100% absorvida em humanos, de acordo com o trabalho realizado por Rubas *et al.* (1993). Por conseguinte, pode-se inferir que a progesterona enquadra-se na classe II do SCB, apresentando baixa solubilidade e alta permeabilidade.

2.4 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE DISSOLUÇÃO

Historicamente, os testes de dissolução têm sido utilizados como ferramenta analítica durante os estágios de desenvolvimento de produtos, através da razão de liberação do fármaco da forma farmacêutica, da avaliação da estabilidade das formulações, bem como do estabelecimento do relacionamento *in vitro/in vivo*. Por isso, o desenvolvimento de um método discriminativo sensível às variáveis que afetam a razão de dissolução é de fundamental importância (BROWN *et al*., 2004).

O teste de dissolução é uma técnica dedicada, principalmente, a determinar a influência das propriedades da forma farmacêutica na eficácia do medicamento. É necessário, consequentemente, o prévio desenvolvimento do método de dissolução para determinar se as características do fármaco em questão e/ou as propriedades da forma farmacêutica, como fatores que podem afetar a liberação do fármaco *in vivo*, são prováveis de ser a razão limitante para a absorção do fármaco e, subsequentemente, sua eficácia. Por isso, a avaliação do sistema de classificação biofarmacêutica deve ser a primeira etapa durante o desenvolvimento do teste de dissolução (KRAMER *et al*., 2005).

O ensaio de dissolução deve ser realizado, sempre que possível, sob condições fisiológicas. As condições do teste devem ser baseadas nas características físico-químicas do fármaco e das condições às quais a forma farmacêutica será exposta após a administração (CDER/FDA, 1997). Conhecendo suas propriedades, a seleção do meio de dissolução, bem como o volume do mesmo serão facilitados. Algumas propriedades físico-químicas que podem influenciar nas características da dissolução são: constante de ionização (pKa), solubilidade em função do pH, estabilidade em função do pH, tamanho da partícula, forma do cristal, efeito tampão (BROWN, 2005).

O desenvolvimento de um método de dissolução representativo para medicamentos contendo fármacos com solubilidade limitada em água tem sido desafiador para indústrias farmacêuticas e agências regulatórias. *In vivo*, tensoativos naturais presentes no organismo promovem a dissolução e subseqüente absorção de fármacos com limitada solubilidade em água. *In vitro*, várias técnicas têm sido utilizadas para encontrar condições adequadas de dissolução para esses tipos de fármacos, como o uso de métodos mecânicos (aumento da velocidade de agitação) e grande volumes de meio (NOORY *et al*., 2000).

Segundo o CDER/FDA (1997), o conhecimento relacionado à solubilidade, permeabilidade, dissolução e farmacocinética do fármaco deve ser considerado para a definição de especificações de dissolução.

2.4.1 Escolha das condições do método de dissolução

Com o intuito de detectar eventuais desvios aos padrões de qualidade inicialmente pretendidos como mudanças na formulação, processo de produção ou características físico-químicas do fármaco (tamanho de partícula, área de superfície, polimorfos, estado de hidratação) e de estabelecer correlações com os dados obtidos *in vivo*, uma seleção criteriosa das condições do ensaio deve ser orientada no sentido de se obter o máximo poder discriminatório (MANADAS *et al*., 2002; MARQUES, 2009).

2.4.1.1 Dispositivo/Método

A escolha do dispositivo deve ser considerada durante o desenvolvimento do método de dissolução, pois pode afetar o resultado e a duração do teste. O tipo de forma farmacêutica deve ser considerado na seleção do dispositivo. De todos os tipos de dispositivos descritos pela USP 31ª ed (2008c), os dispositivos 1 e 2 são os mais largamente utilizados no mundo porque são simples, robustos e adequadamente padronizados. Por causa dessas vantagens, são usualmente os de primeira escolha para testes de dissolução *in vitro* de formas farmacêuticas sólidas orais (CDER/FDA, 1997; KRAMER *et al.*, 2005).

Outros dispositivos, porém, podem ser utilizados caso os dispositivos 1 e 2 não sejam apropriados. Os dispositivos 3 e 4 (cilindros recíprocos e células de fluxo)

podem ter utilidade para cápsulas de gelatina mole, supositórios, ou fármacos fracamente solúveis em água. Dispositivos 5 e 6 (pá sobre o disco e cilindros rotatórios) têm demonstrado ser úteis na avaliação de formas farmacêuticas transdérmicas, e o dispositivo 7 (suporte recíproco) pode ser útil em formas farmacêuticas orais que não se desintegram, além de transdérmicos (USP 31ª ed., 2008b).

2.4.1.2 Velocidade de rotação/agitação

De acordo com a Resolução RE nº 483 (BRASIL, 2002), os ensaios de dissolução devem ser realizados utilizando-se as velocidades de rotação de 50 e 100 rpm para o dispositivo cesta e 50, 75 e 100 rpm para o dispositivo pá. No entanto, velocidades entre 25 e 150 rpm podem ser utilizadas desde que sejam apropriadamente justificadas. Velocidades abaixo de 25 rpm podem promover inconsistência na hidrodinâmica, enquanto que acima de 150 rpm podem causar turbulência no sistema (USP 31ª ed., 2008b).

2.4.1.3 Meio de dissolução

A seleção do meio de dissolução é baseada, em parte, na solubilidade do fármaco e na faixa de dosagem da forma farmacêutica a fim de assegurar a condição *sink*. Além da solubilidade, o meio apropriado deve ser discriminativo, ou seja, capaz de detectar mudanças no produto, proporcionar estabilidade do analito, e, ainda, demonstrar biorrelevância, se possível (BROWN, 2005).

Geralmente, meios aquosos como fluido gástrico simulado e fluido entérico simulado sem enzimas, água e tampões têm sido empregados no estudo de dissolução de formas farmacêuticas sólidas contendo fármacos solúveis em água. No entanto, para fármacos fracamente solúveis em água, meios aquosos comumente utilizados não são adequados, sendo necessária a inclusão de agentes tensoativos como sais e ácidos de bile, lecitina e tensoativos sintéticos, para aumentar a razão de dissolução (SHAH *et al*., 1989). Tensoativos sintéticos como o lauril sulfato de sódio, têm demonstrado intercambialidade *in vitro* com tensoativos naturais, como taurocolato de sódio e colato de sódio (SHAH *et al*., 1995).

De acordo com Shah e colaboradores (1995), tensoativos podem ser utilizados em meios de dissolução como um método alternativo ao dispositivo 4 (células de fluxo) nos casos de fármacos fracamente solúveis em água.

Segundo Marques (2009), a água como meio de dissolução deve ser evitada, por não ser biorrelevante e não ter capacidade tamponante. E solventes orgânicos, condição que era aceita até alguns anos atrás, não podem mais ser utilizados.

2.4.1.4 Volume do meio

A USP 31ª ed. (2008b) estabelece que, para os aparatos cesta e pá, o volume de meio de dissolução varie de 500 a 1000 mL, sendo o volume de 900 mL o mais comumente utilizado. Entretanto, volumes maiores como 2000 ou 4000 mL podem ser utilizados para que a condição *sink* seja estabelecida.

2.4.1.5 Observações visuais

Durante o desenvolvimento do teste de dissolução, é extremamente importante as seguintes observações visuais do comportamento da forma farmacêutica dentro da cuba de dissolução: a maneira como a forma farmacêutica se desintegra e sua velocidade, o modo como as partículas se dispersam, a presença ou não de bolhas e a formação de cone no fundo da cuba. Tais informações são muito importantes na tomada de decisão para a melhoria e a otimização do método e para a caracterização do comportamento habitual da forma farmacêutica (USP 31ª ed., 2008b; MARQUES, 2009).

2.4.1.6 Especificações e Tolerâncias

Os resultados da dissolução devem ser expressos em porcentagem levando-se em consideração o teor de fármaco declarado no rótulo. Portanto, não se deve ajustar o resultado nem em função do teor de fármaco no produto nem com base na uniformidade de distribuição da dose (USP 31ª ed., 2008b; MARQUES, 2009).

Para a caracterização de formulações, testes de dissolução devem ser executados em diferentes condições do ensaio até que a dissolução exceda 80% da quantidade declarada (FIP, 1996).

Segundo a USP 31ª ed. (2008b), para formas farmacêuticas de liberação imediata, a duração do ensaio é tipicamente de 30 a 60 minutos. No caso de produtos que se dissolvem lentamente, pontos acima de 60 minutos podem ser utilizados. Ainda podem ser utilizados pontos no infinito durante o desenvolvimento do estudo. Para tanto, deve-se aumentar a velocidade de rotação por um período sustentado (tipicamente de 15 a 60 minutos) após o final da corrida.

Para formulações de liberação controlada/modificada (exceto liberação retardada), especificações de dissolução devem consistir em três pontos. O primeiro serve para prevenir a dose “dumping” devendo ser verificado após o intervalo de tempo de uma a duas horas, ou corresponder a uma quantidade dissolvida de 20% a 30% da quantidade declarada. O segundo deve definir a dissolução ao redor de 50% da quantidade declarada. A especificação final é geralmente entendida como a quantidade dissolvida maior ou igual a 80% da quantidade declarada (FIP, 1996; USP 31ª ed., 2008b).

2.4.2 Forma Farmacêutica

Cápsulas de gelatina mole são formadas por uma matriz líquida ou semi-sólida incorporada em um invólucro de gelatina externo monolítico, constituído por gelatina, água e plastificantes, estando o fármaco em solução ou suspensão na matriz de enchimento da cápsula. Tal matriz pode ter características hidrofílicas (polietilenoglicol), lipofílicas (triglicerídeos de óleos vegetais) ou uma mistura das duas e conter diversos adjuvantes como, por exemplo, um ou mais tensoativos com a função de auxiliar na estabilidade, molhabilidade ou, ainda, permeabilidade do fármaco (HUTCHISON e FERDINANDO, 2005).

Tanto cápsulas duras quanto moles preenchidas com veículos capazes de se autoemulsionar, devido a sua habilidade de formar fina emulsão óleo em água, oferecem melhor potencial para liberação de fármacos hidrofóbicos e fracamente absorvíveis após administração oral. Entretanto, a avaliação *in vitro* dessas formas farmacêuticas têm sido problemática, pois, até agora, não foi estabelecido método de dissolução oficial para formulações baseadas em lipídeos (PILLAY e FASSIHI, 1999; USP 31ª Ed, 2008).

2.5 FORMULAÇÕES BASEADAS EM LIPÍDEOS

As características hidrofóbicas de certos fármacos dificultam a formulação de formas farmacêuticas destinadas à administração oral devido à menor solubilidade de tais moléculas em sistemas aquosos, proporcionando, assim, uma liberação incompleta e, consequentemente, menor absorção. Nesse sentido, a incorporação de fármacos em veículos oleosos (lipídeos) adicionados em cápsulas de gelatina mole com o objetivo de transformá-las em formas farmacêuticas sólidas orais, tem sido um dos melhores métodos para contornar esse problema (HUTCHISON e FERDINANDO, 2005).

O interesse por formulações contendo fármacos fracamente solúveis em água veiculados em lipídeos (soluções, suspensões, emulsões, sistemas auto-emulsionados, microemulsões) tem aumentado, pois favorecem a solubilização do fármaco no trato gastrointestinal e, consequentemente, melhora a biodisponibilidade oral. Tal processo pode ser explicado, porque a absorção de fármacos fracamente solúveis em água, normalmente, é limitada pela taxa de dissolução. Sendo assim, utilizando-se formulações contendo lipídeos externos, ocorre o estímulo da secreção de sais de bile, lecitina e colesterol da vesícula biliar, além de fluidos pancreáticos do pâncreas que auxiliam na solubilização e absorção do fármaco (HUMBERSTONE e CHARMAN, 1997; PORTER e CHARMAN, 2001; KOSSENA *et al*., 2007), como demonstrado na Figura 4:

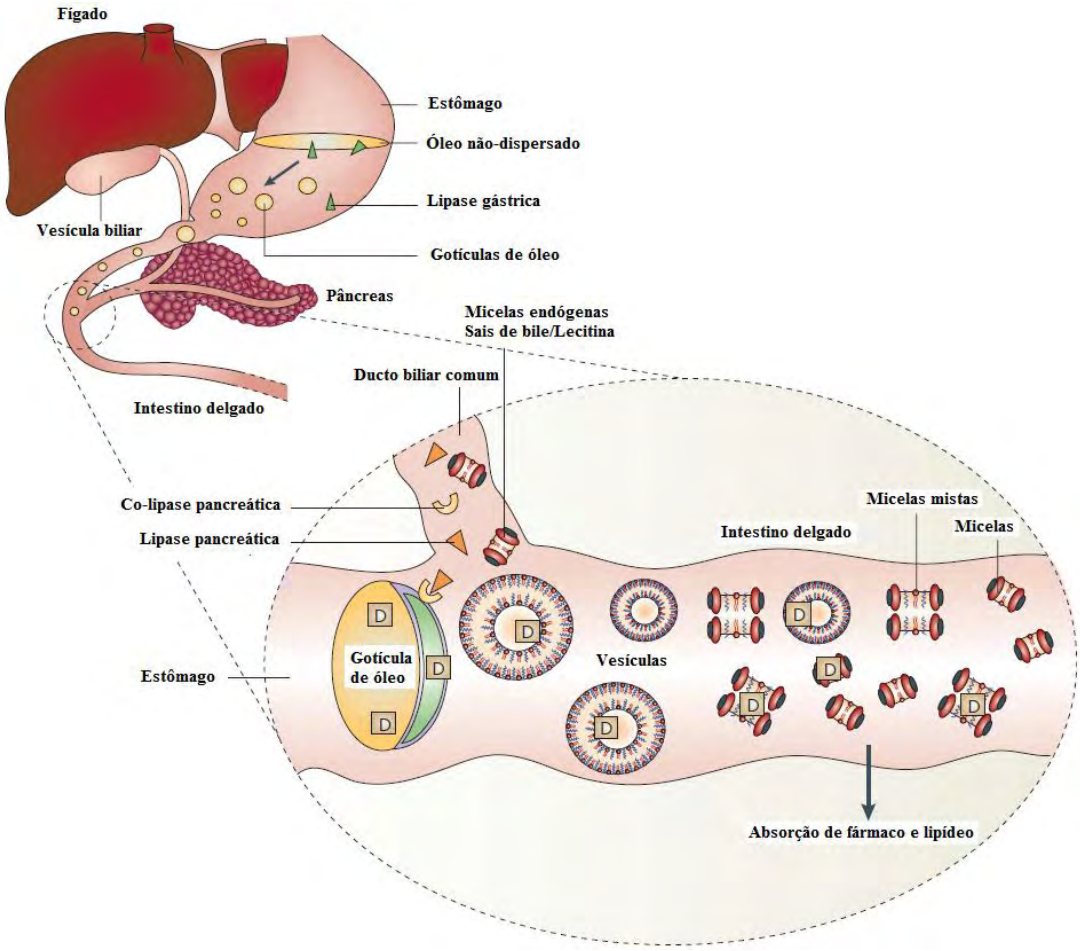


Figura 4: Digestão lipídica e solubilização do fármaco no intestino delgado
(Adaptado de PORTER *et al*., 2007)

Segundo PORTER e colaboradores (2007), são três os mecanismos básicos em que os lipídeos e excipientes lipofílicos podem afetar a disposição de fármacos após a administração oral, a absorção e a biodisponibilidade: alteração da composição e caráter do ambiente intestinal, recrutamento do transporte linfático e interação com processos de transporte baseados em enterócitos. O primeiro se deve ao aumento da secreção de componentes endógenos solubilizantes, derivados biliares e enzimas. O segundo, embora o exato mecanismo de seu acesso não esteja completamente entendido, acredita-se que seja através da associação de fármacos com lipoproteínas. E o terceiro, através de mudanças na disposição intracelular do fármaco influenciando na extensão do transporte linfático.

O transporte linfático é interessante para fármacos que sofrem intensa metabolização, pois são diretamente transportados para a circulação sistêmica sem passar primeiramente pelo fígado. Por conseguinte, ocorre redução de metabolismo de primeira passagem hepática e consequente aumento da biodisponibilidade

(PORTER *et al.*, 2007). Tal mecanismo pode ser aplicado à progesterona, como exemplificado por Humberstone e Charman (1997).

As formulações baseadas em lipídeos foram classificadas por Pouton (2000) em três tipos de sistemas: I, II e III. O tipo I consiste de fármacos em solução em triglicerídeos e/ou mistura de glicerídeos ou em emulsões óleo em água estabilizadas por uma baixa concentração de emulsionantes, como 1% de polissorbato 60 e 1,2% de lecitina. O tipo II, denominado sistema de liberação de fármacos autoemulsionados (*Self-Emulsifying Drug Delivery System* - SEDDS), é caracterizado por misturas isotrópicas de lipídeos e tensoativos lipofílicos que se autoemulsionam formando uma emulsão óleo em água fina, quando introduzidas em meio aquoso. Esse sistema é obtido, geralmente, com a quantidade de tensoativos acima de 25% (v/v) e encapsulados em cápsulas de gelatina dura ou mole para produzir uma forma de dosagem conveniente. E, por último, o tipo III, usualmente referido como sistema de liberação de fármaco auto-microemulsionável (*Self-Microemulsifying Drug Delivery System* - SMEDDS) é definido pela inclusão de tensoativos hidrofílicos e co-solventes tais como etanol ou propilenoglicol (HUMBERSTONE e CHARMAN, 1997; PORTER *et al*., 2008).

Segundo Pouton (2006), a escolha da formulação é frequentemente de importância crítica para desenvolver um produto contendo fármacos classe II (SCB) bem sucedido para administração oral, sendo a razão e a extensão da absorção desses fármacos altamente dependentes do desempenho da formulação. Logo, são necessários alguns cuidados no desenvolvimento da formulação para assegurar biodisponibilidade consistente.

A natureza química e a dinâmica da digestão do lipídeo utilizado como veículo podem influenciar na biodisponibilidade oral de fármacos fracamente solúveis em água, pois, geralmente, a razão, a extensão e a quantidade de produtos formados durante o processo de digestão, bem como o grau de dispersão desses produtos são fatores que governam o potencial aumento da absorção. Os lipídeos podem ser não digeríveis (óleo mineral) e digeríveis (óleo de soja, óleo de milho), apresentar maior ou menor extensão na cadeia carbônica, podendo ser classificados como de baixa, média ou longa cadeia e possuir um maior ou menor grau de insaturação. Para formulações baseadas em soluções lipídicas, os óleos digeríveis são preferidos para aumentar a biodisponibilidade através da solubilização do fármaco em espécies coloidais formadas pela digestão dos lipídeos. Já em relação à extensão da cadeia,

há variação de fármaco para fármaco, sendo os lipídeos de cadeia média e longa os que apresentam melhores performances (DAHAN e HOFFMAN, 2008; PORTER *et al*., 2008).

Diante da fraca solubilidade e do intenso metabolismo de primeira passagem hepática sofrido pela progesterona, estão disponíveis comercialmente formulações a base de lipídeos para a administração oral e/ou vaginal (DEF, 2010), com o intuito de melhorar a biodisponibilidade do fármaco. Estudos clínicos recentes mostraram o aumento da absorção oral de progesterona micronizada quando administrada em forma de suspensão veiculada em ácidos graxos de cadeia longa. A base da proposta foi melhorar a biodisponibilidade reduzindo o metabolismo de primeira passagem hepática devido à promoção do transporte linfático (HUMBERSTONE e CHARMAN, 1997). Em seguida, estudo realizado por MacGregor *et al*. (1997), comparando formulação contendo 100 mg de progesterona veiculada em suspensão oleosa com formulações autoemulsionadas (SEDDS), demonstrou concentração plasmática máxima ($C_{máx}$) e área sob a curva (ASC) entre 8 a 10 vezes melhor no segundo caso, confirmando o potencial desse tipo de formulação.

2.6 PROGESTERONA

Progesterona é um hormônio formado por precursores esteroides nos ovários, testículos, glândulas adrenais, placenta e células da glia no sistema nervoso central, estando presente em altas concentrações no corpo lúteo. Seus receptores estão localizados no útero, sistema nervoso central, glândulas mamárias e glândula pituitária (FITZPATRICK e GOOD, 1999).

Segundo Pucci e colaboradores (2003), ela é sintetizada a partir do colesterol e é precursora de muitos hormônios esteroides, incluindo glicocorticoides, mineralocorticoides, andrógenos e estrógenos (Figura 5).

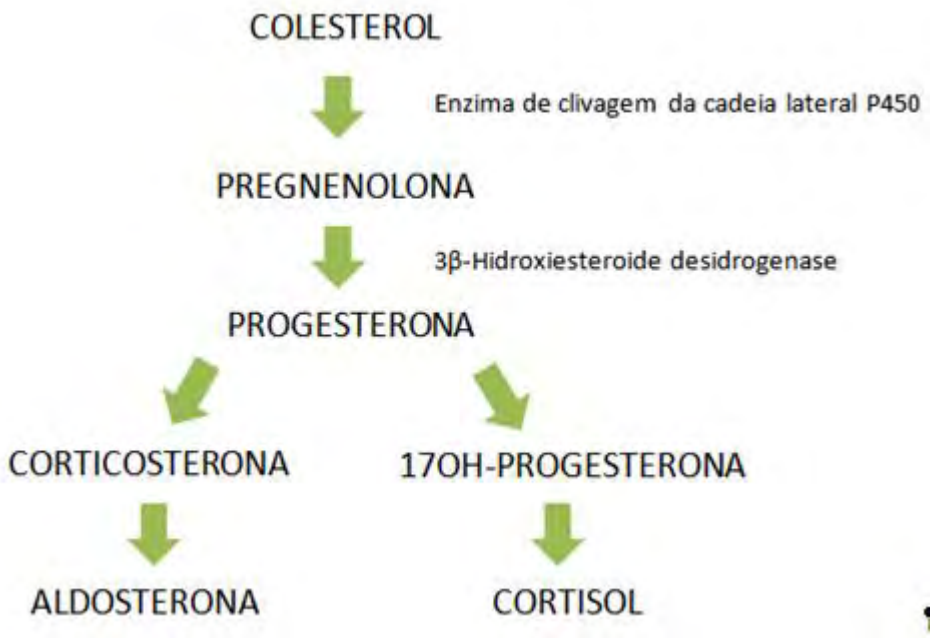


Figura 5: Biossíntese da progesterona (Adaptado de PEREZ, 2007)

Esse hormônio pode ser sintetizado e metabolizado nas células da glia, e alguns de seus metabólitos podem reagir com receptores gaba, promovendo efeitos hipnóticos, ansiolíticos ou anti-epilépticos e, também, produzindo mudanças na biossíntese da prolactina e da gonadotrofina coriônica (GnRH) (LIGNIERES *et al*., 1995).

2.6.1 Propriedades físico-químicas

Progesterona é um hormônio cortical derivado do ciclopentanoperidrofenantreno, formado por três anéis de seis carbonos e um de cinco carbonos (NICOLA, 2004). Representa um derivado do hidrocarboneto pregnano com 21 átomos de carbono e uma cadeia lateral de dois carbonos na posição 17. Quimicamente, corresponde ao pregn-4-eno-3,20-diona (PUCCI *et al*., 2003), como ilustrado na Figura 6.

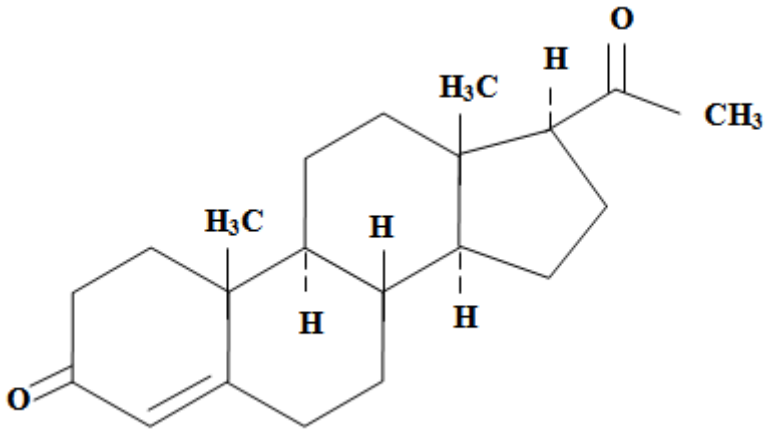


Figura 6: Estrutura química da progesterona.

Suas propriedades físico-químicas estão demonstradas no Quadro 1 (BEDMAR *et al*., 1996; MERCK INDEX, 2006).

Características	Descrições
Fórmula molecular	$C_{21}H_{30}O_2$
Peso molecular	314,5 $g.mol^{-1}$
Ponto de fusão dos polimorfos	127 – 131°C (α) e 121°C (β) - ortorrômbicos
Solubilidade	Praticamente insolúvel em água; solúvel em etanol, metanol, acetona, dioxano, ácido sulfúrico concentrado, clorofórmio e éter; levemente solúvel em óleos vegetais
Coeficiente de partição (log P)	3,87

Quadro 1: Propriedades físico-químicas da progesterona.

2.6.2 Propriedades farmacodinâmicas

Os principais efeitos tendem a preparar o organismo para uma possível gestação, promovendo alterações secretoras no endométrio uterino durante a segunda metade do ciclo sexual feminino mensal, para favorecer a implantação do embrião. Além desse efeito sobre o endométrio, a progesterona diminui a frequência e a intensidade das contrações uterinas, dessa maneira ajudando a impedir a expulsão do embrião implantado (GUYTON e HALL, 1997; GERMOND *et al*., 2002, JANÁT-AMSBURY *et al.*, 2009). Além disso, promove o desenvolvimento de lóbulos

e alvéolos mamários e induz a diferenciação dos ductos, transformando-os em tecido secretor (CUNEO *et al*., 2004).

