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

**Obtenção, caracterização e fotodegradação de complexos
binários e ternários de Difosfato de Cloroquina**

Patricia Elizabeth Rivas Granizo

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz

São Paulo
2007

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013159

Ficha Catalográfica

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

Rivas Granizo, Patricia Elizabeth
R617o Obtenção, caracterização e fotodegradação de complexos binários
e ternários de difosfato de cloroquina / Patricia Elizabeth Rivas
Granizo. -- São Paulo, 2007.
113p.

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

I. Formulações farmacêuticas 2. Terapia por drogas : Malária
I. T. II. Ferraz, Humberto Gomes, orientador.

615.4 CDD

Dedico este trabajo,

À ***Deus*** pela vida e por acompanhar-me em cada passo.

A mi princesa ***Inara*** por todas las sonrisas, por el tiempo prestado y por ser parte de este sueño, con todo el amor del mundo. Sua mamãe.

A ***Luigi*** por todo el amor, cariño, paciencia, apoyo en los días difíciles y dedicación, por cada día compartido y por acompañarme en este sueño. *Sioux*.

A mis padres ***Julio y Vicky*** por cada paso dado juntos, por todo lo que me enseñaron, la lucha por los sueños, el valor de los aciertos y el grande apoyo cada día, este es mi presente, porque siempre me enseñaron el valor del estudio.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz, pela oportunidade, confiança na orientação, apoio e incentivo no desenvolvimento de todas as atividades durante o mestrado.

À Profa. Dra. Silvia Regina Cavani Jorge Santos, pelo apoio e auxílio no desenvolvimento do HPLC e pelas valiosas sugestões na redação e desenvolvimento da dissertação.

À *Lê Carpentieri*, pelo auxílio incondicional e as mil valiosas sugestões na redação e apresentação do trabalho, assim como por todas as dicas de mamãe.

À *Michele*, por tudo desde o primeiro dia que cheguei nesta cálida terra, por estar sempre na hora certa e pela ajuda técnico/ científica no decorrer do trabalho.

Ao *Tércio* e *Vivian*, pelo auxílio em tudo, pela amizade incondicional e por serem apoio nesta aventura.

À *Claudinéia* pela ajuda e apoio técnico e as dicas de mamãe.

À *Andreia*, *Carla*, *Sciliane*, pela ajuda incondicional, amizade e carinho.

Aos todos meus colegas da farmacotécnica pelo carinho, amizade e porque de alguma ou outra forma, contribuíram na realização deste trabalho.

Ao *Danilo* pela ajuda no português - Não tá errado mais tá feio - e pela amizade.

Ao CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior):

“Bolsista da CAPES– IEL Nacional – Brasil”.

“Muchas gracias a todos que Dios los acompañe siempre, sigan adelante con sus objetivos y no desmayen, con voluntad y lucha todo se logra”

RESUMO

Obtenção, caracterização e fotodegradação de complexos binários e ternários de difosfato de cloroquina

O difosfato de cloroquina é um fármaco antimalárico, de conhecida fotossensibilidade. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver, caracterizar e avaliar a fotodegradação de complexos binários e ternários de difosfato de cloroquina. Para tanto, foi desenvolvida uma metodologia analítica que permitiu identificar e quantificar o fármaco por CLAE com detecção UV, que mostrou boa seletividade, além de adequada especificidade, sensibilidade, linearidade, precisão e exatidão, frente a seus respectivos produtos de degradação e fotodegradação. Os complexos com β -ciclodextrina e HP- β -ciclodextrina obtidos não foram capazes de proteger o fármaco da degradação promovida pela luz nos meios água, HCl 0,1N e tampão fosfato pH 6,8. Em HCl 0,1N verificou-se que alguns complexos são capazes, inclusive, de acelerar a degradação promovida pela luz. Foram também realizados estudos de recristalização do fármaco em diferentes solventes para avaliar o impacto sobre suas características físico-químicas, os quais resultaram em possíveis modificações cristalinas observadas mediante técnica de DSC quando foram utilizados etanol e clorofórmio como solventes para o processo.

Palavras chave: difosfato de cloroquina, fotodegradação, CLAE-UV, recristalização, complexação com ciclodextrinas.

ABSTRACT

Obtention, characterization and photodegradation of binary and ternary complex of chloroquine diphosphate

The chloroquine diphosphate is an antimalarial drug of known photosensitivity. The present work had as objective to develop, characterize and evaluate the photodegradation of binary and ternary complex of chloroquine diphosphate. For in such a way, an analytical methodology was developed that allowed to identify and quantify the drug for CLAE with detection UV, that showed good selectivity, beyond adjusted specificity, sensitivity, linearity, precision and accuracy, from its respective products of degradation and photodegradation. The complexes with β -cyclodextrin and HP- β -cyclodextrin had not been capable to protect the drug of the degradation promoted by the light in solvent water, HCl 0,1N and buffer phosphate pH 6,8. In HCl 0,1N is verified that some complex are capable to speed up the degradation promoted by the light. Also studies of recrystallization of the drug in different solvents were carried through to evaluate the impact on its physical-chemistry characteristics, which had resulted in possible observed by DSC crystalline modifications technique when ethanol and chloroform had been used as solvent for the process.

Key words: chloroquine diphosphate, photodegradation, HPLC-UV, recrystallization, complexation and cyclodextrins.

SUMÁRIO

Capítulo 1: Fotodegradação de fármacos.....	1
Resumo	2
1. Fotodegradação.....	3
2. Definição de termos	4
3. Luz visível e ultravioleta.....	5
4. Fotodegradação de fármacos	7
5. Comportamento fotoquímico de fármacos	18
6. Associação de fármacos	30
7. Fotodegradação no estado sólido	31
8. Fotodegradação em solução	32
9. Ciclodextrinas e fotodegradação	33
10. Guia para o teste de fotoestabilidade. ICH- Q1B	35
10.1 Fontes de luz	36
10.2 Sistema Químico Actinométrico: calibração de fontes de luz com quinino	38
11. Fototoxicidade	40
12. Conclusão.....	41
Referências bibliográficas.....	41
 Capítulo 2: Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação do difosfato de cloroquina na presença de seus produtos de degradação...	 58
Resumo	59
1. Introdução.....	60
2. Material e Métodos.....	61
2.1 Reagentes.....	61
2.2 Equipamentos.....	61
2.3 CLAE-UV: condições cromatográficas	62

2.3.1 Curvas de calibração	62
2.4 Validação da metodologia	62
2.4.1 Linearidade	62
2.4.2 Limite de quantificação	62
2.4.3 Precisão.....	62
2.4.4 Exatidão	63
2.4.5 Seletividade	63
2.4.6 Estabilidade de curta duração (24h)	63
2.5 Estudos de estabilidade	63
2.5.1 Degradação forçada	63
2.5.2 Fotodegradação	63
2.6 Preparação das amostras para CLAE	64
2.7 Espectrofotometria UV	64
3. Resultados e discussão	64
4. Conclusão.....	74
Referências bibliográficas	75

Capítulo 3: Avaliação da fotoestabilidade de complexos binários e ternários de difosfato de cloroquina

78

Resumo	79
1. Introdução.....	80
2. Material e Métodos	81
2.1 Reagentes	81
2.2 Preparo dos complexos binários	81
2.3 Preparo dos complexos ternários	82
2.4 Caracterização dos complexos	82
2.4.1 DSC	82
2.4.2 Infravermelho	82
2.5 Avaliação da fotoestabilidade dos complexos.....	82
3. Resultados e discussão	83
4. Conclusão	95
Referências bibliográficas	95

Capítulo 4: Avaliação do impacto da recristalização nas características físico-químicas do difosfato de cloroquina	98
Resumo	99
1. Introdução.....	100
2. Material e Métodos.....	102
2.1 Reagentes.....	102
2.2 Recristalizações do fármaco	102
2.3 Caracterização das amostras	102
2.3.1 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	102
2.3.2 Espectroscopia no infravermelho.....	103
2.3.3 Microscopia ótica	103
2.3.4 Difração do pó por raios-x	103
3. Resultados e discussão.....	103
4. Conclusão.....	112
Referências bibliográficas.....	112

Capítulo 1

FOTODEGRADAÇÃO DE FÁRMACOS

Resumo

A fotodegradação é a transformação de um produto, por efeitos fotoquímicos, que ocorre após exposição à luz. Essa exposição pode derivar de fontes de luz visível ou ultravioleta, seja natural ou artificial. O principal efeito é o fracionamento de uma molécula em pequenas partes de menor peso molecular, embora o efeito manifesto observável seja a perda da potencia farmacológica. Muitos dos fármacos que apresentam fotodegradação têm em sua estrutura grupos funcionais característicos de moléculas, que são altamente fotorreativos, esses grupos desencadeiam efeitos fotossensibilizantes na molécula, por intercâmbio de energia entre as fontes luminosas, originando mudanças significativas no fármaco. Quando o fármaco está no estado sólido o mecanismo de reação é difícil de explicar, pois muitos deles ainda não são esclarecidos; mais quando o produto encontra-se no estado líquido a fotoquímica da reação dependerá de muitos fatores tais como, meio, concentração, pH e presença de oxigênio. Existem alguns mecanismos de proteção para fármacos fotossensíveis, que estão sendo estudados, assim a encapsulação de fármacos em ciclodextrinas é um potencial fonte de investigação que cada vez alcança maiores domínios com resultados alentadores. Por outro lado, foram estabelecidas normas que permitem realizar estudos de fotoestabilidade, para avaliar a fotodegradação de um fármaco, e assim garantir a segurança, principalmente dos efeitos fototóxicos que muitas vezes manifestam-se, só depois de iniciado o tratamento, como alterações cutâneas, oculares e que são os mais prejudiciais para indivíduo.

Palavras chave: fotodegradação de fármacos, fármacos fotossensíveis, comportamento fotoquímico, fototoxicidade.

1. Fotodegradação

A fotodegradação é a transformação de uma molécula em pequenos fragmentos de menor peso molecular, mediante uma reação química causada pela absorção de radiação ultravioleta, visível ou infravermelha, que se manifesta em efeitos como fotodecomposição, fotosensitização e fototoxicidade (VERHOEVEN, 1996; TONNENSEN, 2004).

As reações de fotodegradação na maioria de casos são processos de oxidação associados à absorção de energia e transformação que dependem do comprimento de onda. Essa energia é independente da temperatura e aumenta conforme seu comprimento de onda diminui. Porém, a energia da radiação ultravioleta é maior que a do visível, que por sua vez é maior que a do infravermelho. Como consequência, as radiações absorvidas na zona ultravioleta e visível do espectro são mais ativas na iniciação de reações químicas que outras zonas de maior comprimento de onda (USGS, 2007; MOORE, 2004a; VILA JATO, 2001).

O termo fotodegradação ou fotoestabilidade, dentro do contexto modificação de fármacos, é usado para descrever como um composto responde à exposição da luz, incluindo não somente efeito de degradação, mas também processos como formação de radicais, transferência de energia e luminescência (ALBINI & FASANI, 1998; TONNENSEN, 2004).

As moléculas que absorvem a radiação podem ser componentes da reação principal ou pode acontecer que essas moléculas não participem diretamente da reação, mas atuar como doadoras, passando sua energia a outras moléculas que participam na reação. Nesse caso, produz-se uma excitação indireta denominada “fotosensitização”. Uma reação fotoquímica pode ainda estar acompanhada de uma reação térmica (MOORE, 2004a; VILA JATO, 2001).

Algumas vezes é necessário um período de indução para que a reação ocorra com uma velocidade significativa para ser avaliada e medida. Caso contrário, é possível que fenômenos de fotodegradação já tenham sido induzidos e apresentem uma velocidade muito lenta, de forma que a mudança não seja observável e as metodologias não permitam quantificar a fotodegradação até a reação atingir velocidades mais rápidas. Também é freqüente que, depois de iniciadas, essas reações continuem mesmo na ausência da fonte luminosa desencadeante (MOORE, 2004b; VILA JATO, 2001).

2. Definições de termos

- Fotodecomposição: decomposição química causada por energia luminosa (radiante).
- Fotofísica: quando ocorre um processo de fotoexcitação em uma entidade molecular e subseqüentes eventos que podem direcioná-la para um ou outro estado através de radiação ou radiações de transição. Não resulta em mudanças químicas.
- Fotoestabilidade: as características intrínsecas de um produto podem ser avaliadas para demonstrar que quando expostos à luz não resultaram em mudanças significativas.
- Fotolabilidade: referem-se aquelas substâncias sensíveis à luz que vão resultar em degradação.
- Fotoquímica: uma reação química causada por absorção de radiação ultravioleta, visível ou infravermelho.
- Fotoreação: refere-se às reações químicas desencadeantes por ação da luz. Vão resultar em mudanças químicas.
- Fotoredução: reações de redução induzida pela luz.
- Fotosensibilidade: termo utilizado para descrever as reações adversas à luz, as quais podem por natureza ser fototóxicas ou fotoalérgicas dentro do organismo.
- Fotossensitividade: é o processo pelo qual ocorre uma alteração fotoquímica ou fotofísica de uma entidade molecular, como resultado da absorção inicial de radiação por outra entidade molecular chamada de fotossensitizadora.
- Fototoxicidade: quando um químico não tóxico converte-se em um produto tóxico para os tecidos, após absorção de radiação eletromagnética.

3. Luz visível e ultravioleta

Luz é uma pequena banda no espectro de radiação eletromagnética, em um intervalo aproximado de 400 a 700 nanômetros, que contém todas as cores visíveis. Na forma como a conhecemos é uma gama de comprimentos de onda produzida por transições eletromagnéticas, capaz de ser percebida pelo olho humano, cuja frequência determina sua cor, o que não é casual já que a atmosfera terrestre é transparente para esse tipo de radiação. Trata-se de radiação eletromagnética pulsante ou, num sentido mais geral, qualquer radiação eletromagnética que se situa entre as radiações infravermelha e as radiações ultravioleta (CUEVAS, 1997; LIGHT ADUSTUM, 2006).

Dentro do espectro eletromagnético, a faixa visível tem a particularidade de estimular o órgão da visão tanto dos animais, como do homem. Assim, a luz branca proveniente do sol possui todos os comprimentos de onda e forma um espectro eletromagnético mais amplo que o espectro visível que podemos enxergar. Porém, esta pode ser definida como aquela fração do espectro capaz de sensibilizar a visão e está constituída pela combinação de ondas que têm energias semelhantes, sendo que nenhuma delas predomina sobre as outras. Na FIGURA 1, pode-se observar que a luz visível se situa entre as radiações infravermelha e ultravioleta (LIGHT ADUSTUM, 2006; GARRALÓN, 2006).

Por outro lado, os raios ultravioleta constituem uma parte importante da radiação que o sol envia à terra. Está localizada entre o espectro do raio x e de luz visível (FIGURA 2), com comprimento de onda de aproximadamente 400 nm até cerca de 80 nm. Esse tipo de luz possui energia que produz ionização de átomos e, como consequência, forma-se a ionosfera da Terra. Seu forte efeito químico faz com que seja tóxica para a vida, produzindo mutações cancerígenas na pele (GARRALÓN, 2006).

A radiação ultravioleta natural é produzida principalmente pelo sol, mas nem todos os comprimentos de onda chegam à superfície terrestre. Partes deles, principalmente os mais nocivos aos seres vivos, são interceptadas pela alta atmosfera na camada de ozônio. O olho humano não consegue ver facilmente no ultravioleta porque a córnea o absorve particularmente para pequenos comprimentos de onda, enquanto que o cristalino absorve melhor comprimentos de onda maiores. Alguns animais, como por exemplo abelhas e pombos, são capazes de reagir ao

espectro ultravioleta (ÍNDICE ULTRAVIOLETA, 2007; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997).

A radiação ultravioleta cobre a faixa de comprimentos de onda (λ) entre 100 e 400 nm, sendo sub-dividida em raios ultravioleta C, ultravioleta B e ultravioleta A. Os raios ultravioleta C (λ de 100 a 280 nm) são os de maior energia e os mais perigosos para a saúde, porém são absorvidos pela camada de ozônio e praticamente não alcançam a superfície terrestre; os raios ultravioleta B (λ de 280 a 315 nm), de energia intermediária, penetram a nível epidérmico, sendo os principais causadores de câncer cutâneo. Os menos nocivos, os raios ultravioleta A (λ de 315 a 400 nm), são os de menor energia e chegam a níveis profundos da derme, produzem o bronzeado e o envelhecimento prematuro (IUV, 2007; WHO, 1997).

FIGURA 1. Espectro eletromagnético: cada parte do espectro tem aplicações que lhe estão associadas, que vão desde as linhas de alta tensão que têm grandes comprimentos de onda até aos raios X e raios gama que têm comprimentos de onda muito pequenos. Entre estes extremos de comprimentos, encontram-se as ondas de rádio, as microondas, a radiação infravermelha, a luz visível e a radiação ultravioleta. Fonte: ABC das Ondas eletromagnéticas, OLIVERA *et al.*, 2002.

A luz solar encontra-se num intervalo de comprimentos de onda entre 290 nm e 780 nm, o quais somente a radiação ultravioleta de maior energia (comprimento de onda entre 290 nm a 320 nm) pode causar fotodegradação de substâncias. As lâmpadas convencionais de filamento de tungstênio são consideradas as mais seguras porque emitem radiações com o comprimento de onda maior que 390 nm (VILA JATO, 2001).

FIGURA 2. A luz visível e as radiações ultravioletas são as radiações eletromagnéticas que provocam maiores fotodegradações. Fonte: adaptado de GARRALÓN, 2006.

4. Fotodegradação de fármacos

A fotodegradação é resultado da decomposição, com conseqüente quebra da molécula em fragmentos de menor peso molecular, que surgem como efeito da absorção de energia radiante em forma de luz. Esta transformação leva, evidentemente à inatividade terapêutica do fármaco (ALBINI & FASANI, 1998; TONNENSEN, *et al.*, 2004).

A degradação pela luz, em geral, segue uma cinética mais complexa que as reações térmicas e os efeitos podem ser observados tanto no princípio ativo livre, quanto no produto final. (MOORE, 2004b; REISCH, *et al.*, 1994; VILA JATO, 2001).

A fotodegradação de uma substância depende do comprimento de onda, da intensidade e do tempo de exposição à radiação. Quando o composto absorve a luz natural do ambiente (comprimentos de onda maiores que 330 nm) é de grande importância que estudos de fotoestabilidade sejam realizados, já que, sob esta condição, os fármacos são manipulados, armazenados e, normalmente, sofrem

exposição à radiação, o que significa riscos de alteração e modificações (MOORE, 2004a; ALBINI & FASANI, 1998).

FIGURA 3. Efeitos da Fotodegradação de fármacos.

O fármaco não sofre apenas fotodegradação na manipulação, mas também pode desencadear efeitos fototóxicos dentro do organismo humano, manifestando-se como efeitos colaterais após administração em pacientes. O mecanismo postulado para tais efeitos é a interação com substratos endógenos induzidos pela luz (ANDRISANO, *et al.*, 2001a). Portanto, dois aspectos da estabilidade do fármaco devem ser observados, fotoestabilidade *in vitro* e *in vivo*. A FIGURA 3 ilustra as possíveis conseqüências da fotodegradação nos dois aspectos considerados (TONNENSEN, 2004).

A decomposição induzida pela luz é descrita para um grande número de fármacos. As FARMACOPÉIAS BRITÂNICA (2005), EUROPÉIA (2004) e AMERICANA (2005), indicam a proteção contra a luz para mais de 250 fármacos e outro número de excipientes. Novos produtos são freqüentemente adicionados à lista de compostos fotossensíveis e estudos de fotodegradação, principalmente o estudo de fototoxicidade continuam sendo o objetivo de investigação em numerosos fármacos (HUNG, 1996; REISCH, *et al.*, 1994; TONNENSEN, *et al.*, 2004).

Reações de fotodegradação são relativamente comuns em algumas categorias de fármacos, pois estes contêm, em geral, grupamentos químicos susceptíveis, dentre os quais destacam-se:

- Grupo carbonila: comporta-se como um radical eletrofílico no estado excitado $n\pi^*$. Ocorrendo uma típica reação de redução via abstração do hidrogênio intermolecular e fragmentação via α -clivagem ou via intramolecular, abstração do γ -hidrogênio seguida de $C\alpha$ - $C\beta$ clivagem. Os fármacos flumequina (BAZIN, *et al.*, 2000) e naproxeno (BOSCH, *et al.*, 1990; 2001; JIMENEZ, 1997), apresentam na reação fotolítica uma fotodescarboxilação segundo tais mecanismos.
- Grupo nitro-aromático: também se comporta como um radical eletrofílico, o que leva a uma abstração do hidrogênio intermolecular ou rearranjo em um nitrito éster. Os fármacos bloqueadores dos canais de cálcio estão nesse grupo tais como: nisoldipino (ÁLVAREZ-LUEJE, *et al.*, 1998), nifedipino (MATSUDA, *et al.*, 1989; GIBBS, *et al.*, 1992; TERAOKA, *et al.*, 1999; AMAN & THOMA, 2002; BAYOMI, *et al.*, 2002)
- A função N-óxido heterocíclicos, rearranja facilmente para uma oxaziridina e os produtos finais freqüentemente resultam como uma reação adicional de seus

intermediários. O fármaco Minoxidil resulta nessa fotoreação de N-óxido incluindo a triaminopirimidine 1-óxido minoxidil como intermediários na formação de fotoprodutos (CHINNIAN & ASKER, 1996).

- A dupla ligação conjugada C=C, responsável tanto pela E/Z isomerização como pela oxidação. Esse efeito é mostrado na vitamina A, ácido retinoico e derivados (BRISAERT & PLAIZIER-VERCAMMEN, 2000; IOELE, *et al.*, 2005) e também reações de dupla ligação em presença de oxigênio como ocorre com a vitamina K e derivados (TERAOKA & MATSUDA, 1993).
- O cloreto de arila, responsável pela descloração homolítica e/ou heterolítica. Como exemplo, pode-se citar o fármaco amilorida que sofre fotodeshalogenação, com perda do substituinte cloro (LI, *et al.*, 1999).
- Produtos que contêm uma ligação fraca C-H, por exemplo, na posição benzílica ou α para o nitrogênio da amina. Esses compostos frequentemente sofrem fragmentações fotoinduzidas, via transferência de hidrogênio ou transferência de elétron-próton. Pode-se citar a cloroquina que para o nitrogênio α da amina sofre fragmentação (NORD, *et al.*, 1991) e triantereno que sofre fragmentação do C-H do anel na posição benzílica (VARGAS, *et al.*, 1998a; FIORI, 2003).
- Sulfitos, alcenos, polienos e fenóis, são altamente reativos com o singlete de oxigênio. Esse oxigênio singlete é formado através de fotossensitização de estados de oxigênio relativamente inócuos. A reação de sulfitos da estrutura ocorre na acetazolamida (VARGAS, *et al.*, 1998b), e uma típica fotoreação de polienos ocorre com a estrutura da anfotericina B (THOMA & KÜBLER, 1997).

