UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Avaliação da estabilidade e desenvolvimento de formulações
para o complexo benznidazol- β ciclodextrina

Katia Nami Ito

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz

São Paulo
2012

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

I89a Ito, Katia Nami
Avaliação da estabilidade e desenvolvimento de formulações
para o complexo benznidazol- β -ciclodextrina / Katia Nami Ito. --
São Paulo, 2012.
70p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador : Ferraz, Humberto Gomes

1. Farmacotécnica I. T. II. Ferraz, Humberto Gomes, orientador.

615.4 CDD

Katia Nami Ito

Avaliação da estabilidade e desenvolvimento de formulações para o
complexo benznidazol- β ciclodextrina

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Aos meus pais Noriaki e Taeko,
pelo esforço e dedicação na minha educação
pelo imenso amor, exemplo e apoio.

Aos meus irmãos Mario, Yukari, Sanae e Ayao,
pelas alegrias, carinho, apoio e companheirismo.

Ao meu esposo Eduardo,
pelo amor, companheirismo, paciência, incentivo,
e por estar ao meu lado durante todo esse período.

Obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz pela oportunidade de realizar o mestrado, pelo aprendizado, paciência e dedicação.

À Profa. Dra. Nádia Araci Bou-Chacra e Dra. Letícia Norma Carpentieri Rodrigues pelo carinho e incentivo.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Farmácia, da secretaria de Pós-Graduação e da Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela atenção dispensada.

À Michele Georges Issa pela imensa contribuição no planejamento experimental e avaliação estatística dos dados de perfis de dissolução, pela alegria, amizade e incentivo em todos os momentos.

Às queridas Olga Alexopoulos e Patrícia Rivas pelo auxílio no desenvolvimento de método analítico em HPLC, discussões sobre os estudos de degradação forçada, pelo incentivo e amizade.

À Janisse Miranda pelo auxílio na produção dos complexos benznidazol- β ciclodextrinas, pelo apoio e discussões.

À Libbs Farmacêutica pela doação das matérias primas.

Ao Miller Nunes de Freitas pelo apoio, conselhos e incentivo para a conclusão deste trabalho.

Ao Bruno Camardella, Cintia Alves, Fagner Magalhães e Missael Silva pelo auxílio na produção dos complexos e preparo dos meios de dissolução.

Aos queridos Eremita Santos, Leandro Giorgetti, Marcelo Duque e Karina Gueogjian pela alegria e apoio.

Às amigas da faculdade Andrea Takahashi, Mitie Miyauchi e Regiane Guenta por sempre estarem por perto, pelo apoio e pelas alegrias.

À minha família Lina, Lincoln, Cindy, Jogi, Dani, Kogi, Thais, Sayuri, Yuzuru, Nori, Mitie, Hide, Sr. Kiyoshi, Sra. Tamie, Mayumi, Giuseppe, Yuri, Tokio e Norio pela torcida para que tudo desse certo.

Às amigas Eliane Mathias Leão e Vanesca Fagundes pelo imenso incentivo, alegria, carinho e amizade.

Às amigas Elaine Moraes, Emili Andrade, Aleksandra Alves, Ana Lucia Nobusa, Renata Camargo e Sabrina por sempre terem me apoiado.

Aos amigos da Libbs Farmacêutica, Cassio Yooiti Yamakawa, Fabiana Flank, Priscila Buffolo, Patrícia Radunz, Tiago Sais, Adriana Lara, Michele Muzatio, Fabiano Nogueira, Hélio Salvio, Gabriel Lima, Maria Lenice e Paula Quaresma pelo incentivo de seguir em frente.

A todos aqueles que contribuíram de certa forma para a realização deste trabalho, o meu profundo agradecimento.

RESUMO

ITO, K.N. **Avaliação da estabilidade e desenvolvimento de formulações para o complexo benznidazol- β ciclodextrina**. 2012. 70p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A doença de Chagas afeta aproximadamente 8 a 10 milhões de pessoas em todo o mundo sendo o benznidazol, o único fármaco disponível para o tratamento. Por outro lado, as ciclodextrinas têm se mostrado como grande aliada para melhorar a solubilidade de fármacos pouco solúveis, tendo sido utilizadas, inclusive, para o benznidazol. Entretanto, o comportamento químico dos complexos benznidazol- β CD e a aplicação ou formulação de um produto final com referido composto não foi ainda estudada e o objetivo do presente trabalho foi investigar a estabilidade química do fármaco e de seus complexos com betaciclodextrinas através de estudos de degradação forçada e propor uma formulação multiparticulada (minicomprimidos) com um perfil de dissolução adequado e de fácil produção para o benznidazol. Estudos de degradação do benznidazol em solução e no estado sólido foram conduzidos em meio ácido (HCl 0,1 M), alcalino (NaOH 0,1 M), em pH neutro (água), na presença de peróxido e sob ação da luz. O benznidazol na forma não complexada mostrou-se instável em meio alcalino, na presença de peróxido e sob a ação da luz, quando em solução. Porém, os complexos benznidazol- β ciclodextrina e benznidazol- β ciclodextrina-copovidona, não foram capazes de proteger o fármaco nas condições de estresse estudadas. Adicionalmente, foram produzidas oito formulações de benznidazol utilizando um planejamento fatorial completo com três fatores, sendo o ganho de peso, a adição da β ciclodextrina e da crospovidona, em dois níveis cada (fatorial 2^3). O fármaco, a ciclodextrina e o desintegrante foram aplicados diretamente na superfície dos minicomprimidos inertes com auxílio da hidroxipropilmetilcelulose utilizando a tecnologia de leito fluidizado, obtendo-se formulações com mais de 80% de dissolução do fármaco em 30 minutos. A avaliação estatística dos resultados proporcionou o entendimento da influência do ganho de peso, da adição da β ciclodextrina e crospovidona na dissolução do benznidazol.

Palavras Chave: Benznidazol. β ciclodextrina. Degradação forçada. Minicomprimidos. Dissolução

ABSTRACT

ITO, K.N. **Evaluation of stability and formulation development of benznidazole- β cyclodextrin complexes.** 2012. 70p. Dissertation (Master's) - Department of Pharmaceutics, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo

Chagas disease (a.k.a. American trypanosomiasis) affects approximately 8 to 10 million people worldwide. Currently, benznidazole is the only drug available for treatment. Cyclodextrins have proven to be a valuable resource for improving the solubility of poorly-soluble drugs, and they have also been used with benznidazole. However, the chemical behavior of benznidazole- β CD complexes and the application or formulation of a final product with the aforementioned compound has still not been studied, and so the purpose of this study was to investigate the chemical stability of the drug and its complexes with β -cyclodextrins through forced degradation studies, and to propose a multi-particulate formulation with a satisfactory dissolution profile in the form of mini-tablets that are easy to produce for benznidazole. Degradation studies of benznidazole in solution and solid form were conducted using a variety of media, including acidic (HCl 0.1 M), alkaline (NaOH 0.1 M), pH-neutral (water), as well as in the presence of peroxide and under the action of light. Benznidazole, in solution form and in its uncomplexed state, proved to be unstable in the alkaline medium, in the presence of peroxide and under the action of light. Furthermore, the benznidazole- β cyclodextrin and benznidazole- β cyclodextrin-croscopovidone complexes were not capable of protecting the drug under the stress conditions studied. Eight formulations of benznidazole were produced using a complete factorial design involving three factors, which were weight gain, the addition of the β cyclodextrin and the addition of croscopovidone, on two levels each (2^3 design). The drug, the cyclodextrin and the excipient were applied directly to the surface of the inert mini-tablets with the aid of hydroxypropylmethyl cellulose, using fluid bed technology. Formulations with more than 80% of drug dissolution in 30 minutes were obtained. Statistical evaluation of the results provided understanding of the influence of weight gain, the addition of β cyclodextrin and croscopovidone on the benznidazole dissolution.

Keywords: Benznidazole. β cyclodextrin. Forced degradation. Mini-tablets. Dissolution.

SUMÁRIO

Capítulo 1: Estudos de degradação forçada na caracterização físico-química de fármacos durante a etapa de pré-formulação	11
1.1. Introdução	12
1.2. Recomendações sobre a condução dos estudos de degradação forçada	15
1.3. Avaliação dos produtos gerados pela degradação forçada.....	18
1.4. Publicações sobre os estudos de degradação forçada.....	19
1.5. Sugestão para condução de estudos de degradação forçada durante a pré-formulação	28
1.6. Conclusão	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
 Capítulo 2: Avaliação da estabilidade química de complexos benznidazol-betaciclodextrinas através de estudos de degradação forçada	34
2.1. Introdução	35
2.2. Materiais e Métodos	37
2.2.1. Matérias-primas e reagentes	37
2.2.2. Sistema Cromatográfico	37
2.2.2.1. Validação do método analítico	37
2.2.3. Preparação dos complexos de BNZ-βCD.....	38
2.2.4. Solubilidade	38
2.2.5. Estudos de degradação forçada	39
2.3. Resultados e discussão	40
2.4. Conclusão	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

Capítulo 3: Formulação e avaliação de perfis de dissolução de minicomprimidos de benznidazol-βciclodextrina	52
3.1. Introdução	53
3.2. Materiais e Métodos	55
3.2.1. Matérias-primas e reagentes.....	55
3.2.2. Formulação	55
3.2.2.1. Obtenção dos minicomprimidos inertes	55
3.2.2.2. Incorporação do fármaco.....	55
3.2.3. Caracterização dos minicomprimidos de BNZ	57
3.2.3.1. Peso médio	57
3.2.3.2. Teor de BNZ	57
3.2.3.3. Perfil de dissolução	58
3.3. Resultados e discussão.....	59
3.4. Conclusão	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

CAPÍTULO 1

**Estudos de degradação forçada na caracterização físico-química de fármacos
durante a etapa de pré-formulação**

1.1.Introdução

Os estudos de pré-formulação têm como objetivo conhecer um fármaco antes da fase de desenvolvimento da formulação farmacêutica, através de ensaios para investigar suas principais características físico-químicas. Dentre os testes recomendados para esta caracterização, pode-se citar solubilidade, velocidade de dissolução, tamanho e forma da partícula, estrutura do cristal, propriedades mecânicas do pó e estabilidade química, dentre outros (PANDEY; RATH; DWIVEDI, 2011).

Por outro lado, é importante considerar que os estudos de degradação forçada são ferramentas úteis para um maior entendimento sobre a substância ativa (estabilidade intrínseca) e desta forma, pode ser utilizada como parte do estudo de pré-formulação de medicamentos, pois, a partir das informações prévias sobre o comportamento químico do fármaco, pode-se escolher os excipientes, processo de fabricação e material de embalagem adequados (KAZAKEVICH; LoBRUTTO, 2007).

Uma grande vantagem dos estudos de degradação forçada para se conhecer o comportamento químico do fármaco antes do estudo de estabilidade do produto final é a rapidez na execução dos testes (levam em torno horas ou alguns dias), otimizando assim, o processo de desenvolvimento da formulação de um medicamento (BAERTSCHI, 2005).

Os estudos de degradação forçada (também conhecidos como estudos de estresse), para além da determinação da estabilidade intrínseca da molécula, podem também auxiliar na identificação de produtos de degradação, estabelecer as rotas de degradação e validar metodologias analíticas indicadoras de estabilidade (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2003), sendo portanto, um trabalho de fundamental importância na pré-formulação, inclusive para o desenvolvimento de medicamentos genéricos e similares.

A investigação sobre a suscetibilidade da substância ativa às condições que conduzem à degradação pode ser útil no desenvolvimento do medicamento uma vez que esta instabilidade pode ocorrer devido às reações com a água residual da formulação, com excipientes ou até mesmo com impurezas presentes em sua embalagem. Adicionalmente, o processo de fabricação para a obtenção da forma

farmacêutica também pode causar uma condição que favoreça a degradação do fármaco. O formulador poderá ter um controle maior e poderá ser mais assertivo sobre o desenvolvimento do medicamento após um estudo de estabilidade do fármaco sob diversas situações que envolvam alterações de pH, temperaturas severas, presença de luz e oxigênio, podendo evitar assim, as condições nas quais o fármaco apresenta-se instável (FREED et al., 2008; BAERTSCHI, 2005).

Entretanto, é importante destacar que a metodologia a ser empregada nestes estudos é, ainda, objetivo de discussão, não existindo, até o momento, um guia ou qualquer outro documento onde o pesquisador possa se basear. A exceção fica por conta dos estudos de fotoestabilidade, para qual existe o guia Q1B do ICH (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 1996).

Apesar da inexistência de textos de caráter orientativo, há bastante discussão na literatura científica sobre o tema e, assim, o objetivo deste trabalho é exatamente revisar o assunto, apresentando um panorama de tais estudos e, ao mesmo tempo, estabelecendo uma proposta cientificamente estruturada contendo diretrizes para a condução de estudos de degradação forçada de fármacos.