Ela tem sido efetivamente utilizada em uma variedade de terapias. Os usos terapêuticos mais frequentes são nos casos de disfunções uterinas como hemorragias e amenorréia secundária, contracepção, terapia de reposição hormonal em mulheres na pós-menopausa (FITZPATRICK e GOOD, 1999; PUCCI *et al*., 2003), nos casos de suporte da fase lútea durante as técnicas de reprodução assistida (KLEINSTEIN, 2005), bem como no desenvolvimento normal dos neurônios no cérebro exercendo efeitos protetores no tecido cerebral danificado (BAULIEU e SCHUMACHER, 2000).

2.6.3 Propriedades farmacocinéticas

2.6.3.1 Absorção

Propriedades farmacocinéticas da progesterona administrada oralmente são influenciadas pela ingestão de alimentos, bem como pelo veículo e o tamanho da partícula (HARGROVE *et al*., 1989; TAVANIOTOU *et al*., 2000).

De acordo com Fitzpatrick e Good (1999), a concentração de progesterona obtida após a administração oral do hormônio micronizado é altamente variável. No entanto, após a administração oral, a concentração plasmática máxima ($C_{máx}$) e a área sob a curva (ASC) são proporcionais à dose administrada na faixa de 100 – 300 mg.

A circulação periférica da progesterona foi investigada em cinco mulheres pós-menopausadas após a administração diária de 100 mg por cinco dias diferentes. A concentração plasmática máxima de progesterona foi observada com quatro horas após a ingestão da última dose. Esse estudo mostrou que a absorção, a metabolização e o clearance são rápidos (WHITEHEAD *et al.*, 1980). Outros estudos demonstraram que os níveis plasmáticos máximos foram alcançados com 1 a 4 horas (média de 2,4h ± 0,51h) após a ingestão de cápsula de gelatina mole contendo 100 mg de progesterona micronizada e, com 2 a 8 horas (média de 3,6h ± 1,17h) para a dosagem de 200mg (2 cápsulas de 100mg) (PADWICK *et al*., 1986)

2.6.3.2 Metabolização

Observações clínicas sugerem possíveis diferenças nos metabólitos da progesterona de acordo com a via de administração, principalmente nos níveis dos metabólitos 5α- e 5β-pregnenolona (LIGNIERES *et al*., 1995).

Quando administrada oralmente, a progesterona sofre metabolismo no intestino, parede intestinal e no fígado formando metabólitos hidroxilados e seus derivados sulfatados e glicuronídeos (FITZPATRICK e GOOD, 1999). Ela sofre vários e sucessivos processos de metabolização. O primeiro passo ocorre em contato com bactérias do intestino que possuem atividade 5β-redutase e iniciam a conjugação do esteroide com ácido glicurônico. O segundo passo é o contato com enzimas hepáticas após a circulação no sistema vascular portal. Células do fígado, em mulheres, expressam frequentemente as enzimas 5β-redutase e 3α-hidroxilase, que também são capazes de conjugar esteroides com ácido glicurônico (LIGNIERES *et al*., 1995).

2.6.3.3 Eliminação

A meia vida de eliminação da progesterona é de cerca de 5 minutos. Seus metabólitos hidroxilados e seus conjugados sulfatados e glicuronídeos são eliminados na urina (LOOSE-MITCHELL e STANCEL, 2003; RANG e DALE, 2007).

2.6.4 Vias de administração

Diferentes vias de administração para progesterona têm sido utilizadas como a intra-nasal, sublingual e via retal. No entanto, as vias oral, intramuscular e vaginal têm sido mais frequentemente investigadas (TAVANIOTOU *et al*., 2000).

Antigamente, progesterona não apresentava atividade apreciável quando administrada por via oral, por sofrer intenso metabolismo de primeira passagem sendo prontamente inativada pelo fígado (PUCCI *et al*., 2003). Mas, recentemente, pesquisadores desenvolveram preparações com doses altas de progesterona micronizada contendo partículas pequenas suspensas em óleo e acondicionadas em cápsulas de gelatina. Embora a biodisponibilidade absoluta dessas preparações

ainda seja pequena, podem ser conseguidos níveis plasmáticos eficazes (LOOSE-MITCHELL e STANCEL, 2003).

A micronização da progesterona em partículas de tamanho inferior a 10 µm aumenta a área superficial do fármaco e, consequentemente, a razão de dissolução aquosa e a absorção intestinal. A absorção intestinal também pode ser melhorada através da veiculação em óleo dispensada em cápsulas de gelatina (HARGROVE *et al*., 1989).

A via de administração vaginal tem muitas vantagens quando comparada com outras vias. A vagina fornece um sítio promissor de entrega sistêmica de fármacos, pois apresenta uma grande área de superfície, é rica em suprimento sanguíneo e evita o metabolismo de primeira passagem hepática (HUSSAIN e AHSAN, 2005; VALENTA *et al*.,2001). Favorece a otimização de efeitos no endométrio com mínima exposição sistêmica e reduz a incidência de efeitos colaterais comparados com a via oral (CICINELLI, 2008). Possui boa absorção, apresenta níveis da concentração máxima com 3 a 8 horas dependendo da formulação usada. No entanto, pode apresentar alguns efeitos desagradáveis tais como: corrimento, irritação ou calor local (TAVANIOTOU *et al*., 2000; CHAKRAVARTY *et al*., 2005).

Progesterona pode ser efetivamente utilizada pela via intramuscular, sendo rapidamente absorvida. No entanto, é desconfortável e requer injeções diárias para manter concentrações séricas apropriadas, além de poder causar inflamação no sítio de aplicação, dor e formação de abcessos estéreis (TAVANIOTOU *et al*., 2000, GERMOND *et al.*, 2002). Além disso, deve ser administrada por um profissional capacitado (LEVY *et al*., 2000).

Por isso, o presente trabalho mostra-se relevante, pois, sabendo da importância do fármaco em diversas terapias, da presença de formas farmacêuticas de uso oral/vaginal no mercado e da ausência de uma metodologia oficial disponível, o estudo da liberação *in vitro* da progesterona a partir de cápsulas de gelatina mole proporcionará a investigação da performance dos produtos e, consequentemente, aumentará a segurança no momento da escolha.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método de dissolução para cápsulas de gelatina mole contendo progesterona, a fim de avaliar a liberação *in vitro* e o desempenho de especialidades farmacêuticas disponíveis comercialmente.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar e aplicar uma metodologia analítica para quantificação do fármaco obtido em amostras geradas em ensaios de dissolução, validando-a segundo os critérios especificados pela Resolução RE 899/2003 e ICH 2005.
- Avaliar a solubilidade da progesterona em diferentes meios para garantir condição *sink* nos experimentos de dissolução;
- Determinar parâmetros adequados (meio, aparato, rotação) para aplicação do processo de dissolução *in vitro*;
- Validar o método de dissolução desenvolvido utilizando os parâmetros citados pela USP 31ª ed. (2008b), além de verificar a estabilidade do fármaco em meio de dissolução para demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida;
- Avaliar o desempenho das especialidades farmacêuticas através do método de dissolução desenvolvido, eficiência de dissolução, cinética de liberação e análise estatística.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Equipamentos e Acessórios

- Agitador magnético com aquecimento – Nova Ética (Modelo 114N);
- Balança Analítica – Gehaka (Modelo AG 200);
- Balança Semi-Analítica – Tecnal (Modelo B TEC 1300);
- Banho-Maria – Fisatom (Modelo 552)
- Capela com exaustão
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência – Varian (Injeção automática; Amostrador – Modelo Pro Star 410; Detector – Modelo Pro Star 325; Bomba – Modelo Pro Star 210; Sistema de aquisição – Galaxie versão 1,9 work station);
- Centrífuga – Sigma (Modelo 3-18K);
- Coluna ChromSep SS ChromSpher C_{18} (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) - Varian
- Deionizador – Quimis;
- Dissolutor – Varian (Modelo Vankel 7000);
- Espectrofotômetro UV/Vis – Varian (Modelo Cary 50);
- Lavadora Ultra-sônica – Unique (Modelo USC 1400);
- Milli Q Gradiente – Millipore®;
- Mini incubadora com agitação orbital – Marconi (Modelo MA 410);
- Paquímetro – Fisher Scientific.
- Software - Microsoft®Excel (Office 2007);

4.1.2 Reagentes e Produtos

- Ácido Clorídrico P.A – Quimex (Lote 27593);
- Ácido Acético Glacial – Quimex (Lote 26968);
- Acetato de Sódio Monohidratado – Quimex (Lote 25476);
- Acetonitrila (Grau HPLC) – JT. Baker (Lote H13C63);
- Éter etílico – Quimex (Lote 27489);
- Lauril Sulfato de Sódio – Vetec (Lote 048783);

- Lecitina de Soja – Caramuru (Lécet 150M, LF1170309T03);
- Metanol (Grau HPLC) – JT. Baker (Lote 627E17);
- Óleo de Amendoim – Midelt (AMEO89/08);
- Óleo de Milho – Liza (L08C);
- Óleo Vegetal Hidrogenado;
- Polissorbato 20 – Vetec (Lote 048516);
- Polissorbato 80 – Vetec (Lote 024265).
- Produto A: Cápsula de gelatina mole (progesterona micronizada 200 mg suspensa em óleo de amendoim e lecitina de soja) de uso oral e vaginal (lotes: 1172, 1207, 1218);
- Produto B: Cápsula de gelatina mole (progesterona micronizada 200 mg suspensa em óleo de milho, óleo vegetal hidrogenado e lecitina de soja) de uso oral e vaginal (lotes 83506, 83614, 84115);
- Progesterona (substância de referência) – Sigma-Aldrich Teor 99% (Lote 096K1209);
- Progesterona micronizada – DEG (Lote 08124#2).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Padronização da metodologia analítica para quantificação da progesterona por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

4.2.1.1 Determinação do comprimento de onda de absorção máxima da progesterona no UV/VIS

O comprimento de onda de absorbância máxima da progesterona foi avaliado em espectrofotômetro UV/VIS Cary 50 (Varian), na faixa do ultravioleta (200nm a 400nm), através do espectro de absorção da amostra do fármaco dissolvido em metanol, numa concentração de 10 µg/mL.

4.2.1.2 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas foram determinadas a partir do método proposto por Valenta *et al*. (2001) e Biruss e Valenta (2006 e 2008), como especificado na Tabela 1. Para tanto, foi preparada uma amostra de progesterona diluída em metanol numa concentração de 200 µg/mL (concentração máxima alcançada na cuba de dissolução, considerando um volume de 1000 mL e uma forma farmacêutica contendo 200 mg de fármaco) e analisada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) com bomba isocrática (Varian).

Tabela 1: Condições cromatográficas avaliadas para a quantificação da progesterona.

Parâmetros	Especificações
Fase estacionária	Coluna C_{18} (250 mm x 4,6 mm, 5 µm – Varian)
Fase móvel	Metanol - Água (90:10, v/v)
Fluxo	1,0 mL/minuto
Comprimento de onda	240 nm
Volume de injeção	20 µL
Temperatura	Forno externo a 30°C

4.2.2 Validação da metodologia analítica para a quantificação da progesterona por CLAE

O método cromatográfico para a quantificação da progesterona foi validado segundo os critérios estabelecidos pela Resolução RE n°899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003) e ICH (2005), através da análise dos parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

4.2.2.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada pela comparação do branco, composto pela mistura de metanol e tampão acetato de sódio (TAS) pH 4,5 adicionado de 3,0% de lauril sulfato de sódio (LSS), na proporção de 1:1, e da amostra teste de progesterona (material de referência) preparada na concentração de 50 µg/mL, utilizando-se o branco como diluente.

4.2.2.2 Linearidade

Para análise da linearidade, foram construídas três curvas padrão, em duplicata e em dias diferentes, a partir da solução-estoque (0,5 mg/mL). Dez soluções de trabalho foram preparadas, com valores expressos em µg/mL contendo progesterona nas concentrações de 5 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 80 µg/mL, 100 µg/mL, 120 µg/mL, 160 µg/mL, 200 µg/mL e 240 µg/mL. As curvas padrão foram feitas utilizando metanol como diluente e, também, a mistura de metanol e tampão acetato de sódio (TAS) pH 4,5 adicionado de 3,0% de lauril sulfato de sódio (LSS) na proporção de 1:1.

Os valores da média ($\overline{X}$), do desvio padrão (DP), do desvio padrão relativo (DPR) foram calculados a partir dos valores das áreas (mAu.seg) obtidas em cada concentração utilizada. Após a avaliação de todos os parâmetros, foram geradas as equações da reta ($y = ax + b$), bem como os respectivos coeficientes de correlação (r).

4.2.2.3 Precisão

Para a avaliação da precisão intra-corrida (repetibilidade) e inter-corridas (precisão intermediária) foram analisadas soluções com três níveis de concentração: baixo (10 µg/mL), médio (100 µg/mL) e alto (200 µg/mL), correspondendo a 5%, 50% e 100%, respectivamente. As soluções de trabalho foram preparadas, em triplicata, a partir da solução-estoque contendo 0,5 mg/mL e mistura de metanol e TAS pH 4,5 adicionado de 3,0% de LSS (1:1) como diluente. O procedimento foi realizado em dias diferentes e por analistas diferentes. A análise foi feita por meio do desvio padrão relativo (DPR) dos valores das áreas (mAu.seg) obtidas.

4.2.2.4 Exatidão

A exatidão foi calculada a partir dos resultados obtidos na avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária, utilizando-se a Equação 3.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental x 100}}{\text{Concentração teórica}} \qquad \text{Equação 3}$$

4.2.2.5 Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram determinados por meio da construção de três curvas padrão contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. As curvas padrão foram feitas em duplicata para cada concentração, a partir da solução-estoque de progesterona (0,5 mg/mL), e a mistura de metanol e tampão acetato de sódio pH 4,5 adicionado de 3,0% de lauril sulfato de sódio (1:1). Oito soluções de trabalho foram preparadas nas concentrações de 5 µg/mL, 2,5 µg/mL, 1,25 µg/mL, 0,625 µg/mL, 0,312 µg/mL, 0,156 µg/mL, 0,078 µg/mL e 0,039 µg/mL.

Os valores das equações da reta obtidas foram utilizados nas Equações 4 e 5.

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC} \qquad \text{Equação 4}$$

$$LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC} \qquad \text{Equação 5}$$

Onde:

DP_a = Desvio padrão do intercepto com o eixo y (b)

IC = Inclinação da curva padrão (a)

4.2.3 Estudo da solubilidade da progesterona em função da condição *sink*

A solubilidade da progesterona foi avaliada em diferentes meios, como demonstrado na Tabela 2. Foram analisados a influência do pH e o tipo de tensoativo para verificar a possibilidade de se trabalhar em condição *sink.*

Tabela 2: Meios avaliados no estudo da solubilidade da progesterona.

Meios	Tensoativos		
	LSS	Polissorbato 80	Polissorbato 20
Água	-	-	-
	3,0%	-	-
	-	3,0%	-
	-	-	3,0%
[1]Tampão Acetato de Sódio pH 4,5	3,0%	-	-
[2]HCℓ 0,1mol/L pH 1,2	3,0%	-	-
[3]Tampão Fosfato de Sódio pH 6,8	3,0%	-	-
[4]Tampão Fosfato de Sódio pH 7,4	3,0%	-	-

[1] 2,99 g de acetato de sódio trihidratado em água purificada q.s.p. 1000 ml. pH ajustado a 4,5 ± 0,05 com ácido acético 2 N ; [2] 8,5mL de Ácido Clorídrico em água purificada q.s.p. 1000 ml; [3] 50mL de Solução de Fosfato de Sódio em 200mL + 22,4mL de Hidróxido de Sódio 0,2M; [4] 50mL de Solução de Fosfato de Sódio em 200mL + 39,1mL de Hidróxido de Sódio 0,2M.

Os ensaios foram realizados em duplicata. Um excesso de fármaco foi adicionado (20 mg para o meio sem tensoativo e 50 mg para os meios com

tensoativo) a 50 mL de cada meio (37°C ± 0,5°C) e agitado a 150 rpm, em mini incubadora com agitação orbital e temperatura controlada (37°C ± 0,5°C) por 24h. Nos tempos correspondentes à primeira e à vigésima quarta horas, alíquotas de 2,0 mL foram coletadas de cada meio sem reposição e, posteriormente, centrifugadas em centrífuga (3-18K – Sigma) a 3000 rpm por cinco minutos, filtradas (PVDF com porosidade de 0,45 µm), diluídas (1:10) e analisadas por CLAE.

As quantidades de fármaco dissolvido nos meios avaliados foram calculadas utilizando-se a equação da reta resultante da média de três curvas padrão feitas com metanol. As diluições realizadas e o volume retirado durante a coleta da primeira hora foram corrigidos, e as quantidades dissolvidas foram expressas em µg/mL.

4.2.4 Desenvolvimento do método de dissolução

O método de dissolução para cápsulas de gelatina mole contendo progesterona foi desenvolvido e validado utilizando o Dissolutor VK 7000 (Varian). Foram avaliadas diferentes condições de dissolução, tendo como ponto de partida o método geral da USP 31ª ed. (2008b, 2008c). Parâmetros tais como: meio de dissolução (pH, tipo e concentração de tensoativo), velocidade de agitação e aparato foram variados conforme descrito nas Tabelas 3 e 4. Já os parâmetros temperatura e volume do meio foram mantidos em 37°C ± 0,5°C e 1000 mL, respectivamente.

O produto A foi utilizado na fase de desenvolvimento do método de dissolução por ser o primeiro produto a ser colocado no mercado (Referência). Algumas condições foram avaliadas durante o delineamento do método, sendo testada uma única unidade da forma farmacêutica para cada condição estabelecida.

Tabela 3: Condições avaliadas no delineamento do método de dissolução.

Meio de dissolução	Aparato	Rotação/Agitação
Água + 0,75% LSS	Pá	50 rpm
HCℓ 0,1 mol/L	Pá	50 rpm
Água + 0,5% LSS	Pá	100 rpm
Água + 1,0% LSS	Pá	100, 125 e 150 rpm
Água + 2,0 % LSS	Pá	100, 125 e 150 rpm
Água + 3,0% LSS	Pá	100, 125 e 150 rpm
Água + 5,0% LSS	Pá	100 rpm
TAS pH 4,5 + 3,0% LSS	Pá	150 rpm
Água + 2,0% Polissorbato 20	Pá e Cesta	100 rpm
Água + 2,0% Polissorbato 80	Pá e Cesta	100 rpm
Água + 2,0 % LSS	Cesta	150 rpm
Água + 3,0 % LSS	Cesta	100 e 150 rpm
TAS pH 4,5 + 2,0% LSS	Cesta	150 rpm
Fluido Gástrico Simulado + 0,25% LSS	Pá	125 rpm

Após o delineamento do método de dissolução, algumas condições foram executadas (Tabela 4) em triplicata, para o estabelecimento da condição final, assim como no trabalho realizado por Papadopoulou *et al.* (2008).

Tabela 4: Condições avaliadas para o estabelecimento da condição final do método de dissolução.

Meio de Dissolução	Aparato	Rotação/Agitação
Água + 1,0% LSS	Pá	150 rpm
Água + 2,0% LSS	Pá	150 rpm
Água + 2,0% LSS	Pá	125 rpm
Água + 3,0% LSS	Pá	125 rpm
Água + 3,0% LSS	Pá	150 rpm
Água + 3,0% Polissorbato 80	Pá	150 rpm
Água + 3,0% Polissorbato 20	Pá	150 rpm
TAS pH 4,5 + 3,0%LSS	Pá	150 rpm
TAS pH 4,5 + 3,0%LSS	Cesta	150 rpm
HCℓ 0,1 mol/L pH 1,2 + 3,0% LSS	Pá	150 rpm

Para o ensaio de dissolução, cada cápsula do produto A foi adicionada nas respectivas cubas contendo 1000 mL do meio de dissolução aquecido a 37°C. Nos tempos de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 horas foram coletados, manualmente, 3,0 mL de cada cuba, sem reposição de meio, com auxílio de cânula de metal, seringa de plástico de 3,0 mL e filtro tipo porcelana. Em seguida, as amostras foram filtradas (PVDF com porosidade de 0,45 µm), diluídas em metanol (1:1), homogeneizadas e quantificadas por CLAE.

As quantidades dissolvidas em cada alíquota coletada foram obtidas utilizando-se a equação da reta resultante da média de três curvas padrão feitas com metanol, observando-se as devidas correções (diluição e volume retirado). Os resultados foram expressos em porcentagem de fármaco dissolvido em função do tempo e avaliados estatisticamente, através de análise de variância (ANOVA) em esquema fatorial e Tukey (FERREIRA, 2000).

4.2.5 Validação do método de dissolução

O método de dissolução foi validado segundo os critérios estabelecidos pela USP 31ª ed. (2008b). Foram avaliados os parâmetros de especificidade, linearidade, exatidão (recuperação) e precisão, além da estabilidade da progesterona em meio de dissolução.

A validação foi aplicada para as duas especialidades farmacêuticas (Produto A e B) em estudo.

4.2.5.1 Especificidade/Interferência do placebo

A especificidade do método foi determinada utilizando-se amostras do placebo, composto pela mistura de excipientes do conteúdo da cápsula (Produto A e B) e pelo invólucro previamente lavado. As concentrações de cada excipiente do conteúdo das cápsulas foram baseadas na literatura (POUTON, 2000; PORTER *et al*., 2008) e calculadas a partir do peso médio de 20 cápsulas.

As amostras do placebo foram colocadas em cubas do dissolutor contendo 1000 mL de meio de dissolução pré-aquecido a 37°C ± 0,5°C, agitadas por 90 minutos a 150 rpm, utilizando o aparato pá. Após o tempo determinado, alíquotas de 3,0 mL foram coletadas, filtradas (PVDF com porosidade de 0,45 µm), diluídas em

metanol (1:1), homogeneizadas, filtradas (PVDF com porosidade de 0,45 µm) e analisadas por CLAE.

O resultado foi comparado com as amostras obtidas da dissolução de cápsulas dos produtos A e B, após 30 minutos do início do ensaio.

4.2.5.2 Linearidade

Três curvas padrão foram elaboradas em duplicata e em dias diferentes, utilizando-se sete soluções de trabalho (7,5 µg/mL, 15 µg/mL, 30 µg/mL, 60 µg/mL, 120 µg/mL, 180 µg/mL e 240 µg/mL) feitas por diluições volumétricas a partir da solução-estoque (0,5 mg/mL) preparada com TAS pH 4,5 adicionado de LSS e metanol (< 5,0%).

Os valores da média ($\overline{X}$), do desvio padrão (DP), do desvio padrão relativo (DPR) foram calculados a partir dos valores das áreas (mAu.seg) obtidas em cada concentração utilizada. Após a avaliação de todos os parâmetros, foram geradas as equações da reta (y = ax + b), bem como seus respectivos coeficientes de correlação (r).

4.2.5.3 Exatidão/Recuperação

A exatidão do método foi avaliada por meio do percentual de recuperação de uma quantidade conhecida de progesterona adicionada ao placebo. Para tanto, foram selecionadas três concentrações: baixa, média e alta, representadas pelas concentrações de 10 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL, correspondendo, respectivamente, a 5%, 50% e 100% do valor final encontrado na cuba de dissolução. Os testes foram realizados em triplicata, em dias diferentes e por analistas diferentes.

Para a realização do teste, foi preparada uma solução-estoque contendo progesterona (Padrão Sigma-Aldrich) em metanol na concentração de 20 mg/mL. A solução foi filtrada (PVDF com porosidade de 0,45 µm), e alíquotas de 0,5 mL, 5 mL e 10 mL foram adicionadas em cubas contendo o placebo e meio de dissolução (37°C ± 0,5°C), em quantidade suficiente para um volume final de 1000 mL. Foram obtidas concentrações finais de 10 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL,

respectivamente. O conteúdo foi agitado durante 90 minutos, utilizando o aparato pá numa velocidade de rotação correspondente a 150 rpm. Após o tempo determinado, foram coletados 3,0 mL de cada amostra utilizando-se seringa de plástico de 3,0mL, cânula de metal em “L” e filtro tipo porcelana. As amostras foram filtradas (PVDF com porosidade de 0,45 µm), diluídas em metanol (1:1), em triplicata, homogeneizadas, filtradas (PVDF com porosidade de 0,45 µm) e quantificadas por CLAE.

O percentual de recuperação foi obtido utilizando-se equação da reta resultante da média de três curvas padrão preparadas com a mistura de metanol e TAS pH 4,5 adicionado de 3,0% de LSS (1:1) através dos valores das áreas (mAu.seg) encontradas. A exatidão foi avaliada por meio da análise do percentual de fármaco recuperado, utilizando-se a fórmula descrita na Equação 3.

4.2.5.4 Precisão

A precisão do método foi verificada calculando-se o desvio padrão relativo obtido com as amostras analisadas no ensaio de exatidão (recuperação) realizado em dias diferentes e por analistas diferentes (precisão intra-corrida e inter-corridas).

4.2.5.5 Estudo de estabilidade da progesterona

Para a realização do estudo de estabilidade, foi preparada solução-estoque contendo progesterona (Padrão – Sigma-Aldrich) em meio de dissolução (tampão acetato de sódio pH 4,5 adicionado de 3,0% de lauril sulfato de sódio), na concentração de 100 µg/mL. Após, a solução-estoque foi filtrada (PVDF com porosidade de 0,45 µm), transferida para um tubo de vidro com tampa de rosca, colocada em banho-maria com temperatura de 40°C e exposto à luz ambiente. A solução-estoque recém preparada e filtrada foi diluída em metanol (1:1), em triplicata, homogeneizada e quantificada por CLAE, utilizando-se um tempo de corrida de 15 minutos para verificar a formação de possíveis produtos de degradação. Alíquotas foram retiradas nos tempos de 1, 4, 8 e 24 horas, diluídas em metanol (1:1), em triplicata, homogeneizadas e quantificadas, como realizado para a amostra recém preparada. As amostras também foram analisadas 24 horas após terem sido diluídas para avaliar a possibilidade da quantificação das amostras no dia

seguinte ao ensaio de dissolução, caso necessário. Dessa forma, as amostras diluídas foram quantificadas novamente após 24 horas decorridas do processo de diluição, em cada tempo analisado.