Na TABELA 1, são apresentados os principais grupos funcionais e moléculas de fármacos que têm grande probabilidade de induzir a fotoreatividade pela característica conformacional ou por seu comportamento molecular, dependendo de algumas condições, tais como fontes de radiação e tempo de exposição (ALBINI & FASANI, 1998).

TABELA 1. Grupos funcionais que apresentam fotoreatividade.

Grupo Funcional	Estrutura
Grupos carbonila
Grupos nitroaromáticos
Função N-óxido
Dupla ligação e dupla ligação conjugada
Produtos que contém uma ligação fraca C-H (em posição benzílica ou α para o nitrogênio da amina)
Cloretos de arila
Alcenos
Sulfitos
Fenóis e polienos

Fonte: ALBINI & FASANI, 1998.

É importante desatacar que a maioria das informações disponíveis na literatura acerca das condições e dos processos de fotorreação, envolvem uma complexa fotoquímica e fotofísica. Assim, é difícil definir as condições de fotorreatividade do fármaco, uma vez que estes são sempre diferentes. Pode-se inferir que a fotorreatividade vai depender do fármaco em estado sólido ou em solução, das condições externas e da fonte e irradiação (MOORE, 2004a; ALBINI & FASANI, 1998).

Embora ainda não exista nenhum método com o qual possam-se extrapolar os dados obtidos em condições aceleradas de irradiação para condições lumínicas normais, o efeito da luz deve ser estudado na etapa de pré-formulação (VILA JATO, 2001; TONNENSEN, 2004).

As condições empregadas em um teste de fotodegradação acelerada podem estar longe daquelas nas quais um fármaco ou uma formulação estão normalmente expostos. Entretanto, os dados obtidos podem indicar como a substância se comporta dentro de condições exageradas ou pode também não ser afetada pelo mínimo estresse. Evidências da fotodegradação em condições extremas (degradação forçada), alertam o pesquisador da necessidade de que testes sejam efetuados dentro de condições normais. Além disso, podem fornecer uma base para o desenvolvimento de uma metodologia analítica e determinar os potenciais fotodegradantes (HUNG, 2004; ALBINI & FASANI, 1998).

As pesquisas sobre fotodegradação de fármacos na presença da luz vêm ganhando destaque nas últimas décadas e é possível encontrar na literatura, grande número de estudos nos quais a fotodegradação é descrita para vários fármacos, dentre eles anti-hipertensivos, antiinflamatórios, antibióticos, ansiolíticos, antimaláricos, diuréticos e vitaminas (TABELA 2).

TABELA 2. Exemplos de fármacos que sofrem fotodegradação.

Fármaco	Classe terapêutica*	Referência
Acetazolamida	Oftálmico	VARGAS, <i>et al.</i> , 1998b
Ácido mefenâmico	Analgésico	WERNER, <i>et al.</i> , 2005
Ácido nalidíxico	Antiinfecioso: quimioterápico	VERMEERSCH, <i>et al.</i> , 1989
Ácido tiaprofênico	Antinflamatório**	MIRANDA, <i>et al.</i> , 1997; SARABIA, <i>et al.</i> , 2000
Alprazolam	Sedativo ansiolítico	NUDELMAN & GALLARDO CABRERA, 2002
Amilorida	Diurético	LI, <i>et al.</i> , 1999
Anfotericina B	Antiinfecioso: antifúngico	THOMA & KÜBLER, 1997
Anlodipino	Cardiovascular: dilatador coronário	JANG, <i>et al.</i> ; 2006; RAGNO, <i>et al.</i> , 2003b; RAGNO, <i>et al.</i> , 2002
Atenolol	Cardiovascular: Anti-hipertensivo	ANDRISANO, <i>et al.</i> , 1999.
Atorvastatina	Antilipêmico	CERMOLA, <i>et al.</i> , 2006
Cefalexina	Antiinfecioso: antibiótico	RAY, <i>et al.</i> , 2002
Cefradina	Antiinfecioso: antibiótico	RAY, <i>et al.</i> , 2002
Cetoprofeno	Antireumático: AINE	MOSER <i>et al.</i> , 2000
Cloranfenicol	Antiinfecioso: antibiótico	GARCIA BAUTISTA, <i>et al.</i> , 2000; ICARDO, <i>et al.</i> , 2003b
Cloroquina	Antiinfecioso: antiprotozoários	NORD, <i>et al.</i> , 1991; ELFATIH, <i>et al.</i> , 1994; NORD, <i>et al.</i> , 1997a, 1997b; TONNENSEN, <i>et al.</i> , 1998; TONNENSEN & BAERTSCHI, 2004

Fonte: *KOROLKOVAS, 2006; **MERCK INDEX, 2006.

Continua.....

Fármaco	Classe terapêutica*	Referência
Ciprofloxacino	Antiinfecioso: quimioterápico	TORNIAINEN, <i>et al.</i> , 1996; OUÉDRAOGO, <i>et al.</i> , 2000.
Clorotiazida	Diurético	ULVI, 1998.
Daunorrubicina	Antineoplásico: antibiótico	ISLAM & ASKER, 1995
Digoxina	Cardiovascular: insuficiência cardíaca	REISCH, <i>et al.</i> , 1994; VASIC, <i>et al.</i> , 2006
Diltiazem	Cardiovascular: Anti- hipertensivo	ANDRISANO, <i>et al.</i> , 2001a
Dipirona (Metamizol)	Analgésico-Antipirético	PITARELLO, <i>et al.</i> , 2005
Ditranol	Queratolítico e queratoplástico	THOMA & HOLZMANN, 1998
Flumequina	Antibacteriano**	BAZIN, <i>et al.</i> , 2000.
Flutamida	Antineoplásico	SORTINO, <i>et al.</i> , 2001
Furosemida	Diurético	MOORE & SITHIPITAKS, 1983; VARGAS, <i>et al.</i> , 1998c
Hidroclorotiazida	Diurético	ULVI, 1998.
Hidroprogesterona	Hormônio	ZHAN, <i>et al.</i> , 1998
Ibuprofeno	Analgésico-antipirético: AINE	GABRIELE-CAVIGLIOLI, <i>et al.</i> , 2002.
Indometacina	Antireumático: AINE	WEEDON & WONG, 1991
Irinotecana	Antineoplásico	DODDS, <i>et al.</i> , 1998

Fonte: *KOROLKOVAS, 2006; **MERCK INDEX, 2006.

Continua.....

Fármaco	Classe terapêutica*	Referência
Isradipino	Cardiovascular: dilatador coronário	MIELCAREK & DACZKOWSKA, 1999.
Lercanidipino	Cardiovascular: anti-hipertensivo	FIORI, <i>et al.</i> , 2006.
Labetalol	Anti-hipertensivo**	ANDRISANO, <i>et al.</i> , 2001b
Lacidipino	Cardiovascular: anti-hipertensivo	DE FILIPPIS, <i>et al.</i> , 2002; RAGNO, <i>et al.</i> , 2006
Lomefloxacino	Antiinfecioso: quimioterápico	OUÉDRAOGO, <i>et al.</i> , 2000.
Loratadina	Antialérgico	ABOUNASSIF, <i>et al.</i> , 2005
Manidipino	Cardiovascular: anti-hipertensivo	RAGNO, <i>et al.</i> , 2003a
Mefloquina	Antiinfecioso: antiprotozoários	TONNESEN & GRISLINGAAS, 1990; TONNESEN, 1999; NAVARATNAM, <i>et al.</i> , 2000.
Metildopa	Cardiovascular: anti-hipertensivo	RAMADAN, <i>et al.</i> , 2006
Melatonina	Neuro-hormônio**	ANDRISANO, <i>et al.</i> , 2000
Midazolam	Sedativo-hipnótico	ANDERSIN & TAMMILEHTO, 1995
Minoxidil	Cardiovascular: vasodilatador direto	CHINNIAN & ASKER, 1996.
Molsidomina	Antianginoso**	AMAN & THOMA, 2002
Moxifloxacino	Antiinfecioso: quimioterápico	SUNDERLAND, <i>et al.</i> , 2001; MOTWANI, <i>et al.</i> , 2007
Nabumetona	Anti-reumático	MORIWAKI, <i>et al.</i> , 2001; VALERO & COSTA, 2003; VALERO, 2004.

Fonte: *KOROLKOVAS, 2006; **MERCK INDEX, 2006.

Continua.....

Fármaco	Classe terapêutica*	Referência
Naproxeno	Analgésico-antipirético: AINE	BOSCÁ, <i>et al.</i> , 1990; 2001 JIMÉNEZ, <i>et al.</i> , 1997; VALERO & ESTEBAN, 2004; VALERO & CARRILLO, 2004.
Nelfinavir	Antiinfecioso: quimioterápico antiviral	KAUL, <i>et al.</i> , 2004
Nicardipino	Anti-hipertensivo**	SQUELLA & NUÑEZ- VERGARA, 1990; TERAOKA, <i>et al.</i> , 2004; POMPONIO, <i>et al.</i> , 2004
Nimodipino	Cardiovascular: vasodilatador	RAGNO, <i>et al.</i> , 1995
Nilvadipino	Anti-hipertensivo**	MIELCAREK, <i>et al.</i> , 2000.
Nitrendipino	Cardiovascular: anti- hipertensivo	SQUELLA & NUÑEZ- VERGARA, 1990; RAGNO, <i>et al.</i> , 1993; TIPRE & VAVIA, 2001
Nisoldipino	Cardiovascular: dilatador coronário	ÁLVAREZ-LUEJE, <i>et al.</i> , 1998
Nifedipino	Cardiovascular: dilatador coronário	SQUELLA, <i>et al.</i> , 1989; MATSUDA, <i>et al.</i> , 1989; SQUELLA & NUÑEZ- VERGARA, 1990; BÉCHARD, <i>et al.</i> , 1992; GIBBS, <i>et al.</i> , 1992; GRUNDY, <i>et al.</i> , 1994; DE VRIES & BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, 1998; TERAOKA, <i>et al.</i> , 1999; ABOU-AUDA, <i>et al.</i> , 2000; AMAN & THOMA, 2002; BAYOMI, <i>et al.</i> , 2002
Nistatina	Antiinfecioso: antifúngico	RAY, <i>et al.</i> , 2002

Fonte: *KOROLKOVAS, 2006; **MERCK INDEX, 2006.

Continua.....

Fármaco	Classe terapêutica*	Referência
Nitrofurazona (Nitrofurul)	Antiinfecioso tópico	SHAHJAHAN & ENEVER 1996a, 1996b.
Norfloxacino	Antiinfecioso: quimioterápico	CÓRDOBA-DIAZ, <i>et al.</i> , 1998; OUÉDRAOGO, <i>et al.</i> , 2000.
Pergolida	Antiparkinsoniano	KOTZAGIORGIS, <i>et al.</i> , 2007.
Piroxicam	Anti-reumático: AINE	BARTSCH, <i>et al.</i> , 1999
Pirazinamida	Antiinfecioso: tuberculostático	VARGAS, <i>et al.</i> , 2003.
Pizotifeno	Antienxaqueca	ABOUNASSIF, <i>et al.</i> , 2005
Primaquina	Antiinfecioso: antiprotozoários	KRISTENSEN, <i>et al.</i> , 1993; 1997; 1998.
Propranolol	Cardiovasculares: antiarrítmicos	UWAI, <i>et al.</i> , 2005
Riboflavina	Nutriente: vitamina	LOUKAS, <i>et al.</i> , 1996; AHMAD, <i>et al.</i> , 2004; 2005; 2006.
Rosuvastatina	Antilipêmico	ASTARITA, <i>et al.</i> , 2007
Sulfacetamida	Antiinfecioso: sulfonamida	AHMAD, 1982; ICARDO, <i>et al.</i> , 2003a.
Sulfametoxazol	Antiinfecioso: sulfonamida	ZHOU & MOORE, 1994; ICARDO, <i>et al.</i> , 2003a.
Sulfanilamida	Antiinfecioso: sulfonamida	ICARDO, <i>et al.</i> , 2003a.
Sulfatiazol	Antiinfecioso: sulfonamida	ICARDO, <i>et al.</i> , 2003a.

Fonte: *KOROLKOVAS, 2006; **MERCK INDEX, 2006.

Continua...

Fármaco	Classe terapêutica*	Referência
Suprofen	Antinflamatório**	DE GUIDI, <i>et al.</i> , 1994; SARABIA, <i>et al.</i> , 2000
Tolmetina	Antinflamatório**	GIUFFRIDA, <i>et al.</i> , 1995
Triantereno	Diurético	VARGAS, <i>et al.</i> , 1998a
Ubidecarenona (Ubiquinona)	Coenzima	TAKEUCHI, <i>et al.</i> , 1992
Vitamina A	Nutriente: Vitamina	BRISAERT & PLAIZIER- VERCAMMEN, 2000; IOELE, <i>et al.</i> , 2005.
Vitamina C	Nutriente: Vitamina	SIDHU & SUGDEN, 1992
Vitamina K	Nutriente: vitamina	TERAOKA & MATSUDA, 1993

Fonte: *KOROLKOVAS, 2006; **MERCK INDEX, 2006.

5. Comportamento fotoquímico de fármacos

Apresentam-se alguns dos principais fármacos que sofrem fotodegradação *in vivo* e *in vitro*, com marcados efeitos fototóxicos e que desenvolvem potenciais efeitos de fotossensitização das moléculas dentro do organismo.

Acetazolamida, estudos revelam reações cutâneas adversas, relacionadas à luz, esses efeitos estão ligados com os efeitos do oxigênio ou singleto de oxigênio. Segundo o mecanismo de fotoreação proposto, ocorre reação no S do anel e a dupla ligação, demonstrando significativa fotodegradação entre 300 e 337 nm, sob condições aeróbicas, na estrutura do sulfito (VARGAS, *et al.*, 1998b).

Alprazolam, fármaco benzodiazepínico, um grupo de fármacos de reconhecida fotolabilidade e para os quais existem relatos de fotossensitividade. Os estudos indicaram que o fármaco submetido à radiação UVA e UVB apresenta significativa fotodegradação. O mecanismo proposto é a quebra do anel heterocíclico (fenômeno usualmente observado na fotoreação das benzodiazepinas). O alprazolam reage mediante uma decloração no anel benzênico e abertura do anel benzodiazepinona com subsequente formação de três fotoprodutos: triazoaminoquinoleína, 8H-alprazolam e 5-cloro-[5-metil-4H-1,2,4-triazol-4-il]benzofenona (NUDELMAN & GALLARDO CABRERA, 2002).

Amilorida, foram observadas reações adversas cutâneas, relacionadas à luz do sol. Esses estudos reportam fotodegradação por decloração do fármaco, que por sua vez produz uma fotosensitização via singlete de oxigênio. Sob as condições do estudo, o fármaco foi capaz de absorver a radiação UV-A, presente na luz solar e artificial que foi então relacionado aos efeitos adversos mencionados (LI, *et al.*, 1999).

Anlodipino, os estudos relatam a fotossensibilidade do fármaco tanto à luz solar como artificial. O maior produto de fotodegradação é um derivado piridinico, formado por oxidação do nitrogênio do anel piridinico e catalisado pela luz (RAGNO, *et al.*, 2002; 2003b)

Atenolol, sob determinadas condições deste estudo, o fármaco é capaz de absorver a radiação UV-A e UV-B, presente na luz solar e artificial. O mecanismo proposto para a fotodegradação é a reação por desidratação na ligação do éter (ANDRISANO, *et al.*, 1999).

Ciprofloxacin, estudos apontam que o fármaco é fotossensível e fortemente dependente da sua concentração e do pH do meio, sendo que a maior estabilidade é alcançada em pH 3,0 - 4,0. O mecanismo da possível fotodegradação ocorre no anel piperazinico, onde, o nitrogênio pode ser completamente protonado e no grupo carbonila que sofre completa ionização (TORNIAINEN, *et al.*, 1996).

Cloroquina, este fármaco existe risco de fotosensitização cutânea e ocular, incluindo retinopatia, por fotodegradação. Um mecanismo de fotodegradação foi proposto, em solvente orgânico (iso-propanol) sob condições aeróbicas, que revela a

quebra da molécula em até 15 sub-produtos de fotodegradação dos quais somente sete foram isolados, sendo esses considerados os mais importantes (NORD, *et al.*, 1991; TONNENSEN, *et al.*, 1998).

FIGURA 4. Esquema de fotodegradação de difosfato de cloroquina iso-propanol, com os principais produtos de fotodegradação (NORD, *et al.*, 1991).

Diltiazem, efeitos de fotossensitização cutânea como acne, dermatite e urticária, foram revelados. As propriedades fotoquímicas referem-se a sua capacidade de absorver a radiação UV-A e UV-B da luz solar e artificial, sendo também fortemente dependente do pH, principalmente em pH 9,0 onde se produz a maior reação de fotodegradação e formação de um S-óxido (ANDRISANO, *et al.*, 2001).

Flumequina, efeitos de fotossensitização cutânea são relacionados ao seu uso. Os estudos indicam que sob irradiação de UV-A observaram-se mecanismos de descarboxilação na formação dos produtos de fotodegradação. Sua reatividade cutânea é devida à formação de radicais livres como singletos de oxigênio (BAZIN, *et al.*, 2000).

Furosemida, foram observados efeitos de fotossensitividade e fotoreação cutânea. Sofre uma fotoredução do cloro do anel aromático e fotohidrólise do anel furfurílico. Esses mecanismos de fotodegradação ocorrem em presença de oxigênio (MOORE & SITHIPITAKS, 1983; FIORI, *et al.*, 2003),

Indometacina, estudos realizados em diferentes solventes revelaram reações fotoquímicas do tipo de fotociclo-adição de alcenos, rearranjo de Fries e descarboxilação do ácido acético. Os produtos de degradação obtidos foram considerados potenciais fototóxicos e indutores de fotoreação alérgica cutânea e ocular (WEEDON & WONG, 1991).

Labetalol, o fármaco exposto à radiação UVA-UVB, mostra significativa fotodegradação. Foram testadas também variações de pH e diferentes fontes de luz, em que se observa que o meio alcalino favorece as reações de fotodegradação envolvendo reações de N-dealquilação e homólise da ligação carbono-carbono (ANDRISANO, *et al.*, 2001).

Mefloquina, efeitos de mudanças na pigmentação da pele, da córnea, da retina, são descritos e associados à fotoreação. A fotossensibilidade do fármaco e a formação de produtos de degradação são dependentes das condições aeróbicas. O mecanismo de reação mostra o tripleto de mefloquina como o principal responsável da fotodegradação e fotossensitização, e os radicais livres, singletos de oxigênio e superóxidos como os responsáveis pela fototoxicidade e reações fotoalérgicas (TONNESEN & GRISLINGAAS, 1990; TONNESEN, 1999; NAVARATNAM, *et al.*, 2000).

Moxifloxacin, estudos revelam que após fotodegradação, a potência do fármaco diminui em até 50%. O mecanismo da possível fotodegradação ocorre no anel piperazinico, sendo que o nitrogênio será completamente protonado e também ocorre uma completa ionização do grupo carbonila (SUNDERLAND, *et al.*, 2001; MOTWANI, *et al.*, 2007).

Naproxeno, sua fotosensibilidade e efeitos adversos foram observados, principalmente na pele, donde se manifesta seu potencial efeito fototóxico. O mecanismo de fotodegradação e os produtos formados derivam de uma fotodescarboxilação que leva a formação de um etilo, 1-hidroxietilo e acetil, com quebra da cadeia lateral. Por outro lado, o mecanismo que envolve a fotoreação no organismo humano deriva de processo de fotoionização por desativação de uma molécula excitada sob condições apropriadas de irradiação, levando à formação de radicais livres e, sob condições aeróbicas, à formação de oxigênio singlete (BOSCA, *et al.*, 1990; 2001; JIMENEZ, 1997).

Nisoldipino, o mecanismo dos mais importantes produtos de fotodegradação deriva da redução do grupo nitro, não entanto ocorre uma maior redução no nitroso derivado formando a nitrosopiridina, esse maior produto é obtido pela coplanaridade do anel benzênico e do anel piridínico (ÁLVAREZ-LUEJE, *et al.*, 1998).

Nifedipino, usado como fármaco modelo nos ensaios e testes de fotodegradação por ser extremamente fotossensível. Foram revelados reações de fototoxicidade e fotossensitização na pele de pacientes submetidos à terapia com esse fármaco. Estudos reportam a alta fotossensibilidade que foi observada em experimentos realizados no estado sólido, onde o fármaco muda da cor amarelada para marrom em poucas horas de exposição. Por outro lado, o mecanismo de fotodegradação proposto está fundamentado na estrutura do fármaco, já que este possui dois centros redox, um anel dihidropiridínico e um anel nitro aromático (SQUELLA, *et al.*, 1989; GIBBS, *et al.*, 1992; DE VRIES & BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN 1998). De acordo com MATSUDA, *et al.* (1989), existem dois produtos de fotodegradação, um nitroso derivado (nitrosopiridina) e um nitro derivado, originados por reações de redução. Esses produtos de degradação possuem pouco ou nenhum efeito farmacológico. Foram também, investigados efeitos sobre a fotoestabilidade do fármaco, com o tamanho de partícula, com os processos de formulação e compressão (AMAN & THOMA, 2002). São reportados, também, estudos para proteger o fármaco da fotodegradação, em que foram utilizados ciclodextrinas e dióxido de titânio como filme protetor dos comprimidos (BÉCHARD, *et al.*, 1992; BAYOMI, *et al.*, 2002). A fotodegradação e a fotoestabilização desse fármaco continua recebendo considerável atenção na literatura (TERAOKA, *et al.*, 1999; ABOU-AUDA, *et al.*, 2000).

Pirazinamida, estudos revelam a sua fotosensibilidade à luz (UVA principalmente) e sob condições aeróbicas, sendo descritos quatro fotoprodutos obtidos após exposição à luz. O mecanismo proposto para explicar esse processo de fotodegradação envolve α -clivagem da cadeia lateral, em que iniciam a reação com a clivagem da ligação carbono-carbono entre a carbonila do grupo amido e o anel aromático, e a reação continua com a formação de um radical fenil, como intermediário, via abstração de hidrogênio e dimerização (VARGAS, *et al.*, 2003).

