

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**EBASTINA: OBTENÇÃO DE NOVAS FORMAS  
CRISTALINAS E CARACTERIZAÇÃO NO ESTADO  
SÓLIDO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Karla Giacomelli Ribas**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2015**

# **EBASTINA: OBTENÇÃO DE NOVAS FORMAS CRISTALINAS E CARACTERIZAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO**

**Karla Giacomelli Ribas**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Desenvolvimento e Avaliação de Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Inês Horn Adams**  
**Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simone Gonçalves Cardoso**

**Santa Maria, RS, Brasil**  
**2015**

Giacomelli Ribas, Karla  
EBASTINA: OBTENÇÃO DE NOVAS FORMAS CRISTALINAS E  
CARACTERIZAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO / Karla Giacomelli Ribas.-  
2015.

78 p.; 30cm

Orientadora: Andréa Inês Horn Adams  
Coorientadora: Simone Gonçalves Cardoso  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2015

1. Farmácia 2. Hábito cristalino 3. Caracterização no  
estado sólido I. Horn Adams, Andréa Inês II. Gonçalves  
Cardoso, Simone III. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação  
de Mestrado**

**EBASTINA: OBTENÇÃO DE NOVAS FORMAS CRISTALINAS E  
CARACTERIZAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO**

elaborada por  
**Karla Giacomelli Ribas**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Andréa Inês Horn Adams**  
(Presidente/Orientadora)

**Scheila Rezende Schaffazick, Dr<sup>ª</sup>. (UFSM)**

**Lisiane Bajerski, Pós-Dr<sup>ª</sup>. (UNIPAMPA)**

Santa Maria, 04 de dezembro de 2015

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por manter firme minha esperança.

À minha mãe, Rejane, por acreditar e incentivar os meus sonhos. Obrigada pela compreensão, dedicação, carinho e amor.

À minha irmã, Karen, pela amizade, parceria, amor e incentivo.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por possibilitarem a realização deste trabalho.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Inês Horn Adams, pela confiança, apoio e incentivo. Obrigada por acreditar em mim.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simone Gonçalves Cardoso, pelas sugestões e contribuições para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Dr. Davi Fernando Back, do Departamento de Química da UFSM, pela realização das análises e discussão dos dados da difração de raios X.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sílvia Lucia Cuffini, da Universidade Federal de São Paulo, pela realização das análises de microscopia eletrônica de varredura.

Aos meus colegas de laboratório, pelo aprendizado, companheirismo e por tornarem meus dias melhores. Em especial à Priscila Rosa, pelos ensinamentos e auxílio constantes.

Ao pessoal do Laboratório de Controle de Qualidade da Universidade Federal de Santa Catarina. Em especial à Gislaine Kuminek e Tatiane Machado, por toda ajuda e aprendizado.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A ebastina (EBA) é um anti-histamínico de segunda geração com baixa solubilidade aquosa. É utilizada no tratamento de rinites alérgicas e urticária idiopática crônica. Para a administração de fármacos pela via oral existe uma preferência pelas formas farmacêuticas sólidas, e a eficácia terapêutica destes está diretamente associada às suas propriedades no estado sólido. Portanto, é muito importante controlar essas propriedades durante as várias fases do desenvolvimento de um medicamento. O propósito desse trabalho foi avaliar o impacto de diferentes hábitos cristalinos de EBA sobre as características físico-químicas do fármaco. Foram obtidos quatro novos hábitos cristalinos de EBA, ainda não reportados, por evaporação lenta, em diferentes solventes e temperaturas de evaporação. A matéria-prima de EBA e os cristais foram analisados por técnicas de caracterização no estado sólido, incluindo difração de raios X de pó e de monocristal, calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, microscopia eletrônica de varredura, velocidade de dissolução intrínseca e dissolução em pó. A estrutura cristalina da EBA foi determinada através da difração de raios X de pó e de monocristal. Os resultados da dissolução em pó indicaram diferença significativa entre os perfis de dissolução e entre a eficiência de dissolução dos cristais obtidos e da matéria-prima de EBA, sugerindo a possibilidade da influência de diferentes hábitos cristalinos na biodisponibilidade do fármaco.

**Palavras-chave:** Ebastina. Hábito cristalino. Dissolução em pó. Estado sólido. DRXM. VDI

## ABSTRACT

Ebastine (EBA) is a second-generation antihistamine with poor water solubility. It is used in the treatment of allergic rhinitis and chronic idiopathic urticaria. For oral administration of drugs, there is a preference for solid dosage forms and the therapeutic efficacy of them is directly related to their solid state. Therefore, it is very important to control these properties during the various phases of the development of drug products. The aim of this work was to evaluate the impact of different crystal habits of EBA on the physico-chemical characteristics of the drug. Four not reported new crystal habits of EBA were obtained through the slow solvent evaporation technique, using different solvents and temperatures. The EBA crystals and raw material were analyzed by solid state techniques including X-ray powder diffraction and single crystal diffraction, differential scanning calorimetry, thermogravimetry, Fourier transform infrared, scanning electron microscopy, intrinsic dissolution rate and powder dissolution. The crystalline structure of EBA was determined through single crystal X-ray diffraction. The powder dissolution results indicated significant difference between dissolution profiles and dissolution efficiency from EBA raw material and the new crystals obtained, suggesting the possible influence of distinct crystal habits on the bioavailability of this drug.

**Keywords:** Ebastine. Crystal habit. Powder dissolution. Solid state. SXRD. IDR

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da ebastina.....	19
Figura 2 - Metabolização da ebastina .....	20
Figura 3 - Possíveis formas sólidas de um fármaco .....	26
Figura 4 – Sistema de disco rotatório ( <i>Wood's apparatus</i> ): aparato desmontado (A); configuração do sistema no dissolutor (B).....	38
Figura 5 – Representação da estrutura molecular da EBA. Parâmetro de deslocamento anisotrópico com 50% de probabilidade ocupacional. ....	52
Figura 6 - Difractogramas da EBA MP (A), CR1 (B), CR2 (C), CR3 (D), e do CR4 (E) .....	54
Figura 7 – Curvas DSC referentes à EBA MP (A), CR1 (B), CR2 (C), CR3 (D) e CR4 (E) .....	55
Figura 8 - Curvas de TG referentes à EBA MP (A), CR1 (B), CR2 (C), CR3 (D) e CR4 (E) .....	56
Figura 9 - Espectros ATR-FTIR da EBA MP (A) e dos cristais CR1 (B) CR 2(C), CR3 (D) CR4 (E).....	57
Figura 10 - Fotomicrografias obtidas por MEV referentes aos cristais CR1 (A), CR2 (B), CR3 (C) e CR4 (D) .....	58
Figura 11 - Fotomicrografia obtida por MEV referente à EBA MP .....	59
Figura 12 - Espectro na região UV do meio de dissolução (- - -) e da EBA em meio de dissolução (—) .....	61
Figura 13 - Curva de calibração média da EBA .....	62
Figura 14 - Perfis de VDI dos diferentes cristais e da EBA MP em HCl 0,01 M .....	64
Figura 15 – Comparação dos perfis de dissolução em pó dos diferentes cristais e da EBA MP em HCl 0,01 M.....	65

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Definição de solubilidade encontrada em monografias oficiais .....	22
Quadro 2 - Classificação Biofarmacêutica proposta por Amidon e colaboradores .....	23
Quadro 3 – Sistemas cristalinos fundamentais .....	25
Quadro 4 – Transições entálpicas observadas por DSC .....	32
Quadro 5 – Dados cristalográficos e refinamento da estrutura da EBA .....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades térmicas e calorimétricas da EBA MP e dos cristais .....	55
Tabela 2 - Distribuição granulométrica da EBA MP e dos diferentes cristais .....	60
Tabela 3 – Dados da repetibilidade e da precisão entre dias para o método de dissolução intrínseca.....	62
Tabela 4 – Resultados VDI da EBA MP e dos cristais, em HCl 0,01 M .....	64
Tabela 5 – Eficiência de dissolução da EBA MP e dos cristais em HCl 0,01 M.....	65

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	15
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	15
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	15
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
<b>3.1 Rinite alérgica: aspectos gerais</b> .....	17
<b>3.2 Ebastina</b> .....	19
<b>3.3 Solubilidade e biodisponibilidade de fármacos</b> .....	21
<b>3.4 Sólidos cristalinos</b> .....	24
<b>3.5 Hábito cristalino</b> .....	27
<b>3.6 Cristalização</b> .....	28
<b>3.7 Métodos para caracterização no estado sólido</b> .....	29
3.7.1 Difração de raios X de monocristal (DRXM) e difração de raios X de pó (DRXP).....	29
3.7.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	31
3.7.3 Termogravimetria (TG) .....	33
3.7.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR)...	33
3.7.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	35
3.7.6 Dissolução.....	35
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	41
<b>4.1 Matéria-prima</b> .....	41
<b>4.2 Preparação de novas formas cristalizadas de EBA</b> .....	41
<b>4.3 Caracterização no estado sólido da EBA</b> .....	42
4.3.1 Difração de raios X de monocristal (DRXM) e difração de raios X de pó (DRXP).....	42
4.3.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TG).....	43
4.3.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR)...	43
4.3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	43
4.3.5 Análise do tamanho de partícula .....	44
4.3.6 Validação do método de dissolução intrínseca .....	44
4.3.6.1 Especificidade .....	45
4.3.6.2 Linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) .....	45
4.3.6.3 Exatidão / Precisão.....	45

4.3.6.4 Estabilidade no meio de dissolução .....	46
4.3.6.5 Interferência da filtração .....	47
4.3.7 Velocidade de dissolução intrínseca (VDI) .....	47
4.3.8 Dissolução em pó .....	48
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>5.1 Caracterização no estado sólido da EBA .....</b>	<b>51</b>
5.1.1 Difração de raios X de monocristal (DRXM) e difração de raios X de pó (DRXP).....	51
5.1.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TG) .	54
5.1.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR)...	56
5.1.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	57
5.1.5 Análise do tamanho de partícula .....	59
5.1.6 Validação do método de dissolução intrínseca .....	60
5.1.6.1 Especificidade .....	60
5.1.6.2 Linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) .....	61
5.1.6.3 Exatidão / Precisão.....	62
5.1.6.4 Estabilidade no meio de dissolução .....	63
5.1.6.5 Interferência da filtração .....	63
5.1.7 Velocidade de dissolução intrínseca (VDI) e dissolução em pó .....	63
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>68</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>70</b>



# 1 INTRODUÇÃO

A rinite alérgica é uma doença inflamatória da mucosa nasal caracterizada por sintomas como prurido nasal, obstrução do fluxo aéreo, espirros e congestão nasal, causados por reações mediadas pela imunoglobulina E (IgE) contra alérgenos inalados (GREINER et al., 2011; WHEATLEY; TOGIAS, 2015).

Os fármacos de escolha no tratamento de pacientes com doenças alérgicas, especialmente rinite e urticária, são os antagonistas dos receptores H<sub>1</sub>. Estes são classificados em primeira ou segunda geração e sua principal diferença reside nos efeitos distintos sobre o sistema nervoso central (GREINER et al., 2011; WHEATLEY; TOGIAS, 2015).

A ebastina é um anti-histamínico de segunda geração, não sedativo, potente e seletivo. É utilizada no tratamento de rinites alérgicas e urticária idiopática crônica (HURST; SPENCER, 2000; WEIDE et al., 2004; SASTRE, 2008; GREINER et al., 2011). No Brasil, encontra-se comercialmente disponível nas formas farmacêuticas de comprimidos revestidos de 10 mg, xarope de 1 mg/mL e cápsulas gelatinosas em associação com pseudoefedrina.

Para a administração de medicamentos pela via oral, existe uma preferência pelas formas farmacêuticas sólidas, em virtude da maior aceitação pelos pacientes, da confiabilidade das doses veiculadas e da maior estabilidade do medicamento (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; NEHA et al., 2012).

As propriedades físicas de fármacos no estado sólido são de grande interesse no desenvolvimento de produtos farmacêuticos, uma vez que elas podem ter impacto tanto na produção quanto no desempenho do produto acabado (MODI et al., 2013; ANDRIOLI et al., 2014; MAGHSOODI, 2015). Os sólidos cristalinos podem existir em diferentes formas, tais como polimorfos, solvatos, hidratos e co-cristais (LEE; ERDEMIR; MYERSON, 2011; PRADO; ROCHA 2015). Por sua vez, as diferentes formas cristalinas de um fármaco podem afetar sua solubilidade, biodisponibilidade e estabilidade química (FLORENCE; ATTWOOD, 2011; USP, 2011; SORRENTI et al., 2012).

Nesse contexto, esse trabalho teve como objetivo avaliar a influência do hábito cristalino e/ou do polimorfismo da ebastina sobre algumas de suas características físico-químicas. A ebastina foi escolhida por ser um fármaco da classe II, com características de solubilidade desfavoráveis à administração em formas farmacêuticas sólidas (MADDENS et al., 2011) e por apresentar evidências de polimorfismo (MPA, 2013).

**OBJETIVOS**

---

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Realizar a caracterização no estado sólido da ebastina, verificar a ocorrência de formas polimórficas distintas e avaliar o impacto de diferentes hábitos cristalinos em suas propriedades físico-químicas.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Obter diferentes cristais de ebastina a partir da recristalização por evaporação lenta em diferentes solventes;
- Realizar a caracterização físico-química da matéria-prima e das formas cristalinas obtidas por técnicas cristalográficas, térmicas, espectroscópicas e microscópicas;
- Avaliar o impacto de novos hábitos cristalinos nas características físico-químicas da ebastina;
- Avaliar a influência de novos hábitos cristalinos na dissolução em pó da ebastina;
- Validar metodologia analítica para avaliar a velocidade de dissolução intrínseca das diferentes formas cristalinas da ebastina.



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Rinite alérgica: aspectos gerais

Tem sido observado um aumento expressivo na incidência de doenças alérgicas em nível mundial e acredita-se que cerca de 500 milhões de pessoas sofram de rinite alérgica (RODRIGUES; SANTIS; ARROBAS, 2009).

A rinite alérgica é uma doença nasal sintomática, decorrente de um processo inflamatório mediado pela IgE após a exposição da mucosa nasal a um ou mais alérgenos (RODRIGUES; SANTIS; ARROBAS, 2009; CAMELO-NUNES; SOLÉ, 2010; GREINER et al., 2011; WHEATLEY; TOGIAS, 2015). Os sintomas incluem obstrução nasal, coriza, espirros e prurido nasal. Atualmente, o Grupo de Estudos sobre Rinite Alérgica e seu Impacto na Asma (ARIA, em inglês) em colaboração com a Organização Mundial de Saúde (OMS), propôs uma classificação com base na frequência dos sintomas em “intermitente” ou “persistente” e, de acordo com a intensidade dos sintomas, em “leve” ou “moderada/grave” (RODRIGUES; SANTIS; ARROBAS, 2009; BROZEK et al., 2010; CAMELO-NUNES; SOLÉ, 2010; GREINER et al., 2011; WHEATLEY; TOGIAS, 2015).

Apesar de, muitas vezes, ser vista como uma doença trivial e passageira, a rinite alérgica é capaz de alterar de forma intensa a qualidade de vida dos pacientes, assim como o seu desempenho, aprendizado e produtividade. É importante salientar que prejuízos físicos, psicológicos e sociais atingem não apenas os adultos, mas também crianças e adolescentes (RODRIGUES; SANTIS; ARROBAS, 2009; CAMELO-NUNES; SOLÉ, 2010; GREINER et al., 2011). Além disso, estudos epidemiológicos mostram que a rinite alérgica é parte de um processo inflamatório sistêmico e está associada a outros distúrbios inflamatórios das mucosas, incluindo conjuntivite alérgica, sinusite e asma (CAMELO-NUNES; SOLÉ, 2010; GREINER et al., 2011; WHEATLEY; TOGIAS, 2015). Aproximadamente 80% dos asmáticos têm rinite alérgica, sendo que a última promove o agravamento da asma concomitante, e cerca de 40% dos pacientes com rinite possuem asma (RODRIGUES; SANTIS; ARROBAS, 2009; CAMELO-NUNES; SOLÉ, 2010).

O guia do ARIA tem a qualidade de vida como foco principal quando considera a avaliação e o tratamento. Ele fornece uma abordagem pragmática para o tratamento da rinite alérgica e é constantemente avaliado e atualizado (RODRIGUES; SANTIS; ARROBAS, 2009; BROZEK et al., 2010; CAMELO-NUNES; GREINER et al., 2011; WHEATLEY; TOGIAS, 2015).

Opções de tratamento farmacológico incluem anti-histamínicos H<sub>1</sub> (anti H<sub>1</sub>), glicocorticóides intranasais e antagonistas do receptor do leucotrieno, sendo que os anti H<sub>1</sub> estão entre os medicamentos com o maior número de prescrições para o tratamento de doenças alérgicas, no mundo (RODRIGUES; SANTIS; ARROBAS, 2009; CAMELO-NUNES; SOLÉ, 2010; GREINER et al., 2011; WHEATLEY; TOGIAS, 2015). Apesar de apresentarem eficácia semelhante no tratamento da rinite alérgica, os anti H<sub>1</sub> diferem quanto à sua estrutura química, farmacologia clínica e potencial de toxicidade, sendo classificados como de primeira e segunda geração (LLANES; GRANT, 2000; RODRIGUES; SANTIS; ARROBAS, 2009; GREINER et al., 2011).