A estabilidade da forma farmacêutica em solução (meio de dissolução) também foi avaliada. Amostra obtida após 8 horas de ensaio de dissolução foi quantificada por CLAE, utilizando-se um tempo de corrida de 60 minutos para verificar o aparecimento de possíveis produtos de degradação e/ou diminuição da concentração da amostra.

4.2.6 Ensaios Físicos

4.2.6.1 Determinação do peso médio das cápsulas (Produtos A e B)

Para a determinação do peso médio das cápsulas, foram escolhidas, aleatoriamente, vinte unidades de cada especialidade farmacêutica contendo progesterona (Produtos A – lote 1172 e B – lote 83506), as quais foram pesadas individualmente, avaliando-se também o diâmetro e o comprimento das mesmas, com auxílio de paquímetro. Em seguida, os invólucros foram abertos, e seus conteúdos foram reservados. Os invólucros foram lavados com éter etílico em capela com exaustão e expostos ao ar, em temperatura ambiente, até completa evaporação do solvente e, posteriormente, pesados individualmente. O peso médio foi determinado conforme descrito na Farmacopéia Brasileira 4ª ed. (1988a), obedecendo-se os limites de variação descritos no Quadro 2.

Forma Farmacêutica	Peso médio	Limite de Variação
Cápsulas moles	Até 300mg	± 10,0%
	Acima de 300mg	± 7,5%

Quadro 2: Limites de variação permitidos para cápsulas moles, segundo a Farmacopéia Brasileira. 4ª ed.(1988a).

4.2.6.2 Determinação do teor do fármaco (Produtos A e B)

A Farmacopéia Brasileira 4ª ed. (1988) e a USP 31ª ed. (2008) não descrevem especificação de teor para a forma farmacêutica cápsula de gelatina mole contendo progesterona. Portanto, foi utilizada a especificação geral. Dessa forma, a quantidade obtida no cálculo do peso médio foi pesada, em triplicata, diretamente em balões volumétricos (100 mL). Em seguida, foi adicionado metanol, colocado em banho de ultrassom por 90 minutos, centrifugado por quatro minutos a 4000 rpm, sendo o sobrenadante coletado, filtrado (PVDF com porosidade de 0,45 µm), diluído (1:10) com metanol e quantificado por CLAE.

O teor do fármaco (Produtos A – lote 1172 e B – lote 83506) foi calculado utilizando-se equação da reta resultante da média de três curvas padrão feitas com metanol, corrigindo-se as diluições realizadas e as quantidades pesadas em relação às quantidades teóricas.

4.2.6.3 Determinação da uniformidade de conteúdo (Produtos A e B)

A uniformidade de conteúdo foi realizada de acordo com a Farmacopéia Brasileira 4ª ed. (1988b). Logo, foram analisadas, individualmente, 10 unidades de cada produto (Produto A – lote 1172 e Produto B – Lote 83506). As cápsulas foram pesadas individualmente e colocadas em balões volumétricos (500 mL) devidamente identificados. Em seguida, foi adicionado TAS pH 4,5 contendo 3,0% LSS. Os balões foram colocados em agitador magnético com agitação intensa e aquecimento (40°C) por uma hora. Após o tempo estabelecido, os volumes foram completados, os balões foram homogeneizados, alíquotas de 5,0 mL foram coletadas, filtradas (PVDF com porosidade de 0,45 µm), diluídas com metanol (5:10), filtradas (PVDF com porosidade de 0,45 µm) e quantificadas por CLAE.

Para a determinação do conteúdo unitário, foi realizada a subtração do valor do peso de cada cápsula utilizada pelo valor médio dos invólucros encontrados na realização do peso médio. A uniformidade de conteúdo foi calculada através dos valores das áreas (mAu.seg) encontradas, utilizando-se a equação da reta resultante da média de três curvas padrão obtidas com a mistura de metanol e TAS pH 4,5 adicionado de 3,0% LSS (1:1), observando-se as devidas correções (diluição e valor unitário das cápsulas).

4.2.6.3 Perfil de dissolução (Produtos A e B)

O perfil de dissolução foi realizado com seis unidades de cada produto avaliado. Foram utilizados três lotes de cada (Produto A – lotes 1172, 1207, 1218 e Produto B – lotes 83506, 83614, 84115), sendo adquiridos aleatoriamente no mercado brasileiro. Para a realização do perfil de dissolução dos produtos em estudo, utilizou-se o dissolutor VK 7000 (Varian) e o método de dissolução desenvolvido e validado com as condições especificadas na Tabela 5.

Tabela 5: Condições utilizadas no ensaio de dissolução realizado com seis unidades de cada produto.

Parâmetros	Condições
Meio de dissolução	TAS pH 4,5 + 3,0% LSS
Volume de meio	1000 mL
Aparato	II USP (Pá)
Velocidade de rotação/agitação	150 rpm
Temperatura	37°C ± 0,5°C
Volume de coleta	3,0 mL
Tempos de coleta	0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 horas.

Cada cápsula dos produtos avaliados foi adicionada às respectivas cubas contendo 1000 mL do meio de dissolução aquecido a 37°C e, agitadas numa velocidade de 150 rpm com auxílio do aparato pá. Nos tempos de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 horas foram coletados, manualmente, 3,0 mL de cada cuba, sem reposição de meio, com auxílio de cânula de metal, seringa de plástico de 3,0 mL e filtro tipo porcelana. Em seguida, as amostras foram filtradas (PVDF com porosidade de 0,45µm), diluídas em metanol (1:1), homogeneizadas, filtradas (PVDF com porosidade de 0,45µm) e quantificadas por CLAE.

As quantidades dissolvidas em cada alíquota coletada foram obtidas utilizando-se a equação da reta resultante da média de três curvas padrão feitas com a mistura de metanol e tampão acetato de sódio pH 4,5 adicionado de 3,0% de lauril sulfato de sódio (1:1), observando-se as devidas correções (diluição e volume retirado). O resultado foi expresso em porcentagem de fármaco dissolvido em função do tempo.

Os resultados obtidos nos perfis de dissolução foram avaliados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA) em esquema fatorial e Tukey (FERREIRA, 2000).

4.2.7 Cinética de dissolução e estudo dos perfis obtidos

Os perfis de dissolução (produtos A e B) foram comparados por meio da eficiência de dissolução (modelo método independente) sugerida por Khan e Rhodes (1975), na qual se define a área sob a curva de dissolução até um determinado tempo t, exprimindo-se como uma porcentagem da área do retângulo correspondente a 100% de dissolução do mesmo período de tempo e expresso de acordo com a Equação 6 (MANADAS *et al*., 2002).

$$ED(\%) = \frac{ASC}{A_{ret}} \times 100 \qquad \text{Equação 6}$$

Onde:
ED(%) = eficiência de dissolução
ASC = corresponde à área sob a curva de dissolução em função do tempo
A_{ret} = corresponte à área total do retângulo definido por 100% de dissolução e pelo tempo limite do ensaio.

A comparação entre os lotes dos dois produtos avaliados foi feita por ordem de aquisição dos produtos. Os valores de eficiência de dissolução obtidos foram estatísticamente verificados por meio de análise de variância (ANOVA).

Os resultados dos perfis de dissolução (Produtos A e B) também foram submetidos a cálculos matemáticos utilizando o programa Curve Expert 1.4, seguindo-se os modelos dependentes de ordem zero, higuchi (pseudo primeira Ordem) e primeira ordem. Os cálculos foram feitos baseados nas Equações 7, 8 e 9 para cada modelo, respectivamente. Os coeficientes de correlação foram determinados através das porcentagens de fármaco dissolvido em função do tempo.

$$Q_1 = Q_0 + K_0 t \qquad \text{Equação 7}$$

$$\ln Q_1 = \ln Q_0 + K_1 t \qquad \text{Equação 8}$$

Onde:

- Q_1 – representa a quantidade de fármaco liberada no tempo t;
- Q_0 – representa a quantidade inicial de fármaco na solução, sendo zero na maior parte das vezes;
- K_0 – representa a constante de liberação de ordem zero;
- K_1 – representa a constante de liberação de primeira ordem;
- ln – função logarítmica neperiana.

$$f_t = K_H\, t^{1/2} \qquad \text{Equação 9}$$

Onde:

f_t = representa a quantidade de fármaco dissolvido no tempo t;

K_H = representa a constante de dissolução de Higuchi;

$t^{1/2}$ = corresponde à raiz quadrada do tempo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Padronização da metodologia analítica para quantificação da progesterona por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

5.1.1 Determinação do comprimento de onda de absorção máxima da progesterona no UV/VIS

Por meio da varredura realizada em espectrofotômetro com a amostra do fármaco preparada em metanol, foi possível verificar que o comprimento de onda de absorbância máxima da progesterona foi de 240,5 nm (Figura 7), conforme o comprimento de onda de 240 nm utilizado em outros trabalhos como os de Valenta *et al*., 2001; Pucci *et al*., 2003; Biruss e Valenta, 2006 e 2008, além do especificado pelo Merck Index, 2006.

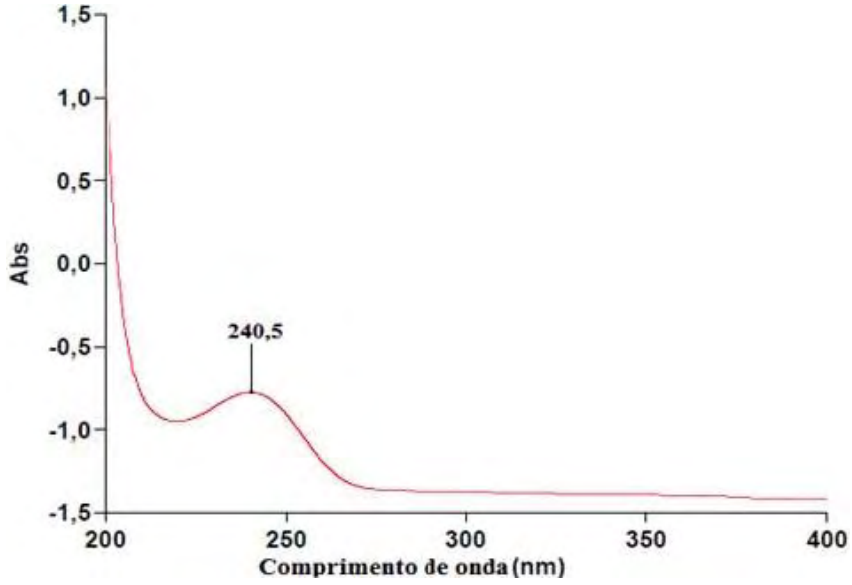


Figura 7: Varredura da amostra de progesterona preparada em metanol (10 µg/mL).

5.1.2 Condições cromatográficas

A USP 31ª ed. (2008) descreve a cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação da progesterona utilizando os seguintes parâmetros: coluna C_{18} (300 mm x 4,0 mm, 10 µm) como fase estacionária, mistura de água e álcool isopropílico (72:28) como fase móvel, fluxo de 1,5 mL/min e comprimento de onda em 254 nm.

No entanto, o método não mostrou ser robusto, pois a substituição da coluna de 300 mm por uma de 250 mm e a redução do fluxo de 1,5 mL/min para 1,0 mL/min não proporcionou resultados adequados. Sendo assim, outros parâmetros foram buscados na literatura com a finalidade de encontrar um método reprodutível.

Pucci e colaboradores (2003) descreveram o uso de método espectrofotométrico derivativo e do método cromatográfico utilizando coluna C_8 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm); pré-coluna C_8 (300 mm x 4,6 mm, 5 µm); fase móvel constituída por álcool isopropílico e tampão fosfato pH 2,5 (1:1 v/v); fluxo de 1,0 mL/min e comprimento de onda variável na determinação da progesterona em diferentes formas farmacêuticas. Dos resultados obtidos pelos autores, foi possível observar que o método cromatográfico forneceu resultados mais adequados em termos de precisão, exatidão e seletividade.

Valenta e colaboradores (2001) utilizaram um método de quantificação para a progesterona em formulações lipossomais utilizando CLAE com os seguintes parâmetros: coluna C_{18} (240 mm x 4,6 mm, 5 µm) como fase estacionária, mistura de metanol e água (90:10, v/v) como fase móvel, fluxo de 1,0 mL/min, comprimento de onda em 240 nm e volume de injeção de 20 µL. O mesmo método também foi utilizado em estudos de permeação (BIRUSS e VALENTA, 2006, 2008).

O método descrito por Valenta e colaboradores (2001) e por Biruss e Valenta (2006, 2008) foi escolhido por ser de simples preparo e execução. As únicas adaptações feitas no método foram o tamanho e a temperatura da coluna: foi utilizada uma coluna de 250 mm e uma temperatura de 30°C para diminuir o tempo e as variações no tempo de retenção. Sendo assim, tal condição foi testada e, posteriormente, avaliada quanto à viabilidade do uso no processo de quantificação de amostras geradas durante o ensaio de dissolução. Foram observados parâmetros tais como: fator de cauda, número de pratos teóricos e principalmente tempo de retenção, pois como os ensaios de dissolução geram grandes quantidades de amostras, o tempo de retenção deve ser curto. O cromatograma obtido está ilustrado na Figura 8.

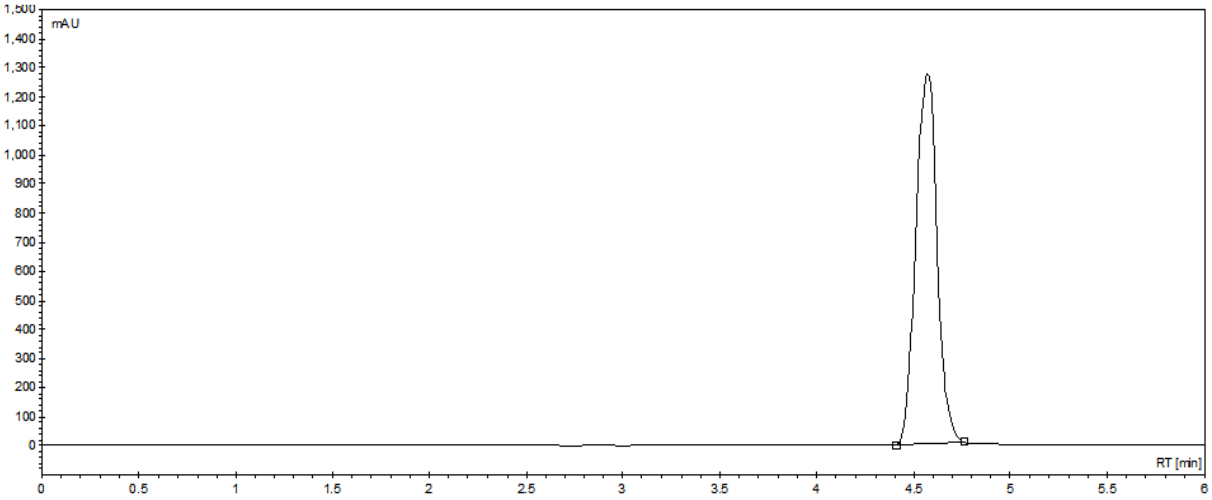


Figura 8: Cromatograma (progesterona 200 µg/mL) obtido na utilização dos seguintes parâmetros: coluna C_{18} (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), fase móvel contendo metanol-água (90:10, v/v), fluxo de 1,0 mL/minuto, forno para coluna com temperatura de 30°C e volume de injeção de 20 µL.

O cromatograma ilustrado na Figura 8 demonstra que o método de quantificação utilizado foi adequado para a finalidade pretendida; apresentou fator de cauda menor ou igual a 2 (cerca de 1,2) e número de pratos teóricos acima de 2000 (cerca de 10317), conforme os parâmetros de adequação do sistema (FDA, 1994), demonstrando, assim, simetria do pico (boa integração) e eficiência da coluna. O tempo de retenção também mostrou ser adequado, pois foi relativamente curto (abaixo de 5 minutos) (SKOUG *et al*., 1997), permitindo a análise de uma grande quantidade de amostras obtidas durante os ensaios de dissolução em menor tempo e, consequentemente, com menor gasto de solventes.

Embora o método espectrofotométrico seja de execução mais rápida e mais barato, optou-se pelo uso da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) por causa de sua maior sensibilidade e seletividade, podendo separar possíveis interferentes da forma farmacêutica e/ou do meio de dissolução, além da possibilidade de detectar possíveis produtos de degradação ao longo do processo.

5.1.3 Validação da metodologia analítica para a quantificação da progesterona por CLAE

O método analítico mostrou-se apropriado para quantificação da progesterona em meio de dissolução. Foram obtidos resultados adequados para os parâmetros de validação avaliados, de acordo com a Resolução RE nº 899 (BRASIL, 2003) e ICH (2005).

5.1.3.1 Seletividade

A seletividade do método analítico indica sua capacidade de diferenciar e quantificar o analito na presença de outros constituintes da amostra que porventura possam interferir em sua determinação, garantindo, assim, que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (BRASIL, 2003; RIBANI *et al*.,2004; ICH, 2005).

Logo, o método avaliado foi seletivo; através da leitura do branco não foi observado qualquer tipo de interferente eluindo no mesmo tempo de eluição do fármaco. O resultado pode ser observado na Figura 9, que mostra a ausência de picos no tempo de eluição do fármaco (cerca de 4,63min) na leitura do branco (A) e a presença do cromatograma no tempo de eluição da amostra contendo progesterona na concentração de 50 ug/mL (B).

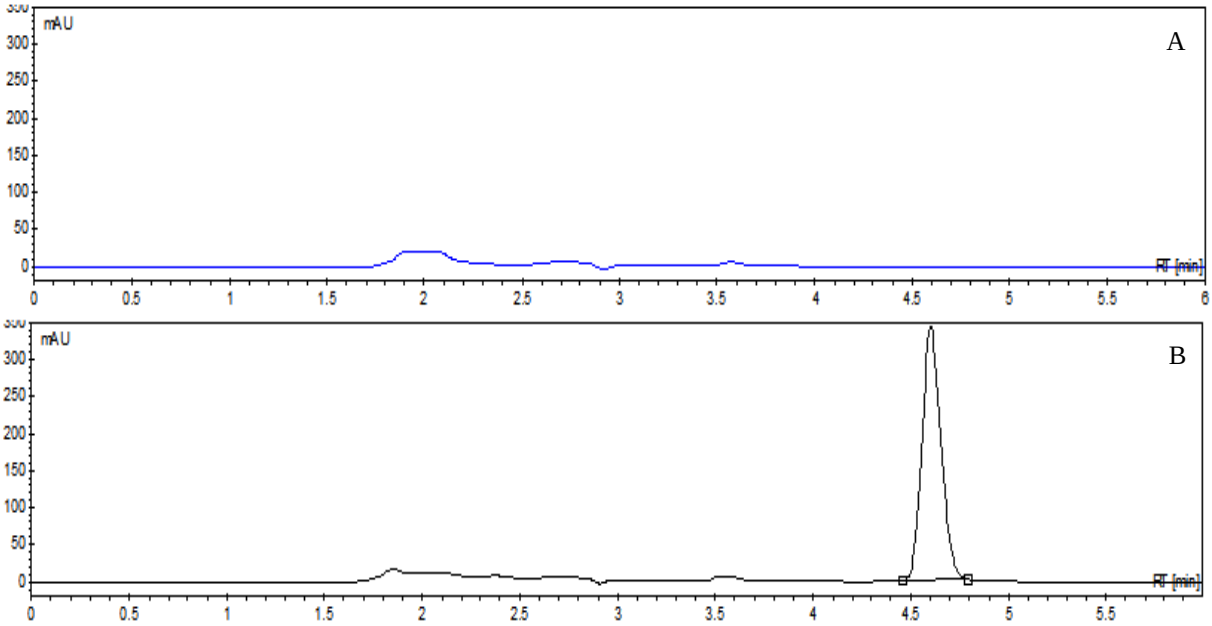


Figura 9: Leitura do branco (A) e da amostra contendo progesterona na mistura de metanol e TAS pH 4,5 + 3,0%LSS na concentração de 50 µg/mL (B), utilizando os parâmetros cromatográficos: coluna C_{18} (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), fase móvel contendo metanol-água (90:10, v/v), fluxo de 1,0 mL/minuto, forno para coluna com a temperatura de 30°C e volume de injeção de 20 µL.

5.1.3.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método analítico em demonstrar resultados diretamente proporcionais à concentração da substância sob análise,

dentro de uma determinada faixa de aplicação (BRASIL, 2003, RIBANI *et al*., 2004, ICH, 2005; USP 31ª ed., 2008b).

A Resolução RE n° 899 (BRASIL, 2003) recomenda a utilização de, no mínimo, cinco concentrações diferentes para a construção da curva padrão, estando estas concentrações situadas abaixo e acima da concentração de 100% da amostra. Estabelece também que, para que ela seja utilizada, deve apresentar o desvio padrão relativo menor ou igual a 5,0% e o coeficiente de correlação maior ou igual a 0,99.

Portanto, de acordo com os resultados obtidos, foi verificada adequada correlação linear, tanto para as curvas preparadas apenas com metanol quanto para as curvas preparadas com a mistura de metanol e meio de dissolução, uma vez que os desvios padrão relativos (DPR) obtidos apresentaram valores abaixo de 5,0%, e os coeficientes de correlação apresentaram valores superiores a 0,99, como estabelecido pela Resolução RE n° 899 (BRASIL, 2003). Esse parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI *et al*., 2004). Os resultados estão demonstrados nas Tabelas 6, 7 e Figuras 10, 11.

Tabela 6: Valores de DPR obtidos na construção das curvas padrão feitas com metanol.

Amostras	Desvio Padrão Relativo		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
5 µg/mL	2,53%	3,53%	1,92%
10 µg/mL	0,33%	4,27%	3,81%
25 µg/mL	1,39%	0,61%	1,00%
50 µg/mL	0,68%	0,17%	1,92%
80 µg/mL	0,57%	1,49%	0,41%
100 µg/mL	4,08%	0,97%	1,41%
120 µg/mL	0,35%	0,14%	0,00%
160 µg/mL	1,18%	0,56%	0,22%
200 µg/mL	0,39%	0,18%	0,73%
240 µg/mL	3,76%	0,62%	0,59%
r	0,9999	0,9993	0,9998

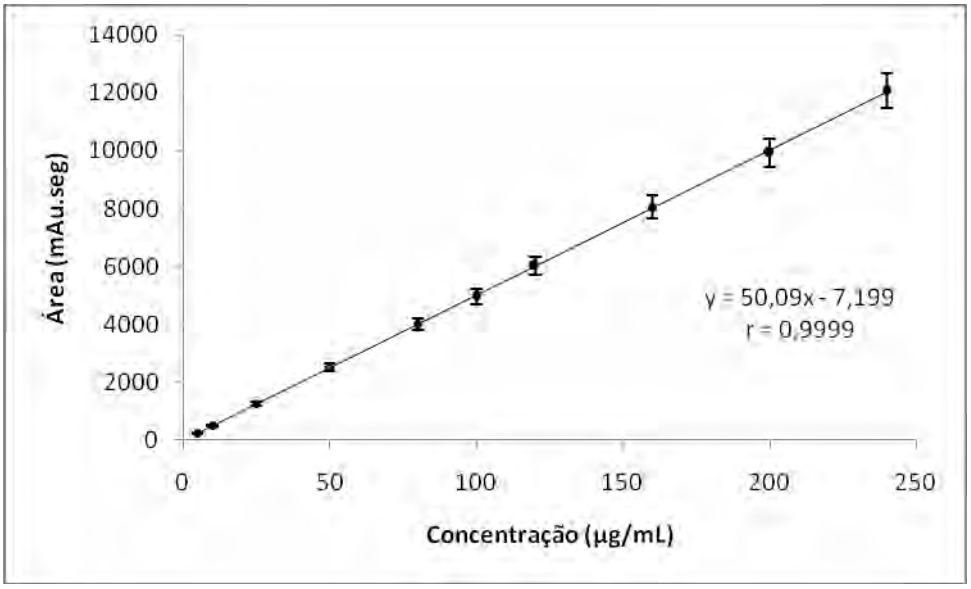


Figura 10: Curva padrão média, equação da reta e coeficiente de correlação obtidos com amostras de progesterona preparadas em metanol (n = 3), utilizando coluna C_{18} (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), fase móvel contendo metanol-água (90:10, v/v), fluxo de 1,0 mL/minuto, forno para coluna com a temperatura de 30°C e volume de injeção de 20 µL.

Tabela 7: Valores de DPR obtidos na construção das curvas padrão feitas com TAS pH 4,5 + 3,0% LSS e metanol, na proporção de 1:1.