Primaquina, pertence ao grupo dos fármacos quinolínicos de conhecida fotossensibilidade. Foram observados efeitos oculares e cutâneos de fotossensibilidade manifestados como irritação cutânea e efeitos oculares de acumulação na retina. Estudos reportam que a fotodegradação em meio aquoso ocorre sob mecanismos de clivagem da cadeia lateral, deixando a estrutura quinolínica inalterada. Foi observado que durante a irradiação em presença de oxigênio, este acelera a fotodecomposição da molécula. Os produtos de degradação obtidos não são fotoquimicamente inertes e podem participar em reações secundárias dentro do organismo humano. Os maiores produtos de fotodegradação não necessariamente são formados *in vivo*, mas são formados *in vitro* após exposição, e apresentam potencial efeito de fototoxicidade cutânea: na pele e retina. Como foi observado nos estudo *in vitro* realizados por KRISTENSEN, *et al.*(1993; 1997; 1998).

FIGURA 5. Esquema de fotodegradação de primaquina em tampão fosfato pH 7,4 0.05 M após exposição à luz (320-600 nm), R no composto 7 é $C_9H_{12}NO_4$ (KRISTENSEN, *et al.*, 1993).

Propranolol, essa molécula é bastante fotossensível, sendo observadas mudanças de cor no estado sólido, em que o fármaco de amarelado vai mudando para marrom chegando finalmente ao preto, com o tempo e intensidade de exposição. Foram isolados e analisados três produtos de fotodegradação e os mecanismos propostos para a formação destes, sugerem uma acetilação do grupo amino formando o N-acetilpropranolol e os outros dois compostos foram o 1-naftol e N-formilpropranolol (UWAI, *et al.*, 2005).

Riboflavina, estudos revelam que existe maior suscetibilidade de fotodegradação na molécula não ionizada que na molécula ionizada, porém, a fotoquímica desse composto é dependente do pH. Foi demonstrado que existe menor fotodegradação entre o pH 5,0 - 6,0. A riboflavina é fotossensível à luz UV e visível, atuando via formação de oxigênio singleto ou via radicais incluindo oxigênio reativo do tipo íon superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio. São propostos dois mecanismos de formação de produtos de fotodegradação por fotoadição e fotoredução, sendo ambos fortemente dependentes da intensidade e do comprimento de onda da fonte irradiação, formando-se até quatro produtos de degradação: 7,8-dimetil-10-(formilmetil)-isoaloxazina, lumicrome, lumiflavina e ciclodehidroriboflavina (LOUKAS, *et al.*, 1996; AHMAD, *et al.*, 2004; 2005; 2006).

Triantereno, estudos revelaram que o fármaco é fotossensível para irradiação UVB, formando produtos de degradação e sob irradiação UVA, em condições aeróbicas, é capaz de transmitir energia ao oxigênio molecular e subsequente formação de um oxigênio singleto que vai gerar o potencial efeito de fototoxicidade como demonstrado em ensaios desenvolvidos em fluidos biológicos, simulando condições *in vivo* (VARGAS, *et al.*, 1998a; FIORI, 2003).

Sulfametoxazol, esse fármaco é extremamente fotossensível, especialmente em meio ácido. O principal produto de fotodegradação resulta da fotoisomerização do anel isoxazol, o 4-amino-N-(5-metil-2-oxazolyl)benzenesulfonamida (I), um produto hidratado da 2H-azirina (II), anilina (III), ácido sulfanílico (IV), 3-amino-5-metilisoxazol (V). O mecanismo de formação desses fotoprodutos inicia-se com a clivagem da ligação do nitrogênio-oxigênio e a conseqüente formação de um composto intermediário e posterior formação do produto II, sendo que este último atua como intermediário na formação dos outros fotoprodutos. Os estudos também postulam que o maior produto de degradação formado (I) é responsável pelas conhecidas reações de fotosensitização por exposição à luz (ZHOU & MOORE, 1994; ICARDO, *et al.*, 2003a).

FIGURA 6. Esquema de fotodegradação de sulfametoxazol foram observados cinco produtos de fotodegradação (ZHOU & MOORE, 1994).

Sulfacetamida e Sulfanilamida pertencem ao grupo de antibióticos sintéticos chamados sulfas. São usados no tratamento de doenças infecciosas oftálmicas. A sulfacetamida apresenta alta fotosensibilidade, sendo facilmente fotolisada para sulfanilamida (AHMAD, 1982; ICARDO, *et al.*, 2003a).

6. Associação de fármacos

Existem também associações de fármacos que potencializam o efeito da fotodegradação. Na TABELA 3 são citados alguns exemplos desses fármacos. Pode-se mencionar a riboflavina, que é conhecida por induzir efeitos de fotodegradação sob certos fármacos como as tetraciclina e fenilefrina, sob condições aeróbicas ou anaeróbicas. Os mecanismos explicam a formação de radicais livres e diminuição de sua atividade terapêutica.

Outro grupo de fármacos, comumente utilizado em associação, são os diuréticos. O triantereno apresenta maior fotodegradação em presença de furosemida, porém, em presença de hidroclorotiazida, além do incremento da fotosensibilidade, foi observada uma maior toxicidade nos produtos da fotodegradação.

Os antineoplásicos como o metotrexato também apresenta fotodegradação incrementada em presença de vimblastina, somente com a luz ambiente sofre fotodegradação, já frente da luz do sol a fotodegradação de ambos fármacos é incrementada.

TABELA 3. Associação de fármacos que sofrem fotodegradação.

Associação de fármacos	Classe terapêutica*	Referência
Riboflavina + Tetraciclina	Vitamina e tetraciclina	CASTILLO <i>et al.</i> , 2007
Riboflavina + Fenilefrina	Vitamina B2 e midriático, descongestionante**	MASSAD <i>et al.</i> , 2005
Triantereno + Furosemida	Associação de diuréticos	FIORI <i>et al.</i> , 2003
Triantereno + hidroclorotiazida	Associação de diuréticos	MOORE & MALLESCH, 1991
Metotrexato + vimblastina	Antineoplásicos	McELNAY <i>et al.</i> , 1988.

Fonte: *KOROLKOVAS, 2006; **MERCK INDEX, 2006.

7. Fotodegradação no estado sólido.

A fotodegradação no estado sólido é consideravelmente diferente da fotodegradação em solução. O mecanismo de degradação de fármacos no estado sólido é muito mais difícil e complexo de medir, controlar e explicar. As reações no estado sólido acontecem de forma lenta, porém, freqüentemente, são empregadas para esses estudos condições extremas que permitam realizar de forma mais rápida previsões do comportamento frente à exposição da luz. (ORFORD, *et al.*, 1998; VILA JATO, 2001).

No estado sólido, o processo fotoquímico tem lugar na superfície do produto. Na melhor das hipóteses, o interior do produto pode ser afetado, sendo independente do tempo de exposição. Na prática, mede-se a concentração do fármaco em função do tempo de irradiação, que não necessariamente segue um modelo e ordem de reação, de forma que, é melhor expressar a velocidade de degradação em termos de tempo (TONNENSEN, 2001; VILA JATO, 2001).

Por outro lado, o mais óbvio resultado de uma amostra sólida irradiada é a mudança na sua aparência, por exemplo, branqueamento dos compostos coloridos e coloração de produtos sem cor, após fotodegradação do composto, e embora a mudança na aparência não necessariamente esteja relacionada à degradação do composto e vice-versa. Algumas vezes, a reação sofrer a influência

da temperatura, umidade e outros fatores relacionados, além da fotodegradação (TONNENSEN, *et al.*, 1998).

Na fotodegradação de fármacos no estado sólido, características como a cor, o tamanho de partícula e a área de superfície são importantes e devem ser consideradas quando dos estudos de pré-formulação. Entretanto, a estrutura cristalina é o aspecto de maior relevância e pode influenciar de modo bastante significativo na fotoestabilidade do produto sob a forma de pó (THOMA, 1996).

Estudos mostram que diferentes polimorfos de um mesmo fármaco apresentam drásticas diferenças na fotodegradação, indicando a grande influência da estrutura cristalina no estado sólido como demonstrado para alguns antagonistas dos leukotrienos B4 (ORFORD *et al.*, 1998, TONNENSEN *et al.*, 1998).

8. Fotodegradação em solução

Efeitos de reações secundárias foram descritas por GLASS, *et al.*, 2004, tanto de fármaco, como de fotoprodutos com o solvente em solução, que resultam na formação de espécies que não foram possíveis no estado sólido, porém existe uma diferença marcada nas reações no estado líquido em diferentes meios.

A concentração de uma solução submetida a fotodegradação, tem muita influência na reação. Em solução a luz será absorvida na superfície da amostra, assim, se essa contém o fármaco em alta concentração as suas moléculas dentro do volume se tornaram protegidas e a irradiação pode não alterar ou desencadear reação alguma. Porém, uma solução concentrada é provavelmente mais estável que uma solução diluída (TONNENSEN, 2001).

Para muitas das substâncias em solução, a fotodegradação é um processo dependente da forma de ionização da molécula, nesse caso a modificação do pH na solução tem marcada influência na fotoestabilidade, como foi demonstrado para os fármacos ciprofloxacino (TORNIAINEN & TAMMILEHTO, 1996), midazolam (ANDERSIN & TAMMILEHTO, 1995), cloroquina (NORD *et al.*, 1997a,b; TONNENSEN *et al.*, 1998) e mefloquina (TONNENSEN, 1999). Por outro lado, os vários tipos de solução tampão exercem diferentes efeitos nos processos de fotodegradação, conforme demonstrados para os fármacos daunorrubicina (ISLAM & ASKER, 1995) e mefloquina (TONNENSEN, 1999).

É conhecida a influência dos sais, por exemplo o íon fosfato, nas propriedades fotoquímicas, facilitando a transferência de prótons para o estado excitado das espécies que estão reagindo. Os sais de tampão como o citrato podem mudar a característica de absorção da formulação para formar um complexo com outros componentes presentes, principalmente em produtos que absorvem parte do espectro visível (TONNENSEN, 2001; GLASS, *et al.*, 2004).

CHINNIAN & ASKER, 1996; com o minoxidil reportam que o incremento na força iônica tem efeitos na fotoestabilidade deste fármaco, formando um filme protetor de solvatos ao redor da molécula mantendo a fotoestabilidade do composto.

Um fato de grande importância nas reações fotoquímicas é a presença de oxigênio, já que o mecanismo é muito complexo, envolve reações de singlete de oxigênio e radicais livres. Descreve-se que um fármaco pode ser desestabilizado por redução da concentração de oxigênio. Colocar a solução no recipiente e injetar um gás inerte pode causar uma desestabilização fotoquímica este é o caso, dos antimaláricos, cloroquina (NORD *et al.*, 1997b); primaquina (KRISTENSEN *et al.*, 1998) e mefloquina (TONNENSEN, 1999).

9. Ciclodextrinas e fotodegradação

As ciclodextrinas são oligossacarídeos obtidos a partir do amido. Elas são muito usadas para encapsulação por inclusão molecular. Estão formadas por um número variável de unidades de glicose enlaçadas entre si por ligações α -1,4. (UEKAMA *et al.*, 1998; BIBBY *et al.*, 2000; LOFTSSON & DUCHÊNE, 2007)

Tem a forma de um cone truncado com uma cavidade interior, essa característica estrutural das ciclodextrinas possibilita a utilização desses compostos como hospedeiros na formação de complexos de inclusão, permitindo as ciclodextrinas complexarem-se com moléculas que apresentam dimensões e polaridade compatíveis com sua cavidade (UEKAMA *et al.*, 1998).

O aspecto molecular tem possibilitado a utilização de ciclodextrinas em diferentes áreas da ciência e tecnologia, em função da possibilidade de obter novos fármacos com propriedades físicas e químicas diferentes com o mesmo princípio ativo. Na indústria farmacêutica, essas características associadas à baixa toxicidade, são o principal domínio de sua aplicação. (IRIE & UEKAMA, 1997; UEKAMA, 2002).

Muitas aplicações vem sendo consideradas, como melhora de solubilidade, liberação, mas existe outra aplicação importante que vem sendo estudado nas últimas décadas é a utilização das ciclodextrinas como agentes encapsulantes, na melhora da fotoestabilidade de fármacos. Alguns trabalhos mostram que as ciclodextrinas são bem aceitas na formação de complexos que permitem melhorar a fotoestabilidade do fármaco. A TABELA 4 mostra alguns exemplos de fármacos encapsulados em ciclodextrinas que apresentam alguma fotoproteção. Sabe-se que a estrutura rígida das diferentes ciclodextrinas permite o isolamento e estudo de apenas um confômero, facilitando a compreensão de eventos fotofísicos e fotoquímicos.

O encapsulamento em ciclodextrina da dipirona (PITARELLO, *et al.*, 2005) promove uma melhora da estabilidade frente a fotólise por luz ultravioleta, em que os melhores resultados foram obtidos com γ -ciclodextrina, em pH 3,0, reduzindo em 58,5% a degradação do fármaco. No entanto, a β -ciclodextrina também estabiliza o fármaco com um efeito de 36,7 % no mesmo pH 3,0.

O ibuprofeno também apresenta melhora na estabilidade fotoquímica com HP- β -ciclodextrina, como demonstrado por GODWIN, *et al.*, 2006. Além disso, foram realizados estudos adicionais sobre aplicação tópica de complexos de ibuprofeno, sob a pele dos indivíduos, após foi submetida a exposição à luz UV e também foi observada uma boa fotoproteção da pele.

O Isradipino, o nicardipino e o nifedipino, como mencionado anteriormente, tem fotosensibilidade conhecida e também apresentam melhoras significativas na fotodegradação após encapsulação com as diferentes ciclodextrinas (MIELCAREK & DACZKOWSKA, 1999). Para o isradipino, foi utilizada a metil- β -ciclodextrina por sua baixa polaridade e melhor solubilidade que a β -ciclodextrina, onde foi observada uma melhor complexação e fotoproteção.

POMPONIO, *et al.*, 2004 estudaram o nicardipino que apresentou melhora na fotoestabilidade em β -ciclodextrina, hidroxipropil- α -ciclodextrina, hidroxietil- β -ciclodextrina. Além disso, foram testadas outras ciclodextrinas, como γ -ciclodextrina, hidroxipropil- β -ciclodextrina, hidroxipropil- γ -ciclodextrina e metil- β -ciclodextrina, onde os resultados não foram relevantes. Já BAYOMI, *et al.*, 2002. demonstraram a fotoproteção do nifedipino em β -ciclodextrina, HP- β -ciclodextrina, DM- β -ciclodextrina, utilizando métodos de co-precipitação.

TABELA 4. Fármacos complexados com ciclodextrinas e estudos de fotodegradação

Associação de fármacos	Tipo de ciclodextrina	Referência
Dipirona	β -ciclodextrina e γ -ciclodextrina	PITARELLO <i>et al.</i> , 2005
Ibuprofeno	HP- β -ciclodextrina	GODWIN <i>et al.</i> , 2006.
Isradipino	Me- β -ciclodextrina	MIELCAREK & DACZKOWSKA, 1999.
Nicardipino	β -ciclodextrina, HP- α -ciclodextrina, HE- β -ciclodextrina	POMPONIO <i>et al.</i> , 2004.
Nifedipino	HP- β -ciclodextrina, β -ciclodextrina, DM- β -ciclodextrina	BAYOMI <i>et al.</i> , 2002.
Naproxeno	HP- β -ciclodextrina (PVP), β -ciclodextrina (PEG)	VALERO & ESTEBAN, 2004; VALERO & CARRILLO, 2004.
Riboflavina	HP- β -ciclodextrina	LOUKAS <i>et al.</i> , 1996

* HP: hidroxipropil, HE: hidroxietil, DM: dimetil.

Estudos de complexação ternária para o naproxeno (VALERO & ESTEBAN, 2004; VALERO & CARRILLO, 2004), onde foram adicionados polímeros do tipo polivinilpirrolidona, polietilenoglicol associado HP- β -ciclodextrina a β -ciclodextrina, respectivamente, foi demonstrada incremento na melhora da fotoestabilidade do fármaco, quando comparado com o complexo binário. Outro fármaco que mostrou melhora na fotoproteção foi a riboflavina em HP- β -ciclodextrina, descrita por LOUKAS, *et al.*, 1996.

10. Guia para o teste de fotoestabilidade. ICH- Q1B

A ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use - elaborou o guia Q1B: Photostability Testing of New Drug Substances and Products (ICH, 1996) que estabelece um roteiro para estudos de fotoestabilidade de substâncias novas e produtos sensíveis à luz.

Os testes têm como finalidade demonstrar que a exposição do fármaco à luz não terá resultados dramáticos e significativos que produzam alterações no produto ou na forma farmacêutica.

10.1 Fontes de Luz

A guia ICH (1996) propõe duas opções de fontes de luz para realizar os testes de fotoestabilidade, descritas a seguir:

- Opção 1, utiliza uma fonte de luz similar ao padrão de emissão D65/ID65, combinado com uma lâmpada fluorescente artificial de emissão UV, xenônio ou lâmpada de metal halogenado. D65 é o padrão internacional reconhecido para luz do dia como definido na ISO 10 977. (ISO, 1993; ICH, 1996)

A utilização da opção 1 baseia-se em que estas fontes de radiação tentam imitar a luz do dia ou indiretamente a luz do dia filtrada, estas fontes expõem amostras a UVA, UVB, e luz visível simultaneamente (semelhante à luz solar). Na prática é impossível que o produto possa ser exposto diretamente à luz do sol por algum período de tempo durante a manufatura, manipulação e transporte. Atualmente, a opção 1 oferece a eleição entre três diferentes tipos de fontes de luz: lâmpada fluorescente com filtros de vidro para luz dia, se obtém todo o espectro de luz e tem produção de ultravioleta e visível, também pode-se usar lâmpadas de xenônio ou lâmpadas de metal halogenado em combinação com filtros apropriados (TONENSEN & BAERTSCHI, 2004).

- Opção 2, permite utilizar uma combinação de lâmpada branca fluorescente fria similar à ISO 10977 e lâmpada fluorescente UV com espectro distribuído entre 320nm e 400nm, emissão máxima de energia entre 350nm e 370nm (ISO,1993; ICH, 1996).

Essas fontes de radiação tentam imitar as condições de iluminação interna, que são compostas de luz dia e radiação artificial proveniente de lâmpadas fluorescentes. Diferente da luz natural do dia, a condição de iluminação interna não é padronizada e o espectro de emissão das lâmpadas fluorescentes varia em grande escala. Esta opção permite o uso de duas lâmpadas separadamente: uma de emissão UVA e outra para luz visível. A contribuição de UV é inferior e pode ser obtida de lâmpadas segundo as normas D65 ou ID65 de emissão padronizada. As lâmpadas podem ser usadas em combinação ou sequencialmente.

No entanto, no uso seqüencial, é recomendado expor as amostras, simultaneamente, primeiro à radiação ultravioleta e logo ao visível, uma vez que ensaios prévios demonstram que a seqüência de irradiação não é importante (UV+VIS ou VIS+UV). A seqüência de irradiação pode influenciar os resultados se o fármaco forma produtos de degradação coloridos que podem-se comportar como sensibilizadores. Deve-se notar que a combinação das fontes na opção 2, pode produzir pequena emissão de energia ou mesmo não produzir emissão de energia. (TONENNSSEN & BAERTSCHI, 2004).

TABELA 5. Fatores a serem considerados na escolha da opção 1 ou opção 2.

Parâmetros para serem considerados	Opção
Evitar o aumento significativo do nível de aquecimento	Opção 1 ou 2
Tempo mínimo de exposição	Opção 1
Emissão de 380 a 420 nm para ser evitada	Opção 1
Exposição seqüencial a ser evitada	Opção 1 ou 2
Problemas na apresentação devido ao sistema de resfriamento	Opção 2
Problema para eliminar a exposição UV	Opção 2
Condições similares de luz interna	Opção 2
Condições similares de luz do dia	Opção 1
Procedimento simples de calibração	Opção 1
Grande área de exposição	Opção 2
Baixo custo	Opção 2
Fácil de padronizar	Opção 1

Fonte: TONNESEN & BAERTSCHI, 2004.

De início a incorporação de duas opções responde às diferentes práticas nos diferentes continentes na manipulação dos fármacos. Mas a escolha da opção pode afetar a degradação e pode dar resultados dramaticamente diferentes, como demonstrado por algumas investigações. Desde um ponto de vista científico, reportados em alguns estudos (PIECHOCKI, 1998) as duas opções dadas no ICH, 1996; são muito diferentes, mas desde uma perspectiva regulatória, as duas são consideradas como suficientemente iguais no acerto da fotoestabilidade dos fármacos. Assim, nenhuma orientação é dada na guia ICH para a escolha da opção 1 ou 2. Somente é recomendada que a mesma opção seja usada para estudos de degradação forçada e estudos confirmatórios para evitar discrepância na velocidade ou perfil de degradação.

Existem, alguns fatores que podem ser considerados durante a seleção da fonte de radiação, independente do fármaco, mas dependentes de condições de tempo e custos. Esses fatores são recomendados e sugeridos por TONNESEN & BAERTSCHI, (2004) e estão descritos na TABELA 5.

10.2 *Sistema Químico Actinométrico*: calibração de fontes de luz com quinino

O sistema químico actinométrico é um método para calibrar a intensidade das fontes de luz artificiais que simulam a luz do sol ou a luz do dia. Em exposições próximas à lâmpada fluorescente UV, baseado na FDA. National Institute of Standards and technology study (ICH, 1996)

Este sistema é citado como anexo no Q1B do ICH por ser um sistema universal estabelecido que permite padronizar a intensidade das fontes de emissão de luz UV usados em testes de fotoestabilidade. Essas fontes podem ser lâmpadas fluorescentes UV, lâmpadas fluorescentes brancas, lâmpadas de metal halogenado e lâmpadas de xenônio empregadas como fontes de luz para estes testes (YOSHIOKA, *et al.*, 1994; ICH, 1996).

O sistema utiliza uma solução calibradora de monoclórato de quinino dihidratado 2% e também oferece duas opções de recipiente para solução calibradora, a seguir:

- Opção 1: utiliza frasco-ampola de 20 mL incolor, segundo as dimensões apresentados no ICH, 1996, selados hermeticamente (FIGURA 7A). Deve-se colocar 10 mL de solução calibradora em cada frasco-ampola.

- Opção 2: utiliza uma cubeta de quartzo de 1cm de caminho óptico com tampa apropriada (FIGURA 7B). Deve-se encher a cubeta completamente.

FIGURA 7. Opções de recipiente: (A) frasco-ampola para a opção 1 (ICH, 1996); (B) cubeta de quartzo com tampa.

Em ambas as opções, o material é exposto à fonte luminosa por um número apropriado de horas e são feitas leituras em intervalos apropriados de tempo, determinando as absorbâncias da amostra (A_a) e do controle (A_c) a 400 nm de comprimento de onda. Calcula-se o $\Delta A = (A_a - A_c)$ para distintos tempos ($t_1, t_2, t_3, \dots, t_n$), trata-se de forma estatística os dados obtidos (Absorbância versus Tempo) e estima-se o tempo de exposição necessário para que se tenha $\Delta A \geq 0,9$ (como mínimo 0,9). Esse delta A é a energia associada ao espectro de distribuição que permite medir a intensidade da fonte.