Os anti-histamínicos de primeira geração, quando comparados aos de segunda geração, apresentam uma relação risco-benefício desfavorável, uma vez que atravessam facilmente a barreira hematoencefálica (BHE), causando o seu principal efeito adverso, a sedação (LLANES; GRANT, 2000; RODRIGUES; SANTIS; ARROBAS, 2009; GREINER et al., 2011). Além disso, são rapidamente absorvidos e metabolizados, o que aumenta o número de administrações diárias. Entre os anti H<sub>1</sub> de primeira geração encontram-se a difenidramina, a tripelenamina, a clorfeniramina e a prometazina (BOUSQUET; VAN CAUWENBERGE; KHALTAEV, 2001; RODRIGUES; SANTIS; ARROBAS, 2009; CAMELO-NUNES; SOLÉ, 2010; GREINER et al., 2011; WHEATLEY; TOGIAS, 2015).

Os anti-histamínicos de segunda geração são os mais utilizados, pois dificilmente atravessam a BHE, diminuindo o seu efeito sedativo. Além disso, apresentam potência elevada, meia-vida prolongada e possuem menos efeitos colaterais que os anti-histamínicos clássicos devido a sua grande seletividade ao receptor H<sub>1</sub>. Entre os anti H<sub>1</sub> de segunda geração encontram-se a levocetirizina, a cetirizina, a desloratadina, a loratadina, a rupatadina, a carebastina e a ebastina (LLANES; GRANT, 2000; RODRIGUES; SANTIS; ARROBAS, 2009; GREINER et al., 2011).

### 3.2 Ebastina

A ebastina (Figura 1) é um anti-histamínico de segunda geração, quimicamente descrito como 1-[4-(1,1-dimetiletil)fenil]-4-[4-(difenilmetoxi)-1-piperidinil]-1-butanona. Apresenta-se como pó branco, cristalino, com ponto de fusão próximo de 86°C; é insolúvel em água, levemente solúvel em metanol e muito solúvel em diclorometano (BP, 2010). De acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), a ebastina pertence à classe II (MADDENS et al., 2011), ou seja, é um fármaco com baixa solubilidade e alta permeabilidade. O fármaco atua como antagonista H<sub>1</sub> potente e seletivo, não provocando sedação e apresentando ações anticolinérgicas e antisserotonérgicas insignificantes (HURST; SPENCER, 2000; LLUPPIA; GRAS; LENNAS, 2003; WEIDE et al., 2004; SASTRE, 2008; GREINER et al., 2011).

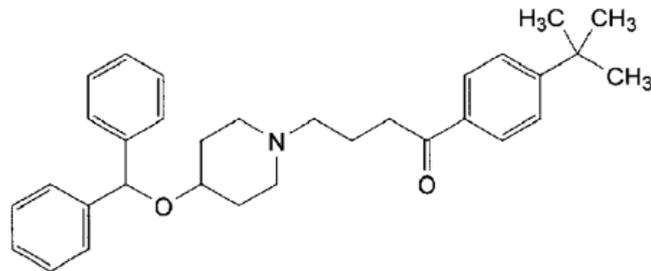


Figura 1 – Estrutura química da ebastina

É indicada para o tratamento dos sintomas de rinites alérgicas, urticárias crônicas e, em alguns países, para o alívio de picadas de mosquitos ou dermatites atópicas (HURST; SPENCER, 2000; WEIDE et al., 2004; SASTRE, 2008; GREINER et al., 2011). Sofre metabolização no fígado, e seus metabólitos primários identificados em humanos são a hidroxiebastina e a desalquilebastina, sendo que a hidroxiebastina é posteriormente metabolizada a carebastina, seu metabólito ativo (Figura 2) (HASHIZUME et al., 2002).

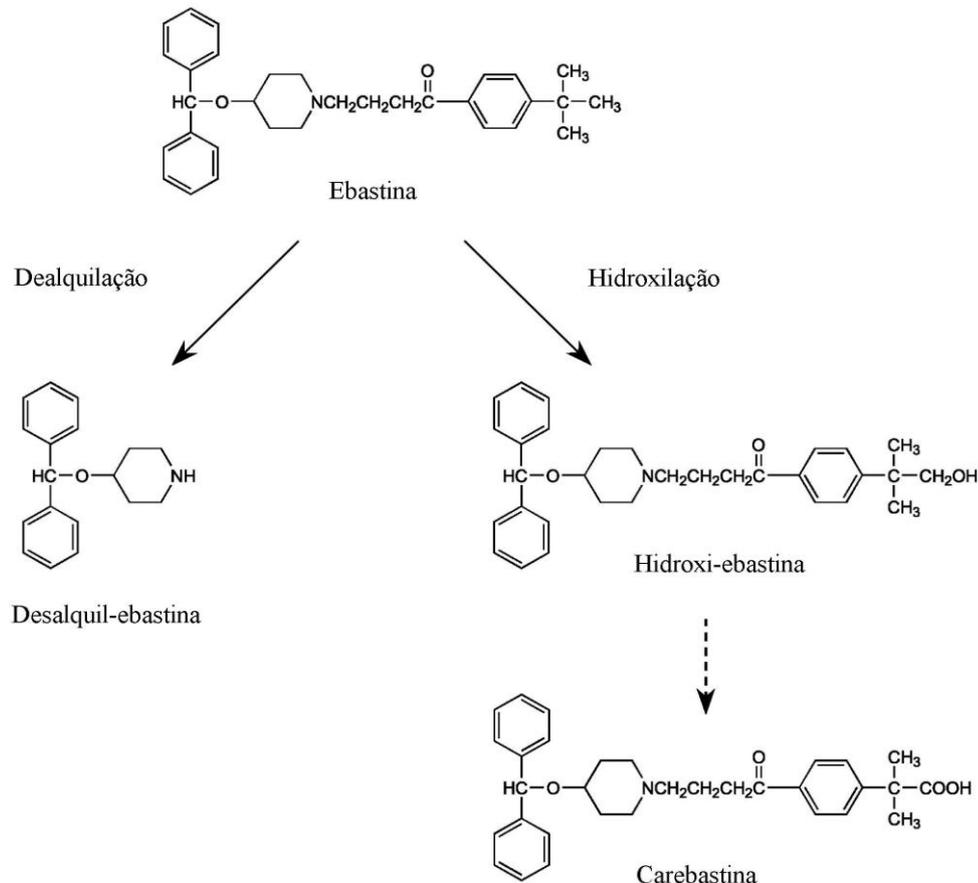


Figura 2 - Metabolização da ebastina (HASHIZUME et al., 2002)

A dose terapêutica usual para adultos é de 10 a 20 mg uma vez ao dia, com início de ação entre 1 e 3 horas (SASTRE, 2008).

Estudos farmacocinéticos demonstram que com apenas uma administração diária de 10 mg de ebastina, a carebastina atinge sua concentração máxima entre 2,6 a 5,7 horas e apresenta meia-vida de 10,3 a 19 horas. Encontra-se fortemente ligada às proteínas plasmáticas (> 95%) e cerca de 70% dos seus metabólitos conjugados são excretados pela urina (YAMAGUCHI et al., 1994; SASTRE, 2008). A farmacocinética da ebastina não é afetada pela ingestão de alimentos (YAMAGUCHI et al., 1994; SASTRE, 2008), nem pela idade do paciente (ROHATAGI et al., 2001). Estudos farmacodinâmicos têm mostrado alta atividade da ebastina após 24 horas de administração do fármaco (HURST; SPENCER, 2000; SIMONS, 2002).

Uma vez que a ebastina pertence à classe II do SCB e está disponível em formas farmacêuticas de uso oral, presume-se que algumas estratégias tenham sido

usadas para garantir sua biodisponibilidade. Nesse contexto, o uso de diluentes como o amido, a lactose e a celulose microcristalina, excipientes dos comprimidos, pode favorecer a dissolução. A lactose é um excipiente hidrossolúvel e favorece o processo de dissolução (GIL, 2007). Já a celulose microcristalina, o amido e a croscarmelose sódica são usadas como desintegrantes (ROWE, 2006). Para as cápsulas, além dos excipientes já citados faz-se uso do solubilizante 8-polioxilestearato. Já na solução oral, utiliza-se o solubilizante glicerina polietilenoglicol oxiestearato (ROWE, 2006).

Evidências de polimorfismo da ebastina foram divulgadas em documento emitido pela *Läkemedelsverket Medical Products Agency* (MPA, 2013). O polimorfismo tornou-se uma grande preocupação para a indústria farmacêutica, no que diz respeito à estabilidade e ao desenvolvimento de medicamentos, uma vez que diferentes estruturas cristalinas significam diferentes propriedades físico-químicas, como ponto de fusão, dureza, densidade e solubilidade, que podem afetar a velocidade de dissolução e a biodisponibilidade do fármaco (CUFFINI; PITALUGA; TOMBARI, 2009; LEE; EDERMIR; MYERSON, 2011; BERNARDI et al., 2013).

### **3.3 Solubilidade e biodisponibilidade de fármacos**

A solubilidade é uma propriedade intrínseca de cada substância, sendo um parâmetro termodinâmico definido como a quantidade máxima de soluto que se dissolve em um determinado solvente ou solução à temperatura e pressão constantes (BUENO; RECH, 2009; ROSA; VILHENA, 2012; VARGAS; RAFFIN; LIMA e MOURA, 2012). A solubilidade depende de diversos fatores como: temperatura, solvente, pH, pressão, tamanho de partícula e polimorfismo (STEGEMANN et al., 2007; SAVJANI; GAJJAR; SAVJANI, 2012; KUMAR, et al., 2013).

Para descrever a solubilidade, as farmacopeias utilizam as definições baseadas no número de partes de solvente (mL) necessário para dissolver uma parte de massa do sólido (1 g), como mostra o Quadro 1.

<b>Definição de solubilidade</b>	<b>Partes de solvente para uma parte de soluto</b>
Muito solúvel	Menos de 1
Facilmente solúvel	De 1 a 10
Solúvel	De 10 a 30
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100
Pouco solúvel	De 100 a 1000
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10.000
Praticamente insolúvel	Mais de 10.000

Quadro 1 – Definição de solubilidade encontrada em compêndios oficiais (FB, 2010).

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB, Quadro 2) classifica os fármacos com relação a sua solubilidade e permeabilidade gastrintestinal (AMIDON et al., 1995). O SCB leva em consideração que a maioria dos fármacos administrados pela via oral é absorvida por um processo de difusão passiva através do intestino delgado, onde a extensão da absorção oral é extremamente influenciada pela solubilidade do composto nos fluidos biológicos e pela sua permeabilidade às membranas biológicas (AMIDON et al., 1995; LOFTSSON; BREWSTER; MÁSSON, 2004; KUMAR et al., 2013). De acordo com essa classificação, os fármacos da Classe I terão absorção superior a 90%. Fármacos da Classe II, por sua baixa solubilidade, não serão completamente absorvidos, ainda que sejam muito permeáveis. Fármacos da classe III têm alta solubilidade, mas devido à baixa permeabilidade, não conseguem atravessar as membranas do trato gastrintestinal em velocidade suficiente para que sejam absorvidos completamente. Por sua vez, fármacos da Classe IV são pouco solúveis e pouco permeáveis, de modo que sua absorção não é favorecida. (DRESSMAN; REPPAS, 2000; LOFTSSON; BREWSTER; MÁSSON, 2004; KUMAR et al., 2013).

Pelo exposto, estratégias que permitam aumentar a solubilidade dos fármacos das classes II (baixa solubilidade/alta permeabilidade) e IV (baixa solubilidade/baixa permeabilidade) podem contribuir para aumentar a sua biodisponibilidade, possibilitando sua administração por via oral (DRESSMAN; REPPAS, 2000).

<b>Classe</b>	<b>Solubilidade</b>	<b>Permeabilidade</b>
<b>I</b>	Alta	Alta
<b>II</b>	Baixa	Alta
<b>III</b>	Alta	Baixa
<b>IV</b>	Baixa	Baixa

Quadro 2 - Classificação Biofarmacêutica proposta por Amidon e colaboradores (1995)

Atualmente, mais de 40% dos fármacos pertencem às classes II e IV do SCB. Além disso, cerca de 70% dos fármacos desenvolvidos nos últimos anos apresentam baixa solubilidade aquosa (KAWABATA et al., 2011; WEYNA et al., 2012b; GUPTA; KESARLA; OMRI, 2013; MEHTA et al., 2014). Existem muitos problemas resultantes da baixa solubilidade no desenvolvimento de fármacos, uma vez que a solubilidade aquosa de um fármaco é crítica e determinante para a sua taxa de dissolução. Essa taxa deve ser significativamente maior que a taxa de trânsito intestinal para que a absorção seja maximizada. De modo semelhante, mesmo que a taxa de dissolução seja rápida, se a solubilidade em equilíbrio for baixa, a quantidade de fármaco disponível em solução para absorção não será suficiente para atingir sua dosagem efetiva em tempo acessível (SAVJANI; GAJJAR; SAVJANI, 2012; KUMAR; SINGH, 2013).

Diversos fatores físico-químicos controlam a taxa de dissolução dos fármacos. Entre eles, destacam-se a área superficial, o coeficiente de difusão, a quantidade de fármaco dissolvido e o volume de meio (HÖRTER; DRESSMAN, 2001). Mudança no hábito cristalino (KUMAR; SINGH, 2013), redução do tamanho de partícula (XIA et al.; 2010), auto-emulsificação (GUPTA; KESARLA; OMRI, 2013), modificação do pH (VARGAS; RAFFIN; LIMA e MOURA, 2012), complexação com ciclodextrinas (KHADKA et al., 2014), polimorfismo (LEE, 2014), e amorfização (GUPTA; KESARLA; OMRI, 2013) são consideradas estratégias efetivas na melhora dos perfis de dissolução de fármacos pouco solúveis em água, destacando-se a manipulação das propriedades do estado sólido dos fármacos (BLAGDEN; MATAS; YORK, 2007; MADDENS et al., 2011; WEYNA et al., 2012b; WILLIAMS et al., 2013; KUMAR et al., 2013; MEHTA et al., 2014).

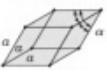
### 3.4 Sólidos cristalinos

O arranjo das moléculas na rede cristalina de um fármaco sólido determina suas propriedades físico-químicas (DATTA; GRANT, 2004; BACCHI, 2012). Portanto, é muito importante controlar a forma cristalina do fármaco durante as várias fases do desenvolvimento de um medicamento, uma vez que qualquer mudança de fase devido à interconversão polimórfica, dessolvatação de solvatos e formação de solvatos pode alterar a biodisponibilidade do medicamento (VIPPAGUNTA; BRITTAIN; GRANT, 2001; RODRÍGUEZ-SPONG et al., 2004; USP, 2011; DATTA; GRANT, 2004; BACCHI, 2012; ANDRIOLI et al., 2014).

Os sólidos podem ser classificados como cristalinos ou amorfos. Os sólidos amorfos possuem moléculas distribuídas aleatoriamente no espaço sem uma ordem tridimensional de longo alcance e suas interações com moléculas vizinhas, como pontes de hidrogênio, não apresentam regularidade em sua distribuição por toda a amostra. Por sua vez, os sólidos cristalinos apresentam arranjos regulares e periódicos das moléculas que se repetem nas três dimensões (VIPPAGUNTA; BRITTAIN; GRANT, 2001; RODRÍGUEZ-SPONG et al., 2004; DATTA; GRANT, 2004; BACCHI, 2012; ANDRIOLI et al., 2014). Quando este arranjo é perfeito e se estende por toda a amostra, sem interrupção, tem-se um monocristal. Entretanto, quando não há o arranjo periódico dos átomos por influência das condições externas no momento da cristalização, como temperatura, pressão e taxa de resfriamento, ocorre divisão do volume sólido em numerosas regiões de pequenos grãos monocristalinos, resultando nos sólidos policristalinos (DATTA; GRANT, 2004; LEE; MYERSON, 2006; CALLISTER, 2007; BYLINE et al., 2009; LEE; EDERMIR; MYERSON, 2011).

Os cristais são formados por unidades estruturais básicas, denominadas células unitárias, unidade que contém todas as características estruturais e elementos de simetria, e por translação reproduzem um padrão em todo espaço tridimensional. Suas dimensões são caracterizadas pelos seis parâmetros de rede: três eixos,  $a$ ,  $b$  e  $c$  e os três ângulos entre eles,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , que descrevem a forma e o tamanho da célula unitária (VIPPAGUNTA; BRITTAIN; GRANT, 2001; DATTA; GRANT, 2004). Cada célula unitária pode ser classificada em um dos sete sistemas

crystalinos: triclínico, monoclínico, ortorrômbico, tetragonal, hexagonal, trigonal e cúbico (Quadro 3). Cada um desses sistemas cristalinos tem um ou mais elementos de simetria que descrevem a simetria da célula unitária. Existem 32 combinações possíveis dos diferentes elementos de simetria, cada uma definida por classe cristalina. Bravais descobriu que algumas redes cristalinas são mais complexas, mas ainda estão em conformidade com os sete sistemas cristalinos. Portanto, existem 14 redes de Bravais que consistem em sete sistemas fundamentais e sete sistemas não fundamentais. A combinação das 32 classes cristalinas com as 14 redes de Bravais resulta nos 230 grupos espaciais (DATTA; GRANT, 2004; GIACOVAZZO, 2011).