Amostras	Desvio Padrão Relativo (DPR)		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
5 µg/mL	2,39%	2,57%	2,51%
10 µg/mL	1,35%	1,00%	4,01%
25 µg/mL	2,02%	3,66%	4,18%
50 µg/mL	0,27%	2,07%	3,13%
80 µg/mL	1,56%	1,79%	2,53%
100 µg/mL	0,09%	0,38%	0,01%
120 µg/mL	0,14%	2,42%	1,28%
160 µg/mL	0,12%	0,56%	2,57%
200 µg/mL	0,57%	0,18%	0,81%
240 µg/mL	0,04%	0,25%	0,30%
r	0,9999	0,9997	0,9995

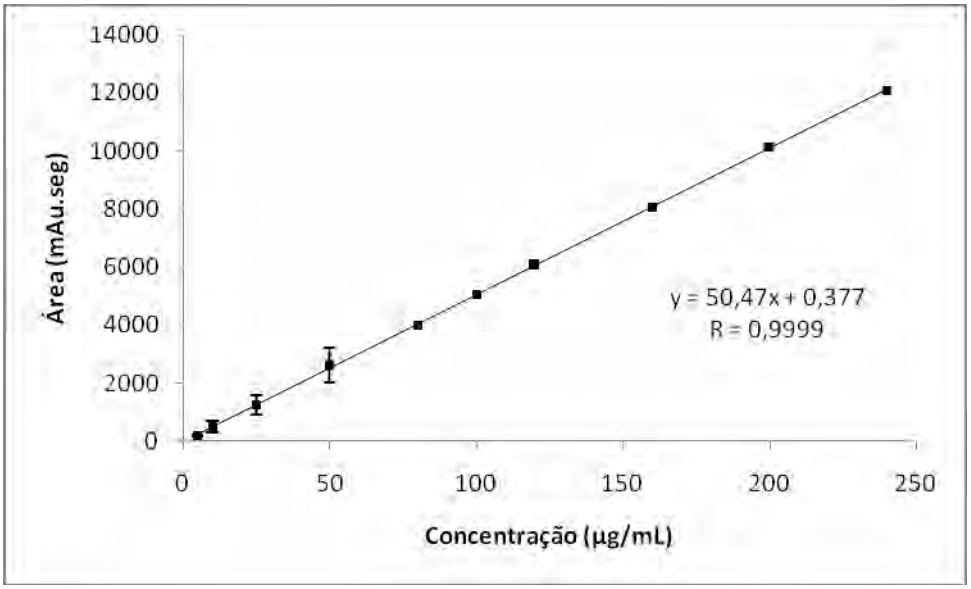


Figura 11: Curva padrão média, equação da reta e coeficiente de correlação obtidos com amostras de progesterona preparadas em metanol e TAS pH 4,5 contendo 3,0% de LSS na proporção de 1:1 (n = 3), utilizando coluna C_{18} (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), fase móvel contendo metanol-água (90:10, v/v), fluxo de 1,0 mL/minuto, forno para coluna com a temperatura de 30°C e volume de injeção de 20 µL.

5.1.3.3 Precisão

A precisão representa o grau de concordância entre os resultados de análises individuais de uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

A análise foi realizada por meio do desvio padrão relativo (DPR) dos valores de áreas encontradas nas leituras das amostras, em três níveis de concentração, não tolerando variação superior a 5,0% (BRASIL, 2003). Os resultados apresentados na Tabela 8 permitem determinar a precisão do método tanto na avaliação intra-corrida (repetibilidade) quanto na avaliação inter-corrida (precisão intermediária). Ambos proporcionaram resultados inferiores ao coeficiente de variação aceitável.

Tabela 8: Resultados obtidos no teste de precisão intra-corrida (n = 3) e inter-corridas (n = 6).

Concentração	Dia	DPR Intra-corrida	DPR Inter-corridas
10 µg/mL	1	0,39%	1,70%
	2	1,45%	
100 µg/mL	1	0,56%	1,69%
	2	1,63%	
200 µg/mL	1	0,15%	0,85%
	2	0,43%	

5.1.3.4 Exatidão

A exatidão do método representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Dessa forma, para avaliação da exatidão, foram realizados os cálculos com as mesmas amostras avaliadas na precisão intra-corrida e inter-corrida, calculando-se o valor real, e em seguida, comparando-se os resultados com os valores teóricos (Equação 3) . Para ensaios de determinação quantitativa em matérias-primas ou em formas farmacêuticas foi utilizado o alcance de 95% a 105% da concentração teórica do teste (USP 31ª ed., 2008b).

Portanto, o método mostrou ser exato por permitir uma proximidade entre os resultados obtidos e os valores verdadeiros, não ultrapassando os limites aceitáveis, como ilustrado na Tabela 9.

Tabela 9: Resultados obtidos no teste de exatidão intra-corrida (n = 3) e inter-corridas (n = 6).

Concentração teórica	Dia	Concentração real (µg/mL)	Exatidão intra-corrida	Exatidão inter-corridas
10 µg/mL	1	10,4	104%	103%
		10,5	105%	
		10,4	104%	
	2	10,0	100%	
		10,3	103%	
		10,2	102%	
100 µg/mL	1	100,5	100%	99%
		99,6	100%	
		100,7	101%	
	2	96,3	96%	
		98,0	98%	
		99,4	99%	
200 µg/mL	1	201,5	101%	100%
		202,1	101%	
		202,0	101%	
	2	198,4	99%	
		199,9	100%	
		198,5	99%	

5.1.3.5 Limite de Detecção e Quantificação

Limite de detecção representa a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Já o limite de quantificação representa a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Após a realização das leituras das amostras preparadas com concentrações próximas ao suposto valor de limite de quantificação, foi verificado que a concentração de 0,039 µg/mL não foi suficiente para promover a integração do pico sendo, por isso, descartada no momento da construção das curvas padrão. As curvas foram construídas, e as equações da reta, bem como seus respectivos coeficientes de correlação, foram determinados, como demonstrado na Tabela 10.

Tabela 10: Equações da reta e coeficientes de correlação gerados a partir da construção de três curvas padrão preparadas com concentrações próximas ao suposto limite de quantificação.

Curva Padrão	Equação da reta (y = ax + b)	Coeficiente de correlação
1	y = 49,02x + 0,389	0,999
2	y = 50,47x – 0,949	1
3	y = 49,17x – 0,812	0,999

Os valores dos coeficientes de regressão (a e b) foram utilizados nas respectivas fórmulas (equações 4 e 5), e os limites de detecção e quantificação foram encontrados matematicamente, como demonstrado na Tabela 11.

Tabela 11: Limite de detecção e quantificação da progesterona (n = 3).

Curvas	Intercepto com o eixo y (b)	Inclinação da curva (a)	LD (ng/mL)	LQ (ng/mL)
1, 2 e 3	0,389	49,02	44,6	148,6
	-0,949	50,47		
	-0,812	49,17		
Média	-0,457	49,55		
DP	0,7361	0,7974		
DPR	-161,0	1,61		

5.2 Estudos da solubilidade da progesterona em função da condição *sink*

Os tampões fosfato de sódio pH 6,8 e 7,4 adicionados de 3,0% de lauril sulfato de sódio não puderam ser quantificados por causa de incompatibilidade com o metanol. No momento da diluição, houve turvação da amostra com formação de precipitado no fundo do vial.

Os resultados apresentados na Tabela 12 demonstram que o meio contendo somente água praticamente não dissolveu o fármaco. Tal resultado já era esperado devido à hidrofobia da molécula (Log P = 3,87) (BEDMAR *et al*., 1996). O tensoativo lauril sulfato de sódio promoveu maior solubilização do fármaco quando comparado com os polissorbatos (80 e 20). Após atingir o equilíbrio (24h), foi observado que o pH do meio não influenciou na solubilização do fármaco, sugerindo uma molécula neutra não-ionizável com valor de pKa não mensurável (WELLS, 2005).

Tabela 12: Quantidade de progesterona dissolvida (µg/mL e %) em diferentes meios (n = 2).

Meio	Fármaco dissolvido			
	1h		24h	
	µg/mL	%	µg/mL	%
[1]Água	7,2 ± 0,2	1,8 ± 0,02	9,2 ± 0,6	2,3 ± 0,2
[2]Água + 3,0% LSS	423,6 ± 143,5	42,3 ± 14,2	997,1 ± 3,4	99,5 ± 0,6
[2]Água + 3,0% Poli 80	267,3 ± 12,6	26,6 ± 1,4	405,5 ± 7,9	40,4 ± 0,6
[2]Água + 3,0% Poli 20	199,3 ± 46,6	19,9 ± 4,7	312,5 ± 39,0	31,2 ± 3,8
[2]TAS pH 4,5 + 3,0% LSS	550,6 ± 200,4	54,6 ± 19,6	971,9 ± 7,2	96,4 ± 1,3
[2]HCℓ 0,1mol/L + 3,0% LSS pH 1,2	703,9 ± 127,1	70,2 ± 12,5	982,2 ± 16,6	98,0 ±1,9

[1] concentração final = 400 µg/mL, [2] concentração final = 1000 µg/mL. Valores encontrados caso todo fármaco adicionado se dissolva.

A Tabela 12 também permitiu verificar que os meios de dissolução utilizando 3,0% de lauril sulfato de sódio proporcionaram a realização do ensaio de dissolução sob condição *sink*, definida como um volume de três vezes mais a quantidade necessária para obter uma solução saturada de fármaco (USP, 2008b). Os meios contendo lauril sulfato de sódio solubilizaram quase cinco vezes mais a concentração máxima alcançada na cuba do dissolutor (200 µg/mL), considerando o volume final de 1000 mL e a forma farmacêutica contendo 200 mg de progesterona.

Os tensoativos desempenharam papel fundamental na solubilidade da progesterona devido à sua alta lipofilicidade, sendo imprescindível a presença dos mesmos nos meios para dissolução.

De acordo com Silva e Volpato (2002), conhecer a solubilidade do fármaco em diferentes solventes é de fundamental importância, visto que possibilita selecionar meios de dissolução adequados para as formulações que o contenham.

5.3 Desenvolvimento do método de dissolução

O método de dissolução foi baseado na análise de parâmetros farmacocinéticos da progesterona encontrados na literatura, além de suas características físico-químicas. Segundo Padwick *et al*. (1986), após a ingestão de 200 mg de progesterona micronizada, a concentração no soro é alcançada em 2 – 8 horas (3,6h ± 1,17h). De acordo com Lignieres *et al*. (1995), o $T_{máx}$ alcançado após a

administração de 2 cápsulas moles de gelatina de progesterona contendo 100 mg foi de 3,44 ± 0,96 horas. Sendo assim, determinou-se que, no desenvolvimento do método de dissolução, a condição satisfatória seria de 80% do fármaco dissolvido até a quarta hora do ensaio.

Para tanto, várias condições foram testadas ao longo do desenvolvimento do método. Algumas não tiveram seus resultados expostos devido à utilização de apenas uma única unidade da forma farmacêutica. No entanto, foram importantes para delinear o estudo, pois direcionaram para parâmetros mais adequados, como o uso de tensoativo no meio de dissolução, velocidade de rotação mais elevada e aparato pá.

Após o delineamento do ensaio de dissolução, algumas condições foram selecionadas e executadas em triplicata a fim de se obter resultados com significância estatística. Os resultados foram analisados estatisticamente através de ANOVA e Tukey, levando-se em consideração um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

O volume de coleta de 3,0 mL foi escolhido por ser suficiente para realizar as diluições necessárias. O meio de dissolução não foi reposto, pois através do ensaio de solubilidade foi possível demonstrar condição *sink,* visto que ao longo de todo o ensaio foram retirados 27 mL de meio, correspondendo apenas a 2,7% do total do meio de dissolução utilizado. Portanto, sabendo que o meio de dissolução utilizado permite dissolver praticamente cinco vezes a quantidade presente na forma farmacêutica, o volume retirado não causaria prejuízos quanto a uma possível limitação da dissolução por causa da saturação do meio e, consequentemente, não interferiria no perfil de dissolução observado.

O mesmo volume de coleta e a não reposição de meio também foram utilizados por Vogt *et al*. (2008) em trabalho realizado com fármacos fracamente solúveis em água.

5.3.1 Definição do tensoativo

Inicialmente, foi observada a influência do tipo de tensoativo. Apesar de existirem no mercado tensoativos naturais ou endógenos como o taurocolato de sódio, não é prático utilizá-los devido ao maior custo, sendo substituídos por tensoativos sintéticos (SHAH *et al*., 1995). Para tanto, foram utilizados tensoativos

aniônicos (Lauril Sulfato de Sódio) e não-iônicos (Polissorbatos 80 e 20), como demonstrado na Tabela 13.

Tabela 13: Tipos de tensoativos utilizados no meio de dissolução.

Meio de Dissolução	Aparato	Velocidade de rotação
Água + 3,0% LSS	Pá	150 rpm
Água + 3,0% polissorbato 80	Pá	150 rpm
Água + 3,0% polissorbato 20	Pá	150 rpm

Segundo Rangel-Yagui *et al.* (2005), os tensoativos não-iônicos são, geralmente, melhores agentes solubilizantes que os tensoativos iônicos para fármacos hidrofóbicos, por causa de seu menor valor da concentração micelar crítica. No entanto, os resultados apresentados na Tabela 14 e Figura 12 demonstram que o lauril sulfato de sódio (aniônico) apresentou melhor efeito solubilizante sobre a progesterona do que os polissorbatos (não-iônicos), por promover a solubilização de uma maior quantidade de fármaco contido em cápsulas de gelatina mole, utilizando os mesmos parâmetros. Tal fato sugere que o mecanismo de solubilização da progesterona não envolve somente a incorporação do fármaco no interior micelar, mas também a molhabilidade do pó (SHAH *et al*., 1989).

Os resultados foram estatisticamente avaliados por meio de análise fatorial 3x9, utilizando ANOVA e Tukey, comprovando que houve diferença significativa em relação à condição do teste, ao tempo e à interação entre os tensoativos utilizados. Em todos os tempos avaliados houve diferença entre o LSS e os polissorbatos, levando-se em consideração um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$), como demonstrado na Tabela 14 e Figura 13.

Tabela 14: Médias e Desvios Padrão das porcentagens de fármaco dissolvido em função do tempo comparando o tipo de tensoativo utilizado no meio de dissolução (n = 3).

Tempo (Horas)	Porcentagem de fármaco dissolvido (média ± DP)		
	3,0% LSS	3,0% Polissorbato 80	3,0% Polissorbato 20
0,5	$14,43^{b} \pm 0,356$	$2,01^{a} \pm 0,523$	$2,60^{a} \pm 0,091$
1	$26,34^{b} \pm 0,995$	$5,19^{a} \pm 1,543$	$6,63^{a} \pm 0,890$
2	$46,60^{b} \pm 6,334$	$10,08^{a} \pm 3,192$	$12,44^{a} \pm 1,807$
3	$72,19^{b} \pm 14,127$	$13,93^{a} \pm 4,433$	$16,40^{a} \pm 2,282$
4	$89,23^{b} \pm 13,975$	$20,32^{a} \pm 6,802$	$19,98^{a} \pm 2,208$
5	$97,31^{b} \pm 1,658$	$22,48^{a} \pm 7,210$	$24,63^{a} \pm 2,432$
6	$99,56^{b} \pm 1,100$	$24,12^{a} \pm 7,349$	$26,08^{a} \pm 2,408$
7	$100,13^{b} \pm 0,502$	$26,90^{a} \pm 8,395$	$28,23^{a} \pm 2,565$
8	$101,42^{b} \pm 0,833$	$29,48^{a} \pm 9,378$	$29,92^{a} \pm 2,419$

[a] e [b]: Média seguida por letras iguais na mesma linha indica que não houve diferença significativa entre os resultados e, seguida por letras diferentes na mesma linha indica que houve diferença significativa entre os resultados ($p < 0,05$).

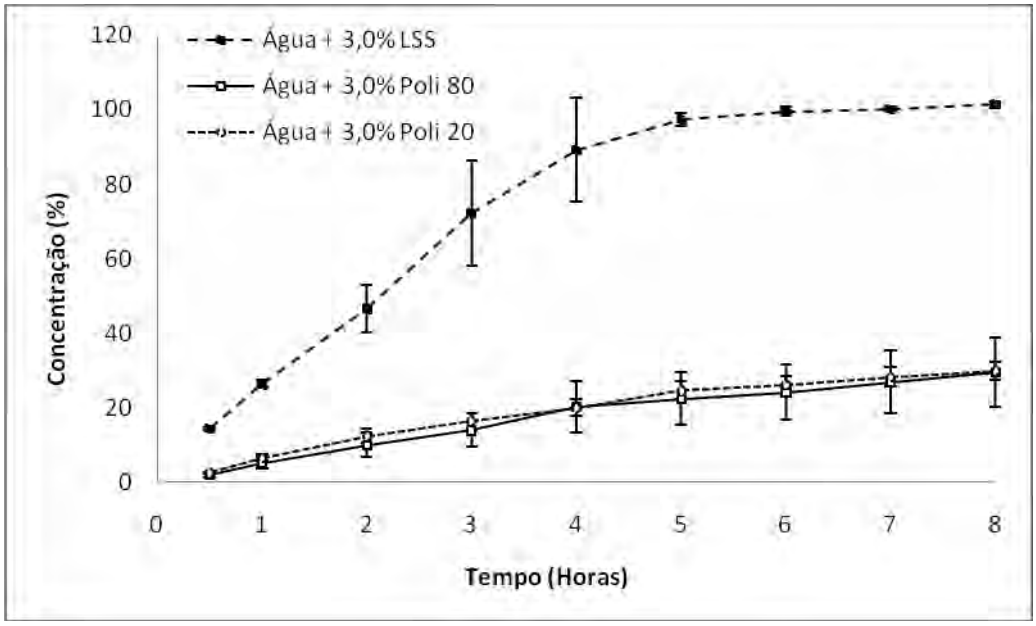


Figura 12: Perfil de dissolução das cápsulas de gelatina mole (Produto A) utilizando tipos diferentes de tensoativos no meio de dissolução (n = 3).

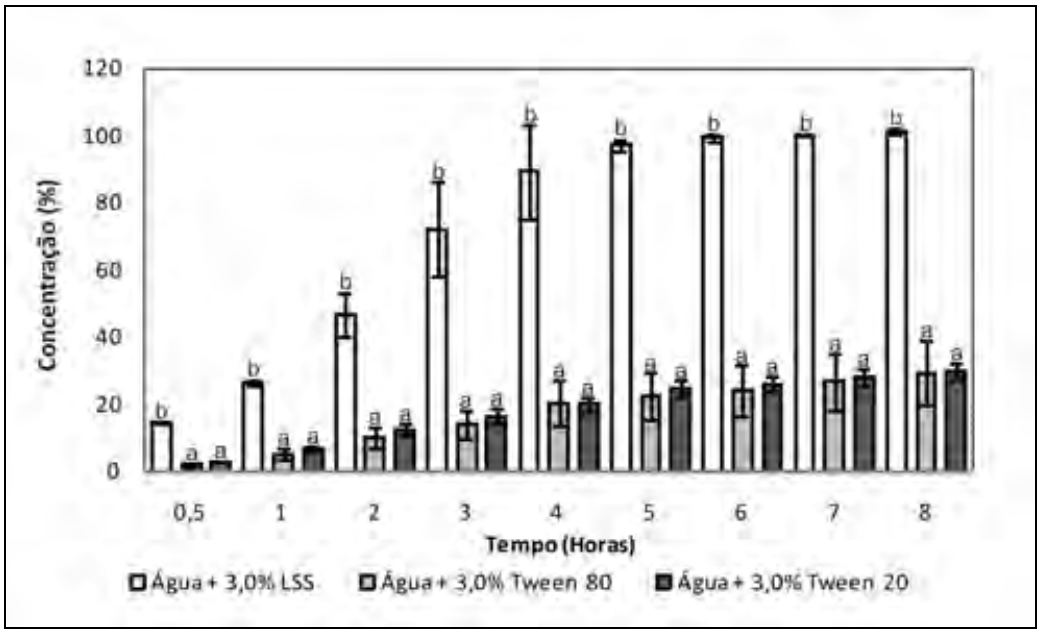


Figura 13: Análise estatística dos dados encontrados no ensaio realizado para avaliar a influência do tipo de tensoativo utilizado no meio de dissolução (n = 3), utilizando ANOVA e Tukey com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

O lauril sulfato de sódio também foi utilizado por Haigh e colaboradores. (1998) em experimentos de difusão de progesterona em gel, utilizando pele de três espécies diferentes de serpentes por aumentar a solubilidade do fármaco e não interferir no procedimento analítico, bem como por Shah e colaboradores. (1989) no método de dissolução utilizado para comprimidos contendo acetato de medroxiprogesterona.

5.3.2 Definição da concentração do tensoativo

Após a escolha do melhor tensoativo para auxiliar na solubilização da progesterona, foi verificado o efeito da concentração, sendo utilizadas as concentrações de 1 a 3% de lauril sulfato de sódio, como demonstrado na Tabela 15.

Tabela 15: Concentrações de Lauril Sulfato de Sódio utilizadas no meio de dissolução.

Meio de Dissolução	Aparato	Velocidade de rotação
Água + 1,0% LSS	Pá	150 rpm
Água + 2,0% LSS	Pá	150 rpm
Água + 3,0% LSS	Pá	150 rpm

Os resultados demonstrados na Tabela 16 e Figura 14 permitiram concluir que o aumento da concentração do tensoativo proporcionou o aumento da porcentagem dissolvida em função do tempo, em algumas horas analisadas.

Os resultados foram estatisticamente avaliados por meio de análise fatorial 3x9, utilizando ANOVA e Tukey, comprovando que houve diferença significativa em relação à condição do teste, ao tempo e à interação entre as concentrações de lauril sulfato de sódio utilizadas. Em relação aos tempos avaliados, houve diferença significativa entre as concentrações de LSS a partir da segunda hora, levando-se em consideração um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$), como demonstrado na Tabela 16 e Figura 15.

Tabela 16: Médias e Desvios Padrão das porcentagens de fármaco dissolvido em função do tempo comparando a concentração do tensoativo utilizado no meio de dissolução (n = 3).

Tempo (Horas)	Porcentagem de fármaco dissolvido (média ± DP)		
	1,0% LSS	2,0% LSS	3,0% LSS
0,5	$8,63^{a} \pm 0,935$	$11,46^{a} \pm 1,402$	$14,43^{a} \pm 0,356$
1	$18,57^{a} \pm 1,584$	$24,02^{a} \pm 1,645$	$26,34^{a} \pm 0,995$
2	$28,89^{a} \pm 1,997$	$37,54^{a,b} \pm 3,930$	$46,60^{b} \pm 6,334$
3	$38,97^{a} \pm 4,418$	$54,41^{a} \pm 8,087$	$72,19^{b} \pm 14,127$
4	$48,66^{a} \pm 6,931$	$73,82^{b} \pm 15,545$	$89,23^{b} \pm 13,975$
5	$57,08^{a} \pm 9,336$	$86,95^{b} \pm 14,834$	$97,31^{b} \pm 1,658$
6	$64,83^{a} \pm 10,060$	$93,16^{b} \pm 12,365$	$99,56^{b} \pm 1,100$
7	$72,22^{a} \pm 12,271$	$97,49^{b} \pm 5,685$	$100,13^{b} \pm 0,502$
8	$79,54^{a} \pm 15,207$	$101,69^{b} \pm 1,147$	$101,42^{b} \pm 0,833$

^{a} e ^{b}: Média seguida por letras iguais na mesma linha indica que não houve diferença significativa entre os resultados e, seguida por letras diferentes na mesma linha indica que houve diferença significativa entre os resultados ($p < 0,05$).

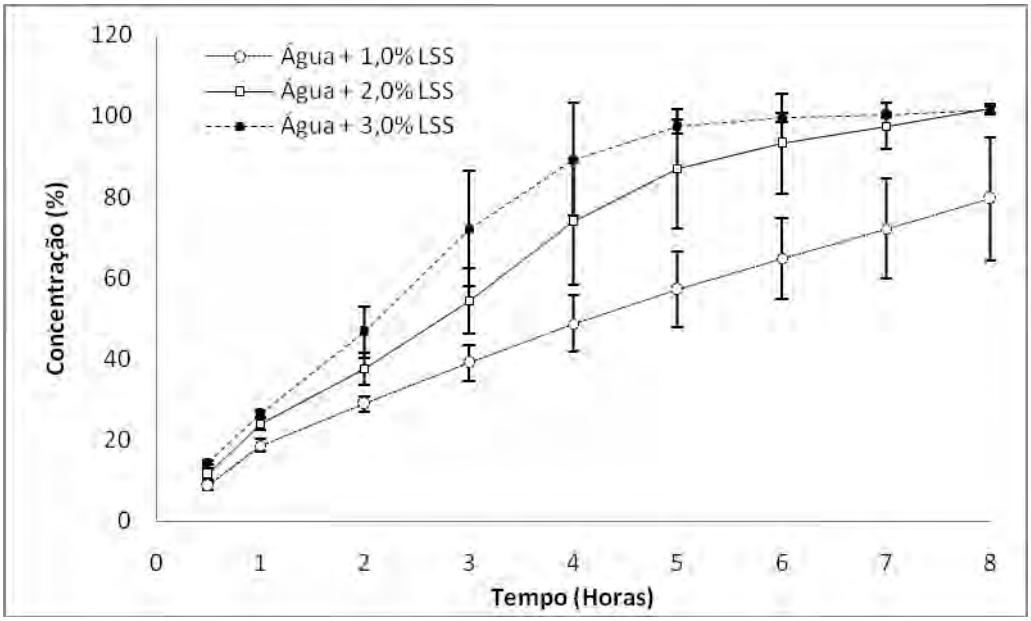


Figura 14: Perfil de dissolução das cápsulas de gelatina mole (Produto A) utilizando concentrações diferentes de tensoativo (LSS) no meio de dissolução (n = 3).

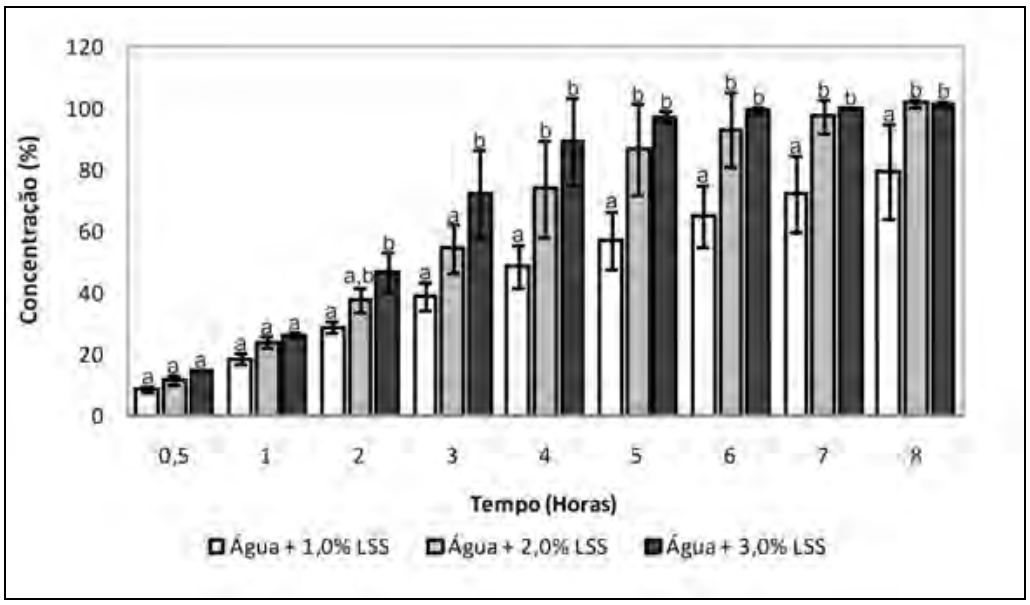


Figura 15: Análise estatística dos dados encontrados no ensaio realizado para avaliar a influência da concentração do tensoativo utilizado no meio de dissolução (n = 3), utilizando ANOVA e Tukey com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Após a análise estatística, foi possível observar que os meios contendo 2,0% e 3,0% de LSS tiveram o comportamento muito semelhante ao longo dos tempos avaliados e se diferiram do meio contendo 1,0% de LSS. No entanto, considerando que os tempos representados pelas primeiras horas apresentam um peso maior em termos de importância no teste, foi escolhido a concentração de 3,0% de LSS por ter

apresentado melhor desempenho na terceira hora e para garantir um resultado satisfatório durante a realização do teste com seis unidades do produto, ou seja, 80% do fármaco dissolvido até a quarta hora.