Estudos realizados por YOSHIOKA, *et al.*, (1994), em colaboração com diferentes laboratórios e com diferentes marcas de lâmpadas, indicaram que o método actinométrico é um método de padronização simples e reprodutível para calibração de intensidades de radiação UV até 330 nm em fontes de luz usadas para

testes de estabilidade de produtos farmacêuticos. No mesmo estudo, utilizando como fármaco modelo o nifedipino, conclui-se também que o método actinométrico pode ser usado para medir a intensidade da radiação UV até 330 nm, embora não determine a intensidade total da radiação responsável pela fotodegradação do fármaco que tem espectro de absorção diferente ao do quinino.

A ANVISA (BRASIL, 2005) também proporciona recomendações para o estudo da fotoestabilidade de fármacos, recomendações estas fundamentadas principalmente na norma ICH-Q1B. Estabelece condições das fontes de luz, desenvolvimento dos testes e método actinométrico, e recomenda testes tanto para produto exposto como para produto em sua embalagem primária. Em produtos onde a embalagem garante a proteção da luz (tubos de alumínio, enlatados) os testes não precisam ser realizados, mas é recomendado um levantamento bibliográfico, demonstrando que a formulação não apresenta problemas de fotoestabilidade.

11. Fototoxicidade

Alguns produtos se mostram fotoquimicamente inertes, no sentido de não se decompor durante exposição à luz, mas podem atuar como potenciais fontes de formação de radicais livres e de metabólitos fototóxicos e fotorreativos *in vivo*. Essa fotoreatividade pode ser observada após administração do fármaco e quando o paciente é submetido a fontes de luz natural ou artificial, induzindo efeitos adversos, os quais são consideradas reações fototóxicas ou fototoxicidade (ALBINI & FASANI, 1998; MOORE, 2004b)

Então a fototoxicidade pode ser definida, como uma alteração da função celular por uma interação entre um composto e uma radiação não ionizante. Essa alteração ocorre após simultâneas exposições ao químico fototóxico e às radiações de comprimentos de onda apropriados (TONNENSEN, 2004).

É possível que um fármaco induza reações fototóxicas agudas em comprimento de onda entre 300 - 400 nm, isso implica que em poucos minutos ou algumas horas após exposição lumínica, vai exibir picos máximos, podendo manifestar-se por algumas horas ou por alguns dias e depois, usualmente desaparecem em pouco tempo após parar a exposição à radiação (GLASS, *et al.*, 2004)

Numerosos fármacos que desencadeiam efeitos adversos fototóxicos no organismo são descritos e reportados, tais como a cloroquina (NORD, *et al.*, 1991; ELFATIH, *et al.*, 1994; NORD, *et al.*, 1997a, 1997b; TONNENSEN, *et al.*, 1998; TONNENSEN & KRISTENSEN, 2004); nimodipino (RAGNO, *et al.*, 1995) e sulfametoxazol (ZHOU & MOORE, 1994; ICARDO, *et al.*, 2003a).

A forma como são manifestados esses efeitos fototóxicos é complexa e pode acontecer que, após administração do fármaco, o indivíduo se exponha à fontes de luz, seja luz artificial ou luz solar, mudança de residência e clima, assim como mudanças na rotina. Além disso, o fármaco ou seus metabólitos, devem-se distribuir em tecidos perto da superfície do organismo como olhos (retina), pele e cabelo. Somente sob estas condições a exposição à luz resulta em efeitos fototóxicos dentro do organismo humano (ALBINI & FASANI, 1998; TONNENSEN, 1998)

12. Conclusão

A maioria dos fármacos tem grupos funcionais susceptíveis de sofrer fotoreatividade e desenvolver uma fotodegradação. No entanto, apenas quando as condições são apropriadas eles podem manifestar tal efeito.

Existem fármacos mais susceptíveis que apresentam fotodegradação sob condições mínimas de stress, mas também existem outros nos quais a fotodegradação ocorrerá quando as condições forem mais drásticas. Assim, as normas recomendam submeter um fármaco ao máximo stress e condições extremas de irradiação em luz artificial.

Referências bibliográficas*

ABOUNASSIF, M.A.; EL-OBEID, H.A.; GADKARIEM, E.A. Stability studies on some benzocycloheptane antihistaminic agents. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.36, p. 1011–1018, 2005.

* As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

ABOU-AUDA, H.S.; NAJJAR, T.A.; AL-KHAMIS, K.I.; AL-HADIYA, B.M.; GHILZAI, N.M.; AL-FAWZAN, N.F. Liquid chromatographic assay of nifedipine in human plasma and its application to pharmacokinetic studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 22, p. 241–249, 2000.

AHMAD, T. Degradation studies on sulphacetamide eye-drops. Part 2: Spectrophotometric evaluation of decomposition products of UV-irradiated solutions of sulphacetamide. **Pharmazie**. v. 37, n. 8, p.559-561, 1982.

AHMAD, I.; FASIHULLAH, Q.; ADNAN NOOR, IZHAR, A.; NAWAB MANZAR, Q.A. Photolysis of riboflavin in aqueous solution: a kinetic study. **International Journal of Pharmaceutics**. n. 280, p.199–208, 2004.

AHMAD, I.; FASIHULLAH, Q.; VAID, F.H.M. Effect of phosphate buffer on photodegradation reactions of riboflavin in aqueous solution **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 78, n.3, p.229-234, 2005.

AHMAD, I.; FASIHULLAH, Q.; VAID, F.H.M. Effect of light intensity and wavelengths on photodegradation reactions of riboflavin in aqueous solution. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 82, n.1, p.21-27, 2006.

ALBINI, A; FASANI, E. **Drugs: Photochemistry and Photostability**. Cambridge: Ed. A. Albin and E. Fasani. Royal Society of Chemistry. 1998, p. 1-72.

ALVAREZ-LUEJE, A.; NARANJO, L.; NUÑEZ-VERGARA, L.J.; SQUELLA, J.A. Electrochemical study of nisoldipine: analytical application in pharmaceutical forms and photodegradation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.16, p. 853-862, 1998.

AMAN, W.; THOMA, K. The influence of formulation and manufacturing process on the photostability of tablets. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 243, p. 33–41, 2002.

ANDERSIN, R.; TAMMILEHTO, S. Photochemical decomposition of midazolam. IV. Study of pH-dependent stability by high-performance liquid chromatography. **International Journal of Pharmaceutics**, v.123, p.229-235, 1995.

ANDRISANO, V.; GOTTI, R.; LEONI, A.; CAVRINI, V. Photodegradation studies on Atenolol by liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 21, p. 851–857, 1999.

ANDRISANO, V.; BERTUCCI, C.; BATTAGLIA, A.; CAVRINI, V. Photostability of drugs: photodegradation of melatonin and its determination in commercial formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.23, p.15–23, 2000.

ANDRISANO, V.; HRELIA, P.; GOTTI, R.; LEONI, A.; CAVRINI, V. Photostability and phototoxicity studies on diltiazem. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.25, p. 589–597, 2001a.

ANDRISANO, V.; BALLARDINI, R.; HRELIA, P.; CAMELI, N.; TOSTI, A.; GOTTI, R.; CAVRINI, V. Studies on the photostability and in vitro phototoxicity of Labetalol. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.12, p. 495–504, 2001b.

ASTARITA, A.; DELLAGRECA, M.; IESCE, M.R.; MONTANARO, S.; PREVITERA, L.; TEMUSSI, F. Polycyclic compounds by sunlight exposure of the drug rosuvastatin in water. **Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry**. v. 187, n. 2, p.263-268, 2007.

BAYOMI, M.A.; ABANUMAY, K.A.; AL-ANGARY, A.A. Effect of inclusion complexation with cyclodextrins on photostability of nifedipine in solid state. **International Journal of Pharmaceutics**. v.243, p.107–117, 2002.

BAZIN, M.; BOSCA, F.; MARIN, M.L.; MIRANDA, M.J.A.; PATTERSON, L.K.; SANTUS, R. A Laser Flash Photolysis and Pulse Radiolysis Study of Primary Photochemical Processes of Flumequine. **Photochemistry and Photobiology**, v. 72, n. 4, p. 451–457, 2000.

BARTSCH, H.; EIPER, A.; KOPELNT-FRANK, H. Stability indicating assays for the determination of piroxicam—comparison of methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 20, p. 531-541, 1999.

BÉCHARD, S.R.; QURAISHI, O.; KWONG, E. Film coating: effect of titanium dioxide concentration and film thickness on the photostability of nifedipine. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 87, p.133-139, 1992.

BIBBY, D.; DAVIES, N.M.; TUCKER, I.G. Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 197, p.1-11, 2000.

BOSCÁ, F.; MIRANDA, M.A.; VAÑÓ, L.; VARGAS, F. New photodegradation pathways for Naproxen, a phototoxic non-steroidal anti-inflammatory drug. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. v.54, p.131-134, 1990.

BOSCÁ, F.; MARÍN, M.A.; MIRANDA, M.A. New Photoreactivity of the nonsteroidal anti-inflammatory 2-arylpropionic acid with photosensitizing side effects. **Photochemistry and Photobiology**. v.74, n. 5; p.635-655, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medicamentos. Recomendações da Anvisa para Alterações Pós-Registro de Medicamentos (Atualizada em 06 de julho de 2005). **Estudo de Fotoestabilidade**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/recomenda/index.htm>>. Acesso em: 10 nov. 2005.

BRISAERT, M.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J. Investigation on the photostability of a tretinoin lotion and stabilization with additives. **International Journal of Pharmaceutics**. v.199, p. 49–57, 2000.

BRITISH Pharmacopoeia. 2005. London: The Stationary Office, 2005. p. 33-1133

CASTILLO, C.; CRIADO, S.; DÍAZ, M.; GARCÍA, N. A. Riboflavin as a sensitizer in the photodegradation of tetracyclines. Kinetics, mechanism and microbiological implications. **Dyes and Pigments**. v.72 , p. 178-184, 2007.

CERMOLA, F.; DELLAGRECA, M.; IESCE, M.R.; MONTANARO, S.; PREVITERA, L.; TEMUSSI, F. Photochemical behavior of the drug atorvastatin in water. **Tetrahedron**. v. 62, n. 31, p.7390-7395, 2006.

CHINNIAN, D.; ASKER, A.F. Photostability profiles of minoxidil solutions. **Journal of Pharmaceutical science and technology PDA**. v.50, n.2, p.94-98, 1996.

CÓRDOBA-DÍAZ, M.; CÓRDOBA-BORREGO, M.; CÓRDOBA-DÍAZ, D. The effect of photodegradation on the fluorescent properties of norfloxacin (Photodegradation and fluorescence of norfloxacin). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** .v.18, p. 865–870, 1998.

CUEVAS, O.A. La luz. **Radiográfica costarricense**, 1997. Disponível em: <<http://www.monografias.com/trabajos10/lalu/lalu.shtml>> Acesso em: 12 jan. 2007.

DE FILIPPIS, P.; BOVINA, E.; DA ROS, L.; FIORI, J.; CAVRINI, V. Photodegradation studies on lacidipine in solution: basic experiments with a cis–trans reversible photoequilibrium under UV-A radiation exposure. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.27, p. 803–812, 2002.

DE GUIDI, G, CHILLEMI, R.; COSTANZO, L. L.; GIUFFRIDA, S.; SORTINO, S.; CONDORELL, G. Molecular mechanism of drug photosensitization 5. Photohemolysis sensitized by Suprofen. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 23, p.125-133, 1994.

DE VRIES, H.; BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, G.M.J. Photoreactivity of nifedipine in vitro and in vivo. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 43, p. 217-221, 1998.

DODDS, H.M.; ROBERT, J.; RIVORY, L.P. The detection of photodegradation products of irinotecan (CPT-11, Campto®, Camptosar®), in clinical studies, using high-performance liquid chromatography:atmospheric pressure chemical ionisation:mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 17, p. 785–792, 1998.

ELFATIH, I.A.K.; IBRAHIM, K.E.E.; ABDELRAHMAN, A.N.; FELS, A.F. Photodegradation studies on chloroquine phosphate by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.12, n.5, p. 667-674, 1994.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 5. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2004. p. 903-2737.

FIORI, J.; BALLARDINI, R.; ANDRISANO,V.; CAVRINI,V. Photostability studies on the furosemide-triamterene drug association. **IL Farmaco**. v.58, p.867-873, 2003.

FIORI, J.; GOTTI, R.; BERTUCCI, C.; CAVRINI, V. Investigation on the photochemical stability of lercanidipine and its determination in tablets by HPLC–UV and LC–ESI–MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** . v. 41, p.176–181, 2006.

GABRIELE-CAVIGLIOLI, G.; POSOCCO, V.; PARODI, B.; CAFAGGI, S.; ALZATI,A.; BIGNARDI, G. Identification of degradation products of Ibuprofen arising from oxidative and thermal treatments. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.30, P. 499-509, 2002.

GARCÍA BAUTISTA, J.A.; GARCÍA MATEO, J.V.; CALATAYUD, J.M. Flow injection biamperometric determination of chloramphenicol and related nitro compounds by on-line chemical photodegradation. **Analytica Chimica Acta**. v. 404, p. 141–150, 2000.

GARRALÓN, J.L. **Tecnología de Ondas electromagnéticas**. Universidade de extremadura. España. 2006. Disponível em: <http://alcazaba.unex.es/old/departamentos/34/105/3801016/A001_ondas_electromagn.pdf> Acesso em: 12 jan. 2007.

GIBBS, N.K.; TRAYNOR, N.J.; JOHNSON, B.E.; FERGUSON, J. In vitro phototoxicity of nifedipine: sequential induction of toxic and non-toxic photoproducts with UVA radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.13, p. 275-288, 1992.

GIUFFRIDA, S.; DE GUIDI, G.; SORTINO, S.; CHILLEMI, R.; COSTANZO, L.L.; CONDORELLI, G. Molecular mechanism of drug photosensitization Part 6. Photohaemolysis sensitized by tolmetin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 29, p. 125-133, 1995.

GLASS, D.B.; NOVAK, CS.; BROWN, M.E. The thermal and photostability of solid pharmaceuticals. **Journal of thermal analysis and calorimetry**. v. 77, p. 1013-1036, 2004.

GRUNDY, J.S.; KHERANI, R.; FOSTER, R.T. Photostability determination of commercially available nifedipine oral dosage formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.2, n. 12, p. 1529-1535, 1994.

GODWIN, D.A.; WILEY, C.J.; FELTON, L.A. Using cyclodextrin complexation to enhance secondary photoprotection of topically applied ibuprofen. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 62, p. 85–93, 2006.

HUNG, J.C. Inconsistencies and deficiencies which exist in the current official regulations concerning the photolytic degradation of drugs, In: TONNENSEN, H.H. **The Photostability of Drugs and Drug Formulations**, Ed. H.H. Tonnesen. London: CRC press, 2004., p.173-187.

ICARDO, M.C.; MATEO, J.V.G.; LOZANO, M.F.; CALATAYUD, J.M. Enhanced flow-injection–chemiluminometric determination of sulphonamides by on-line photochemical reaction. **Analytica Chimica Acta**. v.499, p. 57–69, 2003a.

ICARDO, M.C.; MISIEWICZ, M.; CIUCU, A.; GARCÍA MATEO, J.V.; CALATAYUD, J.M. FI-on line photochemical reaction for direct chemiluminescence determination of photodegraded chloramphenicol. **Talanta**. v. 60, p. 405-414, 2003b.

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Guidelines. Quality Topics. Stability. **Q1B: Photostability Testing of New Drug Substances and Products**. Recommended for Adoption at Step 4 of the ICH Process on 6 November 1996 by the ICH Steering Committee. Disponível em: <<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA412.pdf>>. Acesso em: 20 nov 2006.

International Organization for Standardization. Photography-Processed photographic color films and paper prints- Methods for measuring image stability. ISO 10 977. 1993.

IOELE, G.; CIONE, E.; RISOLI, A.; GENCHI, G.; RAGNO, G. Accelerated photostability study of tretinoin and isotretinoin in liposome formulations. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 293, p. 251–260, 2005.

IRIE, T.; UEKAMA, K. Pharmaceutical applications of ciclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. **Journal Pharmaceutical Science**. v. 86, n. 2, p.147-162. 1997.

ISLAM, M.S.; ASKER, A. F. Photoprotection of daunorubicin hydrochloride with com sodium sulfite. PDA. **Journal Pharmaceutics Science Technology**. v. 49, p. 122-136, 1995.

Índice Ultravioleta. Organização Mundial de Saúde (OMS). Organização Meteorológica Mundial. Universidade federal do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.indiceuv.ufrj.br/2003/iuv2003_radiacao.html>. Acesso em: 12 jan 2007.

JANG, D.J.; JEONG, E.J.; LEE, H.M.; KIM, B.C.; LIM, S.J.; KIM, C.K. Improvement of bioavailability and photostability of amlodipine using redispersible dry emulsion. **European journal of pharmaceutical sciences**. V.28, p. 405–411, 2006.

JIMÉNEZ, M.C.; MIRANDA, M.A.; TORMOS, R. Photochemistry of naproxen in the presence of β -cyclodextrin. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. v.104, p.119-121, 1997.

KAUL, N.; AGRAWAL, H.; PARADKAR, A.R.; MAHADIK, K.R. Stability indicating high-performance thin-layer chromatographic determination of nelfinavir mesylate as bulk drug and in pharmaceutical dosage form. **Analytica Chimica Acta**. v. 502, p.31–38, 2004.

KOROLKOVAS, A.; DE FRANÇA, A.C.F.F. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. 2006-2007. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2006.

KOTZAGIORGIS, E.CH.; MICHALEAS, S.; ANTONIADOU-VYZA, E. Improved photostability indicating ion-pair chromatography method for pergolide analysis in tablets and in the presence of cyclodextrins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. *Article in Press*, 2006.

KRISTENSEN, S.; GRISLINGAAS, A.-L.; GREENHILL, J.V.; SKJETNE, T.; KARLSEN, J.; TONNESEN, H.H. Photochemical stability of biologically active compounds: V. Photochemical degradation of primaquine in an aqueous medium. **International Journal of Pharmaceutics**. v.100, n. 1, p.15-23, 1993.

KRISTENSEN, S.; GRINBERG, L.; TONNESEN, H.H. KRISTENSEN, S.; GRINBERG, L.; TONNESEN, H.H. Photoreactivity of biologically active compounds XI. Primaquine and metabolites as radical inducers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 5, p.139–146, 1997.

KRISTENSEN, S.; NORD, K.; ORSTEEN, A.-L.; TONNESEN, H.H. Photoreactivity of biologically active compounds XIV. Influence of oxygen on light induced reactions of primaquine. **Pharmazie**. v. 53, p. 98–103, 1998.

LI, Y.N.B.; MOORE, D.E.; TATTAM, B.N. Photodegradation of amiloride in aqueous solution. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 183, p.109–116, 1999.

LIGHT. ADUSTUM. Dictionario of terms. In: **Adustum an enlightening journey**. 2006. Disponível em: <<http://library.thinkquest.org/C006027/html-ver/intro.html>>. Acesso em: 10 jan. 2007.

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

LOUKAS, Y.L.; VRAKA, V.; GREGORIADIS, G. Use of a nonlinear least-squares model for the kinetic determination of the stability constant of cyclodextrin inclusion complexes. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 144, p.225–231, 1996.

MASSAD, W.A.; BERTOLOTTI, S.G.; ROMERO, M.; GARCÍA, N.A. A kinetic study on the inhibitory action of sympathomimetic drugs towards photogenerated oxygen active species. The case of phenylephrine. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 80, p.130–138, 2005.

MATSUDA, Y.; TERAOKA, R.; SUGIMOTO, I. Comparative evaluation of photostability of solid-state nifedipine under ordinary and intensive light irradiation conditions. **International Journal of Pharmaceutics**. v.54, p. 211-221, 1989.

McELNAY, J.C.; ELLIOTT, D.S.; CARTWRIGHT-SHAMOON, J.; D'ARCY, P.F. Stability of methotrexate and vinblastine in burette administration sets. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 47, p. 239-247, 1998.

MERCK index. 14 ed. Whitehouse Station, NJ. USA. 2006. p.358, 707, 923, 1004, 1005, 1077, 1124, 1132, 1257, 1545, 1636.

MIELCAREK, J.; DACZKOWSKA, E. Photodegradation of inclusion complexes of isradipine with methyl- β -cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 21, p. 393–398, 1999.

MIELCAREK, J.; STOBIECKI, M.; FRANSKI, R. Identification of photodegradation products of nilvadipine using GC-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.24, p. 71–79, 2000.

MIRANDA, M.A.; CASTELL, J.V.; SARABIA, Z.; HERNÁNDEZ, D.; PUERTES, I.; MORERA, I.M.; GOMEZ-LECHON, M.J. Mechanisms of Photosensitization by Drugs: Involvement of Tyrosines in the Photomodification of Proteins Mediated by Tiaprofenic Acid In Vitro. **Toxicology in Vitro**. v. 11, p. 653-659, 1997.

MOORE, D E.; SITHIPITAKS, V. Photolytic degradation of furosemide. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v.35 , p.489-493, 1983.

MOORE, D.E.; MALLESCH, J.L. Photochemical interaction between triamterene and hydrochlorthiazide. **International Journal of Pharmaceutics**.v. 76, p.187-190, 1991.

MOORE, D.E. Photophysics and photochemical. Aspects of drug stability, In: TONNENSEN, H.H. **The Photostability of Drugs and Drug Formulations**, Ed. H.H. Tonnesen. London: CRC press, 2004a. p.10-37.

MOORE, D.E. Standardization of photodegradation studies and kinetic treatment of photochemical reactions, In: TONNENSEN, H.H. **The Photostability of Drugs and Drug Formulations**, Ed. H.H. Tonnesen. London: CRC press, 2004b. p.41-65.

MORIWAKI, C.; BRESCANSIN, E.G.; HIOKA, N.; MAIONCHI, F.; MATIOLI, G. Estudo da degradação do fármaco Nabumetona por fotólise direta. **Acta Scientiarum**. v. 23, n. 3, p. 651-654, 2001.

MOSER, J.; SARABIAB, Z.; MINTERA, H.; LOVELLA, W.W.; BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, G.J. Photobinding of ketoprofen in vitro and ex vivo. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.58, p. 37-45, 2000.

MOTWANI, S.K.; KHAR, R.K.; AHMAD, F.J.; CHOPRA, S.; KOHLI, K.; TALEGAONKAR, S. Application of a validated stability-indicating densitometric thin-layer chromatographic method to stress degradation studies on moxifloxacin. **Analytica Chimica Acta**. v. 582, p.75-82, 2007.