Sistema Cristalino	Geometria da célula unitária	Parâmetros de rede
<b>Cúbico</b>		$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
<b>Hexagonal</b>		$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$
<b>Tetragonal</b>		$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
<b>Trigonal</b>		$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$
<b>Ortorrômbico</b>		$a \neq b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
<b>Monoclínico</b>		$a \neq b \neq c$ $\alpha = \gamma = 90^\circ \neq \beta$
<b>Triclínico</b>		$a \neq b \neq c$ $\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$

Quadro 3 – Sistemas cristalinos fundamentais (adaptado de GIACOVAZZO, 2011).

Os sólidos cristalinos podem existir como entidades moleculares individuais (unicomponentes) ou combinados (multicomponentes). Os cristais unicomponentes são formados por um único composto químico e podem apresentar polimorfismo, que é a capacidade de uma substância, no estado sólido, existir em duas ou mais estruturas cristalinas, apresentando diferentes arranjos e/ou conformações das

moléculas na rede cristalina. Já os cristais multicomponentes, apresentam dois ou mais compostos na sua estrutura cristalina. Estes englobam os solvatos, que são cristais de uma substância em que moléculas de solvente estão incorporadas ao retículo cristalino; sais, que são compostos cristalinos iônicos; e cocrystalos, sólidos cristalinos compostos por duas ou mais moléculas na mesma estrutura cristalina, como pode ser observado na Figura 3 (VIPAGUNTA; BRITTAIN; GRANT, 2001; SINGHAL; CURATOLO, 2004; BYLINE et al., 2009; LEE; EDERMIR; MYERSON, 2011).

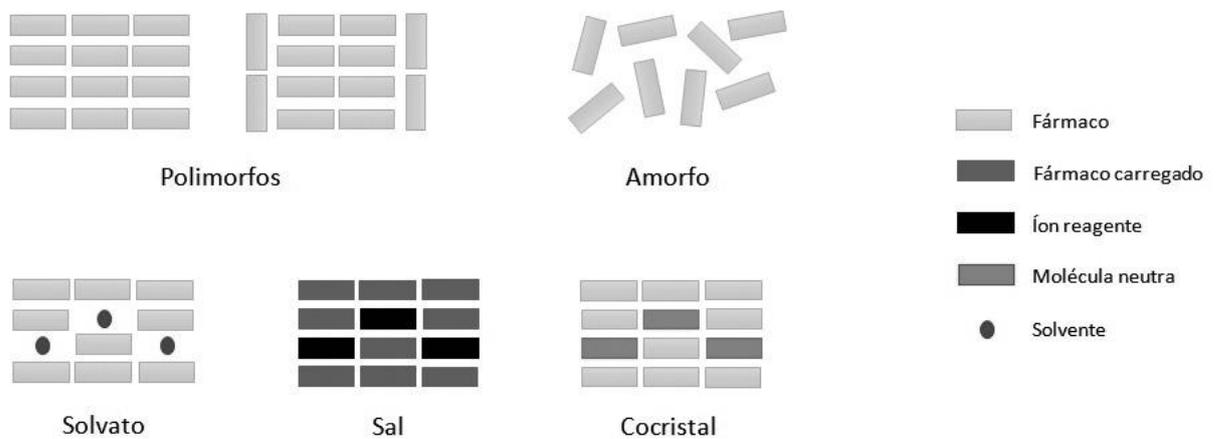


Figura 3 – Possíveis formas sólidas de um fármaco (adaptado de PRADO, 2012).

Frequentemente, solvatos e hidratos possuem solubilidade e taxa de dissolução intrínseca diferente das formas não solvatadas correspondentes. Porém, solvatos e hidratos não são polimorfos verdadeiros, assim como um sólido amorfo não é uma forma polimórfica, já que não apresenta ordem de longo alcance. Entretanto, o FDA (*Food and Drug Administration*) e o ICH (*International Conference on Harmonization*) reconhecem hidratos, solvatos e amorfos como polimorfos (ICH, 1999; FDA, 2007; FDA, 2013).

### 3.5 Hábito cristalino

O hábito cristalino pode ser definido como a descrição da aparência exterior, ou a morfologia do cristal (FLORENCE; ATTWOOD, 2011; MODI et al., 2013; MAGHSOODI, 2015). Diferentes processos de cristalização podem resultar em diferentes hábitos cristalinos, uma vez que fatores como o grau de saturação da solução, o tipo de solvente, a presença de impurezas, a agitação e a temperatura levam à inibição ou a diferentes velocidades de crescimento de determinadas faces do cristal durante a cristalização (KERALIYA et al., 2010; MODI et al., 2013; ANDRIOLI et al., 2014; MAGHSOODI, 2015).

O hábito cristalino pode influenciar o desempenho das formas farmacêuticas sólidas, uma vez que pode impactar e modificar características como fluidez, compressibilidade, molhabilidade, densidade, estabilidade e a dissolução (RASENACK; MÜLLER, 2002; BLAGDEN; MATAS; YORK, 2007; MODI et al., 2013; MAGHSOODI, 2015).

Existem exemplos na literatura da influência do hábito cristalino sobre a solubilidade e perfil de dissolução. Cristais de cloridrato de lomefloxacino em forma de agulhas apresentaram maior solubilidade e maior velocidade de dissolução quando comparados aos cristais em forma de bastonetes (THENGE et al., 2013). Cristais de tolbutamida em forma de placas apresentaram incremento da solubilidade e da velocidade de dissolução quando comparados aos cristais em formas cúbicas, prismáticas e de agulhas (KERALIYA et al., 2010). Cristais de piroxicam com hábito cristalino prismático aumentaram a taxa de dissolução, mas não a solubilidade, enquanto cristais com hábito cúbico, apesar de melhorarem a solubilidade, não alteraram de modo significativo as taxas de dissolução, quando comparados à matéria-prima de piroxicam (LYN et al., 2011).

Além de influenciar a biodisponibilidade, deve-se salientar a importância do hábito cristalino do ponto de vista tecnológico. Nesse sentido, pode haver influência na compressão de comprimidos, em virtude da orientação preferencial, que pode alterar a distribuição dos planos cristalinos sobre a superfície de uma amostra compactada. O hábito cristalino também pode influenciar as propriedades de fluidez do pó, já que essa depende de fatores como morfologia, tamanho, distribuição das

partículas e área superficial (RASENACK; MÜLLER 2002; DE ARAUJO et al., 2012; ANDRIOLI et al., 2014; MAGHSOODI, 2015).

Diferentes polimorfos de um fármaco podem apresentar diferentes hábitos cristalinos, ou não. A prednisona, por exemplo, possui dois polimorfos (formas I e V) que podem apresentar o mesmo formato de agulha, enquanto a forma II pode existir com hábito acicular ou prismático (DE ARAUJO et al., 2012).

De maneira geral, diferentes hábitos cristalinos afetam criticamente as propriedades de um fármaco. Portanto, a triagem das formas sólidas de um fármaco é essencial, uma vez que permite identificar a forma cristalina mais adequada para ser desenvolvida (SNIDER; ADDICKS; OWENS, 2003; BLAGDEN; MATAS; YORK, 2007; RODOMONTE, 2008; ANDRIOLI et al., 2014; MAGHSOODI, 2015).

### **3.6 Cristalização**

A cristalização é uma técnica extensamente utilizada pela indústria farmacêutica e impacta de maneira direta as propriedades do estado sólido, a estabilidade e o desempenho do produto (KERALIYA et al., 2010; MODI et al., 2013; ANDRIOLI et al., 2014; MAGHSOODI, 2015).

Existem diferentes formas para obtenção de cristais (AALTONEN et al., 2009). Por difusão de solvente, uma solução é colocada em um tubo e, em seguida, um solvente menos denso é cuidadosamente adicionado ao tubo, os solventes lentamente se difundem e os cristais são formados. Já por resfriamento lento, prepara-se uma solução saturada, cujo solvente foi aquecido até próximo da sua temperatura de ebulição, em seguida o tubo contendo essa solução deve ser colocado em um banho de calor na mesma temperatura, os cristais irão se formar após alguns dias. Além dessas, outras técnicas como evaporação lenta do solvente, difusão de vapor e sublimação podem ser utilizadas (AUGUSTIJNS; BREWSTER, 2007; SATTLER; FEINDT, 2010).

Entre as diversas formas de se obter cristais, a cristalização por evaporação lenta do solvente é usualmente utilizada na triagem de formas sólidas, na área farmacêutica, por diversas razões (KERALIYA et al., 2010). Primeiramente, um grande número de polimorfos e diferentes hábitos cristalinos podem ser descobertos

alterando-se as condições de cristalização, como: solvente, taxa de arrefecimento, velocidade de evaporação, temperatura final e concentração da solução inicial (MODI et al., 2013; MAGHSOODI, 2015). Além disso, os sólidos farmacêuticos são muitas vezes expostos a diferentes solventes durante o seu desenvolvimento, sendo assim a formação de solvatos ou hidratos de IFAs (insumos farmacêuticos ativos) deve ser avaliada sistematicamente, a fim de melhorar os processos de fabricação (RODOMONTE et al., 2008; ANDRIOLI et al., 2014). Por fim, monocristais de tamanhos suficientes para serem analisados são frequentemente obtidos por esta técnica. A cristalização por evaporação lenta fundamenta-se no preparo de soluções saturadas do fármaco seguidas de filtração ou não, para remoção de impurezas, e repouso até o crescimento dos cristais. A cristalização ocorre através da supersaturação da solução que é atingida pela evaporação do solvente (AUGUSTIJNS; BREWSTER, 2007; SATTLER; FEINDT, 2010).

### **3.7 Métodos para caracterização no estado sólido**

Desvios de qualidade decorrentes da presença de diferentes hábitos cristalinos e/ou polimorfismo podem impactar diretamente a qualidade de medicamentos (AITIPAMULA et al., 2012; DE ARAUJO et al., 2012; THENGE; GANESAN; TEKADE, 2013; ANDRIOLI et al., 2014). Portanto, é importante caracterizar o estado sólido dos fármacos, o que é atingido pelo emprego de uma série de técnicas de modo integrado. Essas técnicas podem ser classificadas em: técnicas térmicas, microscópicas, espectroscópicas, cristalográficas e técnicas para avaliação de desempenho.

#### **3.7.1 Difração de raios X de monocristal (DRXM) e difração de raios X de pó (DRXP)**

O fenômeno da difração ocorre a partir da interação entre um feixe de raios X incidente e os elétrons dos átomos presentes na amostra, a partir do qual se geram feixes de fótons difratados, que serão posteriormente detectados. Os raios X são

difratados pelos cristais apenas quando o ângulo entre o raio e o conjunto de planos no cristal satisfazem a Lei de Bragg (Equação 1). Quando um feixe de raios X incide sobre um cristal constituído de planos atômicos sucessivos, este é difratado gerando um ângulo característico. Portanto, a difração de raios X fundamenta-se na propriedade intrínseca de cada cristal em desviar, em um ângulo específico, a direção dos raios X emitidos sobre ele (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; GIACOVAZZO, 2011).

$$n\lambda = 2 d \sin\theta \quad (1)$$

onde:

$d$  é a distância entre planos do cristal

$\theta$  é o ângulo de difração dos raios X

$\lambda$  é o comprimento de onda dos raios X

$n$  é o número de comprimentos de onda utilizados.

Através da difração de raios X de monocristal determinam-se os parâmetros que caracterizam a rede cristalina. Tanto as interações intra e intermoleculares, quanto a conformação e o empacotamento das moléculas, podem ser analisadas logo que se tenha determinada a estrutura cristalina. É a técnica mais adequada para determinar a estrutura interna de um cristal, por isso é considerada a técnica de referência para o estudo de polimorfismo (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; DATTA; GRANT; 2004; GIACOVAZZO, 2011).

Os insumos farmacêuticos cristalinos utilizados pelas indústrias encontram-se, em sua maioria, na forma de pós, o que delimita o uso industrial da difração de monocristal às etapas de pesquisa e desenvolvimento, onde ocorre a produção de monocristais. Como alternativa, utiliza-se a difração de raios X de pó, técnica mais acessível para o uso em controle de qualidade, pois não há necessidade da produção de monocristal, nem do uso de grande quantidade de insumos (DATTA; GRANT; 2004; GIACOVAZZO, 2011).

Cada substância apresenta um difratograma característico, formado por um conjunto de picos, apresentando diferentes intensidades e posições. As posições dos picos são fixas e características para um mesmo composto, entretanto as

intensidades podem variar um pouco entre amostras diferentes, dependendo do modo de preparo e das condições instrumentais. Portanto, para a identificação de diferentes fases cristalinas, as posições dos picos são os dados que devem ser considerados (VIPAGUNTA; BRITTAIN; GRANT, 2001; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Cada estrutura cristalina apresenta uma composição química definida e gera um único conjunto de reflexões, que está associado a um padrão característico de difração de raios X (“impressão digital”). Já os sólidos amorfos não possuem organização definida, sendo aleatória a orientação das moléculas (VIPAGUNTA; BRITTAIN; GRANT, 2001). Na difração de pó é possível avaliar a cristalinidade de uma substância, e como átomos de um sólido amorfo não se apresentam em planos paralelos, as reflexões obtidas são muito difusas, não produzindo um padrão de difração de raios X definido (GIACOVAZZO et al., 2011).

### 3.7.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Define-se como Análise Térmica um conjunto de técnicas que permite medir alterações nas propriedades físicas ou químicas de uma substância, em função da temperatura ou tempo, enquanto a substância é submetida a um ciclo de temperatura pré-programado (RODRÍGUEZ-SPONG et al., 2004; RODRIGUES et al., 2005). As técnicas termoanalíticas são técnicas que requerem pouca quantidade de amostra e podem fornecer informações detalhadas sobre as novas entidades químicas, mesmo nos primeiros estágios de descoberta e desenvolvimento de medicamentos. Entre as mais utilizadas, encontra-se a calorimetria exploratória diferencial (CLAS; DALTON; HONCOCK, 1999; RODRIGUES et al., 2005; LAVOR et al., 2014).

A DSC (do inglês *Differential scanning calorimetry*) mede a diferença de energia entre a amostra e a substância de referência, as quais são submetidas a uma mesma razão de aquecimento, sendo registrada a quantidade de calor necessária para manter o aquecimento. Uma transformação térmica na amostra é indicada quando ocorre uma variação na quantidade de calor fornecida ao sistema (CLAS; DALTON; HONCOCK, 1999; RODRIGUES et al., 2005; LAVOR et al., 2014).

Como resultado dessa análise obtém-se um gráfico no qual está representado o fluxo de calor em função da temperatura ou tempo, a curva de DSC. Essa técnica fornece informações quantitativas sobre as alterações exotérmicas, endotérmicas e de aquecimento como função da temperatura e do tempo, tais como fusão, mudança de estrutura cristalina, pureza e temperatura de transição vítrea (CLAS; DALTON; HONCOCK, 1999; GIRON, 2002).

É a técnica analítica térmica de escolha, em virtude de sua capacidade de fornecer informações detalhadas sobre as propriedades físicas e energéticas de uma substância (Quadro 4). Além disso, apresenta vantagens como a obtenção de resultados de maneira rápida e precisa e a necessidade de pequenas quantidades de amostra (CLAS; DALTON; HONCOCK, 1999; VIPPAGUNTA; BRITTAİN; GRANT, 2001; LAVOR et al., 2014).

A DSC pode ser aplicada na identificação de diferentes polimorfos, uma vez que na avaliação de substâncias que apresentam diferentes formas cristalinas é possível determinar a mudança de estrutura cristalina e as temperaturas de fusão e dessolvatação, que aparecem como sinais endotérmicos e exotérmicos na curva de DSC (CLAS; DALTON; HONCOCK, 1999; GROOFF et al., 2013 LAVOR et al., 2014).

<b>Eventos endotérmicos</b>	<b>Eventos exotérmicos</b>
Fusão	Cristalização
Vaporização	Condensação
Sublimação	Solidificação
Dessorção	Adsorção
-	Quimiossorção
Dessolvatação	Solvatação
Decomposição	Decomposição
Redução	Oxidação
Degradação	Degradação
Transição vítrea	-

Quadro 4 - Transições entálpicas observadas por DSC (adaptado de CLAS; DALTON; HONCOCK, 1999).

### 3.7.3 Termogravimetria (TG)

Na análise termogravimétrica a variação de massa de uma amostra é determinada em função da temperatura e/ou do tempo, sob determinadas condições atmosféricas (MATOS; MACHADO, 2004; SABER; ATTIA; SALEM, 2014). As curvas obtidas fornecem informações relativas à composição e estabilidade térmica da amostra, dos produtos intermediários e do resíduo formado, ao longo de um intervalo definido de temperatura. As variações de massa resultam de transformações físicas (sublimação, evaporação, condensação) ou químicas (degradação, decomposição, oxidação) (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; MATOS; MACHADO, 2004; SABER; ATTIA; SALEM, 2014).

A combinação das técnicas de DSC e TG fornece uma melhor compreensão dos eventos térmicos, visto que a TG indica somente eventos térmicos relacionados a variações de massa, enquanto a DSC detecta eventos associados ou não à perda de massa (MATOS; MACHADO, 2004; LAVOR et al., 2014; SABER; ATTIA; SALEM, 2014).

### 3.7.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR)

A espectroscopia vibracional, com destaque para a de infravermelho e a Raman, analisa transições vibracionais a fim de obter informações a respeito da geometria molecular e da natureza das ligações químicas presentes nas moléculas, por isso são muito utilizadas na caracterização e identificação de amostras (RODRIGUES; GALZERANI, 2012). O espectro infravermelho de um composto químico é considerado uma de suas propriedades físico-químicas mais características (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007). Em virtude disso, essa técnica tem importante aplicação na identificação de polimorfos (BUGAY, 2001; O'SULLIVAN; GLENNON, 2005).