Segundo Abdou (2004), concentrações de tensoativos de 0,5 a 5,0% são indicados para serem incluídos no meio de dissolução, de maneira a fornecer melhor relação com as condições *in vivo*, principalmente no estado de jejum. Por isso, a concentração de tensoativo determinada para o meio de dissolução está coerente com o objetivo do ensaio, ou seja, utilizar condições biorrelevantes.

5.3.3 Definição da velocidade de rotação

Após a verificação da influência da concentração de tensoativo, foi observada a influência da velocidade de rotação/agitação sobre a dissolução do fármaco contido na forma farmacêutica cápsula de gelatina mole. Para tanto, foram utilizados meios contendo água e duas concentrações de lauril sulfato de sódio em duas velocidades de rotação diferentes, como ilustrado na Tabela 17.

Tabela 17: Variações da velocidade de rotação utilizadas no ensaio de dissolução.

Meio de dissolução	Aparato	Velocidade de rotação
Água + 2,0% LSS	Pá	125 rpm e 150 rpm
Água + 3,0% LSS	Pá	125 rpm e 150 rpm

A Tabela 18 e a Figura 16 demonstram que a velocidade de rotação/agitação exerceu papel relevante na dissolução do fármaco, visto que uma maior velocidade de rotação permitiu maior dissolução em um menor tempo de análise. Tal processo pode ser explicado pela equação estabelecida por Noyes-Whitney modificada, posteriormente, por Nerst e Brunner (Equação 2), pois a espessura da camada de difusão é um fator inversamente proporcional à velocidade de dissolução, e ela é alterada pela velocidade de rotação/agitação (BANAKAR, 1992), se o processo for controlado por difusão. Logo, o aumento da velocidade de rotação/agitação promove uma diminuição na espessura da camada de difusão e, consequentemente, promove um aumento na velocidade de dissolução.

Os resultados apresentados na Tabela 18 e Figura 17 permitiram concluir que, nesse caso, o processo de dissolução é controlado por difusão, pois se fosse

controlado puramente por uma reação interfacial, a velocidade de rotação/agitação não teria influência alguma sobre a dissolução.

Os resultados foram estatisticamente avaliados por meio de análise fatorial 4x9, utilizando ANOVA e Tukey, comprovando que houve diferença significativa em relação à condição do teste, ao tempo e à interação, em relação às concentrações de LSS e velocidades de rotação utilizadas. Em relação aos tempos avaliados, houve diferença significativa entre as rotações utilizadas a partir da segunda hora, levando-se em consideração um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$), como demonstrado na Tabela 18 e Figura 17.

Tabela 18: Médias e Desvios Padrão das porcentagens de fármaco dissolvido em função do tempo comparando as velocidades de rotação/agitação utilizadas no ensaio de dissolução (n = 3).

Tempo (Horas)	Porcentagem de fármaco dissolvido (média ± DP)			
	Água + 2,0% LSS		Água + 3,0% LSS	
	125 rpm	150 rpm	125 rpm	150 rpm
0,5	5,11^{a} ± 0,429	11,46^{a} ± 1,402	7,00^{a} ± 0,853	14,43^{a} ± 0,356
1	17,97^{a} ± 0,367	24,02^{a} ± 1,645	19,46^{a} ± 0,657	26,34^{a} ± 0,995
2	28,60^{a} ± 1,138	37,54^{a,b} ± 3,930	33,04^{a,b} ± 1,078	46,60^{b} ± 6,334
3	36,03^{a} ± 0,979	54,41^{a,b} ± 8,087	43,35^{b} ± 0,460	72,19^{c} ± 14,127
4	45,42^{a} ± 3,246	73,82^{b} ± 15,545	64,05^{b} ± 9,135	89,23^{c} ± 13,975
5	54,52^{a} ± 1,126	86,95^{b} ± 14,834	82,57^{b,c} ± 12,936	97,31^{c} ± 1,658
6	66,33^{a} ± 2,624	93,16^{b} ± 12,365	93,37^{b} ± 9,172	99,56^{b} ± 1,100
7	77,16^{a} ± 3,281	97,49^{b} ± 5,685	97,81^{b} ± 2,533	100,13^{b} ± 0,502
8	87,27^{a} ± 4,194	101,69^{a,b} ±1,147	99,95^{a,b} ± 0,685	101,42^{b} ± 0,833

^{a} e ^{b}: Média seguida por letras iguais na mesma linha indica que não houve diferença significativa entre os resultados e, seguida por letras diferentes na mesma linha indica que houve diferença significativa entre os resultados ($p < 0,05$).

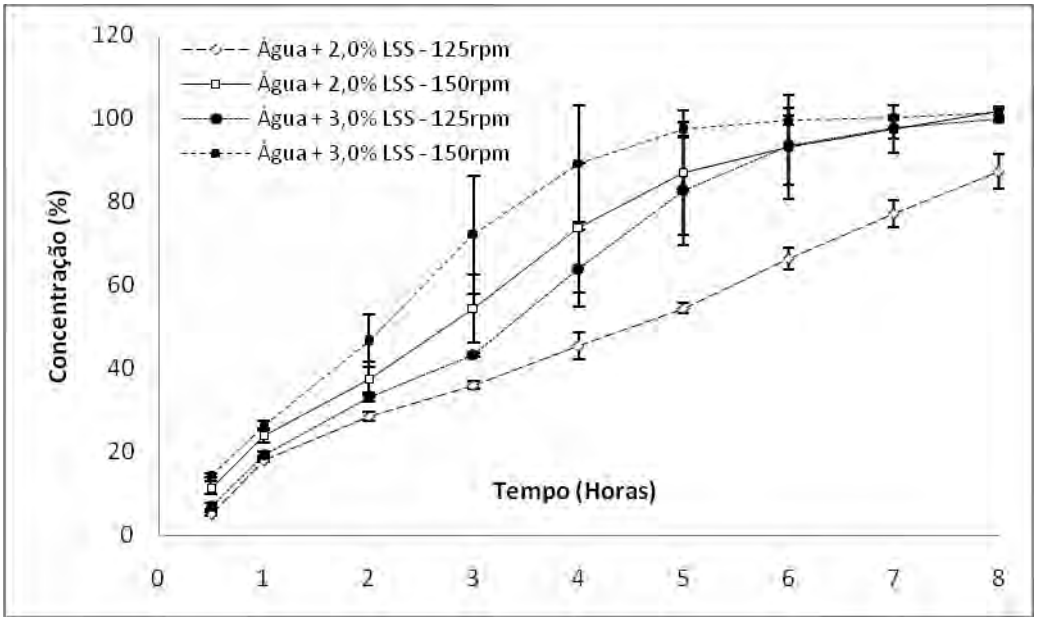


Figura 16: Perfil de dissolução das cápsulas de gelatina mole (Produto A) utilizando diferentes velocidades de rotação no desenvolvimento do ensaio de dissolução (n = 3).

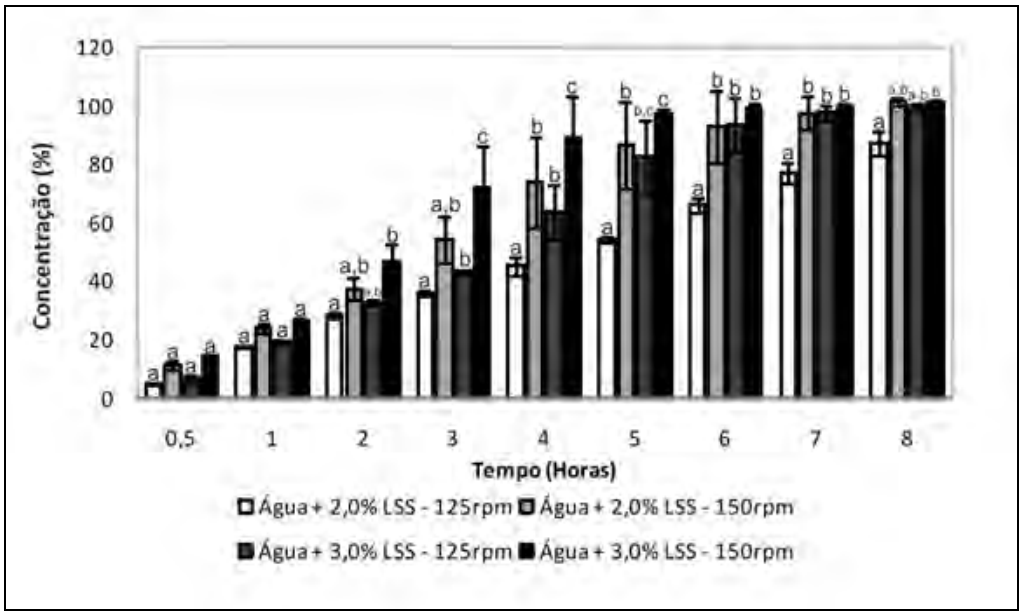


Figura 17: Análise estatística dos dados encontrados no ensaio para avaliar a influência da velocidade de rotação/agitação (n = 3), utilizando ANOVA e Tukey com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Os dados apresentados na Tabela 18 e Figura 17 também demonstram que a velocidade de rotação foi fundamental para promover a dissolução do fármaco em um menor tempo; o meio de dissolução contendo 2,0% de LSS com velocidade de rotação de 150 rpm proporcionou resultados semelhantes estatisticamente ao ensaio utilizando 3,0% de LSS com velocidade de 125 rpm em praticamente todos os tempos avaliados, justificando-se, assim, a utilização de uma rotação mais elevada

do que a aconselhada para o uso do dispositivo pá. No entanto, respeitou-se a velocidade máxima permitida para não ocorrer o processo de turbulência (USP 31ª ed., 2008b). Porém, apesar de os resultados serem semelhantes estatisticamente, não se mostraram satisfatórios com o objetivo do experimento, ou seja, não dissolveram 80% do fármaco até a quarta hora do ensaio, sendo, por isso, escolhida a condição contendo 3,0% do tensoativo lauril sulfato de sódio e a velocidade de rotação de 150 rpm.

5.3.4 Definição do pH do meio de dissolução

Determinados o tipo, a concentração de tensoativo e a velocidade de rotação utilizados no ensaio, foi verificada a influência do pH no processo de dissolução do fármaco. Assim, utilizou-se lauril sulfato de sódio na proporção de 3,0% em água, tampão acetato de sódio pH 4,5 e ácido clorídrico 0,1 mol/L (USP 31ª ed., 2008) com pH ajustado para 1,2 após a adição do tensoativo, como demonstrado na Tabela 19.

Tabela 19: Variações de pH utilizadas no meio de dissolução.

Meio de Dissolução	Aparato	Velocidade de rotação
Água + 3,0% LSS	Pá	150 rpm
TAS pH 4,5 + 3,0% LSS	Pá	150 rpm
HCℓ 0,1 mol/L pH 1,2 + 3,0% LSS	Pá	150 rpm

A partir dos resultados apresentados na Tabela 20 e na Figura 18, foi possível observar que o pH do meio não influenciou no tempo de dissolução da forma farmacêutica avaliada.

Os resultados foram estatisticamente avaliados por meio de análise fatorial 3x9, utilizando ANOVA, comprovando que não houve diferença significativa em relação à condição do teste e à interação, apenas no tempo entre os valores de pH utilizados. Após a utilização de Tukey no desmembramento do tempo, foi observado que não houve diferença significativa entre os valores de pH avaliados em nenhum momento do ensaio, levando-se em consideração um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$), como demonstrado na Tabela 20 e Figura 19.

Tabela 20: Médias e Desvios Padrão das porcentagens de fármaco dissolvido em função do tempo comparando o pH do meio de dissolução utilizado (n = 3).

Tempo (Horas)	Porcentagem de fármaco dissolvido (média ± DP)		
	Água + 3,0% LSS	TAS pH 4,5 + 3,0% LSS	HCℓ 0,1 mol/L pH 1,2 + 3,0% LSS
0,5	14,43[a] ± 0,356	18,68[a] ± 2,215	19,93[a] ± 11,798
1	26,34[a] ± 0,995	32,15[a] ± 1,136	23,81[a] ± 9,771
2	46,60[a] ± 6,334	55,30[a] ± 5,803	56,63[a] ± 9,186
3	72,19[a] ± 14,127	82,31[a] ± 11,610	81,85[a] ± 14,544
4	89,23[a] ± 13,975	93,76[a] ± 7,569	92,50[a] ± 10,148
5	97,31[a] ± 1,658	98,68[a] ± 0,508	98,09[a] ± 2,047
6	99,56[a] ± 1,100	99,87[a] ± 0,266	99,23[a] ± 0,162
7	100,13[a] ± 0,502	101,06[a] ± 0,909	100,79[a] ± 0,081
8	101,42[a] ± 0,833	101,29[a] ± 0,309	101,41[a] ± 0,401

[a] e [b]: Média seguida por letras iguais na mesma linha indica que não houve diferença significativa entre os resultados e, seguida por letras diferentes na mesma linha indica que houve diferença significativa entre os resultados ($p < 0,05$).

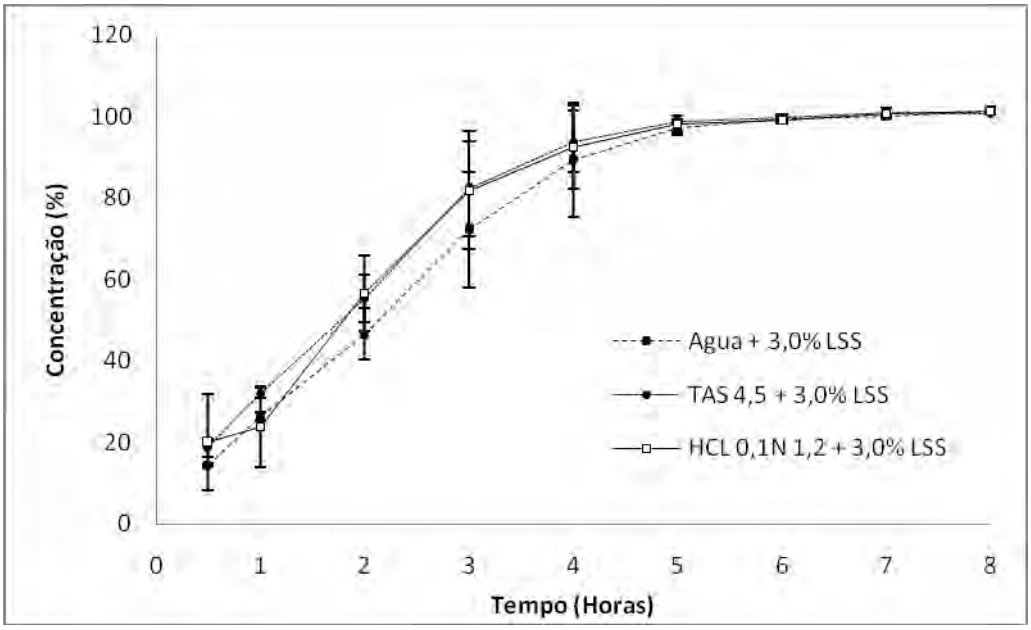


Figura 18: Perfil de dissolução das cápsulas de gelatina mole (Produto A) utilizando pHs diferentes no meio de dissolução (n = 3).

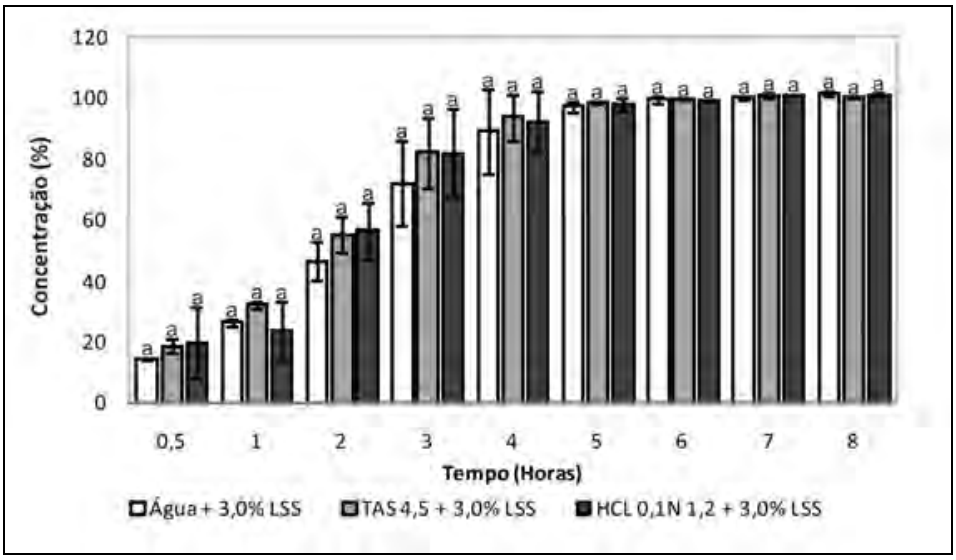


Figura 19: Análise estatística dos dados encontrados no ensaio realizado para avaliar a influência da pH na dissolução do fármaco (n = 3), utilizando ANOVA e Tukey com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

De acordo com a USP 31ª ed. (2008b), o meio contendo exclusivamente água não é considerado ideal por várias razões. Primeiro porque a qualidade da água pode variar dependendo da fonte, e seu pH não é controlado. Segundo, devido ao fato de seu pH poder variar de dia para dia e também durante a corrida, dependendo do ativo e dos excipientes, além de não ser biorrelevante. Por isso, foi feita a opção pelo meio contendo tampão acetato de sódio pH 4,5, por ser fisiologicamente compatível com o pH do trato gastrintestinal (oral) e vaginal, que são as duas vias de administração dos produtos avaliados. Portanto, é um meio biorrelevante, além de proporcionar capacidade tamponante.

Alguns estudos têm demonstrado que o uso de lauril sulfato de sódio em meios com pH ácido têm diminuído significativamente a solubilidade da gelatina. O ponto isoelétrico da gelatina situa-se entre pH 5 e 8 e que, abaixo de 5, a gelatina adquire carga positiva. Dessa forma, em teoria, pode reagir com o LSS através de interações iônicas. No entanto, a diminuição da dissolução não foi observada com concentrações de lauril sulfato de sódio situadas acima de 1,0% (ZHAO *et al*, 2004). Tal comportamento também foi demonstrado na Tabela 20 e figura 19.

5.3.5 Definição do dispositivo/método

Após a definição do meio de dissolução e da velocidade de rotação, foi observado o último parâmetro avaliado, como mostrado na Tabela 21.

Tabela 21: Tipos de dispositivos utilizados no meio de dissolução.

Aparato	Meio de Dissolução	Velocidade de rotação
Pá	TAS pH 4.5 + 3,0% LSS	150 rpm
Cesta	TAS pH 4.5 + 3,0% LSS	150 rpm

A Tabela 22 e a Figura 20 permitem verificar que o dispositivo pá proporcionou melhores condições de dissolução, pois promoveu a dissolução do fármaco em um menor tempo de ensaio quando comparado com o dispositivo cesta. Tal fato pode ser explicado, pois provavelmente, a gelatina presente na forma farmacêutica aderiu na superfície da malha da cesta, dificultando a liberação do fármaco e, consequentemente, retardando sua dissolução. Outra explicação seria em função da diferença da hidrodinâmica imposta pelos dois tipos de dispositivos, sendo que o dispositivo pá exerce um tensão de cisalhamento maior do que o dispositivo cesta.

Os resultados foram estatisticamente avaliados através de análise fatorial 2x9, utilizando ANOVA e Tukey, comprovando que houve diferença significativa em relação à condição do teste, ao tempo e à interação entre os aparatos utilizados. Em relação aos tempos avaliados, só não houve diferença significativa entre os aparatos utilizados a partir da sétima hora, levando-se em consideração um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$), como demonstrado na Tabela 22 e Figura 21.

Tabela 22: Médias e Desvios Padrão das porcentagens de fármaco dissolvido em função do tempo comparando o tipo de aparato utilizado (n = 3).

Tempo (Horas)	Porcentagem de Fármaco dissolvido (média ± DP)	
	Pá	Cesta
0,5	18,68[a] ± 2,215	3,26[b] ± 0,514
1	32,15[a] ± 1,136	9,91[b] ± 1,515
2	55,30[a] ± 5,803	21,87[b] ± 2,418
3	82,31[a] ± 11,610	30,99[b] ± 4,881
4	93,76[a] ± 7,569	52,64[b] ± 11,071
5	98,68[a] ± 0,508	69,47[b] ± 18,023
6	99,87[a] ± 0,266	81,55[b] ± 19,197
7	101,06[a] ± 0,909	87,16[a] ± 16,395
8	101,29[a] ± 0,309	92,00[a] ± 9,158

[a] e [b]: Média seguida por letras iguais na mesma linha indica que não houve diferença significativa entre os resultados e, seguida por letras diferentes na mesma linha indica que houve diferença significativa entre os resultados ($p < 0,05$).

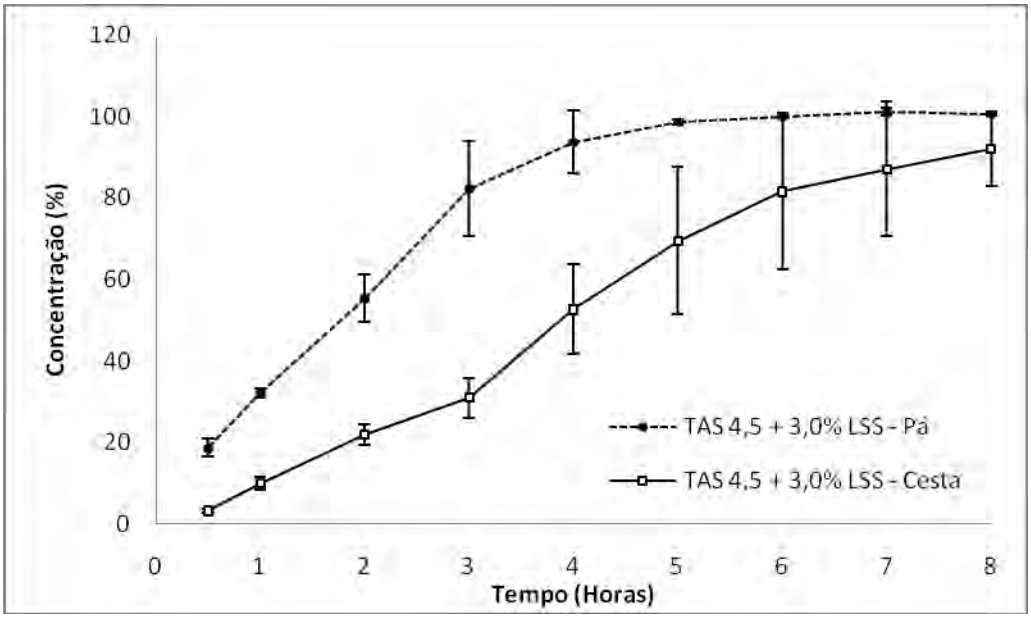


Figura 20: Perfil de dissolução das cápsulas de gelatina mole (Produto A) utilizando aparatos diferentes no desenvolvimento do ensaio de dissolução (n = 3).

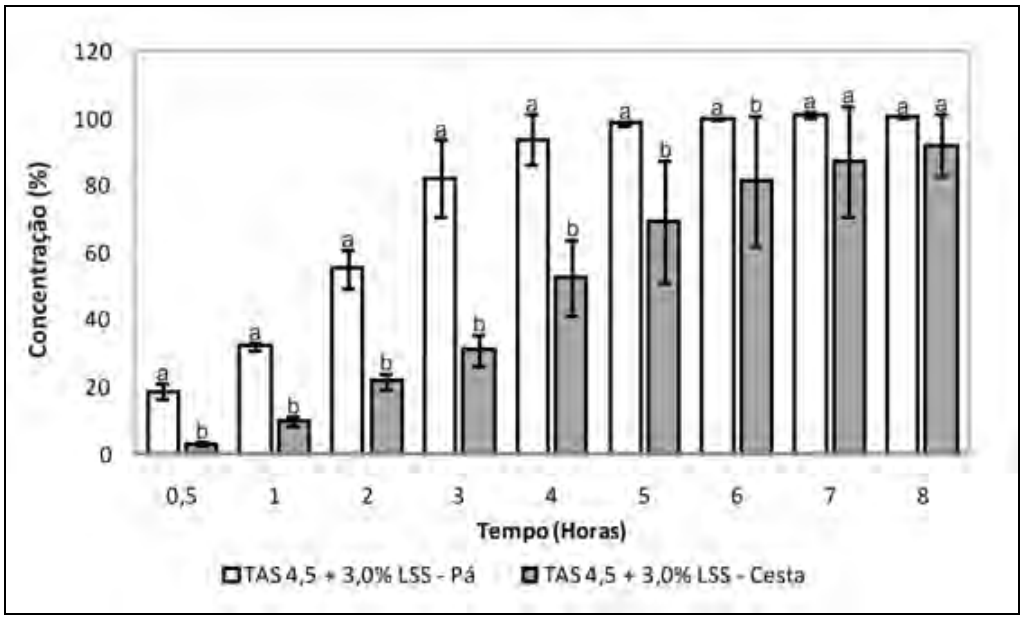


Figura 21: Análise estatística dos dados encontrados no ensaio para avaliar a influência do aparato na dissolução do fármaco (n = 3), utilizando ANOVA e Tukey com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

De acordo com o CDER/FDA (2000), o dispositivo 1 (USP) é geralmente preferível para cápsulas e outras formas farmacêuticas que tendem a flutuar, e o dispositivo 2 (USP) é geralmente preferível para comprimidos. No entanto, as especialidades farmacêuticas em estudo, apesar de serem cápsulas de gelatina mole com conteúdo oleoso, não flutuaram, inicialmente, não necessitando do uso de âncoras e apresentaram melhor desempenho durante a utilização do dispositivo pá, justificando assim, a sua escolha. O dispositivo pá também foi escolhido por Rossi *et al*. (2007) e por Donato *et al*. (2008) em trabalhos realizados com cápsulas de gelatina mole contendo anti-retrovirais.

