



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Estudos de pré-formulação do fármaco dapsona: desenvolvimento de métodos e
avaliação da estabilidade**

MAYARA LADEIRA COELHO

Teresina – Piauí

2012

MAYARA LADEIRA COELHO

**Estudos de pré-formulação do fármaco dapsona: desenvolvimento de métodos e
avaliação da estabilidade**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

Teresina – Piauí

2012

MAYARA LADEIRA COELHO

**Estudos de pré-formulação do fármaco dapsona: desenvolvimento de métodos e
avaliação da estabilidade**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Lamartine Soares Sorinho (Orientador)

Departamento de Ciências Farmacêuticas –UFPE

Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes (Examinador Interno)

Departamento de Bioquímica e Farmacologia – CCS/UFPI

Prof. Dr^a. Monica Felts de la Roca Soares (Examinadora Interna)

Departamento de Ciências Farmacêuticas –UFPE

Prof. Dr. Danilo César Galindo Bedor (Examinador Externo)

Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPE

TERESINA

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Prof^a. Dr^a. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Saulo Cunha de Serpa Brandão

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Antonio dos Santos Rocha Filho

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

José Guilherme Ferre Pompeu

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Lívio Cesar Cunha Nunes

LABORATÓRIOS E INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS

Núcleo de Tecnologia Farmacêutica (NTF) - UFPI

Responsável: Prof. Dr. Stanley Juan Gutierrez

Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Ininga.

Cep: 64049-550 - Teresina-PI – Brasil.

Laboratório de Pesquisa em Cosméticos e Medicamentos (LAPCOM) – UFPI

Responsável: Prof^a Dr^a Monica Felts de La Roca Soares

Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Ininga.

Cep: 64049-550 - Teresina-PI – Brasil.

Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM) - UFPE

Responsável: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

Avenida Professor Artur de Sá, S/N, Cidade Universitária.

CEP:50740-521 - Recife, PE – Brasil.

Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados (LIMAV) – UFPI

Responsável: Prof^a. Dr^a. Maria Rita de Moraes Chaves Santos

Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Ininga.

Cep: 64049-550 - Teresina-PI – Brasil.

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria e Mário, por batalharem incansavelmente para eu chegar até aqui. Aos meus irmãos, Marissa e Mário Júnior, por alegrarem e encherem de vida minha caminhada. A Saymonl, pelo amor e carinho de todos os dias.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por ser Força e Luz, Inspiração e Sentido, em todos os meus dias.
- Ao meu orientador, Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho, por abrir um caminho novo em minha vida, a Tecnologia Farmacêutica. Por confiar a mim a execução deste trabalho, pela orientação, atenção e tempo a mim dedicados.
- Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto, por disponibilizar o Laboratório de Tecnologia Farmacêutica para execução deste trabalho, pelo acolhimento e ajuda.
- A Prof^ª. Dr^ª. Monica Felts de La Roca Soares, pelo incentivo e por me integrar em seus trabalhos.
- Ao Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas, pela amizade, pelo exemplo de dedicação à vida acadêmica, pela presteza em ajudar e por ter me integrado às atividades de seu grupo de pesquisa.
- Aos professores membros do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por contribuírem com meu crescimento científico, em especial ao Prof. Dr. Prof. Dr. Lívio Cesar Cunha Nunes, pela amizade e entusiasmo.
- Ao Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes, por me iniciar na vida científica.
- Ao Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM), coordenado pelo Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto, pelo estágio, por terem me acolhido em sua equipe, por todas as análises, enfim, por possibilitar a execução deste trabalho. Minha gratidão a todos os colegas pela troca de experiências, agradeço em nome de Larissa Rolim, pela especial dedicação, atenção e presteza em todas as minhas idas à Recife.
- À Farmácia Galeno, por doar amostras de dapsona, pela oportunidade, aprendizado, confiança depositada. Agradeço em nome da Dr^ª. Virginia Regina Barbosa de Carvalho Castelo Branco e Ana Karina Marques Fortes Lustosa, pela amizade, apoio fundamental para execução deste trabalho, incentivo imensurável, carinho diário. Sempre serei grata.
- A meus pais, Mário dos Reis Coêlho e Maria Elza Cunha Ladeira Coêlho, pelo amor, esforço, dedicação infindável, por me ensinarem a ser o que sou com poucas críticas e conselhos, mas, bem mais, com seus exemplos de vida.
- Aos meus irmãos, Marissa e Júnior, meus companheiros de todos os dias, pelo amor, pelos sorrisos, pelas conversas que tornam meus dias felizes.
- A toda minha família, meu alicerce, que me apoiou em mais essa jornada, ainda que a maioria deles ainda desconheça a pós-graduação. Agradeço em nome da Tia Maria Luiza (*in memorian*), que lutou sempre por seus estudos e do Tio Clodomir, cujos conselhos sempre me encorajaram a alçar vôos mais altos.

- Ao Saymonl, pelo amor. Por ser ajuda, quando precisei; por ser segurança na incerteza, por ser alegria na dificuldade; por ser estímulo, quando não via sentido; por ser paz na turbulência da vida. Obrigada por me acompanhar e apoiar em tudo e sempre.
- Aos meus colegas de Mestrado, pelos momentos de aprendizado, de troca, de alegrias, em especial a Amanda Campos Fortes, pela amizade, presença e ajuda.
- Aos meus queridos amigos, nenhuma vitória tem valor se não é compartilhada! Aos poucos e bons, que são minha família linda, meus presentes! Agradeço a todos em nome de Adriana Marreiro, pelo amor, palavras, incentivo, ajuda, companhia e direcionamento. Obrigada por me ensinarem a ser especial como vocês são pra mim.
- A Raquel, Daniel, Lília e Júlia, minha família recifense, por toda amizade, ajuda, apoio nos momentos em que mais precisei, verdadeiros presentes que o mestrado me deu.
- Aos alunos de Estágio à Docência em Introdução à Farmácia, muito obrigada pela experiência incrível, minha primeira experiência como professora e a primeira experiência deles como alunos universitários.
- Aos meus alunos do curso de graduação em Farmácia da UFPI, pela vivência. Obrigada por me ensinarem a cada aula.
- A CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa.

“O senhor não daria banho a um leproso nem por um milhão de dólares?”

Eu também não. Só por amor se pode dar banho a um leproso.”

Madre Teresa de Calcutá

COELHO, Mayara Ladeira. **Estudos de pré-formulação do fármaco dapsona: desenvolvimento de métodos analíticos e avaliação da estabilidade.** Orientador: José Lamartine Soares Sobrinho. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2012.

RESUMO

A dapsona (DDS), juntamente com a clofazimina e a rifampicina, faz parte do esquema poliquimioterápico estipulado pela Organização Mundial de Saúde e Ministério da Saúde para tratamento da hanseníase, que se trata de uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*. O Brasil continua sendo o segundo país em número de casos no mundo, após a Índia. A monitorização da estabilidade dos medicamentos é um dos métodos mais eficazes para avaliação, previsão e prevenção de problemas relacionados à qualidade do produto durante a validade. A segurança e a eficácia também podem ser avaliadas, através do monitoramento da formação de produtos de degradação, que podem gerar perda de atividade terapêutica ou toxicidade. Neste sentido, inicialmente foi desenvolvida e validada uma nova alternativa analítica para quantificação da dapsona por espectrofotometria UV. O método farmacopeico atual utiliza metanol como solvente, sendo este tóxico. Desse modo, os solventes selecionados para o método foram etanol e água purificada. Posteriormente, a fim de alcançar a qualidade e aumento no perfil de segurança no processo de pré-formulação farmacêutica, o fármaco teve suas características físico-químicas abordadas por meio de técnicas específicas através de perfis térmicos, difratométricos, químicos e morfológicos, os quais permitiram aprofundar o conhecimento das características físico-químicas do fármaco, essenciais para padronização e estabelecimento de condições de estabilidade desse ativo. Posteriormente, a estabilidade da DDS em misturas binárias com excipientes foi avaliada por meio de calorimetria exploratória diferencial como critério de exclusão. Para o delineamento da estabilidade deste composto foi realizado o estudo de estabilidade forçada da DDS utilizando condições de estresse hidrolítico alcalino (NaOH 0,1 N) ácido (HCl 0,1 N), neutro (H₂O), oxidativo (H₂O₂ 3%) e fotolítico (com associação de lâmpadas ultravioleta e branca fria), as quais foram avaliadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O método indicativo de estabilidade para detecção e quantificação da DDS e seus produtos de degradação foi desenvolvido e validado, possibilitando a avaliação do teor de DDS nas amostras degradadas além de serem identificados, por espectrometria de massa, dois de seus produtos de degradação.

Palavras-chave: Dapsona, Estudo de pré-formulação; Método indicativo de estabilidade

COELHO, Mayara Ladeira. **Preformulation studies of drug dapsone: development of analytical methods and stability assessment.** Advisor: José Lamartine Soares Sobrinho. Master's Dissertation. Post-Graduation Program in Pharmaceutical Sciences. Federal University of Piauí, Teresina, 2012.

ABSTRACT

Dapsone (DDS), together with clofazimine and rifampicin, is part of multidrug therapy provided by the Health Ministry and World Health Organization for treatment of leprosy, it is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*. Brazil remains the second country in number of cases in the world after India. Monitoring the stability of medicines is one of the most effective methods for assessment, prediction and prevention of related problems to the quality of product during the term. The safety and efficacy can also be evaluated by monitoring the formation of degradation products, which can lead to loss of therapeutic activity or toxicity. In this sense, was initially developed and validated a new alternative for analytical quantification of dapsone by UV spectrophotometry. Since the current pharmacopoeial method using methanol as solvent, and this is toxic, the solvents were selected for ethanol and purified water. Subsequently, in order to achieve the quality and increase the safety profile in the pharmaceutical pre-formulation, the drug had its physicochemical characteristics. Thus, thermal, diffractometric, morphological and chemical, profiles were obtained through specific techniques, which allowed deepening knowledge of physical chemical drug properties, essential for standardization and establishment of stable conditions. Subsequently, the stability of DDS with excipients, binary mixtures were evaluated by differential scanning calorimetry as exclusion criteria. For the design of the stability of this asset was performed forced stability study of DDS using basic hydrolytic stress conditions (NaOH 0.1 N) acid (HCl 0.1 N), neutral (H₂O), oxidative (H₂O₂ 3%) and photolytic (with a combination of ultraviolet and cool white bulbs), which were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). The method indicative of stability for detection and quantification of DDS and its degradation products was developed and validated, enabling the evaluation of the amount of the degraded samples DDS and are identified by mass spectrometry, two of its degradation products.

Key-words: Dapsone, Preformulation study; Stability-indicative method.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1 - Estrutura molecular da dapsona 32

Capítulo I

Figura 1 - Relação das entidades que tornaram compulsórias as exigências de estudos de estabilidade em medicamentos no mundo e no Brasil. 53

Figura 2 – Evolução dos estudos em estabilidade de fármacos e medicamentos 55

Capítulo II

Figura 1- Especificidade do método analítico por Espectro UV-Vis 84

Capítulo III

Figura 1 – Estrutura química da dapsona 93

Figura 2 – Esquema de caracterização físico-química da DDS 95

Figura 3 - Espectro de IV da DDS 98

Figura 4 - Espectro UV visível da dapsona 98

Figura 5 – Eletromicrografias da DDS em diferentes aumentos a) 100x, b) 300x, c) 2000x 99

Figura 6 - Difratoograma da DDS 100

Figura 7 – Curva TG e DTA da DDS, razão de aquecimento 10^o/min 101

Figura 8 - Curvas de TG da DDS obtidas a partir de razões de aquecimento crescentes (2,5; 5; 10; 20; 40°C/min) e associação com o gráfico de Ozawa. 102

Figura 9 - Curvas isotérmicas da DDS em diferentes temperaturas na atmosfera de N₂ (50 mL min⁻¹) 103

Figura 10- Curvas DTA da DDS e das misturas binárias DDS: Excipiente. 1:DDS, 2-DDS: Celulose, 3-DDS:Amido, 4- DDS:Estearato de magnésio, 5-DDS:Glicolato de amido sódico 6- DDS:PVP, 7- DDS:βCD, 8- DDS:MβCD 105

Figura 11- Curvas TG e DTG, Razão de 10 °C/min, DDS e mistura binária ---- A: DDS: Celulose, B-DDS:Amido, C- DDS:Estearato de magnésio, D-DDS:Glicolato de amido sódico. 105

Figura 12 - Curvas TG e DTG, Razão de 10 °C/min - , DDS e mistura binária ---- E- DDS:PVP; F- DDS:βCD; G- DDS:MβCD. 106

Capítulo IV

Figura 1- Cromatogramas obtido após o estudo de degradação da DDS	122
Figura 2 – Linearidade do método	124
Figura 3 – Gráfico representativo da degradação da DDS por fotólise, seguindo reação de primeira ordem	126
Figura 4 - Espectros de massa da DDS (a) e dos produtos de degradação PD – 1 (b) e PD – 2 (c)	127
Figura 5 – Prováveis estruturas químicas de 2 produtos de degradação da DDS	127
Figura 6 - Cromatograma de uma amostra de comprimidos de DDS condições de estabilidade acelerada por 6 meses.	128

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Revisão Bibliográfica

Tabela 1 - Termos descritivos de solubilidade e seus significados	35
Tabela 2 – Classificação dos testes, segundo a sua finalidade – RE N°899/2003 – ANVISA	43
Tabela 3 - Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade	44

Capítulo I

Quadro 1. Guias de estabilidade internacionais	57
Quadro 02. Principais diretrizes para testes de estabilidades do ICH.	58
Tabela 1. Parâmetros para a realização dos estudos de estabilidade (BRASIL, 2005).	64
Quadro 3. Tipos e principais objetivos e finalidades dos estudos de estabilidade	66
Tabela 2. Zonas Climáticas segundo a OMS para realização de estudos de estabilidade	67
Tabela 3 – Condições de armazenamento para condução de estudos de estabilidade de longa duração definidas pela ANVISA	67

Capítulo II

Tabela 1- Teste de solubilidade em solventes diferentes de acordo com a Farmacopeia Brasileira.	83
Tabela 2 - Estabilidade da solução de dapsona nos tempos 0, 24 e 48 horas depois da preparação, através de análises espectrofotométricas.	84
Tabela 3 - Especificidade do método analítico, utilizando a CLAE-DAD como padrão.	85

Capítulo III

Tabela 1- Resultados de área superficial e porosidade da DDS	100
--	-----

Capítulo IV

Tabela 1- Parâmetros avaliados no desenvolvimento do método	119
Tabela 2 - Resultados das seleções de variáveis	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASAP	Analizador de Área Superficial de Poros
ATR	Reflectância Total Atenuada
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CD	Ciclodextrinas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DAD	Detector de arranjo diodo
DDS	Dapsona
DRX	Difração de raios X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTA	Análise Térmica Diferencial
EUA	Estados Unidos da América
EMg	Estearato de Magnésio
FDA	Food and Drug Administration
IFA	Ingrediente Farmacêutico Ativo
ICH	International Conference on Harmonization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
IV-TF	Infravermelho com Transformada de Fourier
IT-TOF	Ion trap time of flight
LC-MS	Cromatografia líquida com detector de massas
TG / DTG	Termogravimetria / Derivada termogravimétrica

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	graus Celsius
nm	Nanômetro
M	Molar
Kg	Quilogramas
KV	Quilovolts
µg	Microgramas
ΔH	Varição de entalpia
µm	Micrometro
J.g ⁻¹	Joule por gramas
ΔE	Varição de energia
mM	Milimolar
dap	Densidade Aparente
dcp	Densidade Compactada
g	grama
mg	miligrama
NaOH	Hidróxido de Sódio
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HCl	ácido clorídrico
Å	ångström
m ² /g	metro quadrado por grama
2θ/s	dois teta por seundo
cm ⁻¹	Centímetro elevado a menos 1
>	maior que
<	menor que
L	litro
A	fator de frequência
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 OBJETIVOS	25
1.2 Objetivo Geral	26
1.3 Objetivos Específicos	26
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	27
3.1. Hanseníase	28
3.2. Dapsona	30
3.3. Estudo de pré-formulação	33
3.3.1. Solubilidade	34
3.3.2. Análises Térmicas	35
3.3.3. Compatibilidade fármaco-excipiente	36
3.3.4. Testes de estabilidade	37
3.3.5. Estudos de degradação	38
a. Hidrólises	39
b. Oxidação	39
c. Fotólise	40
3.3.6. Estudo das Cinéticas de Degradação	40
3.4. Validação de métodos analíticos	41
3.4.1. Especificidade e Seletividade	43
3.4.2. Linearidade	39
3.4.3. Intervalo	44
3.4.4. Precisão	44
3.4.4.1. Repetitividade	44
3.4.5. Limite de detecção e limite de quantificação	45
3.4.6. Exatidão	46
3.4.7. Robustez	46
3.4.8. Estudos de estabilidade na validação de métodos analíticos	46
4. CAPÍTULO I: Estabilidade de fármacos e medicamentos: a evolução dos assuntos regulatórios no Brasil e no mundo	47
Resumo	48
Abstract	49
1. Introdução	50
2. Evolução dos estudos em estabilidade de fármacos e medicamentos	51

3. Diretrizes Internacionais	56
4. Diretrizes do MERCOSUL	57
5. Diretrizes do Brasil	61
6. Correlações entre a legislação brasileira e os guias internacionais	64
7. Considerações Finais	68
8. Referências Bibliográficas	69
5. CAPÍTULO II: Nova alternativa analítica para quantificação do antilepromatoso dapsona por espectrofotometria UV	74
Resumo	75
Abstract	76
Introdução	77
Material e métodos	78
Resultados e Discussão	82
Conclusão	86
Referências bibliográficas	87
6. CAPÍTULO III: Estudo de pré-formulação do fármaco dapsona: caracterização físico-química, estabilidade térmica e compatibilidade frente a excipientes.	89
Resumo	90
Abstract	91
Introdução	92
Material e métodos	93
Resultados e Discussão	97
Conclusão	105
Referências	106
7. CAPÍTULO IV: Estudo de degradação forçada da dapsona por CLAE – DAD e CLAE – EM	111
Resumo	112
Abstract	113
Introdução	114
Materiais e métodos	115
Resultados e discussão	119
Conclusão	128
Referências	129
8. CONCLUSÕES	134

9. PERSPECTIVAS	136
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	138
11. PRODUÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA	149
11. APÊNDICE	151

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica provocada pelo *Mycobacterium leprae*, bactéria também conhecida como Bacilo de Hansen, em virtude de sua descoberta no ano de 1873 pelo cientista norueguês Gerhard Armauer Hansen (GOULART et al., 2002; KUSTNER et al., 2006). Ela é considerada um problema de saúde pública com consequências sociais, de discriminação e estigmatização (BRAGHETTO, 2007).

O Brasil continua sendo o segundo país em número de casos de hanseníase no mundo, após a Índia (ARAÚJO, 2003). Aproximadamente 94% dos casos conhecidos nas Américas e 94% dos novos diagnosticados são notificados no Brasil. Em 1981 a OMS definiu novos esquemas terapêuticos, utilizando a associação da Dapsona (DDS), rifampicina e clofazimina para o tratamento da hanseníase. Ao longo das duas últimas décadas, as taxas de prevalência têm se declinado ano a ano, resultado da consolidação do esquema politerápico. Entretanto, as taxas de detecção de casos novos têm se mantido elevadas, estimando-se que na próxima década serão registrados mais de 5 milhões de novos casos e cerca de 1 milhão de pessoas com problemas neuromotores irreversíveis. Apesar de não mortal, a hanseníase pode acarretar invalidez severa e/ou permanente se não for tratada a tempo (RICHARDUS & HABBEMA, 2007; CAMBAU et al, 1997; ARAUJO, 2003; BRASIL, 1998, 1999, 2006).

A dapsona (DDS; 4, 4'- Diamino-Difenil-Sulfona) encontra-se no centro de toda terapêutica anti-hansênica e age através da competição com o ácido para-aminobenzóico (PABA), diminuindo ou bloqueando a síntese do ácido fólico bacteriano (GOULART et al., 2002). A meia vida de eliminação da dapsona é de 20 a 30 horas, porém este fármaco pode permanecer por até 3 semanas após a interrupção do tratamento em órgãos como fígado, rins, pele e músculos (MELLO, 2005; MIZIARA et al; 1992). Lindenberg e colaboradores (2004) classificaram a dapsona como fármaco pertencente à Classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), ou seja, possui baixa solubilidade e alta permeabilidade, enquanto Cao e colaboradores (2006) sugerem Classe IV, atribuída à baixa solubilidade e baixa permeabilidade. Essas características tornam difícil e ainda mais problemática sua formulação.

Atualmente, moléculas com limitada solubilidade em água estão se tornando o principal alvo de pesquisa nas indústrias farmacêuticas, uma vez que elas podem ocasionar uma série de desafios no desenvolvimento de fármacos e ainda promover uma lenta dissolução do mesmo em fluidos biológicos, comprometendo sua eficácia e acarretando problemas de toxicidade (BLAGDEN et al., 2007). Este problema ainda pode ser maior

quando se trata de medicamentos em formas sólidas e suspensões, uma vez que após administração a substância ativa deve estar solubilizada no fluido intestinal a fim de atravessar a membrana e ser transportada até seu alvo de ação (CLARYSSE et al., 2011).

Em relação aos efeitos adversos relacionados ao esquema empregado na hanseníase, a literatura em uma avaliação mais criteriosa apresenta com frequência quadros de metemoglobinemia, agranulocitose e anemia hemolítica associados à exposição à DDS. Estes efeitos são ampliados por sua administração em associação com outros fármacos (COLEMAN, 1995; LANDERS et al., 1996; WARD & McCARTHY, 1998; QUEIROZ et al., 1997; SALAMAT & WATSON, 2003).

Testes de degradação forçada mostram-se como essenciais dentro do planejamento para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica, bem como para fármacos já em produtos comercializados, pois a investigação da estabilidade intrínseca do fármaco fornece abordagens de formulação e indica tipos de adjuvantes, aditivos de proteção específicos e de acondicionamento, que provavelmente melhorarão a integridade do fármaco e do produto, além de esclarecer os possíveis produtos de degradação que podem ser obtidos a partir do mesmo sob condições extremas (OLIVA et al, 2006; ICH Q8; SOARES-SOBRINHO et al, 2010; SOVIZI et al, 2010; RODANTE et al, 2001).

Apesar de sua larga utilização no tratamento da hanseníase, pouco se sabe sobre suas propriedades físico-químicas, as quais são fundamentais para o desenvolvimento de um medicamento eficaz e seguro, além de que a investigação da estabilidade intrínseca do fármaco fornece abordagens de formulação e indica tipos de adjuvantes, aditivos de proteção específicos e de acondicionamento, que provavelmente melhorarão a integridade do fármaco e do produto. Dessa forma, a caracterização do princípio ativo deve ser o primeiro passo no delineamento do medicamento, de modo que as informações obtidas por meio desta prática possibilitem uma abordagem racional ao desenvolvimento da mesma (SOARES-SOBRINHO et al, 2010; SOVIZI et al, 2010; RODANTE et al, 2001).

Torna-se necessário o desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade capaz de separar e quantificar os produtos de degradação da DDS, o que é de extrema importância para a elucidação e avaliação da toxicidade.

Nesse contexto, faz-se necessário o conhecimento sistemático das propriedades físico-químicas das substâncias ativas, já que ela pode influenciar o desempenho do medicamento e sua fabricação, devendo ser identificadas e discutidas (ICH, Q8). As informações e os conhecimentos adquiridos a partir dos estudos de pré-formulação fornecem uma compreensão

científica para apoiar a criação de um espaço de *design*, o que desenvolve uma base para a gestão dos riscos envolvidos capazes de prejudicar a qualidade do produto (ICHQ8; RATHORE, WINKLE, 2009).

Constata-se que a terapia atual para hanseníase, cujo fármaco de escolha inclui a dapsona na forma de dosagem de um comprimido de liberação imediata, não é adequada para a administração em recém-nascidos, crianças e idosos (IGNOTTI, et al., 2001; SAVASSI, 2010).

Embora esteja verificada a necessidade de uma melhor terapia para os portadores de hanseníase, há um fator agravante nesse contexto, o desinteresse de grandes indústrias farmacêuticas em pesquisas neste sentido, já que a doença não é considerada lucrativa pelas grandes companhias internacionais. Sendo a hanseníase classificada pela OMS como uma doença negligenciada, ou seja, está inserida na classe de doenças que afetam milhares de pessoas, mas não apresentam atrativos econômicos para investimentos devido a sua ocorrência principalmente em países em desenvolvimento (MOREL et al., 2005; DNDi, 2001).

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver um estudo de estabilidade forçada da DDS, a partir de diferentes métodos, bem como avaliar as cinéticas degradativas para os casos em que o fármaco foi considerado instável com alterações substanciais. Além de desenvolver um método indicativo de estabilidade e validá-lo segundo ICH e ANVISA, o qual pode, posteriormente, ser utilizado para o monitoramento do estudo de estabilidade acelerada na proposição de uma nova formulação racional para hanseníase.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Realizar o estudo de pré-formulação do anti-hansênico dapsona.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Caracterizar físico-quimicamente a matéria prima, dapsona;
- ✓ Desenvolver e validar métodos analíticos aplicados ao controle de qualidade;
- ✓ Realizar estudo de compatibilidade térmica da DDS com excipientes;
- ✓ Desenvolver e validar método analítico indicativo de estabilidade capaz de detectar e quantificar simultaneamente o DDS e seus produtos de degradação;
- ✓ Realizar o estudo de degradação térmica da DDS;
- ✓ Realizar o estudo de degradação hidrolítica da DDS em condições ácida, básica e neutra;
- ✓ Realizar o estudo de degradação fotolítica do fármaco nas condições pré-estabelecidas pela ANVISA e ICH;
- ✓ Realizar o estudo de degradação oxidativa do fármaco com peróxido de hidrogênio;
- ✓ Determinar a cinética de degradação do fármaco;
- ✓ Determinar os possíveis produtos de degradação em cada estudo.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Hanseníase

As doenças negligenciadas afetam milhares de pessoas ao redor do mundo, mas não dispõem de tratamentos eficazes ou adequados. Em sua maioria, são doenças infecciosas que atingem principalmente pessoas de baixa renda, como exemplo, a hanseníase na América Latina, que gera um impacto devastador sobre a humanidade (LEONARDI et al., 2009).

Um estudo divulgado pela organização não-governamental Médicos sem Fronteiras constatou que nos últimos 25 anos foram registradas somente 15 novas drogas contra doenças negligenciadas e 179 para distúrbios cardiovasculares (ÁVILA, 2001). Outro estudo sobre o financiamento mundial de inovação para doenças negligenciadas revelou que menos de 5% deste financiamento foram investidos no grupo das doenças extremamente negligenciadas (MORAN, 2009), ou seja, hanseníase, leishmaniose visceral e doença de Chagas, ainda que mais de 500 milhões de pessoas sejam ameaçadas por estas três doenças (DNDi, 2011).

A hanseníase, doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium leprae*, já afetou mais de 15 milhões de pessoas em todo o mundo. No passado, devido à inexistência de uma quimioterapia eficaz, os pacientes diagnosticados com hanseníase eram dirigidos a grandes instituições longe da cidade, de onde não mais saíam. Essas instituições, chamadas de “leprosários”, foram responsáveis por um tratamento excludente ao longo dos séculos e agregaram uma imagem de terror à doença, tendo como consequência um estigma social ao simples contato com o doente, já que este apresenta ulcerações na pele e deformidades nas extremidades. Esta deformação do “leproso” provocou horror ao doente, à doença e aos seus familiares (MARCIEL, 2004).

A despeito da redução global da prevalência da doença, aproximadamente 240.000 casos novos foram detectados em 2009 (WHO, 2010b), e alguns países incluindo o Brasil, mantem regiões com elevada endemicidade (WHO, 2010b; NARAIN et al., 2010). Segundo modelos matemáticos para projeções futuras, em 2020 aproximadamente um milhão de pessoas estará portando o grau 2 de incapacidade decorrente da hanseníase (RICHARDUS & HABEMA, 2007).

Na década de 70, a hanseníase exigiu enfoque mais abrangente dos seus programas de controle devido a seu problema epidemiológico. Ações nesse sentido culminaram em 1981, com o lançamento pela Organização Mundial da Saúde (OMS) de um novo regime de

tratamento medicamentoso, a poliquimioterapia (PQT), o qual tem como princípio a associação da rifampicina, dapsona e clofazimina (ARAÚJO, 2005; WHO, 1982).

O sucesso da PQT como principal estratégia do programa mundial de controle da hanseníase permitiu a instituição do conceito da alta por cura após regimes fixos e tratamento. Por conseguinte, em 1991, a Assembléia Mundial da Saúde estabeleceu a meta de eliminação da hanseníase como problema de saúde pública (WHO, 1991), o que comprometeu os governos dos países signatários a concentrar esforços a atingir os níveis de prevalência global com menos de um doente com hanseníase por 10.000 habitantes.

Com isso, houve uma redução drástica da prevalência global (WHO, 1995; WHO, 2009). Com a redução dos níveis de prevalência da ordem de 90% e o índice global a menos de um doente por 10.000 habitantes, a meta da eliminação da hanseníase como problema de saúde pública, como previamente estabelecido foi atingida no ano de 2000 (WHO, 2004). Apesar do sucesso da PQT em promover a alta por cura de milhões de pacientes, a queda progressiva da prevalência não foi acompanhada pela redução da detecção de casos novos, que persiste elevada ou mantida em aglomerações de alguns países e territórios; atualmente, dezesseis países são detentores de 95% dos casos novos detectados no mundo (BARRETO, 2011; WHO, 2005; WHO, 2009; WHO, 2010b).

A idéia da eliminação foi baseada na hipótese de que a prevalência com menos de um caso por 10.000 habitantes proporcionaria a interrupção da transmissão da hanseníase na comunidade (LOCKWOOD & SUNEETHA, 2005). No entanto, a hanseníase possui um longo período de incubação, variando de dois até 20 anos, e doentes diagnosticados podem ter transmitido sua doença para familiares ou na comunidade muito antes da sua doença ter sido detectada. Portanto, o controle da hanseníase baseado exclusivamente nas taxas de prevalência tem sido criticamente reavaliado (BARRETO 2011; MEIMA et al., 2004; LOCKWOOD & SUNEETHA, 2005; RICHARDUS & HABBEMA, 2007).

No Brasil os valores do indicador prevalência oscilaram entre 29,37/100.000 (muito alto) em 2003, a 19,64/100.000 (alto), em 2009 (BRASIL, 2010a). A prevalência da doença é medida pelo registro de pacientes recebendo tratamento em definido momento e expressam a razão utilizando a população como denominador. Portanto a prevalência é afetada pelos aspectos operacionais, como período de tratamento. O quadro é diferente quando a taxa de detecção de casos novos é empregada ao invés da taxa de prevalência. A detecção de casos novos é o melhor indicador por não ser afetado pela mudança da definição de caso ou duração do tratamento (LOCKWOOD & SUNEETHA, 2005).

Apesar de não mortal, a hanseníase pode acarretar invalidez severa e/ou permanente se não for tratada a tempo. Hoje, a doença é tratada com antibióticos através de esquemas poliquimioterápicos preconizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e Ministério da Saúde (MS). O tempo de tratamento oscila entre 6 e 24 meses, de acordo com a gravidade da doença (JUNQUEIRA, 2002).

A epidemiologia da hanseníase, particularmente sua distribuição geográfica, permanece com numerosas lacunas e enigmas. Várias das principais áreas, historicamente, endêmicas no mundo encontram-se sob o clima tropical, elevadas temperaturas e precipitações pluviométricas. Entretanto, em regiões de clima temperado e frio as incidências já foram altas, não obstante fosse eliminada sem uma explicação definitiva (MEIMA, 2002).

3.2 Dapsona

Durante muito tempo, o único tratamento para hanseníase baseava-se na utilização do “óleo de chalmogra”, planta originária da Ásia, e descrita nas antigas farmacopéias hindu e chinesa como terapêutica para doenças de pele, especialmente para hanseníase. Porém sua eficácia não era comprovada, pois os casos em que aparentava alguma atividade terapêuticas eram aqueles que regrediam naturalmente (SKINSNES, 1972).