Os estudos de degradação forçada ocupam um espaço importante durante o desenvolvimento de produtos em função, sobretudo do aumento da preocupação das agências reguladoras quanto às impurezas geradas no período de armazenamento do produto. Sobre este tema, ainda não existe uma literatura completa, principalmente em relação à condução dos ensaios (BAERTSCHI, 2005).

Muitos trabalhos na literatura descrevem estudos de degradação forçada como parte da validação de metodologia analítica, para indicar que um método é específico para a substância estudada, entretanto, não há muitas publicações sobre estudos de degradação forçada como parte do desenvolvimento de formulações, como por exemplo, utilizar os estudos sobre o comportamento químico apresentado pelo fármaco para selecionar adjuvantes farmacotécnicos, processo de fabricação, material de embalagem e acondicionamento adequados.

Dentre os estudos que utilizaram os resultados da degradação forçada para o desenvolvimento de formulação do produto final pode-se citar o fármaco VX-497 que sofre hidrólise em presença de umidade e do polietilenoglicol (excipiente da

formulação). O trabalho cita a importância da integração das áreas analítica, de processo e de formulação na compreensão do mecanismo de degradação, onde a redução da degradação foi determinada pelo controle da temperatura no processo de fabricação e na utilização de um fármaco mais puro (KOCHLING et al., 2007).

As informações obtidas nos estudos de degradação forçada podem caracterizar as substâncias, classificando-as em termolábeis, hidrolisáveis, fotoinstáveis e oxidáveis em vários níveis, ou seja, muito ou levemente suscetíveis em uma ou mais condições. Por outro lado, é também possível encontrar substâncias estáveis em todas as condições de estresse (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2007).

A partir das informações obtidas no estudo de degradação forçada, será mais fácil proteger o fármaco, quando necessário, escolhendo excipientes, processos de fabricação e material de embalagem mais adequados para cada caso (PANDEY; RATH; DWIVEDI, 2011).

Para as substâncias ativas que sofrem degradação com temperaturas elevadas, por exemplo, os cuidados de armazenamento do fármaco e do produto acabado devem criteriosamente selecionados. O processo de fabricação do medicamento não deve incluir aquecimento (KOCHLING et al., 2007).

No caso de fármacos que sofrem hidrólise em solução ácida, deve ser avaliado o impacto na administração do medicamento como a mudança de pH no trato gastro-intestinal. Por outro lado, a hidrólise do fármaco em comprimidos, pode ser evitada pela utilização de um revestimento adequado à base de derivados de celulose, polimetacrilatos, álcool polivinílico, etc. (PORTER; SACKETT; LIU, 2009) ou ainda, pela utilização de embalagens impermeáveis ou pouco permeáveis ou, adicionalmente, utilizar dessecadores como as sílicas. Para formas farmacêuticas líquidas pode-se recorrer aos solventes alternativos em substituição à água como o propilenoglicol, glicerina, etanol, entre outros.

Para fármacos fotossensíveis, deve-se procurar embalagens primárias, quando possível, que protejam a substância ativa e o produto acabado da luz, como embalagens opacas e âmbar. Para os comprimidos, recorrer novamente ao filme

de revestimento e blisteres preferencialmente de alumínio (MERRIFIELD et. al., 2004).

Substâncias ativas que sofrem degradação oxidativa, podem ser adequadamente protegidas pela utilização de antioxidantes, que reagem antes do fármaco, poupando assim, o composto ativo. Como exemplos pode-se citar o bissulfito de sódio, o butilidroxianisol, o ácido ascórbico, entre outros. Nos casos extremos, deve-se substituir o ambiente dentro da embalagem por gás inerte e utilizar embalagens adequadas com baixa permeação de gases (ALSANTE et al., 2007).

1.2. Recomendações sobre a condução dos estudos de degradação forçada

Para o início dos estudos de degradação forçada recomenda-se tentar prever os possíveis produtos de degradação da substância, para direcionar as condições dos testes, através dos grupos funcionais do composto de partida utilizando os conhecimentos em química orgânica ou com auxílio de programas de computador especializados (REYNOLDS et al., 2002; PREKODRAVAC; DAMM; KAPPE, 2011). Um levantamento de informações como solubilidade, pK(s), instabilidade química conhecida, enantiômeros, higroscopicidade entre outras, são muito importantes, pois, pode auxiliar na escolha do método analítico (BAERTSCHI, 2005).

Um exemplo da utilização do conhecimento sobre os grupos funcionais das moléculas para a condução dos estudos de degradação forçada é o estudo sobre a oxidação nucleofílica/eletrofílica do raloxifeno em uma extensa faixa de pH. O mecanismo de oxidação e os possíveis produtos formados foram investigados utilizando um software e um método analítico utilizando CLAE com detector de arranjos diodo acoplado a espectrômetro de massa. Através destes recursos, foi possível compreender o mecanismo de oxidação e assim, utilizar os estudos de degradação forçada juntamente com excipientes da formulação, concluindo-se então, que uma das soluções para que o fármaco se mantenha estável é manter o ambiente do fármaco em pH ácido, como por exemplo, utilizar o ácido cítrico no processo de granulação úmida (FREED et al., 2008).

Aconselha-se conduzir os estudos de degradação forçada até que 5 a 20 % do fármaco sejam degradados, quando for possível, pois, os produtos de degradação gerados podem reagir e produzir compostos secundários. Deve-se utilizar uma amostra controle (sem degradação) para avaliação dos resultados (REYNOLDS et al, 2002).

Na Tabela 1.1 são compilados guias, artigos e outras obras nas quais existem recomendações sobre a condução de estudos de degradação forçada e o que se verifica é a falta de um padrão nos procedimentos (REYNOLDS et al, 2002; SEHRAWAT; MAITHANI; SINGH, 2010).

Tabela 1.1. Recomendações para a condução de estudos de degradação forçada

Tipo de degradação	Referência	Recomendações
Térmica	ICH - Q1A(R2)	Incrementar 10°C acima do estudo de estabilidade acelerado
	ALSANTE et al., 2007	Sólido: 50°C ou mais e umidade maior que 75%. Utilizar cinética de Arrhenius para determinar a temperatura e duração adequadas para a substância
	REYNOLDS et al., 2002	Sólido: Verificar a energia de ativação necessária para conduzir um estudo com incrementos de temperatura que represente um ensaio relativo ao estudo acelerado
	BAERTSCHI, 2005	Sólido: Expor à 70°C durante uma semana, pode-se utilizar umidade relativa de 75% Solução aquosa: Acima de 70°C durante 1 à 7 dias.
	SEHRAWAT; MAITHANI; SINGH, 2010	70°C e umidade 75% por mais de 2 semanas

Tipo de degradação	Referência	Recomendações
Fotolítica	ICH - Q1B	<p>Amostras devem ser expostas à luz totalizando não menos que 1,2 milhões de lux h e uma energia ultravioleta integrada de 200 watt h m⁻². Devem ser expostas lado a lado utilizando uma amostra controle (coberta com folha de alumínio)</p> <p>Realizar o teste apenas com o composto em solução simples ou suspensão.</p> <p>Utilizar recipientes inertes e transparentes. Para desenvolvimento e validação, limitar a exposição caso haja extensiva decomposição. Para substâncias fotoestáveis, pode-se conduzir estudos além do recomendado.</p>
	ALSANTE et al., 2007	<p>Utilizar guia ICH. Para estudos de degradação forçada utilizar 2 vezes o recomendado pelo guia. Para estudos em solução, a acetonitrila é o solvente de escolha.</p>
	BAERTSCHI, 2005	<p>Expor as amostras sólida e aquosa 2 a 3 vezes mais do que o recomendado pelo ICH.</p>
Hidrólise ácida	ICH - Q1A(R2)	<p>Hidrólise em solução ou suspensão em uma larga faixa de pH</p>
	ALSANTE et al., 2007	<p>Utilizar solução de HCl ou H₂SO₄ em concentração 0,1 à 1,0 M. Pode ser conduzido em solução ou suspensão. Para solubilização da substância, pode-se utilizar co-solventes apropriados ou ajustar o pH.</p>
	BAERTSCHI, 2005	<p>Utilizar solução de HCl 0,1 N acima de 70 °C durante 1 à 7 dias.</p>
	SEHRAWAT; MAITHANI; SINGH, 2010	<p>Solução do fármaco de 1 mg L⁻¹ em HCl 0,1 M a 1 M em temperatura ambiente ou maior.</p>
Hidrólise alcalina	ICH - Q1A(R2)	<p>Hidrólise em solução ou suspensão em uma larga faixa de pH</p>
	ALSANTE et al., 2007	<p>Utilizar solução de NaOH, LiOH ou KOH em concentração 0,1 à 1,0 M. Pode ser conduzido em solução ou suspensão. Para solubilização da substância, pode-se utilizar co-solventes apropriados ou ajustar o pH.</p>
	BAERTSCHI, 2005	<p>Utilizar solução de NaOH 0,1 N e outra de pH 8,0 acima de 70 °C durante 1 à 7 dias.</p>
	SEHRAWAT; MAITHANI; SINGH, 2010	<p>Solução do fármaco de 1 mg L⁻¹ em NaOH 0,1 M a 1 M em temperatura ambiente ou maior.</p>

Tipo de degradação	Referência	Recomendações
Oxidativa	ICH - Q1A(R2)	Apenas cita que quando apropriado, deve-se incluir o efeito da oxidação, no entanto, sem citar como conduzi-lo.
	ALSANTE et al., 2007	Pode ser conduzido em atmosfera de O ₂ ou na presença de peróxidos. Recomenda-se fortemente a utilização de iniciadores de radicais livres. Utilizar solução da substância em solvente adequado + 5 a 20% do iniciador de radical livre em pressão atmosférica. Pode-se aumentar a pressão atmosférica do teste com O ₂ e aumentar a temperatura do sistema para estressar ainda mais a substância.
		Para sólidos utilizar uma comparação de ambiente de argônio versus ambiente de oxigênio em seu espaço vazio dentro de um recipiente fechado.
	BAERTSCHI, 2005	Utilizar solução de 0,3% de H ₂ O ₂ em temperatura ambiente no escuro durante 1 a 7 dias
	SEHRAWAT; MAITHANI; SINGH, 2010	O ₂ + agente iniciador em acetonitrila:água 80:20 (v/v) a 40°C por 1 a 7 dias 0,3% a 3% de H ₂ O ₂ a temperatura ambiente por algumas horas até 7 dias protegido da luz

1.3. Avaliação dos produtos gerados pela degradação forçada

Para todos os produtos de degradação que se apresente em quantidades significativas, recomenda-se a identificação, isolamento e caracterização físico-química, se possível. Uma diretriz que pode auxiliar na classificação das impurezas encontradas é o guia Q3A do ICH (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2006a), onde recomenda-se que a impureza deve ser apenas relatada, identificada ou qualificada dependendo da porcentagem encontrada e da dose diária do fármaco a ser ingerida pelo paciente (Tabela 1.2).

Não é necessário examinar especificamente um produto de degradação que não é formado durante o estudo de estabilidade acelerado e longa duração do medicamento (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2006b)

Tabela 1.2. Recomendação do guia Q3A(R2) sobre o registro das impurezas encontradas no fármaco

Dose diária máxima	Relatar	Identificar	Qualificar
$\leq 2\text{g/dia}$	0,05%	0,1% ou 1,0 mg ingerido/dia (o que for menor)	0,15% ou 1,0 mg ingerido/dia (o que for menor)
$> 2\text{g/dia}$	0,03%	0,05%	0,05%

Outro aspecto importante é demonstrar o mecanismo e a cinética de formação de cada produto de degradação, quando for possível, pois, sabe-se da complexidade da investigação de certas reações, como por exemplo, as autooxidações (REYNOLDS et al, 2002).

Para a avaliação dos produtos de degradação pode-se utilizar o cálculo do balanço de massa, que nada mais é que quantificar os picos de degradação e então comparar com a perda da quantidade de amostra do composto original. O balanço de massa é aceito quando totalizar aproximadamente 100%, ou seja, a diminuição da potência do composto original é convertida em produto de degradação quantificável (LUKULAY; HOKANSON, 2005).

É preciso entender que os estudos de degradação forçada mostram indícios do que pode ocorrer com a substância, e assim, destaca-se novamente a importância da extensão dos ensaios para que a condição de estresse escolhida não force demais a decomposição do fármaco em estudo, desviando o foco da preocupação e investigando certos produtos de degradação sem necessidade (BAERTSCHI, 2005).