A radiação no infravermelho (IV) está restrita a espécies moleculares que apresentam pequena diferença de energia entre os diversos estados vibracionais ou rotacionais, uma vez que não possui energia suficiente para promover transições

eletrônicas (RODRIGUES; GALZERANI, 2012). Em virtude disso, para que uma molécula absorva radiação no IV é necessário que exista alteração do momento de dipolo elétrico como consequência de seu movimento vibracional ou rotacional, resultando em absorção da energia radiante. Ao entrar em contato com a amostra, a radiação gera absorções em comprimentos de onda específicos, que correspondem ao tipo de composto, ligação e interações presentes na amostra (ARÊAS; KAWANO; 1991).

A transformada de Fourier (FT) baseia-se do mesmo princípio da espectroscopia no IV tradicional, diferenciando-se apenas no domínio onde o espectro é mensurado. Essa técnica é uma função matemática que converte o domínio do tempo para o domínio da frequência. Entre as vantagens dessa técnica, destaca-se a melhoria da razão sinal-ruído numa dada resolução, a obtenção de espectros em poucos segundos, espectros com maior resolução e maior precisão nas medidas de número de onda, até  $0,01 \text{ cm}^{-1}$  (STUART, 2004).

O princípio da espectroscopia de Reflectância Total Atenuada (ATR) baseia-se no fato de que quando um feixe de radiação passa de um meio mais denso (cristal de ATR) para um meio menos denso (amostra), ocorre reflexão. A fração do feixe de luz incidente que é refletida aumenta conforme aumenta o ângulo de incidência, e quando excede um determinado ângulo crítico, a reflexão é completa. No ponto de reflexão, o feixe atua como se penetrasse a uma pequena distância dentro da amostra. Dessa forma, a técnica de ATR se caracteriza pelas múltiplas reflexões da radiação infravermelha que ocorrem no interior de cristais, interagindo apenas com a amostra que estiver superficialmente no cristal. A principal vantagem da técnica é que, por refletir a radiação, praticamente dispensa preparo da amostra, permitindo a análise de sólidos e de líquidos (STUART, 2004).

A ATR pode ser utilizada como alternativa à utilização de pastilha, que é o procedimento clássico de preparo de amostras para IV, objetivando evitar a ocorrência de transições de fase que pode ocorrer nessa técnica (STUART, 2004). Para o preparo da pastilha, o analito é misturado com haletos alcalinos (brometo de potássio, geralmente), a mistura é comprimida na forma de pastilha e em seguida analisada. A pressão pode induzir transições no estado sólido, que resultam em alterações no espectro, como o alargamento das bandas de absorção (BUGAY, 2001).

### 3.7.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia, óptica e eletrônica, possibilita a análise qualitativa e quantitativa de cristais através da observação da homogeneidade e determinação do tamanho e forma de partículas (BYRN; PFEIFFE; STOWELL, 1999). Informações acerca das formas dos cristais ou hábitos das estruturas cristalinas podem ser observadas por microscópio óptico (MO) ou eletrônico de varredura (MEV) (BOERRIGTER et al., 2002; RODRÍGUEZ-SPONG et al., 2004).

O MEV pode fornecer informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida. Além disso, permite a observação da aparência tridimensional da imagem das amostras, em virtude de sua grande profundidade de campo e possui um aumento máximo muitas vezes maior que o MO (RODRÍGUEZ-SPONG et al., 2004). Quando essa técnica é combinada com outros métodos analíticos, pode fornecer a diferenciação entre as formas cristalinas (DESAI; DHARWADKAR, 2009).

### 3.7.6 Dissolução

Para um fármaco ser absorvido pelo organismo, é necessário que ele se difunda nos líquidos do trato gastrintestinal e atravesse as membranas biológicas. A extensão da absorção depende da velocidade em que o processo de dissolução ocorre, portanto uma relação direta entre a dissolução e eficácia clínica é estabelecida (ABDOU, 1995; FERRAZ, 2004).

A dissolução é um ensaio preconizado pelas farmacopeias, que tem como objetivo avaliar a liberação do fármaco em formas farmacêuticas sólidas, semi-sólidas, pós e outros (PAULINO et al., 2013). Por isso, as pesquisas no ensaio de dissolução são importantes para garantir a qualidade lote-a-lote do produto, avaliar as etapas da produção e desenvolvimento de novas formulações e para proporcionar alguma estimativa sobre o desempenho *in vivo* do medicamento (YU et al., 2004).

Para conhecer como está acontecendo o processo de dissolução dos fármacos analisados, realiza-se o perfil de dissolução. Neste procedimento determina-se quantitativamente o fármaco dissolvido em intervalos de tempos diferentes. O perfil de dissolução fornece, assim, informações sobre a velocidade de dissolução, a porcentagem máxima dissolvida e, ainda, em que ponto mudanças significativas podem estar ocorrendo (FERRAZ; CONSIGLIERI; STORPIRTIS; 1998).

Diferentes parâmetros podem afetar a dissolução de medicamentos, como tamanho de partícula e sua distribuição, higroscopicidade, cristalinidade, amorfismo, polimorfismo, pKa, coeficiente de partição e solubilidade (ROSA, 2005). Diferentes formas cristalinas de um determinado fármaco podem diferir nos seus hábitos cristalinos e apresentar diferentes propriedades biofarmacêuticas (RASENACK; MÜLLER, 2002; FLORENCE; ATWOOD, 2011; LI DESTRI et al., 2013; THENGE; GANESAN; TEKADE, 2013).

Como variações na dissolução podem alterar a eficácia terapêutica de um medicamento, torna-se mais adequado avaliar a velocidade de dissolução intrínseca (VDI) ao invés da solubilidade do fármaco ao avaliar a influência do estado sólido no desenvolvimento farmacotécnico e no controle de qualidade (FILHO et al., 2013). Através dessa técnica, podem-se estudar diferenças na cristalização e efeitos do micronizado, que modificam e impactam as características de ordem ou desordem nas partículas. Dessa forma, a VDI permite o estudo de algumas propriedades físico-químicas do estado sólido, do polimorfismo e seu impacto na velocidade de dissolução sem interferência de características como hábito e tamanho de partícula, uma vez que a área superficial do disco permanece constante (HENDRIKSEN; WILLIAMS, 1991; YU et al., 2004; TENHO et al., 2007; ZAKERI-MILANI et al., 2009, SEHIC et al., 2010).

A VDI é definida como a taxa de dissolução de uma substância pura, normalmente sob condições *sink* (em meio de dissolução com concentração do fármaco equivalente a até 10% da concentração de saturação), onde parâmetros como área superficial, temperatura, velocidade de agitação e pH do meio de dissolução são mantidos constantes (VIEGAS et al., 2001; ROSA; VILHENA, 2012; DEZANI et al., 2013).

De acordo com os estudos de Noyes e Whitney, mantendo-se as condições *sink*, o gradiente de concentração é considerado constante e a taxa de dissolução intrínseca pode ser calculada através da equação 2:

$$j = V \frac{dC}{dt} \cdot A \quad (2)$$

Onde:

$j$  = taxa de dissolução intrínseca

$V$  = volume do meio de dissolução

$dC$  = variação da concentração

$A$  = área da superfície do disco

$t$  = tempo

O aparato da dissolução intrínseca descrito na USP é conhecido como *Wood's apparatus* e foi desenvolvido por John Wood em 1963 (Figura 4). A USP preconiza dois dispositivos para dissolução intrínseca: o disco rotatório e o disco estacionário, que retêm um compacto não desintegrável preparado utilizando-se uma matriz, um punção e uma base de superfície plana. Esse conjunto é colocado em uma prensa hidráulica e após compactar o material, retira-se a base e obtém-se um compacto com uma única face exposta, cuja área é previamente definida, normalmente 0,5 cm<sup>2</sup>. A matriz é encaixada na haste do dissolutor que irá girar em velocidade constante no meio de dissolução escolhido e mantido à temperatura constante (WOOD; SYARTO; LETTERMAN, 1965; VIEGAS et al., 2001; USP, 2011; ROSA; VILHENA, 2012; DEZANI et al., 2013).

As amostras devem ser analisadas por métodos de quantificação previamente validados, e os resultados expressos em miligramas por minuto por centímetro quadrado (mg/min/cm<sup>2</sup>) (BUENO; RECH, 2009; ROSA; VILHENA, 2012; DEZANI et al., 2013).

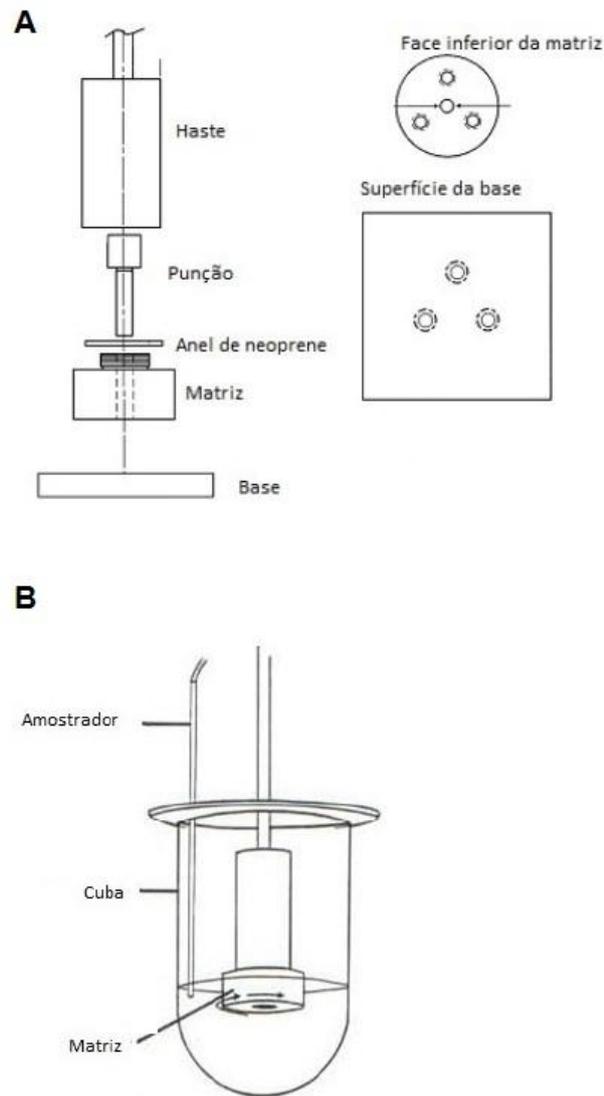


Figura 4 – Sistema de disco rotatório (*Wood's apparatus*): aparato desmontado (A); configuração do sistema no dissolutor (B)

Tendo em vista que o método de dissolução intrínseca minimiza, ou elimina efeitos do tamanho e formato da partícula (TENHO et al., 2007), para avaliar a influência que esses efeitos exercem no perfil de dissolução faz-se uso dos estudos de dissolução em pó.

As farmacopeias não apresentam método oficial para determinar a velocidade de dissolução de pós, entretanto esse ensaio pode ser realizado utilizando aparato II da USP (LÖTTER et al., 1983; AZARMI; ROA; LÖBENBERG, 2007; KERALIYA et al., 2010; LYN et al., 2011; THENGE; GANESAN; TEKADE, 2013). Alguns fatores

afetam as taxas de dissolução, esses podem estar relacionados às propriedades físico-químicas, como o efeito do tamanho da partícula e do estado cristalino. A velocidade de dissolução de um fármaco depende das propriedades do estado sólido, tais como polimorfismo, tamanho de partícula, cristalinidade, solvatação, estado de hidratação e área superficial (ABDOU; HANNA; MUHAMMAD et al., 2000).

Essa técnica consiste em adicionar determinada quantidade de fármaco diretamente ao meio de dissolução, mantendo a temperatura constante a 37°C, utilizando-se o aparato II da USP com velocidade constante (LÖTTER et al., 1983; KERALIYA et al., 2010; LYN et al., 2011; THENGE; GANESAN; TEKADE, 2013).

A eficiência de dissolução (ED) pode ser calculada através dos métodos dos trapézios, utilizando a equação 3:

$$ED = \frac{ASC_{(0-60)}}{ASC_{TR}} \times 100\% \quad (3)$$

A equação considera a razão entre a área sob a curva de dissolução no intervalo de tempo compreendido entre zero e 60 minutos ( $ASC_{0-60}$ ) e a área total do retângulo ( $ASC_{TR}$ ), definido pela ordenada (100% de dissolução) e pela abscissa (tempo igual a 60 minutos) (BOLTON, 1997).

A dissolução em pó permite avaliar a quantidade de fármaco dissolvido no tempo, que depende do tamanho e do número de faces cristalinas expostas ao meio de dissolução. Ou seja, possibilita a análise direta do impacto que essas propriedades exercem na dissolução de fármacos, as quais podem afetar a biodisponibilidade dos mesmos (KERALIYA et al., 2010; LYN et al., 2011; THENGE; GANESAN; TEKADE, 2013)



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Matéria-prima e reagentes

A matéria-prima de ebastina (EBA MP) foi obtida de Ideal Farma (Ribeirão Preto, Brasil), lote 0000000651, pureza de 99,9%. Todos os outros materiais e solventes utilizados apresentam grau analítico.

### 4.2 Preparação de novas formas cristalinas de ebastina

Foram preparadas soluções saturadas de EBA em diferentes concentrações (20, 25 e 30 mg/mL) e em diferentes solventes, tais como: acetonitrila, etanol e metanol. Os cristais foram obtidos pela técnica de evaporação lenta de solvente, em diferentes temperaturas (0-8, 21-23 e 40 °C). As soluções saturadas foram mantidas ao abrigo da luz, até que fosse evidenciada a formação de cristais.

Quatro hábitos cristalinos distintos de EBA, denominados como CR1, CR2, CR3 e CR4 foram obtidos conforme descrito a seguir:

CR1: solução saturada de EBA (30 mg/mL) em acetonitrila foi mantida à temperatura de 0-8°C.

CR2: solução saturada de EBA (30 mg/mL) em etanol foi mantida à temperatura de 40°C.

CR3: solução saturada de EBA (30 mg/mL) em metanol foi mantida à temperatura de 21-23°C.

CR4: solução saturada de EBA (30 mg/mL) em metanol foi mantida à temperatura de 40°C.

### 4.3 Caracterização no estado sólido da EBA

#### 4.3.1 Difração de raios X de monocristal (DRXM) e difração de raios X de pó (DRXP)

Os dados de raios X de monocristal de todos os cristais preparados e da EBA MP foram obtidos em difratômetro Bruker Kappa APEX II CCD (*Charge Coupled Device Detector*). Empregou-se a radiação monocromática de molibdênio,  $K\alpha$  de 0,71073 Å, obtida por meio de um monocromador de grafite, à temperatura ambiente.

As estruturas foram solucionadas empregando-se os métodos diretos através do programa SHELXS-97 (SHELDRICK, 1997). Os refinamentos foram realizados com o pacote de programas SHELXL-97 (SHELDRICK, 1997), através do método de matriz completa/mínimos quadrados dos fatores estruturais  $F^2$ , com os parâmetros de deslocamento térmico anisotrópico para todos os átomos não hidrogenóides.

Os átomos não hidrogenóides foram localizados através de sucessivas diferenças de Fourier e refinamentos com parâmetros anisotrópicos. Já os átomos de hidrogênio foram refinados isotropicamente na forma de grupos vinculados geometricamente aos respectivos átomos não hidrogenóides. As representações gráficas das estruturas cristalinas dos compostos foram elaboradas no programa *Diamond*.

Os padrões de difração de raios X de pó das amostras foram obtidos em difratômetro Bruker (*D8 ADVANCE*), equipado com ânodo de cobre, operando em corrente de 40 mA e voltagem de 45 kV. As amostras foram analisadas por meio de varredura angular a  $2\theta$  na faixa de 5° a 35°, com *step* angular de 0,053° e *step* de tempo de 20 segundos.

#### 4.3.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TG)

As curvas DSC das amostras foram obtidas em triplicata, em calorímetro Shimadzu DSC-60, com sensibilidade de  $\pm 0,1^\circ\text{C}$ . A faixa de temperatura analisada foi de 30 a  $100^\circ\text{C}$ , a uma taxa de aquecimento de  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  e sob atmosfera dinâmica de  $\text{N}_2$  de 100 mL/min. Amostras pesando aproximadamente 3,0 mg foram acondicionadas em cadinhos de alumínio (modelo 201-53090) hermeticamente fechados. A célula de DSC foi previamente calibrada com padrões de índio (ponto de fusão  $156,45^\circ\text{C}$ ) e zinco (ponto de fusão  $419,45^\circ\text{C}$ ).

As curvas TG foram obtidas em termobalança Shimadzu TGA-50. Aproximadamente 3 mg das amostras, acondicionados em cadinho de platina aberto, foram analisados na faixa de 25 a  $500^\circ\text{C}$ , à uma taxa de aquecimento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  e sob atmosfera dinâmica de  $\text{N}_2$  de 100 mL/min. O equipamento foi previamente calibrado com padrão de oxalato de cálcio, com pureza determinada de 99,99%. As curvas DSC e TG obtidas foram analisadas no *software* TA-60.