A partir das descobertas de Faget, nos anos quarenta, um novo tratamento para hanseníase foi implantado. Baseava-se na utilização de um esquema terapêutico monoterápico, com a utilização de sulfonas (diamino-difenil-sulfonas e seus derivados). A dapsona firmou-se como o principal fármaco anti-hansênico e estratégico para o controle da doença na década de 1950; porém descoberta em 1937 (ARAÚJO, 2005; BRAGHETTO, 2007). Porém, esse tratamento não obteve muito sucesso, já que era muito demorado, geralmente, o paciente passava toda a vida em terapia, além de desenvolver a resistência ao medicamento, não contribuindo para o controle da doença (ARAÚJO, 2005; JUNQUEIRA, 2002).

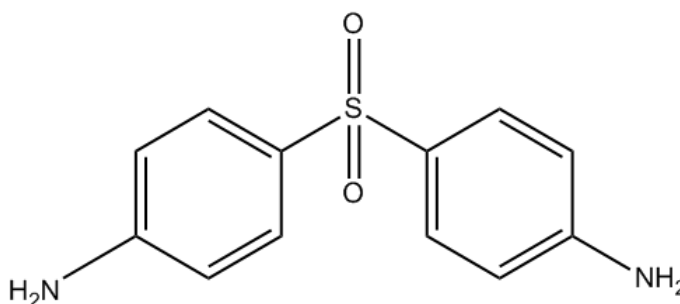
Posteriormente, a partir de 1962, a clofazimina (CFZ) testada por Browne & Hogerzeil e a rifampicina (RMP), por Opromolla, também começaram a ser utilizadas no tratamento da hanseníase.

Em 1981, a OMS introduziu a PQT já descrita e em 1986 essa terapia começou a ser implementada no Brasil e, em 1991, foi adotada oficialmente pelo Ministério da Saúde (MS) (MIZIARA et al., 1992; TALARICO; METRO, 2005).

Logo, o tratamento da hanseníase compreende: quimioterapia específica, supressão dos surtos reacionais, prevenção de incapacidades físicas, reabilitação física e psicossocial. Este conjunto de medidas deve ser desenvolvido em serviços de saúde da rede pública ou particular, mediante notificação de casos à autoridade sanitária competente. As ações de controle são realizadas em níveis progressivos de complexidade, dispondo-se de centros de referência locais, regionais e nacionais para o apoio da rede básica. O Ministério da Saúde (MS) regulamenta o assunto através da portaria de número 1073/GM publicada em 28/09/2000 no Diário Oficial da União, disponível no site www.saude.gov.br (ARAÚJO, 2003).

Em especial, trata-se a dapsona (4,4'-diaminodifenilssulfona), também chamada de DADPS, Dapsonum, DDS, diafenilsulfona, e sulfonildianilina (figura 1).

Figura 1. Estrutura molecular da dapsona



Fonte: arquivo pessoal

Seu emprego em patologias de notificação compulsória como a hanseníase, a malária e como tratamento coadjuvante na pneumonia *Pneumocystis carinii* em pacientes portadores de SIDA, coloca a dapsona como fármaco referência na terapêutica clínica incluindo-o na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais – RENAME (ANVISA, 2002; WHO, 2007).

Quando administrada por via oral a dapsona é rápida e quase completamente absorvida no trato gastrointestinal, tem elevada ligação às proteínas (70 a 90%) e biodisponibilidade de 70 a 80%. O tempo de meia-vida é de 20 a 30 horas (média de 28 horas). Após administração oral, a concentração sérica máxima ocorre entre 2 a 6 horas (AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEM PHARMACISTS, 2006). O fármaco sofre biotransformação hepática, resultando na dapsona monoacetilada e dapsona hidroxilamina, ambas com atividade baixa e que não contribuem para o efeito terapêutico da dapsona.

Entretanto, o metabólito hidroxilamina é responsável pela toxicidade do fármaco, contribuindo para os efeitos adversos de hemólise e metahemoglobinemia. A dapsona apresenta eliminação renal (70 a 85%) na forma inalterada e, em menor proporção, nos seus metabólitos – N-glicuronídeo e N-sulfamato. Uma pequena fração do fármaco livre é eliminada pela bile, por reabsorção, o que explica a persistência da dapsona no plasma durante várias semanas após a suspensão do tratamento (GRUNWALD e AMICHAI, 1996; MARTINDALE, 2002).

Quanto à toxicidade, a hemólise é o efeito tóxico mais comum, incluindo a anemia hemolítica, em pacientes com ou sem deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (GRUNWALD, AMICHAI, 1996; AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEM PHARMACISTS, 2006).

Devido aos altos custos nas pesquisas de novos insumos farmacêuticos ativos (IFAs), atualmente há a necessidade de um estudo mais aprimorado de caracterização e de estabilidade da dapsona, tendo em vista o amplo uso deste fármaco. Estes estudos visam obter maior conhecimento sobre o IFA e otimizar o tratamento para o mal de Hansen.

Considerando que o acompanhamento da saúde dos pacientes com hanseníase, é responsabilidade do Ministério da Saúde, este em acordo com o laboratório Novartis distribui gratuitamente os medicamentos para a poliquimioterapia da doença (MS, 2010).

A averiguação de tamanho das partículas e sua distribuição do fármaco é pré-requisito fundamental para muitas operações de produção e processamento que envolvem materiais na forma de pó. Partículas esféricas apresentam um comportamento previsível por modelos relativamente simples. Desvios da forma esférica ou, formas difíceis de serem descritas por figuras geométricas simples (LOWEL, SHIELDS, 1991) têm um desempenho mais difícil de ser previsto.

Vários fatores podem afetar nas propriedades farmacocinéticas e farmacológicas do medicamento. Um deles é o tamanho de partícula, cujas faixas de especificações não são bem definidas na literatura. Verifica-se que as formulações produzidas a partir de diferentes tamanhos de partículas não são uniformemente bioequivalentes e a dose deve ser ajustada individualmente no caso de alteração de tipos de prescrições (AHFS, 2000).

Desta forma, é iminente a necessidade de rever e aprimorar a especificação ou caracterização da dapsona, uma vez que, só os testes farmacopeicos atualmente exigidos, não são suficientes para apontar diferenças sutis entre as matérias-primas.

A DDS apresenta-se como um pó cristalino branco ou levemente amarelado sem odor característico, pouco solúvel em água, coeficiente de partição óleo/água (Lop P = 1,32), fotossensível, com fórmula molecular $C_{12}H_{12}N_2O_2S$, e peso molecular de 248,3 daltons. O fármaco é solúvel em álcool, metanol, acetona e ácido clorídrico, porém é muito pouco solúvel em água (BRITISH PHARMAOPOEIA COMMISSION, 2005).

Inúmeros esforços, em todo o mundo, têm sido conduzidos na tentativa de aumentar a solubilidade e melhorar a biodisponibilidade de fármacos com características semelhantes à dapsona. Recursos técnicos como a micronização, a dispersão molecular, complexação de inclusão em ciclodextrina e a transformação da fase sólida em formas polimórficas ou amorfas têm sido empregadas no caso da dapsona (LOFTSSON, HREINSDOTTIR e MASSON, 2005; LIMA et al., 2008; GREBOGI, 2009).

A dapsona apresenta duas formas polimórficas - forma I (PF 180°C) e forma II (PF 175°C). Uma forma hidratada também é descrita (YANG e SWARBRICK, 1985; BORKA, 1991; GIRON, 1995). A compreensão da natureza polimorfa de um fármaco ou excipiente é de fundamental importância para o delineamento das formulações farmacêuticas. O fármaco pode sofrer alterações da forma cristalina durante processos como, por exemplo, secagem do granulado, moagem ou compactação. A mudança da forma cristalina pode acarretar alterações na temperatura de fusão, densidade, solubilidade, estabilidade física ou química, dissolução e biodisponibilidade de um fármaco e de sua formulação (CLAS, et al., 1999; YOSHIHASHI, et al., 2000).

Nesse contexto está a importância da caracterização físico-química do fármaco por técnicas diversas tais como, análise térmica, determinações do tamanho da partícula e da área superficial, espectrométricas (UV e IV), difração de raios X, e outras, a fim de melhorar a liberação do fármaco *in vitro*, e conseqüentemente *in vivo* (AMIDON et al., 1995; LINDENBERG et al., 2004).

3.3 Estudos de pré-formulação

Investigações sobre pré-formulação são projetadas para fornecer todos os dados necessários (especialmente físico-químicos, físico-mecânicos e propriedades biofarmacêutica do fármaco, excipientes e materiais de embalagem) que possam influenciar no desenvolvimento da formulação, no processo de produção, na farmacocinética, nas propriedades biofarmacêutica do produto final e na embalagem de acondicionamento escolhida (GOPINATH, NAIDU, 2011; SOARES-SOBRINHO, et al., 2010).

A primeira fase do estudo é a coleta de dados das propriedades físico-químicas do fármaco, avaliando a possível formação de sal e os excipientes adequados, antes do início da formulação. Esta etapa é conhecida como é pré-formulação (YU, 2008).

3.3.1 Solubilidade

Os estudos de solubilidade ganharam grande ênfase nos últimos anos, e sua importância pode ser constatada pela publicação da Resolução da Anvisa - RDC nº 31, de 11 de agosto de 2010, que declara obrigatório a realização desses estudos pelas indústrias farmacêuticas em suas formulações.

O efeito terapêutico de um fármaco depende da sua biodisponibilidade e da solubilidade das suas moléculas. A solubilidade é um dos parâmetros mais importantes para alcançar a concentração desejada do fármaco na circulação sistêmica, para se obter uma resposta farmacológica. Atualmente, apenas 8% dos novos fármacos possuem igualmente elevada solubilidade e permeabilidade (ALMEIDA, 2009).

A solubilidade de um soluto é a quantidade máxima de soluto que se pode dissolver numa determinada quantidade de solvente ou de solução a uma determinada temperatura. Por outras palavras, a solubilidade pode também ser definida como a capacidade de uma substância formar uma solução com outra substância. A substância a ser dissolvida é chamada de soluto, e o líquido em que o soluto se dissolve é chamado de solvente, que conjuntamente formam uma solução. A solubilidade de um fármaco é um parâmetro chave nos estudos de pré-formulação. As substâncias podem ser classificadas quanto à sua solubilidade (Farmacopéia Brasileira, 2011; HANSON, 1996; ROY et al., 2001).

Tabela 1 - Termos descritivos de solubilidade e seus significados

Solvente	Termo descritivo
Muito solúvel	menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10 000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	mais de 10 000 partes

FONTE: FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2011.

3.3.2. Análises Térmicas

O termo análise térmica (AT) refere-se a um grupo de técnicas em que uma propriedade física de uma substância e/ou seus produtos de reação são medidos como função da temperatura ou do tempo enquanto a substância é submetida a um programa de temperatura controlada (WENDLANDT, 1986).

Análise térmica está entre as técnicas mais utilizadas para analisar substâncias de interesse farmacêutico e resolver e ou identificar problemas na área da tecnologia farmacêutica. Revelam informações importantes sobre as propriedades físicas dos materiais como: estabilidade, compatibilidade, polimorfismo, cinética de decomposição, transição de fase, pureza, etc (REZENDE; SANTORO; MATOS et al., 2008, CIDES et al., 2006, ARAÚJO et al., 2003).

A Farmacopeia Japonesa, JP XIV, foi a primeira a descrever os métodos de análise térmica, mas sem nenhuma exigência em monografias. (BRASIL, 2003b). Agências regulatórias da área já indicam a importância da caracterização por meio de AT na definição de parâmetros de qualidade (MCGREGOR et al., 2004; FDA, 2000).

Dentre as técnicas de AT mais utilizadas estão a análise térmica diferencial (DTA), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG) (ARAÚJO et al., 2003).

A DTA é uma técnica na qual a amostra e o material de referência são aquecidos em um forno e a diferença de temperatura da amostra e do material de referência é registrada durante o aquecimento programado (FLAMMERSHEIM et al., 2003; KLANCNIK et al., 2010).

A TG é utilizada para medir a variação de massa em função da temperatura em uma atmosfera controlada sob um programa de aquecimento. Para fins farmacêuticos, seu uso é descrito na caracterização, determinação de pureza e de umidade, identificação de pseudopolimorfismo, na avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos e em estudos de cinética de degradação.

A DSC é utilizada para medir a diferença de fluxo de calor entre uma substância e um material de referência em função de um programa de aquecimento ou resfriamento. Na área farmacêutica é utilizada na caracterização térmica e determinação da pureza de fármacos, estudos de compatibilidade entre os constituintes da formulação e identificação de polimorfismo com determinação das entalpias de cada forma cristalina. Recentemente, muitos trabalhos em análise térmica têm sido publicados na área aplicada à indústria farmacêutica.

Vários estudos relacionados à aplicação da termogravimetria (TG) e calorimetria

exploratória diferencial (DSC) na caracterização, avaliação de pureza, compatibilidade de formulação farmacêutica, identificação de polimorfismo, estabilidade e decomposição térmica de fármacos e medicamentos encontram-se descritos na literatura (OLIVEIRA, et al., 2011; SOARES-SOBRINHO, 2010; SOVIZI, 2010; BALESTRIERI et al., 1996; RODANTE et al., 2002).

Desta forma, as indústrias brasileiras estão, cada vez mais, demonstrando o interesse neste âmbito. Os artigos publicados demonstram que os dados obtidos por análise térmica estão diretamente relacionados com a qualidade final de um produto farmacêutico, seja quanto à eficácia terapêutica do medicamento ou à estabilidade do mesmo ao longo do prazo de validade. Além disso, muitos órgãos regulamentadores de insumos e produtos farmacêuticos já descrevem a importância da análise térmica e dos parâmetros de qualidade dela provenientes (OLIVEIRA et al., 2011).

3.3.3. Compatibilidade fármaco-excipiente

Após a caracterização do fármaco, através de um apanhado das propriedades físicas, químicas e das peculiaridades ligadas à estrutura molecular, o fármaco deve ser formulado em uma forma farmacêutica adequada (GOPINATH, NAIDU, 2011). Embora, na maioria das vezes, os excipientes são julgados inertes, eles podem apresentar interação com o fármaco, e comprometer sua absorção e biodisponibilidade (STULZER et al., 2008).

Estudos de compatibilidade entre o fármaco e excipientes, durante a etapa de pré-formulação, ajudam na seleção de excipientes que aumentam a probabilidade de desenvolver uma formulação estável (VERMA & GARG, 2005; KUSTRIN et al., 2008, TITA et al., 2011). Apesar da importância dos testes de compatibilidade, não há nenhum protocolo oficial, emitido por agência regulatória como Anvisa, EMEA (*Europe Medicines Agency*) ou FDA (*Food and Drug Administration*) para esse propósito.

Técnicas de análise térmica são utilizadas para avaliar compatibilidade térmica entre fármaco excipientes através da interação entre os componentes pela mudança de aparência, ou o desaparecimento dos picos endotérmicos ou exotérmicos e ou variações nos valores de entalpia correspondente a mistura fármaco excipiente (TITA et al., 2011, BHARATE; BHARATE; BAJAJ., 2010).

Entretanto, para garantir resultados precisos e confiáveis é necessário associar técnicas de análise térmica com outras técnicas, como a difratometria de Raios X, espectroscopia de infravermelho e Raman (VERMA & GARG, 2004; SLAVIO et al., 2009).

3.3.4. Testes de estabilidade

A estabilidade de um fármaco ou medicamento é definida como a capacidade do produto manter-se dentro dos limites especificados e durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas condições e características que possuía quando da época de sua fabricação. Pode também ser definida como o período de tempo compreendido entre o momento no qual o produto está sendo fabricado àquela que sua potência está reduzida a não mais do que 10 %, desde que os produtos de alteração estejam todos seguramente identificados e previamente reconhecidos seus efeitos (YOSHIOKA & STELLA, 2002; BRASIL, 2005; WHO, 1996).

Estudo de estabilidade é uma etapa fundamental para garantir a qualidade e segurança de um medicamento. A partir desse estudo pode-se obter evidências sobre o comportamento das alterações de um medicamento ao longo do tempo, sob a influência de uma variedade de fatores, estabelecendo o prazo de validade, assim como as condições de armazenamento do medicamento (ICH, 1993; SEHAWAT, MAITHANI, SINGH, 2010).

Tais estudos são classificados em estresse ou crítico, acelerado, intermediário, de longa duração e de acompanhamento. (BRASIL, 2005, ICH, 2003, MERCOSUL, 1996).

Os estudos de estresse ou crítico são realizados sob condições drásticas e utilizados com o objetivo de identificar produtos de degradação e validar metodologia analítica, com a finalidade no desenvolvimento do produto (BRASIL, 2005; ICH, 2003).

O estudo acelerado é destinado a aumentar a velocidade de degradação química e/ou alterações físicas no produto farmacêutico pela utilização de condições forçadas de armazenamento (umidade relativa e temperatura), com o propósito de monitorar as reações de degradação e estimar o prazo de validade, dentro de 6 meses de estudo (BRASIL, 2005, ICH, 2003, MERCOSUL, 1996).

O estudo intermediário é utilizado para subsidiar os dados do estudo acelerado, bem como a documentação de registro, é realizado em condições ambiente (ICH, 2003).

O estudo de longa duração é realizado em condições normais de armazenamento, com o objetivo de confirmar dados obtidos no estudo acelerado (BRASIL, 2005; WHO, 1996). São projetados para verificação das características do produto farmacêutico durante e depois do prazo de validade esperado. Tal estudo deve ser realizado de acordo com as condições climáticas do país em que se pretende registrar o produto, considerando que o mundo classificado em quatro grandes zonas. Os testes de controle de qualidade são realizados normalmente a cada 3 meses no primeiro ano e a cada 6 meses no segundo, a partir da data de fabricação do lote (ICH, 2003).

O estudo de estabilidade de acompanhamento é realizado após concessão do registro ou notificação do produto, e tem por objetivo verificar se não foi introduzida nenhuma mudança na formulação ou no processo de fabricação que possa afetar adversamente a estabilidade do produto. Desta forma, assegura-se que um controle de mudanças efetivo está sendo adotado e seu impacto sobre o produto final avaliado periodicamente (BRASIL, 2005).

A realização destes estudos permite o desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade capaz de detectar e quantificar os produtos de degradação (PD) dos fármacos. Método este, utilizado para doseamento das formas farmacêuticas após estudo de estabilidade acelerada, de longa duração e de acompanhamento das formas farmacêuticas, a fim de avaliar em condições normais de armazenamento a produção destes degradados durante o armazenamento do produto farmacêutico (SINGH & BAKSHI, 2000; BAERTSCHI, 2005). Com isso, as prováveis mudanças que possam ocorrer durante o processo de formulação e produção, armazenamento e transporte poderão ser controladas, o que é relevante para a qualidade do produto farmacêutico e, conseqüentemente, para o bem estar do paciente (BAERTSCHI, 2006; HUYNH-BA, 2009; SEHRAWAT, MAITHANI, SINGH, R, 2010).

3.3.5. Estudos de degradação

Estudos de degradação ou testes de estresse são destinados a elucidar a estabilidade intrínseca de um fármaco, perfazendo a estratégia de desenvolvimento de medicamentos, sendo, normalmente, realizado em condições mais severas do que as utilizadas em estudos de estabilidade acelerada (KLICK et al., 2005). Esses estudos são um aspecto importante da pré-formulação e desenvolvimento de métodos analíticos, pois ajudam a avaliar a estabilidade intrínseca de um medicamento por aplicação deliberada de estresse para forçar degradação (QIU, et al., 2009).

A degradação da amostra pode ser induzida através de aumento da temperatura, do aumento da umidade (quando relevante) ou à luz (fotoestabilidade) ou pela adição de outros reagentes (por exemplo, ácidos, bases, peróxidos).

a. Hidrólises

Muitos fármacos são considerados como instáveis em meio aquoso e necessitam de intervenções durante a formulação e armazenamento, para que a eficácia e sua estabilidade e da forma farmacêutica final não sejam comprometidas. Para a avaliação da instabilidade sob a condição de hidrólise, também deve ser levado em consideração o pH do meio, pois íons

hidrogênio e hidroxila podem acelerar ou retardar o processo de degradação (ANSEL et al., 2007; SINKO, 2008).

Para realizar o estudo de estresse em condição de hidrólise ácida, utiliza-se principalmente ácido clorídrico e para a hidrólise básica utiliza-se hidróxido de sódio, sendo que, muitas variações são observadas no tempo e na temperatura de exposição de fármacos para essa condição. Existem poucos relatos na literatura sobre a hidrólise realizada em pH neutro, onde geralmente se utiliza água como agente de hidrólise. Nessa condição, a taxa de decomposição é lenta, o que é compreensível, porque reações em pH neutro são não-catalíticas e por isso podem ser necessários períodos muito longos sob condições de temperatura extremas, para conseguir quantidades suficientes de produtos de degradação (SINGH & BAKSHI, 2000; SILVA, et al., 2009).

As condições de estresse iniciais são realizadas, assumindo que o fármaco seja instável, portanto, sujeito a receber condições mais amenas. Dependendo dos resultados obtidos, aumenta-se ou diminui-se a concentração das condições de reação utilizada (SINGH & BAKSHI, 2000; SILVA, et al., 2009).

b. Oxidação

A degradação oxidativa é uma das principais causas de instabilidade de fármacos, dentre os mais conhecidos e estudados têm-se os esteróides, antibióticos, vitaminas, óleos e gorduras. A oxidação envolve a remoção de um átomo eletropositivo, radical ou elétron, ou a adição de um átomo eletronegativo ou radical. Muitas oxidações são reações em cadeia, que procedem lentamente sob a influência do oxigênio molecular. Tal processo de reação é referido como uma auto-oxidação (FLORENCE & ATTWOOD, 2003).

O peróxido de hidrogênio é utilizado para criar as condições de estresse empregadas para o estudo de oxidação. Esse parece ser muito mais popular para o propósito que qualquer outro agente oxidante. A concentração de peróxido utilizada varia entre 1% a 30% (SILVA, et al., 2009).

A estabilização de fármacos frente a condições oxidativas envolve a observação de um número de precauções durante a manufatura e estocagem. O oxigênio em recipientes farmacêuticos deve ser substituído por nitrogênio ou dióxido de carbono; assim como o contato com íons de metais pesados, que catalisam a oxidação, devem ser evitados e a estocagem deve ser a temperaturas reduzidas (FLORENCE & ATTWOOD, 2003).

c. Fotólise

Estudos de fotoestabilidade são conduzidos a fim de quantificar a extensão pelas quais as reações induzidas pela luz afetam as formulações dos medicamentos. Em alguns casos, determinar os mecanismos de fotoreações dos fármacos e de outros componentes que compunham o produto avaliado (PIECHOCK & THOMA, 2007).

Para o registro de produtos no Brasil, poderá ser necessária a comprovação da fotoestabilidade em adição aos testes de estabilidade de produtos farmacêuticos. A RE 01/2005 reporta as recomendações para realização desses estudos. A não apresentação do estudo de fotoestabilidade deve ser justificada tecnicamente com bases em evidências científicas de que os componentes do produto não sofrem fotodegradação ou que a embalagem primária não permite a passagem de luz (BRASIL, 2005; ICHQ1B, 1996).

3.3.7. Estudo das Cinéticas de Degradação

A degradação compreende uma ou mais reações, cuja velocidade pode ser calculada cineticamente. O estudo da cinética de degradação, fundamental para o estudo de fármacos e medicamentos, foi demonstrado inicialmente por Garret e Carper em 1955.

Apresenta como objetivos obter, experimentalmente, os dados cinéticos e correlacioná-los, por equações matemáticas, além de propor mecanismos para as reações de degradação e estabelecer condições para acelerar ou diminuir a velocidade das reações (NUDELMAN, 1975).

As velocidades de reação podem classificar-se como de ordem zero, primeira ordem ou segunda ordem, de acordo com os expoentes que afetam as concentrações dos reagentes. A ordem de reação é uma grandeza experimental, determinada a partir da lei de velocidade da reação química, verificando se a concentração de amostras retiradas no decorrer do tempo (NUDELMAN, 1975).

A reação de ordem zero ocorre quando a velocidade de reação é independente da concentração da substância ativa. Nesse caso, um gráfico de concentração (C) em função do tempo (t) dá origem a uma reta, cuja inclinação corresponde à constante de velocidade da reação (k). Quando a velocidade da reação depende da concentração do reagente, a reação segue cinética de primeira ordem, obtendo-se uma reta com a representação do logaritmo neperiano da concentração (ln C) em função do tempo (t). A cinética de segunda ordem ocorre quando a velocidade de reação depende da concentração de dois reagentes, ou a segunda potência da concentração de um deles. Para esse tipo de reação, a representação do

inverso da concentração (1/C) em função do tempo (t) fornece uma reta (NUDELMAN, 1975; LACHMAN et al., 2001).

3.4 Validação de métodos analíticos

Segundo Ribani e colaboradores (2003), a definição da validação no laboratório (*in house validation*) consiste na validação de um novo método desenvolvido por laboratório interno e específico ou ainda para a verificação e aplicabilidade de métodos já existentes. Essa validação precede etapas da validação completa (*full validation*) que envolve estudos interlaboratoriais com verificação da reprodutibilidade da metodologia e incerteza sobre o método como um todo, para que, desta forma, esse se torne um método oficial. Usualmente a validação dos métodos analíticos de matérias-primas farmacêuticas baseia-se entre: testes de identificação, testes quantitativos para as impurezas, ensaios-limite de controle de impurezas e testes quantitativos do ingrediente ativo em amostras da substância (ICH, 2005).

Como um dos fatores de maior importância para o Controle de Qualidade, os métodos analíticos devem ser validados, a menos que o método utilizado esteja incluído em farmacopéias, compêndios oficiais, ou seja, normatizado (com exceção de serem usados fora dos escopos para os quais foram concebidos), no caso de serem desenvolvidos no próprio laboratório e no caso de ampliações e modificações. A adequação dos métodos utilizados deve, no entanto, verificar as condições reais de utilização. Com o objetivo de confirmar que os métodos são apropriados para o uso pretendido, o laboratório deve validá-los (ABNT, 2001; ICH, 2001; RIBANI et al., 2003).

Segundo a FDA (2000), ainda que haja uma metodologia analítica farmacopeica, pode-se apresentar uma metodologia alternativa, desde que seja comprovado rendimento igual ou superior ao oficial.

O objetivo da validação de metodologia analítica é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, baseando-se na determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos, devendo conter informações de apoio apropriadas aos procedimentos analíticos utilizados (FDA, 2000; BRASIL, 2003).

Os medicamentos devem, sobretudo, possuir qualidade e eficácia assegurada, e por tais razões é essencial o desenvolvimento de validação de metodologias analíticas adequadas, resultando em maior confiabilidade dos métodos propostos, minimizando decisões contraditórias e prejuízos financeiros (RIBANI et al., 2003; LA ROCA et al., 2007).

Na década de 1980 começou a ocorrer uma grande cooperação entre diversas organizações internacionais, com objetivo da harmonização de protocolos que contemplassem informações, características e desempenho de métodos de análise. Entre essas organizações podemos citar a Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Organização Mundial de Saúde (WHO), International Standardization on Organization (ISO), Academic Writing Consulting (WAC), International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), Individual Discipline Feasible (IDF) e Food and Agriculture Organization (FAO). O resultado desta iniciativa foi a elaboração do documento “Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method Performance Studies”, sendo utilizado por muitos anos como base para acreditação de métodos analíticos (FAJGELJ e AMBRUS, 2000).

Uma metodologia analítica pode ser empregada de acordo com quatro finalidades (TABELA 2) (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 31, 2008).

Tabela 2 – Classificação dos testes, segundo a sua finalidade – RE N° 899/2003 - ANVISA

CATEGORIA	FINALIDADE DO TESTE
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matéria-prima.
II	Teste quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos ou matéria-prima.
III	Testes de performance (por exemplo; dissolução, liberação do ativo).
IV	Teste de identificação.

De acordo com a EURACHEM (2000), os estudos de validação de métodos consistem na determinação dos parâmetros totais de desempenho. Estes parâmetros são obtidos no decorrer do desenvolvimento das metodologias ou estudos interlaboratoriais ou de acordo com protocolos internos de validação, quando incertezas devem ser investigadas comparativamente à precisão do método (TABELA 3).

Tabela 3. Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Testes	Testes		
		Quantitativo	limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão/Repetitividade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

(BRASIL, 2003)

3.4.1. Especificidade e Seletividade

A seletividade é o passo primordial no desenvolvimento e validação de um método analítico e deve ser avaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método. Uma forma de verificação da seletividade é a observação de ausência de picos em amostra placebo (GRANGEIRO JÚNIOR et al., 2004).

Convencionalmente, de acordo com a IUPAC é recomendável utilizar o termo seletividade para se tratar desta definição, como meio de evitar confusão desnecessária (VESSMAN et al., 2001).

Muitas vezes pode haver interferência do desempenho da medição de determinada técnica analítica sem alteração em ensaios de especificidade. Para isso, os ensaios de seletividade devem ser conduzidos com disponibilidade e avaliação do analito, da matriz sem o analito e de amostras de referência nas concentrações de interesse para então, a aplicação dos testes F de homogeneidade de variâncias e o teste t (Student) de comparação de médias, ou ainda realizada a análise dos desvios em relação aos valores de referência (INMETRO, 2007).

Quando não se assegura que um método é analiticamente seletivo, pode-se dizer que a precisão, exatidão e linearidade estão também comprometidos (RIBANI et al., 2003).

3.4.2. Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (ICH, 2005).

Dessa maneira, trata-se de uma habilidade que o método deve ter de produzir resultados que são - diretamente ou através de transformações matemáticas - proporcionais à concentração da substância em análise na amostra, dentro de uma variação determinada. Este atributo da validação pode ser estabelecido pela avaliação visual de um diagrama de sinais em função da concentração ou conteúdo analisado. Havendo uma relação linear, os resultados da análise devem ser avaliados com base em apropriados métodos estatísticos, como por exemplo, o método dos quadrados mínimos (Estados Unidos da América, 1996).

3.4.3. Intervalo

A especificação do intervalo é uma derivação dos ensaios de linearidade, exatidão e precisão. No limite inferior da faixa de concentração, os fatores limitantes são os valores dos limites de detecção e de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição (ICH, 2005; INMETRO, 2007).

3.4.4. Precisão

A precisão em validação de métodos representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra (ICH, 2005). Pode ser considerada em três níveis diferentes: precisão intermediária, repetitividade e reprodutibilidade, sendo facultada a realização de dois níveis (BRASIL, 2003).

A precisão é o grau de concordância entre os resultados de cada teste quando aplicado repetidamente a várias amostragens de uma mesma amostra. A partir dos valores obtidos, são calculados a média e o Desvio Padrão (DP), determinando-se o Coeficiente de Variação (CV), expresso em termos de percentagem de uma série de medidas, nas quais duas delas podem ser a reprodutibilidade e a repetitividade do método analítico sob condições normais de operação.

3.4.4.1. Repetitividade

Neste contexto, a reprodutibilidade refere-se ao uso de procedimentos analíticos em diferentes laboratórios, diferentes analistas e em diferentes dias, enquanto que a repetitividade refere-se ao uso de procedimentos analíticos num curto espaço de tempo utilizando os mesmos analistas e os mesmos equipamentos. Para inúmeros propósitos, a repetitividade é o critério que interessa em um método analítico oficial (UNITED STATES PHARMACOPEIA XXIV, 2000; PINTO et al., 2003).

A consistência do método é o grau de reprodutibilidade dos resultados obtidos das análises de mesmas amostras sob várias condições, por exemplo, diferentes: laboratórios; analistas; equipamentos; dias. Esta característica é expressa como a falta de conhecimento nos resultados operacionais e variações do meio ambiente dos métodos analíticos (UNITED STATES PHARMACOPEIA XXIV, 2000).

3.4.5. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) são outros dois atributos da validação analítica. Eles representam a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada e quantificada respectivamente (ICH, 2005; INMETRO, 2003).