5.4 Validação do método de dissolução

O método de dissolução mostrou-se adequado, visto que foi aprovado em todos os parâmetros avaliados, segundo a USP 31ª ed. (2008b).

5.4.1 Especificidade/Interferência do placebo

De acordo com a USP 31ª ed. (2008b), o placebo não deve interferir mais do que 2% no método de dissolução. Logo, o método mostrou-se específico tanto para o produto A quanto para o produto B, porquanto não houve interferência de nenhum

componente da formulação no tempo de eluição do fármaco (± 4,63min), como mostrado nas figuras 22 e 23.

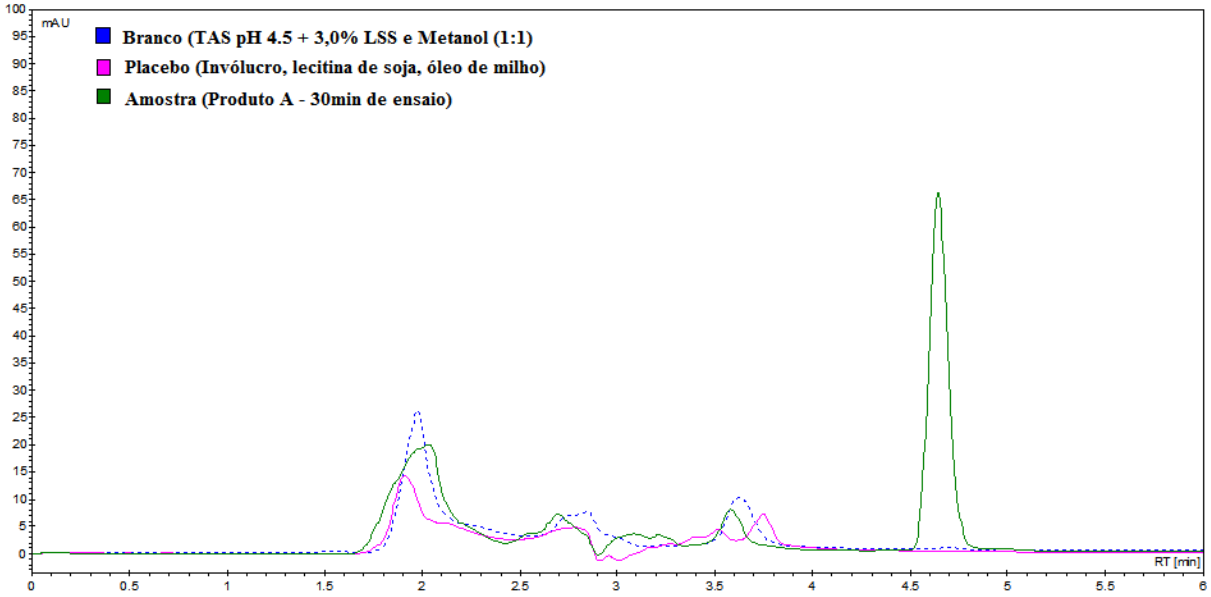


Figura 22: Análise do placebo contido no produto A utilizando as seguintes condições cromatográficas: coluna C_{18} (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), fase móvel contendo metanol-água (90:10, v/v), fluxo de 1,0 mL/min, forno para coluna com a temperatura de 30°C e volume de injeção de 20 µL.

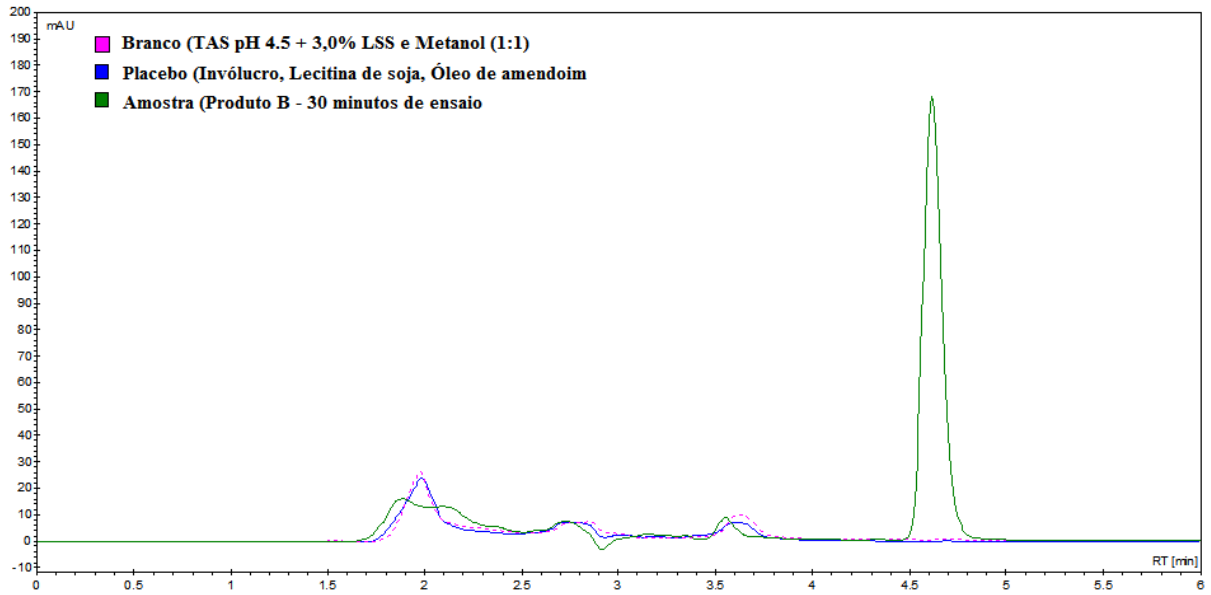


Figura 23: Análise do placebo contido no produto B utilizando as seguintes condições cromatográficas: coluna (C_{18} – 250 mm x 4,6 mm, 5 µm), fase móvel contendo metanol-água (90:10, v/v), fluxo de 1,0 mL/min, forno para coluna com a temperatura de 30°C e volume de injeção de 20 µL.

.

5.4.2 Linearidade

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 23 e Figura 24), foi verificada adequada correlação linear, uma vez que os coeficientes de correlação encontrados nas três curvas padrão apresentaram valores superiores a 0,98, de acordo com a USP 31ª ed. (2008b) e desvios padrão relativo abaixo de 2,5%.

Tabela 23: Valores de DPR obtidos na construção das curvas padrão feitas com TAS pH 4.5 + 3,0% LSS.

Amostras	Desvio Padrão Relativo		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
7,5µg/mL	0,09%	0,80%	0,16%
15µg/mL	0,14%	0,04%	0,30%
30µg/mL	0,64%	1,44%	1,04%
60µg/mL	2,46%	1,08%	0,88%
120µg/mL	0,90%	0,41%	1,06%
180µg/mL	0,34%	0,42%	0,10%
240µg/mL	0,44%	0,68%	0,46%
r^2	1	0,999	1

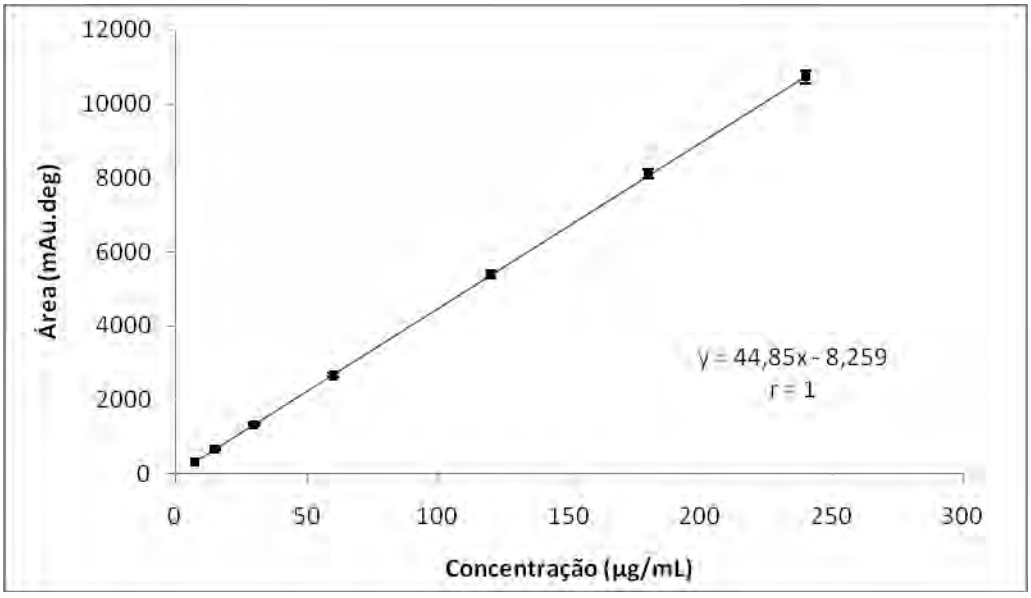


Figura 24: Curva padrão média, equação da reta e coeficiente de correlação obtidos com amostras de progesterona preparadas em TAS pH 4.5 com 3,0% de LSS (n = 3), utilizando os seguintes parâmetros cromatográficos: coluna C_{18} (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), fase móvel contendo metanol-água (90:10, v/v), fluxo de 1,0 mL/minuto, forno para coluna com a temperatura de 30°C e volume de injeção de 20 µL.

5.4.3 Exatidão (Recuperação)

A USP 31ª ed. (2008b) determina que o percentual de recuperação encontrado durante a execução do processo de exatidão deve estar entre 95% e 105% da quantidade adicionada. Sendo assim, o método mostrou-se exato durante os dois dias de análise realizados por dois analistas diferentes, pois todas as quantidades adicionadas tiveram seu percentual de recuperação dentro da faixa estabelecida, como mostrado nas Tabelas 24 e 25.

Tabela 24: Resultados da exatidão intra-corrida (n=3) e inter-corridas (n = 18) do método de dissolução para o produto A.

Concentração	Intra-corrida (1° Dia)	Intra-corrida (2° Dia)	Inter-corridas
10 µg/mL	99%	101%	99%
	97%	100%	
	97%	101%	
100 µg/mL	100%	98%	99%
	98%	100%	
	99%	100%	
200 µg/mL	98%	100%	100%
	97%	101%	
	101%	99%	

Tabela 25: Resultados da exatidão intra-corrida (n=3) e inter-corridas (n = 18) do método de dissolução para o produto B.

Concentração	Intra-corrida (1° Dia)	Intra-corrida (2° Dia)	Inter-corridas
10 µg/mL	103%	104%	104%
	102%	104%	
	104%	104%	
100 µg/mL	97%	100%	100%
	99%	101%	
	100%	100%	
200 µg/mL	98%	98%	98%
	99%	98%	
	98%	99%	

5.4.4 Precisão

O método apresentou precisão intra-corrida e inter-corridas; em todas as análises executadas, o desvio padrão relativo situou-se abaixo de 5,0%, como ilustrado nas tabelas 26 e 27.

Tabela 26: Resultados da precisão intra-corrida (n = 3) e inter-corridas (n = 18) do método de dissolução para o produto A.

Concentração	DPR Intra-corrida (1° Dia)	DPR Intra-corrida (2° Dia)	DPR Inter-corridas
10 µg/mL	0,76%	0,78%	2,03%
	1,67%	0,96%	
	0,26%	0,94%	
100 µg/mL	2,17%	0,13%	1,46%
	2,50%	0,90%	
	0,68%	0,44%	
200 µg/mL	0,45%	0,01%	1,53%
	0,15%	0,78%	
	0,67%	0,31%	

Tabela 27: Resultados da precisão intra-corrida (n = 3) e inter-corridas (n = 18) do método de dissolução para o produto B.

Concentração	DPR Intra-corrida (1° Dia)	DPR Intra-corrida (2° Dia)	DPR Inter-corridas
10 µg/mL	0,28%	1,33%	1,17%
	2,45%	0,52%	
	0,17%	0,20%	
100 µg/mL	0,98%	4,29%	2,28%
	1,73%	1,96%	
	1,19%	0,75%	
200 µg/mL	1,27%	0,74%	0,94%
	0,25%	0,12%	
	1,42%	0,61%	

5.4.5 Estudo de estabilidade da progesterona

A estabilidade da progesterona em meio de dissolução foi analisada com o intuito de verificar a viabilidade da execução do ensaio de dissolução no meio proposto, verificando possíveis produtos de degradação ao longo do processo.

De acordo com a USP 31ª ed. (2008b), a concentração da solução pode variar ± 2,0% (98% a 102%) da concentração inicial (100%). Sendo assim, os resultados apresentados nas Tabelas 28, 29, 30, 31 e Figura 25 demonstram que a progesterona se manteve estável ao calor e à luz no meio proposto, e que as amostras não sofreram degradação de um dia para o outro; as variações encontradas entre as amostras dos tempos zero, 1, 4, 8 e 24 horas foram inferiores a 2,0%.

Tabela 28: Estudo de estabilidade da progesterona recém diluída (n = 3).

Amostra/Tempo	Zero	1 hora	4 horas	8 horas	24 horas
Média (Concentração %)	98,5	99,5	98,0	97,3	98,8
DP	0,47	0,74	1,01	0,25	1,40
DPR	0,48	0,74	1,03	0,26	1,41

Tabela 29: Estudo de estabilidade da progesterona no dia seguinte à diluição (n = 3).

Amostra/Tempo	Zero	1 hora	4 horas	8 horas	24 horas
Média (Concentração %)	99,1	99,2	98,4	97,3	99,4
DP	0,87	0,85	0,96	0,16	1,50
DPR	0,88	0,86	0,97	0,17	1,51

Tabela 30: Estudo comparativo da estabilidade da progesterona recém diluída e no dia seguinte à diluição (n = 3).

Amostra/Tempo	Zero	1 hora	4 horas	8 horas	24 horas
Média (Concentração %)	98,8	99,4	98,2	97,3	99,1
DP	0,424	0,212	0,283	0,000	0,424
DPR	0,429	0,214	0,288	0,000	0,428

Tabela 31: Análise da média dos tempos (n = 5) das amostras recém preparadas e das amostras no dia seguinte.

Dados	Amostras recém preparadas	Amostras do dia seguinte
Média	97,4	97,7
DP	0,819	0,866
DPR	0,841	0,887

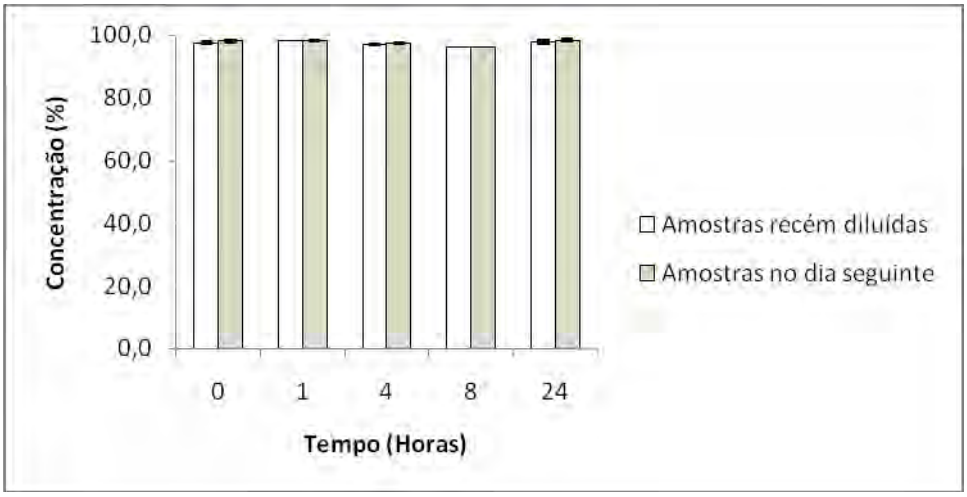


Figura 25: Comparativo entre amostras nos tempos 0, 1, 4, 8 e 24 horas logo após a diluição e 24 horas após a diluição (n = 3).

Após a corrida de 60 minutos da amostra coletada no tempo de 8 horas do ensaio de dissolução, não foi observada a presença de nenhum tipo de pico. Então, é possível garantir a integridade do fármaco durante todo o tempo de análise, sabendo que o fármaco permaneceu estável em solução para o período de tempo especificado, e que nenhum produto de degradação foi observado ao longo da corrida.

5.5 Ensaios físicos comparativos dos Produtos A e B

5.5.1 Peso médio

Os produtos A (lote 1172) e B (lote 83506) foram aprovados no critério do peso médio. Os resultados obtidos foram condizentes com os parâmetros estabelecidos pela Farmacopéia Brasileira 4ª ed. (1988a), como demonstrado nas Tabelas 32 e 33.

Tabela 32: Peso médio das cápsulas (n = 20) do produto A (lote 1172).

Amostras	Peso das cápsulas (g)	Peso dos invól. (g)	Peso do cont. (g)	Diâmetro (mm)	Altura (mm)
1	0,7255	0,2302	0,4953	8,63	14,57
2	0,7340	0,2395	0,4945	8,58	15,03
3	0,7300	0,2355	0,4945	8,52	14,71
4	0,7213	0,2257	0,4956	8,85	14,64
5	0,7301	0,2341	0,4960	8,58	14,79
6	0,7321	0,2348	0,4973	8,61	14,56
7	0,7386	0,2428	0,4958	8,95	14,96
8	0,7348	0,2393	0,4955	8,51	14,98
9	0,7405	0,2444	0,4961	8,90	15,12
10	0,7436	0,2487	0,4949	8,76	14,92
11	0,7272	0,2304	0,4968	8,63	14,92
12	0,7276	0,2334	0,4942	8,79	14,67
13	0,7195	0,2238	0,4957	8,72	14,60
14	0,7345	0,2364	0,4981	8,90	14,78
15	0,7408	0,2434	0,4974	8,65	15,07
16	0,7393	0,2426	0,4967	8,92	15,00
17	0,7247	0,2290	0,4957	8,89	14,56
18	0,7282	0,2330	0,4952	8,78	14,80
19	0,7391	0,2419	0,4972	8,69	14,86
20	0,7386	0,2398	0,4988	8,66	15,00
Média	0,7325	0,2364	0,4961	8,73	14,83
DP	0,0070	0,0066	0,0012	0,14	0,18
DPR	0,9494	2,8041	0,2495	1,61	1,24
Limite inferior	0,6776	0,2187	0,4589	8,07	13,71
Limite superior	0,7874	0,2542	0,5333	9,38	15,94

Tabela 33: Peso médio das cápsulas (n = 20) do produto B (lote 83506).

Amostras	Peso das cápsulas (g)	Peso dos invól. (g)	Peso do cont. (g)	Diâmetro (mm)	Altura (mm)
1	0,7600	0,2405	0,5195	8,73	14,28
2	0,7703	0,2505	0,5198	8,71	14,25
3	0,7673	0,2477	0,5196	9,06	14,46
4	0,7694	0,2488	0,5206	8,87	14,39
5	0,7724	0,2510	0,5214	8,92	14,63
6	0,7725	0,2507	0,5218	8,92	14,38
7	0,7750	0,2521	0,5229	8,94	14,44
8	0,7689	0,2476	0,5213	8,88	14,56
9	0,7743	0,2525	0,5218	8,83	14,41
10	0,7566	0,2344	0,5222	8,67	14,13
11	0,7716	0,2474	0,5242	8,60	14,77
12	0,7597	0,2408	0,5189	8,92	14,29
13	0,7720	0,2498	0,5222	8,46	14,50
14	0,7683	0,2464	0,5219	9,10	14,54
15	0,7692	0,2469	0,5223	8,78	14,35
16	0,7700	0,2483	0,5217	9,12	14,08
17	0,7692	0,2487	0,5205	8,94	14,59
18	0,7748	0,2508	0,5240	8,99	14,21
19	0,7749	0,2478	0,5271	8,86	14,30
20	0,7695	0,2478	0,5217	8,98	14,35
Média	0,7693	0,2475	0,5218	8,86	14,40
DP	0,0051	0,0044	0,0019	0,17	0,17
DPR	0,6656	1,7705	0,3587	1,89	1,19
Limite inferior	0,7116	0,2290	0,4826	8,20	13,32
Limite superior	0,8270	0,2867	0,5609	9,53	15,48

Os invólucros e os conteúdos correspondentes a cada especialidade farmacêutica (Produtos A e B) podem ser visualizados no apêndice C.

5.5.2 Teor

Segundo os critérios estabelecidos para métodos gerais descritos pela Farmacopéia Brasileira 4ª ed. (1988) e USP 31ª ed. (2009), o teor do fármaco pode situar-se entre 90% e 110%. Portanto, apesar de o teor do produto B estar próximo ao limite inferior, os dois produtos obedeceram aos critérios definidos, seguindo iguais condições de execução (Tabela 34).

Tabela 34: Teor dos produtos A e B (n = 3).

Parâmetros	Produto A (lote 1172)	Produto B (lote 83506)
Média	98,3%	93,6%
DP	0,73	2,38
DPR	0,74%	2,54%

5.5.3 Uniformidade de conteúdo

De acordo com a Farmacopéia Brasileira 4ª ed. (1988b), a uniformidade de conteúdo da forma farmacêutica deve estar situada entre 85% e 115%, não permitindo um desvio padrão relativo entre as unidades testadas acima de 6%. Sendo assim, os produtos avaliados mostraram-se uniformes, pois todas as unidades analisadas estão dentro dos parâmetros especificados (Tabela 35).

Tabela 35: Uniformidade de conteúdo dos produtos A e B (n = 10).

Amostras	Concentração (%)	
	Produto A (lote 1172)	Produto B (lote 83506)
1	93,3	92,2
2	93,8	93,8
3	93,2	91,9
4	93,2	91,8
5	92,5	93,4
6	93,4	91,4
7	93,8	92,2
8	92,8	94,7
9	93,0	91,5
10	92,6	92,6
Média ± DP	93,2 ± 0,45	92,5 ± 1,07
DPR	0,48	1,15

5.5.4 Perfil de dissolução

Após o desenvolvimento e a validação do método de dissolução, foi feito o perfil de dissolução de três lotes de cada especialidade farmacêutica com o intuito de verificar a cinética de liberação, o desempenho *in vitro*, bem como avaliar o poder discriminativo do método. A análise visual do perfil de dissolução dos produtos analisados pode ser verificada nos Apêndices A e B.

As Tabelas (36, 37 e 38) e figuras (26, 27 e 28) ilustram o perfil de dissolução dos três lotes dos produtos avaliados (A e B) e demonstram que, em todos os lotes avaliados, houve a dissolução de 80% do fármaco até a quarta hora de estudo, ou seja, todos estão dentro das especificações definidas no método de dissolução desenvolvido e validado. Por conseguinte, representa uma importante ferramenta para orientar no monitoramento da qualidade do medicamento, pois, considerando que os medicamentos sólidos orais são aqueles que podem apresentar maiores problemas em relação à biodisponibilidade, torna-se essencial o perfil de dissolução do fármaco a partir da forma farmacêutica, por permitir visualizar a dissolução em função do tempo (MAHLE et al., 2007) e adequada caracterização da liberação do fármaco.

Os resultados foram estatisticamente avaliados através de análise fatorial 2x9, utilizando ANOVA e Tukey, comprovando que houve diferença significativa em relação à condição do teste, ao tempo e à interação dos perfis de dissolução comparativos entre os produtos A e B. Em relação aos tempos avaliados, houve diferença significativa entre os quatro, cinco e seis primeiros tempos, respectivamente (Tabelas 36, 37 e 38), levando-se em consideração um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Os lotes dos produtos foram comparados aleatoriamente em função da data de aquisição, levando em consideração a proximidade da data de fabricação.

Tabela 36 Perfil de dissolução (n = 6) dos produtos A (lote 1172) e B (lote 83506).

Tempo (Horas)	Porcentagem dissolvida	
	Produto A (média ± DP)	Produto B (média ± DP)
0,5	$13,3^{a} \pm 1,74$	$21,6^{b} \pm 1,93$
1	$24,8^{a} \pm 3,43$	$40,1^{b} \pm 7,07$
2	$48,7^{a} \pm 8,80$	$64,5^{b} \pm 12,27$
3	$71,2^{a} \pm 13,46$	$83,6^{b} \pm 11,71$
4	$85,4^{a} \pm 11,06$	$91,3^{a} \pm 5,69$
5	$92,6^{a} \pm 5,86$	$94,6^{a} \pm 1,64$
6	$96,3^{a} \pm 1,34$	$94,4^{a} \pm 1,25$
7	$97,5^{a} \pm 0,70$	$95,7^{a} \pm 1,43$
8	$98,7^{a} \pm 0,56$	$96,7^{a} \pm 1,34$

^{a} e ^{b}: Média seguida por letras iguais na mesma linha indica que não houve diferença significativa entre os resultados e, seguida por letras diferentes na mesma linha indica que houve diferença significativa entre os resultados ($p < 0,05$).