1.4. Publicações sobre os estudos de degradação forçada

Um levantamento bibliográfico realizado na base de dados *SCOPUS*[®] (*Elsevier B.V.*) com o termo “forced degradation” no título ou no resumo dos artigos científicos publicados no período de 2008-2011, revelou um total de 255 textos, que foram divididos em 4 grupos, conforme descrito na Tabela 1.3.

Tabela 1.3. Trabalhos publicados no período de 2008-2011 relativos a estudos de degradação forçada

Propósito	2008	2009	2010	2011
Validação de metodologias analíticas	63,8%	71,7%	77,9%	75,9%
Elucidação de impurezas	25,5%	24,5%	17,6%	20,7%
Formulação	8,5%	3,8%	4,4%	2,3%
Outros	2,1%	0,0%	0,0%	1,1%
Total	47	53	68	87

Diante de tais resultados, é possível observar que a grande maioria dos estudos refere-se à validação de metodologias analíticas na presença de produtos de degradação de fármaco e, por outro lado, pouco se produz com vistas à formulação de medicamentos.

É óbvio supor que os dados obtidos em estudos de validação de metodologias analíticas podem ser utilizados, também, para a formulação, entretanto, não há uma diretriz clara nesta direção. Em outras palavras, há uma grande lacuna a ser preenchida neste sentido.

Alguns trabalhos encontrados durante o levantamento sobre a literatura de estudos que utilizaram a degradação forçada de fármacos estão exemplificados na Tabela 1.4. e percebe-se uma variedade de procedimentos adotados para a condução destes estudos. Como citado anteriormente, não há um protocolo definido para a execução destes testes e assim, constata-se a diversidade de procedimentos adotados. Por exemplo, para a condição do estudo em meio ácido, apesar de todos os trabalhos utilizarem solução de ácido clorídrico, sua concentração varia de 0,1 M a 1,0 M com e sem aquecimento durante um período de exposição de 30 minutos até 90 horas.

É interessante notar que sem um protocolo, é possível encontrar diferenças na condução dos estudos de degradação forçada para um mesmo fármaco, como por exemplo, o carvedilol. Em um dos trabalhos, a avaliação do meio ácido foi realizada em solução aquosa de HCl 1,0 N (solubilização do composto na solução ácida obtendo concentração final de 1 mg mL^{-1}), sob refluxo a 90°C durante 6 h (LANZANOVA et al., 2009) e em outro estudo o carvedilol foi submetido à mesma avaliação em solução metanólica de HCl 1,0 M (15 mL de solução metanólica estoque de concentração de 1 mg mL^{-1} adicionada à 15 mL de solução de HCl 1,0M), porém, sob refluxo a 70°C durante 2 h (RIZMAN et al., 2009).

Para o primeiro trabalho o fármaco foi considerado estável sem degradação significativa e para o segundo, o carvedilol sofreu de 40 a 47% de degradação nas condições citadas. As diferenças dos testes estão na concentração do fármaco durante o estudo, 1 mg mL^{-1} e $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, na solução ácida, 1,0 N e 0,5 M, para o primeiro e segundo caso, respectivamente, e na presença de metanol para o segundo exemplo. As condições dos estudos são semelhantes, porém, houve degradação do carvedilol no segundo caso. Assim, conclui-se que a presença do metanol favoreceu a degradação do carvedilol em meio ácido.

Há recomendações para que não sejam utilizados alcoóis em estudos de degradação forçada nas condições ácidas, devido à sua reatividade e da natureza alcalina destes compostos (ALSANTE et al., 2007). Assim, o estudo com o carvedilol em meio metanólico citado anteriormente pode ser facilmente questionado.

O uso de solventes nos estudos de estresse pode trazer uma grande alteração na proporção dos produtos de degradação do cumeno provenientes das reações oxidativas com a utilização do metanol comparado com meio sem o solvente. Isto se deve ao fato do metanol possuir uma avidez pelo átomo de hidrogênio atraindo o radical alcóxi que participaria da reação de oxidação do fármaco, diminuindo assim, drasticamente a velocidade de degradação (NELSON et al., 2009).

Há diferenças também relacionadas aos estudos de fotodegradação quando se trata de fontes de luz. Nesse sentido, um estudo aprofundado sobre a fotólise da banidipina constatou comportamento diferente sob irradiação natural e forçada. Quando o composto era submetido à irradiação forçada seguindo as diretrizes do ICH surgiam muitos subprodutos detectados pelo método CLAE. Por outro lado, quando a barnidipina era exposta à luz solar, a maior impureza formada era o derivado de piridina estando em conformidade com os compostos similares a ele (IOELE et al., 2010).

TABELA 1.4 – Exemplos de estudos de degradação forçada para diferentes fármacos, publicados no período de 2003-2012.

Fármaco	Referência	Objetivo do estudo de degradação forçada	Condição do estudo de degradação forçada	Procedimento
Carvedilol	LANZANOVA et al., 2009	Avaliar a segurança, qualidade e eficácia do medicamento através do aparecimento de impurezas e produtos de degradação	Hidrólise ácida	1,0 N HCl sob refluxo a 90 °C (6 horas)
			Hidrólise alcalina	1,0 N NaOH sob refluxo a 90 °C (6 horas)
			Hidrólise neutra	água sob refluxo a 90 °C (6 horas)
			Degradação oxidativa	7,5% H ₂ O ₂ protegido da luz à temperatura ambiente (com o sólido e em solução metanólica)
Maleato de enalapril	BHARDWAJ; SINGH, 2008	Identificar novos produtos de degradação e traçar as vias de degradação do fármaco	Hidrólise ácida	0,1 N HCl a 80 °C
			Hidrólise alcalina	0,1 N NaOH a 80 °C
			Hidrólise neutra	água a 80 °C
			Degradação oxidativa	2mg/mL em 3% e 30% H ₂ O ₂ por 8 dias a temperatura ambiente
			Degradação térmica	sólido a 50 °C por 60 dias
			Degradação fotolítica	1,25 x 10 ⁶ lux h e 210 W h m ⁻²
Anastrozol	SARAVANAN et al., 2007	Desenvolver metodologia analítica indicadora de estabilidade para doseamento do anastrozol e descrever o comportamento químico do fármaco	Luz UV (254 nm)	não descrito
			Degradação térmica	60 °C
			Hidrólise ácida	0,5 N HCl
			Hidrólise alcalina	0,5 N NaOH
			Degradação oxidativa	H ₂ O ₂ a 10%

Fármaco	Referência	Objetivo do estudo de degradação forçada	Condição do estudo de degradação forçada	Procedimento
Aripiprazol	SRINIVAS et al., 2008	Estudar as impurezas do fármaco e validar metodologia analítica por CLAE	Luz UV (254 nm)	exposição durante 24 horas
			Degradação térmica	105°C durante 24 horas
			Hidrólise ácida	1,0 N HCl a 60°C durante 48 horas
			Hidrólise alcalina	0,5 N NaOH durante 48 horas
			Degradação oxidativa	H ₂ O ₂ (solução a 3%) a 60°C durante 2 horas
Famciclovir	RAJU; PANDA; RAO, 2008	Validar metodologia analítica por CLAE	Luz	10.000 lux por 120 horas a 92% UR a 25°C
			Degradação térmica	105°C durante 120 horas
			Hidrólise ácida	adição de 1,0 mL da solução de 1,0 M HCl e mantido a 25°C por 30 minutos
			Hidrólise alcalina	adição de 1,0 mL da solução de 0,1 M NaOH e mantido a 25°C
			Degradação oxidativa	H ₂ O ₂ (solução a 10%) a 80°C durante 2 minutos
Gliclazida	BANSAL; SINGH; JINDAL, 2007	Desenvolver metodologia analítica CLAE-UV	Luz	Exposição de uma camada fina do fármaco sólido em placa de vidro, fármaco em solução a 0,01 N HCl, em água e em solução 0,1 N de NaOH à luz em uma câmara de fotoestabilidade por 6 semanas (1,2 milhões de lux.h)
			Degradação térmica	50°C durante 31 dias (selado em recipiente de vidro de borossilicato)
			Hidrólise ácida	0,1 N HCl à 85°C e a temperatura ambiente por mais de 72 horas
			Hidrólise alcalina	0,1 N NaOH à 85°C e a temperatura ambiente por mais de 72 horas
			Hidrólise neutra	água à 85°C e a temperatura ambiente por mais de 72 horas
			Degradação oxidativa	H ₂ O ₂ (solução a 3%) à temperatura ambiente por mais de 72 horas

Fármaco	Referência	Objetivo do estudo de degradação forçada	Condição do estudo de degradação forçada	Procedimento
Eletriptan	JOCIĆ et al., 2009	Tentar elucidar a via de degradação do fármaco e desenvolver um método adequado por CLAE	Luz	exposição à luz solar durante 2 dias do fármaco na forma sólida em placa de petri e solução (1 mL da solução padrão)
			Degradação térmica	75°C por 48 horas
			Hidrólise ácida	1 mL da solução padrão + 1 mL solução 0,1 M HCl
				1 mL da solução padrão + 1 mL solução 0,5 M HCl
Prazosina, Terazosina e Doxazosina	OJHA et al., 2003	Comparar a natureza e a velocidade de degradação entre os três fármacos e propor uma explicação mecanística da variação do comportamento da decomposição	Luz	1 mL da solução padrão + 1 mL solução 1,0 M HCl
				As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 8 horas e este procedimento foi repetido à 75°C por 30 minutos
			Luz	em solução
				0,1 M HCl por 30 dias
				0,1 M NaOH por 30 dias
				em água por 30 dias
				estado sólido
				em fina camada sobre uma placa de Petri por 3 semanas
			Degradação térmica	no estado sólido
			Hidrólise ácida	à 50°C (calor seco) por 30 dias
				à 40°C / 75% UR por 3 meses
			Hidrólise alcalina	0,1 M HCl à 80°C por 90 h
			Condição neutra	0,1 M NaOH à 80°C por 3 horas
			Degradação oxidativa	água em aquecimento à 80°C por 240 h
				solução 3% H ₂ O ₂ por 24 horas
				solução 30% H ₂ O ₂ por 48 horas

Fármaco	Referência	Objetivo do estudo de degradação forçada	Condição do estudo de degradação forçada	Procedimento
Bisulfato de clopidogrel	RAO et al., 2010	Validar um método de cromatografia líquida em fase normal indicador de estabilidade do fármaco na presença de impurezas e produtos de degradação	Luz	Comprimidos: exposição à luz UV (254 nm) por 10 dias
			Degradação térmica	Comprimidos: 60°C por 10 dias
			Hidrólise ácida	0,5 N HCl por 24 h
			Hidrólise alcalina	0,5 N NaOH por 24 h
			Degradação oxidativa	3,0% H ₂ O ₂ por 24 h
Sulfato de abacavir	RAO et al., 2011	Estudar o comportamento de degradação sob diversas condições de estresse	Luz	320 nm por 60 h
			Degradação térmica	Estado sólido: 100°C por 10 dias
			Hidrólise ácida	1,0 N HCl sob refluxo à 80°C por 24 h
			Hidrólise alcalina	1,0 N NaOH sob refluxo à 80°C por 48 h
			Hidrólise neutra	H ₂ O sob refluxo à 80°C por 72 h
			Degradação oxidativa	3% e 6% H ₂ O ₂ por 7 dias
Fentanila	GARG et al., 2010	Identificar e caracterizar os produtos de degradação e estudar as condições que favorecem seu aparecimento	Degradação térmica	No estado sólido a 350°C por 5 min
			Degradação oxidativa	0,3% de H ₂ O ₂ por 24h
			Hidrólise ácida	HCl 5,0 N a 70°C por 24h
			Hidrólise alcalina	NaOH 5,0 N a 70°C por 24h
			Luz	Luz UV a 365 nm e luz branca em condições ambientes por 1 semana

Fármaco	Referência	Objetivo do estudo de degradação forçada	Condição do estudo de degradação forçada	Procedimento
Tiocolchicosídeo	DEL GROSSO; APRILE; GROSÀ, 2012	Caracterizar os produtos de degradação	Hidrólise ácida	0,5N HCl à 70 °C por 48h
			Hidrólise alcalina	0,05N NaOH à 50 °C por 24h
			Degradação oxidativa	0,075% H ₂ O ₂ à temperatura ambiente por 2 h 60 mM 1,1-azobis(ciclohexano-carbonitrila) à temperatura ambiente por 72h 1,5 mM de FeCl ₃ ou 1,5 mM CuSO ₄ à temperatura ambiente por 72h
			Luz	Solução do ativo em luz UV (254 nm) por 30 min Solução do ativo à luz solar (1.400 W/m ²) por 1 mês
Pró-fármaco benzilpenicilina	JAIN; WU; TUCKER, 2009	Estudar o comportamento químico do pró-fármaco sob diversas condições de estresse e validar o método analítico	Hidrólise ácida	1 mM e 10 mM HCl por 22 h a 25°C
			Hidrólise alcalina	0,1 mM e 1 mM NaOH por 22 h a 25°C 10 mM NaOH por 2 h a 25°C
			Degradação oxidativa	0,3% de H ₂ O ₂ por 2 h a 25°C 3% de H ₂ O ₂ por 1 h a 25°C

1.5. Sugestão para condução de estudos de degradação forçada durante a pré-formulação

Tendo em vista todo o levantamento realizado, foi possível sugerir condições para iniciar um estudo de degradação (Tabela 1.5) como parte da pré-formulação. Recomenda-se utilizar apenas água e retirar alíquotas durante o tempo de exposição para que seja alcançada a porcentagem de 5-20% de degradação. Se não houver degradação, pode-se incrementá-lo com temperatura (utilização de sistema de refluxo).