O limite de detecção é a menor quantidade do analito que pode ser detectada em uma amostra, porém não necessariamente quantificada. Pode ser obtido de diversas maneiras, levando-se em consideração também se o método é ou não instrumental (BRASIL, 2003; ICH, 2005). O LD refere-se a menor quantidade de uma substância presente em uma amostra que possa ser detectado, porém sem quantificá-lo. É expresso em percentual ou partes por bilhão (United States Pharmacopeia XXIV, 2000; Pinto et al., 2003).

O limite de quantificação ou limite de determinação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003; INMETRO, 2007). O LD está relacionado a menor quantidade de um composto presente em uma amostra que possa ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis sob condições experimentais declaradas (United States Pharmacopeia XXIV, 2000; Pinto et al., 2003).

3.4.6. Exatidão

A exatidão é obtida pelo estudo da média de uma grande série de valores obtidos, comparativamente com os valores reais (BRASIL, 2003). Estes valores são calculados pela

diferença entre o valor da concentração considerado como verdadeiro e o valor experimental, obedecendo a intervalos de segurança (United States Pharmacopeia XXIV, 2000; Pinto et al., 2003).

Este parâmetro representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (INMETRO, 2003). Um processo bastante utilizado para avaliação da exatidão de um método é o ensaio de recuperação como demonstrado por Bedor e colaboradores (2004).

De acordo com o ICH (2005), a exatidão pode ser definida, uma vez que a linearidade, a precisão e a especificidade foram alcançadas.

3.4.7. Robustez

É a capacidade que um procedimento analítico apresenta de se manter inalterado ou insensível com pequenas variações das condições das análises (FDA, 2000; INMETRO, 2007). Pode ser avaliado pela variação de parâmetros como marca e concentração de solvente e tipo de agitação (Soares Sobrinho et al., 2005; RIBANI et al., 2003).

Segundo a United States Pharmacopeia XXIV (2000), a robustez fornece indicações de segurança durante o uso normal do método.

3.4.8. Estudos de estabilidade na validação de métodos analíticos

Segundo a FDA (2000), as informações apresentadas na validação de metodologia analítica devem também demonstrar a estabilidade dos reagentes e amostras utilizados ao menos até a finalização das análises, bem como informar resultados obtidos em estudos de estresse (quando aplicável), além da respectiva identificação de impurezas detectadas.

CAPÍTULO I

**Estabilidade de fármacos e medicamentos: a evolução dos assuntos regulatórios
no Brasil e no mundo**

4. Capítulo I

Estabilidade de fármacos e medicamentos: a evolução dos assuntos regulatórios no Brasil e no mundo

RESUMO

Historicamente, sempre houve evidência da preocupação por parte do farmacêutico em relação à estabilidade do medicamento. A determinação dessa estabilidade é, além de uma exigência regulatória, uma questão de saúde pública. Ao longo dos anos, vários países publicaram diretrizes para os estudos de estabilidade. O objetivo desse artigo de revisão foi relatar e correlacionar as legislações relacionadas com a estabilidade de fármacos e medicamentos a nível nacional e mundial. Diante da evolução regulatória dos estudos de estabilidade, foi observado que existem algumas diferenças entre a Guia estabelecida pela ANVISA e as diretrizes internacionais da *International Conference on Harmonisation*, resultando num comprometimento da eficácia e segurança dos produtos e retardando a harmonização do setor regulado.

Palavras chaves: estabilidade, guias, ICH, ANVISA

ABSTRACT

Historically, there has always been evidence of concern regarding drug stabilization by pharmacists. The determination of drug stability is, besides a regulatory demand, a question of public health. Over the years, many countries have published stability studies. This article's objective is to relate and correlate legislations concerning drug stability on national and international levels. Against the regulatory evolution of drug stability studies, it was observed that there are some differences between the guide established by ANVISA and the international guidelines from the International Conference on Harmonisation, resulting in a decrease of effectiveness and security of products and slowing down harmonisation of the regulated sector.

Keywords: stability, guidelines, ICH, ANVISA

1. Introdução

A preocupação com a qualidade, segurança e eficácia dos produtos farmacêuticos é secular. Em 1352, o Rei João, o Bom, da França, tornou compulsória a inspeção das boticas. Nesta fiscalização, os agentes reguladores deveriam examinar a qualidade das drogas, observando aquelas que se revelassem velhas ou mal conservadas (PRISTA *et al.*, 1990). Na realidade, apesar da precariedade dos métodos instrumentais, a estabilidade era avaliada pelo parâmetro das características organolépticas desses produtos. E extrapolando para um contexto mais recente e analítico, as variáveis mensuradas seriam as características físico-químicas e microbiológicas para atestar a qualidade dos medicamentos; e para a eficácia e segurança, as variáveis estariam relacionadas com a dosagem terapêutica e a formação de produtos de degradação (CONNORS, 1986; VADAS, 2000).

Assim, a regulamentação do setor da saúde influenciou a organização de várias sociedades. E as estruturações mais notáveis aconteceram, principalmente, nas primeiras décadas do século XX, uma época marcada pela descoberta de novos fármacos. Foi nesse contexto, que os países mais desenvolvidos estabeleceram leis, criando órgãos e outros mecanismos para controlar a produção e a comercialização de bens e serviços com potencial de risco para a saúde. Dessa forma, surgiram o que hoje chamamos de vigilância sanitária (ROSEN, 1994).

Dentre o universo de produtos submetidos à vigilância sanitária, os medicamentos definidos como “produto farmacêutico, tecnicamente obtido ou elaborado, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico” (BRASIL, 1977), têm ocupado um lugar de destaque, tamanha sua importância na proteção e manutenção da saúde pública e, em contrapartida, devido aos riscos associados ao seu uso.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define estabilidade farmacêutica como a capacidade do produto manter suas propriedades químicas, físicas, microbiológicas e biofarmacêuticas dentro dos limites especificados durante todo seu prazo de validade (WHO, 1996).

A determinação da estabilidade de fármacos e medicamentos é uma questão de saúde pública, logo devem existir especificações para sua avaliação pelas autoridades sanitárias, já que a perda da estabilidade de um medicamento pode estar diretamente relacionada com a perda do efeito terapêutico ou com a formação de produtos de degradação tóxicos (KOMMANABOYINA e RHODES, 1999). No entanto, até 1984, as metodologias de avaliação de estabilidade de fármacos e medicamentos seguiam princípios técnicos e

científicos, sem interferência de atos regulatórios emitidos por agências ou órgãos de vigilância sanitária. As empresas utilizavam metodologias próprias, juntando seus dados e informações na documentação de registro (AMIRJAHED, 1977; LACHMAN, 2001.)

O incremento do comércio internacional, o processo de especialização de unidades produtivas, a racionalização da produção de medicamentos e reconhecimento de zonas climáticas dos países importadores para atender aos princípios de produção em escala econômica, todos incluídos no contexto caracterizado como globalização, contribuíram para que fosse considerado indispensável o conhecimento do comportamento das formas farmacêuticas nas diferentes áreas (AMIRJAHED, 1977; MATTHEWS, 1999).

Sabendo-se que a evolução dos assuntos regulatórios dependem de cada sociedade em função de valores econômicos, tecnológicos, políticos e culturais, esse artigo tem como objetivo discutir as legislações relacionadas com a estabilidade de fármacos e medicamentos à nível nacional e mundial, traçando paralelos e correlações entre as diretrizes, além de contextualizar o surgimento das mesmas.

2. Evolução dos estudos em estabilidade de fármacos e medicamentos

A estabilidade é definida como o tempo durante o qual o fármaco ou o medicamento mantém, dentro dos limites especificados e durante todo o período de armazenamento e uso, as mesmas condições e características que possuía quando da época de sua fabricação (YOSHIOKA & STELLA, 2002; VADAS, 2000). Dessa forma, a estabilidade está diretamente relacionada às análises das especificações físico-químicas e microbiológicas, e estas, por sua vez, dependem de métodos analíticos instrumentais e estudos experimentais para simular a degradação do produto em condições específicas.

Inicialmente a instabilidade era verificada pelas mudanças das características organolépticas do produto, e muitos métodos baseavam-se em reações estequiométricas para quantificação por titulação. Em seguida, com a introdução do espectrofotômetro, um grande passo foi dado, já que muitas substâncias que sofrem degradação são cromóforas. Entretanto, as análises de estabilidade dos anos 50 e 60 ainda careciam de sensibilidade e especificidade; sendo tais problemas amenizados com as técnicas cromatográficas, capazes de detectar pequenas quantidades de impurezas. Além disso, a evolução das condições dos procedimentos ocasionaram grandes avanços, como é o caso da adoção de testes de stress (CARSTENSEN, 1995; AMIRJAHED, 1977). Portanto, a evolução instrumental e os redesenhos dos

experimentos proporcionam a evolução da detecção de novos parâmetros e, continuamente, reformulam a predição da estabilidade.

A avaliação da estabilidade possui uma estrutura complexa, baseada em vários estudos que tem os mesmos objetivos de garantir a pureza, a inocuidade, a potência e a eficácia do produto, estabelecer as condições de estocagem e prever o prazo de validade (CARSTENSEN, RHODES, 2000). Essa avaliação depende de experimentos que fornecem evidências de como a qualidade do produto varia em relação ao tempo sob fatores ambientais como temperatura, umidade, luz e ar atmosférico. Além disso, há fatores que devem ser considerados na escolha e planejamento do estudo de estabilidade farmacêutica são: pH, potencial de interação entre o fármaco excipientes e/ou materiais de embalagem, processo de fabricação, polimorfismo, suscetibilidade do fármaco a oxidação ou hidrólise (BRASIL, 2005; MARTINEZ; FALCO; CABEZA, 2002; ZAJAC et al., 2003; JELINSKA et al., 2006). Esses experimentos foram otimizados ao longo dos anos, e os resultados destes influenciaram as especificações, os limites e os métodos de análise (SIMON *et al.*, 2004).

Com a crescente preocupação sobre o tema, a comprovação da estabilidade e a determinação do prazo de validade de produtos farmacêuticos tornaram-se compulsórias (ver figura 1). Entretanto, na ausência de qualquer orientação dos órgãos reguladores sobre as medidas práticas a serem seguidas para o estabelecimento dos ensaios de estabilidade, a evolução dos experimentos nessa área baseou-se em pesquisas de vários estudiosos nas universidades e indústrias, gerando vários modelos experimentais (BAKSHI, SINGH, 2002).

Figura 1 – Relação das entidades que tornaram compulsórias as exigências de estudos de estabilidade em medicamentos no mundo e no Brasil.



Fonte: arquivo pessoal.

Em 1892, os Estados Unidos da América (EUA) constituíram o primeiro conjunto de normas para o controle de fármacos, apesar de não ser um documento com força de lei, continha procedimentos e recomendações com vistas ao prazo de validade e estabilidade dos produtos farmacêuticos. Em 1936 a Farmacopéia Portuguesa estabeleceu que diversas formas farmacêuticas fossem preparadas na ocasião do emprego e determinou prazo de eficácia para soros e vacinas. O estudo de estabilidade em tempo real era o método clássico utilizado para determinar o prazo de validade de uma preparação farmacêutica, no qual o produto ficava estocado sob condições similares àquelas que ocorreriam durante a comercialização e, assim, asseguravam seu prazo de validade (PRISTA et al., 1990). Na figura 2 é possível relacionar a evolução dos estudos em estabilidade ao longo do tempo (ver figura 2).

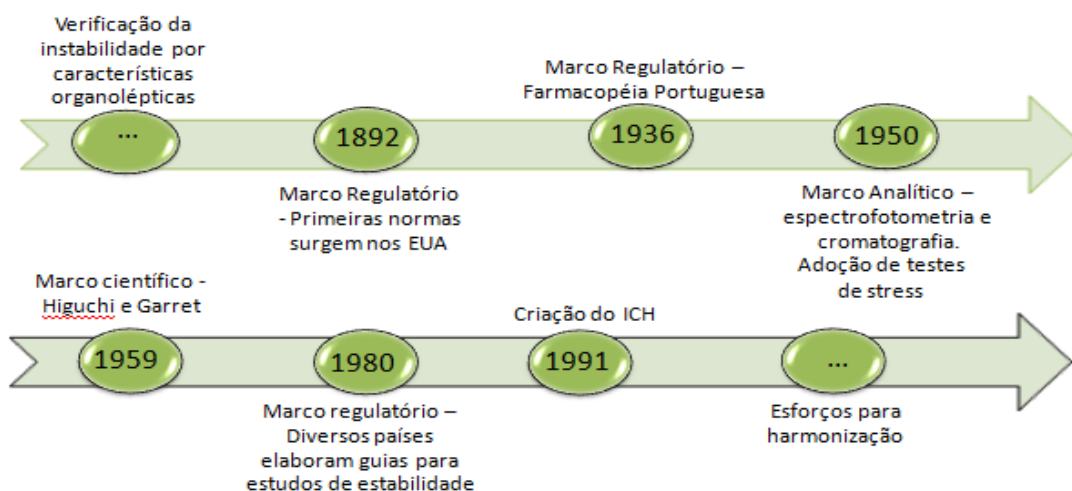
Em 1950, Higuchi e Garret estabeleceram as bases matemáticas para a quantificação do prazo de validade de medicamentos. Mais tarde, foram empregados estudos de estabilidade acelerada, utilizando altas temperaturas, para prever o tempo de vida em prateleira da substância num curto espaço de tempo; e, a partir do momento em que o empirismo foi, na sua maioria, substituído por métodos mais científicos, baseados em princípios físicos e químicos mais adequados para caracterizar o envelhecimento de medicamentos, tornou-se evidente a necessidade do estudo de estabilidade de fármacos e medicamentos (AMIRJAHED, 1977; LACHMAN *et al.*, 2001).

Nesse ínterim, contribuições científicas importantes foram dadas a cerca do tema. No final da década de 50, Lachman e Cooper (1959) publicaram “*A comprehensive pharmaceutical stability testing laboratory I. Physical layout of laboratory and facilities available for stability testing*” onde descrevem sistemas de testes acelerados, sob condições controladas, ilustrando a disposição física, bem como os equipamentos fixo sem um laboratório de estabilidade bem organizado na indústria farmacêutica. Além disso, discutem a aplicação do equipamento para teste de formulações farmacêuticas como a sua estabilidade em diferentes condições de intensidade de temperatura, umidade e luz. Em 1971, Chafetz, publicou “*Stability-indicating assay methods for drugs and their dosage forms*” uma revisão geral dos métodos e seus princípios. Em 1997, Ho e Chen revisaram métodos de estudo de estabilidade utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Uma compilação sobre estudos de estabilidade por HPLC foi publicada por Xu e Trissel (2008), fornecendo uma discussão geral sobre o desenvolvimento do método e a validação com ênfase nos estudos de estabilidade.

Dessa maneira, não só os EUA, mas outros países como Japão, Alemanha, França e Inglaterra elaboraram guias para a realização de estudos de estabilidade para fins de autorização para comercialização de produtos farmacêuticos (quadro 1). Entretanto, estas guias apresentaram diferenças em seus conceitos, recomendações, condições de estudo e enfoque, o que se justifica pelo fato de cada país atender a necessidades particulares. Ressalta-se o inconveniente apresentado para a indústria farmacêutica, que teria de realizar estudos de estabilidade distintos para registrar o mesmo medicamento em países diversos (WHO, 1996).

Portanto, nos anos 80, reconheceu-se a necessidade de um guia regulatório internacional; e tal idealização era motivada, historicamente, pelo exemplo de integração da Comunidade Européia. Dessa forma, Europa, Japão e Estados Unidos começaram a realizar discussões bilaterais sobre as possibilidades de harmonização. Mas, somente em 1989, numa conferência organizada pela OMS, esses países projetaram tais planos. E após uma abordagem para fabricantes de produtos farmacêuticos, o conceito de uma conferência internacional sobre a harmonização nasceu e foi discutida em detalhe numa reunião entre as autoridades reguladoras e representantes da indústria, em 1990. No ano seguinte, criou-se o Comitê Internacional de Harmonização dos Requisitos Técnicos para Registros e Produtos Farmacêuticos para Uso em Seres Humanos (ICH). Um órgão tripartido patrocinado pelas autoridades reguladoras e pelas indústrias farmacêuticas dos três principais mercados farmacêuticos acima mencionados, incluindo os observadores da OMS, do *Health Canada* e da Associação Europeia de Livre Comércio (EFTA), e o apoio da Federação Internacional das Associações dos Fabricantes Farmacêuticos (IFPMA) (BRANCH, 2005).

Figura 2 – Evolução dos estudos em estabilidade de fármacos e medicamentos.



Fonte: Arquivo pessoal.

O objetivo desta harmonização é o uso mais econômico de recursos humanos, animais e materiais, e a eliminação de atrasos desnecessários no desenvolvimento e na disponibilidade global de novos medicamentos, mantendo sua qualidade, segurança e eficácia (ICH, 2003). Contudo, nem sempre esse objetivo é alcançado, tendo em vista as divergências entre a legislação brasileira e as diretrizes internacionais

A comprovação da estabilidade e a determinação do prazo de validade de produtos farmacêuticos objetos de registro sanitário, devido a sua importância, é uma exigência da ANVISA, assim como de outras autoridades sanitárias do Mercado Comum do Sul (MERCOSUL), da European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMEA), da Food and Drug Administration (FDA) e OMS (ver figura 1). Estas autoridades regulatórias elaboraram normas para a realização prática desses estudos, a fim de garantir a qualidade, segurança e eficácia dos produtos que serão expostos aos consumidores considerando a realidade de seu próprio país.

Nesse contexto, importante se faz compreender o esforço para harmonização destas legislações a nível internacional, bem como analisar as legislações brasileira e do Mercosul frente as diretrizes internacionais vigentes.

3. Diretrizes Internacionais

A crescente globalização da indústria farmacêutica é um fenômeno bem reconhecido. Em paralelo ao desenvolvimento de medicamentos para uso em todo o mundo, tem havido um ímpeto crescente para harmonizar as exigências para registro destes produtos com as autoridades reguladoras em diferentes países. Tal harmonização evita a duplicação de trabalho necessário para registrar novos medicamentos e reduz o custo de pesquisa e desenvolvimento. Além disso, pode permitir acesso mais rápido aos novos medicamentos, assegurando que eles são seguros, eficazes e de boa qualidade - o objetivo de todas as autoridades reguladoras para proteger a saúde pública (BRANCH, 2005).

Existiram vários atos regulatórios para testes de estabilidade em todo o mundo (vide quadro 1), evidenciando várias discrepâncias entre eles. A primeira proposta de guia data de 1970, e este foi publicado pelo FDA em 1983. Em 1984, este guia foi colocado à disposição para comentários e sugestões por diversos segmentos da indústria farmacêutica. A forma final do Guia para testes de estabilidade, promulgada pelo FDA foi regulamentada em 1985 e não

era um documento com força de lei, mas continha procedimentos e recomendações com vistas ao prazo de validade e estabilidade de produtos farmacêuticos.

Quadro 1. Guias de estabilidade internacionais

País	Título	Ano de introdução
Japão	<i>Standards for stability testing of new drugs</i>	1980-1984(rev)
UK	<i>Guidance notes on applications for product licenses</i>	1984
EUA	<i>Submitting documentation for the stability of Human Drugs and Biological</i>	1987
UE	<i>Stability testing on active ingredients and finished products</i>	1988

Nota: (UK) – Reino Unido; (EUA) – Estados Unidos da América; (UE) – União Europeia; (rev) – revisão. Fonte: CARVALHO, J. P.; SANTOS, A. S.; SA, A. S.; TEIXEIRA, C. S.; NOGUEIRA, M. S. Estabilidade de medicamentos no âmbito da farmacovigilância. **Fármacos e Medicamentos**, v. 34, n. 6, 2005.

Diante de tais disposições regulatórias, vários outros pesquisadores apresentaram relatórios para regulamentar os estudos de estabilidade. Em 1987, Nagai, Stewart, Grimm e Huyghe contribuíram nesse sentido nas medidas regulatórias do Japão, da Inglaterra, da Alemanha e da União Europeia, respectivamente (CARSTENSEN, 1995). Entretanto, cada país visava atender suas peculiaridades, gerando distintos conceitos, metodologias e especificações entre os guias (WHO, 1996) detalhes, visão crítica

Reunido esforços para harmonização, a Comissão de Coordenação do ICH projetou um procedimento de cinco passos para o desenvolvimento sobre uma série de temas relativos à pesquisa, desenvolvimento e controle de qualidade de produtos farmacêuticos (CARSTENSEN, RHODES, 2000). As diretrizes mais prováveis que sejam de interesse para os testes de estabilidade encontram-se elencadas no quadro 2.

Quadro 02. Principais diretrizes para testes de estabilidades do ICH.

Guia	Título	Data de publicação
Q1A(R2)	<i>Stability Testing of New Drug Substances and Products</i>	Fevereiro de 2003
Q1B	<i>Photostability Testing of New Drug Substances and Products</i>	Novembro de 1996
Q1C	<i>Stability Testing for New Dosage Forms</i>	Novembro de 1996
Q1D	<i>Bracketing and Matrixing Designs for Stability Testing of Drug Substances and Drug Products</i>	Fevereiro de 2002
Q1E	<i>Evaluation of Stability Data</i>	Fevereiro de 2003
Q1F	<i>Stability Data Package for Registration Applications in Climatic Zones III and IV</i>	Junho de 2006 Revogada
Q2 (R1)	<i>Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology</i>	Novembro de 2005
Q3A (R2)	<i>Impurities in New Drug Substances</i>	Outubro de 2006
Q3B (R2)	<i>Impurities in New Drug Products</i>	Junho de 2006
Q5C	<i>Quality of Biotechnological Products : Stability Testing of Biotechnological/Biological Products</i>	Novembro de 1995

A diretriz Q1A enfatiza que a análise das características e propriedades das substâncias e dos produtos farmacêuticos são suscetíveis a alterações durante o armazenamento, podendo comprometer a qualidade, segurança e eficácia. É também mencionada a necessidade da realização de estudos de degradação forçada (*stress testing*), submetendo o fármaco a condições críticas: temperaturas com incrementos 10 °C em relação ao teste de estabilidade acelerada, umidade, oxidação, hidrólise e fotólise – os testes de fotoestabilidade devem ser aplicados nesse estudo conforme a diretriz Q1B. Dessa forma, os dados obtidos nessas condições extremas embasarão o planejamento do estudo de estabilidade do produto acabado e a avaliação sistemática da estabilidade do medicamento; já que é possível identificar os prováveis produtos de degradação e suas vias, além de desenvolver a metodologia para sua análise e validar os métodos analíticos – de acordo com a diretriz Q2 (R1) (ICH, 1996a; ICH, 2003a; ICH, 2005).

A diretriz Q1C é um documento anexo da diretriz Q1A (R2) que aborda as recomendações sobre o que deve ser apresentado em matéria de estabilidade de novas formas farmacêuticas pelo o proprietário da aplicação original, após a submissão original de novos fármacos e produtos. Esta diretriz estabelece que os estudos de estabilidade para novas formas farmacêuticas devem seguir as orientações da “diretriz mãe” – Q1A (R2). Entretanto, dados de estudos de estabilidade acelerado de 6 meses acompanhados dos resultados de estudos de longa duração de 6 meses em andamento podem ser aceitáveis para submissão, em determinados casos, desde que devidamente justificados (ICH, 1996b).

Sabendo-se que a diretriz Q1A (R2) enfoca as zonas climáticas I e II, a diretriz Q1F é uma extensão dessa para contemplar as recomendações da realização de estudos de estabilidade de novos fármacos e medicamentos destinados aos países das zonas climáticas III e VI. No curso da discussão que levaram o desenvolvimento da diretriz Q1F, decidiu-se e aprovou-se, sem objeções significativas, as condições de armazenamento a longo prazo de 30 °C/ 65% UR para os países das zonas III e IV. No entanto, com base em novos cálculos e discussões, alguns países da zona climática IV manifestaram o desejo de incluir uma maior margem de segurança para os medicamentos a serem comercializados na sua região do que o previsto pela ICH. Devido às divergências de requisitos de teste global de estabilidade, a Comissão de Coordenação do ICH decidiu revogar a diretriz Q1F e deixar a definições dessas especificações a cargo dos países dessas zonas e da OMS (ICH, 2006a).

A diretriz Q1D se destina a abordar recomendações sobre a aplicação do agrupamento e matrização para estudos de estabilidade realizados em conformidade com os princípios delineados no Q1A (R2). Isso significa que são modelos de estudos reduzidos que necessitam de considerações cuidadosas e justificativas científicas para embasar a análise do estudo. A saber, o modelo de agrupamento assume que a estabilidade de qualquer nível intermediário é representada pela estabilidade dos extremos, logo somente amostras dos extremos de certos fatores, como dosagem e tamanho de embalagem, são testadas na mesma frequência do estudo de estabilidade completo; e o modelos de matrização assume que a estabilidade de sub-grupos do conjunto de amostras testadas representa a estabilidade de todas as amostras a determinado intervalo de tempo, assim, somente um sub-grupo, selecionado de um número total de amostras possíveis para todos os fatores de combinação, é testada numa frequência especificada (ICH, 2002).

A diretriz Q1E tem como objetivo fornecer recomendações sobre como usar os dados de estabilidade gerada em conformidade com os princípios detalhados da diretriz Q1A (R2)

para propor um período de reteste ou um prazo de validade em um pedido de registro. Isto é, propõe um tratamento estatístico dos dados para otimizar a avaliação da estabilidade (ICH, 2003b). As diretrizes Q3A(R2), Q3B(R2) representam um consenso das impurezas que devem ser controladas bem como recomendações para pesquisa, relato, identificação e qualificação de impurezas individuais em fármacos e produtos de degradação em medicamentos (ICH, 2006b; ICH, 2006c). E, finalmente, a diretriz Q5C que trata dos requisitos específicos para produtos de origem biológica/biotecnológica (ICH, 1995).

De um modo geral, as diretrizes do ICH são utilizadas subsidiariamente em diversas regiões do mundo quando a legislação local não versar a cerca do tema, inclusive no Brasil. Dessa maneira, espera-se a consolidação e evolução técnico-científica das diretrizes, e projeta-se que os estudos de estabilidade também sejam direcionados para a melhor avaliação de fitoterápicos e nutracêuticos.

4. Diretrizes do MERCOSUL

O processo de harmonização dos medicamentos no seio dos países que compõem o Grupo Andino (Peru, Colômbia, Equador, Bolívia, Venezuela), criado em 1969, inicia as primeiras tentativas de estabelecimento de um mercado comum, já nos anos 70, sem muito êxito, apesar dos acordos firmados neste sentido. Nos anos 90, volta a ser outorgada prioridade à formação de um ‘mercado andino de medicamentos’. Apesar de incluir, entre seus integrantes, países (Brasil e Argentina), que contam com um setor farmacêutico bem desenvolvido e que representam o maior mercado de consumo, bem como o parque industrial mais importante da América Latina (os outros dois países integrantes são Uruguai e Paraguai), o processo de harmonização, no âmbito do Mercosul, não tem tido os avanços esperados, tendo se orientado, prioritariamente para os intentos de compatibilizar as normas de fabricação. A harmonização regulamentadora pretendida, no entanto, no campo dos medicamentos contemplava, quando do plano quinquenal acordado em 1995, uma série de itens que iam desde as ‘boas práticas de fabricação’ e ‘estabilidade’, aos ‘hemoderivados’, ‘registro de produtos similares’, ‘padrões de distribuição’, ‘sistemas de informação’, ‘controle de qualidade’ e ‘farmacovigilância’ (BARROS, 2004).

Esses esforços para harmonizar os procedimentos para registro de medicamentos entre os países membros, Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai, culminou na elaboração, em 1996, do regulamento técnico *Estabilidad de Productos Farmacéuticos*. Este regulamento, MERCOSUR/GMC/RES n°53/96, tem por objetivo estabelecer as metodologias para

determinação do prazo de validade de produtos farmacêuticos destinados à comercialização no MERCOSUL (MERCOSUL, 1996).

Assim como no Brasil, os estudos de estabilidade são classificados em acelerado e de longa duração. O estudo acelerado é projetado para aumentar a velocidade de degradação química e/ou alterações físicas no produto farmacêutico pela utilização de condições drásticas de armazenamento, com o propósito de monitorar as reações de degradação e estimar o prazo de validade nas condições normais de armazenamento (BRASIL, 2005; MERCOSUL, 1996). O estudo de longa duração é realizado em condições normais de armazenamento com o objetivo de confirmar os dados obtidos no estudo acelerado (NUDELMAN, 1975; WHO, 1996).

Há ainda o estudo de acompanhamento, em que se verifica se não foi introduzida nenhuma mudança na formulação ou no processo de fabricação que possa afetar adversamente a estabilidade do produto (BRASIL, 2005; MERCOSUL, 1996).

Embora o regulamento nº 53 tenha sido um esforço em conjunto, importantes divergências são observadas entre esta e a legislação brasileira vigente. As faixas de temperatura para armazenamento dos produtos farmacêuticos segundo a RE 01/05 preconizada em -20°C , é relata como uma faixa de -5°C a 20°C pela legislação do Mercosul. Além disso, enquanto o Mercosul sugere, sempre que possível, sejam utilizados lotes de medicamentos produzidos com diferentes lotes do fármaco. A RE 01/05 não estabelece nenhuma orientação neste sentido.

Tais disparidades dificultam a harmonização e, conseqüentemente, o registro de produtos farmacêuticos em países vizinhos e signatários de uma zona de livre comércio.

5. Diretrizes do Brasil

No Brasil, as primeiras preocupações legais quanto à estabilidade foram mencionados na Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976 (BRASIL, 1976). E apenas em abril de 2002, foi publicado pela ANVISA o primeiro “Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade” (Resolução – RE nº. 560) com o objetivo de internacionalizar as diretrizes do MERCOSUL. Em novembro de 2004, a resolução RE n.º 398 instituiu novo guia com a finalidade de harmonizar as diretrizes nacionais com aquelas estabelecidas pelo ICH. Tal guia tem como referência os “*guidelines*” de qualidade editados pelo ICH relativo a requerimentos técnicos para registro de medicamentos para uso humano. Dentre as novidades, destaca-se a inclusão do estudo de estabilidade de acompanhamento, as especificações para estudo de

fotoestabilidade e o plano de estudo de estabilidade reduzido baseado na diretriz Q1D (ICH, 2002). Um terceiro guia foi publicado na RE nº 01 de 29 de julho de 2005, ainda em vigor, foi elaborada com o propósito, dentre outros, de adequar as condições de armazenamento de medicamentos para conduzir os estudos de estabilidade e fotoestabilidade de acordo com a zona climática na qual o país está enquadrado (BRASIL, 2005). Sendo que a RE nº 01/05 apenas recomenda a realização de estudos de fotoestabilidade, o que representa um retrocesso da legislação, uma vez que a conduções destes estudos eram exigidos pela RE 398/04.

A resolução RE Nº 01 instituiu um guia de estabilidade, definindo três tipos de estudos: (1) Estabilidade acelerada: projetada para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento. Os dados assim obtidos, juntamente com aqueles derivados dos estudos de longa duração, usados para avaliar efeitos químicos e físicos prolongados em condições não aceleradas e para avaliar o impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas no rótulo do produto, que podem ocorrer durante o transporte; (2) Estabilidade de acompanhamento: realizado para verificar que o produto farmacêutico mantém suas características físicas, químicas, biológicas, e microbiológicas conforme os resultados obtidos nos estudos de estabilidade de longa duração; (3) Estabilidade de longa duração: projetado para verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento (BRASIL, 2005).

Na RE número 01, o prazo de validade de um produto a ser comercializado no Brasil é determinado por um estudo de estabilidade de longa duração e de acordo com os parâmetros definidos e por ocasião do registro poderá ser concedido um prazo de validade provisório de 24 meses. Se o relatório de estudo de estabilidade de longa duração de 12 meses ou relatório de estudo de estabilidade acelerado de 6 meses estiver acompanhado dos resultados preliminares do estudo de longa duração, conforme parâmetros definidos (ver tabela 1) que classificam os produtos de acordo com a forma farmacêutica fornecendo dados à respeito das condições de armazenamento e estudos (BRASIL, 2005).