NAVARATNAM, S.; HAMBLETT, I.; TONNESEN, H.H. Photoreactivity of biologically active compounds. XVI. Formation and reactivity of free radicals in mefloquine. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 56, n.1, p. 25-38, 2000.

NORD, K.; KARLESEN, J.; TONNESEN, H.H. Photochemical stability of biologically active compounds. IV. Photochemical degradation of chloroquine. **International Journal of Pharmaceutics**, v.72, p.11-18, 1991.

NORD, K.; ORSTEEN, A-L.; KARLESEN, J.; TONNESEN, H.H. Photoreactivity of biologically active compounds, X: Photoreactivity of chloroquine in aqueous solution. **Pharmazie**, v.52, n.8, p. 598-603, 1997a.

NORD, K.; ANDERSEN, H.; TONNESEN, H.H. Photoreactivity of biologically active compounds. XII. Photostability of polymorphic modifications of chloroquine diphosphate. **Drugs stability**. V.1. n. 4. p. 243-248, 1997b.

NUDELMAN, N.S.; GALLARDO CABRERA, C. Spectrofluorimetric assay for the photodegradation products of alprazolam. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 30, p. 887-893, 2002.

OLIVEIRA, C.; FERNANDES, C.; CARPINTEIRO, G.; CORREIA, L. **O ABC das ondas eletromagnéticas**. Instituto de Telecomunicações. Instituto Superior Técnico.

Universidade Técnica de Lisboa, Projeto ITEM. p. 1-13, 2002. Disponível em: <http://193.136.221.5/item/docs/ABC_OEM.pdf> Acesso em: 08 jan. 2007.

ORFORD, C.; WEBB, M.L.; CATTANACH, K.H.; COTTEE, F.H.; ESCOTT, R.E.; PITFIELD, I.D.; RICHARDS, J.J. An analytical and structural study of the photostability of some leukotriene B₄ antagonist, In: ALBINI, A.; E. FASANI. **Drugs: Photochemistry and Photostability**. Cambridge: Ed. A. Albin and E. Fasani. Royal Society of Chemistry. 1998, p. 182-193.

PIECHOCKI, J. Selecting the right source for pharmaceutical photostability testing, In: ALBINI, A.; E. FASANI. **Drugs: Photochemistry and Photostability**. Cambridge: Ed. A. Albin and E. Fasani. Royal Society of Chemistry. 1998, p. 247-271.

PITARELLO, A.P.; LINDINO, C.A.; DA SILVA, C.; VETTER FERRI, E.A.; DE LIMA SOUZA, M.; BARICCATTI, R.A. Estudo fotoquímico da dipirona na presença de β e γ ciclodextrina. **Acta Scientiarum**. v. 27, n. 2, p. 171-175, 2005.

POMPONIO, R.; GOTTI, R.; FIORI, J.; CAVRINI, V.; MURA, P.; CIRRI, M.; MAESTRELLI, F. Photostability studies on nicardipine–cyclodextrin complexes by capillary electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 35, p.267–275, 2004.

OUÉDRAOGO, G.; MORLIÈRE, P.; MAZIÈRE, C.; MAZIÈRE, J.C.; SANTUS, R. Alteration of the Endocytotic Pathway by Photosensitization with Fluoroquinolones. **Photochemistry and Photobiology**. v.72, n.4, p. 458–463, 2000.

RAGNO, G.; VERONICO, M.; VETUSCHI, C. Gas chromatographic and UV derivative determination of nitrendipine and its photodegradation product. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 99, p. 351-355, 1993.

RAGNO, G.; VERONICO, M.; VETUSCHI, C. Analysis of nimodipine and its photodegradation product by derivative spectrophotometry and gas chromatography. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 119, p.115-119, 1995.

RAGNO, G.; GAROFALO, A.; VETUSCHI, C. Photodegradation monitoring of amlodipine by derivative spectrophotometric. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.27, p.19-24, 2002.

RAGNO, G.; AIELLO, F.; GAROFALO, A.; IOELE, G.; SINICROPI, M.S. Multivariate least squares regression applied to the spectrophotometric analysis of manidipine and its main photoproduct. **IL Farmaco**. v. 58, p.909 -915, 2003a.

RAGNO, G.; CIONE, E.; GAROFALO, A.; GENCHI, G.; IOELE, G.; RISOLI, A.; SPAGNOLETTA, A. Design and monitoring of photostability systems for amlodipine dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 265, p.125–132, 2003b

RAGNO, G.; IOELE, G.; DE LUCA, M.; GAROFALO, A.; GRANDE, F.; RISOLI, A. A critical study on the application of the zero-crossing derivative spectrophotometry to the photodegradation monitoring of lacidipine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. V.42, p.39–45, 2006.

RAMADAN, A.; EL-MASSIK, M.; EL-KHORDAGUI, L.; DAABIS, N.; HAMMOUDA, Y. Surface treatment: A potential approach for enhancement of solid-state photostability. **International Journal of Pharmaceutics**. v.307, p.141–149, 2006.

RAY, R.S.; MISRA, R.B.; FAROOQ, M.; HANS, R.K. Effect of UV-B radiation on some common antibiotics. **Toxicology in Vitro**. v. 16, p. 123–127, 2002.

REISCH, J.; ZAPPEL, J.; RAGHU-RAMRAO, A. Photostability studies of ouabain, a-acetyldigoxin and digoxin in solid state. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**. v. 69. p. 47-50. 1994.

SARABIA, Z.; HERNANDEZ, D.; CASTELL, J.V.; BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, G.M.J. Photoreactivity of tiaprofenic acid and suprofen using pig skin as na ex vivo model. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 58, p. 32–36, 2000.

SHAHJAHAN, M.; ENEVER, N.P. Photolability of nitrofurazone in aqueous solution I. Kinetic studies. **International Journal of Pharmaceutics**. v.143, p. 75-82, 1996 a.

SHAHJAHAN, M.; ENEVER, N.P. Photolability of nitrofurazone in aqueous solution II. Kinetic studies. **International Journal of Pharmaceutics**. v.143, p. 83-92, 1996 b.

SIDHU, D.S.; SUGDEN, J.K. Effect of food dyes on the photostability of aqueous solutions of L-ascorbic acid. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 83, p. 263-266, 1992.

SORTINO, S.; GIUFFRIDA, S.; DE GUIDI, G.; CHILLEMI, R.; PETRALIA, S.; MARCONI, G.; CONDORELLI, G.; SCIUTO, S. The Photochemistry of Flutamide and its Inclusion Complex with β -Cyclodextrin. Dramatic Effect of the Microenvironment on the Nature and on the Efficiency of the Photodegradation Pathways. **Photochemistry and Photobiology**. v. 73, n. 1, p. 6-13, 2001.

SQUELLA, J.A.; BARNAFI, E.; PERNA, S.; NUÑEZ-VERGARA, L.J. Nifedipine: differential pulse polarography and photodecomposition. **Talanta**. v. 36, n.3, p. 363-366, 1989.

SQUELLA, J.A.; NUÑEZ-VERGARA, L.J. Polarography as a technique for determining photodegradation in calcium antagonists. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**. v.23, p.161-166, 1990.

SUNDERLAND, J.; TOBIN, C. M.; HEDGES, A.J.; MACGOWAN, A.P.; WHITE, L.O. Antimicrobial activity of fluoroquinolone photodegradation products determined by parallel-line bioassay and high performance liquid chromatography. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**. v.47, n.3, p.271-275, 2001.

TAKEUCHI, H.; SASAKI, H.; NIWA, T.; HINO, T.; KAWASHIMA, Y.; UESUGI, K.; OZAWA, H. Improvement of photostability of ubidecarenone in the formulation of a novel powdered dosage form termed redispersible dry emulsion. **International Journal of Pharmaceutics**. v.86, p. 25-33, 1992.

TERAOKA, R.; MATSUDA, Y. Stabilization-oriented preformulation study of photolabile menatetrenone (vitamin K2). **International Journal of Pharmaceutics**. v.93, p. 85-90, 1993.

TERAOKA, R.; OTSUKA, M.; MATSUDA, Y. Evaluation of photostability of solid-state dimethyl 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-(2-nitro-phenyl)-3,5-pyridinedicarboxylate by using Fourier-transformed reflection-absorption infrared spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**. v.184, p. 35-43, 1999.

TERAOKA, R.; OTSUKA, M.; MATSUDA, Y. Evaluation of photostability of solid-state nicardipine hydrochloride polymorphs by using Fourier-transformed reflection-absorption infrared spectroscopy – effect of grinding on the photostability of crystal form. **International Journal of Pharmaceutics**. v.286, p. 1-8, 2004.

THOMA, K, In: **The Photostability of Drugs and Drug Formulations**. Ed. H. H.Tonnesen. London: Taylor & Francis, 1996., p. 111-140.

THOMA, K.; KÜBLER, N. Photostability of antifungal agents. 2. Photostability of polyene antibiotics. **Pharmazie**. v. 52, n. 4, p. 294-302, 1997.

THOMA, K. & HOLZMANN, C. Photostability of dithranol. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 46, p. 201–208, 1998.

TIPRE, D.N.; VAVIA, P.R. Oxidative degradation study of nitrendipine using stability indicating, HPLC, HPTLC and spectrophotometric method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 24, p. 705–714, 2001.

TONNENSEN, H.H.; KRISTENSEN, S.; NORD, K. Photoreactivity of selected antimalarial compounds in solution and in the solid state, In: ALBINI, A.; E. FASANI. **Drugs: Photochemistry and Photostability**. Cambridge: Ed. A. Albin and E. Fasani. Royal Society of Chemistry. 1998, p. 87-99.

TONNENSEN, H.H. Photoreactivity of biologically active compounds. XV. Photochemical behaviour of mefloquine in aqueous solution. **Pharmazie**. v.54, p. 590-594, 1999.

TONNENSEN, H.H.; GRISLINGAAS, A.L. Photochemical stability of biologically active compounds. II. Photochemical decomposition of mefloquine in water. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 60, n.2, p.157-162, 1990.

TONNENSEN, H.H. Formulation and stability testing of photolabile drugs. **International of Pharmaceutics**. v. 225. p.1-14, 2001.

TONNENSEN, H.H.; BAERTSCHI, S.W. The questions most frequently asked, In: TONNENSEN, H.H. **The Photostability of Drugs and Drug Formulations**. 2ed. H. H.Tonnesen. London: CRC Press, 2004, p. 161-165.

TORNIAINEN, K.; TAMMILEHTO, S; ULVI, V. The effect of pH, buffer type and drug concentration on the photodegradation of ciprofloxacin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.132, p.53-61, 1996.

UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin drug carrier systems. **Chemical Reviews®**. v. 98, n.5, p.2045-2076, 1998.

UEKAMA, K. Recent aspects of pharmaceutical application of cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena Macrocyclic Chemistry**. v. 44, p. 3-7, 2002.

ULVI, V. Spectrophotometric studies on the photostability of some thiazide diuretics in ethanolic solution. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.17, p. 77–82, 1998.

UNITED States Pharmacopeia. 28. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2005. p. 13, 423, 2058.

U.S. Geological Survey (USGS). Science for a changing world. Toxic Substances Hydrology program. Disponível em: <<http://toxics.usgs.gov/definitions/photodegradation.html>> Acesso em: 12 mar. 2007.

UWAI, K.; TANI, M.; OHTAKE, Y.; ABE, S.; MARUKO, A.; CHIBA, T.; HAMAYA, Y.; OHKUBO, Y.; TAKESHITA, M. Photodegradation products of propranolol: The structures and pharmacological studies. **Life science**. v. 78, p. 357-365, 2005.

VALERO, M.; COSTA, S.M.B. Photodegradation of Nabumetone in aqueous solutions. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. v. 157, p. 93–101, 2003.

VALERO, M. Photodegradation of Nabumetone in n-butanol solutions. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. v. 163, p. 159–164, 2004.

VALERO, M.; CARRILLO, C. Effect of binary and ternary polyethyleneglycol and/or b-cyclodextrin complexes on the photochemical and photosensitizing properties of Naproxen. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.74, p.151–160, 2004.

VALERO, M.; ESTEBAN, B. Effect of binary and ternary polyvinylpyrrolidone and/or hydroxypropyl-b-cyclodextrin complexes on the photochemical and photosensitizing properties of Naproxen. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.76, p. 95–102, 2004.

VARGAS, F.; FUENTES, A.; SEQUERA, J.; MÉNDEZ, H.; FRAILE, G.; VELÁSQUEZ, M.; MEDINA, R. In Vitro Approach to Investigating the Phototoxicity of the Diuretic Drug Triamterene. **Toxicology in Vitro**. v. 12, p. 661-667, 1998a.

VARGAS, F.; MÉNDEZ, V.H.; ROJAS, J.K. Photolysis and photosensitized degradation of the diuretic drug acetazolamide. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. v. 118, p.19-23, 1998b.

VARGAS, F.; MARTINEZ VOLKMAR, I.; SEQUERA, J.; MENDEZ, H.; ROJAS, J.; FRAILE, G.; VELASQUEZ, M.; MEDINA, R. Photodegradation and phototoxicity studies of furosemide. Involvement of singlet oxygen in the photoinduced hemolysis and lipid peroxidation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 42, p.219-225, 1998c.

VARGAS, F.; RIVAS, C.; DÍAZ, Y.; FUENTES, A. Photodegradation pathways and the in vitro phototoxicity of pyrazinamide, a phototoxic antitubercular drug. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.72, p. 87–94, 2003.

VASIC, V.; CERNIGOJ, U.; KRINULOVIC, K.; JOKSIC, G.; FRANKO, M. Evaluation of photochemical degradation of digoxin by Na,K-ATPase assay. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 40, p. 404–409, 2006.

VERMEERSCH, G.; FILALI, A.; MARKO, J.; CATTEAU, J.P.; COUTURE, A. Photo-CIDNP and ESR studies of a photosensitizing drug: nalidixic acid. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**. v.4, p. 85-95, 1989.

VERHOEVEN, J.W. Commission on Photochemistry. Glossary of terms used in photochemistry (IUPAC Recommendations 1996): **Pure and Applied Chemistry**. v. 68, n.12, p. 2223-2286, 1996.

VILA JATO, J. L. **Tecnología farmacêutica: Aspectos fundamentais de los sistemas farmacêuticos y operaciones básicas**. Madrid: Ed. Síntesis. 2001. v. 1, p. 57-67.

WEEDON, A.C.; WONG, D.F. The photochemistry of Indomethacin. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. v. 61, p. 27-33, 1991.

WERNER, J.J.; MCNEILL, K.; ARNOLD, W.A. Environmental photodegradation of mefenamic acid. **Chemosphere**. v.58, p.1339–1346, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental Health Criteria 160. Ultraviolet Radiation. International Programme On Chemical Safety**. WHO. Geneva, 1994. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc160.htm#SectionNumber:2.1>>. Acesso em: 12 jan 2007.

YOSHIOKA, S.; ISHIHARA, Y.; TERAZONO, T.; TSUNAKAWA, N.; MURAI, M.; YASUDA, T.; KITAMURA, T.; KUNIHIRO, Y.; SAKAI, K.; HIROSE, Y.; TONOOKA,

K.; TAKAYAMA, K.; IMAI, F.; GODO, M.; MATSUO, M.; NAKAMURA, K., ASO, Y.; KOJIMA, S.; TAKEDA, Y.; TERAQ, T. Quinine actinometry as a method for calibrating ultraviolet radiation intensity in light stability testing of pharmaceutical. **Drug Development and industrial Pharmacy**. v.20, n.13, p. 2049-2062, 1994.

ZHAN, X.; DENG, Z.; YIN, G.; MA, B. Cumulative illuminometer and shelf life of drugs in daylight indoors. **International Journal of Pharmaceutics** v.167, p. 7–11, 1998.

ZHOU, W.; MOORE, D.E. Photochemical decomposition of sulfamethoxazole. **International Journal of Pharmaceutics**. v.110, n.1, p. 55-63, 1994.

BIBLIOTEC A
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Capítulo 2

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA
POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA
QUANTIFICAÇÃO DO DIFOSFATO DE CLOROQUINA NA PRESENÇA DE
SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO**

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar metodologia analítica utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta (CLAE-UV) para quantificação do difosfato de cloroquina, mesmo na presença de seus produtos de degradação. Para tanto, foi utilizado sistema cromatográfico SHIMADZU LC10A, bomba LC-10 AS, autoinjeter SIL-6B, detector UV-Vis SPD-10 AV e as seguintes condições: Nova Pack® C18, (150 x 3,9 mm) 5,0 µm; fase móvel PIC-B7 0,01 M: Acetonitrila, pH 3,6 (40:60 v/v); fluxo 1,0 mL/min e detecção no ultravioleta a 254 nm. O método foi validado de acordo com os parâmetros estabelecidos pela International Conference on Harmonisation (ICH, 2005), avaliando-se a especificidade, sensibilidade, linearidade, precisão e exatidão. Amostras do fármaco foram, ainda submetidas às condições de degradação forçada em meio aquoso, ácido, alcalino e na presença de oxidante (peróxido de hidrogênio), além da fotodegradação, utilizando-se câmara de fotoestabilidade. O método proposto foi, então, utilizado para quantificar o fármaco nestas amostras, apresentando boa seletividade, além de adequada especificidade, sensibilidade, linearidade, precisão e exatidão.

Palavras chave: Difosfato de cloroquina, CLAE-UV, Fotodegradação, Degradação química.

et al., 1994; DUCHARME & FARINOTTI, 1997; VIRENDRA, *et al.* 1999; DWIVEDI, *et al.* 2003; SAMANIDOU *et al.*, 2005; YONEMITSU *et al.*, 2005; DENG *et al.*, 2006). No entanto, os métodos utilizados foram diversos em complexidade e as fases móveis utilizadas do tipo ternário ou quaternário. Assim, é possível obter melhoras utilizando condições mais simples e menos custosas, como por exemplo, utilizando-se as fases do tipo binário.

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver e validar metodologia analítica, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta (CLAE-UV) para quantificação do difosfato de cloroquina, em presença de seus produtos de degradação.

2. Material e métodos

2.1 Reagentes

Foram utilizadas amostras de difosfato de Cloroquina (CQ) gentilmente doados por GERBRAS Química Farmacêutica Ltda. (São Paulo, Brasil), de origem TENGARDEN INC. (China) com grau de pureza 99,06 % e padrão de referência de difosfato de cloroquina SIGMA-ALDRICH chem. Co (Missouri, USA), com grau de pureza 99,96 %. Os solventes utilizados para análise cromatográfica foram de grau CLAE, e Acido Heptanosulfônico PIC-B7 WATERS (Milford, USA). A água ultra-pura foi obtida em equipamento MILLI-Q MILLIPORE (Massachusetts, USA).

2.2 Equipamentos

Foi utilizado equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) SHIMADZU LC10A (Kyoto, Japão); bomba LC-10 AS., autoinjeter SIL-6B., detector UV-Vis SPD-10 AV., controladora SCL-6B e registrador-integrador Chromatopac® C-R6A, SHIMADZU (Kyoto, Japão). Os estudos espectrofotométricos foram conduzidos em Espectrofotômetro Beckman Coulter DU® 640 (Califórnia, USA), utilizando-se cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Os procedimentos de fotodegradação foram realizados em câmara de fotoestabilidade Farma 424 CF Nova Ética (São Paulo, Brasil), sob condições luminosas de: lâmpada branca fluorescente fria similar à ISO 10977(1993) e lâmpada fluorescente UV com espectro distribuído entre 320 nm e 400 nm, e emissão máxima de energia entre 350 nm e 370 nm (ICH, 1996).

2.3 CLAE-UV: Condições cromatográficas

TABELA 1. Condições CLAE-UV

Parâmetro	Condição
Coluna	Nova Pack® C18, (150 x 3,9 mm) 5,0 µm. Waters (Milford, USA)
Fase móvel	PIC-B7 0,01 M: Acetonitrila, pH 3,6 (40:60 v/v)
Fluxo	1,0 mL/min
$\lambda_{\max}$	254 nm
Volume injetado	5 µL
Tempo de corrida	25 min

2.3.1 Curvas de calibração

Foi preparada uma solução padrão de 100 µg/mL de fármaco em HCl 0,1N, a partir da qual, após diluição na fase móvel, obtiveram-se soluções de concentração 0,17 µg/mL; 0,30 µg/mL; 0,70 µg/mL; 1,42 µg/mL; 2,83 µg/mL; 3,77 µg/mL e 5,67 µg/mL. Realizaram-se injeções em duplicata e plotaram-se as concentrações de fármaco *versus* razão da área do pico, obtendo-se sua respectiva regressão linear. Uma vez aceita a curva de calibração, essa foi utilizada para a quantificação do difosfato de cloroquina nas amostras estudadas.

2.4 Validação da metodologia

2.4.1 Linearidade

Para determinar a linearidade sete soluções padrão foram injetadas em duplicata nas concentrações de 0,17 µg/mL; 0,30 µg/mL; 0,70 µg/mL; 1,42 µg/mL; 2,83 µg/mL; 3,77 µg/mL e 5,67 µg/mL. As razões das áreas foram plotadas *versus* a concentração de fármaco, e submetidas a regressão linear obtendo-se a curva.

2.4.2 Limite de quantificação

Definiu-se como a menor concentração quantificada da curva de calibração com precisão e exatidão aceitáveis. Tal determinação foi baseada na análise de 5 replicatas.

2.4.3 Precisão

A precisão foi avaliada com relação à repetibilidade com a injeção de seis replicatas de cada um dos três padrões 0,30; 1,42 e 5,67 µg/mL. A precisão inter-dias foi analisada pela injeção das três concentrações durante três dias consecutivos e intra-dia através das análises realizadas no mesmo dia.

2.4.4 Exatidão

Foi determinado pela interpolação de replicatas (n=6), da área dos picos de três concentrações 0,30; 1,42 e 5,67 µg/mL sob uma curva de calibração previamente construída, descrita em 2.4.1. Em cada caso o erro sistemático do ensaio foi determinado baseado na porcentagem de inexatidão, tanto intra como inter-dia.

2.4.5 Seletividade

Os resultados de degradação forçada em água, HCL 0,1N, NaOH 0,1 N e H₂O₂ 30 vol e fotodegradação indicam o alto grau de seletividade do método proposto.

2.4.6 Estabilidade de curta duração (24 h)

Este parâmetro foi determinado a partir da análise cromatográfica (tempo zero) de uma série de padrões em água e fase móvel (0,30 – 5,67 µg/mL). Análise essa seguida da repetição de diversos ciclos durante 24 horas, mantendo-se os microvials na bandeja do auto-injetor à temperatura ambiente. Os valores obtidos através da curva de calibração do dia, já a partir da segunda série de injeções foram comparados aos valores nominais.