Tabela 1.5. Recomendações para a realização de estudo de degradação forçada

Degradação	Recomendações
Temperatura	Sólido: Expor à 70 °C durante uma semana. Solução aquosa: Acima de 80 °C durante 6 horas.
Fotoestabilidade	Utilizar guia ICH (Q1B)
Hidrólise ácida	Utilizar solução de HCl 0,1 N durante 1 a 7 dias
Hidrólise alcalina	Utilizar solução de NaOH 0,1 N durante 1 a 7 dias
Oxidação	Utilizar solução de 3% de H ₂ O ₂ durante 1 a 7 dias

A recomendação proposta visa simplificar o início do estudo sendo o ajuste do teste feito de acordo com o comportamento do fármaco. Se o fármaco sofrer grande degradação (5 a 20%) em meio alcalino, por exemplo, uma alíquota retirada com 3 horas de exposição já indicará queda de teor significativa, não sendo necessária a extensão do teste por um tempo maior, pois, a resposta para a suscetibilidade à esta condição já terá sido encontrada.

1.6. Conclusão

Diante da ausência de guias para condução dos estudos de degradação forçada (com exceção dos estudos de fotodegradação) o que se ratifica é o cuidado que se deve ter diante da execução destes ensaios de grande importância para a pré-formulação. O panorama para estes ensaios mostra que as publicações são em grande parte referentes à validações de metodologia analítica na presença de produtos de degradação e, minoritariamente, voltados à formulação de medicamentos. Desta forma, foram sugeridos condições nas quais tais estudos podem ser conduzidos, de modo a facilitar o planejamento e a execução destes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, L.V. Desenvolvimento de formas farmacêuticas: Considerações farmacêuticas e de formulação. In: _____. *Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. São Paulo: Premier, 2007. cap. 4, p.111-158.

ALSANTE, M.K.; ANDO, A.; BROWN, R.; ENSING, J.; HATAJIK, T.D.; KONG, W.; TSUDA, Y. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, p.29-37, 2007.

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

BHARDWAJ, S.P.; SINGH, S. Study of forced degradation behavior of enalapril maleate by LC and LC-MS and development of validated stability-indicating assay method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.46, p.113-120, 2008.

BAERTSCHI, S. W. *Pharmaceutical Stress Testing*. Indianapolis: Informa Healthcare, 2005. 469 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA. Resolução RE n. 899, de 29 de Maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos., *Diário Oficial da União*, Brasília, 02/06/2003.

DEL GROSSO, E.; APRILE, S.; GROSSA, G. Forced degradation study of thiocolchicoside: Characterization of its degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 61, p.215-223, 2012.

FREED, A.L.; STROHMEYER, H.E.; MAHJOUR, M.; SADINENI, V.; REID, D.L.; KINGSMILL, C.A., pH control of nucleophilic/electrophilic oxidation. *International Journal of Pharmaceutics*, 357, p. 180-188, 2008.

GARG, A.; SOLAS, D.W.; TAKAHASHI, L.H.; CASSELLA, J.V. Forced degradation of Fentanyl: Identification and analysis of impurities and degradants. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 53, p.325-334, 2010

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. ICH Harmonised Tripartite Guideline. *Q1A(R2) stability testing of New drug substances and products*, 2003. Disponível em: <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>. Acesso em: 15 Maio 2012.

_____. ICH Harmonised Tripartite Guideline. *Q3A(R2) Impurities in new drug substances*, 2006a. Disponível em: <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>. Acesso em: 15 Maio 2012.

_____. ICH Harmonised Tripartite Guideline. *Q3B(R2) Impurities in new drug products*, 2006b. Disponível em: <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>. Acesso em: 15 Maio 2012.

_____. ICH Harmonised Tripartite Guideline. *Q1B Stability testing: Photostability testing of new drug substances and products*, 1996. Disponível em: <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>. Acesso em: 30 Maio 2010.

IOELE, G.; OLIVERIO, F.; ANDREU, I.; DE LUCA, M.; MIRANDA, M.A.; RAGNO, G. Different photodegradation behavior of barnidine under natural and forced irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. n.215, p.205-213, 2010

JOCIĆ, B.; ZEČEVIĆ, M.; ŽIVANOVIĆ, L.; PROTIĆ, A.; JADRANIN, M.; VAJS, V. Study of forced degradation behavior of eletriptan hydrobromide by LC and LC–MS and development of stability-indicating method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v.50, p.622-629, 2009.

JAIN, R.; WU, Z.; TUCKER, I.G. A stability-indicating HPLC assay with diode array detection for the determination of a benzylpenicillin prodrug in aqueous solutions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v. 50, p.841-846, 2009

KAZAKEVICH, Y.; LoBRUTTO, R. *HPLC for pharmaceutical scientists*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2007. p. 491-502.

KOCHLING, J. D.; MIAO, H.; YOUNG, C. R.; LOOKER, A. R.; SHANNON, M.; MONTGOMERY, E. R. Understanding the degradation pathway of a poorly water-soluble drug formulated in PEG-400. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 43, p.1638-1646, 2007.

LANZANOVA, F.A.; ARGENTA, D.; AREND, M.Z.; BRUM JUNIOR, L.; CARDOSO, S.G. LC and LC-MS evaluation of stress degradation behavior of carvedilol. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. v.32, p.526-523, 2009.

LUKULAY, P.; HOKANSON, G. Reconciling mass balance in forced degradation studies. *Pharmaceutical Technology*, v.29, n.10, p.106-112, 2005.

MERRIFIELD, D.R.; CARTER, P.L.; CLAPHAM, D.; SANDERSON, F.D. Addressing the problem of light instability during formulation development. In: TØNNESSEN, H.H. *Photostability of Drugs and Drug Formulations*, 2 ed. Florida: CRC Press, 2004. Cap. 13, p. 285-301.

NELSON, E.D.; THOMPSON, G.M.; YAO, Y.; FLANAGAN, H.M.; HARMON, P.A. Solvent effects on the AIBN forced degradation of cumene: Implications for forced degradation practices. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 98, n. 3, p.959-969, 2009

OJHA, T.; BAKSHI, M.; CHAKRABORTI, A. K.; SINGH, S. The ICH guidance in practice: stress decomposition studies on three piperaziny quinazoline adrenergic

receptor-blocking agents and comparison of their degradation behavior. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v.31, p.775-783, 2003.

PANDEY, A.; RATH, B.; DWIVEDI, A.K. Pharmaceutical preformulation studies with special emphasis on excipients compatibility. *International Journal of Pharmacy and Technology*, v.3 (2), p. 1029-1048, 2011

PORTER, S.; SACKETT, G.; LIU, L. Development, optimization, and scale-up of process parameters: pan coating. In: QIU, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, G.G.Z. *Developing solid oral dosage forms*. Burlington: Academic Press, 2009. Cap. 33, p. 761-806

PREKODRAVAC, B.; DAMM, M.; KAPPE, C.O. Microwave-assited forced degradation using high-throughput microtiter platforms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v. 56, p.867-873, 2011

RAJU, C.B.V.N.; PANDA, G.; RAO, G.N. Stability indicating LC assay method for the determination of famciclovir in bulk drug and pharmaceutical dosage forms. *Chromatographia*, v.68, p.837-841, 2008.

RAO, D.D.; KALYANARAMAN, L.; SAIT, S.S.; RAO, P.V. A validated stability-indicating normal phase LC method for clopidogrel bisulfate and its impurities in bulk drug and pharmaceutical dosage form. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.52, p.160–165, 2010.

RAO, R.N.; VALI, R.M.; RAMACHANDRA, B.; RAJU, S.S. Separation and characterization of forced degradation of abacavir sulphate by LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.54 (2), p.279–285, 2011.

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

RIZMAN, M.; AQIL, M.; AZEEM, A.; SULTANA, Y.; TALEGAONKAR, S.; ALI, A. Study of the degradation kinetics of carvedilol by use of a validated stability-indicating LC method. *Chromatographia*, 70, p.1283-1286, 2009.

SANGOI, M.S.; TODESCHINI, V.; STEPPE, M. Fesoterodine stress degradation behavior by liquid chromatography coupled to ultraviolet detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Talanta*. V.84, n.4, p. 1068-1079, 2011

SARAVANAN, G.; SRYANARAYANA, M.V.; JADHAV, M.J.; SOMESWARARAO, N.; ACHARYULU, P.V.R. A stress stability behavior and development of an LC assay method for anastrozole. *Chromatographia*, v.66, p.435-438, 2007.

SEHRAWAT,R.; MAITHANI,M.; SINGH,R. Regulatory aspects in development of stability-indicating methods: a review. *Chromatographia*. v. 72, p.1-6, 2010

SRINIVAS, K.S.V.; BUCHIREDDY, R.; MADHUSUDHAN, G.; MUKKANTI, K.; SRINIVASULU, P. Stress degradation studies on aripiprazole and development of a validated stability indicating LC method. *Chromatographia*, v.68, p.635-640, 2008.

.

CAPÍTULO 2

**Avaliação da estabilidade química de complexos benznidazol-
betaciclodextrinas através de estudos de degradação forçada**

2.1. Introdução

A doença de Chagas ainda está presente em alguns países (principalmente na América Latina), e estes sofrem com a falta de interesse por parte das indústrias farmacêuticas na produção de medicamentos para o tratamento desta doença, considerados como “medicamentos sociais”, de reduzida demanda e destinado, em geral, à população de baixa renda e, portanto, com pequena margem de lucro (COURA, 2007).

Apesar de suas limitações, como a alta toxicidade e a baixa solubilidade, o benznidazol (BNZ) quimicamente 2-Nitro-N-(fenilmetil)-1H-imidazol-1-acetamida é o fármaco de escolha para o tratamento da doença de Chagas (COURA, 2007; DOCAMPO, 2001), cuja molécula é apresentada na Figura 2.1 com destaque para os seus grupos funcionais. Apresenta peso molecular de $260,25 \text{ g mol}^{-1}$, é um pó cristalino, levemente amarelado, inodoro, insípido e estável ao ar. É pouco solúvel em água, muito solúvel em dimetilsulfóxido, hexano, ligeiramente solúvel em etanol, metanol, acetato de etila e diclorometano. A faixa de fusão é de 188°C a 190°C . O pH da suspensão de 26 mg mL^{-1} é de 5,5 (FARMACOPÉIA Brasileira, 2003).

Figura 2.1. Estrutura molecular do BNZ. Em destaque os grupos funcionais.

Por outro lado, as ciclodextrinas (CD) têm sido utilizadas para buscar uma melhor solubilidade de fármacos poucos solúveis, aumentar a estabilidade, reduzir o gosto amargo de algumas substâncias, amenizar a irritação de tecidos e melhorar a biodisponibilidade. A ligação com as ciclodextrinas pode diminuir a reatividade da molécula complexada por protegê-la em seu interior, evitando assim, ataques do

meio externo, gerando por consequência, um aumento da sua estabilidade química (MIRANDA et al., 2011; CUNHA FILHO; SÁ BARRETO, 2007; CARRIER; MILLER; AHMED, 2007; LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007; BAERTCHI, 2005).

No trabalho de MIRANDA (2008), diferentes tipos de complexos de inclusão BNZ-CD foram estudados, concluindo-se que os complexos benznidazol-betaciclodextrina (BNZ- β CD) e benznidazol- β ciclodextrina-copovidona (BNZ- β CD-CP) foram os que obtiveram melhores resultados de solubilidade, que passou de 0,2 mg mL⁻¹, alcançando 0,8 mg mL⁻¹ e 0,9 mg mL⁻¹ para os complexos BNZ- β CD e BNZ- β CD-CP, respectivamente.

Complexos de inclusão utilizando CD (naturais e modificadas) foram também capazes de aumentar a solubilidade e a velocidade de dissolução do BNZ, sendo os melhores resultados atribuídos aos complexos com β CD metilada randomicamente e o sulfobutil éter β CD (SOARES SOBRINHO et al., 2011).