Nas avaliações de longa duração as amostras são mantidas nas condições previstas de armazenagem (temperatura e umidade) pelo tempo proposto como prazo de validade do produto. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar este prazo e recomendar as condições de armazenamento. O estudo de estabilidade acelerado é projetado para acelerar a

degradação química e mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas (BRASIL, 2005).

O estudo de estabilidade descrito pela RE nº 1/2005 (Brasil, 2005) possui como principal aplicabilidade a determinação do prazo de validade do produto farmacêutico. Porém, também determina a quantificação dos produtos de degradação e o método analítico correspondente, que resultou na publicação de um Informe Técnico nº 1/2008, com o objetivo de esclarecer procedimentos nos casos em que a impureza ou o padrão do produto de degradação não estão disponíveis. Estes procedimentos envolvem a realização de testes de estresse sob condições variadas (SILVA *et al.*, 2009).

Em janeiro de 2012, a ANVISA publicou a consulta pública nº 11, na qual se discute o estabelecimento de parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com princípios ativos sintéticos e semi-sintéticos, classificados como novos, genéricos e similares.

Em agosto do mesmo ano, foi publicada a RDC nº 45, na qual se dispõe sobre realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos (IFA). Nela está descrito o regulamento técnico, incluindo as condições gerais, embalagem e rotulagem, condições de armazenamento e frequência dos testes de estabilidade e estudos de acompanhamento em IFA. Por fim, trata dos testes de degradação forçada e estabelece as condições para os testes de fotoestabilidade. Essa legislação configura um importante passo para padronização das condições analíticas de desenvolvimento de estudos de estabilidade.

Tabela 1. Parâmetros para a realização dos estudos de estabilidade (BRASIL, 2005).

Formas Farmacêutica (F.F)	Condição de armazenamento (*)	Embalagem	Temperatura e Umidade Acelerado (**)	Temperatura e Umidade Longa Duração (**)
Sólido	15-30°C	Semi-permeável	40 ± 2°C / 75 ± 5% UR	30 ± 2°C / 75 ± 5% UR
Sólido	15-30°C	Impermeável	40 ± 2°C	30 ± 2°C
Semi-sólido***	15-30°C	Semi-permeável	40 ± 2°C / 75 ± 5% UR	30 ± 2°C / 75 ± 5% UR
Semi-sólido	15-30°C	Impermeável	40 ± 2°C	30 ± 2°C
Líquidos***	15-30°C	Semi-permeável	40 ± 2°C / 75 ± 5% UR	30 ± 2°C / 75 ± 5% UR
Líquidos	15-30°C	Impermeável	40 ± 2°C	30 ± 2°C
Gases	15-30°C	Impermeável	40 ± 2°C	30 ± 2°C
Todas F.F.	2 - 8°C	Impermeável	25 ± 2°C	5 ± 3°C
Todas F.F.	2 - 8°C	Semi-permeável	25 ± 2°C / 60 ± 5% UR	5 ± 3°C
Todas F.F.	-20°C	Todas	- 20 ± 5°C	- 20 ± 5°C

(*) - Qualquer recomendação de armazenamento em temperatura dentro destas faixas deve constar de bulas e rótulos. A temperatura recomendada não exige de que os testes de estabilidade sejam realizados com as temperaturas definidas nas duas últimas colunas da tabela.

(**) Os valores de temperatura e umidade são fixos e as variações são inerentes às oscilações esperadas pela câmara climática e por eventuais aberturas para retirada ou colocação de material.

(***) Líquidos e semi-sólidos de base aquosa devem realizar o estudo com umidade a 25% UR ou 75% UR. Caso se opte por 75% UR, o valor da perda de peso deverá ser multiplicado por 3,0.

6. Correlações entre a legislação brasileira e os guias internacionais

Na indústria farmacêutica, o estudo de estabilidade é um dos itens mais importantes para o registro, já que garante a eficácia e segurança dos produtos comercializados. Entretanto, os métodos comumente utilizados pelo Controle de Qualidade não são adequados para a avaliação de tais estudos. Para isso, com o intuito de garantir à qualidade e adequar-se às legislações, as empresas devem seguir os guias estabelecidos. O quadro 3 mostra, resumidamente, os tipos de estudos existentes, seus objetivos e finalidades.

O teste de estresse é definido como um teste de estabilidade para fármacos e medicamentos sob condições extremas. Este teste mostra-se como uma tendência dentro do

planejamento para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica, pois a investigação da estabilidade intrínseca do fármaco fornece abordagens de formulação e indica tipos de adjuvantes, aditivos de proteção específicos e de acondicionamento, que provavelmente melhorarão a integridade do fármaco e do produto. Demonstrando-se assim, que o conhecimento do comportamento químico pode ser usado para garantir a estabilidade da forma farmacêutica desejada. Um dos principais objetivos a serem atingidos através desse teste é demonstrar a especificidade ao desenvolver um método indicativo de estabilidade, sobretudo quando poucas informações estão disponíveis sobre os possíveis produtos de degradação. Estes também fornecem informações sobre as rotas de degradação e dos produtos formados, que poderiam ser produzidos durante o período de armazenamento (SILVA *et al.*, 2009).

O ICH, através da diretriz Q1A (R2), direcionou o trabalho das indústrias farmacêuticas com esses estudos de stress, capazes de prever futuros problemas relacionados à degradação e à estabilidade do produto, visando minimizar o custo e tempo durante o desenvolvimento da formulação. Esse teste enfoca, principalmente, o insumo farmacêutico ativo, enquanto os testes de fotoestabilidade e os testes específicos devem ser realizados nos produtos acabados. Seguindo-se a ordem cronológica, a ANVISA, exige o delineamento do teste de degradação com a RE nº1 de 2005, entretanto somente esclarece os testes a serem utilizados com o Informe Técnico nº 1/2008. Comparando-se os dois guias, percebe-se que as diretrizes brasileiras são muito vagas e destacam principalmente o produto acabado; uma realidade esperada, já que a maioria das matérias-primas utilizadas pela indústria farmacêuticas brasileiras são provenientes do exterior com DMFs (*Drug Master Files*) limitados, levando ao planejamento dos estudos sem informações prévias.

O estudo intermediário, no entanto, é preconizado somente pelo ICH (quadro 3), visando aumentar de forma moderada a velocidade de degradação química ou alterações físicas tanto para insumos ativos quanto para o produto farmacêutico que se pretende armazenar a 25 °C (ICH, 2003a). O estudo de acompanhamento, categoricamente, só é exigido pela ANVISA e MERCOSUL. Esse estudo somente poderá ser realizado se o produto não sofrer nenhuma alteração após a conclusão do estudo de estabilidade de longa duração; caso ocorra qualquer alteração no produto deverá ser realizado novo estudo de estabilidade de longa duração (BRASIL, 2005).

Um ponto importante na condução dos testes de estabilidade são as condições de armazenamento, já que elas devem simular as condições que os produtos serão submetidos.

Dessa forma, essas condições são derivadas das condições climáticas reais, as quais variam até mesmo num único país (MARKENS, 2010). Portanto, as divergências mais proeminentes que ocorreram durante a evolução dos estudos de estabilidade foram às especificações das condições de armazenamento estabelecidas para a realização de estudos de longa duração para comercialização de produtos farmacêuticos em países de clima quente e úmido, como é o caso do Brasil. Com a revogação da diretriz Q1F, a OMS e os países envolvidos devem especificar essas condições. Analisando-se as tabelas 2 e 3 é possível observar a mudanças dessas condições. Em 2005, a OMS dividiu a zona IV em IVa e IVb, preconizando, respectivamente, as especificações 30°C / 65% e 30°C / 75% - esta última corroborando com a RE nº1 de 2005.

Quadro 3. Tipos e principais objetivos e finalidades dos estudos de estabilidade.

Tipo do Estudo / Diretriz	Principais Objetivos	Principais Finalidades	Condição de Armazenamento
Estresse ou crítico/ANVISA, ICH	Identificar produtos de degradação e validar metodologia analítica	Desenvolvimento do produto	Forçada
Acelerado / ANVISA, MERCOSUL e ICH	Determinar prazo de validade provisório e condições de armazenamento	Desenvolvimento do Produto / Documentação de Registro	Forçada
Intermediário / ICH	Subsidiar dados do estudo acelerado	Subsidiar Documentação de Registro	Ambiente
Longa Duração / ANVISA, MERCOSUL e ICH	Comprovar o prazo de validade e as condições de armazenamento estabelecidas pelo estudo de estabilidade acelerada	Documentação de Registro	Ambiente
Acompanhamento / ANVISA e MERCOSUL	Verificar se não foi introduzida nenhuma mudança na formulação ou no processo de fabricação que possa afetar adversamente a estabilidade do produto	Garantia da Qualidade / Controle de qualidade	Ambiente

Tabela 2. Zonas Climáticas segundo a OMS para realização de estudos de estabilidade.

Zona Climática	Definição	Condições de Armazenamento (1996)	Condições de Armazenamento (2001)
I	Temperada	21 °C / 45 % UR	21 °C / 45 % UR
II	Mediterrânea	25 °C / 60 % UR	25 °C / 60 % UR
III	Quente e seco	30 °C / 35 % UR	30 °C / 35 % UR
IV	Quente e úmido	30 °C / 70 % UR	30 °C / 65 % UR

Fonte: LEITE, 2005.

Tabela 3 – Condições de armazenamento para condução de estudos de estabilidade de longa duração definidas pela ANVISA

Resolução/ano	Condição de Armazenamento
RE 560/02 (revogada)	30 °C ± 2 °C / 70 % ± 5 % de UR
RE 398/04 (revogada)	30 °C ± 2 °C / 65 % ± 5 % de UR
RE 01/05 (em vigor)	30 °C ± 2 °C / 75 % ± 5 % de UR

UR – Umidade relativa

Fonte: LEITE, 2005.

Outras diferenças estão relacionadas aos critérios de avaliação, à forma de exposição dos dados às agências reguladoras, às condições de transportes e à análise estatística - quantidade de lotes a serem testados e o tratamento dos dados. Essas divergências refletem negativamente na economia das indústrias farmacêuticas que desejam registrar suas medicações em vários países. Portanto, os laudos de estudos não clínicos, etapa que engloba a validação farmacêutica e a garantia da qualidade, realizados no Brasil apresentam uma série de deficiências nos testes de estabilidade como: condições de umidade relativa distintas do estabelecido na Guia e, conseqüentemente, incapazes de comprovar os prazos de validade e cuidados de conservação propostos para os medicamentos; ausência de dados sobre a estabilidade do fármaco e de dados para comprovar a estabilidade do medicamento durante o transporte nacional e internacional; número insuficiente de lotes analisados; utilização de metodologia analítica inadequada e/ou não validada; ausência de laudos das análises efetuadas com amostras estudadas e acompanhadas do respectivo cromatograma ou espectro de

ultravioleta (UV), por exemplo; e relatórios de estudo de estabilidade com falhas e/ou incompletos (BRASIL, 2005; ICH, 1996b).

7. Considerações Finais

No Brasil, o registro e a comercialização de produtos farmacêuticos depende da avaliação técnica dos estudos de estabilidade farmacêutica baseados na RE nº 1 de 2005. Em comparação com as diretrizes internacionais, a legislação brasileira possui informações muito vagas, e focam principalmente os estudos de estabilidade com o produto acabado. Além de não orientar para a realização de estudos de estabilidade de fármacos e nem para a determinação do método indicativo de estabilidade, o que dificulta a avaliação sistemática dos medicamentos registrados pela ANVISA.

Isso é reflexo de uma autoridade regulatória e de uma indústria farmacêutica incipientes. Entretanto, algumas complementações sobre o tema foram publicadas pela ANVISA como a recomendação para estudo de estabilidade e mais regulamentos serão firmados como propõe a Consulta Pública nº 11 de 23 de janeiro de 2012, a qual dispõe sobre o estabelecimento de parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com princípios ativos sintéticos e semi-sintéticos, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências.

Estas deficiências comprometem a avaliação sistemática dos medicamentos registrados na ANVISA, em especial a dos medicamentos novos. Além da ausência de orientações para a determinação do método indicativo de estabilidade, da estabilidade de produtos importados, da estabilidade durante o uso e a compatibilidade entre o produto e o material de embalagem na RE 01/05 dificulta a avaliação técnica da estabilidade de produtos farmacêuticos.

Dessa maneira, encontram-se prejudicadas a garantia da qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos, refletindo em prejuízos terapêuticos à população, administrativos e institucionais à Agência e econômicos ao setor regulado.

Entretanto, sabendo-se da atual consolidação da validação dos métodos analíticos nas indústrias brasileiras e o fortalecimento da exportação de medicamentos, espera-se a evolução e estruturação dos estudos de estabilidade desde a matéria-prima até o produto acabado.

8. Referências Bibliográficas

AMIRJAHED, A. K. Simplified method to study stability of pharmaceutical preparations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 66, n. 06, p. 785-789, 1977.

BAERTSCHI, S. W. Analytical methodologies for discovering and profiling degradation-related impurities. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 25, n. 8, p. 758-767, 2006.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods – critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p. 1011-1040, 2002.

BARROS, J. A. C. **Políticas farmacêuticas: a serviço dos interesses da saúde?** Brasília: UNESCO, 2004. 82p.

BRANCH, S. K. Guidelines from the International Conference on Harmonisation (ICH). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, p. 798-805, 2005.

BRASIL. **Lei 6.360, de 23 de setembro de 1976.** Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. Brasília: Diário Oficial da União, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – **RE n.º 01, de 29 de julho de 2005.** Autoriza, ad referendum, a publicação do Guia para Realização de Estudos de Estabilidade. Brasília: Diário Oficial da União, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Histórico da elaboração da Resolução RE n.º 1, de 29 de julho de 2005.** Disponível em: <www.anvisa.gov.br/medicamentos/legis/01_05_re_comentada.pdf>. Acesso em: 16 ago. 2012.

CARSTENSEN, J. T. **Drug Stability**: principles and practices. 2 ed. New York: Marcel Dekker, p. 37, 1995.

CARSTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. **Drug Stability**: principles and practices. 3ed. New York: Marcel Dekker, p. 287, 2000.

CARVALHO, J. P.; SANTOS, A. S.; SA, A. S.; TEIXEIRA, C. S.; NOGUEIRA, M. S. Estabilidade de medicamentos no âmbito da farmacovigilância. **Fármacos e Medicamentos**, v. 34, n. 6, p. 98, 2005.

CHAFETZ, L. Stability-indicating assay methods for drugs and their dosage forms. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, n. 3, p. 335-345, 1971.

CONNORS, K. A.; AMIDON, G. L.; STELLA, V. L. Chemical stability of pharmaceuticals: a handbook for pharmacists. New York: John Wiley, 1986. 847 p.

HO, C.; CHEN, G. L. Stability-indicating high-performance liquid chromatographic assay methods for drugs in pharmaceutical dosage forms: part I. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 5, p. 271-292, 1997.

ICH. **Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products Q5C**, 1995. Disponível em:<http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5C/Step4/Q5C_Guideline.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2011.

ICH.**Photostability Testing of New Drug Substances and Products Q1B**, 1996a. Disponível em:<http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1B/Step4/Q1B_Guideline.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2011.

ICH. **Stability Testing for New Dosage Forms Q1C**, 1996b. Disponível em:<http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1C/Step4/Q1C_Guideline.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2011.

ICH. **Bracketing and Matrixing Designs for Stability Testing of Drug Substances and Drug Products Q1D**, 2002. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1D/Step4/Q1D_Guideline.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2011.

ICH. **Stability Testing of New Drug Substances and Product Q1A(R2)**, 2003a. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2_Guideline.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2011.

ICH. **Evaluation of Stability Data Q1E**, 2003b. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1E/Step4/Q1E_Guideline.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2011.

ICH. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R2)**, 2005. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2011.

ICH. **Stability Data Package for Registration Applications in Climatic Zones III and IV Q1F**, 2006a. Disponível em: <<http://www.ikev.org/haber/stabilite/kitap/34%201.6%20%20Stability%20Workshop%20ICH%20Q1F%20C%20.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2011.

ICH. **Impurities in New Drug Substances Q3A (R2)**, 2006b. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3A_R2/Step4/Q3A_R2_Guideline.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2011.

ICH. **Impurities in New Drug Products Q3B (R2)**, 2006c. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002676.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2011.

KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C. T. Trends in Stability Testing, with Emphasis on Stability During Distribution and Storage. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n.7, 857-868, 1999.

JELINSKA, A.; DUDZINSKA, I.; ZAJAC, M.; OSZCZPOWICZ, I. The stability of the amorphous form of cefuroxime axetil in solid state. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical. Analysis**, v. 41, p. 1075-1081, 2006.

LACHMAN, L.; COOPER, J.A comprehensive pharmaceutical stability testing laboratory I. Physical layout of laboratory and facilities available for stability testing. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v. 48, n. 04, p. 226-233, 1959.

LACHMAN, L.; LIEBERMEN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. 1 ed. Lisboa: Fundação Galouste Guldenkian. Vol. II, p. 1017, 2001.

LEITE, E. G. **Estabilidade: Importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de fármacos e medicamentos**. Dissertação de mestrado. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UFRS; p 57, 2005.

MARKENS, U. Conducting stability studies – recent changes to climatic zone IV. **Pharma Times**, v. 42, n. 7, p. 239-245, 2010.

MARTINEZ, L.G.; FALCO, P.C.; CABEZA, A.S. Comparison of several methods used for the determination of cephalosporins. Analysis of cephalexin in pharmaceutical samples. **Journal of. Pharmaceutical. Biomedical. Analysis.**, v. 29, p. 405-423, 2002.

MATTHEWS, B. R. Regulatory aspects of stability testing in Europe. **Drug development and Industrial Pharmacy**. [S.I.], v. 25, n.7, p.381-856, 1999.

MERCOSUL. **Resolução GMC 53, 1996**. Aprova o regulamento técnico denominado “Estabilidade de Produtos Farmacêuticos” para aplicação da resolução GMC 23/95.

PRISTA, L. V. N.; ALVES, A. C.; CAMPOS, R. M. **Técnica farmacêutica e Farmácia Galênica**. 3 ed. Lisboa: Fundação Galouste Guldenkian, p. 417, 1990.

ROSEN, G. **Uma história de saúde pública**. 2. ed. São Paulo: Editora UNESP, p. 39, 1994.

SILVA, K. E. R.; ALVES, L. D. S.; SOARES, M. F. R.; PASSOS, R. C. S.; FARIA, A. R.; ROLIM NETO, P. J. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 1-8, 2009.

REYNOLDS, D. W.; FACCHINE, K. L.; MULLANEY, J. F.; ALSANTE, K. M.; HATAJIK, J. D.; MOTTO, M. G. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. **Pharmaceutical Technology**, Iselin, p. 48-56, 2002.

SIMON, P.; VEVERKA, M.; OKULIAR, J. New screening method for the determination of stability of pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 270, p. 21-26, 2004.

VADAS, E.B. **Estabilidade de produtos farmacêuticos**. In: GENARO, A. R. (Ed.). Remington: A Ciência e a prática em farmácia. 20 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 1022-1031.

XU, Q. A.; TRISSEL, L. A. **Stability-indicating HPLC methods for drug analysis**. 3 ed. American Pharmacists Association: Whashington, p. 109, 2008.

ZAJAC, M.; JELINSKA, A.; DOBROWOLSKI, L.; OSZCZAPOWICZ, I. Evaluation of stability of cefuroxime axetil in solid state. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 1181-1187, 2003.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V. J. **Stability of Drugs and Dosage Forms**. Kluwer Academic Publishers New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, p. 111-115, 2002.

WHO. Guidelines for stability testing of pharmaceutical products containing well established drug substances in conventional dosage forms, Annex 5. **WHO Technical Report Series**, n. 863, p. 65-79, 1996.

WHO. Aspects of Quality Assurance. **WHO Drug Information**, v. 18, n.2, p.113-116, 2004.

WHO. Good Distribution Practices (GDP) for Pharmaceuticals Products. Disponível em <http://www.who.int/medicines/services/expertcommittes/pharmprep/QAS_068Rev2_GDPdraft.pdf>. Acesso em 14 mar. 2012.

CAPÍTULO II

Nova alternativa analítica para quantificação do antilepromatoso dapsona por espectrofotometria UV

5. Capítulo II

Nova alternativa analítica para quantificação do antilepromatoso dapsona por espectrofotometria UV

RESUMO

Dapsona é a droga de escolha para o tratamento da lepra. Apesar da existência de métodos analíticos anteriores, este estudo teve como objetivo desenvolver uma nova alternativa analítica para quantificação de dapsona por espectrofotometria UV. Uma vez que o método farmacopeico utiliza metanol, um solvente tóxico, o método foi desenvolvido utilizando primeira diluição em etanol (500 ug / mL) e segunda diluição em água (5 ug / mL), com quantificação em 295 nm. Para a validação, a seletividade foi confirmada pela quantificação de amostras degradadas, utilizando o método desenvolvido em comparação com uma segunda técnica analítica (CLAE-DAD). O método proposto mostrou-se seletivo, linear, preciso, exato e robusto, com baixo custo analítico e toxicidade, além de apresentar facilidade operacional.

Palavras-chave: dapsona, método analítico, espectrofotometria UV.

ABSTRACT

Dapsone is the drug of choice for the treatment of leprosy. Despite the existence of previous analytical methods, this study aimed to develop a new analytical alternative for quantification of dapsone by UV spectrophotometry. Since the pharmacopeial method uses methanol, a toxic solvent, the method was developed using first dilution in ethanol (500 µg/mL) and second dilution in water (5 µg/mL), with quantification in 295 nm. For validation, the selectivity was confirmed by quantification of degraded samples using the developed method in comparison with a second analytical technique (HPLC-DAD). The proposed method proved to be selective, linear, precise, accurate and robust, with analytical low cost and toxicity, besides presenting operational ease.

Keywords: dapsone; analytical method; UV spectrophotometry.

1. Introdução

A dapsona é um fármaco antimicrobiano utilizado no combate ao *Mycobacterium leprae*, uma actinobactéria causadora da hanseníase. Esta é uma moléstia neurocutânea de evolução crônica, que afeta principalmente a pele, nervos periféricos e membranas mucosas (AVILA & FERREIRA, 2001; OPROMOLLA, 1997; VARDANYAN & HRUBY, 2006).

Há diversos métodos analíticos publicados na literatura científica e em compêndios oficiais destinados à quantificação da dapsona por diferentes técnicas, como cromatografia líquida, eletroforese capilar, espectrofotometria e polarografia (MORAES et al., 2008; GRAEFF, 2007). O método farmacopeico para quantificação da dapsona utiliza um sistema solvente composto por metanol e água purificada com leitura por espectrofotometria UV. Tal sistema solvente, devido à presença do metanol, é considerado tóxico ao analista e ao meio ambiente. Metanol tem limites rígidos de exposição, podendo causar danos se inalado, inserido ou entrar em contato com a pele ou mucosas. A toxicidade do metanol torna o método oficial obsoleto e inadequado às necessidades atuais, que envolvem segurança no laboratório, segurança ocupacional e tratamento de resíduos químicos. Sendo necessário o desenvolvimento de uma nova alternativa analítica, em conformidade com as exigências atuais.

A técnica de espectrofotometria no UV apresenta as vantagens de facilidade operacional e rapidez, baixo custo, além de resultados de fácil interpretação, sendo largamente utilizada no controle de qualidade de produtos farmacêuticos, quando estas vantagens são requeridas (SOARES et al., 2008). Esta técnica, não específica, quando aplicada com a finalidade correta é uma excelente alternativa e não há necessidade de trocá-la. O método analítico descrito é destinado ao doseamento simples do fármaco, não sendo indicado para a quantificação simultânea deste e suas impurezas, oriundas da síntese (inorgânicas, orgânicas e orgânicas voláteis) e/ou produtos de degradação. Tal método deve provar sua especificidade ao fármaco em amostras contendo tais impurezas, garantindo que não haja a quantificação indevida destas, atestando então um doseamento errôneo e uma falsa qualidade para a matéria-prima (USP, 2010; BARI et al, 2007). A demonstração da seletividade pode ser feita por uma análise com uma segunda técnica específica, como a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de diodos (CLAE-DAD) (SOARES, 2008).

Ao efetuar uma medição química é necessário que os seus resultados sejam confiáveis e reprodutíveis a fim de demonstrar a qualidade da determinação química. De acordo com a United States Pharmacopeia (USP), a validação de métodos analíticos assegura

a credibilidade destes durante o uso rotineiro, definido como “um processo que fornece evidências documentadas de que o método realiza aquilo que é determinado a fazer”. Além disso, o processo de validação tornou-se uma ferramenta de qualidade e não uma proforma automatizada e inflexível. Aproveitando os benefícios da validação de um método (USP, 2010).

Calculou-se a absorvidade molar do fármaco, que é a capacidade de um mol de dapsona absorver a luz a 295 nm, em um dado solvente. Pôde-se, por meio deste cálculo, avaliar a proximidade dos valores de absorvância encontrados dentro do intervalo linear do método com os valores teóricos, oriundos da absorvidade. Tal ferramenta, se aplicada adequadamente, permite avaliar qualquer concentração de dapsona em qualquer solvente, desde que se tenha feito o cálculo para dado solvente, facilitado a rotina de desenvolvimento analítico (USP, 2010).

Portanto, presente trabalho tem por objetivo o desenvolvimento e validação de uma nova alternativa analítica para o doseamento da dapsona, devidamente adequada as necessidades atuais de baixo custo, rapidez analítica, adequada especificidade, baixo risco de contaminação por agentes tóxicos (ocupacional e ambiental) e qualidade metrológica, garantindo através de estudos experimentais, que o método atenda as exigências preconizadas pela *International Conference on Harmonization* (ICH, 2005).

2. Materiais e Métodos

Matéria-prima: dapsona (Sigma-Aldrich[®], 98.4%, Lote: 10.07.2008). **Reagentes:** etanol (Qeel[®]), metanol (Qeel[®]), ácido clorídrico (Dynamic[®]), peróxido de hidrogênio (Vetec[®]) e água purificada obtida por osmose reversa (Tecnal[®], TE-4007/10). **Equipamentos:** balança analítica (Bel Engeneering[®]), espectrofotômetro (modelo: Spectrophotometer 8500 II Techcomp[®]), Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência equipado com bomba quaternária (LC-20AT), autoinjeter (SIL-20A), detector de arranjo de diodo (SPD-M20A), degaseificador e forno de coluna (CTO-20AC) (Shimadzu[®]), com coluna Restk[®] (C₁₈, 250 x 4,6 mm, ø 5 µm) e um banho de ultra-som (modelo Cleaner Ultra Unique 800).

Desenvolvimento do método analítico

Inicialmente, a solubilidade do fármaco foi analisada a temperatura ambiente com os diferentes solventes: água, etanol, metanol e ácido clorídrico 0,1 M, e mistura destes solventes

(FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2003; ALVES et al., 2010). A fim de se definir a melhor solução diluente, a solubilidade do fármaco foi correlacionada com o custo e toxicidade dos solventes.

Depois da escolha do sistema solvente, por meio de um espectrofotômetro, uma varredura foi realizada na faixa de 180 nm a 500 nm a fim de se determinar qual comprimento de onda apresenta maiores valores de absorvância. Após isto, encontrou-se a concentração da amostra, sendo uma concentração capaz de obter um sinal analítico desejável entre 0,1 e 0,8 de absorvância, e delinear-se as condições de preparo da amostra. Alguns critérios de preparo da amostra foram avaliados cuidadosamente para uma melhor compreensão e otimização do método. Os critérios avaliados foram: tempo de agitação da amostra por ultrassonificação (9, 10 e 11 minutos), estabilidade química da dapsona no sistema solvente (0, 24, 48 horas) (Tabela 2) e influência da radiação emitida por luz artificial durante o preparo da amostra (presença e ausência de luz).

Preparo da amostra

Uma amostra de dapsona foi analiticamente pesada, transferida para um balão volumétrico, diluída em etanol e sonicada por 10 minutos, resultando em uma solução de concentração de 500 µg/ml. Uma alíquota foi retirada dessa solução concentrada foi transferida para um balão volumétrico, diluída em água purificada e homogeneizada manualmente, resultando em uma solução final de concentração 5 µg/ml. As amostras foram preparadas em triplicata e quantificadas por em espectrofotômetro UV no comprimento de onda de 295nm, utilizando água purificada como branco.

Validação do método analítico

Especificidade: Para determinar a seletividade das amostras do método com o fármaco será comparado com amostras que contêm o fármaco na presença de seus produtos de degradação majoritários, obtidos por um estudo de degradação forçada, por análise do método desenvolvido em comparação com uma segunda técnica analítica (CLAE-DAD). As condições do estudo de degradação forçada foram selecionadas levando-se em consideração as características físico-químicas da dapsona. Devido a sua baixa solubilidade em água e baixa higroscopicidade, testes preliminares foram conduzidos para avaliar a possibilidade de ocorrência de degradação hidrolítica da dapsona no estado sólido durante o armazenamento. Uma vez que a droga não mostrou nenhuma capacidade para adsorver/absorver umidade da

atmosfera e iniciar um processo de hidrólise, a degradação hidrolítica não foi avaliada por estudo de degradação forçada, uma vez que não representa condições reais de estresse que possam ocorrer durante o armazenamento desta. Os parâmetros analisados nos estudos de degradação forçada foram: oxidação, termodecomposição e fotoirradiação. A matéria-prima dapsona pó ou soluções à 5 µg/mL foram fracionadas para a realização do estudo em triplicata. A degradação oxidativa foi conduzida utilizando uma solução a 3% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) à temperatura ambiente, protegidos da luz, por 2 dias. Para parar a oxidação, a amostra foi aquecida em chapa de aquecimento para a retirada de todo o peróxido de hidrogênio. A fotoirradiação foi conduzida usando uma câmara de fotoestabilidade com submissão a um mínimo de 200 W/m² de irradiação UV, 1.200.000 lux de irradiação visível. O cálculo do tempo equivalente para estas duas fontes de radiação, em com irradiâncias ou iluminâncias diferentes, produzirem a mesma dose é feito através da equação da reta obtida com a média de 3 análises idênticas para a absorvância do quinino (irradiância) e a quantidade de lux por hora (iluminância). As amostras termodegradadas foram realizadas com o fármaco no estado sólido, em estufa calibrada a 60°C por 7 dias. O método através da técnica analítica de CLAE- DAD teve os parâmetros: fase móvel composta por 20% de acetonitrila e 80% de ácido fosfórico (pH 3), fase estacionária C18, volume de injeção de 50 µg/mL, tempo de corrida de 18 minutos, temperatura do forno de 30 °C, pressão média da coluna de 124 Kgf, integração de 3 segundos, slope de 50.000 e comprimento de onda de 295 e 240.

Linearidade: Para determinação da linearidade do método, realizou-se três curvas autênticas com 5 pontos de concentrações (80, 90, 100, 110, 120%). Os resultados foram estatisticamente tratados através do cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

Precisão: A precisão do método foi avaliada pela repetitividade (precisão intra-corridas) e precisão intermediária (precisão inter-corridas). Para determinação da repetitividade, seis amostras na concentração do fármaco de 100% do valor nominal do método (5 µg/ml), foram analisadas na mesma sequência analítica e com o mesmo analista. Para determinação da precisão intermediária, três réplicas das amostras na concentração do fármaco de 100% da concentração teste (5 µg/ml) foram analisadas em dois dias diferentes e por dois analistas diferentes.

Exatidão: A exatidão do método foi avaliada através da análise de três amostras na concentração de 80, 100 e 120% da concentração teórica da dapsona (4, 5 e 6 µg/ml), A

exatidão foi calculada como a porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado a amostra, ou como a diferença de porcentagem entre a média e o valor real aceito mais o intervalo de confiança. A exatidão foi expressa como a razão entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, esta relação é multiplicada por 100. De acordo com os critérios de aceitação internos adotados, a exatidão deve proporcionar a recuperação de analito de $100 \pm 2\%$ e a média dos resultados deve ter um coeficiente de variação menor ou igual a 2%. Outra análise estatística usada foi o teste t de Student para avaliar a variação entre duas amostras (padrão).