2.5 Estudos de estabilidade

2.5.1 Degradação forçada

O fármaco foi submetido a condições de degradação química acelerada, hidrólise aquosa, ácida em HCl 0,1N; alcalina em NaOH 0,1 N e oxidativa em H₂O₂ 30 vol. Preparou-se soluções de 1 mg / mL de fármaco dissolvido completamente em cada um dos meios, sendo colocadas em refluxo em condensador de bolas durante duas horas sob aquecimento (CHAVEZ, *et al.*, 1993)

2.5.2 Fotodegradação

Foram testados três meios água, HCl 0,1N e tampão fosfato pH 6,8. Preparando-se soluções de 10 µg / mL do fármaco nos respectivos meios. Após,

foram cheios com 10 mL de solução 11 ampolas de vidro transparente e fechadas hermeticamente. Dez foram considerados teste e um controle. Os frascos foram expostos à luz por 10 dias (240 horas), sob temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5$. Manteve-se o controle protegido da luz durante os 10 dias de teste.

2.6 Preparação das amostras para CLAE

A preparação das amostras para CLAE foi feita diluindo-se convenientemente em HCl 0,01N cada uma das amostras, empregaram-se pipetas e micropipetas automáticas, após foram diluídas em solução Acetonitrila: água (8:2), até atingir um pH de 3,6; homogeneizadas em agitador de tubos tipo vórtex PHOENIX modelo AP56, por 30 segundos e filtradas utilizando seringas descartáveis e unidades filtrantes HV Millex® com membrana Durapore® de 13 mm de diâmetro e poro de 0,45 μm , MILLIPORE (Massachusetts, USA). Os filtrados foram levados para análise por CLAE.

2.7 Espectrofotometria UV

As amostras de fármaco submetidas à degradação forçada e fotodegradação foram de início monitoradas qualitativamente utilizando espectrofotometria UV, em apropriados intervalos de tempo para cada solução, sendo realizadas varreduras entre 190 nm e 400 nm.

3. Resultados e discussão

A cromatografia líquida de alta eficiência CLAE com detecção na região do ultravioleta tem sido amplamente utilizada, por ser uma técnica rápida, sensível e específica. Algumas metodologias foram desenvolvidas utilizando CLAE, para quantificar o fármaco só ou em associação com outros antimaláricos (BERGQVIST & FRISK-HOLMBERG, 1980; WILLIAMS *et al.*, 1990; ELFATIH *et al.*, 1994; DUCHARME & FARINOTTI, 1997; VIRENDRA, *et al.* 1999; DWIVEDI, *et al.* 2003; SAMANIDOU *et al.*, 2005; YONEMITSU *et al.*, 2005; DENG *et al.*, 2006). O método utilizado no presente trabalho foi desenvolvido e validado para quantificação do fármaco difosfato de cloroquina, tendo como referência os estudos anteriores mencionados, apresentando algumas vantagens com relação aos parâmetros cromatográficos, como fase móvel e fluxo.

A fase móvel preparada foi Ácido heptanosulfônico 0,01 M (PIC-B7): Acetonitrila (40:60 v/v) com pH 3,6; obtendo-se superioridade frente à utilizada por YONEMITSU *et al.* (2005), DWIVEDI, *et al.* (2003), VIRENDRA, *et al.* (1999) e ELFATIH, *et al.* (1994) que utilizam fases móveis do tipo ternário. O fluxo da fase móvel utilizado (1 mL/min) é igual ao utilizado por os estudos mencionados anteriormente e menor do que usado por WILLIAMS *et al.* (1990) assim a fase desenvolvida neste estudo apresenta vantagens em ser, mas acessível, simples e do tipo binário, o que significa menor custo e maior disponibilidade, além do mais, a eluição mostrou um pico claro com tempo de retenção de 10,0 minutos (FIGURA 2).

FIGURA 2. Cromatograma CLAE-UV do difosfato de cloroquina (tempo de retenção=10,725 minutos)

FIGURA 3. Curva de calibração do método analítico para quantificação do difosfato de cloroquina por CLAE-UV (0,17 µg/mL; 0,30 µg/mL; 0,70 µg/mL; 1,42 µg/mL; 2,83 µg/mL; 3,77 µg/mL e 5,67 µg/mL).

A linearidade foi determinada no intervalo de concentração de 5,70 a 0,08 $\mu\text{g/mL}$ de concentração. A razões das áreas foram plotadas *versus* a concentração de fármaco, submetidas a regressão linear, obtendo-se alto índice de correlação ($r^2 = 0,996$) e a respectiva equação linear $y = 1,213x - 0,1555$, como mostrado na FIGURA 3. O limite de detecção (LOD) obtido foi de 0,17 $\mu\text{g/mL}$ e o limite de quantificação (LOQ) 0,30 $\mu\text{g/mL}$.

A precisão foi avaliada com a injeção de seis replicatas de cada um dos três padrões 0,30; 1,42 e 5,67 $\mu\text{g/mL}$. A precisão inter-dias feitas análises durante três dias consecutivos e intra-dia análises realizadas no mesmo dia. A TABELA 2 mostra as porcentagens de precisão inter e inter-dia.

A exatidão foi determinada pela interpolação de replicatas ($n=6$), da área dos picos de três concentrações 0,30; 1,42 e 5,67 $\mu\text{g/mL}$ sob uma curva de calibração previamente construída, descrita em 2.4.1. Em cada caso o erro sistemático do ensaio foi determinado baseado na porcentagem de inexatidão, tanto intra como inter-dia. A TABELA 2 mostra as porcentagens de inexatidão. A estabilidade de curta duração em bandeja, 24 horas, comparou os valores nominais, sendo o título expresso de 99,42% e erro sistemático de 0,58%.

A Seletividade foi testada com os resultados de degradação forçada em água, HCL 0,1N, NaOH 0,1 N e H_2O_2 30 vol e fotodegradação os quais indicaram o alto grau de seletividade do método proposto. Os típicos cromatogramas obtidos mostrados nas FIGURAS 4 e 5 evidenciam a seletividade do método.

TABELA 2. Precisão e exatidão intra-dia e inter-dias do método analítico CLAE-UV para o difosfato de cloroquina

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão (%)		Exatidão (%)	
	Intra-dia	Inter-dias	Intra-dia	Inter-dias
0,30	2,78	9,51	6,02	3,97
1,42	5,44	5,90	8,95	5,30
5,67	0,80	1,81	1,73	1,17

FIGURA 4. Cromatogramas CLAE-UV: (A) degradação do CQ em H_2O ; (B) degradação do CQ em HCl 0,1N; (C) degradação do CQ em H_2O_2 30 vol; (D) degradação do CQ em $NaOH$ 0,1N. (tempo de retenção aproximado 10 minutos e 10 $\mu g/mL$ de concentração).

As normas mostram pautas para desenvolver e validar uma metodologia analítica (ICH, 2005), e para determinar se um método analítico é consistente e estável. As normas (ICH, 2003) indicam o fato de submeter o fármaco a diferentes condições de stress como estudos de degradação forçada, dentro dos estudos de estabilidade. Entretanto, as normas não indicam quais são as condições de stress, como o tempo, concentração dos agentes degradantes e desenvolvimento do processo de degradação.

FIGURA 5. Cromatogramas CLAE-UV: (A) Fotodegradação do CQ em H_2O , (B) Fotodegradação do CQ em HCL 0,1N e (C) Fotodegradação do CQ em tampão Fosfato pH 6,8 (tempo de retenção aproximado 10 minutos e 10 $\mu g/mL$ de concentração).

A proposta dos estudos de estabilidade é oferecer evidências da qualidade do fármaco no tempo, sob diferentes fatores dentre eles as condições de degradação forçada em diferentes meios tais como, ácido, alcali, peróxido e condições de exposição à luz como a fotodegradação (ICH, 2003).

Assim, a estabilidade do difosfato de cloroquina (CQ) foi investigada submetendo o fármaco a degradação forçada em ácido, alcali e agente oxidante (peróxido de hidrogênio) e também submetida a fotodegradação; as condições para o fármaco foram determinadas conforme citadas em 2.5.1 e 2.5.2, respectivamente.

Inicialmente as degradações foram avaliadas por espectrofotometria UV. Sendo feitas varreduras entre 190 - 400 nm, de concentrações conhecidas (10 µg/mL cada). As varreduras das degradações químicas são mostradas na FIGURA 2, donde observam-se as modificações dos espectros, após degradação.

FIGURA 6. Espectros UV da degradação forçada do CQ: 190-400 nm. (1) Sem degradação; (2) H₂O; (3) HCl 0,1N; (4) NaOH 0,1 N e (5) H₂O₂ 30 vol.

As avaliações qualitativas por espectrofotometria UV das degradações forçadas mostram melhor estabilidade química do fármaco em água, ácido e peróxido de hidrogênio. O fármaco manteve maior estabilidade em HCL 0,1 N, sendo provável acontecer isso pela forma catiônica que apresenta a molécula do fármaco, quando em meio ácido. Este dado é relevante porque pode-se inferir que no pH do estômago o fármaco vai-se manter estável e as formas moncatiônica e dicatiônica estarão presentes em considerável quantidade o que permitirá uma melhor absorção (NORD *et al.*, 1997a).

Entretanto para o NaOH 0,1N teve uma mudança significativa do espectro, assim, o fármaco de caráter ácido no meio alcalino (pH maior), maior concentração de íons OH⁻, maior concentração da forma ionizada vai ser sempre dependente do pH básico, porém menos estável e mais susceptível de sofrer mudanças drásticas. Essa mudança foi também observada ao submeter o fármaco a degradação, observando-se a mudança da solução transparente para cor branco leitoso e viscoso.

FIGURA 7. Mudanças dos espectros UV da Fotodegradação do CQ. (A) H₂O (B), HCl 0,1 N (C), tampão fosfato pH 6,8. controle:C, primeiro dia de ensaio:1 DIA; décimo dia de ensaio:10 DIA.

As mudanças nos espectros de absorção UV do difosfato de cloroquina após fotodegradação em três meios (H_2O , HCl 0,1 N e tampão fosfato pH 6,8) é ilustrada na FIGURA 7A, 7B, 7C, respectivamente, observou-se dois máximos de absorção em 220 nm e 343 nm que diminuem gradativamente com o tempo de exposição à luz. Quando se compara o comportamento do fármaco, pode-se observar que é semelhante nos meios água e HCl 0,1 N, nos dois meios a mudança ou queda do espectro é progressiva, durante os 10 dias de ensaio.

Não ocorre o mesmo para o tampão fosfato pH 6,8 onde se observa que os dois máximos de absorção (220 nm e 343 nm) diminuíram rapidamente desde o primeiro dia de ensaio, sendo que no décimo dia quase nada pode ser observado. Como mencionado antes, o pH tem uma influência significativa na fotodegradação (NORD *et al*, 1997a); no pH 6,8 do tampão fosfato o difosfato de cloroquina perde sua forma monocatiônica ou dicatiônica passando a sua forma ionizada mais instável.

Com a metodologia CLAE-UV, desenvolvida foram quantificadas as quantidades recuperadas de fármaco após degradação forçada e fotodegradação. Reportam-se na TABELA 3 os resultados das quantidades recuperadas do difosfato de cloroquina após degradação forçada, como observados nos estudos preliminares com espectrofotometria UV o meio ácido manteve o fármaco mais estável conseguindo-se recuperar 99,72% de fármaco confirmando a estabilidade neste médio pelas formas monocatiônica e dicatiônica em que se encontra o fármaco, observa-se também o pico característico de fármaco mostrado na FIGURA 4B. Em água a degradação não se apresenta drástica, também manteve-se a estabilidade e foi recuperado 97,14% de fármaco, esses resultados confirmam à água como médio ideal para o difosfato de cloroquina citado pela Farmacopéia americana (USP XXVIII, 2005), mostra-se também o pico característico que aparece aproximadamente aos 10 minutos (FIGURA 4A).

No agente oxidante (peróxido de hidrogênio) o fármaco sofre uma pequena degradação recuperando-se até 93,28%. Frente ao agente oxidante o fármaco manteve uma relativa estabilidade, sabendo-se que o peróxido é um forte oxidante e que as condições de temperatura empregadas favorecem uma oxidação o fármaco apresentou-se estável frente aos processos oxidativos aqui desenvolvidos, observa-se também o pico característico na FIGURA 4C.

TABELA 3. Quantidade de fármaco recuperado, das degradações forçadas. Difosfato de cloroquina em H₂O, HCl 0,1N, NaOH 0,1 N e H₂O₂ 30 vol, utilizando CLAE- UV.

Parâmetro	Quantidade de Fármaco Recuperado			
	H ₂ O	HCl 0,1N	NaOH 0,1N	H ₂ O ₂ 30 vol
Concentração (µg/mL)	5,15	5,67	0,25	5,13
Recuperação (%)	97,14	99,72	8,32	93,28
DP	0,045	0,117	0,008	0,082
CV (%)	0,875	2,093	1,855	1,598

DP: desvio padrão, CV(%): coeficiente de variação

No meio alcalino (NaOH 0,1N), como avaliado nos espectros UV anteriormente, a mudança é significativa só conseguiu-se recuperar 8,32 % de fármaco, o pico que aparece no cromatograma é pequeno como observado na FIGURA 4D, para confirmar se o pico correspondia ao fármaco em estudo e não a produto de degradação foi injetada uma quantidade conhecida de fármaco (0,26 µg/mL), confirmando finalmente que era o fármaco eluído em aproximadamente 10 minutos.

Por outro lado, a degradação por exposição à luz é um fator limitante na estabilidade dos fármacos. A predição do tempo de vida médio de um produto pode ser grandemente afetada por exposição à luz durante a manipulação e transporte. Os estudos de fotodegradação do difosfato de cloroquina, desenvolvidos aqui, foram realizados em dez dias em câmara de fotoestabilidade previamente calibrada pelo método actinométrico do quinino, segundo guia do ICH (ICH, 1996) e recomendações da ANVISA (Brasil, 2005).

Os resultados das quantidades recuperadas de fármaco por CLAE-UV após fotodegradação nos três meios testados são mostrados na TABELA 4. Tanto em água como em HCl 0,1 N os valores de recuperação obtidos foram de 37,74% e 39,85% respectivamente, apresentando um comportamento muito similar esses dois meios testados, confirma-se também com os picos mostrados nas FIGURAS 5A e 5B, eluídos aproximadamente em 10 minutos.

TABELA 4. Quantidade de fármaco recuperado da fotodegradação do difosfato de cloroquina em H₂O, HCl 0,1 N e tampão fosfato pH 6,8, utilizando CLAE-UV, após 10 dias.

Parâmetro	Quantidade de Fármaco Recuperado		
	H ₂ O	HCl 0,1N	Tampão Fosfato pH 6,8
Concentração (µg/mL)	5,04	5,88	1,25
Recuperação (%)	37,74	39,85	8,40
D.P.	0,0558	0,0125	0,0164
C.V. (%)	1,409	0,0314	1,859

DP: desvio padrão, CV(%): coeficiente de variação.

FIGURA 8. Porcentagem recuperada da fotodegradação do CQ, em três meios. Tempo de exposição 10 dias (240 horas), utilizando espectrofotometria UV.

A fotoestabilidade do fármaco em tampão fosfato pH 6,8 sofre um processo de degradação mais rápido, atingindo uma recuperação final após o décimo dia de ensaio de 8,4%, como mencionado anteriormente o pH do médio

exerce muita influencia no comportamento fotoquímico do fármaco. Segundo NORD *et al.*, 1997a, um incremento de pH leva a um incremento da fotólise do fármaco, porém o processo de fotodegradação é fortemente dependente do estado de ionização da molécula. Ao serem comparadas, as fotodegradações realizadas, no meio água e ácido o fármaco é relativamente mais fotoestável pela forma dicatônica da molécula, não acontecendo o mesmo para o pH 6,8 mais alcalino do tampão fosfato. Além do mais, o fármaco apresenta uma estrutura com dois anéis e duas aminas fotossensíveis, possui uma ligação fraca C-H e α para o nitrogênio da amina, essa estrutura com as características descritas é considerada um potencial agente que pode sofrer fotodegradação, como demonstrado neste estudo.

Mostra-se também os perfis da fotodegradação, ilustrados na FIGURA 8, pode-se observar que o fármaco apresenta perfil de degradação semelhante tanto para água como para HCl 0,1N, no entanto existe diferença marcada em tampão fosfato pH 6,8 observando-se uma maior degradação logo após no primeiro dia de ensaio.

Finalmente, além de desenvolver uma metodologia CLAE-UV, estável e simples a intenção deste estudo não foi identificar os produtos de degradação senão aperfeiçoar a metodologia desenvolvida e observar que os produtos de degradação não interferem no método desenvolvido. Este mostrou-se seletivo porque os produtos de degradação não apresentam interferência no pico do produto, além do que, quando otimizado o método com os produtos degradados, conseguiu-se quantificar quantidades apreciáveis de fármaco das amostras da degradação forçada e fotodegradação. Assim, o método aqui desenvolvido, revela que o CLAE-UV é um método sensível e estável e que pode ser utilizado na quantificação de difosfato de cloroquina, porque apresenta boa seletividade.

4. Conclusões

Foi desenvolvido e validado o método analítico CLAE-UV para quantificação de difosfato de cloroquina mostrando-se simples e apresentando boa especificidade, sensibilidade, linearidade, precisão e exatidão. Os resultados dos estudos de degradação recomendados pelo ICH, 2003, mostraram que a presença dos produtos de degradação não apresenta interferência e que o método é seletivo e estável.

Referências bibliográficas*

BERGQVIST, Y. & FRISK-HOLMBERG, M. Sensitive method for the determination of chloroquine and its metabolite desethyl-chloroquine in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography**. v. 221, p. 119-127, 1980.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medicamentos. Recomendações da Anvisa para Alterações Pós-Registro de Medicamentos (Atualizada em 06 de julho de 2005). **Estudo de Fotoestabilidade**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/recomenda/index.htm>>. Acesso em: 10 nov. 2006.

BRITISH Pharmacopoeia. London: The Stationery Office, 2005. Vol I, p.449,450.

CHAVEZ, J.; BRIONES, J.; ARANCIBIA, A. Estabilidad de una formulación oral de ciprofloxacina. **Acta farmacéutica bonaerense**. V.12, n. 3, p. 149-154, 1993.

DENG, H.; LIU, H.; KROGSTAD, M.F.; KROGSTAD, D.J. Sensitive fluorescence HPLC assay for AQ-13, a candidate aminoquinoline antimalarial, that also detects chloroquine and N-dealkylated metabolites. **Journal of chromatography B**. v. 833, p. 122-128, 2006.

DUCHARME. J. & FARINOTTI, R. Rapid and simple method to determine chloroquine and its desethylated metabolites in human microsomes by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of chromatography B**. v. 698, p. 243-250, 1997.

DWIVEDI, A.K.; SAXENA, S.; SINGH, S. HPLC and HPTLC assays for the antimalarial agents Chloroquine, Primaquine and Bulaquine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 33., p. 851-858, 2003.

ELFATIH, I.A. K.; IBRAHIM, K.E.E.; ABDELRAHMAN, A.N.; FELS, A.F. Photodegradation studies on chloroquine phosphate by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.12, n.5, p. 667-674, 1994.

* As referencias bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

ICH, Photostability Testing of New Drug Substances and Products (Q1B). International Conference on Harmonization, IFPMA, Geneva, 1996.

ICH, Stability Testing of New Drug Substances and Products (Q1A-R2). International Conference on Harmonization, IFPMA, Geneva, 2003.

ICH, Validation of Analytical Procedures: Text and methodology Q2(R1). International Conference on Harmonization, IFPMA, Geneva, 2005.

MERCK index. 14 ed. White house Station, 2006. p.358.

NORD, K.; KARLSEN, J.; TONNESEN, H.H. Photochemical stability of biologically active compounds. IV. Photochemical degradation of chloroquine. **International Journal of Pharmaceutics**, v.72, p.11-18, 1991.

NORD, K; ORSTEEN, A.L.; KARLESEN, J; TONNESEN, H.H.; Photoreactivity of biologically active compounds, X: Photoreactivity of chloroquine in aqueous solution. **Pharmazie**, v.52, n.8, p. 598-603, 1997a.

NORD, K; ANDERSEN, H.; TONNESEN, H.H. Photoreactivity of biologically active compounds. XII. Photostability of polymorphic modifications of chloroquine diphosphate. **Drugs stability**. v.1. n. 4. p. 243-248, 1997b.

SAMANIDOU, F.V.; EVAGGELOPOULOU, E.N.; PAPADOYANNIS, I.N. Simultaneous determination of quinine and chloroquine anti-malarial agents in pharmaceuticals and biological fluids by HPLC and fluorescence detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.38, p. 21-28, 2005.

UNITED States Pharmacopeia. 28.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2005. p. 422-423.

VIRENDRA,K.D.; KAR, P.K.; GUPTA, N.C.; SHARMA, V.P. Determination of chloroquine and desethylchloroquine in plasma and blood cells of Plasmodium 6i6ax malaria cases using liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 21, p. 199-205, 1999.

YONEMITSU, K.; KOREEDA, A.; KIBAYASHI, K.; NG'WALALI, P.; MBONDE, M.; KITINYA, J.; TSUNENARI, S. HPLC analysis of anti-malarial agent, chloroquine in blood and tissue from forensic autopsy cases in Tanzania. **Legal Medicine**. v.7, p.113-116, 2005.

WILLIAMS, L.H.; JOHNSON, D.J.; COLLINS, H.H.; MARTIN, S.K. Simultaneous determination of chloroquine and selected calcium (II) channel blockers by high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**. v. 228, p. 155-157, 1990.

Capítulo 3

AVALIAÇÃO DA FOTOESTABILIDADE DE COMPLEXOS BINÁRIOS E TERNÁRIOS DE DIFOSFATO DE CLOROQUINA

Resumo

Com a finalidade de investigar a influência das ciclodextrinas na fotodegradação do difosfato de cloroquina foram desenvolvidos complexos de inclusão binários com β - ciclodextrina e HP- β -ciclodextrina e ternários adicionando-se um polímero aos complexos (PVP K-30). Todos os complexos foram obtidos pelo método de co-precipitação e em proporções estequiométricas (1:1) e com 1% de polímero (p/p). Os complexos foram caracterizados por análise térmica (DSC) e infravermelho e os resultados indicaram a formação de complexos binários fármaco- β -ciclodextrina e fármaco-HP- β -ciclodextrina, assim como complexos ternários com β -ciclodextrina e PVP K-30 e HP- β -Ciclodextrina e PVP K-30. Foram também realizados estudos de fotoestabilidade, os quais indicam que os complexos com β -ciclodextrina e HP- β -Ciclodextrina proporcionam uma melhoria na fotoestabilidade do fármaco em água, sendo que para o complexo ternário em β - ciclodextrina a melhora foi maior. Entretanto, para o meio HCl 0,1N os complexos sofrem fotodegradação significativa que não ocorre com o fármaco livre. O comportamento frente à luz, em meio tampão fosfato pH 6,8, apresenta perfil muito semelhante tanto para os complexos como para o fármaco livre.