É importante considerar ainda que o estudo de degradação forçada é uma ferramenta útil para se conhecer uma substância, quando há poucas informações disponíveis sobre os produtos de degradação e para se conhecer possíveis vias de degradação do fármaco durante o tempo de prateleira. Este tipo de estudo também auxilia no desenvolvimento farmacêutico, processo de fabricação e material de embalagem do produto final visando a estabilidade da substância ativa (REYNOLDS et al, 2002; ALSANTE et al, 2007). O teste de estresse deve incluir o efeito da temperatura, umidade, oxidação, fotólise e outros testes pertinentes de acordo com a molécula em estudo (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2003).

Assim, diante da constatação do efeito positivo das CDs sobre a solubilidade do BNZ (MIRANDA, 2008; SOARES SOBRINHO et al., 2011; LIMA, 2008) este estudo tem como objetivo complementar e aprofundar este conhecimento, avaliando o comportamento químico do fármaco e seus complexos em diferentes condições de estresse, através de estudos de degradação forçada e verificar, então, se, além do aumento da solubilidade citada, também há ganho na estabilidade química da molécula.

2.2. Materiais e Métodos

2.2.1. Matérias-primas e reagentes

O BNZ (pureza de 99,33%) foi doado gentilmente por Roche Produtos Químicos e Farmacêuticos SA. Os reagentes utilizados nestes estudos foram: hidróxido de sódio, ácido clorídrico, peróxido de hidrogênio grau analítico, β CD Roquete Pharma[®] (França), copovidona (Kollidon VA64) cortesia de BASF[®] (EUA), acetonitrila grau CLAE, água ultrapurificada obtido pelo sistema de purificação Milli-Q Millipore[®].

2.2.2. Sistema Cromatográfico

Um método analítico foi desenvolvido em cromatógrafo líquido de alta eficiência Merck Hitachi LaChrom Elite[®] (Alemanha) equipado com uma bomba quaternária L-2130, injetor automático L-2200, forno para coluna L-2300, detector UV L-2400 e outro equipamento similar com detector de arranjos diodo (DAD) L-2455. Os parâmetros estabelecidos para as análises foram: coluna Purosphere STAR[®] RP18e, 250 x 4,6 mm, partícula 5 μ m, fase móvel composto por acetonitrila (ACN) e água na razão de 30:70 (v/v), fluxo 0,5 mL min⁻¹ a 25°C, comprimento de onda em 324 nm e volume de injeção de 20 μ L.

2.2.2.1. Validação do método analítico

O método cromatográfico foi validado quanto a linearidade, seletividade, precisão e saturação de filtro.

A linearidade foi avaliada através do coeficiente de correlação da curva analítica a partir de soluções de BNZ de concentração de 5, 20, 50, 80, 120 e 150 μ g mL⁻¹ em acetonitrila:água 50:50 (v/v), preparados em duplicata, a partir de duas soluções estoque de concentração 1 mg mL⁻¹. Cada ponto foi injetado em duplicata.

A seletividade foi avaliada com as amostras dos estudos de degradação forçada, mantendo o pico do BNZ cromatograficamente puro na presença dos produtos de degradação.

A precisão foi avaliada em dois níveis: precisão intra-corrida (repetitividade) e precisão inter-corridas (precisão intermediária). Para a repetitividade, foram preparadas réplicas de 3 determinações de solução com concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para a precisão intermediária, foram testadas réplicas da concentração teste em dias e equipamentos diferentes.

Foram preparadas amostras em duas concentrações ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de BNZ) e cada solução foi filtrada através de filtro de seringa Millex[®] PVDF de $0,45 \mu\text{m}$ com três volumes de descarte: 0 mL, 3 mL e 5 mL.

2.2.3. Preparação dos complexos de BNZ- β CD

Os complexos binários BNZ- β CD e ternários BNZ- β CD-CP foram obtidos utilizando quantidades equimolares do fármaco em relação à β CD e para o complexo ternário, a quantidade de CP foi de 1% em relação à massa total. Foram obtidas preparações aquosas separadamente de cada componente que, depois de unidas, foram mantidas sob agitação por 48 h e então, foram congeladas à -25°C e secas pelo processo de liofilização em liofilizador modelo SuperModulyo Freeze Dryer da Thermo Scientific (EUA), equipado com bomba de alto vácuo modelo VLP-285 da Boc-Edwards (Itália).

Foram obtidas as mesmas quantidades dos compostos binários e ternários por mistura física (MF) para fins de comparação quanto ao processo de complexação.

2.2.4. Solubilidade

As amostras de BNZ, BNZ- β CD e BNZ- β CD-CP foram adicionadas em excesso em 10 mL de água e as suspensões obtidas foram submetidas à agitação de 200 rpm por 72 horas à temperatura de 37°C em agitador orbital Tecnal, TE 420 (Brasil) em duplicata. Em seguida, as amostras foram filtradas em filtro de PVDF de $0,45 \mu\text{m}$, e diluídas 10 vezes com acetonitrila:água na proporção 50:50 (v/v) e em seguida foram analisadas em CLAE.

2.2.5. Estudos de degradação forçada

Para os estudos de degradação forçada foram preparadas soluções estoque de BNZ, BNZ- β CD e BNZ- β CD-CP, obtidos por liofilização, em água na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. As condições utilizadas estão descritas na Tabela 2.1.

Os complexos binários e ternários foram submetidos ao estudo de degradação forçada apenas nas condições em que o BNZ se apresentou instável.

As soluções alcalinas e ácidas foram neutralizadas e diluídas até uma concentração teórica de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções provenientes do estudo oxidação foram diluídas duas vezes e as amostras coletadas nas condições de pH neutro e fotólise não foram diluídas. As amostras e seus respectivos brancos (amostras com os mesmos componentes de cada condição em estudo sem o fármaco) foram analisados por CLAE em duplicata, filtrando-as por membrana $0,45 \mu\text{m}$ e descartando-se os primeiros 3 mL.

Tabela 2.1. Condições empregadas nos estudos de degradação forçada para solução aquosa de BNZ em temperatura ambiente

Estudo	Condição	Tempo de exposição
Hidrólise ácida	HCl 0,1 M	50 horas
Hidrólise alcalina	NaOH 0,1M	50 horas
Hidrólise pH neutro	Água a 90°C	6 horas
Degradação oxidativa	H ₂ O ₂ 3%	50 horas
Luz	UV + visível (solução)	30 minutos
Luz	UV + visível (estado sólido)	50 horas

2.3. Resultados e discussão

Foi obtida uma curva analítica com um valor de coeficiente de correlação linear (r) de 0,999 e coeficiente de determinação (R^2) de 0,9999 (Fig. 2), apresentando assim, uma boa correlação dentro da faixa de concentração de 5 a 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o método cromatográfico proposto.

Figura 2.2. Curva analítica do BNZ utilizando método CLAE, fase móvel acetonitrila:água 50:50, fluxo 0,5 mL min^{-1} , a 25°C, coluna Purosphere STAR® RP18e, 250 x 4,6 mm, partícula 5 μm , leitura em 324 nm com injeção de 20 μL .

A precisão do método foi comprovada, através dos resultados das análises de amostras de BNZ na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 2.2) onde o coeficiente de variação (CV) foi menor que 1%.

Tabela 2.2. Precisão intra e inter-corridas para solução de BNZ

Dia	equipamento	1	2	3	4	5	média	CV(%)
1	1	100,13	100,61	100,11	99,87	100,14	100,17	0,27
	2	99,82	100,21	99,82	99,18	99,32	99,67	0,42
2	1	101,05	99,69	99,87	98,97	100,01	99,92	0,75
	2	100,23	100,34	101,31	100,12	100,45	100,49	0,47

Foi avaliada a saturação do filtro utilizado na preparação das amostras e concluiu-se que são necessários o descarte de 3 mL da solução contendo o BNZ (Tabela 2.3.) para que possa garantir a saturação do composto no filtro.

Tabela 2.3. Avaliação da saturação de filtro para soluções de BNZ. Volumes de descarte em mL.

Concentração teórica (µg/mL)	Sem filtrar	0	3	5
50	100,07 ± 0,03	99,89 ± 0,00	100,00 ± 0,01	100,00 ± 0,02
100	100,45 ± 0,04	100,10 ± 0,06	100,27 ± 0,03	100,30 ± 0,06

Assim, diante dos resultados obtidos para linearidade, precisão e saturação de filtro, o método aqui proposto para quantificação do BNZ apresenta-se adequado.

De acordo com a classificação biofarmacêutica, um fármaco adquire solubilidade adequada quando a relação dose/solubilidade é menor ou igual a 250 mL (DRESSMAN; LENNERNÄS, 2000; YU *et al.*, 2004), no caso do BNZ a dose corresponde à 100 mg. Para uma dose de 100 mg são necessários 412 mL de água para a solubilização do BNZ não complexado, 131 mL para o complexo binário e 125 mL para o ternário obtidos por liofilização (Tabela 2.5). Assim, o fármaco, inicialmente considerado de baixa solubilidade, quando complexado adquiriu solubilidade adequada para a dissolução da dose no trato gastrointestinal (TONG, 2000; VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006).

Fig. 2.3. Solubilidade do BNZ e dos complexos binários BNZ-βCD e ternários BNZ-βCD-CP obtidos por liofilização e mistura física em água. (solubilidade adequada para D/S < 250 mL)

O teste de solubilidade foi um parâmetro de comparação frente ao extenso estudo de caracterização já realizado disponível em literatura para os complexos BNZ- β CD. Os valores encontrados de 0,243 mg mL⁻¹ para o BNZ, 0,764 mg mL⁻¹ para os complexos BNZ- β CD e 0,802 mg mL⁻¹ para BNZ- β CD-CP são semelhantes aos valores de 0,2 mg mL⁻¹, 0,8 mg mL⁻¹ e 0,9 mg mL⁻¹, respectivamente, para os valores obtidos por MIRANDA (2008).

O BNZ foi submetido a diversas condições de estresse onde foi possível detectar sua degradação em solução alcalina (Fig. 2.4b), ambiente oxidante (Fig. 2.4d) e na presença da luz quando em solução (Fig. 2.4e). Nas condições ácidas, em solução aquosa à 90°C e no estado sólido sob ação da luz o BNZ não sofreu degradação.

Em solução alcalina, é possível observar pelo cromatograma (Figura 2.4b) o surgimento de outro grande pico proveniente da degradação, além do fármaco com tempo de retenção em torno de 20 minutos. A degradação nesta condição chegou a 20% (Tabela 2.4) e pode ser atribuída à hidrólise do grupo funcional acetamida, suscetível ao ataque nucleofílico da água (BAERTCHI, 2005).

Em ambiente oxidativo o BNZ também se degradou com o surgimento de diversos produtos de degradação (Figura 2.4d). A impureza com tempo de retenção de 5 minutos, que surgiu tanto no cromatograma do BNZ em condição alcalina quanto na condição oxidativa podem ser parecidas, porém, não foi possível comparar os espectros de absorbância, pois, ambos os picos não se apresentavam puros. Geralmente a degradação oxidativa de fármacos ocorre por autooxidação que pode ser provocada pela formação de radicais iniciada pela presença de metais de transição, peróxidos ou oxigênio molecular (BAERTCHI, 2005).

A presença de peróxidos em formulações é uma preocupação relevante, visto que podem ser impurezas presentes em excipientes usuais na composição de formas farmacêuticas sólidas como a povidona, o polietilenoglicol, hidroxipropilcelulose, entre outros. As concentrações destes peróxidos podem variar de lote a lote e de fabricante para fabricante (WASYLASCHUK et al., 2007).

Do mesmo modo, o estudo de fotodegradação mostrou que o fármaco se decompõe em solução, quando exposto à luz, pois, o pico de BNZ desapareceu do

cromatograma obtido após 50 h de exposição (tempo necessário da câmara de fotoestabilidade para que alcançasse as condições recomendadas pelo ICH). Assim, o teste foi repetido até um período de 30 minutos (Tabela 2.4 e Figura 2.4e) e assim, foi possível observar que há uma redução da área do pico do BNZ no cromatograma, porém, não houve o aparecimento de qualquer outro pico significativo detectado pelo método aplicado.

Figura 2.4. Cromatogramas do BNZ (TR em 20 minutos) obtidos por CLAE-UV a 324 nm resultantes da exposição em HCl 0,1 M após 50h **(a)**, NaOH 0,1 M após 50h **(b)**, H₂O a 90°C após 6h **(c)**, H₂O₂ a 3% após 50h **(d)**, solução aquosa sob luz após 30 minutos **(e)**, BNZ no estado sólido sob luz após 50h **(f)**. Concentração teórica inicial: 50 µg mL⁻¹ para **a**, **b**, e **d**; 100 µg mL⁻¹ para **c**, **e** e **f**.