Robustez: A robustez do método foi avaliada por variação de parâmetros aplicados à preparação da amostra e/ou do método analítico, tal como a variação do tempo de sonicação das amostras entre 9, 10 e 11 minutos, e a variação do comprimento de onda selecionado: 294,5, 295 e 295,5 nm.

Determinação da absorvidade molar

A lei de Lambert-Beer é a base matemática para medidas de absorção de radiação pelo espectrofotômetro. A absorvidade molar (ϵ) é a grandeza analisada nas medições espectrofotométricas. Tal grandeza é característica da espécie absorvente, cuja magnitude depende do comprimento de onda da radiação incidente (USP, 2010; ALVES et al., 2010). Para o cálculo da absorvidade molar da dapsona nos solventes de interesse, água purificada e etanol, utilizou-se as equações de molaridade (equação 1) e absorvidade (equação 2).

Equação 1: $M = m / \text{mol} \times V$, onde M é molaridade, m é a massa molar e V o volume da solução

Equação 2: $\epsilon = \text{Abs} / M$, onde ϵ é absorvidade, Abs é a absorbância e M a molaridade da solução.

3. Resultados e discussão

3.1 Desenvolvimento do método analítico

De acordo com a análise da solubilidade da dapsona em diferentes solventes, observou-se que o fármaco apresentou-se muito pouco solúvel em solução de HCl 0,1M, água purificada e etanol, sendo pouco solúvel em metanol (Tabela 1) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2003). Os resultados, mostrados na Tabela 1, não possibilitaram a escolha do solvente mais adequado, uma vez que não somente a classificação de solubilidade do fármaco é de relevância, sendo necessário correlacionar estes dados com valores de concentração da saturação do solvente e estabilidade. Apesar do metanol ter apresentado maior solubilidade, o mesmo foi excluído das opções devido a alta toxicidade, com desvantagens ambientais e ocupacionais. Os outros três solventes, na mesma categoria, apresentaram diferentes concentrações de saturação, e o etanol foi selecionado como a melhor escolha. O estudo de estabilidade da dapsona em etanol está descrito na Tabela 2. A primeira diluição foi obtida com etanol e a segunda diluição, ao final, foi obtida com água. O experimento foi realizado em sextuplicata.

Tabela 1. Teste de solubilidade em solventes diferentes de acordo com a Farmacopeia Brasileira.

Solvente	Volume necessário para solubilizar	Classificação	Termo descritivo
HCl 0.1M	Mais que 100 mL	Muito pouco solúvel	1.000 a 10.000 partes
Água destilada	Mais que 100 mL	Muito pouco solúvel	1.000 a 10.000 partes
Etanol	Cerca de 20 mL	Muito pouco solúvel	1.000 a 10.000 partes
Metanol	Cerca de 10 mL	Ligeiramente solúvel	100 a 1.000 partes

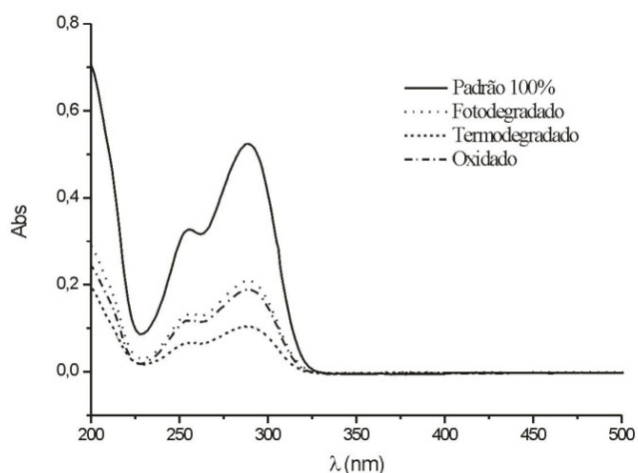
Tabela 2: Estabilidade da solução de dapsona nos tempos 0, 24 e 48 horas depois da preparação, através de análises espectrofotométricas.

Tempo (h)	Média	CV%
0	0.532	1.22
24	0.539	1.77
48	0.531	1.20

F calculado = 1,0093F tabelado = 5,1432

Por meio de uma varredura espectrofotométrica UV-Vis dois picos de absorvância, um em 260,5 e 295 nm (Figura 1). Adotou-se então o segundo valor, visto que o fármaco demonstrou uma maior absorvância em tal comprimento. Para determinação do tempo de sonicação da amostra, 10 minutos, foi escolhido como melhor opção. A presença de radiação emitida por fonte de luz artificial não influencia a estabilidade do fármaco em solução, por conseguinte, a preparação da amostra pode ser realizada sem proteção da luz.

Figura 1: Especificidade do método analítico por Espectro UV-Vis.



3.2 Validação do método analítico

Especificidade: Os resultados mostrados do doseamento de amostras por espectrofotometria UV-Vis foram estatisticamente semelhantes aos resultados de doseamento de amostras por CLAE-DAD na área sob a curva (AUC) (teste t de Student, n=3, p<0,05) (Tabela 3). O método de CLAE-DAD apresenta pico de pureza satisfatório do pico do

fármaco e foi capaz de detectar outros picos correlacionados durante a análise, em diferentes tempos de retenções, mas nem todos os picos de massa podem ser explicados. O objetivo deste experimento não era a quantificação de produtos de degradação, uma vez que não houve padrões químicos de referência para isto, e porque cada molécula tem absorvidade molar específica, não podemos correlacionar a área sob a curva atribuída a produtos de degradação com a área sob a curva do fármaco. Uma vez que o método de CLAE mostrou uma pureza satisfatória do pico principal, ele foi considerado apropriado para demonstrar a especificidade do método espectrofotométrico. Com base nos resultados pode-se dizer que a quantificação da dapsona ocorre de forma segura e eficiente, mesmo na presença de substâncias afins, que não são capazes de observar durante a análise.

Os resultados também permitem analisar a estabilidade do fármaco, uma vez que se classifica o oxigênio como sendo o agente de maior impacto na estabilidade da matéria-prima. Pode ser necessário selecionar uma formulação, processo de fabricação e material de embalagem apropriado para evitar um grande contato do oxigênio com o fármaco. A fotoirradiação foi o segundo principal agente capaz de degradar o fármaco. Pode ser necessário selecionar um material de embalagem apropriado para bloquear a radiação ultravioleta emitida pela luz solar e luz artificial.

Tabela 3: Especificidade do método analítico, utilizando a CLAE-DAD como padrão.

Amostras	Abs λ_{295} nm	% Abs	AUC* CLAE (DAD)	% AUC*	Teste t Calculado ($p < 0,05$)	Teste t Tabelado ($p < 0,05$)
Solução Padrão (5 $\mu\text{g/mL}$)	0,491	100,0%	552679	100,0%		
Solução Oxidada (3% H_2O_2 , 2 dias)	0,096	19,5%	108557	19,6%	1,0000	4,3026
Solução termodegradada (60°C, 7dias)	0,177	36,0%	192885	34,9%	0,0006	
Solução fotoirradiada (1.200.000 lux)	0,195	39,7%	212781	38,5%	0,0194	

*AUC:Área sob a curva

Linearidade: A análise de regressão linear dos mínimos quadrados demonstrou um coeficiente de correlação R^2 de 0,9932, indicando que a linearidade está dentro dos limites das concentrações estudadas. A equação da reta obtida foi $y = 0,1132x - 0,0157$, no intervalo de

80 a 120%. Os CV% para as concentrações de 4; 4,5; 5; 5,5 e 6 µg/ml foram de 2,05; 2,62; 3,28; 1,5; 2,55, respectivamente. Além disso, foi realizada ANOVA *One Way*, onde foi obtido o valor de F (0,1406) menor que o F crítico (2,7728).

Precisão: O método demonstrou ser preciso nos dois níveis testados. Para a repetitividade os resultados apresentaram média de 100% de absorvância, com CV% de 2,56%. Na precisão intermediária apresentada, por tratamento estatístico ANOVA *One way*, o F calculado de 0,1943 para dias diferentes e 0,4339 para analistas diferentes, foram menores do que os F tabelado de 18,513.

Exatidão: A exatidão foi confirmada por encontrar resultados dentro das especificações teóricas. O estudo estatístico aplicado foi o teste *t Student*, o qual demonstrou que o t calculado para cada concentração foi de 0,0963 (80%); 0,0201 (100%) e 0,0160 (120%), sendo menor do que o t tabelado 2,1318, comprovando que não houve diferença significativa entre as médias das três concentrações analisadas.

Robustez: O método demonstrou ser robusto quanto à variação de comprimento de onda. De acordo com os resultados tratados por ANOVA *One way*, o valor do F calculado foi de 0,2735, sendo menor que o F tabelado de 5,1432, provando a robustez do método para este parâmetro. Quanto a influência do de pequenas e deliberadas variações no tempo de sonicação da amostra, estatisticamente tratados por ANOVA *One way*, o valor do F calculado de 0,6418 menor que o F tabelado de 5,1432, prova a robustez do método para este parâmetro.

Absortividade Molar

Na concentração teórica do fármaco de 100% do método, 5µg/mL, as absorvâncias das soluções preparadas com etanol e água purificada foram de 0,464 e 0,498, respectivamente. Para o cálculo da molaridade, utiliza-se a equação da molaridade. Sabendo que a massa molar da dapsona é de 248.3 g/mol, e que a concentração utilizada nas absorvâncias foi de 5 µg/mL, conclui-se que a molaridade das soluções correspondentes foi de $2,1 \times 10^{-5}$ mol/L. Aplicando-se a equação da molaridade, pode ser estimada a absorvidades molares da dapsona em água purificada e álcool etílico foram de 24776,12 $M^{-1}cm^{-1}$ e 23084,57 $M^{-1}cm^{-1}$. Uma vez realizado o cálculo de absorvidade molar para determinado solvente, pode-se então descobrir qualquer concentração cuja absorção seja conhecida para aquele solvente, bastando aplicar a fórmula.

4. Conclusão

O novo método foi desenvolvido de acordo com as necessidades de propiciar uma alternativa segura ao ambiente, através da formação de resíduos químicos com impacto ambiental reduzido sem sacrificar a segurança do analista. A validação foi feita segundo as normas do ICH, apresentando a confiabilidade requerida para um método analítico. Os resultados obtidos mostram que o método atende as exigências das Boas Práticas Laboratoriais, pois garante confiabilidade metrológica requerida a um método analítico. Além de confiável, ficou demonstrado também ser um método seguro, rápido e de custo baixo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, L.D.S.; ROLIM, L.A.; FONTES, D.A.F.; ROLIM-NETO, P.J.; SOARES, M.F. R.; SOARES-SOBRINHO, J.L. Desenvolvimento de método analítico para quantificação do Efavirenz por espectrofotometria no UV-Vis. **Química Nova**, v. 33, p. 1967-1972, 2010.

AVILA, S.L.M.; FERREIRA, A.W. **Hanseníase, Diagnósticos laboratoriais das principais doenças infectocontagiosas e auto-imunes**. 2 ed., São Paulo: Editora Atheneu, p. 177-186, 2001.

BARI, S.B.; BHARATI, R.K.; JAISWAL, Y.S.; SHIRKHEDKAR, A.A. Impurity profile: Significance in active pharmaceutical ingredient. **Eurasian Journal of Analytical Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 32-53, 2007.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

GRAEF, L.E. **Desenvolvimento e validação de um método analítico quantitativo por eletroforese capilar para tuberculostático de primeira escolha**. 2007. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, 2007.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH); Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use – ICH “Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Methodology”, 2005.

MORAES, N.V.; MELLO, M.H.; SOUZA, A.M.; SAMPAIO, S.V.; QUEIROZ, R.H.C. Potencialização do efeito metemoglobinizante da dapsona em ratos pela N-acetilcisteína. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 4, n. 1, p. 97-104.

OPROMOLLA, D. V. A; Terapêutica da Hanseníase. **Medicina**, v. 30, p.345-350, 1997.

SOARES, M.F.L.R.; SOARES-SOBRINHO, J.L.; GRANEIRO-JÚNIOR, S.; SILVA, K.E.R.; ROLIM, P.J. Métodos de Determinação do Ornidazol em Comprimidos Revestidos:

Desenvolvimento, Validação e Comparação Estatística. **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 27, n. 5, p. 688-94, 2008.

UNITED STATES Pharmacopeia Convention; 33 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, p. 1225, 2006.

VARDANYAN, R.S.; HRUBY, V.J. Drugs for Treating Leprosy. **Synthesis of Essential Drugs**. Amsterdam: Elsevier, p. 532-533, 2006.

CAPÍTULO III

Estudo de pré-formulação do fármaco dapsona: caracterização físico-química, estabilidade térmica e compatibilidade frente a excipientes.

6. Capítulo III

Estudo de pré-formulação do fármaco dapsona: caracterização físico-química, estabilidade térmica e compatibilidade frente a excipientes.

Resumo

Com o fim de alcançar a qualidade e aumento no perfil de segurança no processo de fabricação farmacêutica, estudos de pré-formulação preconizam o conhecimento sistemático do processo de desenvolvimento de um medicamento através de experimentos multivariados. O primeiro esforço nesse sentido deve ser a caracterização físico-química do fármaco. A dapsona (DDS) é o centro da poliquimioterapia, tratamento de primeira escolha no tratamento da hanseníase. O objetivo desse trabalho foi realizar um estudo detalhado das propriedades físico-químicas da DDS, através de múltiplos ensaios. Foram obtidos perfis térmicos, difratométricos, químicos e morfológicos. O espectro de infravermelho confirmou a estrutura química da DDS. A eletromicrografia e a difratometria de raios X evidenciaram a morfologia e a cristalinidade do fármaco, respectivamente. As análises térmicas forneceram informações importantes sobre temperatura de fusão e degradação do fármaco, e a cinética de degradação não-isotérmica revelou valores de energia de ativação, fator de frequência e ordem da reação. A análise da compatibilidade da DDS frente a excipientes farmacêuticos foi realizada através de técnicas de análise térmica, que demonstraram ausência de variações significativas das faixas de fusão e dois comportamentos distintos quanto às faixas de decomposição: a não identificação do pico endotérmico característico de decomposição, para celulose, estearato de magnésio e glicolato de amido sódico, e o deslocamento do pico de decomposição para amido, PVP e beta ciclodextrina. Esses resultados são essenciais para padronizar e estabelecer condições nas quais a DDS é estável.

Palavras-chave: Pré-formulação, Dapsona, Análise térmica.

Abstract

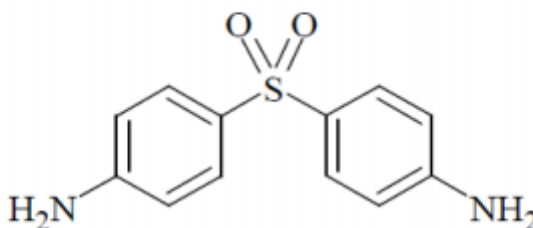
In order to achieve the quality and increase the safety profile during the manufacturing process pharmaceutical preformulation studies recommend the systematic knowledge of the development of a drug through multivariate experiments. The first effort in this direction should be the physicochemical characterization of the drug. Dapsone (DDS) is the center of multidrug therapy, treatment of first choice in the treatment of leprosy. The aim of this study was to perform a detailed study of the physicochemical properties of the DDS, across multiple trials. Thermal profiles were obtained, difratométricos, chemical and morphological. The infrared spectra confirmed the chemical structure of the DDS. The electron and X-ray diffraction showed the morphology and crystallinity of the drug, respectively. Thermal analysis provided important information on the melting temperature and degradation of the drug, and the kinetics of non-isothermal degradation revealed activation energy values, frequency factor and order of reaction. The analysis of the compatibility of DDS against pharmaceutical excipients was performed using thermal analysis techniques, which showed no significant variations of fusion tracks and two distinct behaviors regarding tracks decomposition: the failure to identify the characteristic endothermic peak decomposition for cellulose, magnesium stearate and sodium starch glycolate, and displacement to peak decomposition starch, PVP and beta cyclodextrin. These results are essential to standardize and to establish conditions under which the DDS is stable.

Keywords: Pre-formulation, Dapsone, Thermal analysis.

1. Introdução

A dapsona (4, 4' diaminodifenil sulfona) (Figura 1) é um fármaco empregado com êxito no tratamento da hanseníase desde 1940, sendo um dos fármacos de escolha do tratamento desta doença (BLEUMINK, 1992; BRASIL, 1989; DOUGLAS, 1980; ZUIDEMA et al, 1986). Trata-se de um pó cristalino, branco e inodoro, classificada como uma sulfona bacteriostática e antiinflamatória (GOULART et al, 2002). Este fármaco tem peso molecular igual a 248,31 g/mol (HARDMAN, LIMBIRD & GILMAN, 2007), Lindenberg e colaboradores (2004) classificaram a dapsona (DDS) como fármaco pertencente à Classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), ou seja, possui baixa solubilidade e alta permeabilidade. Ao passo que, posteriormente, Cao e colaboradores (2006) sugerem Classe IV, atribuída à baixa solubilidade e baixa permeabilidade.

Figura 1 – Estrutura química da dapsona



Devido a sua baixa solubilidade em água, formulações a base de dapsona tornam-se difíceis e ainda mais problemáticas. Observa-se ainda, problemas com relação à estabilidade do fármaco em formulações, que não se disponibiliza em formulações pediátricas líquidas. Há evidências na literatura que o produto de oxidação da dapsona pode ser obtido tanto em formulações sólidas, como em produtos semi-sólidos de uso tópico, especialmente se o sistema de embalagem primário utilizado não se mostrar adequado para inibir reações de oxidação (HEATCHCOCK *et al.*, 1985; GREENHILL & MCLELLAND, 1990), sendo mais provável a formação do nitro derivado, que seria reduzido a N-hidroxil amina *in vivo*.

Problemas de solubilidade e de estabilidade em medicamentos podem colaborar para o surgimento de efeitos colaterais em tratamentos crônicos (PEREIRA, 2007). No caso da DDS há diversos relatos de efeitos colaterais sérios como anemia hemolítica, metahemoglobinemia, hepatites tóxicas e uma síndrome que ficou conhecida como a “Síndrome da Sulfona” (“rash”cutâneo, aumento de linfonodos, Icterícia, Hepatoesplenomegalia e Linfocitose com

linfócitos atípicos) (KROMANN; WILHIELMSEN & STAHL, 1982; OPRMOLLA, 1997). Além disso, desde o início do emprego da Sulfona, já se considerava a possibilidade de resistência e isso foi comprovado, experimentalmente, por Pettit & Rees em 1964.

Neste panorama, vários cientistas vêm estudando novas alternativas para desenvolvimento de novas terapias anti hansênicas. Resultados recentes mostram tentativas de incremento na solubilidade da DDS por inclusão em ciclodextrinas (GREBOGI et al, 2012), preparo de novas formulações de DDS a base de nanocompósitos (CARMO, 2009), desenvolvimento de novas microemulsões de DDS (BORGES, 2011), preparo de formulações líquidas extemporâneas (KAILA et al., 2003).

Para o desenvolvimento de formas farmacêuticas é necessário conhecimento sobre as propriedades físico-químicas do fármaco e excipientes, além de conhecimentos a cerca da estabilidade da molécula. Técnicas termoanalíticas são utilizadas nesse âmbito para se investigar essas propriedades. Estas técnicas têm sido usadas para diversos propósitos, incluindo a caracterização térmica (SOARES et al., 2011; SCHIMIDT, 2005; KANAZE et al, 2006, GOMES et al., 2007), estudos de estabilidade (GLASS et al, 2004; MARCINIEC, 2004; CERVANTES et al., 2003) e estudos de pré-formulação (SOARES-SOBRINHO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2005).

Nesse sentido, o estudo de caracterização físico-química da DDS aliado a estudos de análise térmica, irá contribuir com importantes informações para subsidiar futuras formulações. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um estudo de pré-formulação da dapsona com excipientes farmacêuticos, abrangendo estudos de caracterização físico-química, estabilidade térmica e compatibilidade da DDS.

2. Material e métodos

2.1 Material

A DDS foi sintetizada pela Sughou Yinsheng – Chemical Companies Ltd., importado pela Deg e doada por uma farmácia de manipulação, lote 2010-08-11. O padrão da dapsona foi sintetizado pela Sigma-Aldrich[®], 98.4%, Lote: 10.07.2008). Foram utilizados os solventes éter etílico (Dinâmica[®]) e acetonitrila (CaRlo Erba[®]). Os excipientes utilizados foram glicolato de amido sódico, estereato de magnésio, polivinilpirrolidona, celulose microcristalina, amido, lactose, beta ciclodextrina e metil beta ciclodextrina. Foram escolhidos excipientes clássicos devido ao baixo custo, já que a hanseníase é uma doença

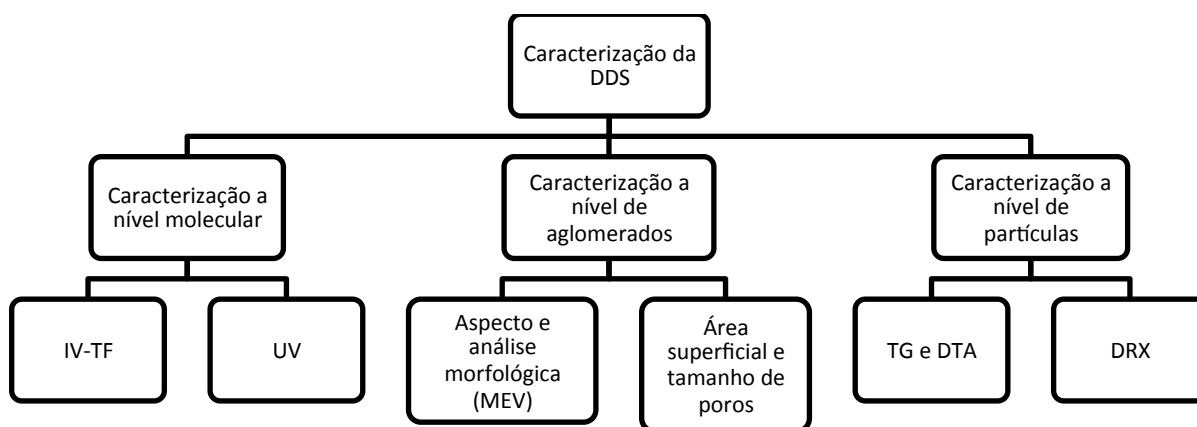
negligenciada. Já os dois últimos referem-se a tentativas de incremento de solubilidade da DDS.

As misturas binárias foram obtidas por mistura física dos compostos em frasco de vidro por um vórtice durante 15 min (Barnstead Thermolyne Maxi Mix II). A razão de 1:1 (p / p) foi escolhido para maximizar as interações entre os compostos, uma vez que os excipientes serão utilizados em proporções menores na formulação (SOARES-SOBRINHO et al, 2010).

2.2 Métodos

Inicialmente a molécula foi submetida a ensaios de espectrofotometria na região do infravermelho e ultravioleta para identificação e à técnica de cromatografia líquida de alta eficiência para determinação da pureza. Posteriormente avaliou-se a estrutura particular da DDS através de difração de raios X, microscopia eletrônica de varredura (MEV), área superficial e tamanho de poros. Com isso, procedeu-se às análises termoanalíticas, de termogravimetria (TG), análise térmica diferencial (DTA), estudo cinético de decomposição e estudo de compatibilidade. Conforme fluxograma de caracterização abaixo (Figura 2).

Figura 2 – Esquema de caracterização físico-química da DDS. Adaptado de CHING, 2011.



Espectrofotometria na região do Infravermelho e UV

O espectro de infravermelho foi obtido utilizando o equipamento PerkinElmer® (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de seleneto de zinco. As amostras a serem analisadas foram transferidas diretamente para o compartimento do dispositivo de ATR, sendo o resultado obtido da média de 16 varreduras. As micrografias foram obtidas de 650 a 4000 cm^{-1} na resolução de 4 cm^{-1} .

Para a obtenção da varredura por espectrofotometria na região UV utilizou-se espectrofotômetro da marca SHIMADZU UV-2401 PC equipado com detector ultravioleta e cubetas de quartzo de seção transversal de 1 cm².

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Sistema de CLAE equipado com bomba quaternária (LC-20ADVP), alimentado por degaseificador de hélio (DGU-20A), detector de arranjo de diodo (SPD-M20AVP), forno (CTO-20ASVP) de coluna Restk (C₁₈, 250 x 4,6 mm / 5 µm), autoinjeter (SIL-20ADVP) e controlador modelo SCL-20AVP. Os dados foram processados pelo software Shimadzu® LC solution 2.0.

As condições utilizadas no método foram fase móvel acetonitrila : água até ph 3 com ácido fosfórico na proporção 2:8 (v/v), respectivamente, com um fluxo de 1 mL.min⁻¹, a 25 °C. O volume de injeção utilizado foi de 30 µL a uma concentração de amostra padrão de 50 µg.mL⁻¹. Os resultados foram obtidos em comprimento de onda de 295 nm. Esse método foi desenvolvido e validado e está descrito no capítulo 4 deste trabalho.

Difração de raios-X (DRX)

O difratograma do fármaco foi obtido no difratômetro SIEMENS® (X-Ray Diffractometer, D-5000), equipado com ânodo de cobre. As amostras foram analisadas no intervalo de ângulo 2θ de 5-80 a uma velocidade de digitalização de 0,02° 2θ/s. As amostras foram preparadas em suportes de vidro com uma fina camada de material do pó sem solvente.

Descrição e análise morfológica

A matéria-prima foi visualizada a olho nu, para verificação do aspecto e cor. A avaliação da morfologia dos cristais da DDS realizada através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) utilizando-se um microscópio Jeol® JSM-5900, após serem fixadas em fita de dupla face de carbono e metalizadas com ouro por 15 min (Metalizador Baltec® SCD 050). As eletromicrografias foram obtidas em uma câmara com tensão de excitação de 15 KV.

Área superficial e tamanho de poros

Para a realização deste ensaio, foi utilizado um Analisador de Área Superficial e Tamanho de Poros–ASAP 2420 Micromeritics®, munido de software próprio para determinar

a área superficial (SBET) e porosidade (tamanho de poro e volume total de poros) pelo método Barret-Joyner-Halenda (BJH).

Uma amostra de aproximadamente 200 mg do fármaco foi transferida para o tubo de amostra, para remover qualquer material adsorvido no interior dos poros e na superfície do material, durante 48h a 100°C.

A adsorção física progressiva de nitrogênio a -198°C sobre o material, e subsequente dessorção deu origem às isotermas adsorção/dessorção, aplicando-se os modelos apropriados para o ajuste dos pontos experimentais. A aplicação do modelo de BET sobre a porção apropriada da curva forneceu o valor da área superficial (de BET e de Langmuir).

Estudos termoanalíticos

Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)

A caracterização termoanalítica através de TG e DTA foi realizada em duplicata por meio de termobalança Shimadzu®, modelo TGA Q60, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50 mL.min⁻¹, sendo a massa da amostra de cerca de 4,5 mg (\pm 0.5) de DDS, acondicionadas em cadinho de platina na faixa de temperatura de 25 a 600 °C na razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹. Antes dos ensaios, verificou-se a calibração do instrumento empregando-se uma amostra de alumínio e zinco.

Estudo cinético de termodecomposição da DDS

A investigação cinética de degradação não-isotérmica da DDS foi obtida a partir dos dados de TG pela aplicação do método de Ozawa. Foram utilizadas razões de aquecimento 2,5, 5,0, 10, 20 e 40 °C.min⁻¹, faixa de temperatura entre 30-800 °C, em porta amostra de alumina com aproximadamente 4mg de amostras e atmosfera dinâmica de nitrogênio em (50 mL·min⁻¹).

Para o estudo cinético isotérmico, as curvas TG foram obtidas a partir do aquecimento das amostras até as temperaturas de 260, 270, 280, 290 e 300 °C, e mantidas em condições isotérmicas em atmosfera de N₂ (50 mL min⁻¹) durante o tempo necessário para uma perda de massa de 5% \pm 0,5 em porta amostra de alumina com aproximadamente 4mg de amostra.

Estudo de Compatibilidade

Amostras de DDS e cada excipiente foram individualmente pesados em quantidades iguais e colocados em recipientes de vidro âmbar para dar peso final de 5 mg \pm 5%. As

misturas binárias 1:1 (DDS:excipiente) foram preparadas na relação p/p através de uma simples mistura.

As curvas de TG para análise de compatibilidade foram obtidas por meio de termobalança Shimadzu[®], modelo TGA Q60, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50 mL.min⁻¹, as amostras foram acondicionadas em cadinho de alumina na faixa de temperatura de 30 a 600 °C na razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹. Antes dos ensaios, verificou-se a calibração do instrumento empregando-se uma amostra de alumínio e zinco.

3 Resultados e Discussão

3.1. Identificação por espectroscopia no IV e UV e determinação do teor por CLAE

A espectroscopia na região do IV fornece informações sobre a estrutura e a conformação molecular da substância no estado sólido por investigar as vibrações dos átomos (KALINKOVA, 1999). Neste sentido, o espectro de absorção da DDS na região do infravermelho médio (FTIR MID) foi registrado no intervalo de 4000 a 600 cm⁻¹ (FIGURA 3).

Figura 3. Espectro de IV da DDS

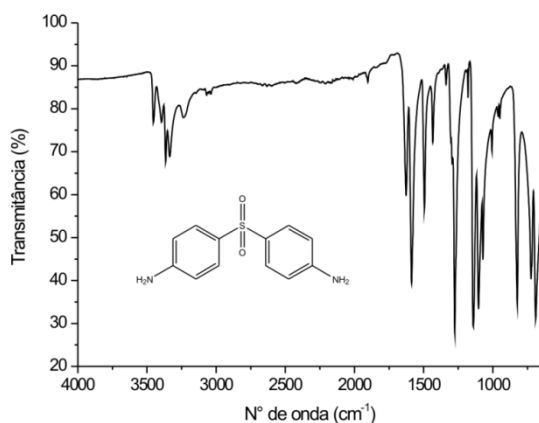
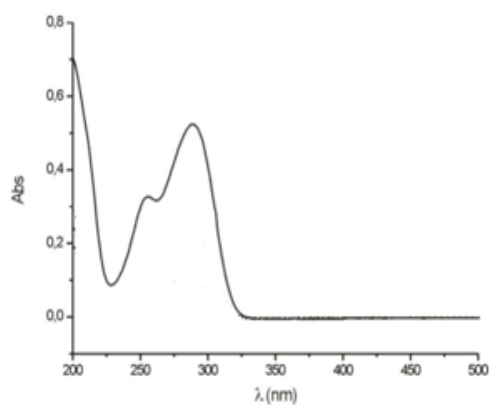


Figura 4- Espectro UV visível da DDS



O espectro de IV-TF da dapsona mostra como bandas características os picos em 1143 cm⁻¹ relacionados à absorção da sulfona - estiramento assimétrico; em 1098 cm⁻¹ relacionada ao estiramento simétrico, características de S=O. Outra importante banda no espectro da DDS é a banda de absorção de NH que ocorrem entre 3452 e 3391 cm⁻¹ (D'CUNHA et al., 1983; BUGAY, 2001).

Os espectros de absorção eletrônica na região do ultravioleta foram utilizados para relacionar os grupos funcionais vistos nos espectros do infravermelho, e principalmente observar a existência de conjugação entre duas ou mais ligações duplas (ou triplas) carbono-carbono; entre ligações duplas carbono-carbono e carbono-oxigênio; entre ligações duplas e anéis aromáticos; e mesmo a presença de um anel aromático (MORRISON & BOYD, 1972).

Na figura 4 tem-se o espectro de ultravioleta da dapsona, uma banda de absorção principal foi observada na região do ultravioleta próximo (270 - 300nm), em 295 nm, atribuída a transições eletrônicas $n-\pi^*$, correspondentes ao grupo cromóforo benzênico e outra de menor intensidade em torno de 253 nm, atribuída a transições eletrônicas $\pi-\pi^*$, correspondente a sulfona (MA et al., 2002).