#### 4.3.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR)

Os espectros IV foram obtidos em equipamento Perkin Elmer Spectrum One FTIR, equipado com acessório ATR PIKE Technologies, na faixa espectral de 4000 a  $600\text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises por MEV foram realizadas utilizando equipamento FEI Inspect F50. Campo de emissão em alto vácuo ( $1,01\text{e-}6$  Torr), distância de trabalho de 11,1 mm, magnificação de  $7.10\text{ X}$  a  $1,4.10^3\text{ X}$  (1mm a  $50\text{ }\mu\text{m}$ ), voltagem de aceleração de 7,5 kV e detecção por elétrons secundários (ETD-SE). As amostras foram

previamente revestidas, a vácuo, com ouro (corrente de 20mA e *sputter time* de 90 segundos).

#### 4.3.5 Análise do tamanho de partícula

A distribuição de tamanho de partículas da EBA MP e dos diferentes cristais de EBA foi determinada por espalhamento de luz dinâmica em modo úmido, em equipamento Malvern Mastersizer 2000 – Hydro 2000 SM. As análises foram realizadas por meio de pesagem de, aproximadamente, 10 mg de cada amostra, que foi dispersa em um béquer de 25 mL contendo 10 mL de água. Foram utilizados 100 mL de água como meio dispersante e agitação de 2000 rpm.

#### 4.3.6 Validação do método de dissolução intrínseca

Para a determinação da VDI da EBA, usou-se método por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV), o qual foi validado obedecendo as normativas atuais (ICH, 2005; USP, 2011). Parâmetros como especificidade, linearidade, exatidão, precisão e estabilidade no meio de dissolução foram avaliados. Após testes preliminares, ácido clorídrico 0,01M (HCl 0,01M) foi escolhido como meio de dissolução. As leituras foram realizadas em 258 nm, comprimento de onda de máxima absorção da EBA no meio selecionado.

Objetivando-se garantir a condição *sink* durante os diferentes métodos de dissolução usados, inicialmente a solubilidade da EBA no meio de dissolução foi determinada. Para isso, um excesso de fármaco foi adicionado a 50 mL do meio de dissolução em triplicata, mantido a  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , sob proteção da luz e agitação constante. Após um período de equilíbrio de 2 horas, as soluções foram filtradas em membranas de nylon com tamanho de poro de  $0,45 \mu\text{m}$ , analisadas pelo método de espectrofotometria na região do UV e a concentração de EBA ( $\mu\text{g/mL}$ ) dissolvida no meio foi calculada.

#### 4.3.6.1 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através da análise em espectrofotômetro na região do UV (Shimadzu UV-1800) do meio de dissolução (HCl 0,01 M) entre 200 e 400 nm. Teve-se como objetivo identificar a presença de possíveis máximos de absorção do meio de dissolução no mesmo comprimento de onda de absorção máxima da EBA, o que impediria a sua quantificação.

#### 4.3.6.2 Linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

A linearidade do método proposto foi avaliada pelo preparo de três curvas padrão. Para a construção de cada curva, sete concentrações padrão de EBA (1; 2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20 e 25 µg/mL) foram preparadas a partir de solução estoque a 100 µg/mL, em HCl 0,01 M. As leituras foram realizadas a 258 nm. A linearidade foi avaliada pela análise da regressão linear, a qual foi calculada pelo método dos mínimos quadrados e pela análise da variância (ANOVA).

Também foram estimados os limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD), calculados a partir do desvio padrão da resposta ( $\sigma$ ) e do coeficiente angular (S) (Equações 3 e 4), obtidos através da equação da reta média.

$$LQ = (10 \sigma) / S \quad (4)$$

$$LD = (3,3 \sigma) / S \quad (5)$$

#### 4.3.6.3 Exatidão / Precisão

A exatidão do método foi avaliada pelo teste de recuperação de quantidades conhecidas de EBA adicionadas ao meio de dissolução. Alíquotas de uma solução padrão de 100 µg/mL foram adicionadas às cubas contendo meio de dissolução, até

um volume final de 250 mL, em triplicata. As concentrações finais obtidas foram de 12, 15 e 18 µg/mL, respectivamente. Estas soluções foram submetidas ao ensaio de dissolução utilizando-se aparato II da USP, com rotação de 75 rpm e meio de dissolução (HCl 0,01 M) a  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Depois de transcorrida 1 hora, alíquotas foram removidas e filtradas em membranas de nylon com poro de 0,45 µm. A seguir, as soluções foram analisadas por espectrofotometria, em 258 nm.

A precisão do método foi avaliada através da repetibilidade e da precisão intermediária (entre-dias). Alíquotas de uma solução padrão de 100 µg/mL foram adicionadas às cubas contendo meio de dissolução até um volume final de 250 mL, a fim de se obter uma concentração final de 15 µg/mL. Estas soluções foram submetidas ao ensaio de dissolução utilizando-se aparato II da USP, com rotação de 75 rpm e meio de dissolução (HCl 0,01 M) a  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Depois de transcorrida 1 hora, alíquotas foram removidas e filtradas em membranas de nylon com poro de 0,45 µm. A seguir, as soluções foram analisadas em espectrofotômetro na região do UV.

A repetibilidade foi avaliada através da análise de nove amostras, em um dia. A precisão intermediária foi determinada por meio da análise de três amostras, em três diferentes dias. As medidas foram realizadas em triplicata e expressas com desvio padrão relativo (DPR).

#### 4.3.6.4 Estabilidade no meio de dissolução

Soluções de EBA a 15 µg/mL, em meio de dissolução, mantido a  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , foram submetidas à agitação, por 1 hora. Após este período, as soluções foram protegidas da luz e mantidas à temperatura ambiente. Alíquotas destas soluções foram filtradas e avaliadas nos tempos zero e 24 horas, através de análise espectrofotométrica na região do UV.

#### 4.3.6.5 Interferência da filtração

Uma vez que as alíquotas removidas do meio eram filtradas antes da análise, em membranas de nylon com poro de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore, Bedford, Estados Unidos), avaliou-se a capacidade de retenção da amostra pelo filtro através da análise comparativa, em triplicata, de soluções de EBA filtradas e não filtradas, na concentração de 15  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 4.3.7 Velocidade de dissolução intrínseca (VDI)

Para avaliação da velocidade de dissolução intrínseca foi utilizado aparato de disco rotativo em dissolutor Pharma Test, de acordo com as especificações da Farmacopeia Americana (USP, 2011).

Um quantidade de aproximadamente 100 mg de cada uma das amostras (EBA MP, CR1, CR2, CR3 e CR4) foi comprimida em prensa hidráulica (Specac, Londres, Inglaterra) a 8.500 psi, por 1 min, em uma matriz contendo disco de 8 mm de diâmetro e área superficial de 0,5  $\text{cm}^2$ . O aparato contendo a pastilha comprimida foi, primeiramente, levado à estufa a 40°C por 15 minutos. Em seguida, as amostras, em triplicata, foram submetidas ao ensaio de dissolução intrínseca, com velocidade de rotação de 75 rpm, em 250 mL de HCl 0,01 M previamente desaerado, a uma temperatura de  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Foram retiradas alíquotas de 5 mL em intervalos pré-definidos de tempo (5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 min), com reposição imediata do mesmo volume de meio. As alíquotas removidas foram filtradas em membranas de nylon com poro de 0,45  $\mu\text{m}$ . A seguir, as soluções foram analisadas em espectrofotômetro na região do UV, em 258 nm e suas concentrações foram calculadas por comparação com solução padrão na concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$ .

O padrão foi preparado por meio de pesagem exata de cerca de 10,0 mg de fármaco em balão volumétrico de 500 mL. Em seguida foram adicionados 10 mL de metanol e o balão foi mantido no ultrassom por 15 minutos. Após este período o volume do balão foi completado com o meio de dissolução e foi realizada a leitura em espectrofotômetro, em 258 nm.

Após o término da VDI, os discos foram removidos, submetidos à secagem a 40°C e suas superfícies foram avaliadas por DSC, nas condições descritas no item 4.3.2. Com o objetivo de verificar a ocorrência de transição de fase, devido à pressão utilizada para o preparo da pastilha, foi realizada análise por DSC antes da VDI em pastilha preparada para esse fim. Análises por DSC também foram realizadas após a VDI, objetivando-se verificar a ocorrência de transição de fase por efeito do solvente.

Para calcular a VDI plotou-se um gráfico considerando a quantidade de fármaco dissolvido em função do tempo. Através da regressão linear dos pontos, obteve-se a equação da reta, cujo coeficiente angular representa a velocidade de dissolução em unidade de massa por minuto. Logo, determina-se a VDI pela razão entre o valor do coeficiente angular e a área superficial da pastilha (0,5 cm<sup>2</sup>).

A análise estatística dos dados para EBA MP, CR1, CR2, CR3 e CR4 foi realizada através de ANOVA e Tukey (GraphPad Prism 6<sup>®</sup>), em nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.3.8 Dissolução em pó

A dissolução em pó foi avaliada utilizando o aparato II da USP em dissolutor Pharma Test. Em virtude da ausência de especificações farmacopeicas para a realização desse teste, foram adotadas as condições citadas na literatura (LÖTTER et al., 1983; VAN TONDER et al., 2004; TSINMAN et al., 2009). A fim de atender a condição *sink*, exatamente 11,6 mg de cada amostra foram diretamente adicionados a 500 mL de HCl 0,01 M previamente desaerado e mantido à temperatura de  $37 \pm 0,5$  °C, com rotação de 100 rpm. Foram retiradas líquotas de 10 mL, com reposição imediata de mesmo volume de meio, em intervalos de tempo pré-definidos (3, 6, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 min), as quais foram filtradas em membranas de nylon com poro de 0,45 µm imediatamente antes das leituras por espectrofotometria na região do UV, em 258 nm.

O padrão foi preparado por meio de pesagem exata de cerca de 10,0 mg de fármaco em balão volumétrico de 500 mL. Em seguida foram adicionados 10 mL de

metanol e o balão foi mantido no ultrassom por 15 minutos. Após este período o volume do balão foi completado com o meio de dissolução e foi realizada a leitura em espectrofotômetro, em 258 nm.

A eficiência de dissolução (ED) foi calculada através do método dos trapézios (conforme equação 3, página 39) e a análise estatística dos dados para EBA MP, CR1, CR2, CR3 e CR4 foi realizada através de ANOVA e Tukey (GraphPad Prism 6<sup>®</sup>), no qual resultados significativos apresentam probabilidade menor do que 5% ( $p \leq 0,05$ )

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, a ideia desse estudo consistia em fazer um *screening* de polimorfos de EBA. Uma vez que, embora o MPA (2013) afirme a existência de polimorfos de EBA, até o momento não existem relatos de novas estruturas desse fármaco disponíveis na literatura. Entretanto, apesar de diferentes solventes, concentrações de fármaco e temperaturas empregados para a recristalização por evaporação lenta de solvente, nenhum polimorfo foi encontrado. Porém, monocristais de diferentes hábitos cristalinos foram obtidos, a partir da mesma estrutura interna. Desta forma, a caracterização físico-química da matéria-prima e dos monocristais de diferentes hábitos cristalinos por técnicas térmicas, microscópicas, espectroscópicas e cristalográficas, agregada a avaliação do impacto desses novos hábitos cristalinos nas características físico-químicas da EBA tornaram-se o enfoque desse trabalho.

Além disso, a obtenção de monocristais da EBA possibilitou a sua completa elucidação estrutural pela técnica de DRXM.

É importante salientar que não há nenhum estudo que englobe a caracterização no estado sólido da EBA aliada a sua completa elucidação estrutural. Assim como não há relatos do impacto que novos hábitos cristalinos poderiam ocasionar na dissolução desse fármaco.

### 5.1 Caracterização no estado sólido da EBA

#### 5.1.1 Difração de raios X de monocristal (DRXM) e difração de raios X de pó (DRXP)

A representação das elipsoides térmicas da unidade assimétrica da EBA é apresentada na Figura 5. Este composto cristaliza em um sistema monoclinico e grupo espacial P21/c. Todas as amostras analisadas (EBA MP, CR1, CR2, CR3 e

CR4) apresentaram a mesma estrutura molecular. Dados cristalográficos adicionais encontram-se resumidos no Quadro 5.

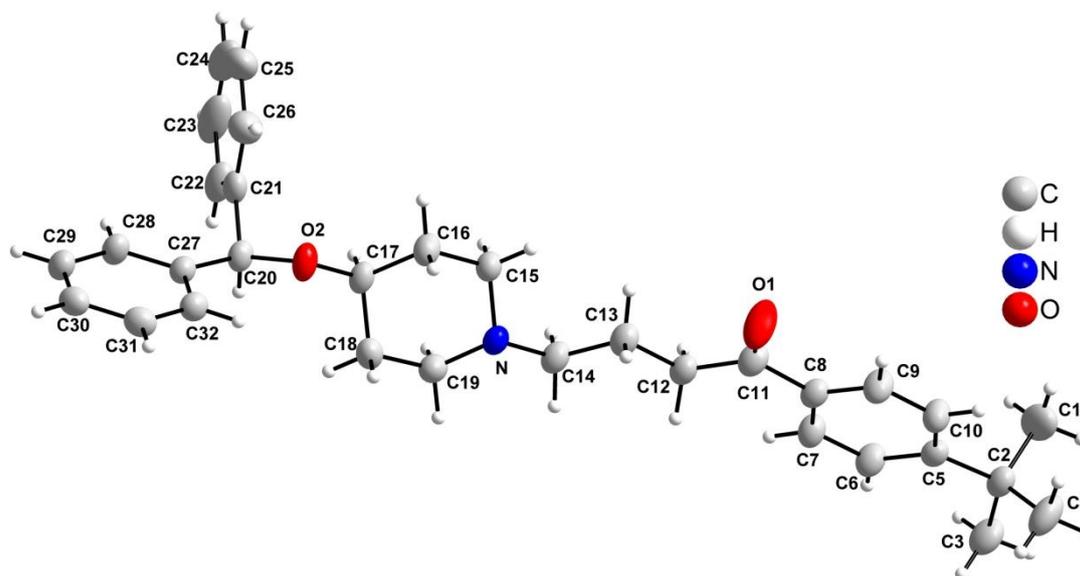


Figura 5 - Representação da estrutura molecular da EBA. Parâmetro de deslocamento anisotrópico com 50% de probabilidade ocupacional.

Quadro 5 - Dados cristalográficos e refinamento da estrutura da EBA

<b>Fórmula Empírica</b>	$C_{32}H_{39}NO_2$
<b>Peso Molecular</b>	469,64
<b>T (K)</b>	293(2) K
<b>Radiação, <math>\lambda</math> (Å)</b>	Mo K $\alpha$ ; 0,71073
<b>Sistema Cristalino, Grupo Espacial</b>	Monoclínico, P21/c
<b>a (Å)</b>	a = 16,6254 (6)
<b>b (Å)</b>	b = 10,9501 (5)
<b>c (Å)</b>	c = 16,6717 (7)
<b><math>\alpha</math> (°)</b>	90
<b><math>\beta</math> (°)</b>	113,655(2)
<b><math>\gamma</math> (°)</b>	90
<b>V (Å<sup>3</sup>)</b>	2780,1(2)
<b>Z, densidade calculada (g, cm<sup>-3</sup>)</b>	4, 1,112
<b>Coefficiente de Absorção (mm<sup>-1</sup>)</b>	0,069

<b>F (000)</b>	1016
<b>Tamanho do Cristal (mm)</b>	0,22 x 0,14 x 0,10
<b>Região de Varredura Angular <math>\theta</math> (°)</b>	1,39 - 27,12
<b>Região de Varredura dos índices</b>	-21<=h<=18
	-13<=k<=14
	-21<=l<=21
<b>Número de Reflexos Coletados</b>	37754
<b>Número Reflexos Independentes</b>	6138
<b>Integralidade da Medida</b>	99,8 %
<b>Correção de Absorção</b>	Numérico
<b>Dados/ Restrições/Parâmetros</b>	6138 / 0 / 317
<b>Goodness-of-fit on <math>F^2</math></b>	1,010
<b>Índice R final [<math>I &gt; 2\sigma(I)</math>]</b>	R1 = 0,0513, wR2 = 0,1264
<b>Índices R (todos os dados)</b>	R1 = 0,0960, wR2 = 0,16154
<b>Densidade residual</b>	0,302 a -0,362

Em relação à estrutura cristalina apresentada por Cheng, Zhou e Yang (2005) e à estrutura cristalina apresentada por Sharma, Prasher e Tiwari (2015), os parâmetros de célula e o grupo espacial são similares, entretanto, ocorreu uma modificação acentuada no eixo beta, mostrando que o processo de cristalização da molécula pode provocar modificação no seu processo de empacotamento e por consequência uma possível alteração nos padrões físico-químicos.

Os dados cristalográficos da EBA foram depositados no banco de dados da Cambridge (CSD, Cambridge Structural Database) com código CCDC XXXX.

Os difratogramas da DRXP da EBA MP e dos cristais estão representados na Figura 6. Todos os padrões de difração apresentam picos de Bragg semelhantes e as reflexões de maior intensidade se encontram em 5,73; 11,55; 14,05; 16,07; 16,88; 17,10; 18,73; 19,36 e 23,72 °. Atribui-se diferença entre amostras caso os ângulos de espalhamento das reflexões mais intensas obtidas a partir do material de referência variarem em  $\pm 0,10$  °. Por sua vez, as intensidades relativas podem variar consideravelmente, e ainda assim indicam apenas orientação preferencial (USP, 2011). Desta forma, é possível afirmar que EBA MP, CR1, CR2, CR3 e CR4

apresentam a mesma estrutura cristalina, embora os padrões de difração apresentem notável orientação preferencial.