Tabela 2.4. Porcentagem de BNZ nas diversas condições do estudo de degradação forçada. Dados de concentração do fármaco convertidos em porcentagem considerando o valor inicial de cada condição como 100%. A concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$ inicial foi de: a) 48,5; b) 47,9; c) 98,1; d) 48,7; e) 99,3; f) 98,2. As colunas destacadas representam as condições em que houve queda de concentração do fármaco maior que 10%, mostrando fortes indícios de suscetibilidade à degradação nestas condições.

	HCl 0,1 M	NaOH 0,1 M	H ₂ O 90°C	H ₂ O ₂ 3%	Luz (solução)	Luz (sólido)
Inicial	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
1 min	-	-	-	-	99,4%	-
5 min	-	-	-	-	97,7%	-
30 min	-	-	-	-	85,4%	-
2 h	-	-	100,9%	-	-	-
3 h	100,4%	97,7%	-	98,4%	-	-
4 h	-	-	101,4%	-	-	-
6 h	100,2%	97,3%	98,7%	96,9%	-	-
11 h	100,4%	92,3%	-	-	-	-
30 h	100,2%	80,2%	-	83,8%	-	-
50 h	100,2%	79,3%	-	68,6%	-	98,6%

A fotodegradação aqui observada pode ser atribuída ao grupo nitro presente na molécula de BNZ, que é muito suscetível à reatividade fotoquímica. Sabe-se que a luz visível e UV são capazes de transformar o grupo nitro em nitroso. Outro grupo funcional presente na molécula que pode também sofrer fotólise é o anel imidazol que pode ser clivado sob ação da luz e tais reações parecem acontecer muito rapidamente (BAERTCHI, 2005).

A amostra de BNZ oriunda do teste de fotoestabilidade (após 30 minutos de exposição) foi analisada em HPLC-DAD e foi possível notar o aparecimento de picos em cerca de 200 nm (Figura 2.5), que pode estar relacionado aos produtos de degradação do BNZ e não são detectados em 324 nm no método desenvolvido. As análises a 200 nm não são viáveis devido à grande interferência da fase móvel nesta região do espectro (BAERTCHI, 2005).

Neste caso, uma hipótese do aparecimento destas bandas pode ser da clivagem de um grupo de cromóforos, provavelmente o anel imidazol. Outra hipótese é que as bandas de cerca de 200 nm pode representar parte da molécula do BNZ, como o grupo benzila na ausência de grupos auxócromos que causam uma

mudança da absortividade do cromóforo para comprimentos de onda mais longos. Estes grupos caracteristicamente possuem elétrons não compartilhados, neste caso, o grupo NH da acetamida do BNZ (THOMAS, 1996).

Figura 2.5. Cromatogramas em 3D obtidos por CLAE-DAD da solução de BNZ controle (protegido da luz com papel alumínio) **(A)** e a solução de BNZ exposta à luz durante 30 minutos **(B)** apresentando uma queda de aproximadamente 15% do conteúdo de fármaco.

Porém, no estado sólido, o BNZ parece ser mais estável nas condições recomendadas pelo ICH se comparado com a solução (Figura 2.4f e Tabela 2.4). O pó de BNZ, após a exposição, apresentou cor amarela mais intensa do que a amostra controle, no entanto, a mudança de cor não significa necessariamente degradação do fármaco.

Diante da constatação de que o BNZ se degrada em solução alcalina, na presença de peróxido e sob a ação da luz, os complexos BNZ- β CD e BNZ- β CD-CP foram submetidos à estas mesmas condições (Tabela 2.5, 2.6 e 2.7).

Tabela 2.5. Porcentagem de BNZ em relação ao tempo de exposição no estudo de fotodegradação em solução

t (min)	BNZ	BNZ- β CD	BNZ- β CD-CP
0	100,0	100,0	100,0
30	85,8	88,9	86,6
60	76,0	76,8	74,8
120	59,3	56,2	55,1
150	50,5	48,6	46,8

Tabela 2.6. Porcentagem de BNZ em relação ao tempo de exposição em solução alcalina

t (h)	BNZ	BNZ- β CD	BNZ- β CD-CP
0	100,0	100,0	100,0
3	97,2	96,3	94,8
6	95,6	96,1	95,3
11	92,2	93,1	91,2
30	86,0	87,3	85,1
50	81,1	82,1	79,0

Tabela 2.7. Porcentagem de BNZ em relação ao tempo de exposição em solução na presença de peróxido

t (h)	BNZ	BNZ- β CD	BNZ- β CD-CP
0	100,0	100,0	100,0
2	92,7	94,2	90,9
5	93,1	94,4	95,4
10	93,6	95,9	96,0
30	75,2	77,6	81,4
50	67,9	72,8	74,2

Pelos resultados apresentados nas Tabelas 2.5, 2.6 e 2.7 e Figura 2.6 percebe-se que não houve ganho na estabilidade química do BNZ nas condições estudadas. A complexação do BNZ com a β CD é energeticamente favorável, no entanto, a entalpia envolvida na ligação fármaco-CD é praticamente a mesma quando se insere o grupamento benzil ou imidazol da molécula dentro da cavidade da ciclodextrina, calculada através de modelagem molecular (LIMA, 2008). Assim, o grupo imidazol e nitro suscetível à degradação fotolítica, por exemplo, não estarão protegidos.

Figura 2.6. Gráfico da concentração de BNZ em solução (convertido em porcentagem considerando o tempo inicial como 100%) versus tempo de exposição sob luz UV + visível **(A)**, em meio alcalino em solução de NaOH 0,1M **(B)** e em meio oxidativo em solução de H₂O₂ 3% **(C)**.

2.4. Conclusão

Os estudos de degradação forçada de BNZ mostraram que o fármaco é suscetível à degradação em solução alcalina, na presença de peróxido e sob ação da luz. Os complexos com β ciclodextrina (β CD e β CD-CP) que comprovaram aumentar a solubilidade do fármaco não foram capazes de proteger o BNZ, pois, não apresentaram diferenças no comportamento químico nas condições de estresse do estudo em relação à molécula não complexada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALSANTE, M. K.; ANDO, A.; BROWN, R.; ENSING, J.; HATAJIK, T. D.; KONG, W.; TSUDA, Y. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, p. 29-37, 2007.

BAERTSCHI, S. W. *Pharmaceutical Stress Testing*. Indianapolis: Informa Healthcare, 2005. 469 p.

BRASIL. Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003. O Adjunto da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária torna público o “Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos” e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, n. 104, Brasília, 2 jun. 2003. Seção 1, p.56.

CARRIER, R. L.; MILLER, L. A.; AHMED, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *Journal of Controlled Release*, v. 123, p. 78-99, 2007.

COURA, J. R. A história da terapêutica da doença de Chagas, Departamento de Medicina Tropical, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, 21045-900, Rio de Janeiro. 2007. Disponível em <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=37>. Acesso em 14 de Abril de 2012.

CUNHA FILHO, M.S.S; SÁ BARRETO, L.C.L Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. v.28, n.1, p. 1-9, 2007

DOCAMPO, R. Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. *Current Pharmaceutical Design*, Schiphol, v. 7, n. 12, p. 1157-1164, 2001.

DRESSMAN, J.B.; LENNERNAS, H. *Oral drug absorption - prediction and assessment*, New York: Ed. Marcel Dekker, 2000; p. 161.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. pt.2, fascículo 4, p.177-177.2

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. ICH Harmonised Tripartite Guideline. *Q1A(R2) stability testing of New drug substances and products*, 2003. Disponível em: <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>. Acesso em: 10 Fev. 2012.

_____. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Q1B Stability testing: Photostability testing of New Drug Substances and Products, 1996. Disponível em: <http://www.ich.org/cache/comp/276-254-1.html>. Acesso em: 10 Fev. 2012.

LIMA, A.A.N. Desenvolvimento de dispersões sólidas e complexos de inclusão para benznidazol em formas farmacêuticas sólidas. Recife, 2008. 104 p. Dissertação de mestrado – Departamento de Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal de Pernambuco.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *Journal of Pharmaceutical Science*, 85(10), p.1017-1025, 1996.

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, n.329, p. 1-11, 2007

MIRANDA, J.C.; MARTINS, T.E.A; VEIGA, F.; FERRAZ, H.G. Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.47, n. 4, p.665-681, 2011.

MIRANDA, J.C. Obtenção e caracterização de complexos binários e ternários de benznidazol com ciclodextrinas e polímeros hidrossolúveis. São Paulo, 2008. 79p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

REYNOLDS, D. W.; FACCHINE, K. L., MULLANEY, J. F.; ALSANTE, K. M.; HATAJIK, T. D.; MOTTO, M. G. Available Guidance and Best Practices for Conducting Forced Degradation Studies. *Pharmaceutical Technology*, p. 48-56, fevereiro, 2002.

SILVA, A. L. M.; SOARES SOBRINHO, J. L.; ROLIM NETO, P. J. Desenvolvimento de método analítico por CLAE em comprimidos de benznidazol para a doença de chagas. *Química Nova*, v. 30, n. 5, p. 1163-1166, 2007

SOARES SOBRINHO, J.L.; SOARES, M.F.R.; ROLIM NETO, P.J.; TORRES LABANDEIRA, J.J.; ALVES, L.D.S. Improving the solubility of the antichagasic drug benznidazole through formation of inclusion complexes with cyclodextrins. *Química Nova*, v. 34, n. 9, p.1534-1538, 2011

THOMAS, M.J.K. *Ultraviolet and visible spectroscopy*. Chichester: Wiley, 1996. 2nd ed. p.1-66

TONG, W. Applications of complexation in the formulation of insoluble compounds. In: LIU, R. *Water-insoluble drug formulation*. Boca Raton: Interpharm, 2000. cap.6, p.111-135

VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. *As Ciclodextrinas em Tecnologia Farmacêutica*. Coimbra: Ed. MinervaCoimbra, 2006.

WASYLASCHUK, W.R.; HARMON, P.A.; WAGNER, G.; HARMAN, A.B.; TEMPLETON, A.C.; XU, H.; REED, R.A. Evaluation of hydroperoxides in common pharmaceutical excipients. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. V. 96 n.1, p. 106-116, 2007.

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

CAPÍTULO 3

Formulação e avaliação de perfis de dissolução de minicomprimidos de benznidazol- β ciclodextrina

3.1. Introdução

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanossoma cruzi* infecta aproximadamente de 8 a 10 milhões de pessoas em todo o mundo, distribuídas principalmente nos países da América Latina. Caracteriza-se por possuir duas fases: aguda e crônica sendo que as chances de cura concentram-se na fase aguda, através do tratamento com benznidazol (BNZ), único fármaco aprovado no Brasil para o tratamento desta doença (FIOCRUZ, 2012; DNDi, 2012; WHO, 2010).

O BNZ (2-Nitro-N-(fenilmetil)-1H-imidazol-1-acetamida), cuja molécula é apresentada na Figura 3.1, possui massa molecular de $260,25 \text{ g mol}^{-1}$, é um pó cristalino, levemente amarelado, inodoro, insípido e estável ao ar. É pouco solúvel em água, muito solúvel em dimetilsulfóxido, hexano, ligeiramente solúvel em etanol, metanol, acetato de etila e diclorometano. A faixa de fusão é de 188°C a 190°C . O pH da suspensão de 26 mg mL^{-1} é de 5,5 (FARMACOPÉIA Brasileira, 2003).

Figura 3.1. Estrutura molecular do benznidazol

Por outro lado, as ciclodextrinas (CD), oligossacarídeos cíclicos, têm sido utilizadas para buscar uma melhor solubilidade de fármacos pouco solúveis, aumentar a estabilidade, reduzir o gosto amargo de algumas substâncias e melhorar a biodisponibilidade (MIRANDA et al., 2011; CARRIER; MILLER; AHMED, 2007; LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007).

É possível encontrar estudos sobre complexos de inclusão do BNZ com CDs e seus derivados com resultados positivos em relação ao aumento da solubilidade do fármaco, de $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ para o BNZ não complexado alcançando $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,9 \text{ mg mL}^{-1}$ para o complexo benznidazol- β ciclodextrina (BNZ- β CD) e benznidazol- β ciclodextrina-copovidona (BNZ- β CD-CP), respectivamente (MIRANDA, 2008). Do

mesmo modo, complexos do fármaco com β CD metilada randomicamente e com sulfobutil éter β CD foram capazes de promover um aumento considerável da solubilidade do BNZ (SOARES SOBRINHO et al., 2011).