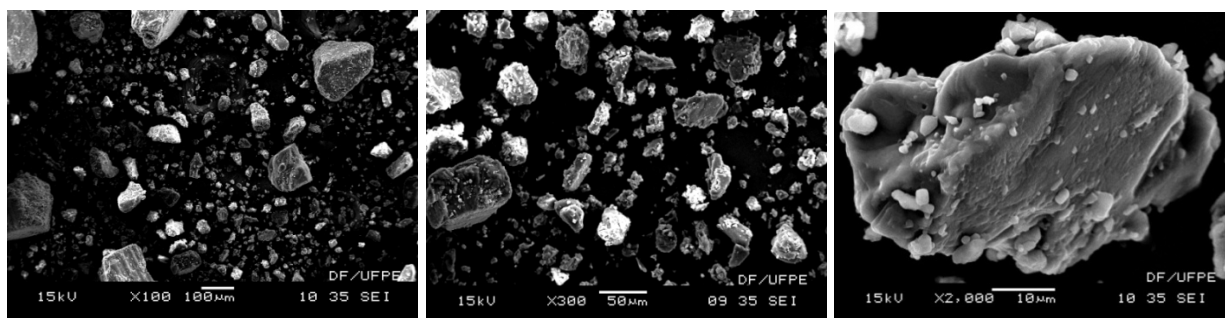
O resultado da análise e teor por CLAE-DAD da matéria-prima de trabalho foi de $99,6\% \pm 0,50$ em relação ao padrão, e apresentou-se dentro do valor esperado de 98,0 – 102,0%, descrito em literatura de referência, encontrando-se adequada para o uso de acordo com compêndios oficiais (USP, 2011).

3.3 Descrição e análise morfológica

A DDS utilizada apresentou-se como um pó branco e denso, sem tendência a formar aglomerações, atendendo a especificação da Farmacopéia utilizada como referência (United States Pharmacopoeial Convention, 2007).

As eletromicrografias da DDS matéria-prima estão apresentadas na figura 5, demonstrando estrutura cristalina, apresentando cristais irregulares ortorrômbicos (GREBOGI et al., 2011), o que só poderá ser confirmado pela realização da difração de raios-X do monocristal.

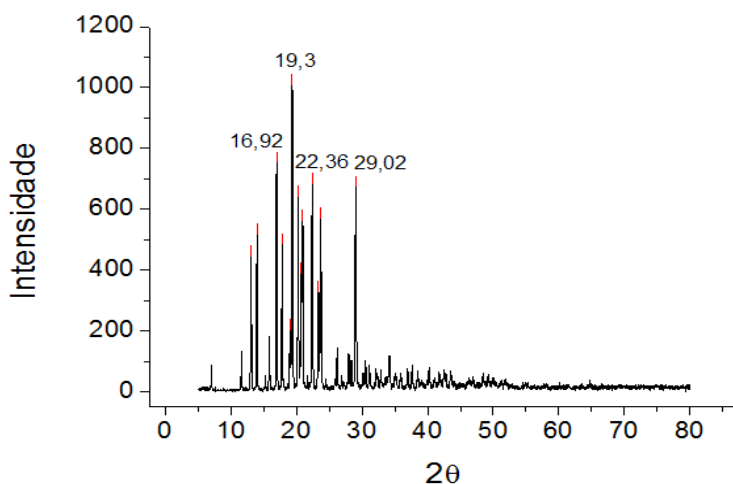
Figura. 5 – Eletromicrografias da DDS em diferentes aumentos a) 100x, b) 300x, c) 2000x



3.4 Difração de Raios-X

A presença de inúmeros picos ao longo do difratograma (figura 6), ordenamento estrutural típico de um sólido cristalino, principalmente a 2θ em torno de $19,3^\circ$, sendo o pico mais intenso, podendo ser considerado pico característico da DAP. Além desse, apresenta outros importantes picos secundários em $16,92^\circ$, $22,36^\circ$ e $29,02^\circ$.

Figura 6. Difratograma da DDS



3.5 Área superficial e tamanho de poros

Outro parâmetro importante para o estudo de um insumo farmacêutico ativo é a distribuição de tamanhos de poro já que está intimamente relacionado à área total do sólido. As distribuições de tamanhos de poros são apresentadas na tabela 2.

Tabela 2 - Resultados de área superficial e porosidade da DDS

Amostra	Área superficial		Diâmetro médio de poro (BET)	
	BET	Langmuir	Unidade (Å)	Unidade (nm)
DDS	44,0520 m ² /g	560,0899 m ² /g	36,6157	3,66157

A DDS apresentou diâmetro médio do poro de $36,6157 \text{ \AA}$, o equivalente a $3,66157 \text{ nm}$ o que pode ser indicativo da presença de microporos mais largos e principalmente de mesoporos/macroporos, o que facilita a entrada e saída do gás, sem aprisionamento, corroborando com o tipo da isoterma de adsorção/dessorção obtida (TEIXEIRA et al., 2001).

O resultado da área superficial da DDS, que apresentou um valor 44,0520 m²/g, sendo considerado intermediário. A classificação dos poros obtidos, com prevalência de mesoporos (COSTA et al., 2006).

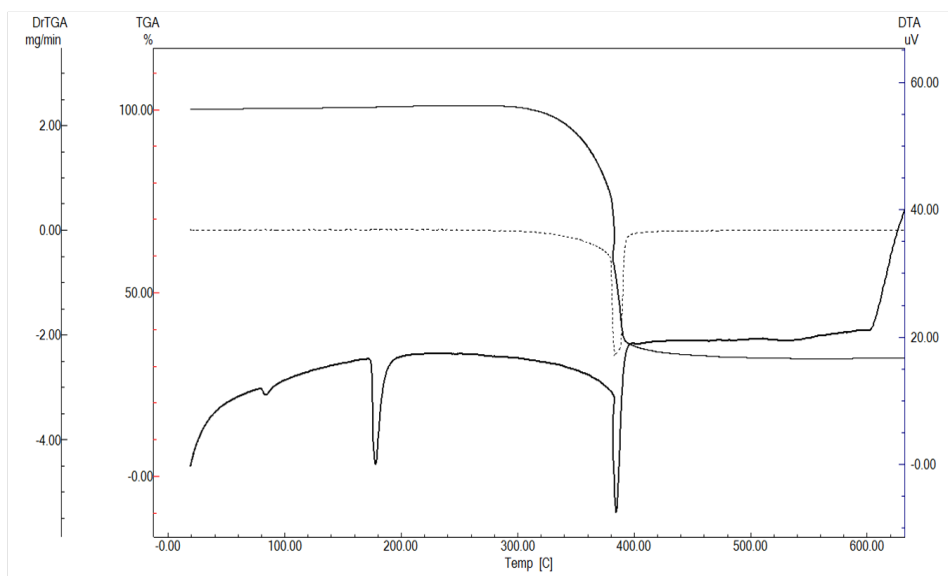
Com essas análises preliminares a DDS teve sua estrutura molecular identificada pelas técnicas de IV-TF e UV, bem como sua pureza determinada por CLAE, o que nos permitiu prosseguir os estudos de caracterização físico-química com análises a nível de aglomerados, através de MEV, determinação de área superficial e tamanho de poros, que por sua vez evidenciaram a morfologia e a cristalinidade do fármaco, esta última confirmada pela técnica de DRX. Sendo necessário aprofundar os estudos das partículas de DDS, por meio de estudos de análise térmica para determinar as características térmicas da substância (SOARES et al., 2011; CAVALCANTI et al., 2012), determinar as cinéticas de degradação térmica (SOARES et al., 2011, SOARES-SOBRINHO et al., 2010) e avaliar a compatibilidade frente a excipientes farmacêuticos (OLIVEIRA et al., 2005) (Figura 2).

3.6 Estudos termoanalíticos

3.6.1. Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)

Na análise termogravimétrica, observou-se que a faixa de temperatura de degradação do fármaco ficou entre 360,26 °C e 390,80 °C, tendo um perfil degradativo de fase única e perda de massa de 97,71% (figura 7).

Figura 7. – Curva TG e DTA da DDS, razão de aquecimento 10°\min.

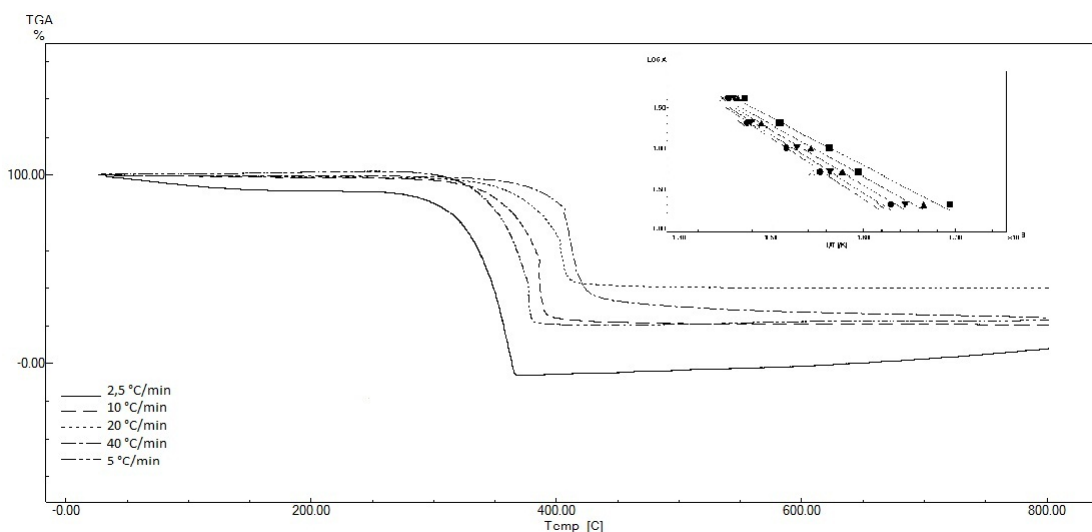


3.6.2 Estudo cinético de termodecomposição da DDS

Com procedimentos experimentais, podem ser obtidas informações sobre a cinética de decomposição e projeções de uso do fármaco ao longo do tempo. A capacidade de prever o tempo de validade é valioso, porque os custos os custos de uma falha posterior a utilização do produto podem ser elevados.

O gráfico que representa as curvas termogravimétricas da DDS em diferentes razões de aquecimento em conjunto com o gráfico de Ozawa (\ln da razão de aquecimento em função de $1/T$) está representado na figura 8, o qual demonstrou uma correlação evidente entre as 5 razões de aquecimento. O Valor da energia de ativação para a DDS foi de $147,49 \text{ KJ mol}^{-1}$, calculada a partir do produto do coeficiente angular da inclinação da reta com a constante geral dos gases R ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$). apresentou fator de frequência (A) de $2,74 \times 10^8 \text{ min}^{-1}$ e ordem de reação de $n=1$.

Figura 8. Curvas de TG da DAP obtidas a partir de razões d aquecimento crescentes (2,5; 5; 10; 20; 40°C/min) e associação com o gráfico de Ozawa.



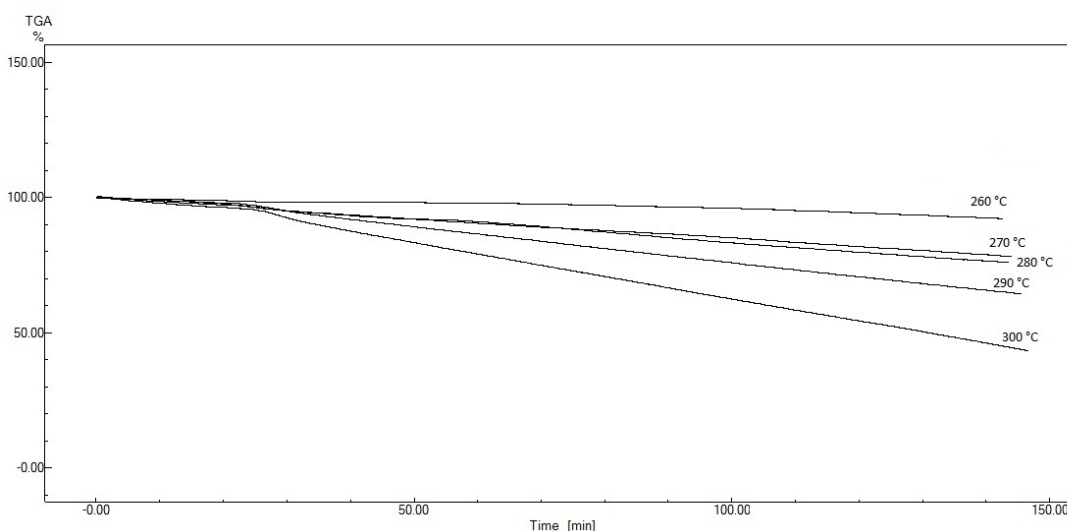
O gráfico de Ozawa demonstra uma boa correlação linear entre as cinco razões de aquecimento (FELIX; CIDES DA SILVA; MATOS., 2009). As cinco curvas TG indicam que a perda de massa entre 250°C e 430°C, ocorreu em uma única etapa, o que corrobora com a ordem de reação assumida de primeira ordem, uma vez que uma única reação contribui para a perda de massa, ou seja, há apenas uma reação significativa ocorrendo e não é afetado por processos concorrentes (HOWELL; RAY., 2006). Mostram também que as curvas de TG são

deslocadas para maiores temperaturas, quando a razão de aquecimento aumentam. (BERTOL et al., 2010, CIDES et al., 2006)

O método isotérmico usa comumente a mesma razão de aquecimento e as temperaturas são mantidas constantes na região de interesse, ou melhor, antes do processo de decomposição, como mostra a curva TG/DTG (Figura 7) para monitorar a cinética da reação de decomposição térmica no estado sólido, portanto, o tempo de decomposição é estimado para um determinado intervalo de perda de massa (ALVES et al., 2010).

Os dados apresentados na Figura 9 mostram as isotermas utilizadas na determinação da energia de ativação da DDS. Esta foi realizada aquecendo a amostra a 260, 270, 280, 290 e 300°C e mantidas constantes sob uma atmosfera dinâmica de nitrogênio ($50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) por um tempo suficiente para a perda de massa em pelo menos 5%. Estas curvas mostram que quanto maior a temperatura, menor será o tempo necessário para a perda de massa.

Figura 9- Curvas isotérmicas da DDS em diferentes temperaturas na atmosfera de N_2 ($50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$)



Estas curvas foram utilizadas para obter o gráfico de $\ln t$ vs a recíproca da temperatura $1/T$ (K^{-1}) para a DDS (Figura 8) também chamado de gráfico de Arrhenius, onde a equação da reta foi obtida por regressão linear ($y = ax + b$), para avaliar a validade do modelo cinético, mensurar a linearidade e o coeficiente de correlação (r) (RODRIGUES et al., 2005).

Calculou-se a estabilidade (em dias) com base na equação de Arrhenius, utilizando 25 °C como padrão de temperatura ambiente. O resultado foi um tempo estimado de estabilidade térmica de 677 dias, ou seja, aproximadamente 22 meses para um decaimento de 5 % de massa.

Como esses estudos fornecem um método para acelerar o tempo de vida de substâncias a curto prazo, foi possível então prever o tempo de vida da DDS (BARRAL et al., 2005; VIANA et al., 2008), importante parâmetro para determinação do prazo de validade. O método não-isotérmico estabelecido por Ozawa foi utilizado também para determinar os parâmetros de Arrhenius, que é um dos principais objetivos de análise cinética de decomposição sólida em condições dinâmicas de razão de aquecimento (BARRAL et al., 2005; VIANA et al., 2008; BURNHAM et al., 2002), já que a ordem de reação obtida neste estudo pode ser correlacionado com o mecanismo de reação de degradação do fármaco, apresentado no próximo capítulo deste trabalho.

3.6.3. Estudos de compatibilidade

Baseado no ponto de fusão da DDS, conforme observado na coluna A da figura 10, pode-se afirmar que não houve variação significativa da faixa de fusão (178,8 – 196,15 °C), Nenhum deslocamento foi verificado nas misturas físicas testadas, apenas pequenos alargamentos da faixa de fusão na temperatura final de fusão, podemos acarretar tais resultados aos impedimentos físicos advindos da mistura física.

Com relação à faixa de decomposição da DDS (coluna B), pode-se observar dois comportamentos distintos, o primeiro nas curvas 2, 4, 5 onde o excipiente não permite a visualização da faixa de decomposição do insumo ativo, onde não é identificado o pico endotérmico característico de decomposição como observado na figura 10, curva 1. O segundo comportamento observado nas misturas binárias é o deslocamento do pico de decomposição para temperaturas maiores, curvas 3, 6 e 7, conferindo a esse sistema uma estabilidade térmica maior, tal fato pode ser atribuído por motivos físicos simplesmente.

Figura 10- Curvas DTA da DDS e das misturas binárias DDS:Excipiente. 1:DDS, 2- DDS: Celulose, 3- DDS: Amido, 4- DDS: Estearato de magnésio, 5- DDS: Glicolato de amido sódico 6- DDS: PVP, 7- DSS: β CD, 8- DDS: M β CD.

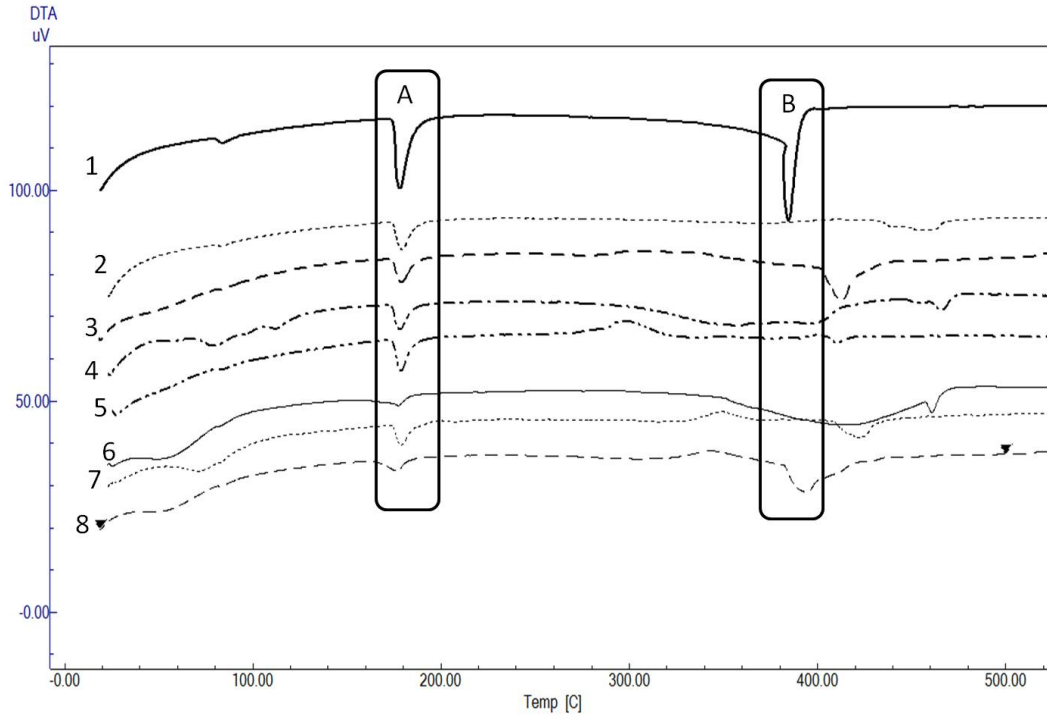


Figura 11- Curvas TG e DTG, Razão de 10 °C/min, DDS e mistura binária ---- A: DDS: Celulose, B- DDS: Amido, C- DDS: Estearato de magnésio, D- DDS: Glicolato de amido sódico.

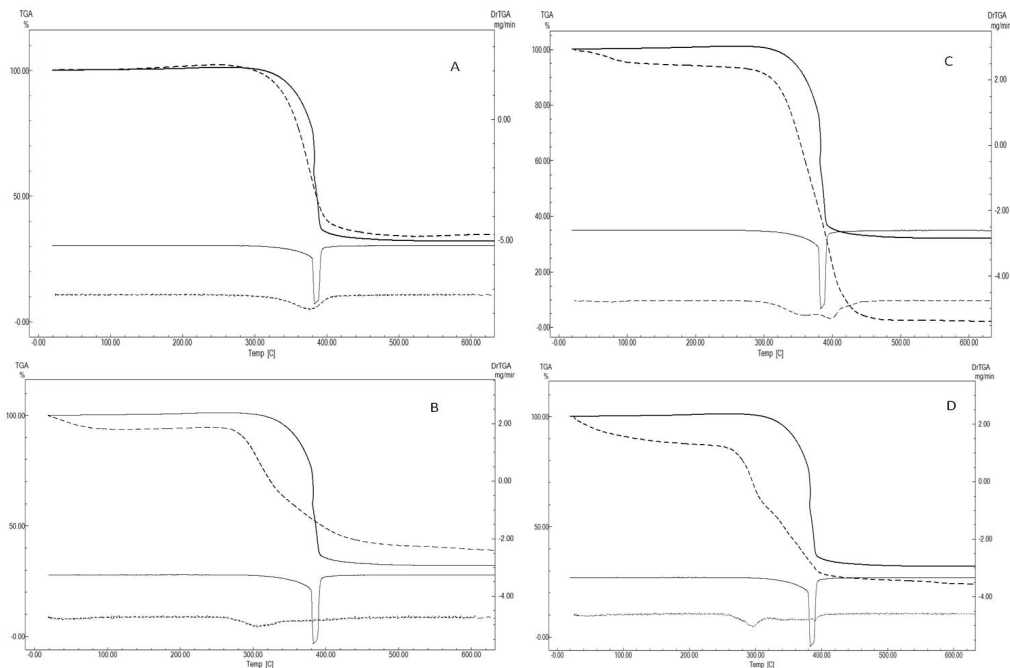
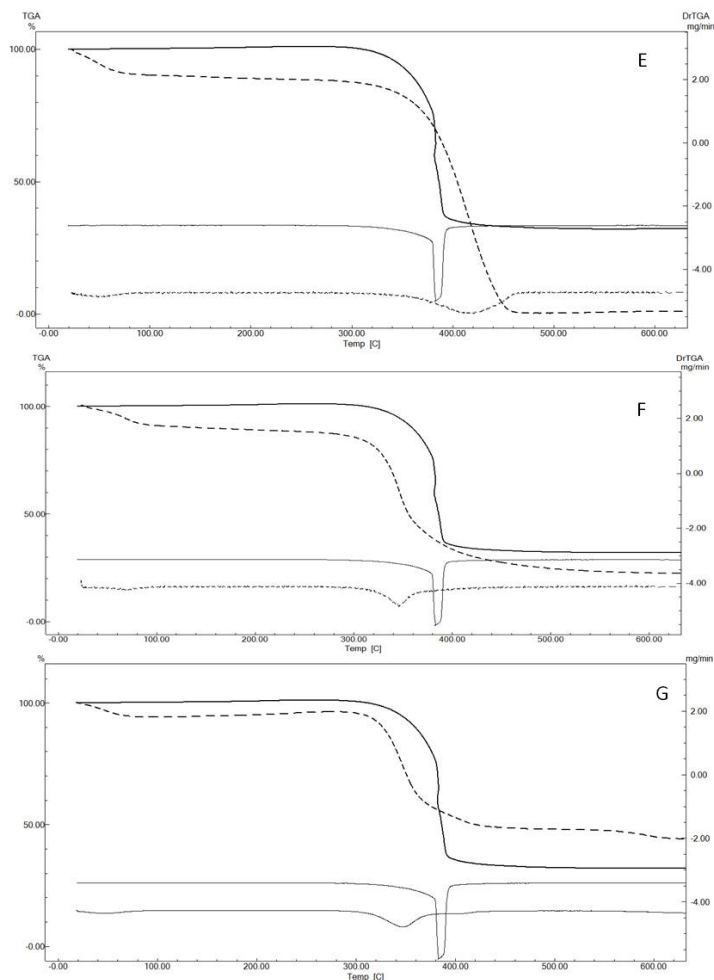


Figura 12- Curvas TG e DTG, Razão de 10 °C\min - , DDS e mistura binária ---- E- DDS : PVP; F- DSS : β CD; G- DDS : M β CD.



4. Conclusão

As técnicas analíticas utilizadas permitiram um conhecimento mais aprofundado sobre a natureza físico-química do anti hanseniano dapsona, que ajudarão a fornecer subsídios para o estabelecimento de um perfil de qualidade detalhado a ser adotado no controle de qualidade de rotina para este fármaco e para formulações que o utilizem. A caracterização físico-química traz informações imprescindíveis para a padronização e estabelecimento de condições de estabilidade desse Insumo Farmacêutico Ativo, o que subsidia o desenvolvimento racional de medicamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AGRAWAL, S.; AGARWALLA, A. Dapsone hypersensitivity syndrome: A clinic epidemiological review. **Journal of Dermatology**, v. 32, p. 883-889, 2005.

BARRAL, L.; DÍEZ, F.J.; GARCÍA-GARABAL, S.; LÓPEZ, J.; MONTERO, B.; MONTES, R.; RAMÍREZ, C.; RICO, M. *Thermodegradation kinetics of a hybrid inorganic-organic epoxy system*. **European Polymer Journal**, n. 41, p. 1662-6, 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Programas Especiais de Saúde. Divisão Nacional de Dermatologia Sanitária. **Controle da hanseníase: uma proposta de integração ensino-serviço**. Rio de Janeiro: DNDSNUTES, 1989.

BLEUMINK, M. B. Relapses in leprosy patients after release from dapsone monotherapy, experience in the leprosy control program of the all Africa leprosy and rehabilitation training center (ALERT) in **Ethiopia**.**Int. J. Lepr.** v. 60, p. 161-72, 1992.

BRANDÃO, F.C.; BERTI, L.F; SILVA, M.A.S.; STULZER, H.K. Avaliação da qualidade e caracterização físico-química de piroxicam. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 4, p.560-7, 2008.

BRITISH PHARMACOPOEIA, HM Stationery Office: London, England, 2009.

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

BURNHAM, L.; DOLLIMORE, D.; ALEXANDER, K.S. Kinetic study of the drug acetazolamide using thermogravimetry. **Thermochimica Acta**, v. 392-3, p. 127-133, 2002.

CAO, X.; GIBBS, S. T.; FANG, L.; MILLER, H. A.; LANDOWSKI, C. P.; SHIN, H. C.; LENNERNAS, H.; ZHONG, Y.; AMIDON, G. L.; YU, L. X.; SUN, D. Why is it challenging to predict intestinal drug absorption and oral bioavailability in human using rat model. **Pharmaceutical Research**, v.23, n.8, p.1675-86, 2006.

COSTA, A. C. F. M.; VILAR, M. A.; LIRA, H. L.; KIMINAMI, R. H. G. A.; GAMA, L. Síntese e Caracterização de Nanopartículas de TiO₂. **Cerâmica**, v 52, p. 255-259, 2006.

D'CUNHA, R.; KARTHA, V.B; GURNANI, S. Raman and i.r. studies of antileprotic drug dapson. **Spectrochimica acta**, v. 39A, n. 4, p. 331-336, 1983.

DOUGLAS, W. W. Histamine and 5-Hydroxytryptamine (serotonin) and their antagonists. In: GILMAN, G.A.; GOODMAN, L.S.; RALL, T.W.; MURAD, F. **The pharmacological basis of therapeutics**. 7. ed. New York: Macmillan publishing company, cap 26, p. 624-27, 1980.

ERCEG, M., KOVACIC, T., KLARIC, I. Dynamic thermogravimetric degradation of poly(3-hydroxybutyrate)/aliphatic aromatic copolyester blends. **Polymer Degradation and Stability**, v. 90, p. 86-94, 2005.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, 5a ed., Atheneu: Rio de Janeiro, **2010**.

FELIX, F.S.; CIDES DA SILVA, L. C.; ANGNES, L. MATOS, J. R. Thermal behavior study and decomposition kinetics of salbutamol under isothermal and non-isothermal conditions . **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 95, p. 877-880, 2009.

FROEHLICH, P.E.; GASPAROTTO, F.S. Mebendazol: identificação das formas polimórficas em diferentes matérias-primas e medicamentos (referência e genéricos)

disponíveis no mercado nacional. **Revista de Ciências Farmacêuticas. Básica e Aplicadas**, v. 26, n. 3, p. 205-10, 2005.

GREBOGI, I. H.; TIBOLA, A.P.O.V.; BARISON, A.; GRANDIZOLI, C.W.P.S.; FERRAZ, H.G.; RODRIGUES, L.N.C. Binary and ternary inclusion complexes of dapsone in cyclodextrins and polymers: preparation, characterization and evaluation, *Journal Incl Phenom Macrocycl Chemical*, 2011.

GREENHILL, J.V.; MCLELLAND, M.A. Photodecomposition of drugs. **Program Medicinal Chemistry**, v. 27, p. 51-121, 1990.

HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. Goodman & Gilman's: **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11 ed., 2007.

HEATCHCOCK, C.H. **Introduction to organic chemistry**. 3 ed., Macmillan Publishing Company, 1985.

HOWELL, B. A.; RAY, J. A. Comparison of isothermal and dynamic methods for the determination of activation energy by thermogravimetry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetr.** v. 83, p. 63–66, 2006.

KALINKOVA, G.N. Infrared spectroscopy in pharmacy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 19, p. 307-20, (1999).

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

MA, L.; TANG, B.; CHU, C. Spectrofluorimetric study of the β -cyclodextrin-dapsone-linear alcohol supramolecular system and determination of dapsone. **Analytica Chimica Acta**, v. 469, n. 2, p. 273-283, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria Programa Nacional de DST E AIDS. **Guia de tratamento clínico da infecção pelo HIV em crianças**. Brasília, 2004, 49p.

MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. Química Orgânica. Tradução M. Alves da Silva. 5ª edição. Lisboa, Portugal: Fundação Calouste Gulbenkian, 1972. 1315 p.

RAMA, A. C. R.; VEIGA, F.; FIGUEIREDO, I. V.; SOUSA, A.; CARAMONA, M. Complexos de inclusão de indometacina com hidroxipropil- β -ciclodextrina. Estudos de dissolução e coeficiente de partição. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 1, 2006.

ROCHA, H.V.A.; GOMES, A.S.; DORNELAS, C.B.; CARMO, F.A.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.; SANTOS, T.C.; CABRAL, L. The preparation and evaluation of sodium and alkylammonium montmorillonite and polysaccharide nanocomposites as sustained release excipients. **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, v. 47, p. 1256-1264, 2008.

SOVIZI, M. R. Thermal behavior of drugs. Investigation on decomposition kinetic of naproxen and celecoxib. **Journal Thermal Analysis and Calorimetry**. v.102, p. 285–9, 2010.

STEGEMANN, S.; LEVEILLER, F.; FRANCHI, D.; DE JONG, H.; LINDÉN, H. When poor solubility becomes an issue: From early stage to proof of concept. **European Journal Pharmaceutical Sciences**, v 31, p. 249-61, 2007.

TEIXEIRA, V. G.; COUTINHO, F. M. B.; GOMES, A. S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. **Química Nova**, v. 24, p. 808, 2001.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA 30 ed. United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, Maryland, U.S.A. 2007.

VIANA, O. S.; ARAUJO, A. A.S.; SIMOES, R. A.; SOARES, J. L.; MATOS, C. R.S.; GRANGEIRO-JUNIOR, S. C.; LIMA, M.; ROLIM-NETO, P. J. Kinetic Analysis of the Thermal decomposition of Efavirenz and Compatibility Studies with Selected Excipients. **Latin American Journal of Pharmacy**.v. 27, p. 211-6, 2008.

ZUIDEMA, J; MODDERMAN, H.; MERKUS, F. W. H. M. Clinical pharmacokinetics of dapsone. *Clin Pharmacokinet* 1986;11:299-315

WEBB, P. A.; ORR, C.; Analytical Methods in Fine Particle Technology; **Micromeritics Instruments Corp**, p 24, 1997.

CAPÍTULO IV

Estudo de degradação forçada da dapsona por CLAE – DAD e CLAE – EM

ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA DA DAPSONA POR CLAE - DAD e CLAE-EM

ROLIM, L. A.¹; COELHO, M. L.; ROLIM-NETO, P. J.^{1,*}; CLIMACO, M. S.¹; ARAUJO, R. F.M.², MOURA, M. L.C.¹; FERRAZ, L.R.M.¹; GOLZIO, S.S.³; SILVA, M. S.³; SOARES-SOBRINHO, J.L.¹.