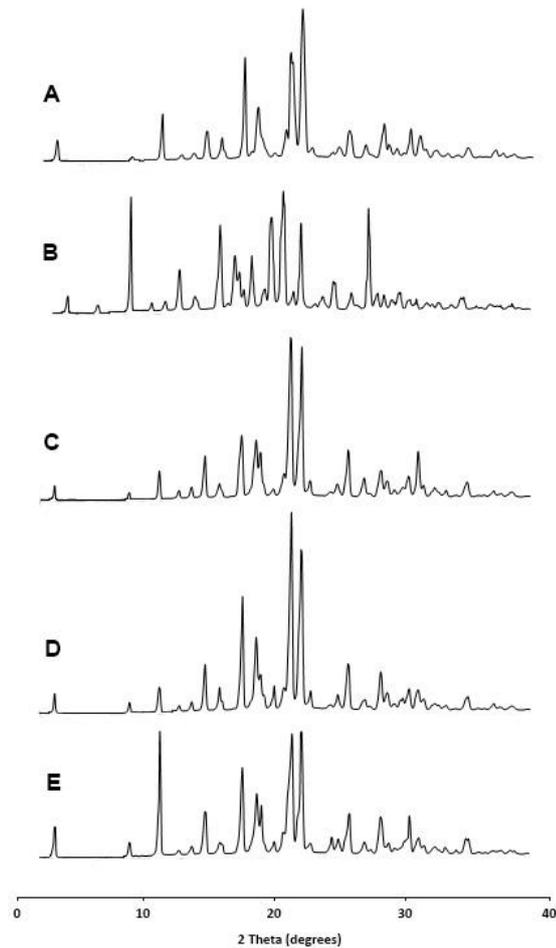


Figura 6 - Difratomogramas em pó da EBA MP (A) e dos cristais CR1 (B), CR2 (C), CR3 (D), e do CR4 (E)

#### 5.1.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TG)

As curvas DSC para EBA MP, CR1, CR2, CR3, e do CR4 estão apresentadas na Figura 7. Picos que correspondem a eventos de fusão foram observados em temperaturas similares para todas as amostras (81,85°C; 84,22°C; 81,96°C; 81,74°C e 82,56°C para EBA MP, CR1, CR2, CR3, e CR4, respectivamente) e também foram

semelhantes as temperaturas de início e fim da fusão (Tabela 1). Diferenças no calor de fusão das amostras foram observadas, sugerindo presença de impurezas (FB, 2010). Esses dados calorimétricos associados aos resultados obtidos por difração de raios X confirmam que as cinco amostras apresentam a mesma estrutura cristalina.

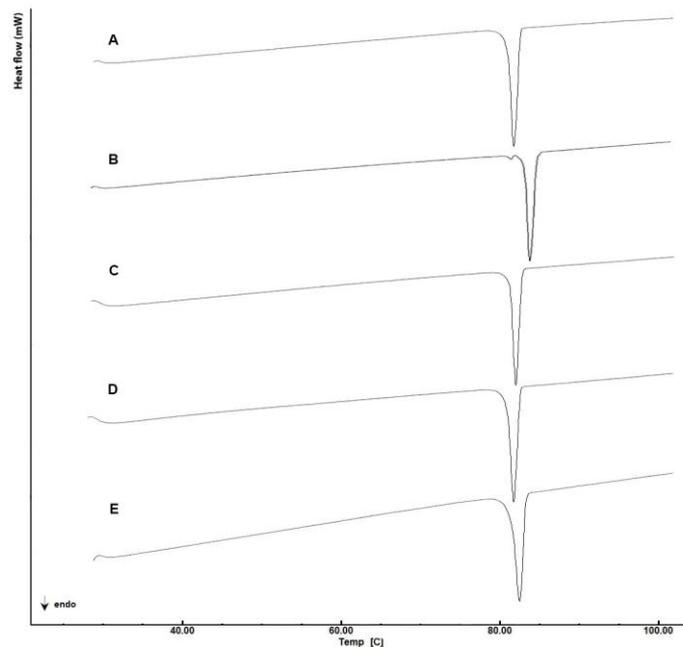


Figura 7 – Curvas DSC referentes à EBA MP (A), cristais CR1 (B), CR2 (C), CR3 (D) e CR4 (E)

Tabela 1 – Propriedades térmicas e calorimétricas da EBA MP e dos cristais

Propriedades	EBA MP	CR1	CR2	CR3	CR4
Temperatura de fusão (° C)	81,85	84,22	81,96	81,74	82,56
Temperatura de início da fusão (° C)	81,03	83,64	81,28	80,93	81,41
Temperatura finalização da fusão (° C)	82,67	85,05	82,72	82,56	83,33
Calor de fusão (J/g)	86,21	93,29	120,27	87,39	71,10

As curvas de TG correspondentes a EBA MP, CR1, CR2, CR3 e CR4 estão apresentadas na Figura 8. As amostras apresentaram padrão de decomposição térmica similar, podendo-se concluir que os diferentes hábitos cristalinos não parecem influenciar a característica térmica da EBA. A decomposição do fármaco ocorreu em cerca de 376°C, com perda de, aproximadamente, 75% da massa de cada amostra.

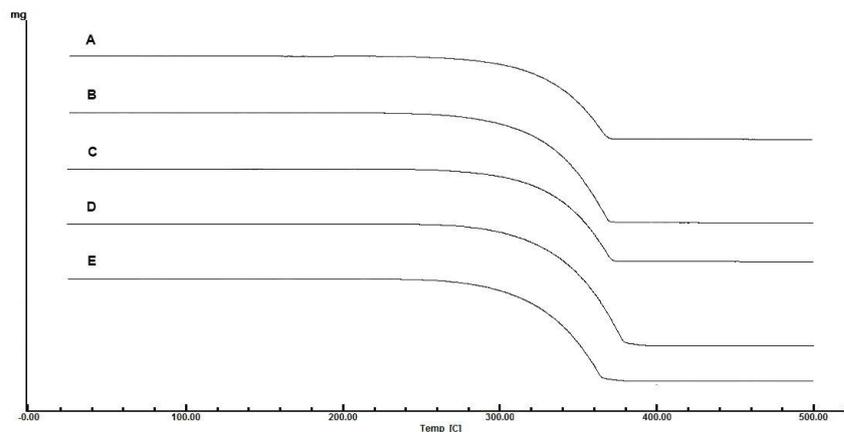


Figura 8 – Curvas de TG referentes à EBA MP (A), cristais CR1 (B), CR2 (C), CR3 (D) e CR4 (E)

### 5.1.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR)

Os espectros de IV da EBA MP e dos cristais apresentaram bandas em posição e intensidade semelhantes ao reportado na literatura (KHOM et al., 2014; RAPOLU et al., 2015). As bandas características da EBA encontram-se em 3053; 1676; 1451 e 1268  $\text{cm}^{-1}$ . As bandas respectivas à deformação C-H evidenciadas em 3053  $\text{cm}^{-1}$  referem-se ao grupo metil. A banda em 1676  $\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuída ao grupamento carbonila; a banda em 1451  $\text{cm}^{-1}$  a um grupamento metileno e a banda em 1268  $\text{cm}^{-1}$  pode ser referente ao grupo amina.

As análises dos espectros no IV, apresentadas na Figura 9, demonstram que não houve modificações em bandas características entre as amostras em teste.

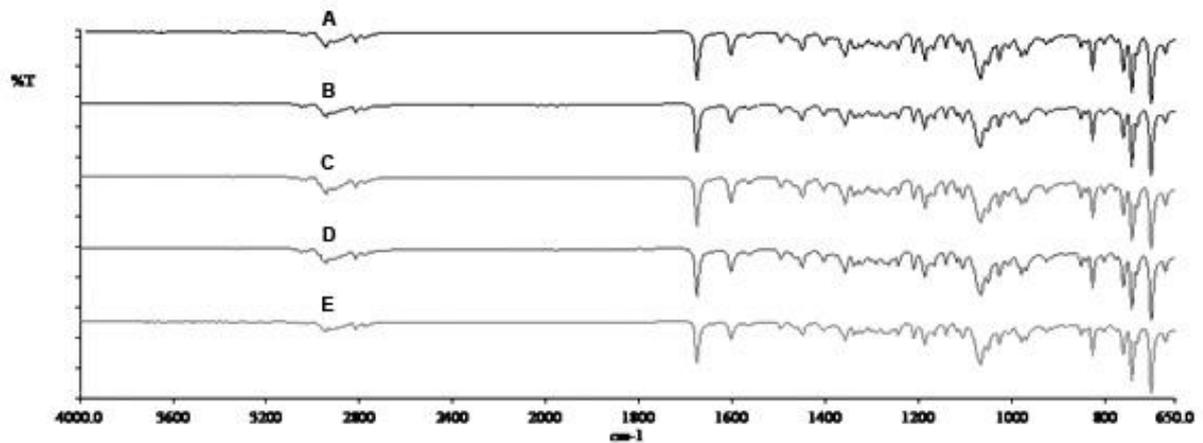


Figura 9 - Espectros ATR-FTIR da EBA MP (A) e dos cristais CR1 (B); CR2 (C); CR3 (D) e CR4 (E)

#### 5.1.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As fotomicrografias por MEV estão apresentadas na Figura 10. O cristal CR1, obtido a partir de solução saturada de EBA MP em acetonitrila, demonstrou morfologia lamelar (Figura 10A). O cristal CR2, obtido a partir da recristalização em etanol, também apresentou morfologia lamelar (Figura 10B). Por sua vez, os cristais CR3 e CR4, resultantes da recristalização em metanol, em temperatura ambiente e a 40°C, respectivamente, apresentaram morfologia romboédrica (Figuras 10C e 10D). Esses resultados evidenciam a influência que o solvente de cristalização exerce na morfologia cristalina, em virtude de interações soluto-solvente em diversas interfaces cristal-solução. Mudanças na cinética de crescimento do cristal, aumento ou inibição do crescimento em certas faces cristalinas e o arredondamento de interfaces são alguns fatores afetados (KUMINEK et al., 2013).

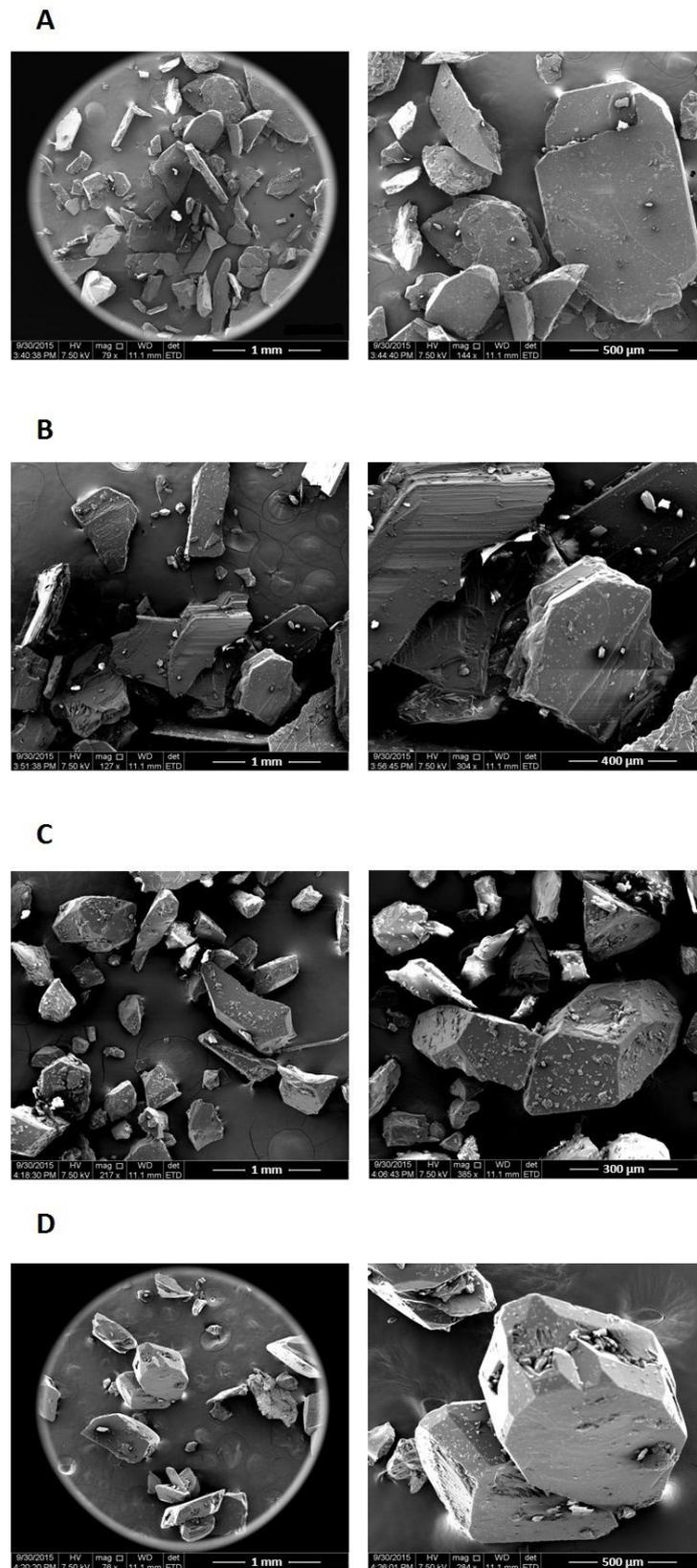


Figura 10 - Fotomicrografias obtidas por MEV referentes aos cristais CR1 (A), CR2 (B), CR3 (C) e CR4 (D)

Através das fotomicrografias dos diferentes cristais evidenciou-se distribuição heterogênea do tamanho de partícula, tanto nos cristais obtidos, quanto na EBA MP. A análise morfológica de EBA MP (Figura 11) revelou hábito granular, notoriamente diferente do observado para as demais amostras, assim como menor tamanho de partícula. O hábito cristalino pode influenciar o desempenho das formas farmacêuticas sólidas, uma vez que este impacta nas propriedades físicas como fluidez, compressibilidade, estabilidade e a taxa de dissolução (RASENACK; MÜLLER, 2002; ANDRIOLI, 2014).

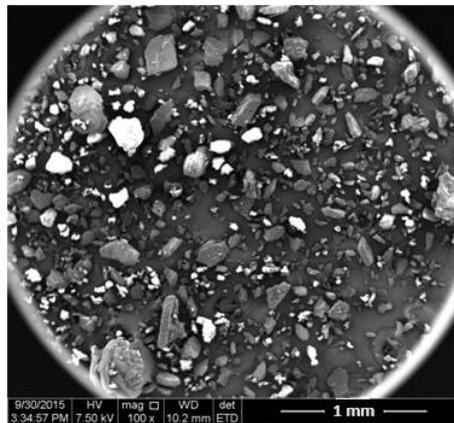


Figura 11 - Fotomicrografia obtida por MEV referente à EBA MP

#### 5.1.5 Análise do tamanho de partícula

A distribuição do tamanho de partícula dos diferentes hábitos cristalinos obtidos e da matéria prima de EBA está ilustrada na Tabela 2.

Foram encontrados diferentes tamanhos de partícula e índices de polidispersão variados para as diferentes amostras. Os cristais CR3 e CR4 apresentaram os menores tamanhos de partículas, já os cristais CR1 e CR2 apresentaram os maiores e EBA MP apresentou o menor tamanho de partícula entre todas as amostras.

Destaca-se o elevado valor de  $d(0,9)$  dos cristais CR1 e CR2, confirmando que esses cristais possuem os maiores tamanhos de partícula dentre as amostras

analisadas. O maior índice de polidispersão (IDP) foi evidenciado para EBA MP, demonstrando que nessa amostra o tamanho de partícula apresentou distribuição mais ampla. O conjunto desses dados corrobora com os obtidos na análise por MEV.

Tabela 2 – Distribuição granulométrica da EBA MP e dos diferentes cristais

Amostra	d (0,1) (µm)	d (0,5) (µm)	d (0,9) (µm)	IDP
EBA MP	29,81	156,13	448,43	2,68
CR1	202,98	907,35	1536,15	1,47
CR2	164,57	803,51	1485,71	1,64
CR3	212,05	507,66	999,17	1,55
CR4	183,96	596,09	1184,77	1,68

#### 5.1.6 Validação do método de dissolução intrínseca

Condição *sink* é o termo que se refere ao excesso de volume do meio que permite que o sólido se dissolva continuamente. Esta condição é obtida não se excedendo 10% da solubilidade máxima do fármaco no meio, ao final do teste (USP, 2011). A condição *sink* após um período de equilíbrio de 2 horas, em HCl 0,01 M, foi de 23,25 µg/mL (n = 3; DPR = 1,5).

Até o momento, as farmacopeias não apresentam monografias para comprimidos de ebastina, trazendo apenas monografia da matéria-prima (BP, 2010). Estudos de dissolução dessa forma farmacêutica foram conduzidos por Arend e colaboradores (2009), que evidenciaram dissolução adequada em HCl 0,01 M.

Nesse trabalho optou-se por realizar testes adicionais em outros meios, como água ultrapura; água com lauril sulfato de sódio 0,5%; HCl 0,1 M; tampão acetato pH 4,5 e tampão fosfato pH 6,8. Observaram-se precipitação e baixos teores dissolvidos, o que descartou a possibilidade de uso dos meios citados. Dessa forma, em todos os ensaios foi usado como meio de dissolução, HCl 0,01M.