Outro aspecto de grande importância neste contexto é a escolha da formulação mais adequada para os complexos de inclusão, uma vez que, em geral, a quantidade de CD requerida é elevada, o que dificulta a obtenção de uma forma farmacêutica com um tamanho/volume apropriados. Assim, quanto maior a dose do medicamento, maior será a dificuldade em obter uma forma farmacêutica com estes complexos (VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006; LOFTSSON et al., 2005).

Muito embora existam trabalhos nos quais o BNZ foi complexado com CDs, resultando em significativo aumento de solubilidade do fármaco, não existem trabalhos nos quais tenha sido demonstrada a utilização destes complexos para a elaboração de formulações comercialmente viáveis.

Um tipo de formulação de grande destaque atualmente são as formas farmacêuticas multiparticuladas, nas quais a dose do fármaco encontra-se subdividida em diversas unidades, trazendo flexibilidade para o desenvolvimento de formulações. Ainda dentro deste tema, destacam-se os minicomprimidos que possuem algumas vantagens quando comparados com *pellets* e grânulos como, por exemplo, menor número de etapas de fabricação, podendo ser obtido por compressão direta (ZERBINI; FERRAZ, 2011).

Assim, o objetivo do presente trabalho é obter uma formulação multiparticulada (minicomprimidos) para o complexo BNZ- β CD que, para além de um perfil de dissolução adequado, deve também, ser de fácil produção, apresentando-se como uma alternativa viável para a produção de tais sistemas.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Matérias-primas e reagentes

O BNZ (pureza de 99,33%) foi doado gentilmente por Roche Produtos Químicos e Farmacêuticos SA. A β CD utilizada foi obtida da Roquette Pharma® (França), a Hidroxipropilmetilcelulose E6 (HPMC) da Shinetsu® (Japão), Crospovidona (CPV) da Basf® (EUA), celulose microcristalina da Blanver® (Brasil) e estearato de magnésio da Mallinkrodt® (EUA) sendo todas de grau farmacêutico.

3.2.2. Formulação

Foram preparados minicomprimidos inertes sobre os quais foi aplicada uma camada de fármaco, utilizando-se a tecnologia de leito fluidizado.

3.2.2.1. Obtenção dos minicomprimidos inertes

Foram produzidos 400 g de minicomprimidos inertes (99% de celulose microcristalina 102 e 1% de estearato de magnésio) em máquina de comprimir de matriz única contendo 3 mini punções de 3 mm de diâmetro. O peso médio obtido foi de $15,5 \text{ mg} \pm 0,4 \text{ mg}$ e dureza de $28,1 \text{ N} \pm 5,4 \text{ N}$.

3.2.2.2. Incorporação do fármaco

O BNZ foi incorporado à superfície dos minicomprimidos na forma de uma camada. Para tanto, foram testadas diferentes formulações a partir de um planejamento fatorial do tipo 2^3 (3 fatores em 2 níveis) completa e ordenada de acordo com o descrito nas Tabelas 3.1 e 3.2. Na codificação dos fatores para a matriz de planejamento, o fator 1 (ganho de peso) foi explorado nos níveis menor (-1) e maior (+1), para o fator 2 (β CD) e 3 (CPV) foram ausência (-1) e presença (+1) (Tabela 3.1).

Não foi possível a randomização dos ensaios, pois, os níveis do fator ganho de peso não poderiam ser separados, pois, o menor e maior ganho de peso seriam adquiridos sempre em um mesmo processo de fabricação.

Tabela 3.1. Matriz de planejamento fatorial 2³ completa para a produção das formulações de minicomprimidos de BNZ

Ensaio	Formulação	Fator 1 Ganho de peso	Fator 2 βCD	Fator 3 CPV
1	1A	- 1	- 1	- 1
2	1B	+ 1	- 1	- 1
3	2A	- 1	+ 1	- 1
4	2B	+ 1	+ 1	- 1
5	3A	- 1	- 1	+ 1
6	3B	+ 1	- 1	+ 1
7	4A	- 1	+ 1	+ 1
8	4B	+ 1	+ 1	+ 1

Tabela 3.2. Composição das formulações de BNZ em g por lote

Composição	1	2	3	4
Minicomprimidos inertes	80,00	80,00	80,00	80,00
Benznidazol (BNZ)	15,00	15,00	15,00	15,00
Hidroxipropilmetilcelulose E6 (HPMC)	15,00	15,00	15,00	15,00
Óxido de ferro vermelho	0,04	0,04	0,04	0,04
βciclodextrina (βCD)	-	65,40	-	65,40
Crospovidona (CPV)	-	-	5,00	5,00

Outros componentes da formulação incluem, hidroxipropilmetilcelulose E6 (HPMC) que é um polímero de baixa viscosidade com boas características adesivas e o corante óxido de ferro vermelho com a função de pigmento da camada do fármaco para que visualmente fosse possível verificar o progresso da aplicação.

As suspensões para aplicação foram obtidas dispersando-se o HPMC em 110 g de água purificada e, em outro recipiente, o BNZ e o óxido de ferro vermelho

foram dispersos em 60 g de água purificada com o auxílio de ultraturrax IKA (Alemanha). Em seguida as duas preparações foram juntadas com auxílio de agitador mecânico IKA (Alemanha) utilizando 50 g de água purificada para arraste dos resíduos. Adicionou-se então, a β CD e a CPV, nas respectivas formulações, sob agitação, até obter uma preparação homogênea. A suspensão foi passada através de malha com abertura de 250 μ m.

A camada de fármaco foi aplicada utilizando-se a tecnologia de leito fluidizado em equipamento Huttlin[®] modelo Mycrolab[®] (Alemanha) configurado para operar no modo “bottom spray”, empregando-se as seguintes condições: temperatura do ar de entrada e a do produto mantida entre 50°C a 60°C e 40° a 45°C, respectivamente, fluxo de ar entre 8 a 15 m³ h⁻¹, agulha da pistola com abertura de 0,6 mm, pressão de spray e microclima de 0,5 e 0,1 bar, respectivamente e velocidade de bomba peristáltica de 8 rpm. A suspensão foi mantida sob agitação em agitador mecânico.

3.2.3. Caracterização dos minicomprimidos de BNZ

3.2.3.1. Peso médio

Foram determinadas as médias e os respectivos desvios padrões dos pesos de 20 minicomprimidos. O ganho de peso foi calculado segundo a equação 1.

$$\text{Ganho de peso} = \frac{\text{PMf} - \text{PMi} \times 100}{\text{PMi}} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde, PMf é o peso médio final dos minicomprimidos e PMi é o peso médio inicial dos minicomprimidos.

3.2.3.2. Teor de BNZ

Para os padrões de análise, pesou-se 50 mg de BNZ que foram transferidos para balões de 50 mL âmbar e adicionou-se solução de acetonitrila:água na proporção de 50:50 (v/v). Os balões foram submetidos em banho de ultrassom por 15 minutos e então completou-se o volume com a mesma solução. Retirou-se uma alíquota de 1 mL, transferindo-a para um balão âmbar de 10 mL cujo volume foi completado com a solução solvente:água anteriormente citada. A solução final foi

filtrada (filtro 0,45 μm) descartando-se os primeiros 3 mL e transferindo para vials de 1,5 mL âmbares.

Para o doseamento de BNZ nas formulações, calculou-se a quantidade teórica de sólidos aplicados para cada porção da formulação e pesou-se os minicomprimidos em quantidade equivalente a 50 mg de BNZ que foram transferidos diretamente em balões de 50 mL âmbares repetindo-se as operações descritas para os padrões de análise citadas acima. O doseamento foi realizado em duplicata.

As amostras foram analisadas utilizando um método desenvolvido em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Merck Hitachi LaChrom Elite® (Alemanha) equipado com uma bomba quaternária L-2130, injetor automático L-2200, forno para coluna L-2300 e detector UV L-2400. Os parâmetros estabelecidos para as análises foram: coluna Purosphere STAR® RP18e, 250 x 4,6 mm, partícula 5 μm , fase móvel composto por acetonitrila (ACN) : água na razão de 70:30 (v/v) com fluxo de 0,5 mL min⁻¹, comprimento de onda em 324 nm e volume de injeção de 20 μL (SILVA, 2007).

3.2.3.3. Perfil de dissolução

Calculou-se a quantidade de minicomprimidos equivalente a 100 mg de BNZ para cada formulação. Os ensaios de dissolução foram executados em equipamento Logan (EUA) utilizando água contendo laurilssulfato de sódio a 0,1%, aparato 1 (cesta) à 75 rpm, com volume de meio de 900 mL a 37°C. Foram coletadas amostras em 5, 10, 15, 20 e 30 minutos em triplicata (3 cubas) que foram filtradas em filtro Millex PVDF 0,45 μm descartando-se os primeiros 3 mL e transferindo-as para vials de 1,5 mL âmbares que foram posteriormente analisados em CLAE utilizando o mesmo método descrito em 3.2.3.2.

Para a avaliação dos resultados, foi proposto um tratamento dos dados que levasse em consideração os primeiros 15 minutos em relação aos 30 minutos finais do mesmo ensaio, pois, esta avaliação aos pares aumenta os efeitos das respostas já que a maior diferença encontrada situa-se no início dos perfis e adicionalmente há dissolução de mais de 80% em 30 minutos para todos eles. Assim, o cálculo foi feito

utilizando a razão entre área sobre a curva em 15 minutos (ASC15) e 30 minutos (ASC30). Esta razão em porcentagem foi considerada como a resposta para o planejamento proposto e quanto maior a razão, maior é a dissolução nos primeiros minutos em relação à porcentagem final dissolvida. A ASC foi calculada pelo método dos trapézios.

A significância dos efeitos e dos coeficientes de cada fator e a combinação entre eles sobre a resposta foi avaliada através da análise de variância (ANOVA), empregando-se 95% de confiança. O software utilizado para este tratamento foi o Statistica versão 10.0.

3.3. Resultados e discussão

O processo de aplicação do fármaco nos minicomprimidos mostrou-se viável e a adesividade da camada proporcionou um ganho de peso de até 80% em relação a massa inicial. Os resultados de peso médio, ganho de peso e teor de BNZ encontram-se na Tabela 3.3 e os valores de BNZ dissolvido estão apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.3. Peso médio (mg), ganho de peso (%) e teor de BNZ (mg/comprimido) das formulações dos minicomprimidos

Formulação	Peso médio	Ganho de peso	Teor
1A	17,93 ± 0,31	16	1,669
1B	20,55 ± 0,63	33	3,181
2A	22,62 ± 0,49	46	2,025
2B	27,24 ± 0,77	76	3,129
3A	18,66 ± 0,53	20	1,642
3B	21,98 ± 0,44	42	3,102
4A	22,43 ± 0,52	45	1,708
4B	27,93 ± 0,63	80	3,043

Tabela 3.4. Porcentagem de BNZ dissolvido em água com LSS 0,1% a partir das formulações de minicomprimidos. Condição: aparato 1 (cesta), 75 rpm e 900 mL de meio.

Formulação	5	10	15	20	30
1A	37,2 ± 6,4	71,1 ± 3,1	80,7 ± 1,4	83,2 ± 0,8	84,5 ± 0,6
1B	15,2 ± 1,5	39,3 ± 3,3	66,4 ± 3,3	80,1 ± 3,1	89,4 ± 1,6
2A	41,0 ± 3,2	72,1 ± 5,3	86,9 ± 1,6	92,2 ± 1,3	93,1 ± 0,7
2B	27,0 ± 1,7	55,4 ± 1,7	78,8 ± 2,3	87,8 ± 0,3	90,9 ± 0,4
3A	31,7 ± 1,4	66,1 ± 1,5	80,4 ± 0,2	84,8 ± 0,7	87,1 ± 0,8
3B	15,2 ± 1,2	38,5 ± 2,3	56,7 ± 2,8	79,5 ± 2,1	92,4 ± 0,9
4A	34,3 ± 5,0	67,3 ± 1,9	75,7 ± 3,4	78,3 ± 3,6	81,2 ± 1,5
4B	25,5 ± 0,9	54,6 ± 1,4	77,8 ± 1,8	86,5 ± 0,7	90,0 ± 0,3

Quando são comparados os perfis de dissolução entre os diferentes ganhos de peso (Figura 3.2 e Tabela 3.4) o que se observa é um aumento na porcentagem de BNZ dissolvido nos primeiros minutos para as formulações com menor ganho de peso. Como a quantidade de minicomprimidos foi calculada para 100 mg de BNZ foram necessários mais unidades com ganho de peso menor (A) em relação às formulações B, tendo assim, uma área superficial maior que fica em contato com o meio de dissolução, consequentemente, mais fármaco entra em contato com a solução. Além disso, as amostras A possuem uma camada mais fina que a porção com maior ganho de massa (B), dissolvendo-se assim, mais rapidamente.