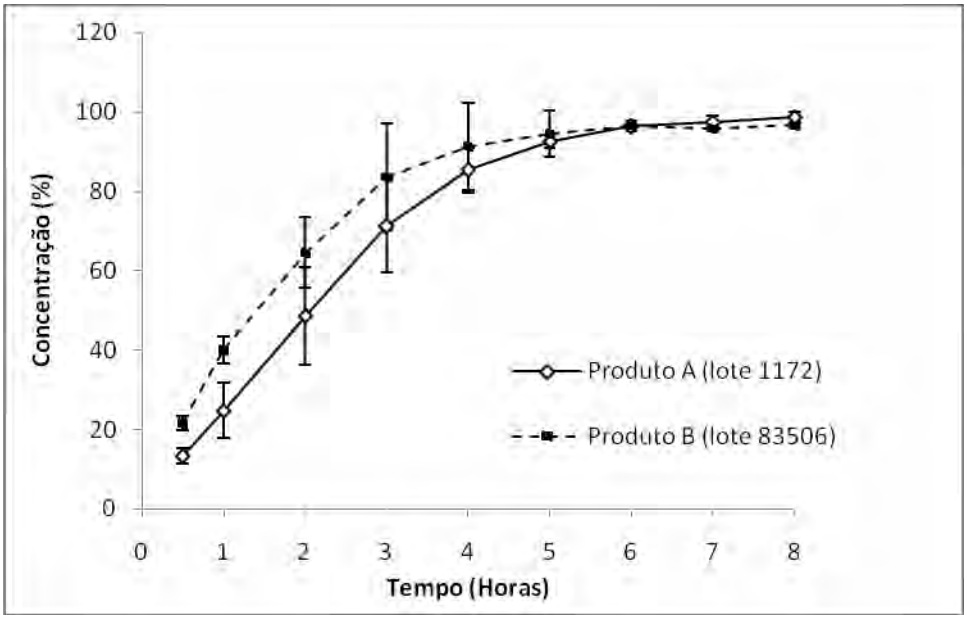


Figura 26: Perfil de dissolução comparativo entre o produto A (lote 1172) e o produto B (lote 83506) (n = 6).

Tabela 37: Perfil de dissolução (n = 6) dos produtos A (lote 1207) e B (lote 83614).

Tempo (Horas)	Porcentagem dissolvida	
	Produto A (média ± DP)	Produto B (média ± DP)
0,5	13,6[a] ± 1,37	23,3[b] ± 1,06
1	25,4[a] ± 2,29	40,9[b] ± 6,13
2	43,5[a] ± 5,95	63,8[b] ± 10,28
3	65,7[a] ± 11,55	82,0[b] ± 8,03
4	83,1[a] ± 10,38	93,8[b] ± 1,85
5	94,3[a] ± 6,10	97,0[a] ± 1,08
6	98,2[a] ± 2,25	97,8[a] ± 1,21
7	100,4[a] ± 0,24	97,0[a] ± 1,36
8	101,0[a] ± 0,56	98,7[a] ± 1,12

[a] e [b]: Média seguida por letras iguais na mesma linha indica que não houve diferença significativa entre os resultados e, seguida por letras diferentes na mesma linha indica que houve diferença significativa entre os resultados ($p < 0,05$).

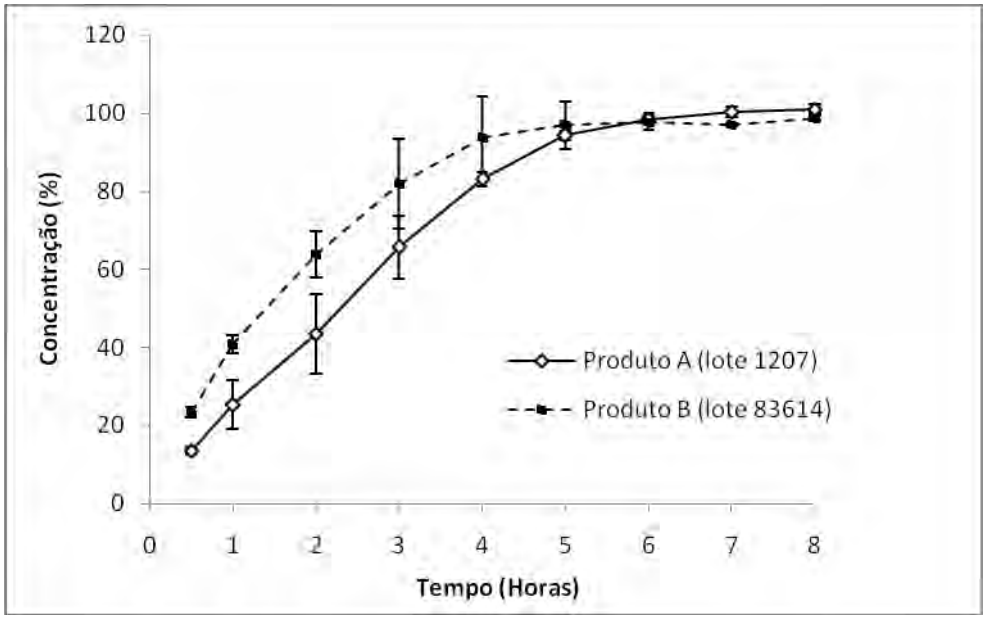


Figura 27: Perfil de dissolução comparativo entre o produto A (lote 1207) e o produto B (lote 83614) (n = 6).

Tabela 38: Perfil de dissolução (n = 6) dos produtos A (lote 1218) e B (lote 84115).

Tempo (Horas)	Porcentagem dissolvida	
	Produto A (média ± DP)	Produto B (média ± DP)
0.5	$8,5^{a} \pm 0,94$	$18,6^{b} \pm 1,90$
1	$19,2^{a} \pm 1,04$	$35,2^{b} \pm 4,92$
2	$38,2^{a} \pm 2,78$	$61,6^{b} \pm 9,45$
3	$59,4^{a} \pm 6,71$	$84,7^{b} \pm 9,49$
4	$80,5^{a} \pm 9,38$	$96,6^{b} \pm 2,79$
5	$92,1^{a} \pm 7,29$	$100,2^{b} \pm 0,39$
6	$95,7^{a} \pm 3,82$	$100,6^{a} \pm 0,24$
7	$97,8^{a} \pm 1,29$	$101,2^{a} \pm 1,04$
8	$99,3^{a} \pm 0,92$	$102,4^{a} \pm 2,00$

[a] e [b]: Média seguida por letras iguais na mesma linha indica que não houve diferença significativa entre os resultados e seguida por letras diferentes na mesma linha indica que houve diferença significativa entre os resultados ($p < 0,05$).

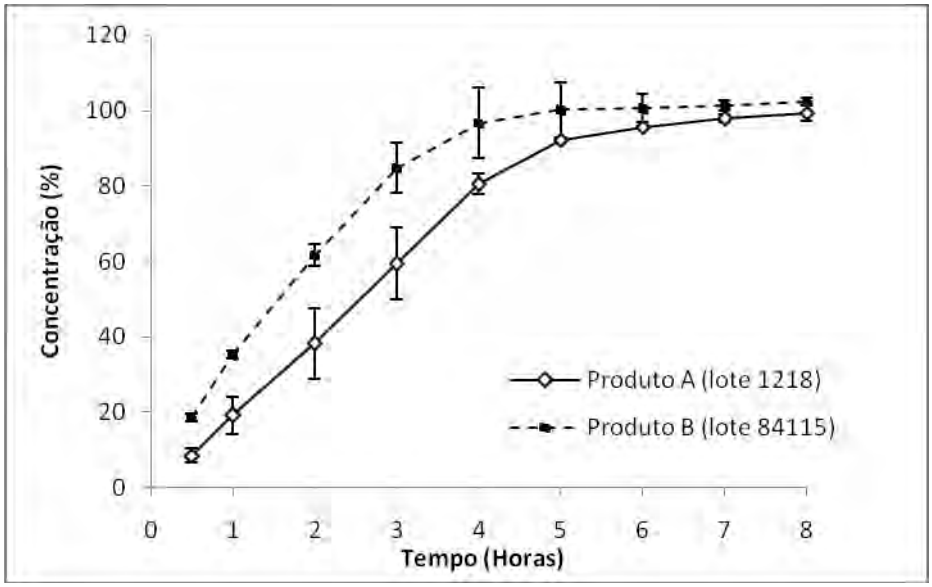


Figura 28: Perfil de dissolução comparativo entre o produto A (lote 1218) e o produto B (lote 84115) (n = 6).

As Tabelas (36, 37 e 38) e as figuras (26, 27 e 28) permitem concluir que o método de dissolução desenvolvido apresentou poder discriminativo, visto que possibilitou visualizar diferenças entre unidades de um mesmo lote, através dos desvios padrão encontrados e entre diferentes especialidades farmacêuticas.

Após a análise dos resultados apresentados nas Tabelas 36, 37, 38 e Figuras 26, 27 e 28, observa-se que o produto B proporcionou a dissolução do fármaco em uma hora a menos do que o produto A, em todos os três lotes avaliados. Acredita-se que tal resultado possa ter sido em função de uma maior quantidade de lecitina de soja presente na formulação do produto B, que promoveu melhor dispersão das gotículas (menor tamanho) através da redução da tensão interfacial e, consequentemente, acelerou a solubilização do fármaco. Acredita-se também que a dissolução do produto B em um menor tempo possa ter sido em função da sua menor viscosidade, visto que facilita a dispersão das gotículas e a passagem do fármaco pela camada de difusão. Além disso, a formulação A é descrita como uma suspensão da progesterona micronizada no veículo oleoso, o que também pode ser aplicado à formulação B. Porém, em razão da solubilidade da progesterona no óleo vegetal, é possível que proporções diferentes do fármaco estejam dissolvidas no veículo de cada uma das formulações.

O tipo de lipídeo presente nas formulações A e B (óleo de amendoim e óleo de milho, respectivamente), provavelmente não foi a razão para a modificação do

processo de dissolução da progesterona, porque os dois tipos de óleos são semelhantes em termos de comprimento da cadeia, ou seja, os dois são do tipo cadeia longa. Estudos avaliando a influência do tamanho da cadeia do óleo através de lipólise (DAHAN e HOFFMAN, 2008) e biodisponibilidade (PORTER *et al*., 2008) verificaram que formulações contendo progesterona em lipídeos de cadeia média possuíram um melhor desempenho quando comparado com os outros tipos (triglicérides de cadeia média > triglicérides de cadeia longa > triglicérides de cadeia curta).

5.6 Cinética de dissolução e estudo dos perfis obtidos (Produtos A e B)

5.6.1 Modelo método independente

Os resultados apresentados nas Tabelas 39, 40 e 41 demonstram que o produto B apresentou maior eficiência de dissolução do que o produto A, em todos os três lotes avaliados. Os lotes dos produtos foram comparados aleatoriamente em função da data de aquisição, levando em consideração a proximidade da data de fabricação.

Tabela 39: Eficiência de Dissolução (n = 6) dos produtos A (lote 1172) e B (83506).

Cubas	Produto A (%)	Produto B (%)
1	68,72	76,45
2	69,84	81,69
3	76,43	85,36
4	73,84	81,07
5	77,44	81,47
6	63,78	72,18
Média	71,68 [a]	79,70 [b]
DP	5,195	4,650
DPR	7,249	5,834

Tabela 40: Eficiência de Dissolução (n = 6) dos produtos A (lote 1207) e B (lote 83614).

Cubas	Produto A (%)	Produto B (%)
1	66,65	76,45
2	68,21	82,16
3	76,17	83,77
4	69,22	79,65
5	74,20	75,21
6	62,05	76,33
Média	69,42 [a]	78,93 [b]
DP	5,136	3,496
DPR	7,399	4,430

Tabela 41: Eficiência de Dissolução (n = 6) dos produtos A (lote 1218) e B (lote 84115).

Cubas	Produto A (%)	Produto B (%)
1	67,21	72,31
2	67,47	76,83
3	69,35	84,51
4	69,29	77,69
5	69,03	79,69
6	59,44	72,66
Média	66,97 [a]	77,28 [b]
DP	3,803	4,572
DPR	5,678	5,915

Os resultados foram estatisticamente avaliados através de análise de variância (ANOVA), comprovando que houve diferença significativa em relação à eficiência de dissolução dos produtos analisados, levando-se em consideração um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Através do cálculo da eficiência de dissolução avalia-se não apenas a quantidade de fármaco que foi liberada da forma farmacêutica ao final de um tempo determinado, mas também a cinética de liberação ao longo de todo o período em questão (MANADAS *et al*., 2002).

5.6.2 Modelos método dependente

A determinação do modelo que rege a cinética de dissolução das especialidades farmacêuticas foi avaliada por meio dos coeficientes de correlação gerados a partir da construção da curva para cada modelo estudado, sendo o modelo de escolha representado pelo o de maior coeficiente de correlação. Por isso, foi verificado que as duas especialidades farmacêuticas apresentaram a cinética de liberação de primeira ordem, como ilustrado na Tabela 42.

Tabela 42: Coeficientes de correlação gerados a partir da avaliação da cinética de dissolução apresentadas para os produtos A e B.

Modelos	Coeficiente de correlação					
	Produto A			Produto B		
Lotes	1172	1207	1218	83506	83614	84115
Ordem Zero	0,9248	0,9481	0,9453	0,8671	0,8788	0,8816
Primeira Ordem	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999
Higuchi	0,9718	0,9811	0,9810	0,9366	0,9443	0,9456

A cinética de primeira ordem parte do pressuposto de que a velocidade de dissolução depende da relação quantidade dissolvida de fármaco e quantidade remanescente deste na matriz (RODRIGUES e SILVA, 2005), ou seja, a liberação do fármaco é proporcional a quantidade de fármaco que permanece na forma farmacêutica, sendo sua liberação diminuída por unidade de tempo (COSTA e LOBO, 2001)

Os modelos método dependente e independente permitem verificar a semelhança do comportamento da dissolução dos diferentes produtos avaliados (PORTA *et al*., 2002). A cinética e a eficiência de dissolução apresentam-se como parâmetros sensíveis à diferenciação entre os produtos, sendo a eficiência de dissolução um parâmetro mais discriminatório (MAHLE *et al*., 2007).

O estudo de dissolução *in vitro* avalia o desempenho do produto, ou seja, sua capacidade de liberar o fármaco da forma farmacêutica e disponibilizá-lo para ser absorvido, bem como a forma com que isso ocorre (cinética). Assim, dependendo das características do fármaco e da formulação, há como fazer uma previsão de como será seu comportamento *in vivo*. No entanto, não há como comparar produtos

in vitro e afirmar qual produto terá melhor desempenho *in vivo* ou se terão o mesmo desempenho. Isso só é possível após a realização da correlação *in vivo – in vitro* feita através de ensaios de dissolução *in vitro* e de estudos de biodisponibilidade *in vivo* com as especialidades farmacêuticas em estudo. Por isso, a relevância do desenvolvimento e validação de um método de dissolução discriminativo capaz de avaliar formas farmacêuticas disponíveis comercialmente.

Partindo-se do princípio que o presente trabalho tem como objetivo avaliar o desempenho *in vitro* de dois produtos farmacêuticos (A e B) disponíveis no mercado, tal comparação tem relevância por permitir maior segurança durante a escolha do produto, considerando que medicamentos sólidos de uso oral podem apresentar maiores problemas em relação à biodisponibilidade e, portanto, sendo essencial avaliar o impacto e visualizar a liberação do produto em função do tempo.

6. CONCLUSÕES

- As condições cromatográficas avaliadas (metanol:água (90:10 v/v) como fase móvel; Coluna C_{18} - 250 mm x 4,6 mm, 5 µm como fase estacionária; fluxo de 1,0 mL/min; detecção no comprimento de onda de 240 nm, volume de injeção de 20 µL e temperatura da coluna a 30°C) demonstraram ser adequadas para a finalidade pretendida, possibilitando a quantificação da progesterona em menos de 5 minutos, tendo sido validado para todos os parâmetros pertinentes ao estudo.
- O lauril sulfato de sódio exerceu melhor efeito solubilizante sobre a progesterona do que os polissorbatos. A presença de 3,0% de LSS garantiu condição *sink* nos ensaios de dissolução.
- As condições que proporcionaram o melhor perfil de dissolução para cápsulas de gelatina mole foram: Meio de dissolução contendo tampão acetato de sódio pH 4,5 acrescido de 3,0% de lauril sulfato de sódio; volume de 1000mL; velocidade de 150rpm; aparato pá e duração do teste de 8h,
- O método de dissolução desenvolvido e validado foi considerado satisfatório e foi cuidadosamente estudado com o intuito de garantir a estabilidade do fármaco durante todo o tempo de análise.
- O método desenvolvido foi adequado à análise de dissolução de cápsulas de gelatina mole contendo progesterona, pois apresentou poder discriminatório entre unidades de um mesmo lote e entre diferentes especialidades farmacêuticas, além de atender aos critérios de validação apresentando linearidade, especificidade, precisão e exatidão.
- O produto B apresentou 80% do fármaco dissolvido em 3 horas de ensaio, enquanto que o produto A demorou 4 horas para atingir o mesmo percentual de fármaco dissolvido, em todos os lotes avaliados. Os dois produtos demonstraram cinética de dissolução de primeira ordem. No entanto, o produto B demonstrou maior eficiência de dissolução.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU, H. M. Dissolução. In: GENNARO, A. R. Remington: A Ciência e a Prática da Farmácia. 20ªEd. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004, Cap. 35, p. 674 – 686.

AMIDON, G. L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A Theorical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The correlation of *In Vitro* Drug Product Dissolution and *In Vivo* Bioavailability*, Pharmaceutical Research*, v. 12, n. 3, p.413 – 420, 1995.

_____. Desenvolvimento de Formas Farmacêuticas: Considerações Farmacêuticas. In: ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN Jr, LOYD, V. Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos, 8ªEd., Porto Alegre: Editora Artimed, 2007, Cap. 4, p. 111 – 158.

_____. Delineamento de Formas Farmacêuticas: Considerações Biofarmacêuticas. In: ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN Jr, LOYD, V. Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos, 8ªEd., Porto Alegre: Editora Artimed, 2007, Cap. 5, p. 159 - 203.

AULTON, M. Dissolução e solubilidade. In: AULTON, M.E. Delineamento de Formas Farmacêuticas. 2ªEd., Porto Alegre: Editora Artmed, 2005, Cap. 2, p. 32 - 47.

ASHFORD, M. Biodisponibilidade: fatores físico-químicos e relacionados à forma farmacêutica. In: AULTON, M. E. Delineamento de Formas Farmacêuticas. 2ªEd., São Paulo: Editora Artmed, 2005, Cap. 17, p. 245 - 263.

BANAKAR, U. K. Pharmaceutical Dissolution Testing. New York: Marcel Dekker Inc., 1992, p. 144 – 166.

BAULIEU, E. E.; SCHUMACHER, M. Progesterone as a neuroactive neurosteroid, with special reference to the effect of progesterone on myelination. *Human Reproduction*, v. 15, suppl. 1, p. 1 – 13, 2000.

BEDMAR, M. C.; CEREZO, A.; AZNARTE, P.; BRIZ, R.; GARCIA, L.; HERNANDEZ, P. J. Hydrophobicity parametrization of progesterone and corticosteroid derivatives by high performance liquid chromatographic technique. I: Linear case. International Journal of Pharmaceutics, v. 138, p. 95 – 102, 1996.

BIRUSS, B.; VALENTA, C. Skin permeation of different steroid hormones from polymeric coated liposomal formulations. *European Journal Pharmaceutics and. Biopharmaceutics.*, v. 62, p. 210 – 219, 2006.

BIRUSS, B.; VALENTA, C. The advantage of polymer addition to a non-ionic oil in water microemulsion for the dermal delivery of progesterone. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 349, p. 269 – 273, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 483, de 19 de março de 2002. Determina a publicação do "Guia para ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberção imediata". Disponível em URL: http://www.anvisa.gov.br. [01 Jan 2010].

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". Disponível em URL: http://www.anvisa.gov.br. [20 Fev 2008].

BRASIL. Agência Nacional de Vigilãncia Sanitária. RE n° 310, de 01 de setembro de 2004. Determina a publicação do "Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução". Disponível em URL: http://www.anvisa.gov.br. [10 Abr 2009].

BROWN, C. K.; CHOKSHI, H. P.; NICKERSON, B.; REED, R. A.; ROHRS, B. R.; SHAH, P. A. Acceptable Analytical Practices for Dissolution Testing of Poorly Soluble Compounds. *Pharmaceutical Technology*, 2004. Disponível em URL: http://www.pharmtech.com [15 Out 2009].

BROWN, C. K. Dissolution Method Development: An Industry Perspectives. In: DRESSMAN, J.; KRAMER, J. Pharmaceutical Dissolution Testing. Boca Raton: Editora Taylor & Francis Group, 2005, Cap. 12, p. 351 – 372.

BUENO, M. M.; RECH, N. Insumos Farmacêuticos: Aspectos Técnicos, Ciêntíficos e Regulatórios. In: STORPIRTIS *et al.* Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica. 1ªEd., Rio do Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2009, Cap. 2, p. 13 – 20.

CDER/FDA, Guidance for Industry. Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. 1997, 14p.

CDER/FDA, Guidance for Industry. Waiver of *in vivo* Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System, 2000, 14p.

CHAKRAVARTY, B. N.; SHIRAZEE, H. H., GOSWAMI, S. K.; CHATTERJEE, R.; GHOSH, S. Oral dydrogesterone versus intravaginal micronized progesterone as luteal phase support in assisted reproductive technology (ART) cycles: Results of a randomized study, *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, v. 97, p. 416-420, 2005.

CICINELLI, E. Intravaginal oestrogen and progestin administration: advantages and disadvantages, *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, v. 22, n. 2, p. 391-405, 2008.

_____. CLARKE'S – Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material, Third Edition, London: Pharmaceutical Press, 2004, 1935p.

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

CUNEO, M. F.; RUIZ, R. D.; LACUARA, J. L. Sistema genital feminino. In: CINGOLANI, H. E.; HOUSSAY, A. B. Fisiologia humana de Houssay. 7ªEd. São Paulo: Editora Artmed, 2004, Cap. 55, p. 705 – 715.

DAHAN, A.; HOFFMAN, A. Rationalizing the selection of oral lipid based drug delivery systems by an *in vitro* dynamic lipolysis model for improved oral bioavailability of poorly water soluble drugs. *Journal of Controlled Release*, v. 129, p 1 -10, 2008.

DEF – Dicionário de Especialidades Farmacêuticas, *Jornal Brasileiro de Medicina,* 2010.

DIEBOLD, S. M. Physiological Parameters Relevant to dissolution Testing: Hydrodinamic Considerations. In: DRESSMAN, J.; KRAMER, J. Pharmaceutical Dissolution Testing. Boca Raton: Editora Taylor & Francis Group, 2005, Cap. 6, p. 127 – 191.

DOKOUMETZIDIS, A.; MACHERAS, P. A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 321, p. 1 – 11, 2006.

DOKOUMETZIDIS, A.; PAPADOPOULOU, V.; VALSAMI, G.; MACHERAS, P. Development of a reaction-limited modelo of dissolution: Application to official

dissolution tests experiments. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 355, p. 114 – 125, 2008.

DONATO, E. M.; MARTINS, L. A.; FROEHLICH, P. E.; BERGOLD, A. M. Development and validation of dissolution test for lopinavir, a poorly water-soluble drug, in soft gel capsules, based on in vivo data. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 47, p. 547 – 552, 2008.

DRESSMAN, J. B.; AMIDON, G. L.; REPPAS, C.; SHAH, V. P. Dissolution Testing as a Prognostic Tool for Oral Drug Absorption: Immediate Release Dosage Forms. Pharmaceutical Research, v. 15, n. 1, p. 11 – 22, 1998.

DRESSMAN, J. B.; REPPAS, C. *In viro-in vivo* correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences,* v. 11, Suppl. 2, p. 73 – 80, 2000.

DRUGBANK Disponível em: http://www.drugbank.ca/, acessado em 15/05/2008.

EL-MASSIK, M. A.; DARWISH, I. A.; HASSAN, E. E.; EL-KHORDAGUI, L. K. Development of a dissolution médium for glibenclamide. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 140, p. 69 – 76, 1996.

FARM. BRAS.: FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. São Paulo: Atheneu Ed. São Paulo, 1988.

FARM. BRAS.: FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. São Paulo: Atheneu Ed. São Paulo, 1988a. parte.1. V.1.1. Determinação de peso em formas farmacêuticas.

FARM. BRAS.: FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. São Paulo: Atheneu Ed. São Paulo, 1988b. parte.1. V.1.6. Uniformidade de doses unitárias.

FDA Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods, 1994.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows 4.0. In: Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, 45, São Carlos, 2000. Anais. São Carlos, UFSC, p. 255 – 258, 2000.

FIP, Guidelines for Dissolution testing of solid oral products, *Drug Information Journal*, v. 30, p.1071 – 1084, 1996.

FITZPATRICK, L. A.; GOOD, A. Micronized progesterone: clinical indications and comparison with current treatments. Fertility and Sterility, v. 72, n. 3, p. 389 – 396, 1999.

FLACH, A. O. P.; DALLA COSTA, T. Avaliação do Critérios de Isenção de Estudos de Bioequivalência *In vivo* para Medicamentos Orais em Forma Farmacêutica Sólida de Liberação Imediata*. Caderno de Farmácia*, v. 15, n. 2, p. 49-58, 1999.

GALIA, E.; NICOLAIDES, E.; HORTER, D.; LOBENBERG, R.; REPPAS, C.; DRESSMAN, J. B. Evaluation of Various Dissolution Media for Predicting *In Vivo* Performance of Class I and II Drugs. Pharmaceutical Research, v. 15, n. 5, 1998.

GARAY, E. A. R. Secreções gastrointestinais. In: CINGOLANI; HOUSSAY et al. Fisiologia Humana de Houssay. 7ªEd. Porto Alegre: Editora Artmed, 2004, Cap. 14, p. 194 – 210.