##### 5.1.6.1 Especificidade

A varredura do espectro, na região do UV, do meio de dissolução e da EBA são mostrados na Figura 12. Como pode ser observado, não ocorreu nenhuma absorção no comprimento de onda usado para análise, de modo que o método pode ser considerado específico.

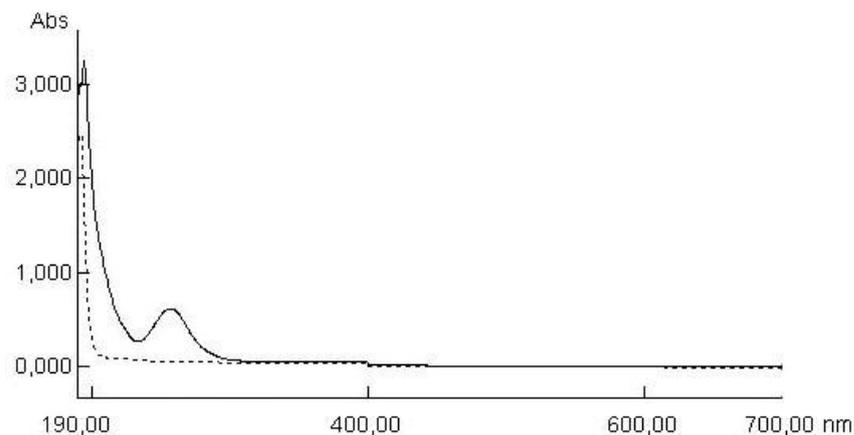


Figura 12 – Espectro na região UV do meio de dissolução (- - -) e da EBA em meio de dissolução (—)

#### 5.1.6.2 Linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

A curva de calibração obtida a partir da avaliação da linearidade está representada na Figura 13. Os resultados obtidos na avaliação da linearidade demonstraram que soluções de EBA diluídas no meio de dissolução apresentam correlação linear entre a absorbância e a concentração das soluções.

A análise de variância ANOVA demonstrou regressão linear significativa ( $p < 0,05$ ) e desvio da linearidade não significativo ( $p > 0,05$ ). Estes dados indicam que o método é linear na faixa de 1 a 25  $\mu\text{g/mL}$  de EBA.

O LQ e o LD, calculados a partir da equação da reta foram 0,39 e 0,13  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

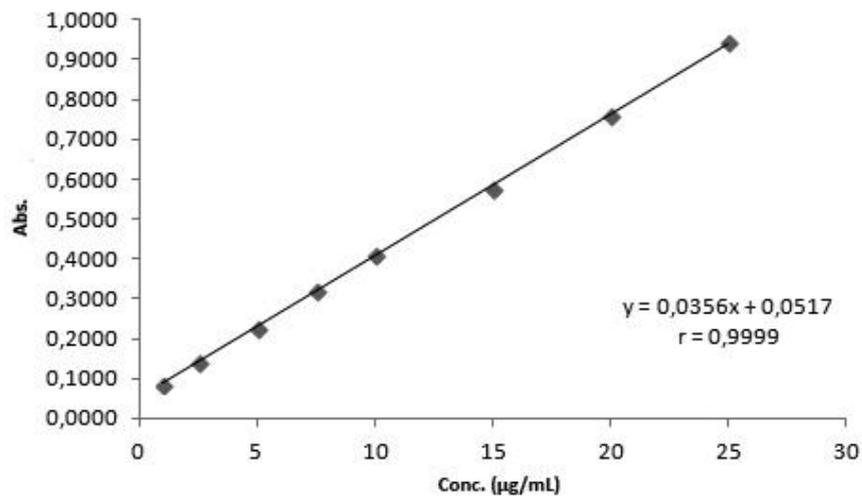


Figura 13 – Curva de calibração média da EBA

#### 5.1.6.3 Exatidão / Precisão

As recuperações médias de EBA para as concentrações de 12, 15 e 18 µg/mL foram de  $101,0 \pm 1,21$ ;  $100,2 \pm 0,83$  e  $99,05 \pm 0,46$  %, respectivamente, encontrando-se dentro dos limites preconizados de 95 a 105 % (USP, 2011).

Os resultados da repetibilidade e da precisão entre dias apresentaram valores de DPR menores do que 2,0% e estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Dados da repetibilidade e da precisão entre-dias para o método de dissolução intrínseca

Dia	Repetibilidade	Entre-dias
	Teor (%) $\pm$ DPR	Teor (%) $\pm$ DPR
1 (n=9)	98,76 $\pm$ 0,16	
2 (n=3)	99,39 $\pm$ 0,25	99,21 $\pm$ 0,41
3 (n=3)	99,49 $\pm$ 0,33	

#### 5.1.6.4 Estabilidade no meio de dissolução

A EBA demonstrou ser estável no meio de dissolução por um período de até 24 horas. Nenhuma evidência de degradação foi detectada e o teor das soluções ao término das 24 horas foi de  $99,1 \pm 0,3\%$  ( $n = 3$ ), em relação ao tempo zero.

#### 5.1.6.5 Interferência da filtração

Em relação à interferência do processo de filtração, os teores das soluções filtradas, calculados em relação às respectivas soluções não filtradas, foram de  $99,7 \pm 0,1\%$  ( $n = 3$ ), indicando a não adsorção do fármaco ao filtro utilizado.

#### 5.1.7 Velocidade de dissolução intrínseca (VDI) e dissolução em pó

A Figura 14 apresenta a comparação dos perfis de dissolução intrínseca dos diferentes cristais e de EBA MP, em HCl 0,01 M (Tabela 4). A análise estatística realizada através de ANOVA e Tukey (GraphPad Prism 6<sup>®</sup>) revelou perfis significativamente não diferentes entre as amostras analisadas ( $p > 0,05$ ). Para calcular os valores de VDI foi utilizado o coeficiente angular das retas, obtido pela linearização dos pontos de cada curva. As análises por DSC, realizadas antes e depois do procedimento da VDI, não apresentaram alterações, o que indicou a ausência de transformações de fase mediadas por pressão ou solvente.

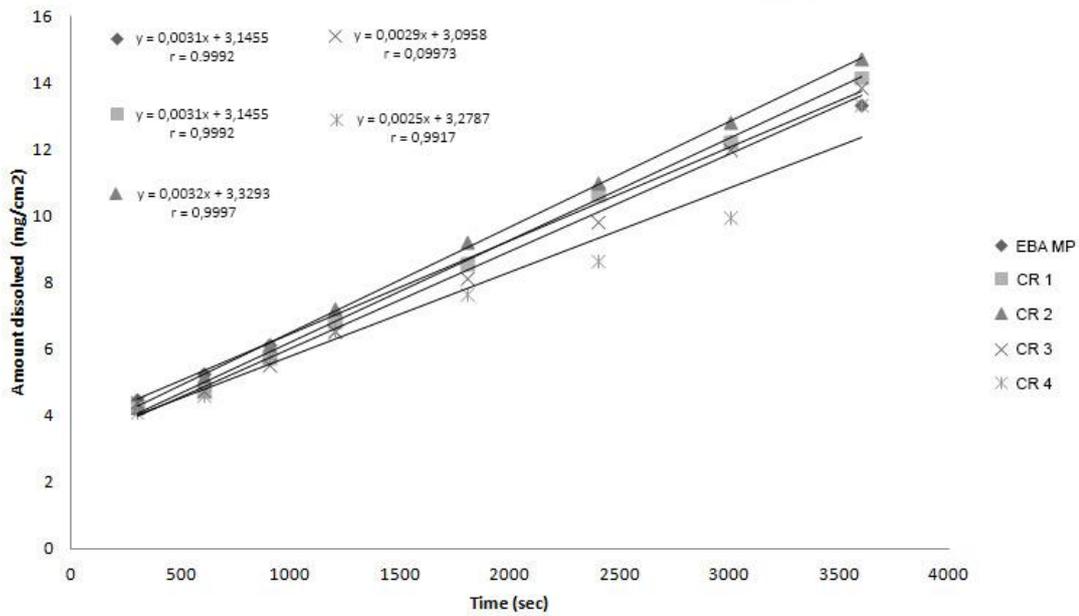


Figura 14 – Perfis de VDI dos diferentes cristais e da EBA MP em HCl 0,01 M

Tabela 4. Resultados VDI da EBA MP e dos cristais, em HCl 0,01 M

Amostra (n=3)	VDI ( $\text{mg cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ ) $\pm$ DP
EBA MP	$0,372 \pm 0,0060$
CR1	$0,372 \pm 0,0056$
CR2	$0,384 \pm 0,0059$
CR3	$0,348 \pm 0,0079$
CR4	$0,300 \pm 0,0059$

A Figura 15 apresenta a comparação dos perfis de dissolução em pó dos diferentes cristais e de EBA MP, em HCl 0,01 M. A análise estatística realizada através de ANOVA e Tukey (GraphPad Prism 6<sup>®</sup>) revelou ED significativamente diferentes entre todas as amostras ( $p < 0,05$ ), sendo o maior valor de ED atingido pela EBA MP. Entre os cristais obtidos experimentalmente, CR3 e CR4 apresentaram os maiores valores (Tabela 5).

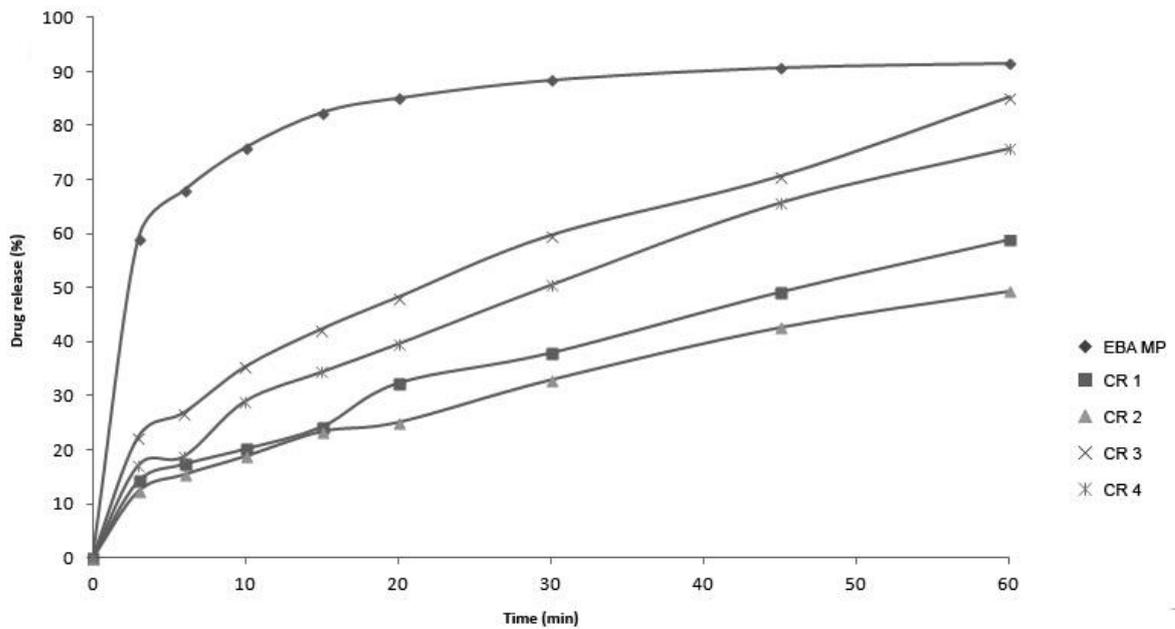


Figura 15. Comparação dos perfis de dissolução em pó dos diferentes cristais e da EBA MP em HCl 0,01 M.

Tabela 5 - Eficiência de dissolução da EBA MP e dos cristais em HCl 0,01 M

Amostra (n=6)	ED (%)	± DP
EBA MP	82,74	1,56
CR1	36,89	2,62
CR2	31,76	1,11
CR3	54,86	1,38
CR4	48,43	1,40

Existem diversos exemplos na literatura de sólidos com diferentes hábitos cristalinos que apresentam mudanças na solubilidade e no perfil de dissolução. O trabalho de Thenge e colaboradores (2013), envolvendo diferentes hábitos cristalinos de cloridrato de lomefloxacino, demonstrou solubilidade e taxas de dissolução significativamente maiores para os cristais em forma de agulhas quando comparados aos bastonetes. O estudo de Keraliya e colaboradores (2010), envolvendo diferentes hábitos cristalinos de tolbutamida, demonstrou solubilidade e taxas de dissolução significativamente maiores para os cristais em forma de placas

quando comparados aos em forma cúbicas, prismáticas e de agulhas. Já o trabalho de Lyn e colaboradores (2011), sobre diferentes hábitos cristalinos de piroxicam, indicou que hábitos cristalinos prismáticos melhoram as taxas de dissolução, mas não a solubilidade. Enquanto os hábitos cúbicos, apesar de melhorarem a solubilidade, não promovem alterações significativas nas taxas de dissolução quando comparados à matéria-prima de piroxicam.

A dissolução em pó e a VDI permitem evidenciar a relevância que parâmetros do estado sólido, como hábito cristalino e polimorfismo, podem ter sobre o desempenho de um fármaco. A ausência de diferença significativa entre os perfis de VDI dos diferentes cristais e da EBA MP associada aos resultados de caracterização no estado sólido (descritos no tópico 3.1), contribuiu para a confirmação de ausência de polimorfismo nas amostras analisadas, uma vez que o método de dissolução intrínseca é capaz de eliminar os efeitos de tamanho e formato da partícula enfatizando então, o efeito do polimorfismo na VDI.

Os resultados obtidos através do estudo de dissolução em pó indicaram a presença de diferença significativa entre as eficiências de dissolução dos diferentes cristais e da EBA MP. Como já citado, as amostras que apresentaram a melhor eficiência de dissolução foram EBA MP, CR3 e CR4. Acredita-se que essas amostras dispõem de tal comportamento em virtude de seus hábitos cristalinos com menores tamanhos de partículas frente aos cristais CR1 e CR2. Esse fato indica que o hábito cristalino influencia não somente as características de fluidez, compressibilidade, molhabilidade e compactabilidade de um pó, mas também o seu perfil de dissolução, podendo afetar a sua biodisponibilidade.

**CONCLUSÕES**

---

## 6 CONCLUSÕES

- Nas condições de recristalização usadas, não foi possível obter polimorfos da EBA, entretanto foram obtidos monocristais de diferentes hábitos cristalinos;
- Realizou-se a determinação da estrutura cristalina e a caracterização em estado sólido da EBA MP e das diferentes formas cristalinas obtidas;
- Foi observada a influência dos distintos hábitos cristalinos no perfil e na taxa de dissolução do fármaco. Destaca-se a diferença significativa no ensaio de dissolução em pó entre as amostras analisadas;
- Os resultados da validação analítica indicaram que o método de dissolução intrínseca validado mostra-se exato, específico, linear e preciso;
- Os resultados deste estudo serão úteis para o controle físico-químico de matérias-primas de EBA e demonstram a importância do controle de hábitos cristalinos distintos durante o desenvolvimento de uma formulação e a importância de especificações de controle de qualidade desse fármaco.

## REFERÊNCIAS

---

## 7 REFERÊNCIAS

AALTONEN, J. et al. Solid form screening – A review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 1, p. 23–37, 2009.

ABDOU, H. M. Dissolution. In: **Remington: the science and practice of pharmacy**. 19. ed. Easton: Mack Publishing Company. v. 1, p. 593-604, 1995.

ABDOU, H.M., HANNA, S., MUHAMMAD, N. Dissolution In: Genaro A.R. **Remington: The science and practice of pharmacy**. 20. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. p. 654-666, 2000.

AITIPAMULA, S. et al. Pharmaceutical cocrystals of ethenzamide: structural, solubility and dissolution studies. **CrystEngComm**. p. 8515–8524, 2012.

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

ANDRIOLI, A. et al. Caracterização do insumo ibuprofeno e a correlação com propriedades de dissolução e de fluxo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 3, p. 401–411, 2014.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G., ALLEN JR. L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 6.ed. São Paulo: Premier. 568p., 2000.

ARÊAS, E. P. G.; KAWANO, Y. Aplicações de técnicas espectroscópicas vibracionais ao estudo conformacional de proteínas. **Química Nova**, v. 4, n. 1, p. 31-43, 1991.

AUGUSTIJNS, P.; BREWSTER, M. Solvent Systems and Their Selection in Pharmaceutics and Biopharmaceutics. **Thermal Separation Processes: Principles and Design**. Springer-Verlag New York Inc, 2007.

AZARMI, S.; ROA, W.; LÖBENBERG, R. Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, n. 1, p. 12–21, 2007.

BACCHI, A. X-ray diffraction as a tool in the path from the design of an active pharmaceutical ingredient to the tablet on the shelf. **Rendiconti Lincei**, v. 24, n. S1, p. 109–114, 2012.

BERNARDI, L. S. et al. Solid-state evaluation and polymorphic quantification of venlafaxine hydrochloride raw materials using the Rietveld method. **Talanta**, v. 117, p. 189–195, 2013.

BLAGDEN, N.; MATAS, M.; YORK, P. T. Crystal engineering of active

pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 617–630, 2007.

BOERRIGTER, S. X. M. et al. In Situ Observation of Epitaxial Polymorphic Nucleation of the Model Steroid Methyl Analogue 17 Norethindrone. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 106, p. 4725–4731, 2002.