Por outro lado, a presença da β CD nas formulações (Figura 3.3) promove um aumento da porcentagem de BNZ dissolvido nos primeiros minutos em relação à formulação que não a possui. Assim, aparentemente, há um aumento na solubilidade do BNZ causado pela adição da CD.

Figura 3.2. Perfis de dissolução de minicomprimidos de BNZ. Condição: LSS 0,1% em água, 900 mL, aparato cesta a 75 rpm comparando-se mesma composição da formulação com diferentes ganhos de peso, menor (A) e maior (B).

Figura 3.3. Perfis de dissolução de minicomprimidos de BNZ. Condição: LSS 0,1% em água, 900 mL, aparato cesta a 75 rpm comparando-se formulações com mesma composição adicionando apenas β ciclodextrina.

A adição do desintegrante nas formulações (Figura 3.4) não influenciou no aumento da dissolução do BNZ quando comparadas formulações de igual composição e ganho de peso com exceção da comparação entre as formulações 2A (sem desintegrante) e 4A (com desintegrante), ambos com ganho de peso menor. Neste caso, especificamente, a formulação sem o desintegrante possui uma porcentagem de BNZ dissolvida maior, porém, para as mesmas formulações, desta vez, com ganho de peso maior, os perfis são muito semelhantes havendo quase uma sobreposição de curvas.

Figura 3.4. Perfis de dissolução de minicomprimidos de BNZ. Condição: LSS 0,1% em água, 900 mL, aparato cesta a 75 rpm comparando-se formulações com mesma composição adicionando apenas CPV.

Para tentar elucidar estas diferenças dos perfis de dissolução do BNZ e verificar o quanto cada fator realmente contribui para a resposta, foi necessária uma ferramenta que avaliasse todos estes fatores ao mesmo tempo. Assim, os resultados foram avaliados estatisticamente utilizando os dados ASC15/ASC30 (%) e a análise de variância através do software Statistica®.

A partir dos perfis de dissolução, calculou-se a ASC15 e ASC30 pelo método dos trapézios e em seguida, a razão, em porcentagem, para cada um dos ensaios (Tabela 3.5).

Tabela 3.5. Valores de ASC15, ASC30, razão ASC15/ASC30 (%), em triplicata e suas respectivas médias baseados nos perfis de dissolução das formulações de BNZ.

Formulação	ASC15	ASC30	Razão (%)	Média
1A	709,2	1947,0	36,43	37,28
	719,5	1965,5	36,61	
	800,8	2062,9	38,82	
2A	761,8	2142,4	35,56	35,83
	732,9	2089,5	35,08	
	808,9	2194,9	36,85	
3A	676,5	1955,5	34,59	35,15
	704,7	1967,2	35,82	
	688,9	1966,1	35,04	
4A	663,8	1874,9	35,40	37,37
	706,9	1843,4	38,35	
	721,5	1880,5	38,37	
1B	419,5	1618,4	25,92	26,52
	423,5	1607,8	26,34	
	472,4	1731,3	27,29	
2B	586,6	1887,7	31,07	31,74
	610,8	1923,8	31,75	
	630,3	1945,9	32,39	
3B	395,6	1577,5	25,08	25,48
	397,3	1613,5	24,62	
	438,5	1639,7	26,74	
4B	577,4	1857,7	31,08	31,52
	607,5	1906,1	31,87	
	601,1	1902,3	31,60	

A análise de variância dos efeitos (Tabela 3.6 e Figura 3.5) interessante revelou que o fator CPV isoladamente não é um efeito significativo ($p > 0,05$). Entretanto, a interação entre CPV e β CD (efeito 2x3) possui significância, onde o desintegrante pode estar auxiliando na desagregação da camada do fármaco complexado.

Tabela 3.6. Análise de variância dos efeitos sobre ASC15/ASC30 com IC de 95%. SQ (soma dos quadrados), GL (graus de liberdade), QM (quadrado das médias), F (Fisher), p (probabilidade).

Fator	SQ	GL	QM	F	p
1	346,1714	1	346,1714	300,8355	0,000000
2	54,2360	1	54,2360	47,1331	0,000003
3	1,2742	1	1,2742	1,1073	0,307391
1x2	41,2741	1	41,2741	35,8687	0,000015
1x3	0,1681	1	0,1681	0,1461	0,707045
2x3	7,5530	1	7,5530	6,5638	0,020205
Erro	19,5619	17	1,1507		
Total SQ	470,2387	23			

Fator 1: ganho de peso, Fator 2: β CD, Fator 3: CPV

Pelo gráfico de Pareto (Figura 3.5) é possível identificar os efeitos significativos sobre a influência na razão ASC15/ASC30 (barras ultrapassam a linha limite de 0,05 de probabilidade), percebe-se que há grande influência negativa do ganho de peso, ou seja, o maior ganho de peso acarretou em menor dissolução inicial do BNZ. Esta influência também é significativa para a adição da β CD e os efeitos que interagem com ela, porém, ao contrário do ganho de peso, há um aumento de dissolução nos primeiros minutos.

Figura 3.5. Gráfico de Pareto para a análise de variância dos efeitos sobre a razão ASC15/ASC30 (%) dos perfis de dissolução das formulações de minicomprimidos de BNZ.

Para verificar a validade do modelo proposto, foi analisada a variância da regressão retirando os efeitos não significativos para a avaliação da falta de ajuste (Tabela 3.7). Assim, foi possível verificar que a falta de ajuste não é significativa ($p < 0,05$), ou seja, o modelo é válido e possui um coeficiente de determinação de 0,955, ou seja, mais de 95% dos dados podem ser explicados pelo modelo.

Tabela 3.7. Análise de variância dos efeitos sobre a razão ASC15/ASC30 sem os efeitos significativos para cálculo da falta de ajuste do modelo.

Fator	SQ	GL	QM	F	P
1	346,1714	1	346,1714	335,8419	0,000000
2	54,2360	1	54,2360	52,6177	0,000002
1x2	41,2741	1	41,2741	40,0425	0,000010
2x3	7,5530	1	7,5530	7,3276	0,015549
Falta de ajuste	4,5121	3	1,5040	1,4592	0,263101
Erro Puro	16,4921	16	1,1507		
Total SQ	470,2387	23			

Fator 1: ganho de peso, Fator 2: β CD, Fator 3: CPV

Através do software Statistica[®], foi possível calcular os valores dos efeitos e os coeficientes para este modelo de regressão (Tabela 3.8). Assim, tem-se o valor de 32,6% para a média das razões ASC15/ASC30 (%) e com os valores dos

coeficientes, é possível montar uma equação linear para o modelo proposto (Equação 2).

Tabela 3.8. Efeitos e coeficientes do modelo de regressão proposto para a os fatores significativos para a razão ASC15/ASC30(%) para formulações de minicomprimidos de BNZ

Fator	Efeitos	Erro padrão dos efeitos	Coeficientes	Erro padrão coeficientes	p
Média	32,61119	0,214620	32,61119	0,214620	0,000000
1	-7,59574	0,429240	-3,79787	0,214620	0,000000
2	3,00655	0,429240	1,50327	0,214620	0,000001
1 x 2	2,62279	0,429240	1,31139	0,214620	0,000007
2 x 3	1,12198	0,429240	0,56099	0,214620	0,017072

Fator 1: ganho de peso, Fator 2: β CD, Fator 3: CPV

$$\frac{ASC15(\%)}{ASC30} = 32,6 - 3,8 (F1) + 1,5 (F2) + 1,3 (F1 \times F2) + 0,56 (F2 \times F3) \quad (\text{Equação 2})$$

Assim, é possível prever uma resposta máxima pelo gráfico de contorno, representada pela região de cor vinho (Figura 3.6), ou seja, o fator 1 (ganho de peso) influencia negativamente na razão, assim, deve-se substituir este fator com a codificação de menor nível (-1) e todos os outros fatores (β CD e CPV) com maior nível (+1). A equação 2 pode ser substituída pelos valores codificados:

$$\frac{ASC15(\%)}{ASC30} = 32,6 - 3,8 (-1) + 1,5 (+1) + 1,3 ((-1) \times (+1)) + 0,56 ((+1) \times (+1))$$

$$\frac{ASC15(\%)}{ASC30} = 37,16\%$$

Portanto, a formulação que corresponde aos níveis da resposta máxima é a 4A, cuja média real foi de 37,37% (Tabela 3.5), valor próximo ao calculado (37,16%). Assim, a resposta máxima pode ser obtida com a formulação que contém β CD, CPV com um menor ganho de peso.

Figura 3.6. Gráfico de contorno do fator 1 (ganho de peso) x fator 3 (CPV) (A) e do fator 1 (ganho de peso) x fator 2 (β CD) (B), onde o eixo X e Y são valores dos níveis codificados.

O gráfico de contorno (Figura 3.6) é representado por retas quando os fatores não possuem interação e curvas quando há interação. Ao longo da faixa de mesma cor, a resposta é a igual, ou seja, para o nível -1 de ganho de peso a resposta é a mesma independentemente do nível da CPV.

Se considerarmos que o coeficiente do efeito 2x3 da equação é de +0,56 (F2) x (F3) (Equação 2), para uma formulação que não possui CPV (menor nível -1) o valor teórico do modelo é de 36,81, um valor próximo ao de resposta máxima. Neste caso, a formulação 2A também pode ser considerada uma formulação adequada.

É interessante notar que a análise de variância permite que seja avaliada a influência dos fatores isoladamente e sua interação com os demais fatores, expressando através de valores de coeficiente a influência negativa ou positiva e pelo p (probabilidade) qual fator tem maior influência, ou seja, quanto menor o valor de p maior é a certeza de que o fator avaliado tem forte significância para a resposta estudada. Em outras palavras, pode-se avaliar os gráficos de perfis de dissolução isoladamente, mas o tratamento estatístico pode traduzir em números a discussão sobre semelhança e diferença, deixando claro qual a influência de cada fator com uma região de resposta e não apenas valores pontuais.

3.4. Conclusão

A partir dos resultados aqui obtidos conclui-se que foi possível obter formulações na qual o BNZ foi aplicado em leito fluidizado na superfície de minicomprimidos juntamente com β CD e CPV. Tais formulações apresentaram um perfil de dissolução adequados e através do tratamento estatístico, foi possível entender a influência do ganho de peso, da adição da β CD e da CPV na dissolução do BNZ.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARRIER, R. L.; MILLER, L. A.; AHMED, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *Journal of Controlled Release*, v. 123, p. 78-99, 2007.

DNDi. Drugs for Neglected Diseases *iniciative*. CHAGAS. Disponível em <http://www.dndi.org.br/pt/doencas-negligenciadas/doenca-de-chagas.html>. Acesso em: 20 de Fevereiro de 2012.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. pt.2, fascículo 4, p.177-177.2

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. *Doença de Chagas*. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home>. Acesso em: 23 de Janeiro de 2012.

LIMA, A.A.N. Desenvolvimento de dispersões sólidas e complexos de inclusão para benznidazol em formas farmacêuticas sólidas. Recife, 2008. 87p. Dissertação de mestrado – Departamento de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco.

LOFTSSON, T.; JARHO, P.; MÁSSON, M.; JÄRVINEN, T. Cyclodextrins in drug delivery, *Expert Opinion Drug Delivery*, v. 2, p. 335-351, 2005.

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 329, p.1-11, 2007.

MIRANDA, J.C.; MARTINS, T.E.A; VEIGA, F.; FERRAZ, H.G. Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.47, n. 4, p.665-681, 2011.

MIRANDA, J.C. Obtenção e caracterização de complexos binários e ternários de benznidazol com ciclodextrinas e polímeros hidrossolúveis. São Paulo, 2008. 79p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

SILVA, A. L. M.; SOARES SOBRINHO, J. L.; ROLIM NETO, P. J. Desenvolvimento de Método Analítico por CLAE em comprimidos de Benznidazol para a Doença de Chagas. *Química Nova*, v. 30, n. 5, p. 1163-1166, 2007

SOARES SOBRINHO, J.L.; SOARES, M.F.R.; ROLIM NETO, P.J.; TORRES LABANDEIRA, J.J.; ALVES, L.D.S. Improving the solubility of the antichagasic drug benznidazole through formation of inclusion complexes with cyclodextrins. *Química Nova*, v. 34, n. 9, p.1534-1538, 2011.

VEIGA, F.J.B.; PECORELLI, C.C.M.F., RIBEIRO, L.S.S., *As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica*. 1 ed., Minerva Coimbra Editora, Coimbra, 2006, 228p.

WHO. World Health Organization. *Chagas disease (American Tripanosomiasis)*. Fact sheet n. 340, Junho, 2010. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em: 15 de Fevereiro de 2012.

ZERBINI, A.P.N.A.; FERRAZ, H.G. Sistemas multiparticulados: minicomprimidos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 32, n.2, p.149-158, 2011