GERMOND, M.; CAPELLI, P.; BRUNO, G.; VESNAVER, S.; SENN, A.; ROUGE, N.; BIOLLAZ, J. Comparison of the efficacy and sefaty of two formulations of micronized progesterone (Ellios™ and Utrogestan™) used as luteal phase support after *in vitro* fertilization, *Fertility and Sterility*, v. 77, n. 2, p. 313 – 317, 2002.

_____. Fisiologia feminina antes da gravidez e os hormônios femininos. In: GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de Fisologia Médica, 9ªEd., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1997, Cap.81, p. 869 – 882.

HAIGH, J. M.; BEYSSAC, E.; CHANET, L.; AIACHE, J. M. *In vitro* permeation of progesterone from a gel through the shed skin of three different snake species. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 170, p. 151 – 156, 1998.

HARGROVE, J.; MAXSON, W.; WENTZ, C. Absorption of oral progesterone is influenced by vehicle and particle size. Am. Journal of. Obstetricy and. Gynecology., v.161, p. 948 – 951, 1989.

HITCHISON, K.; FERDINANDO, J. Cápsulas moles de gelatina. In: AULTON, M. E. Delineamento de Formas Farmacêuticas. São Paulo: Editora Artmed, 2005, Cap. 30, p. 466 – 477.

HUMBERSTONE, A. J.; CHARMAN, W. N. Lipid-based vehicles for the oral delivery of poorly water soluble drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 25, p. 103 – 128, 1997.

HUSSAIN, A.; AHSAN, F. The vagina as a route for systemic drug delivery. Journal *of Controlled Release*, v. 103, p. 301 – 313, 2005.

ICH – Harmonised Tripartite Guidance. Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B. In: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.

JANÁT-AMSBURY, M.M.; GUPTA, K.M.; KABLITZ, C. D.; PETERSON, C.M. Drug delivery for in vitro fertilization: Rationale, current strategies and challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 61, p. 871 – 882, 2009.

KHAN, K. A.; RHODES, C. T. The concept of dissolution efficiency. *Journal of Pharmacy and. Pharmacology*., v. 27, p. 48 - 49, 1975.

KLEINSTEIN, J. Efficacy and tolerability of vaginal progesterone capsules (Utrogest™ 200) compared with progesterone gel (Crinone™ 8%) for luteal phase support during assisted reproduction. *Fertility and Sterility*, v. 83, n. 6, p. 1641 – 1649, 2005.

KOSSENA, G. A.; CHARMAN, W. N.; WILSON, C. G.; O'MAHONY, B.; LINDSAY, B.; HEMPENSTALL, J. M.; DAVISON, C. L.; CROWLEY, P. J.; PORTER, C. J. H. Low Dose Lipid formulations: Effects on Gastric Emptying and Biliary Secretion. *Pharmaceutical Research*, v. 24, n. 11, p. 2084 - 2096, 2007.

KRAMER, J.; GRADY, L. T.; GAJENDRAN, J. Historical Development of Dissolution Testing In: DRESSMAN, J.; KRAMER, J. Pharmaceutical Dissolution Testing. Boca Raton: Editora Taylor & Francis Group, 2005.

LEVY, T.; YAIRI, Y.; BAR-HAVA, I.; SHALEV, J.; ORVIETO, R.; BEM-RAFAEL, Z. Pharmacokinetics of the progesterone-containing vaginal tablet and its use in assited reprodution. Steroids 65, p. 645 – 649, 2000.

LIGNIERES, B.; DENNERSTEIN, L.; BACKSTROM, T. Influence of route of administration on progesterone metabolism. *Maturitas*, v. 21, p. 251 - 257, 1995.

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

LOOSE-MITCHELL, D. S.; STANCEL, G. M. Estrogênios e Progestogênios. In: GOODMAN & GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica, 10ª edição, Rio de Janeiro: Editora Mc Graw-Hill, 2003, Cap. 58, p. 1201-1229.

MACGREGOR, K. J.; EMBLETON, J. K.; LACY, J. E.; ANNE PERRY, E.; SOLOMON, L. J.; SEAGER, H.; POUTON, C. W. Influence of lipolysis on drug absorption from the gastro-intestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 25, p. 33 – 46, 1997.

MAHLE, F.; GOELZER, F.; ADIANO, J.; FELIPPE, M.; VIER, N.; CARLI, R.B.G..; ROSA, T.; COUTO, A. G.; LUCINDA-SILVAR. M. Avaliação do perfil de dissolução de comprimidos de hidroclorotiazida comercializados no Brasil. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 28, n. 3, p. 265 - 271, 2007.

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

MANIASSO, N. Ambientes Micelares em Química Analítica. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 87-93, 2001.

MARCOLONGO, R., Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica. São Paulo, 2003. 127p. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo.

MARQUES, M. R. C. Dissolução de Medicamentos. In: STORPIRTIS *et al*. Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica, Rio de Janeiro: Editora Guanabra Koogan, 2009, Cap. 7, p. 96 - 108.

MELIA, C.D.; DAVIS, S. S. Review article: Mechanisms of drug release from tablets and capsules. 2. Dissolution. *Aliment. Pharmacol. Therap*. V.3, p. 513–525, 1989.

NICOLA, A. F. Fisiologia do córtex supra-renal. In: CINGOLANI, H. E.; HOUSSAY, A. B. Fisiologia Humana de Houssay. 7ª Ed. São Paulo: Editora Artmed, 2004, Cap. 51, p. 656 – 669.

NOORY, C.; TRAN, N.; OUDERKIRK, L.; SHAH, V. Steps for Development of a Dissolution Test for Sparingly Water-Soluble Drug Products, *Dissolution Tecnologies*, 2000.

OLIVEIRA, D. C. Desenvolvimento e Validação de Métodos para Avaliação de Cloridrato de Fexofenadina. Santa Maria, 2006, 113p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Maria,RS.

PADWICK, M.; ENDACOTT, J.; MATSON, C. *et al*. Absorption and metabolism of oral progesterone when administered twice daily. *Fertility and Sterility*, v. 46, n. 6, p. 402 – 407, 1986.

PAPADOPOULOU, V.; VALSAMI, G.; DOKOUMETZIDIS, A.; MACHERAS, P. Biopharmaceutics classification systems for new molecular entities (BCS-NMEs) and marketed drugs (BCS-MD): Theorical basis and practical examples. *International Journal of Pharmaceutics,* v. 361, p. 70 - 77, 2008.

PILLAI, V.; FASSIHI, R. Unconventional dissolution methodologies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 88, n. 9, p. 843 – 851, 1999.

PORTA, V.; YAMAMICHI, E.; STORPIRTIS, S. Avaliação biofarmacêutica *in vitro* de cápsulas de fluconazol. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 38, n. 3, p. 333 – 343, 2002.

PORTER, C. J. H.; CHARMAN, W. N. *In vitro* assessment of oral lipid based formulations. *Advanced Drug delivery Reviews*, v. 50, p. S127 – S147, 2001.
PORTER, C. J. H.; TREVASKIS, N. L.; CHARMAN, W.N. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nature Reviews/Drug Discovery*, v. 6, p. 231 -248, 2007.

PORTER, C. J. H.; POUTON, C. W.; CUINE, J. F. CHARMAN, W. N. Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 60, p. 673 – 691, 2008.

POUTON, C. W. Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and self-microemulsifying drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 11, suppl. 2, p. S93 – S98, 2000.

POUTON, C. W. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: Physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 29, p. 278 – 287, 2006.

PUCCI, V.; BUGAMELLI, F.; MANDRIOLI, R.; LUPPI, B.; RAGGI, M. A., Determination of progesterone in commercial formulations and in non conventional

micellar systems, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30, p. 1549-1559, 2003.

_____. O sistema reprodutor. In: RANG, H. P,; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R.J. Farmacologia. 6ªEd., Rio de Janeiro: Elsevier Editora LTDA, 2007, Cap. 30, p. 445 – 460.

RANGEL-YAGUI, C. O. R.; PESSOA Jr, A.; TAVARES, L. C. Micellar solubilization of drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences,* v. 8, n. 2, p. 147 – 163, 2005.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, p. 771 - 780, 2004.

RODRIGUES, P. O.; SILVA, M. A. S. Avaliação in vitro de medicamentos de liberação prolongada: aplicação de métodos estatísticos, modelos dependents e independents de análise. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm*., v.34, n. 1, p. 13 – 23, 2005.

ROHRS, B. R. Dissolution Method Development for Poorly Soluble Compounds. *Dissolution Technologies*, 2001.

ROSA, T. C. C. Dissolução Intrínseca de Hidroclorotiazida de Diferentes Granulometrias e sua Relação com a Dissolução do Ativo em Comprimidos. Rio de Janeiro, 2005, 81p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

ROSSI, R. C.; DIAS, C. L.; DONATO, E. M.; MARTINS, L. A.; BERGOLD, A. M.; FROEHLICH, P. E. Development and validation of dissolution test for ritonavir soft gelatin capsules based on in vivo data. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 338, p. 119 – 124, 2007.

RUBAS, W.; JEZYK, N.; GRASS, G. M. Comparison of the Permeability Characteristics of a Human Colonic Epithelial (Caco-2) Cell Line to Colon of Rabbit, Monkey, and Dog Intestine and Human Drug Absorption. *Pharmaceutical Research*, v. 10, n. 1, p. 113 – 118, 1993.

SCHOT, H.; KWAN, L. C.; FELDMAN, S. The role of surfactants in the release of very slightly soluble drugs from tablets. *J. Pharm. Sci*., v. 71, n. 9, p. 1038 – 1045, 1982.

SERRA, C. H. R.; STORPIRTIS, S.; Comparação de perfis de dissolução da cefalexina através de estudos de cinética e eficiência de dissolução (ED%), *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, n. 1 p. 79 - 88, 2007.

SHAH, V. P.; KONECNY, J. J.; EVERETT, R. L.; McCULLOUGH, B.; NOORIZADDEH, A. C.; SKELLY, J. P. *In Vitro* Dissolution Profile of Water-Insoluble Drug Dosage Forms in the Presence of Surfactants. *Pharmaceutical Research*, v. 6, n. 7, 612 – 618, 1989.

SHAH, V. P.; NOORY, A..; NOORY, C.; McCULLOUGH, B.; CLARKE, S.; EVERETT, R.; NAVIASKY, N.; SRINIVASAN, B. N.; FORTMAN, D.; SKELLY, J. P. *In vitro* dissolution of sparingly water-soluble drug dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 125, p. 99 – 106, 1995.

SHAH, V.P. The role of dissolution testing in the regulation of pharmaceuticals: The FDA perspective. In: DRESSMAN, J.; KRAMER, J. Pharmaceutical Dissolution Testing. Boca Raton: Editora Taylor & Francis Group, 2005, Cap. 4, p. 81 – 96.

SIEWERT, M.; DRESSMAN, J.; BROWN, C. SHAH, V. FIP/AAPS Guidelines for Dissolution/In Vitro Realease Testing of Novel/Special Dosage Forms. Dissolution *Technologies*, 2003.

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

SIRISUTH, N.; EDDINGTON, N. In vitro – In vivo Correlation: Definitions and Regulatory Guidance. *International Journal of Generic Drugs*. Disponível em: www.locumusa.com. Acessado em: Janeiro de 2010.

SKOUG, J. W.; HALSTEAD, G. W.; THEIS, D. L.; FREEMAN, J. E.; FAGAM, D. T.; ROHRS, B. R. Roteiro para Desenvolvimento e Validação do Teste de Dissolução em Formas Farmacêuticas Sólidas para Uso Oral. *Pharmaceutical Technology*, p. 34 – 43, 1997.

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

TAVANIOTOU, A.; SMITZ, J.; BOURGAIN, C.; DEVROEY, P., Comparison between different routs of progesterone administration as luteal phase support in infertility treatments, *Human Reproduction Update*, v. 6, n. 2, p. 139-148, 2000.

THE BRITISH PHARMACOPOEIA - BP2000. The British Pharmacopoeia Comission, 2000, CD-Rom.

THE JAPANESE PHARMACOPEIA – JP2006. Tokyo: the Ministry of Health, Labour and Welfare, 2006, 15th ed. 1800p. Available at http://jpdb.nihs.go.jp/jp15e/jp15.pdf

THE MERCK INDEX: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Fourteenth Ediction,. New Jersey: MERCK & CO, p. 7777, 2006.

TOZER, T. N.; ROWLAND, M. Dose Extravascular e Absorção Sistêmica. In:_____ Introdução à Farmacocinética e à Farmacodinâmica: As bases Quantitativas da Terapia Farmacológica, Porto Alegre: Editora Artmed, 2009, Cap. 6, p. 117 – 148.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. 31. Ed. Rockville: U.S.P. Convention, 2008

UNITED STATES PHARMACOPEIA. 31. Ed. Rockville: U.S.P. Convention, 2008a. Reagents > Solutions > Buffer Solutions

UNITED STATES PHARMACOPEIA. 31. Ed. Rockville: U.S.P. Convention, 2008b. Cap. 1092. The Dissolution Procedure: Development and Validation.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. 31. Ed. Rockville: U.S.P. Convention, 2008c. Cap. 711. Dissolution.

VALENTA, C.; NOWAK, M.; HADGRAFT, J. Influence of phloretin and 6-ketocholestanol on the permeation of progesterone through porcine skin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 217, p. 79 – 86, 2001.

VOGT, M.; KUNATH, K.; DRESSMAN, J. B. Dissolution improvement of four poorly water soluble drugs by cogrinding with commonly used excipients. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 68, p. 330 – 337, 2008.

WELLS, J. Pré-formulação farmacêutica. In: AULTON, M.E. Delineamento de Formas Farmacêuticas, 2ª edição, Editora Artmed, Porto Alegre, Cap. 8, p. 125 – 148, 2005.

WHITEHEAD, M. I.; TOWNSEND, P. T.; GILL, D. K.; COLLINS, W. P.; CAMPBELL, S. Absorption and metabolismo f oral progesterone. *British Medical Journal*, 1980.

WILSON, C. G.; KELLY, K. Gastrointestinal Transit and Drug Absorption. In: DRESSMAN, J.; KRAMER, J. Pharmaceutical Dissolution Testing. Boca Raton: Editora Taylor & Francis Group, 2005, Cap. 5, p. 97 – 125.

YU, L. X.; CARLIN, A. S.; AMIDON, G. L.; HUSSAIM, A. S. Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 270, p. 221 – 227, 2004.

YUKSEL, N.; KANIK, A. E.; BAYKARA, T. Comparison of *in vitro* dissolution profiles by ANOVA-based, model-dependent and –independent methods. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 209, p. 57 – 67, 2000.

ZHAO, F.; MALAYEV, V.; RAO, V.; HUSSAIN, M. Effect of Sodium Lauryl Sulfate in Dissolution Media on Dissolution of Hard Gelatin Capsule Shells. *Pharmaceutical Research*, v. 21, n. 1, p. 144 – 148, 2004.

Apêndice A

Análise visual do Perfil de Dissolução do Produto A.

Foto 1

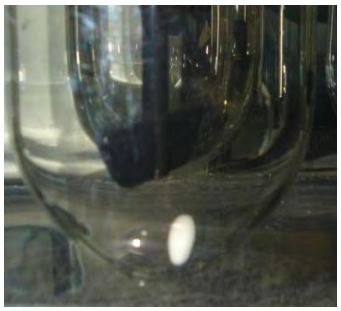


Foto 2

Foto 3

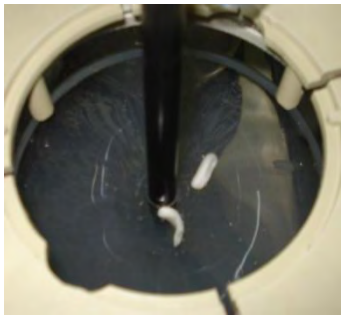


Foto 4

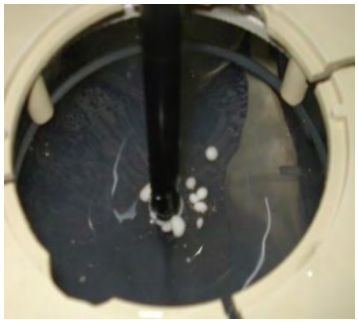


Foto 5

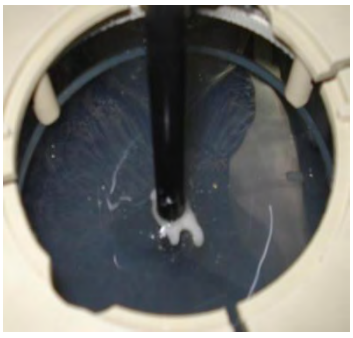


Foto 6

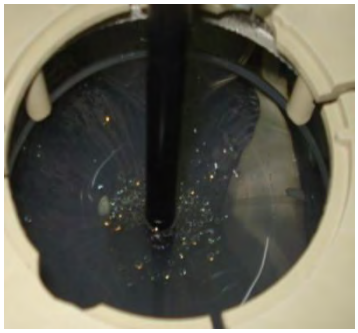


Foto 7

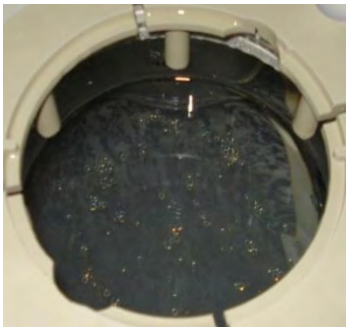


Foto 8

Legenda do Apêndice A:

Foto 1: Visão superior da cuba demostrando a ausência de espuma no início do teste de dissolução.

Foto 2: Visão frontal da cuba demostrando a maior densidade da forma farmacêutica (cápsula) em relação ao meio de dissolução e, por isso, mantendo-se no fundo da cuba. Tal comportamento evitou o uso de âncoras.

Foto 3: Visão frontal da cuba demostrando a desintegração (rompimento do invólucro e dispersão do conteúdo oleoso) da cápsula com aproximadamente 15 – 20 minutos do teste.

Foto 4: Visão superior da cuba demonstrando a flutuação do conteúdo da cápsula (oleoso) ao redor do eixo do dispositivo pá após o rompimento do invólucro.

Foto 5: Visão superior da cuba demonstrando a alteração do conteúdo da cápsula após 2 horas de teste.

Foto 6: Visão superior da cuba demonstrando a alteração do conteúdo da cápsula após 3 horas de teste. O conteúdo esbranquiçado vai se tornando translúcido.

Foto 7: Visão superior da cuba demonstrando a alteração do conteúdo da cápsula após 4 horas de teste. O conteúdo esbranquiçado torna-se translúcido indicando que 80% do fármaco encontra-se em solução (dissolvido). Dado comprovado pelo método de quantificação.

Foto 8: Visão superior da cuba demonstrando a dispersão das gotículas de óleo presentes na formulação avaliada. O fármaco encontra-se, praticamente, 100% dissolvido.

Apêndice B

Análise visual do Perfil de Dissolução do Produto B.

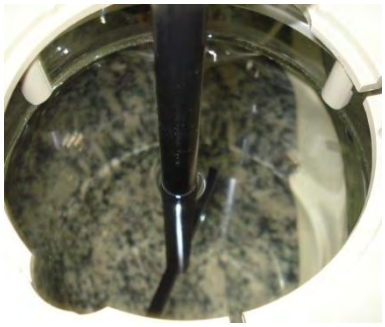


Foto 1

Foto 2

Foto 3

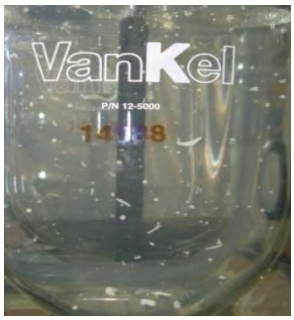


Foto 4

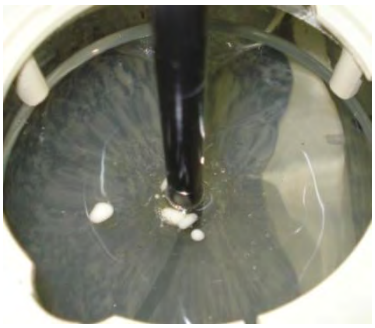


Foto 5

Foto 6

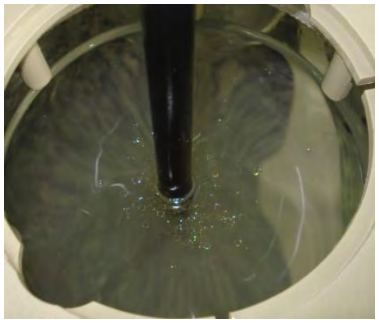


Foto 7

Foto 8

Legenda do Apêndice B:

Foto 1: Visão superior da cuba demostrando a ausência de espuma no início do teste de dissolução.

Foto 2: Visão frontal da cuba demostrando a maior densidade da forma farmacêutica (cápsula) em relação ao meio de dissolução e, por isso, mantendo-se no fundo da cuba. Tal comportamento evitou o uso de âncoras.

Foto 3: Visão frontal da cuba demostrando a desintegração (rompimento do invólucro e dispersão do conteúdo oleoso) da cápsula com menos de 15 minutos do teste.

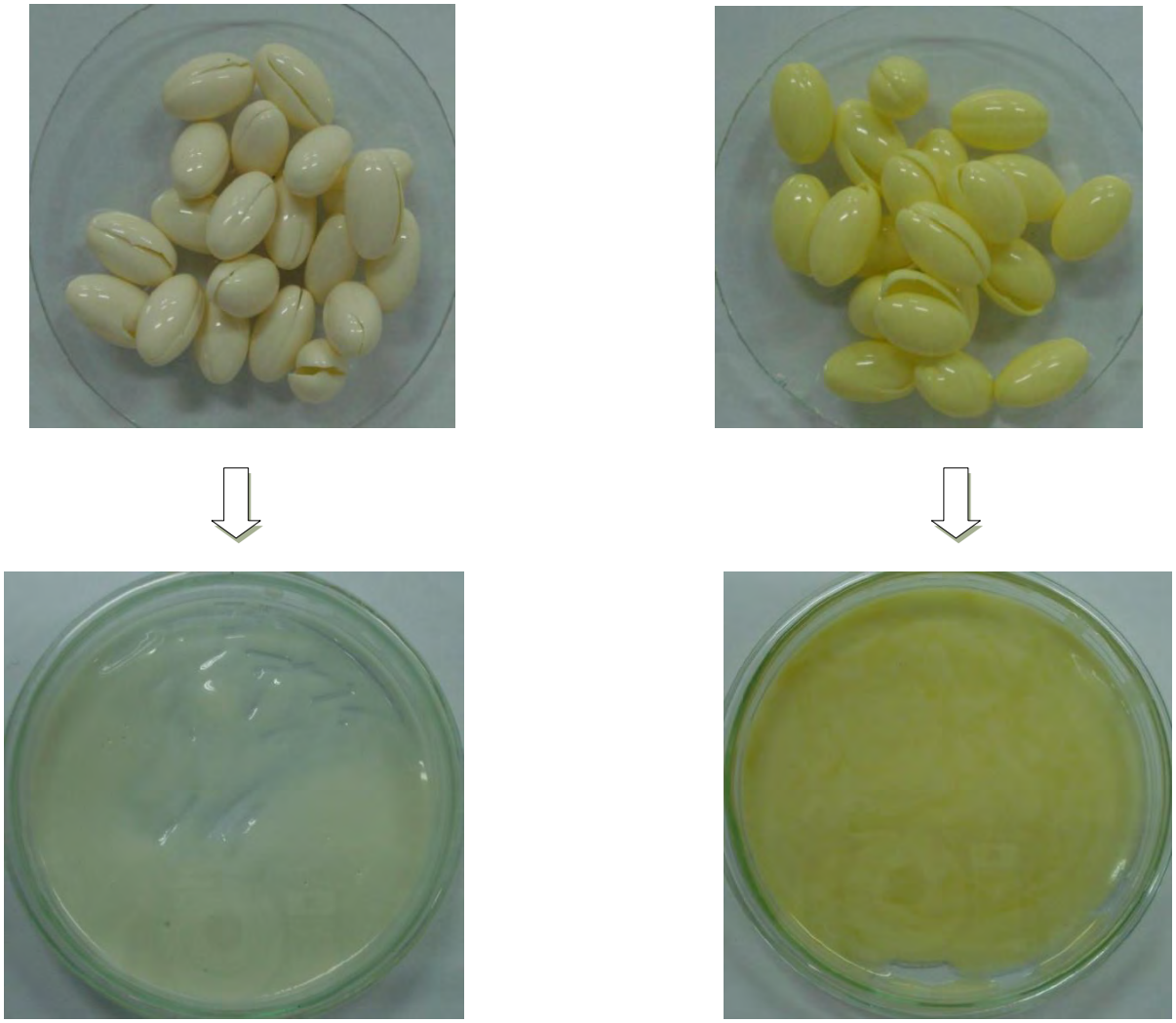
Foto 4: Visão frontal da cuba demonstrando que após a desintegração da cápsula ocorre a separação do conteúdo em pequenas partículas e, que posteriormente, permanecem boiando na superfície da cuba.

Foto 5: Visão superior da cuba demonstrando a alteração do conteúdo da cápsula após 1 horas de teste.

Foto 6: Visão superior da cuba demonstrando a alteração do conteúdo da cápsula após 2 horas de teste. O conteúdo esbranquiçado vai se tornando translúcido.

Foto 7: Visão superior da cuba demonstrando a alteração do conteúdo da cápsula após 3 horas de teste. O conteúdo esbranquiçado torna-se translúcido indicando que 80% do fármaco encontra-se em solução (dissolvido). Dado comprovado pelo método de quantificação.

Foto 8: Visão superior da cuba demonstrando a dispersão das gotículas de óleo presentes na formulação avaliada. O fármaco encontra-se, praticamente, 100% dissolvido.

Apêndice C

Análise visual dos invólucros e dos conteúdos dos produtos A (à esquerda) e B (à direita).