¹ Universidade Federal do Pernambuco - UFPE, Recife-PE, Brasil;² Universidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina – PI, Brasil;³ Universidade Federal da Paraíba - UFPB, João Pessoa-PB, Brasil.

RESUMO: O objetivo do presente estudo foi realizar estudos de degradação forçada no fármaco dapsona (diamino-difenil-sulfona), comumente utilizado em combinação com rifampicina e clofazimina para o tratamento de infecções causadas pelo *Mycobacterium leprae* (hanseníase). A dapsona (DDS) foi submetida a condições hidrolíticas ácida (HCl 0,1 M), neutra e alcalina (NaOH 0,1 M) a 80 ° C, bem como a meio oxidativo (H₂O₂ a 3%) em temperatura ambiente. Estudos de fotodegradação foram realizados em solução e em estado sólido de acordo com ICH. Os produtos formados sob condições de degradação diferentes foram investigados por CLAE-DAD e CLAE-EM. O método desenvolvido foi capaz de separar todos os produtos de degradação, utilizando uma coluna C18 e uma fase móvel composta por ACN e fosfato (pH 3) em 1mL.min⁻¹ (295 nm), e esta foi sutilmente modificada para estudos por CLAE -EM. Em solução, o fármaco mostrou instabilidade nos meios ácido (11,68% em 24 horas), alcalino (15,01% em 24h), oxidativo (19,11% em 72h) e em condições de estresse fotolítico (10h - 10,44% em solução, não degradada no estado sólido até exposição máxima), não havendo degradação representativa na condição neutra (3,98% em 72h). O método desenvolvido mostrou ser preciso, exato, específico e sensível. A análise dos produtos de degradação da DDS por CLAE-EM resultaram em padrões de fragmentação de dois derivados (158 e 234 m/z), sugeridos como produtos de degradação da dapsona (249 m/z). Com base nestes resultados, uma via de degradação para o fármaco pode ser proposta a partir da hidrólise do grupo sulfona central da molécula e da hidrólise da amina lateral. Neste estudo também foi possível detectar a presença destes produtos de degradação em amostras de comprimidos de dapsona quando submetidos a condições de estabilidade acelerada, através do método indicativo de estabilidade desenvolvido e validado.

Palavras-chave: Dapsona; Degradação forçada; Método indicativo de estabilidade

ABSTRACT: The aim of this study was to conduct forced degradation studies in drug dapsone (diamino-diphenyl sulfone), commonly used in combination with rifampicin and clofazimine for the treatment of infections caused by *Mycobacterium leprae* (leprosy). Dapsone (DDS) was submitted to acidic hydrolytic conditions (0.1 M HCl), neutral and alkaline (0.1 M NaOH) at 80 ° C and the oxidative environment (3% H₂O₂) at room temperature. Photobleaching studies were performed in solution and in the solid state according to ICH. The products formed under different degradation conditions were investigated by HPLC-DAD and HPLC-MS. The method was capable of separating all degradation products using a C18 column and a mobile phase composed of ACN and phosphate (pH 3) in 1mL.min⁻¹ (295 nm), and this was slightly modified to study by HPLC-MS. In solution, the drug showed instability in acid media (11.68% in 24 hours), alkali (15.01% in 24 hours), oxidative (19.11% in 72 hours) and photolytic stress conditions (10h - 10, 44% solution, not degraded in solid until maximum exposure), with no degradation in representative neutral condition (3.98% in 72h). The method proved to be precise, accurate, specific and sensitive. The analysis of the degradation products DDS by HPLC-MS fragmentation patterns resulted in two products (158 and 234 m / z) suggested as degradation products of dapsone (249 m / z). Based on these results, a degradation pathway for the drug can be proposed by the hydrolysis of the central sulfone group of the molecule and hydrolyzing the amine side. In this study it was also possible to detect the presence of degradation products in sample tablets of dapsone when subjected to accelerated stability conditions, using the method indicative of stability developed and validated.

Keywords: Dapsone; Forced Degradation; Method indicative stability

1. Introdução

A estabilidade de produtos farmacêuticos ou matérias-primas é definida como o tempo no qual o referido, considerado isoladamente, mantém dentro dos limites especificados e durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas condições e características que possuía quando da época de sua fabricação. Pode também ser definida como o período de tempo compreendido entre o momento no qual o produto está sendo fabricado àquela que sua potência está reduzida a não mais do que 10%, desde que os produtos de alteração estejam todos seguramente identificados e previamente reconhecidos seus efeitos (TABORIANSKI, 2003; VEHABOVIC et al., 2003; STULZER, SILVA, 2006; ANSEL et al., 2009; RAMOS et al., 2009).

A manutenção da qualidade de fármacos e produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros fatores relacionados ao próprio produto, como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e de excipientes farmacêuticos, de forma farmacêutica e sua composição, do processo de fabricação, do tipo e das propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005). Além disso, Lachman e colaboradores (2001) citam que fatores como pH, polimorfismo, susceptibilidade do fármaco a oxidação ou hidrólise, potencial de interação entre fármaco e excipientes e/ou materiais de embalagem, processo de fabricação e outros também podem afetar a estabilidade farmacêutica e que todos esses fatores devem ser considerados no planejamento do estudo de estabilidade.

Estudos de degradação forçada são conhecidos como uma importante ferramenta no desenvolvimento de medicamentos. Com a finalidade de garantir a integridade do fármaco e da forma farmacêutica dentro dos limites especificados, sob influência dos fatores ambientais em função do tempo, são preconizados estudos de estabilidade (MATTHEWS, 1999; LUCAS et al., 2004; ANSEL et al., 2007).

As razões para a determinação da estabilidade de produtos farmacêuticos fundamentam-se, entre outras, na preocupação com a saúde pública. A avaliação da estabilidade farmacêutica é importante, tendo em vista que a perda da estabilidade de um medicamento pode estar diretamente relacionada com a perda do efeito terapêutico ou com a formação de produtos de degradação tóxicos (KOMMANABOYINA, RODHES, 1999). Além disso, estudos de produtos de degradação de um medicamento fazem-se necessários para

atender aos requisitos de órgãos regulamentadores no Brasil, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e guias internacionais, tais como os guias do *International Conference Harmonization* (ICH) recomendados nos Estados Unidos, Japão e Comunidade Européia, que preconizam a quantificação do princípio ativo e dos produtos de degradação para assegurar a qualidade do medicamento (ICH, 1993; FDA, 1998).

Dessa forma, espera-se que todos os métodos analíticos aplicados no estudo sejam, verdadeiramente, indicativos de estabilidade, a fim de detectar e quantificar com precisão o fármaco e todas as suas substâncias relacionadas. Com isso, as prováveis mudanças que possam ocorrer durante o processo de formulação e produção, armazenamento e transporte poderão ser controladas (BAERTSCHI, 2006; HUYNH-BA, 2009; SEHRAWAT, MAITHANI, SINGH, 2010).

Conforme descrito pelo ICH, o processo para estabelecer um método indicativo de estabilidade envolve testes de estresse, que auxiliam na identificação dos prováveis produtos de degradação, que por sua vez ajudam a estabelecer as vias de degradação, a estabilidade intrínseca da molécula e a validar o poder indicativo de estabilidade dos procedimentos analíticos utilizados (BAERTSCHI, 2006; ICH, 1996).

A dapsona (diamino-difenil-sulfona), fármaco utilizado neste estudo, é um antibiótico bacteriostático utilizado, em combinação com rifampicina e clofazimina, como primeira escolha na terapêutica da hanseníase. A dapsona (DDS) atua inibindo competitivamente a enzima dihidropteroato sintetase, com bloqueio da síntese do ácido fólico no microorganismo (JUNQUEIRA, OLIVEIRA, 2002).

Com isso, o objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um método indicativo de estabilidade de acordo com ICH e delinear a cinética de fotodegradação da dapsona. Além disso, analisou-se a aplicabilidade do método desenvolvido para produtos acabados a base de DDS (BANSAL et al., 2007; HADAD, 2008; ICH, 1994; ICH 1996b).

2. Métodos

2.1. Reagentes

A dapsona (98,99%) utilizada foi adquirida da Sigma Aldrich® (lote SZE7225X). Os solventes acetonitrila (CarloErba®) e metanol (JTBaker®), de grau HPLC, foram utilizados para a composição da fase móvel e diluição das amostras. As soluções foram preparadas usando água ultrapura (MilliQ®) e filtrada através de filtros de membrana com uma

porosidade de 0,22 mM Millipore ® (SP, Brasil). As substâncias: hidróxido de sódio, ácido fosfórico, ácido clorídrico e peróxido de hidrogênio utilizados nos estudos foram de F. Maia®, Vetec®, Cinética e Dinâmica®, respectivamente.

2.2 Preparação das amostras e do padrão

As amostras para os testes de degradação foram obtidas a partir de uma diluição inicial de 50 mg da dapsona em 50 mL de metanol com sonicação durante 10 min em balão volumétrico de 500 mL usando água ultra-pura. Obtendo uma concentração final de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

As soluções do padrão de dapsona foram preparadas de forma semelhante às soluções da amostra com uma concentração final de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A curva de calibração foi preparada nas mesmas condições analíticas das amostras que serão utilizadas durante o processo de validação em cada avaliação para se obter as concentrações de amostras do dia.

2.3 Estudos de degradação forçada

Foram realizados estudos de degradação forçada na matéria-prima em estado sólido e em solução. A matéria-prima sólida foi submetida a estudos fotolíticos por espalhamento de uma fina camada do fármaco em uma placa de Petri, a 25 °C e expondo-o diretamente a uma combinação de luz UV e fluorescente em uma câmara de fotoestabilidade Nova Ética ® (modelo C242), com uma combinação de lâmpadas de UV e fluorescentes com a emissão de 30.000 lux e 13,33 W.m^{-2} por hora, com coletas em tempos determinados, em triplicata, com a determinação por CLAE - DAD. (KUHN et al., 2004; ICH, 1996).

Para a matéria-prima em solução, os estudos de degradação foram realizados sob as condições de hidrólise, oxidação e fotólise, como preconizado pelo ICH (SINGH, BAKSHI, 2000; BAERTSCHI, 2005). Para os estudos de hidrólise, soluções do fármaco de concentração 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram submetidas à degradações em soluções de meio ácido (HCl 0,1 M), básico (NaOH 0,1 M), a 80 °C. Além disso, soluções de fármaco em água na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi aquecida a 80 °C. Os estudos de stress oxidativo foram conduzidos com a solução concentrada do fármaco de 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ em 3% de H_2O_2 à temperatura ambiente. Todas as condições de estresse foram avaliadas em períodos de de tempo determinados (0, 5, 10, 24 e 48 h) ou até degradação suficiente, isto é, decaimento de 10 a 30 % do teor de DDS (KLICK et al., 2005; SINGH & BAKSHI, 2000).

2.4. Cinética de fotodegradação

As amostras de DDS submetidas à fotodegradação reagiram por tempo total de 7 dias, apresentando decaimento característico do teor da DDS, o que possibilitou os cálculos cinéticos para reação de fotodegradação. A ordem de reação para a cinética de fotodegradação da DDS foi determinada representando o percentual de fármaco residual em função do tempo (ordem zero), do logaritmo neperiano do percentual de fármaco em função do tempo (primeira ordem) e inverso do percentual de fármaco em função do tempo (segunda ordem). O coeficiente de regressão linear foi obtido, sendo o coeficiente mais próximo da unidade indicador da ordem de degradação da DDS (SINKO, 2008).

O modelo cinético pode ser representado pelas seguintes equações:

$$\begin{array}{lll}
 C = C_0 - k.t & t_{90\%} = (0,1 \times C_0) / k & \text{(Ordem zero)} \\
 \ln C = \ln C_0 - k.t & t_{90\%} = 0,16 / k & \text{(Primeira ordem)} \\
 1 / C = 1 / C_0 + k.t & t_{90\%} = 1 / (9k \times C_0) & \text{(Segunda ordem)}
 \end{array}$$

Onde C_0 é a concentração dos reagentes no tempo zero, C é a concentração após reação n tempo t e k , a constante de reação (SINKO, 2008).

2.5. Desenvolvimento de método indicativo de estabilidade por CLAE

Inicialmente, as amostras obtidas a partir de estudos de degradação foram individualmente submetidas à análise por CLAE – DAD para o desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade, partindo-se das condições cromatográficas do método desenvolvido por Santos e colaboradores (2012), que foi otimizado seguindo um desenho 2^3 fatorial variando o fluxo da fase móvel, a constituição da fase móvel e a temperatura do forno de coluna, com uma fase estacionária fixa, coluna C18 (250 x 4,6mm/5mm), de acordo com a Tabela1. Os parâmetros utilizados para selecionar o melhor método foram a intensidade do pico principal (DDS), o fator de separação relativa entre a DDS e seus produtos de degradação mais representativos, e o número de pratos teóricos dos seus produtos de degradação (BRASIL, 2003).

Tabela 1- Parâmetros avaliados no desenvolvimento do método.

Parâmetros	Variáveis	Nível
Fase móvel	Ácido fosfórico	(-)
	Ácido fórmico	(+)
Fluxo	1 mL.min ⁻¹	(-)
	1,5 mL.min ⁻¹	(+)
Temperatura	25 °C	(-)
	35 °C	(+)

2.6 Equipamento e definição das condições cromatográficas

O sistema utilizado para desenvolvimento do método foi um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Shimadzu® equipado com uma bomba quaternária modelo LC-20ADVP, com degaseificador de hélio modelo DGU-20A, detector PDA modelo SPD-20AVP, forno modelo CTO-20ASVP, injetor automático modelo SIL -20ADVP e controlador modelo SCL -20AVP. Os dados foram processados pelo software Shimadzu® LC solution 2.0.

Para identificação dos produtos de degradação, as soluções degradadas de DDS foram submetidas à análise por CLAE-EM modelo Shimadzu® semelhante ao utilizado no desenvolvimento e na validação do método com o método analítico semelhante, com as seguintes modificações em um único componente da fase móvel, de ácido fosfórico para ácido fórmico e a taxa de fluxo de fase móvel 0,2mL. min⁻¹, além de ter o detector de espectrômetro de massa DAD Shimadzu® IT-TOF.

2.6 Validação do método

A validação do método indicativo de estabilidade foi feita com relação a vários parâmetros, conforme exigido na diretriz Q2 (R1) do ICH (ICH, 1994; ICH, 1996b). Para estabelecer a linearidade da série, uma solução estoque do fármaco foi preparada na concentração de 200 µg.mL⁻¹, que foi posteriormente diluída para preparar soluções no intervalo de concentração do fármaco entre 10-100µg.mL⁻¹.As soluções foram injetadas em triplicata no CLAE, mantendo o volume de injeção constante. A precisão do método foi

estudada fazendo seis injeções de três concentrações diferentes, 30, 50, e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no mesmo dia e os valores de coeficiente de variação (CV) foram calculados para determinar a precisão intra-dia. Estes estudos também foram repetidos em diferentes dias para determinar a precisão inter-dia. A exatidão foi avaliada adicionando-se às soluções degradadas uma solução do fármaco na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A recuperação do fármaco adicionado foi determinada. A especificidade do método foi estabelecida através de um estudo de fatores de resolução do pico do fármaco a partir do pico mais próximo, e também entre todos os outros picos. A seletividade foi confirmada através de estudos de pureza de pico usando um detector DAD. Para cada condição degradativa foram preparadas amostras em triplicata para fins de controle, constituídas apenas do agente indutor de degradação, em concentração idêntica à utilizada nos testes, e do diluente utilizado. Para o controle do teste de fotodegradação uma amostra de DDS foi protegida da exposição à luz.

2.7 Aplicação do método desenvolvido para amostras de produto acabado

De acordo com as regras estabelecidas pelo ICH e ANVISA com respeito a quantificação dos produtos de degradação foram analisados os produtos de degradação em comprimidos de 100 mg de DDS (doado pela Novartis® lote B.KF09055FGM 08/12PKG.EXP09/06.1.13) após estudo de estabilidade acelerada (40 °C \pm 2°C/75% UR \pm 5% durante 6 meses) a fim de avaliar a necessidade de reportar, identificar ou qualificá-los (SILVA et al., 2009; BRASIL, 2005). A quantificação do teor da DDS e de seus produtos de degradação foi realizada tomando-se a área sob a curva do padrão de DDS (BINDU et al, 2012).

3. Resultados e discussão

3.1 Desenvolvimento e otimização do método indicativo de estabilidade

A partir das condições propostas por Santos e colaboradores (2012), o método foi otimizado para aplicação como teste indicativo de estabilidade, já que o mesmo foi desenvolvido para determinação de DDS em nanopartículas lipídicas. Após a conclusão dos oito experimentos propostos em triplicata, mudando todos os níveis das variáveis, pode-se estabelecer uma correlação entre eles simultaneamente. A razão para isto é que as variáveis podem influenciar umas as outras e o valor ótimo para cada uma delas pode ser dependente da outra. Nesta fase, os efeitos de variáveis críticas e as suas interações foram quantificados

pelos métodos de análise de variância, que são geralmente aplicados aos dados gerados pelo modelo fatorial (OYLER et al., 2012; YOSHIOIDA, STELLA, 2002). Os experimentos e seus resultados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados das seleções de variáveis

Fase móvel	Fluxo	Temperatura	Fator de cauda da DDS	Nº de pratos teóricos do PD-1	Resolução entre os picos (DDS-PD1)
-	-	-	1,28 ± 0,50	13080	14,77 ± 1,08
+	-	-	1,06 ± 0,12	11050	15,01 ± 0,87
-	+	-	1,07 ± 0,27	10628	11,99 ± 0,98
+	+	-	1,12 ± 0,13	10086	11,67 ± 1,12
-	-	+	1,07 ± 0,02	11020	12,73 ± 1,31
+	-	+	1,10 ± 0,07	10922	13,18 ± 1,03
-	+	+	1,10 ± 0,10	9934	10,76 ± 0,87
+	+	+	1,26 ± 0,19	9087	9,09 ± 0,75

Na interpretação destes resultados, a taxa de separação entre a DDS e PD-1 foi mostrada como crítica, que foi selecionada como referência para a análise dos dados.

Dessa forma, após os estudos, as melhores condições para análise do princípio ativo e dos produtos de degradação seriam fase móvel acetonitrila : água acidificada até pH 3 com ácido fosfórico na proporção 2:8 (v/v), respectivamente, com um fluxo de 1 mL min⁻¹ com fase estacionária C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), a 25 °C. O volume de injeção utilizado foi de 30 µL a uma concentração de amostra padrão de 50 µg.mL⁻¹. Os resultados foram analisados em comprimentos de onda de 295 nm, comprimento de absorção máxima da dapsona, conforme mostra Figura 1.

As condições de análises propostas mostraram algumas semelhanças com o processo desenvolvido pela Mannan, Krol e Kho (1977). No entanto, o método aqui apresentado foi mais usual para a indústria farmacêutica, uma vez que utiliza o HPLC com detector de DAD em vez fluorimetria, tal como aplicado por Gordon, Ghoul e Peters (1975) (MANNAN et al., 1977; GORDON et al., 1975).

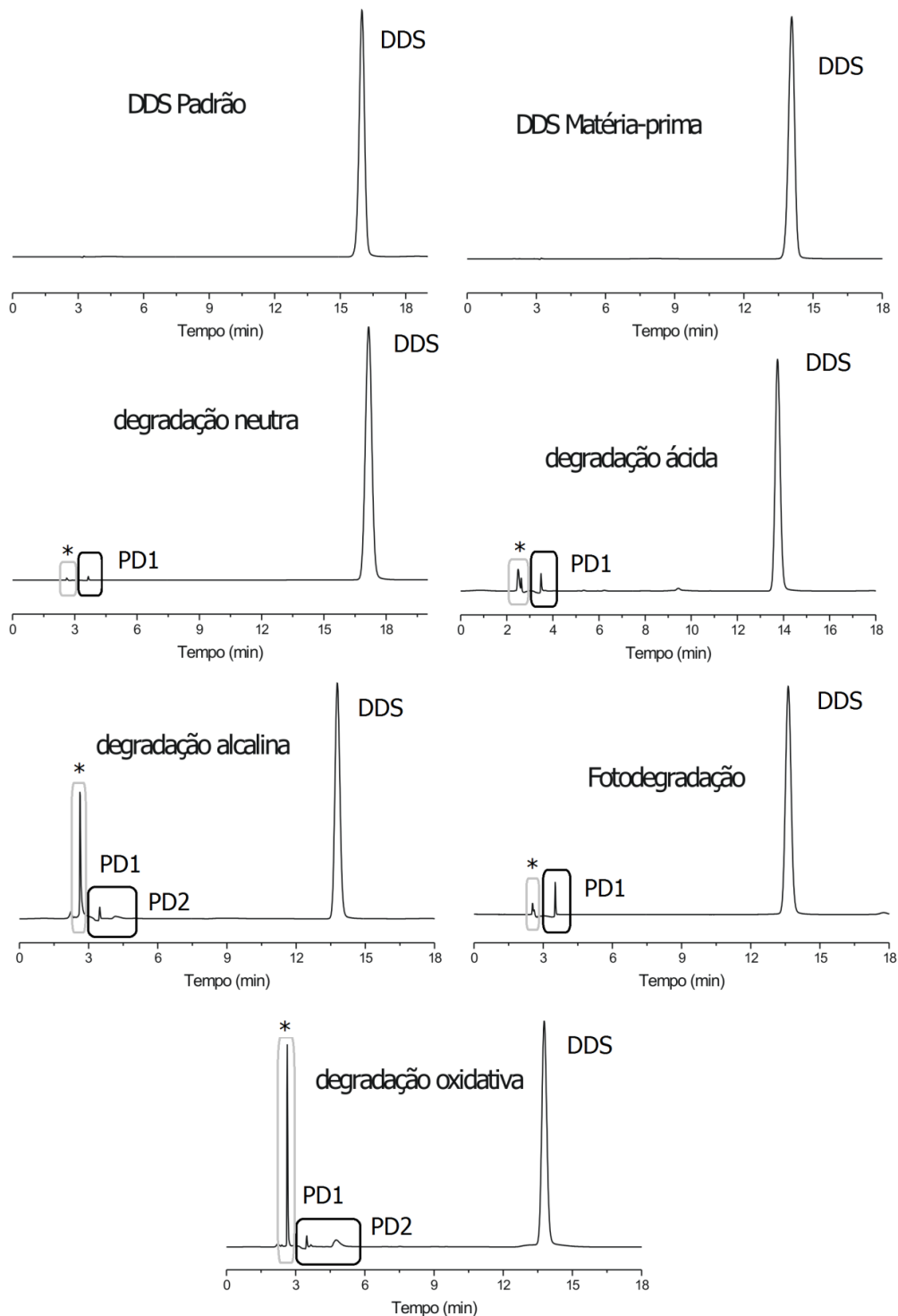
3.2. Estudos de degradação forçada

O método foi capaz de detectar e quantificar dois produtos de degradação de DDS nas situações de estresses mencionadas acima, também foi possível observar que a DDS mostrou-se estável à degradação hidrolítica neutra, uma vez que com o tempo total de análise (96 h) foi possível observar o decaimento de apenas 3,98%.

Tratando-se da hidrólise catalisada por íons de hidrogênio (meio ácido de HCl 0,1 M) ou íons de hidroxila (meio básico de NaOH 0,1 M), após 24 horas, foi observado uma degradação suficiente para a análise dos seus produtos de degradação, sendo o decaimento médio de: 11,68% e 15,01%, respectivamente, conforme mostrado na Figura 1 Estes resultados sugerem, conforme explicado por Leal e colaboradores (2008), que a reatividade hidrolítica é catalisada por íons hidrogênio e hidroxila, respectivamente, produzindo o mesmo produto de degradação, chamado de PD-1, sendo ligeiramente mais susceptível à hidrólise básica.

As amostras submetidas à degradação alcalina e oxidativa por peróxido de hidrogênio 3% apresentaram dois dos produtos de degradação da DDS, o primeiro era semelhante ao produto obtido por hidrólise neutra e ácida (PD-1) e o segundo (PD-2), conforme ilustrado na Figura 1. As amostras mostraram degradação ótima após 24h de degradação alcalina (15,01%), após 24 h em meio ácido (11,68%), após 72 h de estresse oxidativo (19,11%) e após 10 h em condições de estresse fotolítico (10,44%) em solução (Figura 3). Para a oxidação com H₂O₂ pode-se usar as amostras com 48 horas de degradação, já que apresentaram uma percentagem de degradação entre 10 e 30%, mas era preferível usar a 72h visto que é o nível mais alto de produtos de degradação (NEVES et al., 2002; NETO et al., 2010).

Figura 1 – Cromatogramas obtidos após o estudo de degradação da DDS.

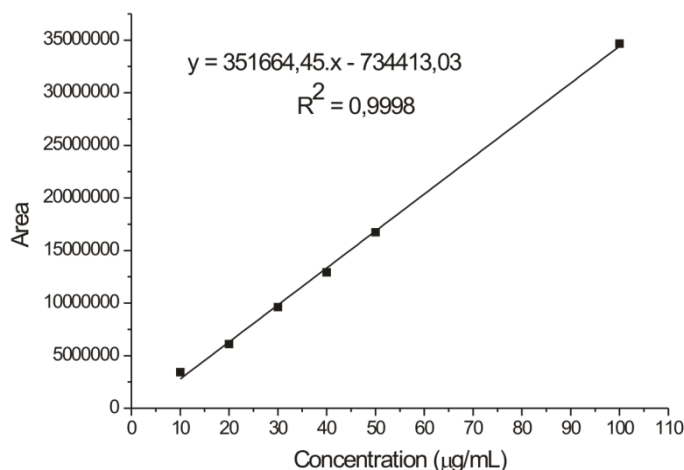


Legenda: * - Subprodutos de degradação da DDS que não tiveram afinidade pela coluna cromatográfica e permaneceram no volume morto da coluna cromatográfica ou aos próprios agentes de degradação; PD1 – Produto de degradação 1; PD2 – produto de degradação 2.

3.3 Validação do método indicativo de estabilidade desenvolvido

A média dos dados obtidos a partir de estudos de linearidade são mostrados na Figura 2, sendo considerado linear, analisado estatisticamente por ANOVA, com intervalo de confiança de 95%.

Figura 2- Linearidade do método



Os limites de detecção e quantificação para o método desenvolvido foram calculados para a DDS, sendo obtidos $0,58 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $0,13 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente.

Na validação do método, as variáveis analisadas foram a mudança no fabricante do ácido fosfórico (componente da fase móvel), avaliou-se Vetec® e Dinâmica® e foi considerado robusto quanto aos fabricantes diferentes, já que demonstraram resultados semelhantes, por conseguinte, os resultados mostraram com intervalo de confiança de 95% (t Student), assumindo variâncias desiguais, que o t calculado (0,045) foi inferior ao t tabelado (2,228).

Também se testou a mudança da temperatura da coluna cromatográfica, com temperaturas de 25, 24 e 26 °C e os dados estatísticos mostraram o intervalo de confiança de 95% que a ANOVA F calculado (0,02) foi menor do que o F tabelado (3,682).

O fluxo da fase móvel também foi avaliado, considerando a variação aceitável do equipamento; a variação proposta foi de $\pm 0,01 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Demonstrando com intervalo de confiança de 95% que o F calculado (0,143) foi menor do que F tabelado (3,682), o que permitiu a conclusão de que o método é robusto à variação de fluxo proposta.

Finalmente, a estabilidade das amostras com $n = 4$ foi observada em 24 horas, com teste estatístico ("t Student") e os resultados mostraram que o t calculado (1,080) foi menor do que t tabelado (2,446), com 95% de intervalo de confiança, assumindo variâncias iguais.

A determinação da exatidão do método foi realizada com base na avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de múltiplas alíquotas da mesma amostra. Estatisticamente, a repetitividade foi mostrada por resultar um CV inferior a 5% e teste de precisão intermediária após a aplicação do t de Student, apresentando t calculado (0,505) inferior a t tabelado (2,262), com intervalo de confiança de 95%.

O estudo da exatidão foi conduzido obtendo-se os coeficientes de variação 2,46; 0,83 e 1,48 para cada nível de concentração, que são menores que 5%, considerando a exatidão do método.

No teste de degradação forçada, os cromatogramas obtidos a partir de soluções de DDS sob condições diferentes de stress foram comparados com cromatogramas de amostras não degradadas. A retenção do pico de DDS foi identificada por tempo de retenção relativo e de pureza dos picos obtidos pelo detector de DAD, calculado a partir da média de três cromatogramas (Tabela3).

Tabela 3 – Estudos da pureza do pico

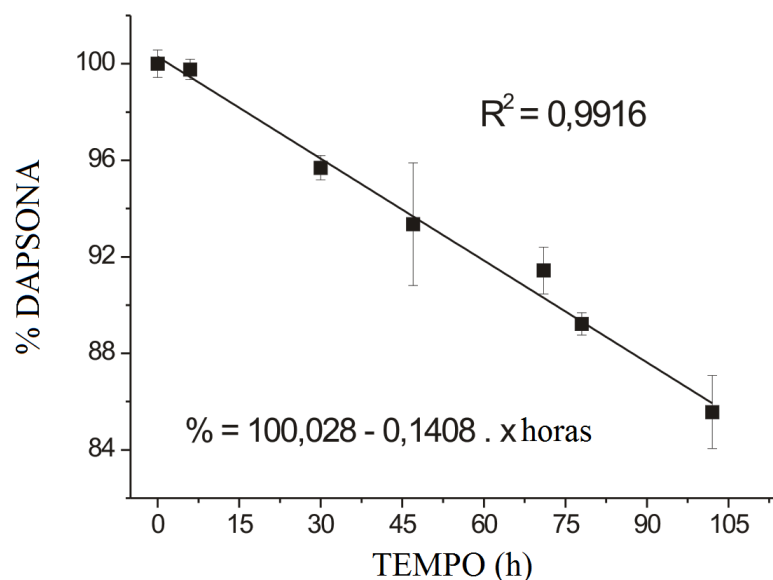
Pico (RR_T)	Threshold	Índice de pureza do pico
DP-1 (0.27)	0.9866	0.9888
DAP (1.00)	0.9999	1.0000
DP-2 (1.14)	0.9923	0.9999

3.4 Avaliação da cinética de fotodegradação

O teste de fotodegradação foi escolhido para ter sua cinética avaliada em virtude da maior facilidade em se interpretar os resultados, correlacionando com os dados cinéticos obtidos com apenas um parâmetro (exposição à luz), já que para o teste de fotodegradação não se utiliza nenhum indutor químico catalítico, nem aquecimento concomitante.

Os parâmetros cinéticos obtidos demonstraram que a decomposição fotolítica da DDS, segue uma reação de primeira ordem, calculados de acordo com a seguinte equação: $\ln C = \ln C_0 - k.t$, onde C_0 é a concentração inicial, C a concentração remanescente, k a constante de velocidade (s^{-1}) e t é o tempo (s), com a equação descrita na figura 3.

Figura 3 - Gráfico representativo da degradação da DDS por fotólise, seguindo reação de primeira ordem.



Como observado, o gráfico obtido a partir do percentual de fármaco em função do tempo, evidencia um comportamento de reação de primeira ordem para fotodegradação, no qual a degradação da DDS depende apenas da sua concentração no meio.