Palavras chave: complexação, difosfato de cloroquina, β -ciclodextrina, HP- β -ciclodextrina.

1. Introdução

O estudo de complexos moleculares do tipo hospedeiro-hóspede tem promovido avanços significativos em diferentes áreas da ciência e tecnologia. Empregam-se compostos macrocíclicos para encapsular, em suas cavidades, pequenas moléculas hóspedes. A interação entre as espécies pode ser possível devido a requisitos de natureza estérica e afinidade química, produzindo-se novos materiais que podem apresentar propriedades físico-químicas potencialmente aplicáveis em fármacos, produtos cosméticos e alimentos (UEKAMA, *et al.*, 1998; WENZ, 2003).

As principais ciclodextrinas (CD) possuem seis, sete e oito unidades de açúcares, conhecidas como α , β e γ ciclodextrinas, respectivamente. Esses agentes têm a forma estrutural de cone truncado apresentando as extremidades abertas, com grupos hidroxila primários e secundários orientados para o exterior. Assim, sua face externa apresenta características hidrofílicas e a interna hidrofóbica permitindo complexarem-se com moléculas de dimensões compatíveis com a sua cavidade. A complexação é capaz de alterar propriedades físico-químicas, como solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade do fármaco (UEKAMA, *et al.*, 1998; FRÖMING & SZEJTLI, 2000; McCORMACK & GREGORIADIS, 2001).

A habilidade das ciclodextrinas de formarem complexos de inclusão depende essencialmente da compatibilidade estérica e da polaridade do fármaco. Além disso, as forças que dirigem a complexação têm sido atribuídas à alta energia de repulsão da água na cavidade das ciclodextrinas, às interações de Van der Waals, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, já que a cavidade interna tem diâmetros de 5 a 8 Å, sendo capaz de acomodar um hexanel aromático (BIBBY, *et al.*, 2000; REJEWSKI & STELLA, 2001; VEIGA, *et al.*, 2006).

Na indústria farmacêutica numerosas são as aplicações de complexos com ciclodextrinas, dentre as quais destaca-se a melhora da absorção e liberação do ativo em lugares alvo do trato digestivo, sendo estas características vinculadas à solubilidade. No entanto, substâncias sensíveis ao calor, oxigênio e à luz podem ter sua estabilidade melhorada mediante uma incorporação às ciclodextrinas (VEIGA, *et al.*, 2006; UEKAMA, *et al.*, 1998).

A fotoestabilidade de determinados fármacos pode ser melhorada, por intermédio da complexação com ciclodextrinas, como demonstrado para dipirona (PITARELLO, *et al.*, 2005), ibuprofeno (GODWIN, *et al.*, 2006), nicardipino

1. Introdução

O estudo de complexos moleculares do tipo hospedeiro-hóspede tem promovido avanços significativos em diferentes áreas da ciência e tecnologia. Empregam-se compostos macrocíclicos para encapsular, em suas cavidades, pequenas moléculas hóspedes. A interação entre as espécies pode ser possível devido a requisitos de natureza estérica e afinidade química, produzindo-se novos materiais que podem apresentar propriedades físico-químicas potencialmente aplicáveis em fármacos, produtos cosméticos e alimentos (UEKAMA, *et al.*, 1998; WENZ, 2003).

As principais ciclodextrinas (CD) possuem seis, sete e oito unidades de açúcares, conhecidas como α , β e γ ciclodextrinas, respectivamente. Esses agentes têm a forma estrutural de cone truncado apresentando as extremidades abertas, com grupos hidroxila primários e secundários orientados para o exterior. Assim, sua face externa apresenta características hidrofílicas e a interna hidrofóbica permitindo complexarem-se com moléculas de dimensões compatíveis com a sua cavidade. A complexação é capaz de alterar propriedades físico-químicas, como solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade do fármaco (UEKAMA, *et al.*, 1998; FRÖMING & SZEJTLI, 2000; McCORMACK & GREGORIADIS, 2001).

A habilidade das ciclodextrinas de formarem complexos de inclusão depende essencialmente da compatibilidade estérica e da polaridade do fármaco. Além disso, as forças que dirigem a complexação têm sido atribuídas à alta energia de repulsão da água na cavidade das ciclodextrinas, às interações de Van der Waals, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, já que a cavidade interna tem diâmetros de 5 a 8 Å, sendo capaz de acomodar um hexanel aromático (BIBBY, *et al.*, 2000; REJEWSKI & STELLA, 2001; VEIGA, *et al.*, 2006).

Na indústria farmacêutica numerosas são as aplicações de complexos com ciclodextrinas, dentre as quais destaca-se a melhora da absorção e liberação do ativo em lugares alvo do trato digestivo, sendo estas características vinculadas à solubilidade. No entanto, substâncias sensíveis ao calor, oxigênio e à luz podem ter sua estabilidade melhorada mediante uma incorporação às ciclodextrinas (VEIGA, *et al.*, 2006; UEKAMA, *et al.*, 1998).

A fotoestabilidade de determinados fármacos pode ser melhorada, por intermédio da complexação com ciclodextrinas, como demonstrado para dipirona (PITARELLO, *et al.*, 2005), ibuprofeno (GODWIN, *et al.*, 2006), nicardipino

(POMPONIO, *et al.*, 2004), nifedipino (BAYOMI, *et al.*, 2002), isradipino (MIELCAREK & DACZKOWSKA, 1999). É possível, ainda, obter-se um efeito sinérgico, com benefícios sobre a fotoestabilidade do fármaco ao adicionar-se um terceiro componente. VALERO & ESTEBAN (2004) e VALERO & CARRILLO (2004), utilizaram este recurso para o naproxeno com os polímeros polivinilpirrolidona e polietilenoglicol.

Por outro lado, o difosfato de cloroquina, um fármaco quinolínico de conhecida fotosensibilidade, utilizado no tratamento da malária por sua rápida atividade esquizonticida para todas as espécies e gametocitocida para *P. vivax* e *P. malariae*. Também é usado no tratamento de doenças como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide, entre outras menos freqüentes (MERCK INDEX, 2006; NORD *et al.*, 1997).

Assim, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a influência da complexação com β -ciclodextrina, HP- β -ciclodextrina e polímeros na fotoestabilidade do difosfato de cloroquina.

2. Material e métodos

2.1 Reagentes

Foi utilizado difosfato de cloroquina (CQ) gentilmente doado por GERBRAS Química Farmacêutica Ltda., (Brasil), de origem TENGARDEN INC., China, com grau de pureza 99,06 %. As ciclodextrinas utilizadas foram β -ciclodextrina (BCD) Kleptose®, ROQUETTE, (França) e HP- β -ciclodextrina (HP-BCD) Chemyunion (Brasil). O polímero polivinilpirrolidona K-30, BASF (Brasil); todas as matérias primas utilizadas foram de grau de pureza farmacêutico.

Os solventes e demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2 Preparo dos complexos binários

Os complexos binários (CXB) foram obtidos pelo método de co-evaporação utilizando proporção estequiométrica 1:1 de fármaco: β -ciclodextrina e fármaco:HP- β -ciclodextrina (RIBEIRO, *et al.*, 2003). O fármaco e a ciclodextrina foram dissolvidos em água destilada em quantidade suficiente para cada ciclodextrina testada. A solução de fármaco e ciclodextrina foi juntada e colocada

sob agitação em agitador magnético Speedlab Nalgon (Brasil), em velocidade de 500 rpm, por 48 horas. Após este tempo foi levado para secagem, em estufa de circulação forçada de ar Fabbe–Primar (Brasil) a 50° C, para secagem total.

2.3 Preparo dos complexos ternários

Os complexos ternários (CXT) foram obtidos pelo mesmo método descrito anteriormente, somente adicionando 1% de solução de polímero, polivinilpirrolidona K-30 (p/p) para cada ciclodextrina testada (RIBEIRO, *et al.*, 2003). As soluções de fármaco, complexo e polímero foram juntadas e colocadas em agitador magnético Speedlab Nalgon (Brasil), em velocidade de 500 rpm por 48 horas. Após este tempo foram levados para rotaevaporação em rotaevaporador Tecnal TE-210 (Brasil) com bomba de vácuo Millipore (EUA) a 45° C por 24 horas e posteriormente colocado em estufa de circulação de ar Fabbe–Primar (Brasil) a 50°C, para secagem total.

2.4 Caracterização dos complexos

2.4.1 DSC

Os complexos foram submetidos a análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC) em calorímetro DSC 2920 TA Instruments (EUA). A análise foi conduzida empregando-se cadinho hermético de alumínio (massa das amostras aproximadamente 2,0 mg) que foram submetidas a aquecimento no intervalo de temperatura de 25°C a 300°C sob atmosfera dinâmica de nitrogênio. A razão de aquecimento empregada foi de 10° C/ min com fluxo de nitrogênio de 50 mL/min.

2.4.2 Infravermelho

Para o análise de Infravermelho foram preparadas pastilhas de cada um dos complexos que, após mistura com KBr em grau de água na proporção de 1:3, foram prensados com força de 0,5 ton durante 4 minutos, com auxílio de bomba de vácuo para remoção do ar. Utilizou-se o equipamento FITR-BOMEM Michelsson Hartmann & Braun MB-100 (Alemanha).

2.5 Avaliação da fotoestabilidade dos complexos

Os ensaios de avaliação da fotoestabilidade dos complexos de difosfato de cloroquina foram conduzidos em câmara de fotoestabilidade Farma 424 CF NOVA ÉTICA (Brasil), sob as seguintes condições das fontes: Lâmpada branca fluorescente fria similar à ISO 10977 e Lâmpada fluorescente UV com espectro

distribuído entre 320 nm e 400 nm, e emissão máxima de energia entre 350 nm e 370 nm (ICH, 1996).

Foram preparadas soluções com os complexos formados (10 µg/mL) em três meios: água, HCl 0,1 N e tampão fosfato pH 6,8. Colocaram-se 10 mL de solução de cada meio testado em frasco-ampola de vidro transparente (ICH, 1996), fechadas hermeticamente (dez para teste e um controle). Os frascos foram colocados na câmara de fotoestabilidade, regulada a temperatura $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5$. Manteve-se o controle protegido com papel de alumínio durante os 10 dias de teste.

Após este tempo, as amostras foram retiradas da câmara e submetidas a leitura em espectrofotômetro Beckman Coulter DU® 640 (EUA), no comprimento de onda máximo detectável para o fármaco de 343 nm, utilizando-se cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

A quantificação do fármaco recuperado foi baseada em reta de calibração previamente construída e submetida à análise de regressão linear.

3. Resultados e discussão

Segundo estudos de fotodegradação do difosfato de cloroquina em meio aquoso e iso-propanol (NORD, *et al.*, 1991; TONNESEN, *et al.*, 1998) os dois compostos formados em maior proporção pela quebra da molécula (tanto *in vitro* como *in vivo*), são a 4-amino-7-cloroquina e desetilcloroquina, as quais são potenciais fotossensíveis. Entretanto, existe uma parte da estrutura, o carbono C15 que tem uma molécula de cloro, que é considerada estável, pois, em todas as quebras e produtos de degradação obtidos essa aparece sem alteração.

A caracterização dos complexos por análise térmica, apresentadas nas FIGURAS 1 e 3 indica a formação de complexos de inclusão binários do fármaco com β -ciclodextrina e HP- β -ciclodextrina respectivamente. É possível observar deslocamento do ponto de fusão da ciclodextrina e o desaparecimento do pico do fármaco (CQ). Logo após a fusão característica do complexo, acontecem outros eventos endotérmicos que indicam possível recristalização do fármaco. Na TABELA 1 é apresentado um resumo das variações dos pontos de fusão.

TABELA 1. Deslocamento dos valores de ponto de fusão dos complexos binários e ternários com β -ciclodextrina e HP- β -ciclodextrina.

Amostra	Ponto de fusão (°C)				
	Não complexado	CXB BCD	CXT BCD	CXB HP-BCD	CXT HP-BCD
CQ	201,32	Não aparece	Não aparece	Não aparece	Não aparece
BCD	135,35	129,61	138,30	--	--
HP-BCD	116,42	--	--	226,24	226,19
PVP K-30	131,15	--	Não aparece	--	Não aparece

CXB BCD: complexo binário com β -ciclodextrina

CXT BCD: complexo ternário com β -ciclodextrina e PVP K-30

CXB HP-BCD: complexo binário com HP- β -ciclodextrina

CXT HP-BCD: complexo ternário com HP- β -ciclodextrina e PVP K-30

Para os complexos ternários com PVP K-30 (FIGURAS 2 e 4) os resultados indicam a complexação como ambas ciclodextrinas, uma vez que o pico do fármaco desaparece. No caso do complexo com HP- β -ciclodextrina, ocorre o desaparecimento de todos os picos.

Nas FIGURAS 5 e 7 são apresentados os espectros no infravermelho do complexo binário do difosfato de cloroquina com β -ciclodextrina e HP- β -ciclodextrina respectivamente. É possível observar o deslocamento da banda das aminas secundárias do estiramento N-H (3500 cm^{-1} e 3300 cm^{-1}) do fármaco, que se modifica aparecendo como bandas maiores e mais largas, sendo deslocadas para 3391 cm^{-1} e 3426 cm^{-1} respectivamente, característica das ciclodextrinas, indicando assim a formação dos complexos de inclusão.

As FIGURAS 6 e 8 apresentam os espectros de infravermelho dos complexos ternários do fármaco com β -ciclodextrina e HP- β -ciclodextrina. É possível observar o deslocamento das aminas secundárias do estiramento N-H (3500 cm^{-1} e 3300 cm^{-1}) do fármaco, que muda e aparece como uma banda maior e mais larga deslocada para 3385 cm^{-1} e 3406 cm^{-1} , característica da ciclodextrina. Na mesma banda encontra-se também o polímero PVP K-30, indicando assim a formação de complexo de inclusão.

FIGURA 2. Curvas de DSC do complexos de inclusão ternários (CXT BCD) contendo difosfato de cloroquina (CQ), β -ciclodextrina (BCD) e polímero (PVP K-30), obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

FIGURA 3. Curvas de DSC do complexo de inclusão binário (CXB HP-BCD) contendo difosfato de cloroquina (CQ) e HP- β -ciclodextrina (HP-BCD), obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

FIGURA 4. Curvas de DSC do complexo de inclusão ternário (CXT HP-BCD) contendo difosfato de cloroquina (CQ), HP- β -ciclodextrina (HP-BCD) e polímero (PVP K-30), obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min.

Em seguida à comprovação da formação dos complexos foi avaliada a fotoestabilidade do fármaco, cujos resultados são apresentados na TABELA 2, onde são descritos os valores de porcentagem de fármaco recuperado após 24 horas e 10 dias de ensaio de fotodegradação, utilizando-se diferentes meios para os complexos binários (CXB) e ternários (CXT).

FIGURA 5. Espectros infravermelho do difosfato de cloroquina (CQ), β -ciclodextrina (BCD) e complexo de inclusão binário (CXB BCD).

FIGURA 6. Espectros infravermelho do difosfato de cloroquina (CQ), β -ciclodextrina (BCD), polímero (PVP K-30) e complexo de inclusão ternário (CXT BCD)

FIGURA 7. Espectros infravermelho do difosfato de cloroquina (CQ), HP- β -ciclodextrina (HP-BCD) e complexo de inclusão binário (CXB HP-BCD).

FIGURA 8. Espectros infravermelho do difosfato de cloroquina (CQ), HP-β-ciclodextrina (HP-B-CD), polímero (PVP K-30) e complexo de inclusão ternário (CXT HP-BCD).

TABELA 2. Valores de porcentagem de fármaco recuperado a partir dos complexos binários e ternários do difosfato de cloroquina com β -ciclodextrina e HP- β -ciclodextrina após exposição durante 24 horas e 10 dias.

Quantidade de Fármaco Recuperada (%)			
Amostras	Água	HCl 0,1 N	Tampão fosfato pH 6,8
CQ	99,74	99,85	100,88
CQ (24 horas)	87,62	81,32	40,62
CQ (10 dias)	20,58	14,74	4,69
CXB BCD	18,91	5,60	2,68
CXT BCD	34,51	2,10	3,06
CXB HP-BCD	24,55	0,04	3,75
CXT HP-BCD	29,14	0,08	3,17

CXB BCD: complexo binário com β -ciclodextrina

CXT BCD: complexo ternário com β -ciclodextrina e PVP K-30

CXB HP-BCD: complexo binário com HP- β -ciclodextrina

CXT HP-BCD: complexo ternário com HP- β -ciclodextrina e PVP K-30.

Os resultados mostram que após 24 horas de ensaio já é possível observar uma queda de até 60% no teor do fármaco para o meio tampão fosfato e de até 12% e 18% para água e HCL 0,1N respectivamente (TABELA 2), o que parece indicar que a sensibilidade à luz apresentada pela cloroquina mostra-se dependente do pH do meio no qual esta encontra-se dissolvida, é possível que os complexos sejam instáveis em meio ácido e levem à instabilidade da molécula do fármaco acelerando o processo de fotodegradação.

FIGURA 9. Perfil da fotodegradação dos complexos binário (CXB) e ternário (CXT) utilizando β -ciclodextrina e HP- β -Ciclodextrina, submetida a fotodegradação em câmara de fotoestabilidade, após 10 dias de ensaio.

FIGURA 10. Perfil da fotodegradação dos complexos binário (CXB) e ternário (CXT) utilizando β -ciclodextrina e HP- β -Ciclodextrina, submetida a fotodegradação em câmara de fotoestabilidade, após 10 dias de ensaio.

Aumento na fotodegradação do fármaco após complexação com ciclodextrinas são relatadas na literatura, como por exemplo, para o naproxeno (JIMÉNEZ, *et al.*, 1997) onde a complexação sob condições aeróbicas resulta na fotodescarboxilação do fármaco acelerando o processo de fotodegradação. Do mesmo modo, as ciclodextrinas aceleram a degradação da flutamida, neste caso é observada uma mudança significativa tanto da natureza, como da eficiência da fotodegradação, resultando na fotoredução do grupo nitro e a fotoclivagem da ligação de amida, incrementando a fotodegradação em presença da ciclodextrina em até 20 vezes, conforme descrito por SORTINO, *et al.*, 2001.

Decorridos 10 dias de ensaio de fotodegradação, os resultados indicam que em água (FIGURA 10) o fármaco continua apresentando a menor degradação, e foi possível observar certa proteção do mesmo com o complexo ternário de β -ciclodextrina e PVP K-30, conseguindo-se recuperar, nesse caso, 34,51% de fármaco (TABELA 2).

FIGURA 11. Perfil da fotodegradação dos complexos binário (CXB) e ternário (CXT) utilizando β -ciclodextrina e HP- β -Ciclodextrina, submetida a fotodegradação em câmara de fotoestabilidade, após 10 dias de ensaio.

Para o HCl 0,1N, o comportamento verificado, após a complexação é distinto do observado para água: os complexos aceleram a degradação do fármaco pela luz (FIGURA 11).

Entretanto, em tampão fosfato pH 6,8, a cloroquina apresenta a maior degradação (queda de mais de 99% da quantidade presente na solução) e os complexos desenvolvidos não foram capazes de proteger o fármaco. Nesse meio, o comportamento frente à luz apresentado pela cloroquina não se modifica, mantendo-se praticamente o mesmo para o fármaco e os complexos, durante os 10 dias de ensaio (FIGURA 12).

Portanto, embora seja possível utilizar ciclodextrinas para melhorar a fotoestabilidade de fármacos, em alguns casos específicos, como aqui demonstrado para o difosfato de cloroquina, a complexação pode não ser capaz de exercer este efeito protetor diante da luz. Para o difosfato de cloroquina outras estratégias devem ser buscadas.

4. Conclusão

Os complexos binários e ternários (com PVP K-30) contendo difosfato de cloroquina e β - ciclodextrina ou HP- β -ciclodextrina, não foram capazes de proteger o fármaco da degradação promovida pela luz nos meios água, HCl 0,1N e tampão fosfato pH 6,8. Em HCl 0,1N verifica-se que alguns complexos são capazes, inclusive, de acelerar a degradação promovida pela luz.

Referências bibliográficas*

BAYOMI, M.A.; ABANUMAY, K.A.; AL-ANGARY, A.A. Effect of inclusion complexation with cyclodextrins on photostability of nifedipine in solid state. **International Journal of Pharmaceutics**. v.243, p.107–117, 2002.

BIBBY, D.; DAVIES, N.M.; TUCKER, I.G. Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**. v.197, p.1-11, 2000.

* As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

FRÖMMING, K.H.; SZEJTLI, J. **Topics in Inclusion Science - Cyclodextrins in Pharmacy**. Hungria, Kluwer Academic Publishers, 2000-II; p. 50-51.

GODWIN, D.A.; WILEY, C.J.; FELTON, L.A. Using cyclodextrin complexation to enhance secondary photoprotection of topically applied ibuprofen. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 62, p. 85–93, 2006.

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Guidelines. Quality Topics. Stability. **Q1B: Photostability Testing of New Drug Substances and Products**. Recommended for Adoption at Step 4 of the ICH Process on 6 November 1996 by the ICH Steering Committee. Disponível em: <<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA412.pdf>>. Acesso em: 20 nov 2006.

JIMÉNEZ, M.C.; MIRANDA, M.A.; TORMOS, R. Photochemistry of naproxen in the presence of β -cyclodextrin. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. v.104, p.119-121, 1997.

McCORMACK, B.; GREGORIADIS, G. Drugs-in-cyclodextrins-in-liposomes: an approach to controlling the fate of water insoluble drugs *in vivo*. **International Journal of Pharmaceutics**. v.162, p.59-69, 2001.

MIELCAREK, J.; DACZKOWSKA, E. Photodegradation of inclusion complexes of isradipine with methyl- β -cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 21, p. 393–398, 1999.

MERCK index. 14 ed. Whitehouse Station, NJ. USA. 2006. p.358.

NORD, K.; KARLESEN, J.; TONNESEN, H.H. Photochemical stability of biologically active compounds. IV. Photochemical degradation of chloroquine. **International Journal of Pharmaceutics**, v.72, p.11-18, 1991.

NORD, K.; ORSTEEN, A-L.; KARLESEN, J.; TONNESEN, H.H. Photoreactivity of biologically active compounds, X: Photoreactivity of chloroquine in aqueous solution. **Pharmazie**, v.52, n.8, p. 598-603, 1997.

PITARELLO, A.P.; LINDINO, C.A.; DA SILVA, C.; VETTER FERREIRA, E.A.; DE LIMA SOUZA, M.; BARICCATI, R.A. Estudo fotoquímico da dipirona na presença de β e γ ciclodextrina. **Acta Scientiarum. Health sciences**. v. 27, n. 2, p. 171-175, 2005.