BOLTON, S. **Pharmaceutical statistics, practical and clinical applications**. New York: Marcel Dekker. p. 148-156, 1997.

BOUSQUET, J.; Van CAUWENBERGE, P.; KHALTAEV, N. Allergic rhinitis and its impact on asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.108, n.5, p. S147-334, 2001.

BP. BRITISH PHARMACOPEIA (BP), Her Majesty's Stationary Office, London, 2010.

BROZEK, J. L. et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines: 2010 Revision. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 126, n. 3, p. 466–476, 2010.

BUENO, M. M.; RECH, N. Insumos farmacêuticos – Aspectos técnicos, científicos e regulatórios. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M. N. **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 12-20, 2009.

BUGAY, D. E. Characterization of the solid-state: Spectroscopic techniques. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 1, p. 43–65, 2001.

BYLINE, A. Y. et al. Co-crystals: A novel approach to modify physicochemical properties of active pharmaceutical ingredients. **Indian Journal Of Pharmaceutical Sciences**. v. 71, n. 4, p. 359-370, 2009.

BYRN, S. R.; PFEIFFER, R. R.; STOWELL, J. G. **Solid-State chemistry of Drugs**. Indiana: SSCI. 574 p., 1999.

CALLISTER, W. D. **Materials science and engineering : an introduction**. 7th ed, New York: John Wiley & Sons, Inc. 975 p., 2007.

CHENG, J.; ZHOU, Z.; YANG, G. 4-[4-(Benzhydryloxy)piperidin-1-yl]-1-(4 tertbutylphenyl)butan-1-one. **Acta Crystallographica Section E**. n. 61, p. 2932-2933, 2005.

CUFFINI, S.L., PITALUGA, A., TOMBARI, D. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M. N. **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 21-30, 2009.

CAMELO-NUNES, I. C.; SOLÉ, D. Rinite alérgica: indicadores de qualidade de vida. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, n. 1, p. 124–133, 2010.

CLAS, S.; DALTON, C.; HANCOCK, B. Differential scanning calorimetry: applications

in drug development. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 2, n. 8, p. 311–320, 1999.

DATTA, S.; GRANT, D. J. W. Crystal structures of drugs: advances in determination, prediction and engineering. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 1, p. 42–57, 2004.

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

DESAI, S. R.; DHARWADKAR, S. R. Study of process induced polymorphic transformations in fluconazole drug. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 66, n. 2, p. 115–122, 2009.

DEZANI, A. B. et al. Equilibrium solubility versus intrinsic dissolution: characterization of lamivudine, stavudine and zidovudine for BCS classification. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 4, p. 853-863, 2013.

DRESSMAN, J. B.; REPPAS, C. In vitro–in vivo correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, p. S73–S80, 2000.

FB. Farmacopeia Brasileira. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010

FDA. Guidance for Industry. **ANDAs: Pharmaceutical Solid Polymorphism. Chemistry, Manufacturing, and Controls Information**. U.S. Department of Health and Human Services, 2007.

FDA. Guidance for Industry. **Regulatory Classification of Pharmaceutical Co-crystals**. U.S. Department of Health and Human Services, 2013.

FERRAZ, H. G., CONSIGLIERI, V. O., STORPIRTIS, S. Avaliação da cinética de dissolução de ampicilina em comprimidos comercializados no Brasil. **Revista Farmácia e Bioquímica**, v. 34 n. 2, p. 93-99, 1998.

FERRAZ, H. G. O perfil de dissolução é importante para o seu produto. **Revista Anfarmag**. n. 47, p. 26, 2004.

FILHO, E. et al. Estudo das propriedades físico-químicas da glibenclamida e excipientes que influem sobre resultados do ensaio de dissolução para medicamento similar e genérico. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 72, n. 4, p. 316-32, 2013.

FLORENCE, A. T; ATTWOOD, D. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks Editora, 690 p., 2011.

GIACOVAZZO, C. **Fundamentals of Crystallography**. Oxford: Oxford University Press. 864 p., 2011.

GIL, E. **Excipientes: suas aplicações e controle físico-químico**. Pharmabooks, 2. ed. São Paulo, p. 285, 2007.

GIRON, D. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 68, n. 2, p. 335–357, 2002.

GREINER, A. et al. Allergic rhinitis. **Lancet**, v. 378, n. 9809, p. 2112–22, 2011.

GROOFF, D. et al. Photostability of Crystalline Versus Amorphous Nifedipine and Nimodipine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 6, p. 1883-1894, 2013.

GUPTA, S.; KESARLA, R.; OMRI, A. Formulation strategies to improve the bioavailability of poorly absorbed drugs with special emphasis on self-emulsifying systems. **ISRN Pharmaceutics**, v. 2013, p. 1-16, 2013.

HASHIZUME, T. et al. Involvement of CYP2J2 and CYP4F12 in the metabolism of ebastine in human intestinal microsomes. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 300, n. 2, p. 298–304, 2002.

HENDRIKSEN, B. A.; WILLIAMS, J. D. Characterization of calcium fenoprofen 2. Dissolution from formulated tablets and compressed rotating discs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 69, n. 2, p. 175–180, 1991.

HÖRTER, D.; DRESSMAN, J. B. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 25, n. 1, p. 3–14, 1997.

HURST, M.; SPENCER, C. M. Ebastine: an update of its use in allergic disorders. **Drugs**, n. 54, v.4, p. 981-1006, 2000.

ICH. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Specifications: Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products**. Chemical Substances, Q6A, 1999.

KAWABATA, Y. et al. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, n. 1, p. 1–10, 2011.

KERALIYA, R. A. et al. Effect of solvent on crystal habit and dissolution behavior of tolbutamide by initial solvent screening. **Dissolution Technologies**, v. 17, n. 1, p. 16–21, 2010.

KHADKA, P. et al. Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 6, p. 304–316, 2014.

KHOM, T. C. et al. Development of Mucoadhesive Nanoparticulate System of Ebastine for Nasal Drug Delivery. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n.7, p. 1013-1019, 2013.

KUMAR, S. et al. Drug carrier systems for solubility enhancement of BCS class II

drugs: a critical review. **Critical reviews in therapeutic drug carrier systems**, v. 30, n. 3, p. 217–56, 2013.

KUMAR, P.; SINGH, C. A Study on Solubility Enhancement Methods for Poorly Water Soluble Drugs. **American Journal of Pharmacological Sciences**, v. 1, n. 4, p. 67–73, 2013.

KUMINEK, G. et al. Single crystal structure, solid state characterization and dissolution rate of terbinafine hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 78-79, p. 105–111, 2013.

LAVOR, E. et al. Application of thermal analysis to the study of antituberculosis drugs–excipient compatibility. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, n. 3, p. 2303–2309, 2014.

LLANES, S.; GRANT, J. A. Comparison of the potency of antihistamines. **Dermatologic Therapy**. v. 13, p. 344–348, 2000.

LEE, E. H. A practical guide to pharmaceutical polymorph screening & selection. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 4, p. 163–175, 2014.

LEE, A. Y.; ERDEMIR, D.; MYERSON, A. S. Crystal polymorphism in chemical process development. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2, n. 1, p. 259–280, 2011.

LEE, A. Y.; MYERSON, A. S. Particle Engineering: Fundamentals of Particle Formation and Crystal Growth. **MRS Bulletin**, v. 31, n. 11, p. 881–886, 2006.

LI DESTRI, G. et al. Crystal morphologies and polymorphs in tolbutamide microcrystalline powder. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 1, p. 73–83, 2013.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E.; MÁSSON, M. Role of cyclodextrins in improving oral drug delivery. **American Journal of Drug Delivery**, v. 2, n. 4, p. 1–15, 2004.

LÖTTER, A. P. et al. A simple reproducible method for determining dissolution rates of hydrophobic powders. **Pharmaceutical Technologies**, v. 7, n. 4, p. 56-66, 1983.

LLUPPIA, J.; GRAS, J.; LLENAS, J. Comparative antiallergic effects of second-generation H1-antihistamines ebastine, cetirizine and loratadine in preclinical models. **Arzneimittelforschung**, v. 53, n. 2, p. 93-97, 2003.

LYN, L. Y. et al. Crystal modifications and dissolution rate of piroxicam. **Acta Pharmaceutica**, v. 61, n. 4, p. 391–402, 2011.

MADDENS, T. et al. Complexation of ebastine with  $\beta$ -cyclodextrin derivatives. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 70, n. 3-4, p. 415–419, 2011.

MAGHSOODI, M. Role of solvents in improvement of dissolution rate of drugs:

crystal habit and crystal agglomeration. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 5, n. 1, p. 13–8, 2015.

MATOS, J.R.; MACHADO, L.D.B. Análise térmica termogravimetria. In: CANEVAROLO JUNIOR., S.V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber. p. 209-228, 2004.

MEHTA, S. et al. Review article improving solubility of bcs class II drugs using solid dispersion. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**. v. 4, n. 3, p. 7–13, 2014.

MODI, S. R. et al. Impact of crystal habit on biopharmaceutical performance of celecoxib. **Crystal Growth & Design**, v. 13, n. 7, p. 2824–2832, 2013.

MPA - LÄKEMEDELSVERKET MEDICAL PRODUCTS. Agency-public assessment report scientific discussion Ebastine Teva (ebastine) SE/H1211/01-02/DC, Suíça, 2013 (<https://lakemedelsverket.se/english/>).

NEHA et al. Approaches to improve the solubility and bioavailability of poorly soluble drugs and different parameter to screen them. **Novel Science International Journal of Pharmaceutical Science**, v. 1, n. 4, p. 171–182, 2012.

O'SULLIVAN, B.; GLENNON, B. Application of in situ FBRM and ATR-FTIR to the monitoring of the polymorphic transformation of D-mannitol. **Organic Process Research and Development**, v. 9, n. 6, p. 884–889, 2005.

PAULINO, A. S. et al. Hollow crystal anti-solvent preparation process as a promising technique to improve dissolution of poorly soluble drugs. **Journal of Crystal Growth**, v. 366, p. 76–81, 2013.

PRADO, L. D. **Preparação e caracterização de polimorfos de mebendazol e carvedilol**. 2012. 173 f. Dissertação (Mestrado em Química) Centro de Estudos Gerais, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2012.

PRADO, L. D.; ROCHA, H. V. A. Estado sólido na indústria farmacêutica: uma breve revisão. **Revista Virtual de Química**. 2015.

RAPOLU, R. et al. A novel UV degradation product of Ebastine: Isolation and characterization using Q-TOF, NMR, IR and computational chemistry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 107, , p. 488–494, 2015.

RASENACK, N.; MÜLLER, B. W. Crystal habit and tableting behavior. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 244, n. 1-2, p. 45–57, 2002.

RODOMONTE, A. et al. Different crystal morphologies arising from different preparation methods of a same polymorphic form may result in different properties of the final materials: The case of diclofenac sodium trihydrate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, , p. 477–481, 2008.

RODRIGUES, A. D. G.; GALZERANI, J. C. Espectroscopias de infravermelho , Raman e de fotoluminescência : potencialidades e complementaridades. **Revista**

**Brasileira de Ensino de Física**, v. 34, n. 4, p. 4309–9, 2012.

RODRIGUES, C.; DE SANTIS, M.; ARROBAS, A. M. Rinite alérgica e doenças associadas. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v. 15, n. 5, p. 891–898, 2009.

RODRIGUES, P. O. et al. Aplicação de técnicas termoanalíticas na caracterização, determinação da pureza e cinética de degradação da zidovudina (AZT). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, n. 3, p. 383–387, 2005.

RODRÍGUEZ-SPONG, B. et al. General principles of pharmaceutical solid polymorphism A supramolecular perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 241–274, 2004.

ROHATAGI, S. et al. Effect of age and gender on the pharmacokinetics of ebastine after single and repeated dosing in healthy subjects. **International Journal Of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 39, n.3, p. 126–134, 2001.

ROSA, Tatiana Cupello Colonesi da; **Dissolução intrínseca de hidroclorotiazida de diferentes granulometrias e sua relação com a dissolução do ativo em comprimidos**. Rio de Janeiro, 2005, Faculdade de Farmácia, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

ROSA, M. F.; VILHENA, R. O. Intrinsic Dissolution: concepts and applications on pharmaceutical. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. IX, n. 1, p. 49–61, 2012.

ROWE, R. C. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 5th.ed. London: Pharmaceutical Press. 918 p., 2006.

SABER, R. A.; ATTIA, A. K.; SALEM, W. M. Thermal analysis study of antihypertensive drugs telmisartan and cilazapril. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v. 4, n. 3, p. 283–287, 2014.

SASTRE, J. Ebastine in allergic rhinitis and chronic idiopathic urticaria. **Allergy**, v. 63, Suppl 8, p. 1–20, 2008.

SATTLER, K.; FEINDT, H. J. **Thermal Separation Processes: Principles and Design**. 563 p., 2010

SAVJANI, K. T.; GAJJAR, A. K.; SAVJANI, J. K. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. **ISRN Pharmaceutics**, v. 2012, n. 100 , p. 1–10, 2012.

ŠEHIĆ, S. et al. Investigation of intrinsic dissolution behavior of different carbamazepine samples. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 386, n. 1-2, p. 77–90, 2010.

SINGHAL, D.; CURATOLO, W. Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 335–347, 2004.

SHARMA, R.; PRASHERB, D.; TIWARI, R. K. Crystal structure analysis of ebastine [4-(4-benzhydryloxy-1-piperidyl)-1-(4-tert-butylphenyl) butan-1-one]: an oral histamine antagonist. **Journal of Applied Crystallography**. n. 48, p. 1299–1301, 2015.

SHELDRICK, G. M. **SHELXS-97, Program for Crystal Structure Determination**; University of Göttingen: Germany, 1997.

SHELDRICK, G. M. **SHELXL-97, Program for the Refinement of Crystal Structure**; University of Göttingen: Germany, 1997.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J.; **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7<sup>a</sup>. ed. New York: Wiley, 2007.

SIMONS, F. E. R. Comparative Pharmacology of H1 Antihistamines: Clinical Relevance. **The American Journal of Medicine**, v. 113, n.9, p. 38S–46S, 2002.

SKOOG, A. D.; HOLLER F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5<sup>a</sup> ed., Porto Alegre: Bookman. 836p., 2002.

SNIDER, D. A.; ADDICKS, W.; OWENS, W. Polymorphism in generic drug product development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 391–395, 2004.

SORRENTI, M et al. Solid-state characterization of tacrine hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.63, p.53-61, 2012.

STEGEMANN, S. et al. When poor solubility becomes an issue: From early stage to proof of concept. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 31, n. 5, p. 249–261, 2007.

STUART, B. H. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. Chichester: John Wiley & Sons. v. 8, 2004.

TENHO, M. et al. Does the preferred orientation of crystallites in tablets affect the intrinsic dissolution? **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 4, p. 1315–1323, 2007.

THENGE, R.; GANESAN, V.; TEKADE, N. P. Studies on the crystal forms of lomefloxacin hydrochloride: preparation, characterization and dissolution profile. **International Journal of Research in Pharmaceutical Science**, v.4, n. 1, p. 12-17, 2013.

TSINMAN, K. et al. Powder dissolution method for estimating rotating disk intrinsic dissolution rates of low solubility drugs. **Pharmaceutical Research**. v. 26, n. 9, p. 2093–2100, 2009.

USP 34. The United States Pharmacopeia, 34<sup>nd</sup> ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2011.

VAN TONDER, E. C. et al. Preparation and physicochemical characterization of 5

niclosamide solvates and 1 hemisolvate. **AAPS PharmSciTech**, v. 5, n. 1, p. E12, 2004.

VARGAS, M. R. W.; RAFFIN, F. N.; LIMA e MOURA, T. F. A. Strategies used for to improve aqueous solubility of simvastatin : a systematic review. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 33, n. 4, p. 497–507, 2012.

VIEGAS, T. X. et al. Intrinsic Drug Dissolution Testing Using the Stationary Disk System. **Dissolution Technologies**, v.8, n. 3, p. 1–4, 2001.

VIPPAGUNTA, S. R.; BRITTAIN, H. G.; GRANT, D. J. W. Crystalline solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 3–26, 2001.

WEIDE, B. et al. Ebastine – Review of the efficacy and safety profile of a nonsedating antihistamine. **Allergologie**, v. 27, p. 275 – 288, 2004.

WEYNA, D. R. et al. Improving solubility and pharmacokinetics of meloxicam via multiple-component crystal formation. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, p. 2094–2102, 2012.

WHEATLEY, L. M.; TOGIAS, A. Allergic Rhinitis. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 5, p. 456–463, 2015.

WILLIAMS, H. D. et al. Strategies to address low drug solubility in discovery and development. **Pharmacological Reviews**, v. 65, p. 315–499, 2013.

WOOD, J.H.; SYARTO, J.E.; LETTERMAN, H. Improved holder for intrinsic dissolution rate studies. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v.54, p.1068, 1965.

XIA, D. et al. Effect of crystal size on the in vitro dissolution and oral absorption of nitrendipine in rats. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 9, p. 1965–76, 2010.

YAMAGUCHI, T. et al. Pharmacokinetics of the H1-receptor antagonist ebastine and its active metabolite carebastine in healthy subjects. **Arzneimittelforschung**, v. 44, p. 59 – 64, 1994.

YU, L. X. et al. Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 270, n. 1-2, p. 221–227, 2004.

ZAKERI-MILANI, P. et al. Biopharmaceutical classification of drugs using intrinsic dissolution rate (IDR) and rat intestinal permeability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73, n. 1, p. 102–106, 2009.