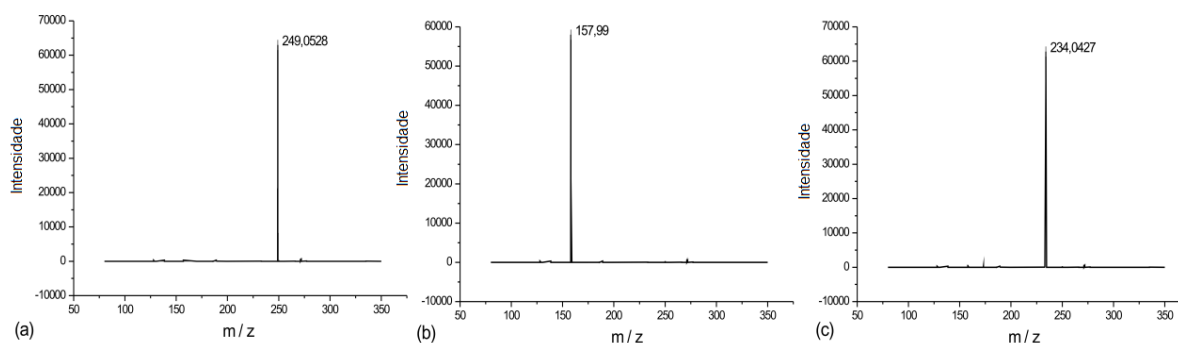
A constante de velocidade da reação é semelhante ao coeficiente angular da reta obtida, tomada com o sinal oposto. Sua análise revelou que, nestas condições experimentais o valor da taxa constante de decomposição fotolítica da DDS nestas condições é de $k = 0,1408 \text{ horas}^{-1}$.

3.5 Identificação dos produtos de degradação

A identificação dos produtos de degradação foi determinada através da solução de DDS degradada por oxidação (H_2O_2 a 3%), já que foi a degradação com percentual mais representativo de decaimento da DDS, na qual foram observados dois produtos de degradação de DDS, de acordo com a figura 1 (PD-1; DAP e PD-2). Estes produtos de degradação são diferentes dos encontrados no método desenvolvido por Lime Cheung (1977), que eram de 2,4'-sulfonilbis (benzeneamine), 4- (fenilsul-fonil) benzenamina, e 4-(4'-clorofenilsulfonil) benzenamina.

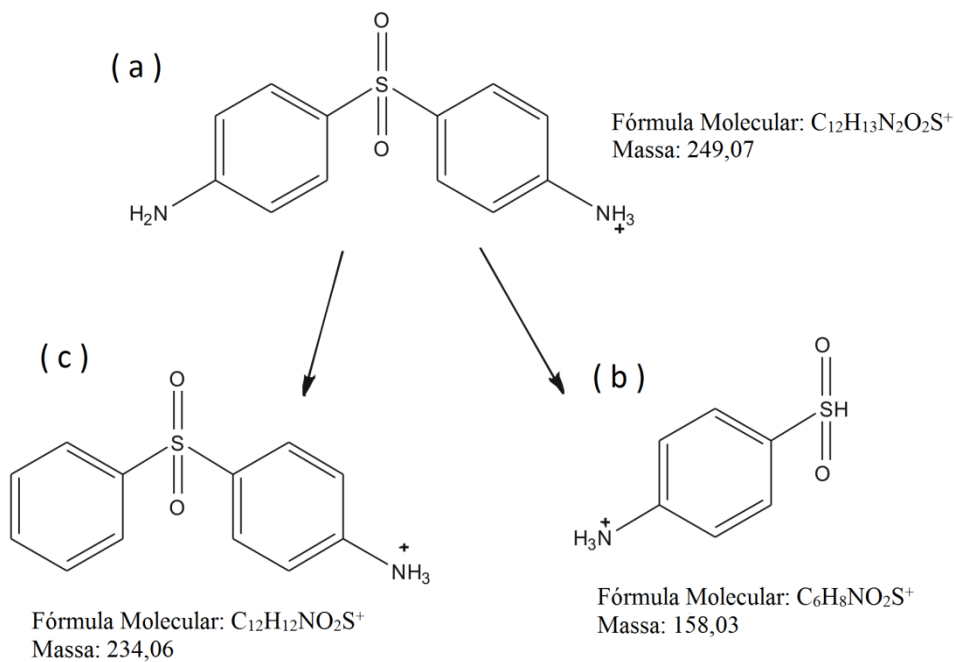
Avaliaram-se os picos identificados como PD – 1 e PD – 2 do cromatograma de degradação oxidativa acima através de espectrometria de massas, os quais podem ser observados na figura 4

Figura 4 - Espectros de massa da DDS (a) e dos produtos de degradação do PD – 1 (b) e PD – 2 (c)



O espectro de massa obtido permitiu-nos sugerir a possível estrutura química dos produtos de degradação da DDS, conforme representado na figura 5.

Figura 5 – Prováveis estruturas químicas de dois dos produtos de degradação da DDS

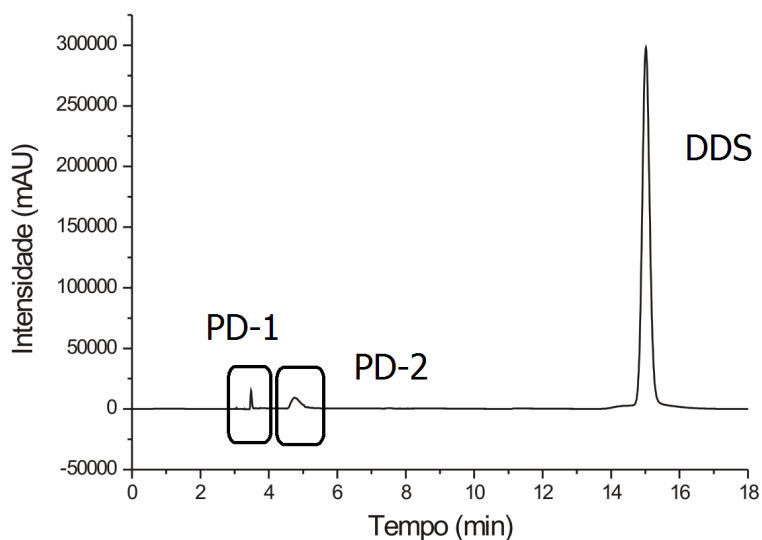


3.6 Aplicação do método desenvolvido para amostras de produto acabado de DDS

O método desenvolvido foi feito para ser aplicável até mesmo para as amostras de estabilidade em produtos acabados. Isso foi verificado com sucesso através de análises de formulações contendo DDS armazenadas sob condições aceleradas de temperatura (40 °C) e umidade (75% UR) por 3 e 6 meses.

A avaliação dos comprimidos após condições de testes de estabilidade acelerada mostrou a formação de dois produtos de degradação: PD - 1 e PD - 2 (figura 6), os quais foram detectados em estudos de degradação por hidrólise básica, oxidação e fotoestabilidade.

Figura 6 - Cromatograma de uma amostra de comprimidos de DDS condições de estabilidade acelerada por 6 meses.



A concentração da DDS foi quantificada em 95,7% e os produtos de degradação foram quantificados em 0,33% para PD-1 e 0,5% para o PD-2. À medida que a dose diária de DDS de 200-300 mg, variando de acordo com o paciente, estes produtos de degradação devem ser qualificados, isto é, isolados, identificados quimicamente e avaliados para a genotoxicidade e citotoxicidade.

4. Conclusão

Foi possível, neste estudo, desenvolver um método indicativo de estabilidade por CLAE para submeter a dapsona a condições de degradação recomendadas pelo ICH. O fármaco e os produtos de degradação foram bem separados um do outro num modo isocrático utilizando uma coluna de fase reversa C18 e fase móvel composta de ácido fosfórico pH 3: acetonitrila (80:20, v/v). O método mostrou ser simples, exato, preciso, específico e seletivo. Foi facilmente transferível para CLAE-EM. Além disso, pode ser empregado com sucesso para a análise do fármaco e seus produtos de degradação nos produtos comercializados armazenados por 6 meses sob condições de testes de estabilidade acelerada.

Os estudos de stress e subseqüentes análises de CLAE-EM mostraram que a droga foi decomposta sob condições hidrolíticas, oxidativa e fotolíticas em dois produtos de degradação, que tiveram suas estruturas químicas sugeridas. Mas, para confirmar a estrutura química dos produtos de degradação é necessário isolar e caracterizar os compostos puros através de estudos espectrais de EM, IV e RMN.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, M. G. 1925-2005 Evolution and current status of chemotherapy of leprosy. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.80, p. 25-29, 2005.

BAERTSCHI, S.W. *Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation*. Taylor & Francis Group LLC, 2005.

BAERTSCHI, S.W. Analytical methodologies for discovering and profiling degradation-related impurities. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 8, p. 758- 767, 2006.

BANSAL, G.; SINGH, M.; JINDAL, K. C. Forced degradation study on glicazide and application of validated stability-indicating HPLC-UV method in stability testing of glicazide tablets. **Chromatographia**, v. 66, p. 751 – 755, 2007.

BHUTANI, H.; SINGH, S.; VIR, S.; BHUTANI, K.K.; KUMAR, R.; CHAKRABORTI, A. K.; JINDAL, K C. LC and LC-MS study of stress decomposition behaviour of soniazid and establishment of validated stability-indicating assay method. **Journal Pharmaceutical Biomedical Analysis**, v.43, p. 1213-1220, 2007.

BINDU, K. H.; REDDY, I. U.; SURYANARAYANA, M. V. A Stability-Indicating Ultra-Performance Liquid Chromatographic method for estimation of related substances and degradants in paliperidone active pharmaceutical ingredient and its pharmaceutical dosage forms. **Journal of Chromatographic Science**, v. 50, p. 368-372, 2012.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE n.º 01, de 29 de julho de 2005, **Guia para realização dos estudos de estabilidade**. Brasília: Diário Oficial da União, 2005.

DOUSA, M.; GIBALA, P.; RÁDL, S.; KLECÁN, O.; MANDELOVÁ, Z.; BRICHÁČ, J.; PEKÁREK, J. Identification, preparation and UHPLC determination of process-related impurity in zolmitriptan. **Journal Pharmaceutical Biomedical Analysis**, v. 58, p. 1-6, 2012.

FDA, Guidance for Industry: Stability Testing of Drug Substances and Drug Products (Draft Guidance), **Food and Drug Administration**, Rockville, MD, 1998.

GORDON, G. R.; GHOUL, D. C.; PETERS, J. H. Identification and quantitation of impurities in dapsone preparations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 64, p. 1205-1207, 1975.

HADAD, G.M. Validated stability-indicating HPLC method for the determination of dimethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylene dioxybiphenyl-2,2'-dicarboxylate (DDB) and its degradation products. **Journal Pharmaceutical Biomedical Analysis**, v. 47, p. 695 – 703, 2008.

HUYNH-BA, K. Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development. Editor Springer, New York, USA, 2009.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, “ICH Q2A: **Validation of Analytical Procedures: Methodology**,” Step 5 (1994).

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, **Photostability Testing of New Drug Substances and Products Q1B**, in: International Conference on Harmonization, IFPMA, Geneva, 1996.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, “ICH Q2B: **Validation of Analytical Procedures: Terms and Definitions**,” Step 5 (1996b).

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, “ICH Q2 (R1): **Harmonised Tripartite Guideline; Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**,” IFPMA: Geneva, 2005.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. **Guidance for industry Q1A(R2) stability testing of new drug substances and products**. Geneva, 2006.

JUNQUEIRA, T. B.; OLIVEIRA, H. P. Leprosy Past-Present. **Science, Health and Care**, v. 2, p. 263-266, 2002.

KLICK, S.; MUIJSELAAR, P.G.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDING, T.K.; DEBETS, A.J.; GRIEND, C.S.; VAN DEN BELD, C.; SOMSEN, G.W.; JONG, G.J. Toward a Generic Approach for Stress Testing of Drug Substances and Drug Products. **Pharmaceutical Technology**, v. 5, p. 48-58, 2005.

KUHN, H.J.; BRASLAVSKY, S.E.; SCHIMIDT, R. Chemical actinometry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 76, p. 2105 – 2146, 2004.

LEAL, L.B.; SILVA, M.C.T.; BEDOR, D.C.G.; PIMENTEL, M.F.; SANTANA, D.P. Desenvolvimento de teste de dissolução para o meloxicam utilizando o planejamento fatorial: estudo comparativo de produtos industrializados x produtos magistrais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, p. 160-163, 2008.

MACIEL, L. B. A solução de um mal que é um flagelo: notas históricas sobre hanseníase no Brasil do século XX. In: Nascimento DR, Carvalho DM. Uma história Brasileira das doenças. Brasília: **Paralelo**, v. 15, p. 57-63, 2004.

MANNAN, C.A.; KROL, G.J.; KHO, B.T. High speed liquid chromatographic analysis of dapsone and related compounds. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 66, p. 1618-1623, 1977.

MEIMA, A.; IRGENS, L. M.; OORTMARSSSEN, G. J.; RICHARDUS, J. H.; HABBEMA, J. D. F. Disappearance of leprosy from Norway: an exploration of critical factors using an epidemiological modelling approach. **International Journal of Epidemiology**, v. 31, p. 991-1000, 2002.

NEVES, C.F.C.; Schvartzman, M.A.M.; JORDÃO, E. Técnica para seleção de variáveis aplicada à separação de gases. **Química Nova**, 25 (2002) 327-329.

NETO, B.B; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos**. 4ª.ed. Bookman: Porto Alegre, 2010.

OYLER, A.R.; SEGMULLER, B.E.; SUN, Y.; POLSHYNA, A.; DUNPHY, R.; ARMSTRONG, B.L.; ACHORD, P.; MARYANOFF, C.A.; ALQUIER, L.; IL'ICHEV, Y.V. Forced degradation studies of rapamycin: Identification of autoxidation products. **Journal Pharmaceutical Biomedical Analysis**, v. 59, p. 194 – 200, 2012.

SANTOS, G. S.; PEREIRA, G. G.; BENDER, E. A.; COLOMÉ, L. M. GUTERRES, S. S.; CARVALHO, D. C. M.; WISSMÜLLER, G. Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas destinadas à aplicação tópica de dapsona. **Química Nova**, Vol. 35, No. 7, 1388-1394, 2012.

SEHRAWAT, R.; MAITHANI, M.; SINGH, R. Regulatory Aspects in Development of Stability-Indicating Methods: A Review. **Chromatographia**, v. 72, p. 1-6, 2010.

SILVA, K.E.R.; ALVES, L.D.S.; SOARES, M.F.R.; PASSOS, R.C.S.; FARIA, A.R.; ROLIM-NETO, P.J. Models for Stability Assessment of Pharmaceuticals and Medicinal Products for the Pharmaceutical Industry. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, p. 1-8, 2009.

SINGH, S.; BAKSHI, M. Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs. **Pharmaceutical Technology**, v. 24, p. 1-14, 2000.

SINKO, P. J. **Martin – Físico-farmácia e ciências farmacêuticas**. Editora Artmed. 5ªEd. 810p. 2008.

TØNNESEN, H. H. **Photostability of Drugs and Drug Formulations**. 2. ed., CRC Press, 2004.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V.J. **Stability of Drugs and Dosage Forms**. Boston: Kluwer Academic Publishers New York, 2002.

WHO. Leprosy today, 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs101/en/>>. Acesso em: 10 fev. 2011.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- As técnicas analíticas utilizadas para a caracterização do fármaco possibilitaram um melhor entendimento das propriedades físico-químicas da DDS, as quais são essenciais no estudo de pré-formulação e no desenvolvimento tecnológico racional de uma nova formulação;
- Um novo método de quantificação da DDS por UV simples e de baixo custo foi desenvolvido e validado segundo parâmetros propostos na RDC 899 de 2003(ANVISA). Este método apresenta uma alternativa mais racional ao doseamento da DDS, tendo em vista a baixa toxicidade dos solventes utilizados, expondo tanto o analista quando o ambiente a menores riscos;
- O método CLAE-DAD desenvolvido para quantificação da DDS e de seus produtos de degradação foi desenvolvido e validado segundo o guia do ICH e a RDC 899 de 2003(ANVISA). Este método é necessário para as análises de estudos de degradação que visem delinear o perfil degradativo da DDS em diferentes condições, bem como no estudo de estabilidade e controle de qualidade de formas farmacêuticas de DDS.
- Os estudos de degradação em solução aquosa realizados possibilitaram o conhecimento das de alguns dos produtos de degradação da DDS e suas respectivas estruturas químicas através de CLAE-DAD e CLAE-MS.

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

- Estudo das cinéticas de degradação oxidativa e hidrolítica;
- Realizar estudo de compatibilidade térmica com excipientes utilizados em formulações líquidas.
- Aprofundar e aperfeiçoar o estudo termoanalítico, utilizando técnicas complementares;
- Realizar estudo de polimorfos;

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHFS drug information 2000. Bethesda: American Society of Health System Pharmacists, p.2850-2856, 2000.

ALMEIDA, H. **Métodos para o Incremento da Solubilidade de Substâncias Activas Pouco Solúveis (BCS – Classe II)**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009.

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

ANVISA. Resolução nº 2, de 15 de janeiro de 2007. Diário Oficial da União 2007.

ARAÚJO, M. G. Hanseníase no Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 36, p. 373-382, 2003.

ARAÚJO, A.A.S.; STORPIRTIS, S.; MERCURI, L.P.; CARVALHO, F.M.S.; SANTOS FILHO, M. ; MATOS L. R. Thermal analysis of the antiretroviral zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with excipients used in solid dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 260, p. 303–314, 2003.

BALESTRIERI, F.;MAGRI, A.D.; MAGRI, A.L.;MARINI, D.; SACCHINI.A. Application of differential scanning calorimetry to the study of drug-excipient compatibility. **Thermochim Acta**, v. 45, p. 285-337, 1996.

BEDOR, D. C. G. et al. Validação de Método Analítico. **Controle de Contaminação**,n. 68, p. 32-36, dez. 2004.

BHARATE, S. S., BHARATE, S. B. BAJAJ, A. N. Interactions and incompatibilities of pharmaceutical excipients with active pharmaceutical ingredients: a comprehensive review. **J. Excipients and Food Chem.** v.1, 2010.

BLAGDEN, N.; MATAS, M.; GAVAN, P.T.; YORK, P. Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. **Advanced Drug Delivery Reviews.** Belgium, v. 59 , p. 617–630, 2007.

BRAGHETTO, J. B. **Avaliação do potencial da Arginina na prevenção da hemotoxicidade induzida pela Dapsona em ratos.** Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. DPGE. **Hanseníase no Brasil: progressos e dificuldades em relação à eliminação.** Brasília, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. DPGE. **Guia para implantar/implementar as atividades de controle da hanseníase nos planos estaduais e municipais de saúde.** Brasília, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Aprova o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Diário Oficial da União. Brasília, 01 de novembro de 2003.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Resolução RDC nº 150, 17/6/2003,** Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 20/06/2003b.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Programa Nacional de Eliminação da Hanseníase.** Brasília, 2006.

CAO, X.; GIBBS, S. T.; FANG, L.; MILLER, H. A.; LANDOWSKI, C. P.; SHIN, H. C.; LENNERNAS, H.; ZHONG, Y.; AMIDON, G. L.; YU, L. X; SUN, D. Why is it challenging to predict intestinal drug absorption and oral bioavailability in human using rat model. **Pharmaceutical Research,** v.23, n.8, p.1675-86, 2006.

CAMBAU, E.; PERANI, E.; GUILLEMIN, I.; JAMET, P. J.I.B. Multidrug-resistance to dapsone, rifampicin, and ofloxacin in *Mycobacterium leprae*. **Lancet**, v. 349, p.103-4, 1997.

CLARYSSE, S.; BROUWERS, J.; TACK, J.; ANNAERT, P.; AUGUSTIJNS. Intestinal drug solubility estimation based on simulated intestinal fluids: Comparison with solubility in human intestinal fluids. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, p. 260-269, 2011.

COLEMAN, M.D. Dapsone: modes of action, toxicity and possible strategies for increasing patient tolerance. **British Journal of Dermatology**, v. 129, p. 507-13, 1993.

DNDi – Drugs for Neglected Diseases initiative. **Desequilíbrio fatal, a crise de pesquisa e desenvolvimento de drogas para doenças negligenciadas**. 32p., set. 2001. Disponível em: <http://www.dndi.org.br/Portugues/doencas_negligenciadas.aspx > Acesso em: 8 jan. 2011.

EURACHEM/CITAC Guide. **Quantifying uncertainty in analytical measurement**. ed. 2, 2000.

FARMACOPEIA PORTUGUESA VIII. Lisboa: Infarmed-Ministério da Saúde, 2005.

FAJGELJ, A.; AMBRUS, A. **Principles and Practices of Method Validation**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2000. 305 p.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Analytical Procedures and Methods Validation**. Washington: Center of Drug Evaluation and Research, 2000.

GREBOGI, I. H. **Obtenção e caracterização de complexos binários e ternários de dapsona**. 2009, 98p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná.

GIOLITO, I.; IONASHIRO, M. Nomenclatura em análise térmica: Parte II. **Cerâmica**, vol. 34:163-164, 1988

GOPINATH , R.; NAIDU, R.A.S. **Pharmaceutical Preformulation Studies – Current Review. International Journal of Pharmaceutical and Biological Archive.** v. 2, n. 5, p. 1391-1400, 2011

GOULART, I.M.B.; ARBEX, G.L.; CARNEIRO, M.H.; RODRIGUES, M.S.; GADIA, R. Efeitos adversos da poliquimioterapia em pacientes com hanseníase: um levantamento de cinco anos em um Centro de Saúde da Universidade Federal de Uberlândia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n.5, p. 453-460, 2002.

FDA.Guidance for Industry.**Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system**, Department of Health and Human Services 2000.

HANSON-research-corporation. Dissolution: Past, Present & Future. 2. ed. Chatsworth. Hanson Research, 2-12, 1996.

HÖHNE, G. W. H.; HEMM INGER, W. F.; FLAMM ERSHEIM, H. J. **Differential Scanning Calorimetry**; New York: Springer Verlag Heidelberg, 2003.

International Conference on Harmonization.**ICH, Q1A(R2). Stability testing of new drug substances and products**, in: International Conference on Harmonization, IFPMA, Geneva, 2003.

International Conference on Harmonization.**Ich Q8: Pharmaceutical Development**, step 4, 2009.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO.**Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQCGCRE-008. 2003.

KLANCNIK, G.; MEDVED, J.; MRVAR, P. Differential thermal analysis (DTA) and differential scanning calorimetry (DSC) as a method of material investigation. **RMZ – Materials and Geoenvironment**, v. 57, p. 127–142, 2010.

KUSTNER, E.C.; CRUZ, M.P.; DANSIS, C.P.; IGLESIAS, H.V.; CAMPILLO, E.R.R.; LÓPEZ, J.L. Lepromatous leprosy: a review and case report. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 11, p. 474-9, 2006.

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

LA ROCA, M.F.; SOBRINHO, J.L.S.; NUNES, L.C.C; NETO, P.J.R. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n. 4, p.177-180, 2007.

LANDERS, D.; BERGIN, C.; O'LEARY, A.; MERRY, C.; KEATING, S.; MULCAHY, F. Dapsone induced methaemoglobinaemia. **International Journal STD AIDS**, v. 7, n.6, p. 445-7, 1996.

LIMA, A.A.N.; SOARES SOBRINHO, J.L.; CORREA JR., R.A.C; ROLIM NETO, P.J. Alternative Technologies to Improve Solubility of Poorly Water Soluble Drugs. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 5, p. 789-97, 2008.

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

LOFTSSON, T., HREINSDOTTIR, D. e MASSON, M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v.302, n.1-2, Sep 30, p.18-28. 2005.

MCGREGOR, C.; SAUNDERS, M. H.; BUCKTON, G.; SAKLATVALA, R. D. The use of high-speed differential scanning calorimetry (HyperDSC(TM)) to study the thermal properties of carbamazepine polymorphs. **Thermochimica Acta**, v. 417, p. 231-237, 2004.

MELLO, M.H. **N-acetilcisteína e dapsona**: avaliação da toxicidade hematológica e bioquímica em ratos Wistar. 2005. 120 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

MERCOSUL. **Resolução GMC 53, 1996**. Aprova o regulamento técnico denominado “Estabilidade de Produtos Farmacêuticos” para aplicação da resolução GMC 23/95.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Rev Saúde Pública**. v.;44(1), p.200-202, 2010.

MIZIARA, I.D.; GONCLIM, M.; MINITI, A. Uso da dapsona no tratamento da estomatite aftóide recidivante. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 58, n.2, p. 96-8, 1992.

MOREL, C.M., T. ACHARYA, D. BROUN, A.J. DANG, C. ELIAS, N.K. GANGULY, C.A. GARDNER, R.K. GUPTA, J. HAYCOCK, A.D. HEHER, P.J. HOTEZ, H.E. KETTLER, G.T. KEUSCH, A.F. KRATTIGER, F.T. KREUTZ, S. LALL, K. LEE, R. MAHONEY, A. MARTINEZ-PALOMO, R.A. MASHELKAR, S.A. MATLIN, M. MZIMBA, J. OEHLER, R.G. RIDLEY, S. PRAMILLA, P. SINGER, M.Y. Health innovation networks to help developing countries address neglected diseases. **Science**, v.309, n. 5733, p. 401-404, 2005.

OLIVA, A.; LLABRÉS, M.; FARIÑA, J. B. Data Analysis of Kinetic Modelling Used in Drug Stability Studies: Isothermal Versus Nonisothermal Assays. **Pharmaceutical research**, v. 23, p. 2595 – 2602, 2006.

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

PINTO T.J.A.; FERRARINI, M.; GATTI, R.M. Proposta de roteiroprático para a validação de métodos analíticos. **Farmácia & Química**, v.36, p. 26-36, 2003.

QUEIROZ, R.H.C.; MELCHIOR JUNIOR, R.; DE SOUZA, A.M.; GOUVEIA, E.; BARBOSA, J. C.; DE CARVALHO, D. Haematological and biochemical alterations in leprosy patients already treated with dapsone and MDT. **Pharmaceutica Acta.Helveitiae**, v. 2, n. 4, p. 209-13, 1997.

RATHORE, A. S.; WINKLE, H. Quality by design for biopharmaceuticals.**Nature biotechnology**, v. 27, P. 26 – 34,2009.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p.771-780, 2003.

RICHARDUS, J.H.; HABBEMA, J.D. The impact of leprosy control on the transmission of *M. leprae*: is elimination being attained? **Leprosy Review**, v. 78, p. 330-7, 2007.

RODANTE, F.; VECCHIO, S.; CATALANI, G.; TOMASSETTI, M. Application of TA and kinetic study to compatibility and stability problems in some commercial drugs.**Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 66, p. 155-178, 2001.

RODANTE, F.; VECCHIO, S.; CATALANI, G.; TOMASSETTI, M. Compatibility between active components of a commercial drug.**Farmaco**, v. 57, p. 833-43, 2002.

ROY, D.; DUCHER, F.; LAUMAIN, A.; LEGENDRE, J. Y.Determination of the aqueous solubility of drugs using a convenient 96 well plate based assay. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 27, n. 1, p. 107-109, 2001.

SALAMAT, A.; WATSON, H.G. Drug-induced methemoglobinaemia presenting with angina follow the use of dapsone.**Clinical and Laboratory Haematology**, v. 25, n.5, p. 327-8, 2003.

SLAVIO, H.N.; NOVAK, C.; MATOS, J.R. Thermal analysis and compatibility studies of prednicarbate with excipients used in semi solid pharmaceutical form, **Journal of Thermal Analysis and Calorimetric**, v. 97, p. 367-374, 2009.

SOARES SOBRINHO, J. L. ET AL. Validação de metodologias analíticas no mercado farmacêutico: Caso paracetamol. **Controle de Contaminação**, São Paulo, n.73, p. 35-41, maio. 2005.

SOARES SOBRINHO, J. L. et al. Desenvolvimento e validação do método analítico para o doseamento de benznidazol. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 87, n. 3, p. 78-80, jul./set. 2006a.

SOARES SOBRINHO, J. L. et al. Alternativa para o doseamento de metildopacomprimido: desenvolvimento e validação do método analítico. **Controle de Contaminação**, São Paulo, n. 82, p. 31-35, fev. 2006b.

SOARES-SOBRINHO, J. L.; SOARES DE LA ROCA, M. F.; LOPES, P. Q.; CORREIA, L. P.; SOUZA, F. S.; MACÊDO, R. O.; ROLIM-NETO, P. J. A Preformulation Study of a New Medicine for Chagas Disease Treatment: Physicochemical Characterization, Thermal Stability, and Compatibility of Benznidazole. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, p. 1391-1396, 2010.

SOVIZI, M. R. Thermal behavior of drugs. Investigation on decomposition kinetic of naproxen and celecoxib. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetric**, v. 102, p. 285-289, 2010.

STULZER, H.K.; RODRIGUES, P.O.; CARDOSO, T.M.; MATOS, J.S.R.; SILVA, M.A.S. Compatibility studies between captopril and pharmaceutical excipients used in tablets formulations. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetric**, Florianópolis, Brasil, v. 91, p. 323–328, 2008.

TALARICO, J.F.; METRO, D.G. Presentation of dapsone-induced methemoglobinemia in a patient status post small bowel transplant. **Journal Clinical Anesthesiology**, v. 17, p. 568-2005.

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

UNITED STATES PHARMACOPEIA. 24.ed. Rockville U.S.:Pharmacopeial Convention; 2000.

VERMA, R.K.; GARG, S. Compatibility studies between isosorbide mononitrate and selected excipients used in the development of extended release formulations, **Journal Pharmaceutical Biomedical Analysis**, Haryana, India, v. 35, p. 449–458, 2004.

VERMA, R.K.; GARG, S. Selection of excipients for the extended release formulations of glipizide through drug-excipient compatibility testing. **Journal Pharmaceutical Biomedical Analysis**, Haryana, India, v. 38, p. 633-644, 2005.

VESSMAN, J.; STEFAN, R.I.; STADEN, J.F.V.; DANZER, K.; LINDNER, W.; BURNS, D.T.; FAJGELJ, A.; MÜLLER, H. Selectivity in analytical chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 8, p. 1381-1386, 2001.

WARD, K.E.; McCARTHY, M. W. Dapsone-induced methemoglobinemia. **Ann Pharmacother**, v.32, n. 5, p. 549-53, 1998.

WENDTLENDT, W. **Thermal analysis**. Jonh Wiley Song, New York. 200p., 1986.

WHO. World Health Organization. **Leprosy Today**. Disponível em: <<http://www.who.int/lep/en/>> Acesso em: 27/09/2011.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA

PRODUÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA

- **ARTIGO ACEITO**

ARAÚJO, R. F. M.; COELHO, M. L.; SOARES, M. F. L. R.; ROLIM, L. A.; NETO, P. J. R.; SOARES-SOBRINHO, J. L. New Alternative Analytical to Quantify the Anti-Leprosy Drug Dapsone by UV Spectrophotometry. **Latin American Journal of Pharmacy**, vol. 31 (2), p. 265-270, 2012.

- **DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE**


SABINO, E. B.; BEZERRA JUNIOR, F. J.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; COELHO, M. L. Derivados 2 – ((benzilideno)amino)-5-6-di-hidro-4H-ciclopenta(b)tiofeno – 3 carbonila cloro substituída e seus sais farmacologicamente aceitáveis. 2012.

- **APRESENTAÇÃO DE TRABALHO CIENTÍFICO**

COELHO, M. L.; ARAÚJO, F. M.; CHAVES, L. L.; ROLIM, L. A.; NETO, P. J. R.; SOARES SOBRINHO, J. L. Estudos de pré-formulação do fármaco dapsona: Desenvolvimento de métodos analíticos e Avaliação da estabilidade. Apresentação oral premiada com Mensão Honrosa, durante o 1º Workshop de Projetos e Dissertações, Teresina, 2012.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Artigo publicado no Latin American Journal of Pharmacy

 *Latin American Journal of Pharmacy*
(formerly *Acta Farmacéutica Bonaerense*)
Lat. Am. J. Pharm. **31** (2): 265-70 (2012)

Regular Article
Received: November 3, 2011
Revised version: March 19, 2012
Accepted: March 21, 2012

New Alternative Analytical to Quantify the Anti-Leprosy Drug Dapsone by UV Spectrophotometry

Rian F.M. ARAUJO ¹, Mayara L. COELHO ¹, Monica F.L.R. SOARES ¹,
Larissa A. ROLIM ², Pedro J.R. NETO, José L. SOARES-SOBRINHO ^{1*}

¹ *Core of Pharmaceutical Technology. Federal University of Piauí, Brazil.*

² *Pharmaceutical Technology Laboratory. Federal University of Pernambuco, Brazil.*