POMPONIO, R.; GOTTI, R.; FIORI, J.; CAVRINI, V.; MURA, P.; CIRRI, M.; MAESTRELLI, F. Photostability studies on nicardipine–cyclodextrin complexes by capillary electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 35, p.267–275, 2004.

RAJEWSKI, R.A.; STELLA, V.J. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. *In vivo* Drug delivery. **Journal Pharmaceutical Science**. v.85, p.1142-1169, 2001.

RIBEIRO, L.; LOFTSSON, T.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Investigation and physicochemical characterization of vinpocetine-sulfobutyl ether beta-cyclodextrin binary and ternary complex. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**. v.51, n.8, p.914–922, 2003.

SORTINO, S.; GIUFFRIDA, S.; DE GUIDI, G.; CHILLEMI, R.; PETRALIA, S.; MARCONI, G.; CONDORELLI, G.; SCIUTO, S. The Photochemistry of Flutamide and its Inclusion Complex with b-Cyclodextrin. Dramatic Effect of the Microenvironment on the Nature and on the Efficiency of the Photodegradation Pathways. **Photochemistry and Photobiology**. v. 73, n. 1, p. 6-13, 2001.

TONNESEN, H.H.; GRISLINGAAS, A-L.; WOO, S.O.; KARLESEN, J; Photochemical stability of malarial. I. Hydroxychloroquine. **International Journal of Pharmaceutics**, v.3, n.3 p.215-219, 1998.

UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin drug carrier systems. **Chemical Reviews**®. v. 98, n.5, p.2045-2076, 1998.

VALERO, M.; CARRILLO, C. Effect of binary and ternary polyethyleneglycol and/or b-cyclodextrin complexes on the photochemical and photosensitizing properties of Naproxen. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.74, p.151–160, 2004.

VALERO, M.; ESTEBAN, B. Effect of binary and ternary polyvinylpyrrolidone and/or hydroxypropyl-b-cyclodextrin complexes on the photochemical and photosensitizing properties of Naproxen. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.76, p. 95–102, 2004.

VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. **As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica**, Ed.MinervaCoimbra: Coimbra, 2006. p. 43-46, 142.

WENZ, G. Cyclodextrins as Building Blocks for Supramolecular Structures and Functional Units. **Angewandte Chemie International**. v.33, n.8, p.803-822, 2003.

Capítulo 4

AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA RECRISTALIZAÇÃO NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO DIFOSFATO DE CLOROQUINA

Resumo

O difosfato de cloroquina é um fármaco utilizado para o tratamento da malária que se apresenta sob duas formas polimórficas com ponto de fusão entre 193°-197° C e 215-218° C. Com a finalidade de investigar os polimorfos deste fármaco, foram realizadas recristalizações em diferentes condições, tais como solventes (água, etanol, metanol, iso-propanol e clorofórmio); temperaturas ($8^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e $40^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) e processos (agitação mecânica, rotaevaporação, aquecimento, resfriamento e secagem). Os cristais assim obtidos foram caracterizados mediante calorimetria diferencial de varredura (DSC), espectroscopia no infravermelho, difração de raios-X e microscopia, os resultados indicaram que os cristais formados não apresentaram mudança significativa, exceto naqueles obtidos por recristalização com etanol e clorofórmio denominados CQR4. Para os quais foram registrados diferentes picos de fusão em DSC. Entretanto, a espectroscopia no infravermelho e a difração de raios-X não revelam essa diferença.

Palavras chave: difosfato de cloroquina, recristalização, DSC, Difração de raio-X, microscopia ótica.

1. Introdução

Cristais são arranjos ordenados de moléculas de átomos, mantidos por interações não covalentes e caracterizados pela repetição periódica de uma estrutura tridimensional regular. Tais estruturas podem variar no tamanho, no desenvolvimento relativo de uma dada face e no número e tipo de faces (formas) presentes, isto é, os cristais podem adotar diferentes estruturas externas sem alterar a sua estrutura interna (LACHMAN *et al.*, 2001; WELLS, 2005; VIPPAGUNTA, *et al.*, 2001).

Há sete células unitárias básicas ou sistemas cristalinos: cúbico, tetragonal, ortorrômbico, romboédricos (ou trigonal) monoclinicos, triclinicos e trigonal-hexagonal. O que diferencia esses tipos de celas unitárias é a relação entre seus parâmetros de rede. Os seis parâmetros de rede definem a células unitárias pelas arestas (a , b , c) que indicam o comprimento dos três eixos, enquanto α , β e γ são os três ângulos existentes convergem em um vértice 0, FIGURA 1. No caso específico dos fármacos, os três tipos mais comuns de cela unitária são: triclinica, monoclinica e ortorrômbica (FLORENCE & ATTWOOD, 2003, VIPPAGUNTA, *et al.*, 2001; WELLS, 2005).

18979

FIGURA 1. Célula unitária básica de um sistema cristalino.

Os cristais podem apresentar diferentes hábitos cristalinos, dos quais são reconhecidas seis formas: tubulares, aciculares, prismáticos, piramidais, colunares e lamelares. O hábito cristalino depende das condições de cristalização, podendo ser modificado por supersaturação, velocidade de resfriamento e agitação, temperatura, solvente de recristalização, adição de co-solvente ou outros íons, presença de impurezas, etc. (BUCKTON, 2005; FLORENCE & ATTWOOD, 2003; WELLS, 2005)

A forma cristalina e a estrutura interna de um fármaco podem afetar suas propriedades físico-químicas, que incluem desde a capacidade de escoamento até a estabilidade físico-química do produto acabado e finalmente seu comportamento biológico em termos farmacológicos e terapêuticos (LACHMAN, *et al.*, 2001; ANSEL, *et al.*, 2000).

Muitos compostos orgânicos são capazes de adotar uma ou mais formas cristalinas ou uma forma amorfa (sem estrutura definida), dependendo das condições sob as quais a cristalização é induzida. Essa propriedade pela qual uma substância pode existir em mais de uma forma cristalina é chamada de polimorfismo. Assim, dois polimorfos de um mesmo composto podem ser tão distintos em estrutura cristalina e propriedades físico-químicas como dois compostos diferentes (ANSEL, *et al.*, 2000; DOELKER, 2002; VILA JATO, 2001; VIPPAGUNTA, *et al.*, 2001).

A estrutura dos cristais afeta a densidade e porosidade do comprimido, mecanismos de desintegração, assim como as propriedades plásticas e elásticas na preparação das formas sólidas e, com isso, a estabilidade e biodisponibilidade do fármaco poderão ser diretamente influenciadas (HALEBLIAN, 1975 e STOLTZ *et al.*, 1989)

O difosfato de cloroquina, um fármaco utilizado no tratamento da malária, apresenta duas formas polimórficas: uma com ponto de fusão em 193-195°C e outra em 215-218°C. (MERCK INDEX, 2006; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2005).

Então, considerando-se que o difosfato de cloroquina pode apresentar modificações cristalinas polimórficas o presente estudo tem como objetivo caracterizar amostras de difosfato de cloroquina obtidas comercialmente e a partir de diferentes condições de recristalização.

2. Material e Métodos

2.1 Reagentes

Foi utilizado difosfato de Cloroquina gentilmente doado por Gerbras Química Farmacêutica Ltda. (Brasil), com grau de pureza 99,06% e Kinder Ltda., (Brasil), com grau de pureza, 99,73%; denominados CQG e CQK, respectivamente. Os solventes utilizados para as recristalizações foram de grau analítico.

2.2 Recristalizações do fármaco

O fármaco foi submetido a diferentes processos de recristalização empregando-se diferentes solventes tais como etanol, iso-propanol, metanol, clorofórmio e condições de temperatura, agitação e evaporação. Na TABELA 1 estão descritas as condições nas quais as amostras foram obtidas.

TABELA 1. Condições utilizadas para obtenção dos cristais de difosfato de cloroquina.

Amostras	Solvente	Condições iniciais	Processo de recristalização
CQR1	Etanol	Solução aquosa 15 %, a 25° C	Agitação mecânica *
CQR2	Iso-propanol		Refrigeração 8°C ± 0,5°C; 24 h.
CQR3	Metanol		Filtração sob vácuo Secagem 40°C ± 0,5°C; 24 h.
CQR4	1°solvente: clorofórmio e 2° solvente: etanol	Solução aquosa, saturada, a 25° C	1° solvente Agitação mecânica* Refrigeração 8°C ± 0,5°C; 24 h. 2° solvente Agitação mecânica* Refrigeração 8°C ± 0,5°C; 24 h. Rotaevaporação sob vácuo, 40°C ± 0,5°C; 8h. Secagem 40°C ± 0,5°C; 72 h.

2.3 Caracterização das amostras

2.3.1 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Foi utilizado Calorímetro DSC 2920 TA Instruments (USA) e as análises foram conduzidas empregando-se cadinho hermético de alumínio, massa de amostra de aproximadamente 2,0 mg que foram submetidas a aquecimento no intervalo de temperatura de 25°C a 300°C sob atmosfera dinâmica de nitrogênio. As

razões de aquecimento empregadas foram de 2° C/min, 10 °C/min e 20°C/min com fluxo de nitrogênio de 50 mL/min.

2.3.2 Espectroscopia no Infravermelho

Para a análise por Infravermelho foram preparadas pastilhas das amostras obtidas com KBr mediante a mistura, em grau de ágata, na proporção de 1:3 e prensados com força de 0,5 ton durante 4 minutos, com auxílio de bomba de vácuo para remoção do oxigênio. Utilizou-se o equipamento FITR-BOMEM Michelsson Hartmann & Braun MB-100 (Alemanha).

2.3.3 Microscopia Ótica

Foi empregado Estereoscópio Motic® MLC-150C (China) e câmera fotográfica digital FUJIFILM FinePix S5100 (Japão), sistema ótico com aumento total de 100 vezes (100X).

2.3.4 Difração do pó por Raios-x

A caracterização das amostras foi realizada em equipamento Rigaku X-Ray Diffractometer, modelo Ultima+ (USA). O gerador de raio-X utilizou um tubo com alvo de cobre monocromatizado e um detector de cintilação. Comprimento de onda 1,5418 Å e potência de emissão de 40 KV e 30 mA. As amostras foram fixadas com gel amorfo do tipo HIVAC-G Shin-Etsu Silicone e o passo angular para cada amostra foi de 0,05° em um tempo de irradiação de 5 segundos, sob rotação de 30 rpm e óptica $\theta - \theta$ (dois teta).

3. Resultados e discussão

A caracterização do fármaco difosfato de cloroquina (CQK), realizado por DSC, apresentou eventos endotérmico em 195,74°C (2°C/min), 196,09°C (10°C/min) e 204,29°C (20°C/min) referente ao ponto de fusão que corresponde ao fármaco sob a forma hidratada (BJAEN, *et al.*, 1993; FURUSETH, *et al.*, 1990). Os diferentes valores obtidos podem estar relacionados com o incremento da razão de aquecimento, sendo que a maior taxa de aquecimento gerou um deslocamento no ponto de fusão.

Na FIGURA 1 estão representadas as curvas de DSC traçadas com razão de aquecimento de 2°C/min, onde verifica-se que as amostras obtidas pelas diferentes recristalizações do fármaco apresentaram ponto de fusão em 194,81°C; 194,76°C; 195,23°C para CQR1, CQR2, CQR3, respectivamente. Pode-se observar

também outros eventos endotérmicos em 205,86°C e 207,95°C para CQR1 e CQR2, respectivamente. Esses eventos podem sugerir a formação de uma ou mais fases co-existindo simultaneamente.

A amostra CQR4 apresenta três eventos endotérmicos, um deles em 189,30°C que corresponde ao ponto de fusão do fármaco hidratado (FIGURA 1). Os outros eventos sugerem a formação de núcleos cristalinos após saturação e, porém, crescimento cristalino em torno dos núcleos, mostrando a formação de novos cristais. Pode-se postular que existe uma primeira fase de transição em 172,75°C e uma segunda fase em 206,96°C, formadas por uma parcial recrystalização iniciada pela presença de uma semente cristalina, resultante da conversão durante o processo de fusão e do processo de saturação. Esses resultados indicam a existência de uma mistura de duas modificações polimórficas em CQR4.

FIGURA 1. Curvas de DSC das amostras do difosfato de cloroquina (CQ), e as recrystalizações CQR1, CQR2, CQR3 e CQR4 obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min) e razão de aquecimento de 2°C/min.

As curvas DSC com razão de aquecimento de 10°C/min (FIGURA 2), mostram que com o aumento da razão de aquecimento houve uma diminuição no número de eventos observados na FIGURA 1 (razão de aquecimento 2°C/min), relacionado a possível junção de picos pela diminuição da sensibilidade, não

permitindo a separação dos mesmos e provocando um deslocamento dos pontos de fusão. Estas modificações podem ser atribuídas ao incremento da razão de aquecimento e modificação da cinética do processo e assim, variação da temperatura aparente de transição sólido-sólido (LACHMAN *et al.*, 2001). Os que são confirmados com a FIGURA 3 que mostra as curvas de DSC com incremento da razão de aquecimento para 20 °C/min onde se observa maior deslocamento dos pontos de fusão. Para amostra CQR4 observa-se um ponto de fusão de 198,94°C mostrando um evento endotérmico deformado, observando-se um pico largo deslocado, confirmando a influência da razão de aquecimento na formação dos eventos endotérmicos.

Os valores de Tonset mostrados na TABELA, 2 comparados com os valores de temperatura máxima dos eventos endotérmicos para as três razões de aquecimento (2°, 10°, 20°C) não apresentam diferença significativa permitindo inferir uma estrutura cristalina possivelmente semelhante, entre o fármaco inicial e as amostras recristalizadas para CQR1-CQR3. Entretanto, os valores comparados para o CQR4 apresentam alguma diferença.

FIGURA 2. Curvas de DSC das amostras do difosfato de cloroquina (CQ), e as recristalizações CQR1, CQR2, CQR3 e CQR4 obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min.

FIGURA 3. Curvas de DSC das amostras do difosfato de cloroquina (CQ), e as recristalizações CQR1, CQR2, CQR3 e CQR4 obtidas sob atmosfera dinâmica nitrogênio (50 mL/min) e razão de aquecimento de 20°C/min.

TABELA 2. Temperatura máxima e Tonset, obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min) e razão de aquecimento de 2°, 10° e 20°C/min.

Amostras	Razão de Aquecimento					
	2° C		10° C		20° C	
	T _{max}	T _{onset}	T _{max}	T _{onset}	T _{max}	T _{onset}
CQK	195,74	198,56	196,09	198,75	204,29	198,74
	194,81	193,99			179,57	176,39
CQR1	208,86	208,36	201,42	193,91	203,65	192,58
	194,75	190,41				
CQR2	207,95	207,44	200,69	192,90	204,15	195,40
CQR3	195,23	191,71	202,04	197,17	205,16	201,74
	172,75	178,62				
CQR4	206,96	185,54	178,10	173,14	198,94	205,72
	189,30	205,97	194,76	188,66		

Estudos demonstraram que podem co-existir as duas formas polimórficas do difosfato de cloroquina e que é possível uma transição da forma anidra para hidratada durante o incremento da umidade relativa e armazenagem, assim como também durante os processos de compressão (BJAEN, *et al.*, 1993).

Por outro lado o tamanho de partícula e a temperatura também exercem influência sobre a transição cristalina e polimórfica (VAN AERDE, *et al.*, 1984) que pode ser evidenciado na diminuição do calor de transição e modificação do ponto de fusão. Então, sabendo que existem alguns fatores como os mencionado anteriormente que modificam a forma cristalina deste fármaco, este estudo aponta a seguir investigando esses fatores. Assim, sabendo que o tamanho de partícula exerce alguma influência os resultados também sugerem a formação de cristais de diferente tamanho correspondentes a duas possíveis modificações cristalinas reportadas na literatura e que se manifestam nos dois diferentes pontos de fusão observados na FIGURA 1, para amostra CQR4.

Os cristais obtidos comercialmente e das diferentes recristalizações, foram examinados recorrendo à microscopia óptica. Esta técnica permite obter dados sobre a morfologia dos cristais formados e suas diferenças. Na FIGURA 4, apresentam-se as imagens captadas com ampliação de 100X (100 vezes) para as amostras comerciais (CQG, CQK) e para as amostras obtidas por recristalização CQR1-CQR4. As amostras CQG e CQK comparadas com as amostras de CQR1 - CQR3, apresentam morfologia semelhante, a forma dos cristais é clara, possui ângulos amplos e definidos, a forma dos cristais é semelhante, esses resultados estão conforme aos resultados obtidos por espectrofotometria no infravermelho e difração de raios-x, como veremos posteriormente.

Para os cristais da amostra CQR4 observa-se uma mudança na morfologia, esta amostra apresenta cristais, não definidos, quando comparados com as outras amostras. Pode-se postular que a morfologia observada confirma os resultados de influência do tamanho de partícula no comportamento polimórfico observados (VAN AERDE, *et al.*, 1984) mediante técnica de DSC.

FIGURA 4. Microscopia dos Cristais do difosfato de cloroquina CQG, CQK e das recrystalizações CQR1, CQR2, CQR3, CQR4.

As recristalizações caracterizadas por Infravermelho permitem observar que as amostras em estudo não apresentam mudança significativa. Na TABELA 3 mostra-se as frequências de absorção das bandas características do fármaco: (A) estiramento N-H da amina secundária entre 3500 - 3300 cm^{-1} ; (B) deformação N-H da amina secundária entre 1640 – 1500 cm^{-1} ; (C) estiramento C=C do benzeno entre 1475 - 1600 cm^{-1} ; (D) estiramento C=N da amina do anel aromático perto de 1610 cm^{-1} ; (E) estiramento C-Cl entre 800-600 cm^{-1} .

Essas frequências são características do espectro e identificam o fármaco puro. Assim, como mostra a FIGURA 5, as bandas das amostras obtidas por recristalização (CQR1-CQR3) correspondem as bandas, (A) e (B) de aminas secundárias e (C) do anel aromático, todas são características do fármaco. Uma pequena diferença aparece na amostra CQR4 donde as bandas apresentam um leve deslocamento de até 5 cm^{-1} , não significativo para a espectroscopia do IV.

TABELA 3. Bandas e frequências de absorção do difosfato de cloroquina e das recristalizações, por espectroscopia de infravermelho.

Amostras	Frequências de absorção (cm^{-1})				
Bandas	A Es. -N-H	B Def. -N-H	C C=C	D C=N	E C-Cl
CQG	3231.1	1549.3	1452.7	1620.1	652.8
CQK	3234.8	1547.8	1452.1	1619.6	653.4
CQR1	3235.6	1553.3	1458.7	1614.0	654.8
CQR2	3234.1	1548.5	1458.9	1616.4	657.5
CQR3	3238.8	1552.2	1458.8	1613.6	654.8
CQR4	3242.0	1553.9	1460.6	1616.2	659.3

FIGURA 5. Espectros do Infravermelho do difosfato de cloroquina (CQG, CQK) e das amostras CQR1- CQR4

Figura 6. Difração do pó por raios-X do difosfato de cloroquina e das amostras, CQR1- CQR4.

Os espectros de difração de pó por raios-x do difosfato de cloroquina e das amostras obtidas por recristalização são ilustrados na FIGURA 6, onde, a partir das dimensões das unidades (cps) e dos ângulos (θ) verifica-se que, em todos os casos, trata-se da mesma estrutura cristalina: sistema cristalino monoclinico, conforme já havia sido demonstrado por FURUSETH, *et al.* (1990).

É curioso notar que as análises por calorimetria diferencial de varredura (DSC) mostram a existência de duas modificações polimórficas na amostra CQR4, porém, as técnicas espectroscópicas e de difração de raios-x não revelam essa diferença. Tal discrepância pode ser atribuída ao fato de que as modificações polimórficas são formadas durante a fase de transição no DSC. Ou seja, o comportamento polimórfico é observado durante os processos de fusão, sendo óbvio que não poderão ser observadas em condições de temperatura ambientais como ocorre com as técnicas espectroscópicas. Este fato também foi observado em estudos realizados por (VAN AERDE, *et al.*, 1984).

4. Conclusão

A partir dos resultados aqui obtidos, verifica-se que o fármaco apresenta cristais do tipo monoclinico tanto nas amostras sem tratamento, como para aquelas obtidas após recristalização em diferentes condições. Para amostra denominada CQR4 (oriunda de recristalização em clorofórmio e etanol) verifica-se uma diferença nos termogramas (DSC) e na análise morfológica (microscopia). Entretanto, os espectros de infravermelho, difração de raios-x não detectaram estas modificações.

Referências bibliográficas*

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

BJAEN, A.-K.B.; NORD, K.; FURUSETH, S.; ÅGREN, T.; TONNESEN, H.H.; KARLSEN, J. Polymorphism of chloroquine diphosphate. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 92, Issues 1-3, n.3, p.183-189, 1993.

BRITISH Pharmacopoeia. 2005. London: The Stationery Office, 2005. v. I, p.449,450

BUCKTON, G. Propriedades do estado sólido. *In*: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2.ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005, p. 135,137.

DOELKER, E. Modifications Cristalines et transformations polymorphs au cours des operations galéniques. **Annales Pharmaceutiques Françaises**. v.60, p. 161-176, 2002.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. São Paulo: EDUSP, 2003.

* As referencias bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

FURUSETH, S.; KARLSEN, J.; MOSTAD, A.; ROMMING, C.; SALMÉN, R.; TONNESEN, H.H. N⁴-(7-Chloro-4-quinoliny)-N¹, N¹-diethyl-1,4-pentanediamine. An X-Ray Diffraction study of chloroquine diphosphate hydrate. **Acta Chemica Scandinavica**. v. 44. p. 741–745, 1990.

HALEBLIAN, J.K. Characterization of habits and crystalline modification of solids and their pharmaceutical applications. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 64, n.8, p. 1269-1288, 1975

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v.I, p.303-311

STOLTZ, M.; CAIRA, M.R.; LOTTER, A.P.; VAN DER WATT, J.G. Physical and structural comparison of oxyphenbutazone monohydrate and anhydrate. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 78, n. 9, p. 758-763, 1989.

MERCK index. 14 ed. Whitehouse Station, NJ. USA. 2006. p.358.

VAN AERDE, P.; REMON, J.P.; DE RUDDER, D.; VAN SEVEREN, R.; BRAECKMAN, P. Polymorphic behaviour of chloroquine diphosphate. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 36, n. 1. p 190-191, 1984.

VILA JATO, J. L. **Tecnología farmacéutica: Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas**. Madrid: Ed. Síntesis, 2001. v. I, p. 44-49.

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

WELLS, J. Pré-formulação farmacêutica. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2.ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005, p. 135,137.